MARCOS PAULO GUILHERME

Atividade *in vitro* de óleos essenciais de *Cinnamomum cassia* (L.) J.Presl, *Myristica fragrans* Houtt, *Schinus terebinthifolius* Raddi, *Zingiber officinale* Roscoe, sobre *Candida albicans*

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

Área de Concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública
Orientadora: Profa. Dra. Maria de Fátima Costa Pires
Co-orientadora: Profa. Dra. Patrícia de Souza Santos

SÃO PAULO
2021

FICHA CATALOGRÁFICA

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

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Guilherme, Marcos Paulo
Atividade *in vitro* de óleos essenciais de *Cinnamomum cassia* (L.) J. Presl, Myristica fragrans houtt, Schinus *terebinthifolius* Raddi Zingiber officinale Roscoe, sobre *Candida albicans*/ Marcos Paulo Guilherme. - 2021.

Dissertação (Mestrado em Ciências) - Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças, São Paulo, 2021.
Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública.
Orientação: Profa. Dra. Maria de Fátima Costa Pires.
Co-orientador: Prof(a) Dr(a) Patrícia de Souza Santos.

1. Candida albicans/crescimento. 2. Óleos voláteis/ análise.

SES/CCD/CD - 428/2021

Elaborada por Renan Matheus Predasoli CRB 8/9275

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

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

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha amada mãe Eunice Francisco Bueno, que sempre foi minha base para tudo na vida, e que sempre acreditou em mim, até quando eu mesmo não acreditava.

Dedico para minha avó Margarida Bueno (in memoriam) que sempre me apoiou, e sempre me ensinou a pensar fora da caixinha mostrando-me que a vida podia ser melhor do que era.

Dedico para meu irmão Marcio Luiz Guilherme que me deu apoio a vida toda, e mesmo sem entender a razão da minha pesquisa, mas sempre achou interessante.

Dedico para minha Esposa Jessica de Paula Cunha Guilherme, que caminha lada a lado comigo, sempre me apoiando e incentivando a estudar, agradeço a ela que abdicou de muitas coisas e momentos porque eu tinha que entregar rsrsrsrrs.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, e a todos que me ajudaram a chegar nessa fase da minha vida me dando apoio, conselhos, puxando minha orelha quando tinham que puxar, mas sei que sempre foi para o meu bem.

Agradeço à minha Família principalmente as minhas tias Neiva, Neuza e Esperança que sempre me ajudaram em tudo.

Agradeço à minha Diretora Luz Marina Trujillo, que me incentivou a ingressar na pós-graduação, e sempre me deu apoio no que fosse preciso para que eu me mantivesse o mais focado na pesquisa.

Agradeço à minha Orientadora Profª Drª Maria de Fatima Costa Pires, pela atenção que me deu desde a primeira conversa antes de iniciar o mestrado até o último dia, agradeço muito pelos conselhos valiosíssimos que sempre me deu, e que irei carregar para toda à vida, um exemplo de pessoa e Pesquisadora que admiro muito e me espelho, muito obrigado por acreditar em mim.

Agradeço muito à minha Co-orientadora Profª Drª Patrícia de Souza Santos, que sempre me acompanhou, e sempre sanou todas minhas dúvidas, que não eram poucas, e me ensinou a ser algo que ela já é, um cientista melhor, e além de tudo isso também adora um bom Rock.

Agradeço a todos os meus amigos do NFQM do Instituto Adolfo Lutz pelo apoio.

Agradeço a todos os meus amigos que sempre me apoiaram nesta jornada.

Agradeço aos colegas do laboratório de microscopia eletrônica, que estiveram literalmente ao meu lado durante essa jornada.

Agradeço ao Instituo Adolfo Lutz e a CCD pela oportunidade concedida.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS 08
LISTA DE FIGURAS E MICROGRAFIAS..... 10
LISTA DE TABELAS..... 11
LISTA DE GRÁFICO..... 12
RESUMO..... 13
ABSTRACT..... 14
1. INTRODUÇÃO..... 15
1.1 Gênero *Candida*..... 15
1.2 Antifúngicos sintéticos 16
1.3 Antifúngicos naturais..... 18
1.4 Óleos Essenciais..... 19
1.5 Espécies vegetais dos óleos essenciais 21
1.5.1 *Cinnamomum cassia* (L.) J.Presl 21
1.5.2 *Myristica fragans* Houtt 23
1.5.3 *Schinus terebinthifolius* Radd..... 24
1.5.4 *Zingiber officinale* Roscoe..... 26
2. OBJETIVOS 28
2.1 Objetivos Gerais 28
2.2 Objetivos Específicos 28
3. MATERIAL E MÉTODOS..... 29
3.1 *Candida albicans*..... 29
3.1.1 Pesquisa de tubo germinativo (Teste de Reynolds - Braude, 1956) 29
3.1.2 Pesquisa de clamidoconídios (Microcultivo em lâmina – Kreger- Van Rij, 1984) 29
3.1.3 Tipagem fenotípica..... 30
3.2 Óleos essenciais..... 31
3.3 Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica dos óleos essenciais e do composto químico majoritário sobre os isolados de *C. albicans* (Eloff, 1998, modificado por Polachini, 2004) 31
3.3.1 Preparação da suspensão de leveduras..... 31

3.3.2 Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica dos óleos essenciais e compostos químico majoritário sobre *C. albicans*..... 31

3.4 Controles..... 32

3.5 Avaliação da atividade fungistática e fungicida dos óleos essenciais e do composto químico majoritário..... 32

3.6 Controle de qualidade e biossegurança..... 33

3.7 Descarte dos resíduos..... 33

4. RESULTADOS..... 34

4.1 *Candida albicans*..... 34

4.2 Avaliação da atividade do óleo essencial de *C. cassia* (L.) J.Presl sobre *C. albicans*..... 34

4.3 Avaliação da atividade do óleo essencial de *M. fragrans* Houtt sobre *C. albicans*..... 39

4.4 Avaliação da atividade do óleo essencial de *S. terebinthifolius* Raddi sobre *C. albicans*..... 43

4.5 Avaliação da atividade do óleo essencial de *Zingiber officinale* Roscoe sobre *C. albicans*..... 48

4.6 Avaliação da atividade do composto químico majoritário aldeído cinâmico do óleo essencial de *Cinnamomum cassia* (L.) J.Presl sobre *C. albicans*..... 54

5 DISCUSSÃO..... 60

6 CONCLUSÕES..... 68

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 69

8 ANEXOS..... 82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A: Ausente

AIDS: Síndrome da imunodeficiência adquirida.

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CDC: *Centers for Disease Control and Prevention*

CFM: Concentração Fungicida Mínima.

CFM50: CIM capaz de inibir o crescimento de 50% dos Isolados.

CFM90: CIM capaz de inibir o crescimento de 90% dos Isolados.

CIM: Concentração Inibitória Mínima.

DMSO: Dimetil Sulfóxido

EPC: Equipamento de Proteção Coletiva.

EPI: Equipamento de Proteção Individual.

et al.: e outros.

EUA: Estados Unidos da América

g: Grama.

HIV: *Human Immunodeficiency Vírus*

ICB - USP: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

IV: Intravenoso.

M: Metro

mg: Miligrama

mL: Mililitro

mm: Milímetro

Mol: Molar

MS: Ministério da Saúde.

NHC: Não Houve Crescimento

OMS: Organização Mundial da Saúde.

P: Presente

PBS: *Phospate Buffer Solution*

pH: Potencial Hidrogeniônico

R: Resistente – Presença de crescimento total do isolado até a porcentagem máxima de cada produto

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute Médium.*

S: Sensível – Ausência de crescimento até a porcentagem mínima do produto.

SNC: Sistema Nervoso Central.

UFC: Unidade Formadora de Colônia

UTI: Unidade de Terapia Intensiva

µg: micrograma.

µL: Microlitro.

%: Porcentagem

°C: graus Celsius.

LISTA DE FIGURAS E MICROGRAFIAS

Figura 1. A - Folhas e flores de *Cinnamomum cassia* (L.) J.Presl

B - Casca da *Cinnamomum cassia* (L.) J.Presl..... **22**

Figura 2. A - Fruto e folhas da *Myristica fragans* Houtt..... **23**

B - Noz moscada seca e em pó *Myristica fragans* Houtt..... **24**

Figura 3. A - Folhas e flores de *Schinus terebinthifolius* Raddi

B – Folhas e frutos *Schinus terebinthifolius* Raddi..... **25**

Figura 4. A – Rizoma fresco com folhas de *Zingiber officinale* Roscoe

B - Rizoma de *Zingiber officinale* Roscoe..... **27**

Figura 5. 1- Isolado de *Candida albicans* antes do contato com óleo essencial de *C.cassia* morfotipo 7540*.

2 - Isolado de *Candida albicans* depois do contato com o óleo essencial de *C.cassia* morfotipo 5341*..... **38**

Figura 6. 1 - Isolado de *Candida albicans* antes do contato com óleo essencial *S. terebinthifolius*, morfotipo 7540*.

2 - Isolado de *Candida albicans* depois do contato com o óleo essencial de *S. terebinthifolius;* morfotipo 7541*..... **47**

Figura 7. 1 - Isolado de *Candida albicans* antes do contato com óleo essencial *Z. officinale* Roscoe; morfotipo 7540*.

2 - Isolado de *Candida albicans* depois do contato com o óleo essencial *Z. officinale* Roscoe morfotipo 5341*..... **53**

Micrografia 1: Clamidoconídeos pseudohifa e hifas presentes em isolado de *Candida albicans* no teste de cultivo em lâmina em ágar fubá após contato com óleo essencial de *C.cassia* (L) Presl..... **38**

Micrografia 2: Tubo germinativos de *C. albicans* após contato com óleo essencial de *Z. officinale* Roscoe..... **52**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Concentração Fungicida Mínima, formação de tubo germinativo, clamidoconídeo e morfotipos de *Candida albicans* antes e após contato com o óleo essencial de *C. cassia* (L.) J. Presl..... **35**

Tabela 2. Valores de CFM50 / CFM90 do óleo essencial de *C. cassia* (L.) J.Presl sobre isolados de *Candida albicans* **36**

.

Tabela 3. Média, desvio padrão, máxima e mínima do óleo essencial de *C. cassia* (L.) J.Presl sobre isolados biológicos de *Candida albicans*..... **36**

.

Tabela 4. Concentração Fungicida Mínima, formação de tubo germinativo, clamidoconídeo e morfotipos de *Candida albicans* antes e após contato com o óleo essencial de *M. fragrans* Houtt **40**

.

Tabela 5. Valores de CFM50 / CFM90 do óleo essencial de *M. fragrans* Houtt sobre isolados de *Candida albicans* **41**

Tabela 6. Média, desvio padrão, máxima e mínima do óleo essencial de *M. fragrans* Houtt sobre isolados biológicos de *Candida albicans*..... **41**

Tabela 7. Concentração Fungicida Mínima, formação de tubo germinativo, clamidoconídeo e morfotipos de *Candida albicans* antes e após contato com o óleo essencial de *S. terebinthifolius* Raddi..... **44**

Tabela 8. Valores de CFM50 / CFM90 do óleo essencial de *S. terebinthifolius* Raddi sobre isolados de *Candida albicans*..... **45**

Tabela 9. Média, desvio padrão, máxima e mínima do óleo essencial de *S. terebinthifolius* Raddi sobre isolados biológicos de *Candida albicans*..... **45**

Tabela 10. Concentração Fungicida Mínima, formação de tubo germinativo, clamidoconídeo e morfotipos de *Candida albicans* antes e após contato com o óleo essencial de *Z. officinale* Roscoe **49**

Tabela 11. Valores de CFM50 / CFM90 do óleo essencial de *Z. officinale* Roscoe sobre isolados de *Candida albicans* de origem humana..... **50**

Tabela 12. Média, desvio padrão, máxima e mínima do óleo essencial de *Z. officinale* Roscoe sobre isolados biológicos de *Candida albicans*..... **50**

Tabela 13. Concentração Fungicida Mínima, formação de tubo germinativo, clamídoconídeo e morfotipos de *Candida albicans* antes e após contato com o composto químico majoritário aldeído cinâmico do óleo essencial de *Cinnamomum cassia* (L.) J.Presl..... **55**

Tabela 14. Valores de CFM50 / CFM90 do composto químico majoritário aldeído cinâmico sobre isolados de *Candida albicans*..... **56**

Tabela 15. Média, desvio padrão, máxima e mínima do composto químico majoritário aldeído cinâmico sobre isolados de *Candida albicans*..... **56**

Tabela 16. Concentração fungicida mínima (CFM) dos óleos essenciais de *C. cassia* (L.) J.Presl, *M. Fragrans* Houtt, *S. terebinthifolius* Raddi, *Z. officinale* Roscoe, e composto químico majoritário aldeído cinâmico do óleo essencial de *C. cassia* (L.) J.Presl sobre os isolados biológicos de *C. albicans*.. ..... **58**

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Número de isolados de *C. albicans* que apresentaram os mesmos morfotipos antes do contato com o óleo essencial de *C.cassia* (L.) J.Presl..... **37**

Gráfico 2. Número de isolados de *C. albicans* que apresentaram os mesmos morfotipos após contato com o óleo essencial de *C. cassia* (L.) J. Presl..... **37**

Gráfico 3 Número de isolados de *C. albicans* que apresentaram os mesmos morfotipos antes do contato com o óleo essencial de *M. fragrans* Houtt..... **42**

Gráfico 4. Número de isolados de *C. albicans* que apresentaram os mesmos morfotipos após contato com o óleo essencial de *M. fragrans* Houtt..... **42**

Gráfico 5. Número de isolados de *C. albicans* que apresentaram os mesmos morfotipos antes do contato com o óleo essencial de *S. terebinthifolius* Raddi..... **46**

Gráfico 6. Número de isolados de *C. albicans* que apresentaram os mesmos morfotipos após contato com o óleo essencial de *S. terebinthifolius* Raddi..... **46**

Gráfico 7. Número de isolados de *C. albicans* que apresentaram os mesmos morfotipos antes do contato com o óleo essencial de *Z. officinale* Roscoe..... **51**

Gráfico 8. Número de isolados de *C. albicans* que apresentaram os mesmos morfotipos após contato com o óleo essencial de Z. officinale Roscoe **51**

Gráfico 9. Número de isolados de *C. albicans* que apresentaram a mesma morfotipagem antes do contato com o composto químico aldeído cinâmico do óleo essencial de *Cinnamomum cassia* (L.) J. Presl..... **57**

Gráfico 10. Número de isolados de *C. albicans* que apresentaram a mesma morfotipagem após contato com o composto químico aldeído cinâmico do óleo essencial de *Cinnamomum cassia* (L.) J. Presl..... **57**

Gráfico 11. Média da Concentração fungicida mínima (CFM) dos óleos essenciais de *C. cassia* (L.), J.Presl (canela), *M. fragans* Houtt (noz moscada), *S. terebinthifolius* Raddi (pimenta rosa), *Z. officinale* Roscoe (gengibre) e do composto químico majoritário aldeído cinâmico do óleo essencial de *C. cassia* (L.) J.Presl sobre isolados biológicos de *C.albicans*..... **59**

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antifúngica dos óleos essenciais de *Cinnamomum cassia* (L.) J.Presl*, Myristica fragrans* Houtt, *Schinus terebinthifolius* Raddi, *Zingiber officinale* Roscoe bem como o composto químico majoritário do óleo essencial com a menor concentração fungicida mínima sobre 16 isolados biológicos de *Candida albicans*. Determinar as concentrações fungicidas mínimas, o efeito dos óleos e do composto químico majoritário, em doses subinibitórias sobre a formação de tubo germinativo, clamidoconídeo e a produção de franjas, nos isolados de *C. albicans*, antes e após contato com os diferentes óleos essenciais e composto químico majoritário. Os quatro óleos essenciais apresentaram atividade inibitória sobre *C. albicans*. *C. cassia* (L.) J.Presl CFM 50 3,23 µg/mL e CFM 90 51,68 µg/mL ,*M. fragrans* Houtt CFM 50 21,437 µg/mL e CFM 90 171.500 µg/mL, *S. terebinthifolius* Raddi CFM 50 42.600 µg/mL e CFM 90 85.200µg/mL, *Z. officinale* Roscoe CFM 50 171.200µg/mL e CFM 90 resistente até a concentração de 171.200 µg/mL, sendo o óleo essencial de *C. cassia* (L.) J.Presl o que apresentou a menor concentração fungicida sobre os isolados de *C. albicans.* Nas doses subinibitórias os óleos essenciais de *C. cassia* (L.) J.Presl (canela)*, M. fragans* Houtt (noz moscada)*, S. terebinthifolius* Raddi (pimenta rosa)*, Z. officinale* Roscoe (gengibre) não inibiram em todos os isolados a formação de tubo germinativo e clamidoconídeo, mas alteraram a produção de franjas. O composto químico majoritário aldeído cinâmico do óleo essencial de *C. cassia* (L.) J.Presl com CFM 50 26,64µg/mL e CFM 90 213,18 µg/mL, apresentou atividade fungicida sobre os isolados de *C. albicans*, mas pouca atividade inibitória na formação de tubo germinativo, clamidoconídeo e produção de franja. O óleo essencial de *C. cassia* (L.) J.Presl (canela)*,* apresentou as melhores concentrações fungicidas mínimas e inibição da formação de tubo germinativo em relação ao composto químico majoritário aldeído cinâmico.

Palavras-chaves: *Candida albicans*/crescimento; Óleos Voláteis/análise.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the antifungal activity of the essential oils of *Cinnamomum cassia* (L.) J.Presl, *Myristica fragrans* Houtt, *Schinus terebinthifolius* Raddi, *Zingiber officinale* Roscoe as well as the major chemical compound of the essential oil with the lowest minimum fungicidal concentration on 16 biological isolates of *Candida albicans*. Determine the minimum fungicidal concentrations, the effect of oils and the majority chemical compound, in subinhibitory doses on the formation of germ tube, chlamydoconid and fringe production, in the isolates of *C. albicans*, before and after contact with the different essential oils and majority chemical compound. The four essential oils showed inhibitory activity on *C. albicans. C. cassia* (L.) J.Presl CFM 50 3.23 µg / mL and CFM 90 51.68 µg / mL, *M. fragrances* Houtt CFM 50 21,437µg / mL and CFM 90 171,500µg / mL, *S. terebinthifolius* Raddi CFM 50 42,600µg / mL and CFM 90 85,200µg / mL, *Z. officinale* Roscoe CFM 50 171,200µg / mL and CFM 90 resistant to concentration of 171,200µg / mL, with the essential oil of *C. cassia* (L.) J.Presl having the lowest fungicidal concentration on the isolates of *C. albicans*. At sub-inhibitory doses, the essential oils of *C. cassia* (L.) J.Presl (cinnamon), *M. fragans* Houtt (nutmeg), *S. terebinthifolius* Raddi (pink pepper), *Z. officinale* Roscoe (ginger) did not inhibit in all isolates formed a germinative tube and chlamydoconidus, but altered the fringe production. The major chemical compound cinnamic aldehyde in the essential oil of *C. cassia* (L.) J.Presl with CFM 50 26.64µg / mL and CFM 90 213.18µg / mL, showed fungicidal activity on the isolates of *C. albicans*, but little inhibitory activity in the formation of germ tube, chlamydoconid and fringe production. The essential oil of *C. cassia* (L.) J.Presl (cinnamon), showed the best minimum fungicidal concentrations and inhibition of germ tube formation in relation to the major chemical compound, cinnamic aldehyde.

Keywords: *Candida albicans /* growth; Volatile oils / analysis.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Gênero *Candida*

Descrito primeiramente por Gruby em 1842 e posteriormente por Robin em 1923, o gênero *Candida* é atualmente classificado como fungo imperfeito ou fungo anamórfico, pertencente a classe dos Blastomycetes, ordem *Cryptococcales* e da família *Cryptococcaceae*, é caracterizado por ser um fungo unicelular, eucarionte, heterotrófico, tem como substância de reserva o glicogênio, na fase assexuada a reprodução é por brotamento unipolar. Algumas espécies têm a propriedade de formar estruturas filamentosas como hifas e pseudohifas sendo esta característica um dos principais mecanismos de defesa dessa levedura (Paes, 2005; Murray et al., 2009).

Candida albicans faz parte da microbiota normal humana, presente na mucosa bucal, vaginal e do trato gastrointestinal em aproximadamente 80% da população sadia. Entre as mulheres cerca de 20 a 30% apresentam colonização na vagina por *C. albicans.* Em condições favoráveis essas leveduras aumentam em número, produzem filamento e penetram no tecido (Sidrim e Rocha, 2004; Trabulsi et al., 2015). *C. albicans* é uma das espécies mais isolada em material biológico humano e responde de 90% a 100% dos isolados da mucosa e 50% a 70% dos isolados de infecções sanguíneas. Estima-se que cerca de 95% de todas as infecções por *Candida* são causadas por quatros espécies: *C. albicans, Candida. glabrata, Candida parapsilosis e Candida tropicalis (*Araújo et al., 2012*;* Levinson et al., 2010*;* Murray et al., 2009*).* Mas ocorreu também um aumento do número de infecções invasivas causadas por espécies não *albicans* tais como *Candida guilliermondii e Candida krusei* (Ruiz et al., 2005; Pupulin et al., 2014; Navarro-Arias et al., 2019) e *C. auris,* uma levedura multirresistente descrita pela primeira vez no Japão em 2009 e relatada em 36 países de seis continentes (Satoh et al., 2009; CCD, 2020; Lima et al., 2020), mas especialmente em indivíduos imunocomprometidos *C. albicans* ainda é a espécie fúngica mais isolada (Ndoricyimpaye et al., 2020).

A maioria dos indivíduos saudáveis desenvolve defesas imunológicas que impedem a proliferação e progressão dessas leveduras para o desenvolvimento de

candidíase (Ruiz et al., 2005). As leveduras podem se tornar patogênicas quando ocorrem alterações no mecanismo de defesa do hospedeiro, como mudança do pH da região, uso de antibióticos de amplo espectro, prótese cardíaca, hospitalização prolongada, diabetes não controlada, ou quando ocorre comprometimento de barreiras anatômicas, tais como queimaduras ou procedimentos médicos invasivos (Oliveira, 2012; ANVISA, 2013; Bezerra et al., 2019; Navarro-Arias et al., 2019).

Os principais fatores de virulência desse gênero incluem a capacidade de adesão, pré-requisito para a transformação da levedura de saprófita a patogênica (Samaranayake, 1992; Pires et al., 2001) e a produção de exoenzimas. Outras propriedades dessa levedura é a formação de tubo germinativo, a variabilidade fenotípica (Samaranayake, 1992), a capacidade de formar hifas e pseudohifas como mecanismo de escape à fagocitose (Kumar et al., 2006; Gacser et al., 2007; Pupulin, 2014; Shan-Ju et al., 2019), produção de metabólitos alergênicos, os quais podem desencadear manifestações de hipersensibilidade tanto do tipo imediato, quanto do tipo tardio. O progresso da infecção está relacionado com uma combinação de fatores, como a virulência da cepa e as desordens imunológicas do hospedeiro. (Furlaneto-Maia et al., 2008; Grubb et al., 2009; Rorig e Colacite, 2009; Mayer et al., 2013; Pupulin, 2014; Shan-Ju et al., 2019).

A morfotipagem é uma técnica que caracteriza *C. albicans* macroscopicamente com relação as diferenças de tamanho e textura de franjas marginais e da superfície das colônias no meio ágar extrato de malte, que pode identificar um morfotipo distinto com capacidade de virulência, onde franjas descontínuas estão presentes geralmente em isolados de infecções sistêmicas fatais.

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

1.2 Antifúngicos sintéticos

Atualmente no mercado farmacêutico existem várias classes de fármacos para o tratamento das infecções causadas por *C.albicans*, e a utilização depende

exclusivamente da localização, as infecções tópicas podem ser tratadas com antissépticos como tintura de iodo, violeta de genciana e ácido salicílico e benzóico, derivados sulfamídicos, quinonas e antifúngicos poliênicos como a nistatina, além dos azóis (cetoconazol, econazol, miconazol, clotrimazol, fluconazol, voriconazol), alilaminas (terbinafina), hidroxipiridona, morfolina, sulfeto de selênio. Em casos mais graves como candidemia disseminada, o uso de anfotericina B lipossomal, e as equinocandinas (caspofungina, micafungina, anidulafungina) essas últimas são uma nova classe de medicamentos que tem se mostrado eficaz contra as leveduras. (Levinson, 2010; Oliveira, 2012; Pappas et al., 2016).

Os agentes antifúngicos tradicionais, azólicos e poliênicos, são dirigidos contra alvos moleculares envolvidos em síntese e estabilidade da membrana dos fungos. As equinocandinas, são uma nova classe de agentes antifúngicos, são lipopeptídeos solúveis em água, que têm como alvo um complexo enzimático envolvido na inibição da síntese da parede celular dos fungos. (Martinez, 2003)

Apesar dos avanços nas medidas profiláticas e terapêuticas frente aos agentes infecciosos, estes continuam representando uma significativa parcela das causas de morte em todo o mundo, impactando, sobretudo na qualidade de vida, mas também na economia, devido aos custos de internações, diagnóstico e tratamento bem como nas ações de saúde pública (Ministério da Saúde, 2017).

As infecções fúngicas são de difícil tratamento e seus agentes etiológicos têm mostrado resistência a ação de antifúngicos. Diversos estudos têm indicado a resistência de *C. albicans* aos azóis (Colombo et al., 2003; Pfaller e Castanheira, 2016).

A toxicidade dos antifúngicos varia dependendo da classe. A toxicidade dos triazólicos está relacionada a toxicidade hepática e pode desencadear também a síndrome de Stevens Johnson, distúrbio gastrointestinal. Os polienos estão relacionados a toxicidade renal (acidose tubular renal, cilindrúria, hipopotassemia), tempestade de citocinas (febre, calafrios, hipotensão), anemia perda de peso, distúrbio gastrointestinal, dermatite de contato. A toxicidade das equinocandinas está relacionada a prurido, exantema, distúrbios gastrointestinais aumento das enzimas hepáticas, tromboflebite, cefaleia, febre (Golan et al., 2014; Ritter et al., 2016).

A busca por novas alternativas para o tratamento destas infecções com produtos naturais se faz necessária.

1.3 Antifúngicos naturais

O conhecimento no uso de plantas no combate a doenças, se confundem com a história da humanidade, e com a sua evolução, esse conhecimento foi passando de geração para geração, até os dias de hoje. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), o estudo das plantas seriam as melhores fontes de obtenção de uma imensa variedade de fármacos, como alternativa para a descoberta de novos fármacos sintéticos. Pelo fato de o Brasil apresentar uma grande extensão territorial, com uma grande diversidade de clima e solo, isso favoreceu a condição do desenvolvimento de uma imensa biodiversidade, para a pesquisa racional e sustentável de novos princípios ativos de valor terapêutico, lembrando que o uso de plantas é a primeira opção no tratamento para a população mais carente. (Gullo, 2012).

No Brasil, o uso de plantas medicinais como recomendação de política pública se sistematizou sob o decreto 5.813, a partir de 2006 com a institucionalização da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF). As diretrizes da (PNPMF) foram detalhadas como ações no Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos em 2008, pelo Ministério da Saúde (MS), a partir da Portaria Interministerial nº 2.960/2008**.** No ano de 2011 a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) lançou o Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira, contribuindo assim para os serviços de fitoterapia e farmácias vivas existentes no Brasil. (Ministério da saúde, 2015; ANVISA 2016; Castro et al., 2020)

A partir do surgimento dessas políticas e programas, houve um aumento no número de pesquisas etnofarmacológicas, a fim da descoberta de novos compostos ativos, pesquisando partes das plantas como folhas, cascas, raízes, flores, tradicionalmente empregados ou observados pelo homem, identificando as espécies mais utilizadas pela população, as quais apresentam atividade antifúngica; assim, vários extratos de plantas, tinturas, óleos essenciais e produtos opoterápicos têm sido testados sobre leveduras, principalmente do gênero *Candida* (Albuquerque

e Hanazaki, 2006; Araújo et al., 2004; Polachini, 2004; Makabe, Santos e Pires 2018 e 2019).

As plantas medicinais possuem composições químicas complexas, envolvendo centenas de compostos fitoquímicos. Quando aplicada como fitoterápico, essa complexidade faz com que tenham aplicação em diversas doenças, nem sempre relacionadas entre si, sendo assim, uma espécie pode servir para mais de uma enfermidade. Porém é importante informar que o uso inadequado das plantas pode desencadear reações adversas graves ao ser humano (Albuquerque e Hanazaki, 2006; Polachini, 2004; Silva et al., 2020).

A atividade antimicrobiana de extratos naturais, é fonte de várias pesquisas publicadas extensivamente em revistas no mundo todo, os mais estudados são: própolis, própolis verde, chá verde (*Camellia sinensis*), tomilho (*Thymus vulgaris*), mamona (*Ricinnus communis*), óleos essenciais de sálvia (*Salvia officinalis*), e capim-limão (*Cymbopogon citratus*), alho (*Allium sativum*) Limão siciliano (*Citrus limon*) entre outros (Leonardo et al., 2001; Pereira et al., 2004; Polachini, 2004; Michelin et al., 2005; Lu, Chen & Chou, 2005; Carreto et al., 2007; Abrahão, 2007; Oliveira, 2007; Silva, 2007; Raimundo e Toledo, 2017).

Silva (2007), avaliou a sensibilidade aos antifúngicos sintéticos e ao extrato etanólico de própolis sobre *C.albicans e C. dubliniensis*, isoladas de pacientes com diagnóstico de HIV positivo e negativo, e concluiu que as amostras que apresentaram resistência ao extrato etanólico de própolis na concentração a 3% apresentaram redução da atividade enzimática e redução ou inibição da produção de franjas, e todas foram sensíveis ao extrato etanólico de própolis a 10%.

1.4 Óleos Essenciais

Os óleos essenciais constituem um dos mais importantes grupos de substâncias para as indústrias farmacêuticas, alimentícias e de cosméticos. Bizzo, Hovell e Rezende (2009), definem óleo essencial como um complexo de substâncias naturais, extraídas de diversas partes de plantas por meio de destilação por arraste com vapor d’água, ou obtidos por prensagem a frio. São constituídos principalmente por substâncias de baixo peso molecular, como os monoterpenos, sesquiterpenos, fenilpropanóides, ésteres, alcoóis, aldeídos e cetonas,

normalmente são utilizados *in natura*, apresentam-se organolepticamente como, líquidos insolúveis em água, porém, solúveis em álcool e em vários solventes imiscíveis na água, odoríferos, normalmente apresentam cor amarelada. (Simões, 2004; Felipe e Bicas, 2017)

De acordo com a família a que pertencem, as espécies de plantas acumulam essas substâncias voláteis em órgãos vegetais específicos: folha, flor, fruto, semente, caule etc. (Gazim et al., 2008). Nas plantas os óleos essenciais são classificados como função secundária, associados a várias funções necessárias à sobrevivência do organismo vegetal em um ecossistema, exercendo o papel fundamental na defesa contra microrganismos e predadores, como também na atração de insetos e outros agentes polinizadores. (Vitti e Brito, 2003; Gazim et al., 2008; Magalhães, 2009)

Cavalcante et al. (2011), estudaram a atividade antifúngica, dos óleos essenciais de *Melaleuca alternifólia* (melaleuca), *Cymbopogon winterianus* (citronela), e *Rosmarinus officinalis* (alecrim), sobre várias espécies de *Candida*, e concluíram que todos os óleos estudados apresentaram atividade antifúngica, destacando-se o óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* (alecrim) que apresentou menor CIM e CFM.

Um estudo feito por Hammer et al. (2000), avaliando a ação de óleos essenciais sobre fatores de virulência de *C. albicans*, concluiu que o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (“tea tree”) inibiu a formação de tubos germinativos e podem ter ação sobre importantes fatores de virulência, como a capacidade de adesão à resina.

Abrantes et al. (2013) relataram que *Candida* não-albicans apresentaram resistência ao óleo essencial de *Coriandrum sativum*, porém a atividade antifúngica de óleos essenciais de *Citrus limonum, Cinnamomum zeylanicum, Eucalyptus globulus, Eugenia coryophyllata, Mentha arvensis, Mentha piperita, Mentha spicata, Origanum vulgare, Pimpinella anisum* foi melhor que o antifúngico sintético sobre espécies não *albicans*.

Estudo feito por Chami et al. (2004) avaliando os compostos majoritários carvacrol, e eugenol dos óleos essenciais de *Thymus vulgaris* e *Origanum vulgaris*, e do óleo essencial de cravo (*Dianthus caryophyllus*), respectivamente em animais,

como resultado, obteve-se uma cura microbiológica significativa, e um espectro de ação melhor na candidíase oral ao comparado com a administração da nistatina.

1.5 Espécies vegetais dos óleos essenciais e suas principais características

1.5.1 *Cinnamomum cassia* (L.) J.Presl

A canela da china é uma das mais antigas especiarias conhecidas, da família Lauraceae e foi descrita inicialmente por Carl Linnaeus. O córtex Cinnamonmi é um nome coletivo empregado para casca de canela medicinal, que em geral inclui duas espécies *Cinnamomum verum* JS Presl, e *Cinnamomum cassia* Blume. Existem variações entre essas duas espécies em relação a botânica, geografia e bioquímica. *C. verum*, conhecido como *C. zeylanicum* Nees ou *C.* laurus, é nativo da Índia e do Sri Lanka, enquanto *C. cassia*, também conhecido como *C. aromaticum* Nees é nativo da China, Indonésia, Laos e Vietnã. A canela falsa foi introduzida na Europa por mercadores árabes e fenícios e até hoje é empregada como substituta de qualidade inferior à da canela verdadeira. Na América do Norte, a canela em pó é vendida sem distinção quanto às espécies das quais a casca é obtida. A casca de *C. cassia* tem um sabor mais picante e menos delicado e é mais espessa que a casca de *C. zeylanicum. C. cassia* é uma árvore perene, medindo até 10 m de altura, suas folhas são alternadas, coriáceas, pecioladas, oblongas, elípticas-ovais ou oblongas-lanceoladas, de 8 a 15 cm de comprimento por 3 a 4 cm de largura, suas flores são brancas amareladas, pequenas. A casca é usada em peças canalizadas ou penas simples, com 30 a 40 cm de comprimento por 3 a 10 cm de largura e 0,2 a 0,8 cm de espessura. Sua superfície é marrom acinzentada, ligeiramente grossa, com rugas irregularmente finas e lenticelas transversais, é muito utilizada na culinária, em cosméticos, pesticida muito utilizado como repelente para formigas. É também muito utilizada na área da saúde em forma de infusão, óleo essencial, por apresentar propriedades medicinais como atividade antimicrobiana, antifúngica, hipoglicemiante, entre outras (Hua Wang et al., 2006; Ervanarium, 2019; Akbar, 2020).

O óleo essencial de *C. cassia* (L.) J.Presl é extraído por destilação a vapor das folhas cascas e talos. Os principais componentes são: aldeído cinâmico (80%),

benzaldeído (2%), cumarina (2%), álcool cinamílico (2%) e estireno (2%), É caracterizado organolépticamente como: líquido amarelo a marrom, de odor característico (Anexo 1).

Figura 1. A - Folhas e flores de *Cinnamomum cassia* (L.) J.Presl

FONTE: HTTPS://BOTANY.CZ/CS/CINNAMOMUM-CASSIA

Figura 1 B - Casca da *Cinnamomum cassia* (L.) J.Presl

FONTE: HTTPS://LINK.SPRINGER.COM/CHAPTER/10.1007/978-3-030-16807-0_67

1.5.2 *Myristica fragans* Houtt

Noz moscada é uma das especiarias, obtidas do fruto da moscadeira uma planta da família das *Myristicaceae*, seu nome científico é *Myristica fragans* Houtt. Árvore de porte alto, atingindo cerca de 10 a 15 metros de altura, com várias ramas dispostas ao longo do tronco principal. Sua madeira é muito boa para confecção de móveis, é nativa das Ilhas Molucas, na Indonésia e foi introduzida na Índia onde é comumente usada. Descrita primeiramente por Johan Frederik Gronovius, a noz-moscada é cultivada na Índia, Ceilão, Malásia e Granada e foi introduzida no ocidente pelos árabes, onde logo se tornou uma especiaria muito procurada e cara. Apresenta sabor picante, amargo, aromático e adstringente. É muito utilizado na aromaterapia, apresenta propriedades terapêuticas medicinais como fungicida, carminativo, digestivo, anti-inflamatório, antioxidante entre outras. Suas partes utilizadas são semente e a casca ou camada que envolve a semente chamada de Mace. (Ervanarium, 2019; Akbar, 2020).

O óleo essencial de *M. fragrans* Houtt é extraído por destilação à vapor dos frutos e os principais componentes são: Sabineno (25%), α−pineno (22%), Terpineno-4-ol (4%), β-pineno (14%), Limoneno (4%), γ-terpineno (3%). É caracterizado organolépticamente como: líquido incolor a amarelo com odor característico (Anexo 2).

Figura 2. A - Fruto e folhas da *Myristica fragans* Houtt

Fonte*:* https://ervanarium.com.br/planta/noz-moscada-plantas-medicinais/

Figura 2. B - Noz moscada seca e em pó *Myristica fragans* Houtt

Fonte: https://www.britannica.com/topic/nutmeg

1.5.3 *Schinus terebinthifolius* Raddi

A pimenta rosa, cujo nome científico é *Schinus terebinthifolius* Raddi faz parte da família das Anacardiaceae, citada inicialmente pelo nome indígena como medicinal por Piso, holandês que visitou o Nordeste em 1637 - 1644, e registrado entre seis espécies pelo médico João Ferreyra da Rosa na sua campanha contra o que parece ser febre amarela em Pernambuco descrita em 1694. É conhecida popularmente como aroeira-da-praia, aroeira-vermelha, aroeira-pimenteira, aroeira-de-remédio entre outros nomes. *S. terebinthifolius*, possui distribuição tropical e subtropical é originária da América do Sul, nativa do Brasil, Paraguai, Uruguai e leste da Argentina. É largamente distribuída por todo território brasileiro, estendendo-se desde Pernambuco até Rio Grande do Sul e pode ser encontrada na Europa, onde a cultivam como espécie ornamental, América Central e Sul dos Estados Unidos, principalmente na Flórida, onde tem um comportamento invasor. Devido à facilidade de adaptação a diversos habitats, a espécie pode sobreviver em estações secas, é facilmente vista por toda a faixa litorânea do Brasil, mas também em terrenos secos, habitando várias formações vegetais. *S. terebinthifolius* atinge de 5-10 m de altura e 30-60 cm de diâmetro com casca grossa, pode ser encontrada na forma de arbusto ou árvore. A copa é ovóide, com um tronco tortuoso, revestido por uma casca grossa, é muito comumente usada na medicina popular, suas partes utilizadas são as folhas, cascas e frutos, nas formas de chás, extratos, banhos, e

óleo essencial, possui ação antimicrobiana, anti-inflamatória, antifúngica, cicatrizante, balsâmica, depurativa e hipotensiva (Gilbert e Favoreto, 2011).

O óleo essencial de *S. terebinthifolius* Raddi é extraído por destilação a vapor dos frutos maduros, os principais componentes são: : γ-terpineno (32%), d-limoneno (20%), α-felandreno (15%), α-pineno (10%), p-cimeno (4%). É caracterizado organolépticamente como: líquido com coloração incolor a verde claro, com aroma fresco (Anexo 3).

Figura 3. A - Folhas e flores de *Schinus terebinthifolius* Raddi

Fonte: https://www.infraestruturameioambiente.sp.gov.br/2016/05/aroeira-mansa-pequena-e-apimentada/

Figura 3. B – Folhas e frutos *Schinus terebinthifolius* Raddi

Fonte: https://www.infraestruturameioambiente.sp.gov.br/2016/05/aroeira-mansa-pequena-e-apimentada/

1.5.4 *Zingiber officinale* Roscoe

O gengibre é uma raiz muito conhecida e utilizada mundialmente e foi uma das primeiras especiarias orientais a chegar no Ocidente. Seu nome científico é *Zingiber officinale* Roscoe, faz parte da família das Zingiberaceae, foi primeiramente descrita, em 1807, pelo botânico inglês William Roscoe. É uma planta originária da região da Ásia Tropical, o óleo utilizado neste trabalho é de origem Chinesa, pode ser conhecida também como Mangarataia, Gengibre, Ginger entre outros, ela é escrita botanicamente como, Planta herbácea podendo atingir 1,50 m de altura, de caule articulado, rizoma horizontal, comprido lateralmente, com ramificações situadas num mesmo plano, digitiformes (mão de gengibre), no vértice das quais se encontram cicatrizes do caule foliáceo; de 14 a 16 cm de comprimento por 4 a 20 mm de espessura. Folhas ordenadas em duas séries (dísticas), com bainha amplexicaule e flores amarelo-esverdeadas em espigas fusiformes. O fruto é uma cápsula trilocular que se fende em três válvulas; as sementes são azuladas e contêm um albúmen carnoso. O rizoma é geralmente articulado formado por tubérculos ovóides, rugosos e prensados uns contra os outros. Há diversas variedades de gengibre popularmente conhecidas: branca, azul e amarela. Adapta-se bem em climas tropical e subtropical, mas tem se adaptado também em regiões mais frias, apresenta sabor picante e quente, apresenta atividades terapêuticas, e é muito utilizado na medicina, ele é indicado em casos de cólicas, dores de garganta, resfriados, náusea e enjoos em geral, gripe, bronquite, rouquidão, asma, reumatismo. (Ervanarium, 2019; Akbar, 2020).

O óleo essencial de *Z. officinale* Roscoe é extraído por destilação à vapor da raiz. Os principais componentes são: α-Zingibereno (33,0%), β-sesquifelandreno (13%), α-curcumeno (8%), β-bisaboleno (6%), α-pineno (2%), Canfeno (6%). É caracterizado organolepticamente como: líquido amarelo a marrom, de odor característico (Anexo 4).

FIGURA 4. A - Rizoma fresco com folha de *Zingiber officinale* Roscoe

Fonte:https://institutopinheiro.org.br/

Figura 4. **B** - Rizoma de *Zingiber officinale* Roscoe

Fonte:https://institutopinheiro.org.br/

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

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar *in vitro* a atividade antifúngica dos óleos essenciais de *Cinnamomum cassia* (L.) J.Presl*, Myristica fragrans* Houtt, *Schinus terebinthifolius* Raddi, *Zingiber officinale* Roscoe, bem como o composto químico majoritário do óleo essencial com a menor concentração fungicida mínima sobre isolados biológicos de *Candida albicans.*

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar *in vitro* a atividade antifúngica dos óleos essenciais de *C. cassia (L.)* J.Presl*, M. fragans* Houtt*, S. terebinthifolius* Raddi, *Z. officinale* Roscoe sobre isolados biológicos de *C.albicans*.

- Determinar as concentrações fungicidas mínimas dos óleos essenciais de *C. cassia* (L.) J.Presl*, M. fragans* Houtt, *S. terebinthifolius* Raddi*, Z. officinale* Roscoe sobre *C.albicans.*

- Avaliar e comparar a formação de tubo germinativo, clamidoconídio e a produção de franjas, em isolados de *C. albicans* antes e após contato com os diferentes óleos essenciais.

- Avaliar e determinar *in vitro* a concentração fungicida mínima do composto químico majoritário do óleo essencial com a menor concentração fungicida mínima sobre *C. albicans.*

- Avaliar e comparar a formação de tubo germinativo e a produção de franjas, em isolados de *C. albicans* antes e após contato com o composto químico majoritário do óleo essencial com a menor concentração fungicida mínima sobre *C. albicans.*

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 *Candida albicans*

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

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

Leveduras com 24 horas de crescimento em ágar Sabouraud dextrose (Difco) - acrescido de 200µg/mL cloranfenicol - foram semeadas em tubos de ensaio contendo 1mL de soro fetal bovino (Gibco) e incubadas a 37ºC por até 3 horas. A pesquisa da formação de tubo germinativo foi observada em duplicata, no microscópio ótico de luz, antes e após contato com os óleos essenciais.

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

Amostras cultivadas em lâmina, como descritas segundo a técnica de Kreger van Rij, 1984; Kutzeman e Fell, 2011. O meio composto por 17,0 g de Ágar "Corn-meal (*Difco*)" acrescido de 2,8 g Tween 20 (*BBL*) e 1000 mL de água destilada (Lacaz, 2002), foi esterilizado em autoclave a 120°C por 15 minutos. No momento do uso, volume de 3 mL foi distribuído em lâminas de microscopia. As leveduras cultivadas anteriormente em ágar Sabouraud-dextrose (*Difco*) por 24 horas foram semeadas em estrias nesta lâmina, e recobertas com lamínula estéril. Essa preparação foi colocada em câmara úmida por até cinco dias, mantida a 25°C, para observação da produção de filamentação e de clamidoconídeos, sendo as leituras

realizadas diariamente. Pesquisa realizada em duplicata, antes e após contato com óleos essenciais.

3.1.3 Tipagem fenotípica

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

Os resultados foram avaliados segundo os aspectos macromorfológicos da franja e superfície das colônias de tal modo que resulte em um biotipo composto por quatro dígitos, de acordo com o modelo de tipificação de Hunter et al., (1989). 1º Franja – distribuição: Ausente (0); Descontínua (>20% da margem) (1); Descontínua (21 a 50% da margem) (2); Descontínua (51 a 90% da margem) (3); contínua, somente na periferia ou fios conspícuos em leques (5); contínuas com filamentos paralelos (7). 2º Franja- comprimento: Ausente (0); igual ou menor do que 2mm (2), de 3 a 5 mm (3); igual ou maior do que 6 mm (5). 3º Franja – Textura: Ausente (0); muito grosseira (1); Intermediária (3); Fina (4). 4º Superfície – Topografia: Lisa (0); Nodular (1); Escavada (2); Crateriforme (4); crateriforme com dobras e pregas (5); Dobras ou pregas (6); Pelos (8).

Após contato com o óleo essencial a pesquisa de tubo germinativo, clamidoconídeo, e tipagem fenotípica foram realizadas em duplicata nas concentrações subinibitórias de cada isolado de *C. albicans* testado. Como controle, isolados sem o contato com o óleo essencial foram avaliados simultaneamente.

3.2 Óleos essenciais

Os óleos essenciais de *Cinnamomum cassia* (L.) J.Presl*, Myristica fragrans* Houtt, *Schinus terebinthifolius* Raddi, *Zingiber officinale* Roscoe foram adquiridos da empresa Ferquima® Ind. Com. Ltda. (Vargem Grande Paulista, São Paulo, Brasil). Os parâmetros de qualidade: aparência, cor, pureza, odor, densidade - 20ºC, índice de refração - 20ºC foram descritos em um relatório técnico anexo (Anexo 1, 2, 3 e 4). Esse fornecedor produz e comercializa óleos essenciais em escala industrial. Todos os óleos essenciais foram mantidos em frasco âmbar, à temperatura ambiente.

A pesquisa com o composto químico majoritário do óleo essencial com a menor concentração fungicida mínima sobre isolados biológicos de *Candida albicans* foi adquirido da empresa Quínari® de Ponta Grossa-Paraná.

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

3.3.1 Preparação da suspensão de leveduras

Os isolados de *C. albicans* foram cultivados em ágar Sabouraud Dextrose (Difco – USA) e incubados em estufa a 37°C por 24 horas. A suspensão dos isolados foi preparada em duplicata a partir de uma cultura de 24 horas, com turbidez equivalente à escala 0,5 de Mc Farland, concentração equivalente a 1-5 x 10^6 UFC/mL (Pfaller et al., 1998). A um mL desta suspensão em PBS pH 7.2 acrescentou-se 9 mL do meio de cultivo RPMI-1640 (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) ajustando-se a suspensão final para 0,5-2,5 x 10^5 UFC /mL.

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

Os ensaios foram realizados em duplicata, em microplacas de fundo chato, com 96 poços. Em cada poço foi colocado uma solução de 100µL de meio RPMI-

1640 (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) acrescido do tensoativo polissorbato Tween 20 a 0,02% (Sigma- Aldrich®), até o 24º poço. No primeiro poço foram colocados 200µL do óleo essencial ou do composto químico a ser testado (100%). A partir do segundo poço, 100µl do mesmo produto testado foi homogeneizado e diluído em série, na base 2 até 24º poço, na sequência foram distribuídos em cada poço 100µL da suspensão da levedura de cada isolado biológico. As placas foram seladas com Parafilm "M"® e incubadas em estufa a 37°C por 24 horas.

3.4 Controles

Em uma placa de microdiluição à parte foi realizado: um controle negativo, para verificar a esterilidade do meio RPMI -1640 (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), um controle negativo do tensoativo, um controle negativo para o óleo essencial e um controle positivo para cada levedura (meio + inóculo). Esta placa foi tampada e incubada em estufa a 37°C, por 24 horas.

3.5 Avaliação da atividade fungistática e fungicida dos óleos essenciais e do composto químico majoritário

Também pode se expressar em termos de concentração fungicida mínima (CFM), considerada como a menor concentração da substância capaz de levar a morte do fungo (Cury,1997), após 24 horas.

A avaliação das atividades fungistática ou fungicida dos óleos essenciais e dos compostos químicos foi realizada em placas de Petri com ágar Sabouraud Dextrose (DIFCO), semeando-se 5µl das três diluições anteriores ao poço com inibição do crescimento fúngico. As placas de Petri com os inóculos foram incubadas em estufa a 37°C por 24 horas.

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

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

3.6 Controle de qualidade e biossegurança

Durante a realização do projeto até a fase dos testes foram seguidas e respeitadas todas as normas de ética e biossegurança. Todas as preparações e análises foram realizadas pelos mesmos técnicos utilizando-se os equipamentos de proteção individual (EPIs) como luvas, avental, máscara, óculos e equipamentos de proteção coletiva (EPC) como cabine de segurança biológica, bico de Bunsen e capela de exaustão (OMS, 2004).

3.7 Descarte dos resíduos

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

4. Resultados

4.1. *Candida albicans*

Os 16 isolados utilizados nesta pesquisa foram reidentificados como *Candida albicans* 100% (16/16) e todos apresentaram tubo germinativo e clamidoconídeos antes do contato com os óleos essenciais

4.2 Avaliação da atividade do óleo essencial de *C. cassia* (L.) J.Presl sobre *C. albicans*

Na tabela 1 observa-se a atividade do óleo essencial de *C. cassia* sobre isolados de *C. albicans.* O isolado de número 3 foi sensível até a concentração de 0,025 µg/mL.

Os valores de CFM50 e CFM90 para o óleo essencial de *C. cassia*, nos diferentes isolados foram 3,23 µg/mL e 51,68 µg/mL respectivamente (Tabela 2).

Em relação à média e o desvio padrão da CFM do óleo essencial de *C. cassia* foi de 12,23 ± 15,37µg/mL (Gráfico 11). Os valores de mínima e máxima apresentados foram de 0,05 µg/mL e 51,68 µg/mL respectivamente (Tabela 3 e 16).

A formação de tubo germinativo ocorreu em 18,75% (03/16) (2,4 e 15) dos isolados após contato com óleo essencial de *C. cassia* (Tabela 1; micrografia 1).

Cinquenta por cento (08/16) dos isolados apresentaram clamidoconídeo após contato com óleo essencial de *C. cassia* (L.) J.Presl (Tabela 1 e micrografia 1).

Os isolados de *C. albicans* apresentaram 7 morfotipos diferentes antes do contato com o óleo essencial de *C. cassia* **(**L.) J.Presl (Tabela 1 e Gráfico 1). Após contato com o óleo essencial encontrou-se 6 morfotipos e 12,5% (2/16) não cresceram após contato com o óleo essencial de *C. cassia* (Tabela 1 e Gráfico 2).

Na Figura 5 (1 e 2) Isolado de *C. albicans* antes e após contato com óleo essencial de *C.cassia* (L.) J.Presl.

Tabela 1 Concentração Fungicida Mínima, formação de tubo germinativo, clamidoconídeo e morfotipos de *Candida albicans* antes e após contato com o óleo essencial de *C. cassia* (L.) J.Presl

Candida albicans* - Óleo Essencial de *C. cassia (L.) J.Presl							
ISOLADOS de *Candida albicans*	**CFM***	**TUBO GERMINATIVO**		**CLAMIDOCONÍDEO**		**MORFOTIPAGEM****	
	µg/mL	Antes do contato com óleo essencial	Após contato com óleo essencial	Antes do contato com óleo essencial	Após contato com óleo essencial	Antes do contato com óleo essencial	Após contato com óleo essencial
1	25,84	P*****	A******	P	A	7540	5346
2	25,84	P	P	P	A	7340	5341
3	S***	P	NHC****	P	NHC	7336	NHC
4	51,68	P	P	P	A	5540	5541
5	25,84	P	A	P	A	7540	5341
6	3,23	P	A	P	A	5540	5541
7	12,92	P	A	P	A	7340	2341
8	25,84	P	A	P	P	5340	NHC
9	0,40	P	A	P	P	7540	7341
10	0,40	P	A	P	P	5346	5346
11	3,23	P	A	P	P	5540	5541
12	0,10	P	A	P	P	5540	5541
13	1,61	P	A	P	A	7540	5341
14	3,23	P	A	P	P	7540	5341
15	0,05	P	P	P	P	7330	5241
16	3,23	P	A	P	P	7340	7341

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

*CFM: concentração fungicida mínima

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

***S - Sensível até a concentração 0,025 µg/mL
****NHC - Não Houve Crescimento
*****P – Presente
******A - Ausente

Tabela 2. Valores de CFM50 / CFM90 do óleo essencial de *C. cassia* (L.) J.Presl sobre isolados de *Candida albicans*.

Óleo Essencial de *C. cassia* (L.) J.Presl		
	CFM50*	CFM90**
µg/mL	3,23	51,68

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

CFM: concentração fungicida mínima;

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

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

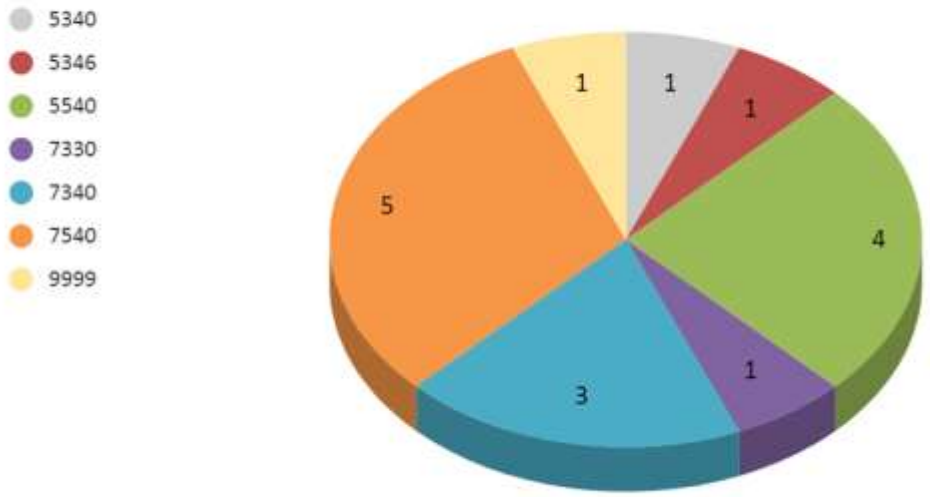
Tabela 3. Média, desvio padrão, máxima e mínima do óleo essencial de *C. cassia* (L.) J.Presl sobre isolados biológicos de *Candida albicans.*

VARIAVEL – CFM*	***C.albicans***
Cinnamomum cassia	N=16
µ ± dp**	12,23 ± 15,37µg/mL
Min.– Max.**	0,05 - 51,68 µg/mL

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

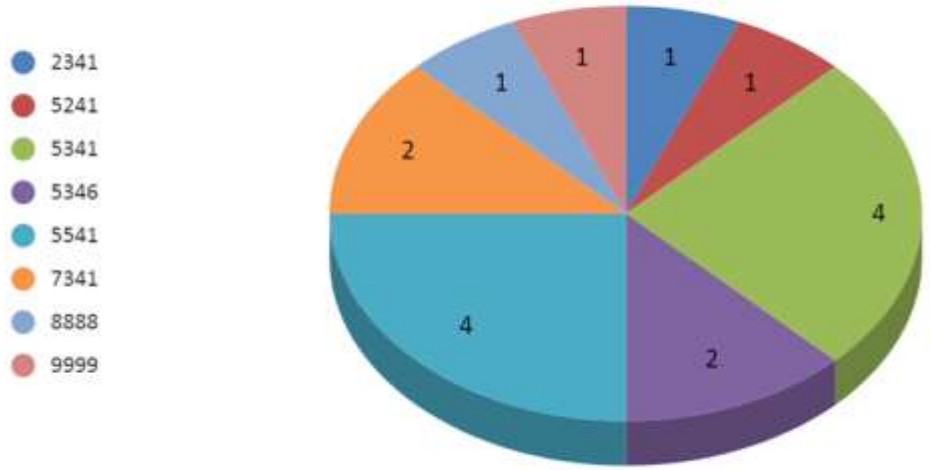
*µ ± dp – Média e desvio padrão

**Min. – Max - Mínima e. Máxima



*9999 = Morfotipo 7336

Gráfico 1. Número de isolados de *C. albicans* que apresentaram os mesmos morfotipos antes do contato com o óleo essencial de *C.cassia* (L.) J.Presl.



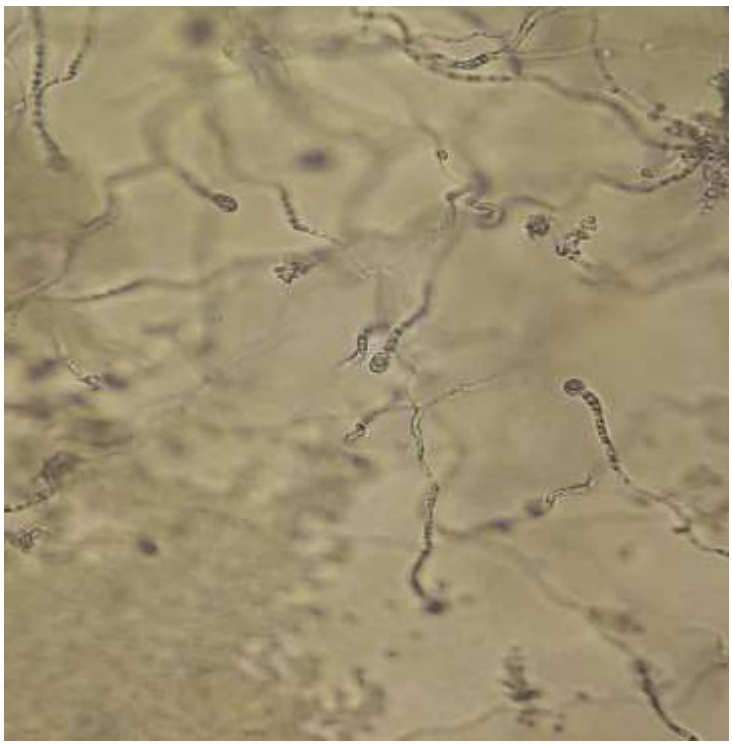
*8888 e 9999 = NHC - Não Houve Crescimento

Gráfico 2. Número de isolados de *C. albicans* que apresentaram os mesmos morfotipos após contato com o óleo essencial de *C. cassia* (L.) J.Presl

Figura 5. 1 - Isolado de *Candida albicans* antes do contato com óleo essencial de *C.cassia* morfotipo 7540*.

2 - Isolado de *Candida albicans* depois do contato com o óleo essencial de *C.cassia* morfotipo 5341*.

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



Micrografia 1: Clamidoconídeos pseudohifa e hifas presentes em isolado de *Candida albicans* no teste de cultivo em lâmina em ágar fubá após contato com óleo essencial de *C. cassia* (L) Presl.

4.3 Avaliação da atividade do óleo essencial de *M. fragrans* Houtt sobre *C. albicans*

Na tabela 4 observa-se a atividade do óleo essencial de *M. fragrans* sobre isolados de *C. albicans.* O isolado de número 4 foi sensível até a concentração de1.339 µg/mL.

Os valores de CFM50 e CFM90 para o óleo essencial de *M. fragrans*, nos diferentes isolados foram 21,437 µg/mL e 171.500 µg/mL respectivamente (Tabela 5).

Em relação à média e o desvio padrão da CFM do óleo essencial de *M. fragrans* foi de 48.478 ± 56715,41µg/mL(Gráfico 11). Os valores de mínima e máxima apresentados foram de 1.339µg/mL e 171.500µg/mL respectivamente (Tabela 6 e 16).

A formação de tubo germinativo ocorreu em 68,75% (11/16) dos isolados após contato com óleo essencial de *M. fragrans* Houtt (Tabela 4).

Todos os isolados (16/16) apresentaram clamidoconídeo após contato com óleo essencial de *M. fragrans* Houtt (Tabela 4).

Os isolados de *C. albicans* apresentaram 12 morfotipos diferentes antes e após contato com o óleo essencial *M. fragrans* Houtt (Tabela 4 e Gráficos 3 e 4).

Tabela 4. Concentração Fungicida Mínima, formação de tubo germinativo, clamidoconídeo e morfotipos de *Candida albicans* antes e após contato com o óleo essencial de *M. fragrans* Houtt

***Candida albicans* - Óleo Essencial de *M. fragrans* Houtt**							
ISOLADOS de *Candida albicans*	**CFM***	**TUBO GERMINATIVO**		**CLAMIDOCONÍDEO**		**MORFOTIPAGEM****	
	CFM µg/mL	Antes do contato com óleo essencial	Após contato com óleo essencial	Antes do contato com óleo essencial	Após contato com óleo essencial	Antes do contato com óleo essencial	Após contato com óleo essencial
1	21.437	P***	A****	P	P	7526	5328
2	42.875	P	A	P	P	7340	5340
3	2.679	P	P	P	P	7336	5336
4	1.339	P	P	P	P	7541	3341
5	10.718	P	P	P	P	7335	2341
6	10.718	P	A	P	P	5540	3341
7	171.500	P	A	P	P	5541	3340
8	171.500	P	P	P	P	5340	0001
9	10.718	P	P	P	P	7330	5531
10	87.500	P	A	P	P	7540	3240
11	87.500	P	P	P	P	7540	3340
12	21.437	P	P	P	P	5540	3341
13	5.359	P	P	P	P	7541	5546
14	21.437	P	P	P	P	7538	5338
15	87.500	P	P	P	P	3200	0000
16	21.437	P	P	P	P	5540	3340

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

*CFM: concentração fungicida mínima

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

***P- Presente

****A - Ausente

Tabela 5. Valores de CFM50 / CFM90 do óleo essencial de *M. fragrans* Houtt sobre isolados de *Candida albicans*.

Óleo Essencial de *M. fragrans* Houtt		
	CFM 50	**CFM 90**
µg/mL	21.437	171.500

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

CFM: concentração fungicida mínima;

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

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

Tabela 6. Média, desvio padrão, máxima e mínima do óleo essencial de *M. fragrans* Houtt sobre isolados biológicos de *Candida albicans.*

VARIAVEL – CFM*	*C.albicans*
Myristica fragrans	N=16
µ ± dp**	48.478 ± 56715,41 µg/mL
Min.– Max.**	1.339 - 171.500 µg/mL

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

*µ ± dp – Média e desvio padrão

**Min. – Max - Mínima e. Máxima

Gráfico 3 Número de isolados de *C. albicans* que apresentaram os mesmos morfotipos antes do contato com o óleo essencial de *M. fragrans* Houtt

Gráfico 4. Número de isolados de *C. albicans* que apresentaram os mesmos morfotipos após contato com o óleo essencial de *M. fragrans* Houtt.

4.4 Avaliação da atividade do óleo essencial de *S. terebinthifolius* Raddi sobre *C. albicans*

Na tabela 7 observa-se a atividade do óleo essencial de *S. terebinthifolius* Raddi sobre isolados de *C. albicans.* O isolado de número 14 foi sensível até a concentração de 2.662 µg/mL.

Os valores de CFM50 e CFM90 para o óleo essencial de *S. terebinthifolius*, Raddi nos diferentes isolados foram 42.600 µg/mL e 85.200µg/mL, respectivamente (Tabela 8).

Em relação à média e o desvio padrão da CFM do óleo essencial de *S. terebinthifolius* Raddi foi de 56.745±46.693,52µg/mL (Gráfico 11). Os valores de mínima e máxima apresentados foram de 2.662µg/mL e 170.400µg/mL respectivamente (Tabela 9 e 16).

A formação de tubo germinativo ocorreu em 56,25% (09/16) dos isolados após contato com óleo essencial de *S. terebinthifolius* Raddi (Tabela 7).

Todos os isolados (16/16) apresentaram clamidoconídeo após contato com óleo essencial de *S. terebinthifolius* Raddi (Tabela 7).

Os isolados de *C. albicans* apresentaram 11 morfotipos diferentes antes e 13 morfotipos diferentes após contato com o óleo essencial *S. terebinthifolius* Raddi (Tabela 7 e Gráficos 5 e 6).

Na Figura 6 (1 e 2) Isolado de *C. albicans* antes e após contato com óleo essencial de *S. terebinthifolius* Raddi.

Tabela 7. Concentração Fungicida Mínima, formação de tubo germinativo, clamidoconídeo e morfotipos de *Candida albicans* antes e após contato com o óleo essencial de *S. terebinthifolius* Raddi

***Candida albicans* - Óleo Essencial de *S. terebinthifolius* Raddi**							
ISOLADOS de *Candida albicans*	**CFM***	**TUBO GERMINATIVO**		**CLAMIDOCONÍDEO**		**MORFOTIPAGEM****	
	CFM µg/mL	Antes contato com óleo essencial	Após contato com óleo essencial	Antes contato com óleo essencial	Após contato com óleo essencial	Antes contato com óleo essencial	Após contato com óleo essencial
1	85.200	P***	A****	P	P	5538	7338
2	85.200	P	P	P	P	7540	7541
3	42.600	P	P	P	P	7236	2235
4	10.650	P	P	P	P	7530	7334
5	170.400	P	A	P	P	5535	0000
6	85.200	P	A	P	P	5540	0000
7	85.200	P	A	p	P	5330	3240
8	85.200	P	P	P	P	5530	0000
9	85.200	P	P	P	P	7330	0001
10	85.200	P	P	P	P	7540	5541
11	21.300	P	P	P	P	7530	5530
12	42.600	P	P	P	P	5540	5541
13	5.325	P	P	P	P	7534	5536
14	2.662	P	A	P	P	5530	1240
15	10.650	P	A	P	P	7330	5341
16	5.325	P	A	P	P	3240	5546

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

*CFM: concentração fungicida mínima

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

***P- Presente

****A - Ausente

Tabela 8. Valores de CFM50 / CFM90 do óleo essencial de *S. terebinthifolius* Raddi sobre isolados de *Candida albicans*.

Óleo Essencial de *S. terebinthifolius* Raddi		
	CFM 50 %	CFM 90 %
µg/mL	42.600	85.200

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

CFM: concentração fungicida mínima;

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

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

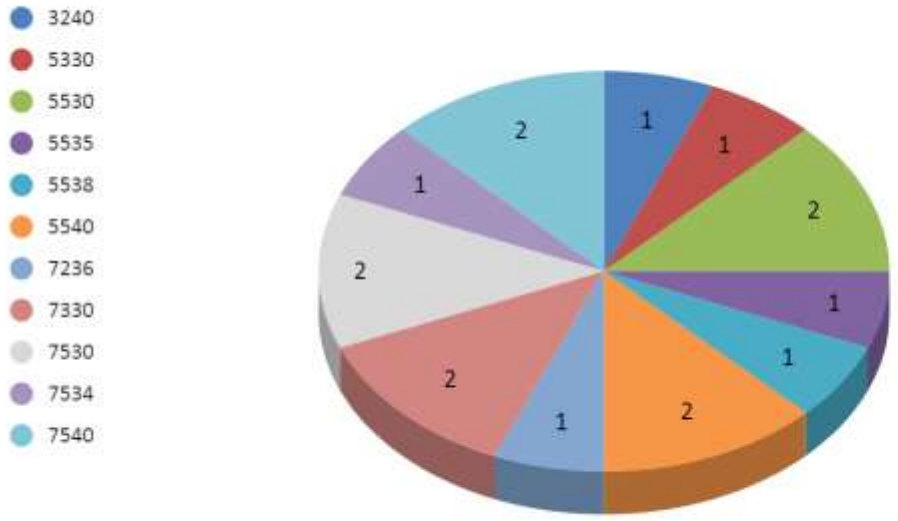
Tabela 9. Média, desvio padrão, máxima e mínima do óleo essencial de *S. terebinthifolius* Raddi sobre isolados biológicos de *Candida albicans.*

VARIAVEL – CFM*	***C.albicans***
Schinus terebinthifolius	N=16
µ ± dp**	56.745 ± 46.693,52 µg/mL
Min.– Max.**	2.662 - 170.400 µg/mL

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

*µ ± dp – Média e desvio padrão

**Min. – Max - Mínima e. Máxima



.

Gráfico 5. Número de isolados de *C. albicans* que apresentaram os mesmos morfotipos antes do contato com o óleo essencial de *S. terebinthifolius* Raddi

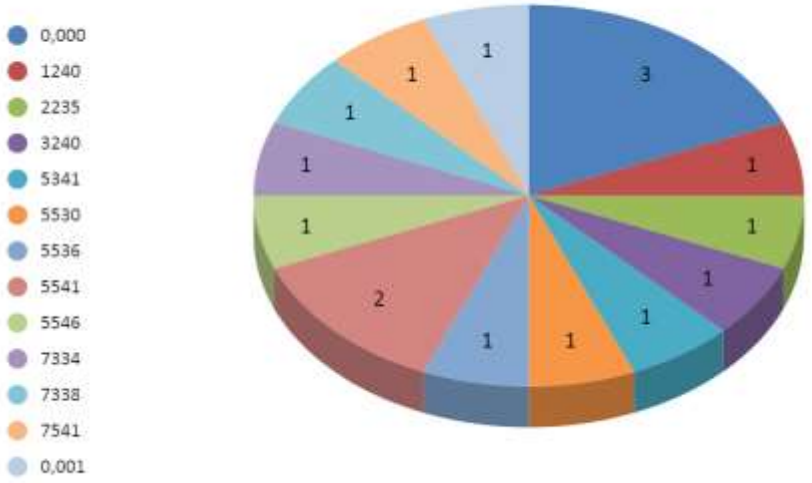


Gráfico 6. Número de isolados de *C. albicans* que apresentaram os mesmos morfotipos após contato com o óleo essencial de *S. terebinthifolius* Raddi.

Figura 6. 1 - Isolado de *Candida albicans* antes do contato com óleo essencial *S. terebinthifolius*, morfotipo 7540*.

2 - Isolado de *Candida albicans* depois do contato com o óleo essencial de *S. terebinthifolius* morfotipo 7541*.

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

4.5 Avaliação da atividade do óleo essencial de *Zingiber officinale* Roscoe sobre *C. albicans*

Na tabela 10 observa-se a atividade do óleo essencial de *Z. officinale* Roscoe sobre isolados de *C. albicans.* O isolado de número 14 foi sensível até a concentração de 2.675µg/mL.

Os valores de CFM50 e CFM90 para o óleo essencial de *Z. officinale* Roscoe nos diferentes isolados foram 171.200µg/mL e resistente, respectivamente (Tabela 11).

Em relação à média e o desvio padrão da CFM do óleo essencial de *Z. officinale* Roscoe foi de 105.663± 84.640,25µg/mL (Gráfico 11). Os valores de mínima e máxima apresentados foram de 2,675µg/mL e 171.200µg/mL respectivamente (Tabela 12 e 16).

A formação de tubo germinativo ocorreu em 50% (08/16) dos isolados após contato com óleo essencial de *Z.officinale* Roscoe (Tabela 10).

Quinze dos dezesseis solados 93,75% (15/16) apresentaram clamidoconídeo após contato com óleo essencial de *Z. officinale* Roscoe (Tabela 10).

Os isolados de *C. albicans* apresentaram 09 morfotipos diferentes antes e 14 morfotipos diferentes após contato com o óleo essencial *Z. officinale* Roscoe (Tabela 10 e Gráficos 7 e 8).

Na Micrografia 2, tubo germinativos de *C. albicans* após contato com óleo essencial de *Z. officinale* Roscoe.

Na Figura 7 (1 e 2) Isolado de *C. albicans* antes e após contato com óleo essencial de *Z. officinale* Roscoe.

Tabela 10. Concentração Fungicida Mínima, formação de tubo germinativo, clamidoconídeo e morfotipos de *Candida albicans* antes e após contato com o óleo essencial de *Z. officinale* Roscoe.

***Candida albicans* - Óleo Essencial de *Z. officinale* Roscoe**							
ISOLADOS de *Candida albicans*	**CFM***	**TUBO GERMINATIVO**		**CLAMIDOCONÍDEO**		**MORFOTIPAGEM****	
	CFM µg/mL	Antes contato com óleo essencial	Após contato com óleo essencial	Antes contato com óleo essencial	Após contato com óleo essencial	Antes contato com óleo essencial	Após contato com óleo essencial
1	5.350	P***	A****	P	P	7538	5338
2	171.200	P	P	P	P	7640	5531
3	171.200	P	P	P	P	7336	5336
4	10.700	P	P	P	P	7540	5541
5	171.200	P	A	P	P	7531	5345
6	R*****	P	A	P	P	5540	3301
7	R	P	A	P	P	7530	7341
8	171.200	P	P	P	P	7540	5341
9	R	P	P	P	P	7340	5240
10	R	P	A	P	P	7340	5240
11	171.200	A	A	P	P	7340	0004
12	171.200	A	A	A	P	7540	0004
13	10.700	P	A	P	P	7330	1240
14	2.675	P	P	P	P	7340	7240
15	R	A	A	A	A	7530	2340
16	R	P	P	P	P	7340	5345

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

*CFM: concentração fungicida mínima

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

***P- Presente

****A - Ausente

*****R= Resistente até a concentração de 171.200 µg/mL

Tabela 11. Valores de CFM50 / CFM90 do óleo essencial de *Z. officinale* Roscoe sobre isolados de *Candida albicans*.

Óleo Essencial de *Z. officinale* Roscoe		
	CFM 50	CFM 90
µg/mL	171.200	R

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

CFM: concentração fungicida mínima;

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

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

Tabela 12. Média, desvio padrão, máxima e mínima do óleo essencial de *Z. officinale* Roscoe sobre isolados biológicos de *Candida albicans.*

VARIAVEL – CFM*	***C.albicans***
Zingiber officinale	N=16
µ ± dp**	105.663± 84.640,25 µg/mL
Min.– Max.**	2.675 - 171.200 µg/mL

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

*µ ± dp – Média e desvio padrão

**Min. – Max - Mínima e. Máxima

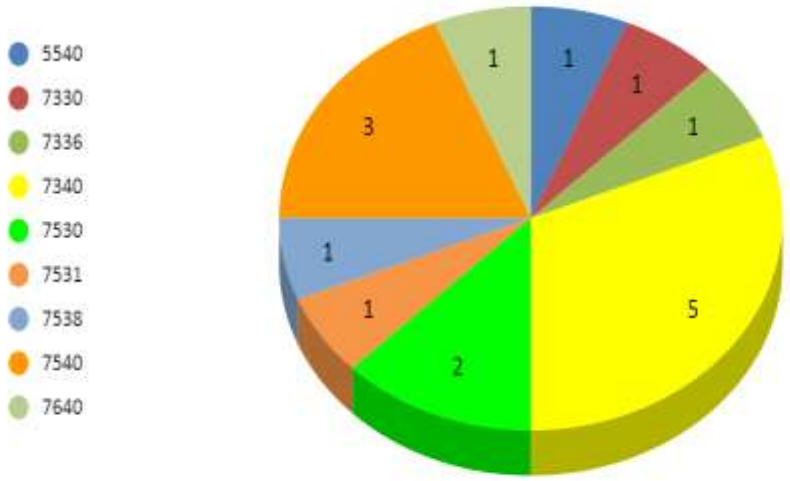


Gráfico 7: Número de isolados de *C. albicans* que apresentaram os mesmos morfotipos antes do contato com o óleo essencial de *Z. officinale* Roscoe

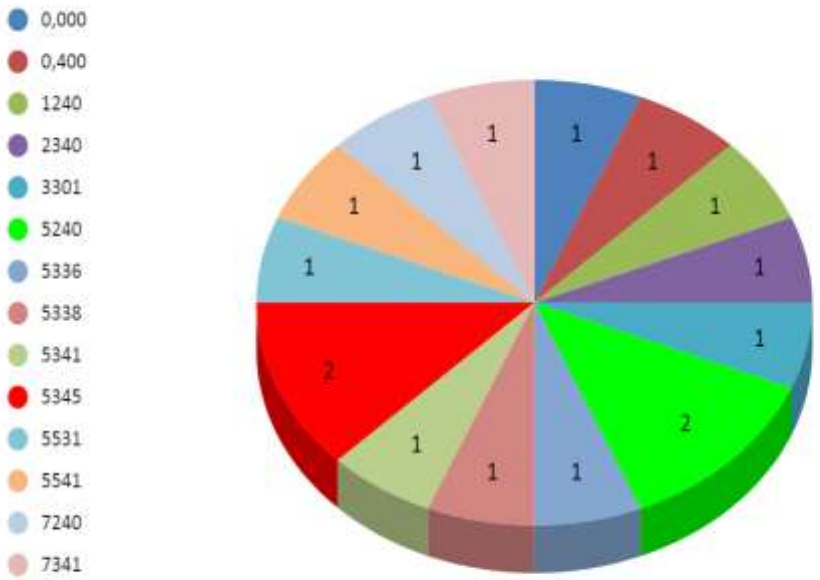
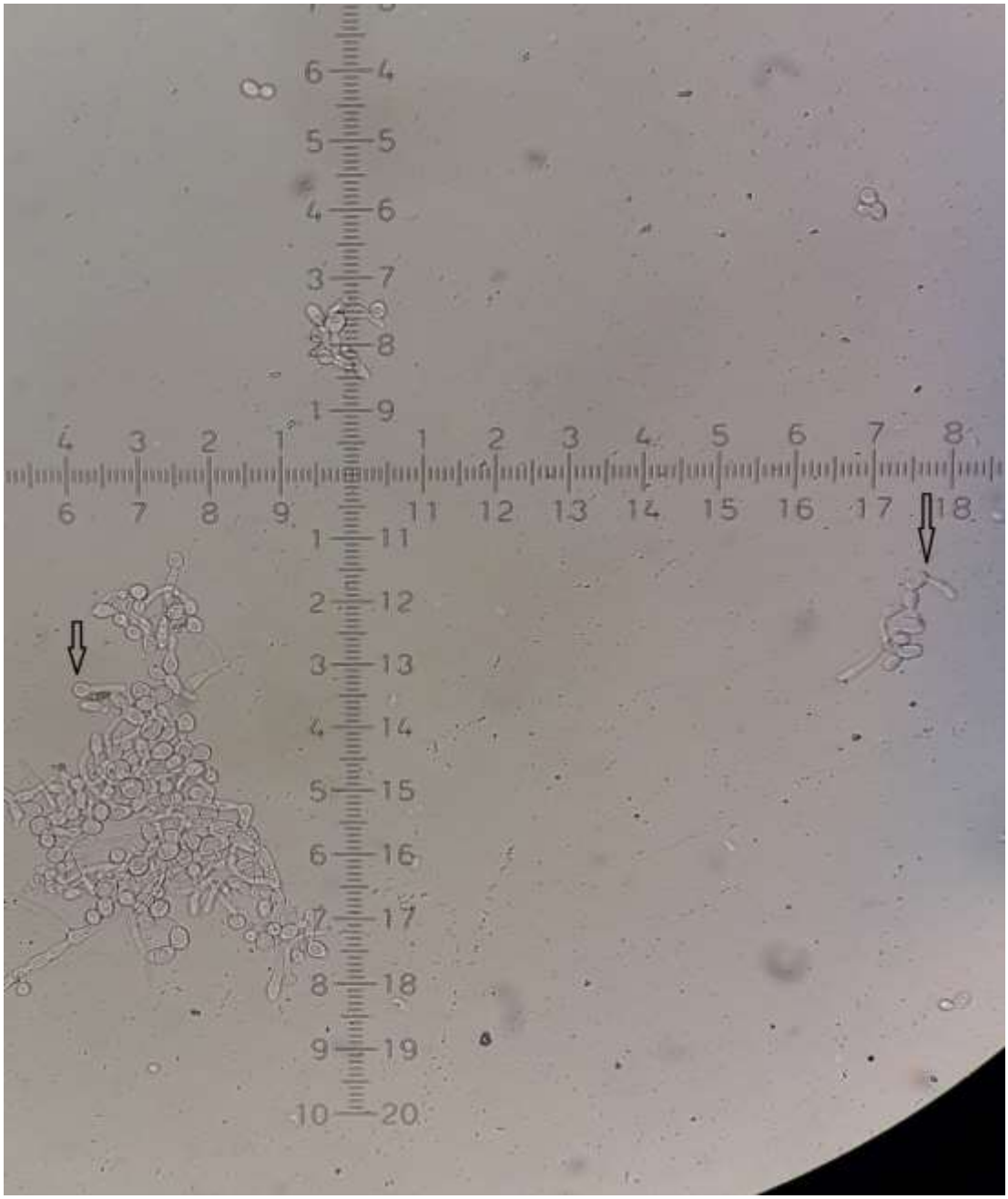


Gráfico 8. Número de isolados de *C. albicans* que apresentaram os mesmos morfotipos após contato com o óleo essencial de *Z. officinale* Roscoe



Micrografia 2. Tubo germinativos de *C. albicans* após contato com óleo essencial de *Z. officinale* Roscoe

Figura 7. 1 - Isolado de *Candida albicans* antes do contato com óleo essencial *Z. officinale* Roscoe morfotipo 7540*.

2 - Isolado de *Candida albicans* depois do contato com o óleo essencial de *Z. officinale* morfotipo 5341*.

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

Dentre os óleos essenciais testados o óleo essencial *C. cassia* apresentou a menor concentração fungicida sobre os isolados de *C. albicans,* para tanto passa-se a apresentar a concentração fungicida mínima do composto químico majoritário aldeído cinâmico (87%); desse óleo essencial sobre os isolados de *C.albcans*, quanto aos fatores de virulência, formação de tubo germinativo e a produção de franjas.

4.6 Avaliação da atividade do composto químico majoritário aldeído cinâmico do óleo essencial de *Cinnamomum cassia* (L.) J.Presl sobre *C. albicans*

Na tabela 13 observa-se a atividade do composto químico majoritário aldeído cinâmico do óleo essencial de *C.cassia* (L.) J.Presl sobre isolados de *C. albicans.* O isolado de número 16 foi sensível até a concentração de 0,20µg/mL.

Os valores de CFM50 e CFM90 para o composto químico majoritário aldeído cinâmico do óleo essencial de *C.cassia* (L.) J.Presl nos diferentes isolados foram 26,64µg/mL e 213,18 µg/mL, respectivamente (Tabela 14).

Em relação à média e o desvio padrão da CFM do óleo essencial de *Z. officinale* Roscoe foi de 48.93 ± 68,97µg/mL (Gráfico 11). Os valores de mínima e máxima apresentados foram de 0,20 µg/mL e 213,18 µg/mL respectivamente (Tabela 15 e 16).

A formação de tubo germinativo ocorreu em 68,75% (11/16) dos isolados após contato com o composto químico majoritário aldeído cinâmico do óleo essencial de *C.cassia* (L.) J.Presl (Tabela 13).

Quinze dos dezesseis isolados 93,75% (15/16) apresentaram clamidoconídeo após contato com o composto químico majoritário aldeído cinâmico do óleo essencial de *C.cassia* (L.) J.Presl (Tabela 13).

Os isolados de *C. albicans* apresentaram 10 morfotipos diferentes antes e após contato com o composto químico majoritário aldeído cinâmico do óleo essencial de *C.cassia* (L.) J.Presl e 25% (4/16) apresentaram o mesmo morfotipo antes e após a atividade do composto químico aldeído cinâmico (Tabela 13 e Gráficos 9 e 10).

Tabela 13. Concentração Fungicida Mínima, formação de tubo germinativo, clamídoconídeo e morfotipos sobre *Candida albicans* antes e após contato com o composto químico majoritário aldeído cinâmico do óleo essencial de *Cinnamomum cassia* (L.) J.Presl

***Candida albicans* - Composto Químico Aldeido Cinâmico**							
ISOLADOS de *Candida albicans*	**CFM***	**TUBO GERMINATIVO**		**CLAMIDOCONIDEO**		**MORFOTIPAGEM****	
	CFM µg/mL	Antes do contato com óleo essencial	Após contato com óleo essencial	Antes do contato com óleo essencial	Após contato com óleo essencial	Antes do contato com óleo essencial	Após contato com óleo essencial
1	26,64	P***	A****	P	P	5538	7535
2	26,64	P	A	P	P	7540	7540
3	213,18	P	A	P	P	7528	7328
4	213,18	P	P	P	P	7540	5538
5	26,64	P	P	P	P	7525	7535
6	26,64	P	P	P	P	7540	7540
7	106,59	P	A	P	A	7340	5340
8	53,29	P	P	P	P	5530	3341
9	26,64	P	A	P	P	5340	5341
10	26,64	P	P	P	P	7340	7341
11	3,33	P	P	P	P	7540	7341
12	13,32	P	P	P	P	5340	5341
13	6,66	P	P	P	P	7541	5541
14	6,66	P	P	P	P	7240	7241
15	6,66	P	P	P	P	7341	7341
16	0,20	P	P	P	P	5340	5340

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

*CFM: concentração fungicida mínima

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

***P- Presente

****A - Ausente

Tabela 14. Valores de CFM50 / CFM90 do composto químico majoritário aldeído cinâmico do óleo essencial de *Cinnamomum cassia* (L.) J.Presl sobre isolados de *Candida albicans* de origem humana.

Composto Químico Aldeído Cinâmico		
	CFM 50	CFM 90
µg/mL	26,64	213,18

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

CFM: concentração fungicida mínima;

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

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

Tabela 15. Média, desvio padrão, máxima e mínima do composto químico majoritário aldeído cinâmico do óleo essencial de *Cinnamomum cassia* (L.) J.Presl sobre isolados de *Candida albicans*.

VARIAVEL – CFM*	*C.albicans*
Aldeído Cinâmico	N=16
µ ± dp**	48.93 ± 68,97µg/mL
Min.– Max.**	0,20 - 213,18µg/mL

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

*µ ± dp – Média e desvio padrão

**Min. – Max - Mínima e. Máxima

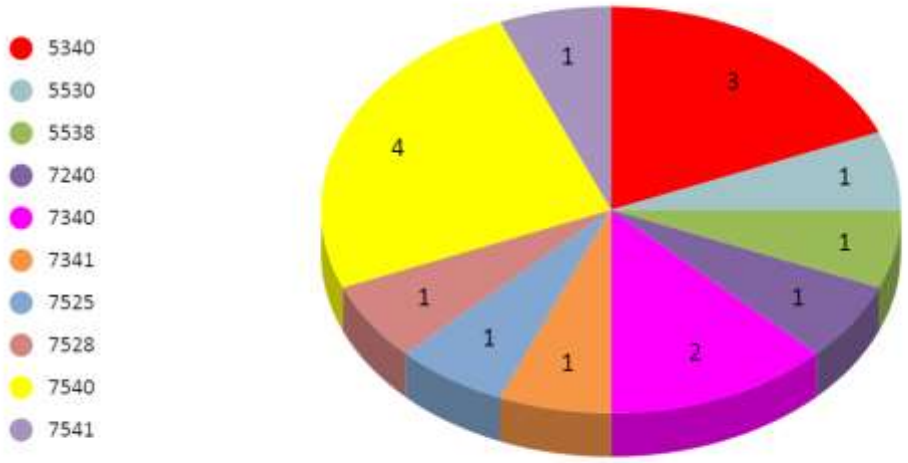


Gráfico 9: Número de isolados de *C. albicans* que apresentaram a mesma morfotipagem antes do contato com o composto químico aldeído cinâmico do óleo essencial de *Cinnamomum cassia* (L.) J.Presl.

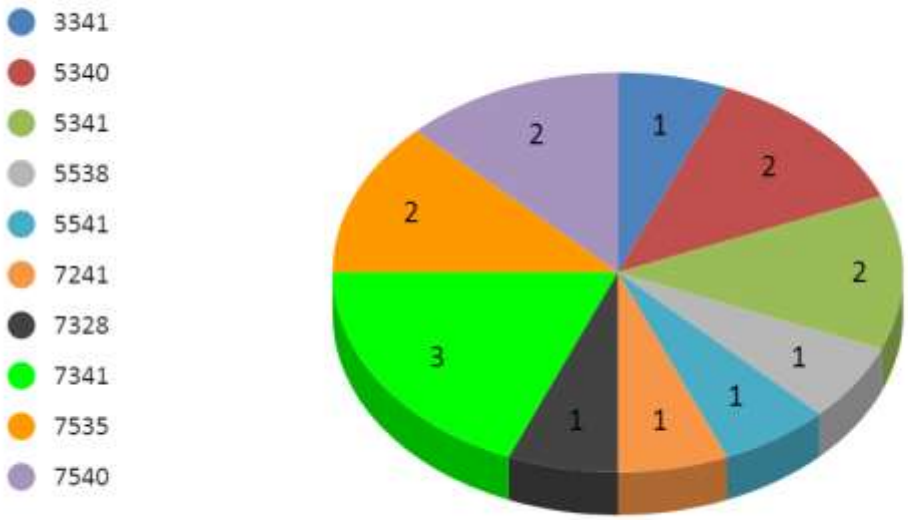


Gráfico 10. Número de isolados de *C. albicans* que apresentaram a mesma morfotipagem após contato com o composto químico aldeído cinâmico do óleo essencial de *Cinnamomum cassia* (L.) J.Presl

Tabela 16. Concentração fungicida mínima (CFM) dos óleos essenciais de *C. cassia* (L.) J.Presl, *M. fragrans* Houtt, *S. terebinthifolius* Raddi, *Z. officinale* Roscoe, e composto químico majoritário aldeído cinâmico do óleo essencial de *C. cassia* (L.) J.Presl sobre os isolados biológicos de *C. albicans*.

Isolados Biológicos	***C. cassia (L.)* J.Presl**	***M.fragrans Houtt***	***S.terebinthifolius* Raddi**	***Z.officinale* Roscoe**	**Composto aldeído cinâmico a 99,67%**
Candida albicans	**CFM* µg/mL**	**CFM µg/mL**	**CFM µg/mL**	**CFM µg/mL**	**CFM µg/mL**
1	25,84	21.437	85.200	5.350	26,64
2	25,84	42.875	85.200	171.200	26,64
3	S**	2.679	42.600	171.200	213,18
4	51,68	1.339	10.650	10.700	213,18
5	25,84	10.718	170.400	171.200	26,64
6	3,23	10.718	85.200	R***	26,64
7	12,92	171.500	85.200	R	106,59
8	25,84	171.500	85.200	171.200	53,29
9	0,40	10.718	85.200	R	26,64
10	0,40	87.500	85.200	R	26,64
11	3,23	87.500	21.300	171.200	3,33
12	0,10	21.437	42.600	171.200	13,32
13	1,61	5.359	5.325	10.700	6,66
14	3,23	21.437	2.662	2.675	6,66
15	0,05	87.500	10.650	R	6,66
16	3,23	21.437	5.325	R	0,20

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

*CFM: concentração fungicida mínima

**S - Sensível até a concentração 0,025 µg/mL

***R= Resistente até a concentração de 171.200 µg/mL

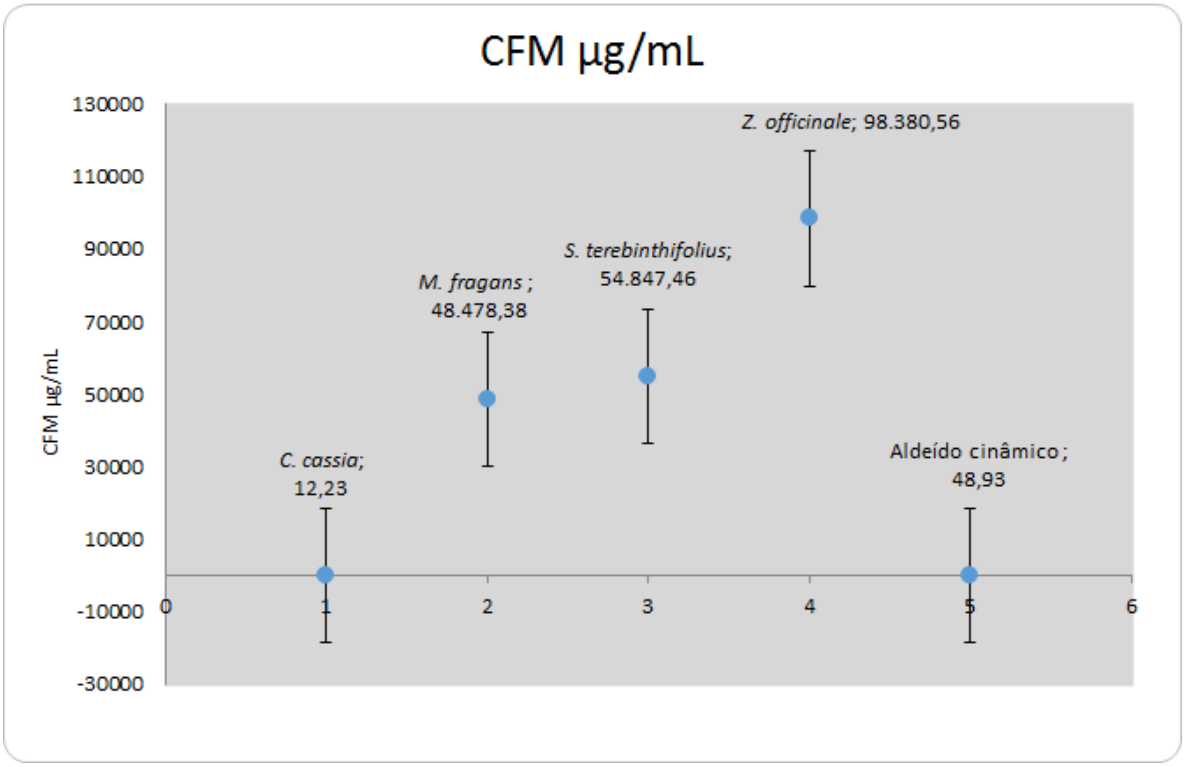


Gráfico 11: Média da Concentração fungicida mínima (CFM) dos óleos essenciais de *C. cassia* (L.) J.Presl (canela), *M. fragans* Houtt (noz moscada), *S. terebinthifolius* Raddi (pimenta rosa), *Z. officinale* Roscoe (gengibre) e do composto químico majoritário aldeído cinâmico do óleo essencial de *C. cassia* (L.) J.Presl sobre isolados biológicos de *C.albicans.*

5. Discussão

Os óleos essenciais são substâncias químicas naturais, voláteis, odoríficos, exploradas e empregadas a cerca de 3500 anos pela humanidade, quimicamente, os terpenos podem ser definidos como “alcenos naturais”, isto é, apresentam uma dupla ligação carbono-carbono sendo caracterizado como um hidrocarboneto insaturado (Felipe e Bicas, 2017).

As análises físico-químicas dos óleos essenciais demonstram que estes são constituídos por diferentes compostos, como hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos, cetonas, entre outros, os quais são responsáveis pelas propriedades físico-químicas e biológicas são misturas complexas de compostos lipofílicos, de baixo peso molecular como os monoterpenos, sesquiterpenos, fenilpropanóides, ésteres, alcoóis, aldeídos e cetonas, normalmente são utilizados *in natura*, pois suas propriedades estão associadas a vários componentes que formam cada óleo em particular, nas plantas são caracterizadas como compostos secundários, e são responsáveis pela defesa da planta, ou para atrair polinizadores por exemplo, mas quando são extraídos de diversas partes de plantas (flores, botões, folhas, ramos, casca, semente, frutas, lenho, raízes e rizomas) por meio de destilação por arraste com vapor d’água e o uso pode ser empregado tanto na indústria alimentícia quanto na farmacêutica, entre outras, os óleos essenciais são bem empregados no campo da medicina tradicional chinesa, e em outras práticas terapêuticas como a aromaterapia (Simões et al., 2004).

Os gêneros capazes de elaborar os constituintes que compõem os óleos essenciais estão divididos em várias famílias, tais como: Myrtaceae, Lauraceae, Rutaceae, Lamiaceae, Asteraceae, Apiaceae, Cupressaceae, Zingiberaceae, Poaceae, Myristicaceae, Piperaceae dentre outras (Sarto e Junior, 2014).

Nesta pesquisa foram estudados 16 isolados biológicos de *C. albicans* de origem humana, desconhecidos quanto ao material biológico de onde foram isolados e mantidos em meio de cultura ágar Sabouraud Dextrose (Difco – USA) no Núcleo de Microscopia Eletrônica do Instituto Adolfo Lutz. Na reidentificação todos os isolados apresentaram tubo germinativo e baseando-se especialmente nas diferenças de produção e extensão de franjas das colônias, nesta pesquisa obteve-se morfotipos com franjas contínuas com filamentos paralelos (7) e morfotipos com franjas contínua, somente na periferia ou fios conspícuos em leques (5) e

descontínua (>20% da margem) (1) e com comprimento Igual ou menor do que 2mm (2) e com 3 a 5 mm (3); igual ou maior do que 6 mm (5).

Atualmente, as leveduras do gênero *Candida* são um dos agentes de infecção hospitalar que representam um desafio para a sobrevida de pacientes internados em estado grave. Estas leveduras são consideradas o principal grupo de fungos patogênicos oportunistas, representando cerca de 8-10% das causas de infecções sanguíneas nosocomiais em UTIs (CDC, 2020).

Pappas et al. (2016), relataram que a candidemia é uma das causas mais frequentes de infecções da corrente sanguínea associadas aos cuidados de saúde em muitos hospitais dos EUA. *Candida* sp representa o terceiro ou quarto agente mais isolado na corrente sanguínea adquirida no hospital, sendo *C. albicans* a espécie mais isolada. Mas as espécies não - *albicans* de *Candida* juntas representam aproximadamente 50% dos isolados da corrente sanguínea e essa tem sido uma tendência crescente em muitos hospitais em todo o mundo há mais de uma década.

O Programa de Infecções Emergentes (PIE) do CDC, avaliando 45 municípios de 9 Estados dos EUA, mostrou que em 2017 foram identificadas um total de 1.226 casos de candidemia. O estudo estima que tenham ocorridos por volta de 23.000 casos de candidemia com IC95% nos Estados Unidos em 2017. O número estimado de mortes foi de 3.000 pessoas, IC95%. (Tsay et al., 2018).

O gênero *Candida* possui fatores de virulência como a formação de hifas e pseudohifas, como mecanismo de escape a fagocitose (Samaranayake, 1992; Gacser et al, 2007; Martins et al., 2015). O progresso da infecção está relacionado a uma combinação de fatores como virulência da cepa e desordens imunológicas do hospedeiro (Furlanento-Maia et al., 2008; Grubb et al., 2009; Rorig, Colacite e Maxwel, 2009; Pupulin, 2014).

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

Baseando-se nas diferenças de produção e extensão de franjas das colônias obtidas por meio da semeadura de isolados, em meio de ágar extrato de malte,

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

São várias as metodologias para a pesquisa da atividade antifúngica dos óleos essenciais frente às leveduras tais como: difusão em ágar, difusão em disco, macrodiluição em tubos e microdiluição em caldo, fitas de Etest e sistemas automatizados, sempre partindo de variações individuais como: tamanho do inóculo, temperatura do meio, tempo de incubação, meio de cultura. Porém a comparação dos valores de CFM entre alguns estudos é dificultada (Chang et al .,2001).

A escolha do método de microdiluição em caldo para esta pesquisa deve-se ao fato deste método ser de baixo custo, boa reprodutibilidade dos resultados, possibilidade de preparação de grande quantidade de placas a partir da mesma série de diluições de antimicrobianos sem necessidade de equipamentos complexos para leitura, pois é feita visualmente e por ser mais sensível que outros métodos usados na literatura, requer pequena quantidade de óleos essenciais, assim como para seus respectivos compostos químicos majoritários testados (Ostrosky et al., 2008).

Óleos essenciais são insolúveis em água, mas solúveis em solventes orgânicos, por esse motivo a pesquisa *in vitro* com óleos essenciais, requer a utilização de solventes, mas que não interfiram no estudo. Para uma boa qualidade das análises com óleos essenciais, tornou-se importante a utilização de agentes tensoativos como o *Tween* 20, *Tween* 80 e os solventes DMSO e etanol, para dispersão dos óleos essenciais no meio de cultura. Esses agentes auxiliam na visualização dos resultados da atividade antimicrobiana dos óleos; porém, podem acarretar possíveis interações com a substância testada, bem como produzirem atividade antimicrobiana (Nascimento et al., 2007).

Toledo (2013) utilizou os tensoativos *Tween* 20 (polissorbato 20) e *Tween* 80 (polissorbato 80), sobre cepas padrão de *C. albicans,* ambos não apresentaram atividade fungicida e fungistática. Já o uso do solvente DMSO o resultado foi de uma atividade fungicida a 25% v/v (2.500 µg/mL). Uma vez que não se observou diferenças dos tensoativos, optou-se pelo tensoativo *Tween* 20 para todos os ensaios, uma vez que possui a menor concentração, fácil homogeneização no meio de cultura e por não apresentar atividade fungicida. Nascimento et al. (2007) e Santos (2016) recomendaram a utilização do *Tween* 20 a 0,02% como emulsificador para os testes com óleo essencial.

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

A sazonalidade também pode interferir na composição química e no teor de óleo essencial. Kapur, Vashist & Atal (1982) observaram que ao destilarem folhas de *E. citriodora* Hk. durante um ano, a intervalos mensais, que a produção de óleo essencial foi mínima durante os meses de inverno (junho e julho), mas que aumentou gradualmente e permaneceu assim até os meses de setembro, outubro e novembro e alcançou o máximo de produção durante os meses mais quentes (dezembro a fevereiro). Observaram que houve um pequeno declínio nos meses de março e abril.

Os terpenos presentes em óleos essenciais são classificados de acordo com o número de unidades de isopreno que entraram em sua montagem, os monoterpenos e sesquiterpenos, com estruturas terpênicas de menor massa molecular, apresentam volatilidade acentuada. Essa última característica, por sua vez, apresenta grande importância para o aroma dos produtos naturais, particularmente de frutas cítricas, ervas aromáticas, especiarias e condimentos. O tipo de solo, a temperatura e a luminosidade são fatores que influenciam a qualidade do terpeno produzido pelo vegetal e geralmente, a maior quantidade de luminosidade (sem excessos) melhora a qualidade dos terpenos produzidos. O emprego do uso de óleos essenciais como antimicrobiano e antifúngico são estudados a muito tempo e tem sido objeto de diversas pesquisas em todo o mundo. (Felipe e Bicas, 2017).

Neste trabalho fez-se opção por adquirir óleos essenciais comercializados por uma empresa que mostrou se preocupar com a obtenção de matérias-primas vegetais de qualidade, no país de origem da planta, possibilitando com isso a obtenção de óleos essenciais com composição química constante e com resultados de atividades biológicas confiáveis.

Os óleos essenciais estudados nesse trabalho foram *Cinnamomum cassia* (L.) J.Presl*, Myristica fragrans* Houtt, *Schinus terebinthifolius* Raddi, *Zingiber officinale* Roscoe e que apresentaram atividade antimicrobiana sobre os isolados de *C. albicans.*

Nesta pesquisa, o óleo essencial de *C. cassia* foi o que apresentou a menor concentração fungicida contra *C. albicans*, bem como em doses subinibitórias, inibindo a formação de tubo germinativo e de clamidoconídeos. Por outro lado, não apresentou atividade sobre a produção e o tamanho de franjas.

Powers et al. (2018) observaram a atividade antifúngica e citotóxica do óleo essencial de *C. cassia* sobre isolados de *C.albicans, Cryptococcus neoformans e Aspergillus niger.*

Gucwa et al. (2018) pesquisaram a atividade dos óleos essencias *T. vulgaris, Citrus limonum, Pelargonium graveolens, Cinnamomum cassia, Ocimum basilicum,* e *Eugenia caryophyllus* avaliada sobre 183 isolados de *C.albicans* e 76 isolados de *C. glabrata.* Todos os óleos apresentaram atividade contra os isolados *C. albicans* e *C. glabrata*, mas com a menor concentração fungicida de *C. cassia*. Todos os óleos inibiram a transição da levedura para a formação de micélio, mas este efeito foi menor no óleo de canela.

Ooi et al. (2006) avaliaram a atividade antimicrobiana de óleos essenciais de duas espécies de canela, *C. verum* e *C. cassia* e do composto químico cinamaldeido ou aldeído cinâmico, presente em 85% no óleo essencial de *C. cassia.* Ambos foram eficazes na inibição dos fungos filamentosos e leveduras das espécies de *Candida* (*C. albicans, C. tropicalis, C. glabrata* e *C. cruzi*).

Giordani et al. (2006) avaliaram o potencial antifúngico do óleo essencial de *C. cassia* sobre *C. albicans* e quando associado ao antifúngico sintético anfotericina B, houve uma potencialização na ação do antifúngico, mostrando-se promissor para o desenvolvimento de terapias menos tóxicas e mais eficazes, especialmente para o tratamento de paciente acometidos por HIV.

Nesta pesquisa, os isolados biológicos de *C. albicans* apresentaram pouca sensibilidade ao óleo essencial de *M. fragrans*, assim como a formação de tubos germinativo e clamidoconídeos, porém ocorreu a redução da produção e tamanho das franjas.

Setty et al. (2020) observaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *M. fragrans* sobre os patógenos presentes em canais radiculares de dentes primários entre eles entre eles *C. albicans* utilizando o método de diluição seriada e mostrou-se eficaz para todos os microrganismos. Ferrão et al. (2020), observaram uma moderada concentração fungicida mínima de *M. fragrans* sobre *C. albicans.*

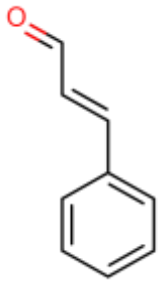
Prasath, Sethupathy e Pandian (2019), avaliaram a atividade do ácido mirístico, um composto majoritário do óleo essencial de *M. fragrans* sobre a formação de biofilme de *C. albicans* e concluíram que esse composto majoritário apresentou atividade inibitória sobre a formação do biofilme.

Nesta pesquisa, o óleo essencial de *S. terebinthifolius*, não apresentou uma boa atividade antifúngica, mas alterou a produção e o tamanho das franjas sobre vários isolados de *C. albicans.*

Pozzatti et al. (2008) e Sharifzadeh e Shokri (2016), avaliaram a atividade antifúngica de diferentes óleos essenciais sobre *C. albicans* e observaram, assim como neste trabalho, que alguns isolados de *C. albicans* apresentaram resistência ao óleo essencial de *Z. officinale* em 37,5% (6/16) dos isolados a concentração de 100% (171.200µg/mL) deste óleo essencial.

O aldeido cinâmico também é conhecido com outros sinônimos:(E) - ácido 3-fenil-2-propenóico; ácido cinâmico; ácido trans; cinâmico, ácido fenilacrílico; ácido 3-fenilacrílico. Sua fórmula molecular: C_9H_8O2; massa molecular: 148,17g/mol. É um composto fenólico presente com propriedades antimicrobianas e anti-inflamatórias. O cinamaldeído presente na canela, é um líquido amarelado e oleoso, ligado principalmente ao óleo essencial e está presente em grande quantidade nesta planta. É o principal composto que confere o aroma amadeirado a canela (Gruenwald et al., 2010; Singh, 2018; Pubchem, 2020). É considerado um antioxidante potente, atuando na redução dos níveis de LDL (lipoproteína de baixa densidade), devido a esse fato, seu consumo é recomendado por estar relacionado com a diminuição do risco de algumas doenças como certos cânceres e doenças cardiovasculares (Auger et al., 2004).

É utilizada em várias áreas como cosmética, muito empregada em produtos alimentícios como aromatizante, de alimentos e bebidas, bastante utilizada também na área farmacêutica. Estudos apontam que o aldeído cinâmico apresenta atividades fungicida, larvicida, anti-inflamatória e antibiótica sobre bactérias Gram positivas e Gram negativas, além de apresentar efeitos hipoglicemiante em ratos, seu mecanismo de ação ainda tem que ser estudado para melhor esclarecimento (Figueiredo et al., 2017; Chemicalize, 2020).



Aldeído Cinâmico

Fonte: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/

O composto aldeído cinâmico (cinamaldeído), é o composto majoritário do óleo essencial de *C cassia,* descrito pelos químicos franceses Eugene Peligot e Jean Baptiste Dumas. Este composto foi escolhido nesta pesquisa por ser encontrado em maior quantidade no óleo essencial de *C. cassia,* cerca de 87% de sua composição (Figueiredo et al., 2017; Chemicalize, 2020). É um composto fenólico com propriedades antimicrobianas e anti-inflamatórias. É um líquido amarelado e oleoso, ligado principalmente ao óleo essencial e está presente em grande quantidade nesta planta. É o principal composto que confere o aroma amadeirado a canela (Gruenwald, Freder e Ambruester, 2010; Singh, 2018).

O aldeído cinâmico, de sabor doce, adicionado aos alimentos e medicamentos para melhorar o sabor, está presente como aromatizador de doces e pode ser encontrado em uma série de alimentos como aspargos, goiaba e nas flores. Isso faz do aldeído cinâmico um potencial biomarcador para o consumo desses produtos alimentícios (O'neil, 2006).

Nesta pesquisa, os isolados de *C. albicans,* nas doses subinibitórias, foram mais sensíveis ao óleo essencial de *C. cassia*, em relação ao seu composto aldeído

cinâmico, tanto na formação de tubo germinativo, quanto na produção e tamanho das franjas.

Powers et al. (2018) também avaliaram o composto aldeído cinâmico, que apresentou atividade fungicida inibindo o crescimento *C. albicans C. neoformans e A.niger .*

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

6. CONCLUSÕES

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

- Os óleos essenciais de *C. cassia* (L.) J.Presl (canela), *M. fragans* Houtt (noz moscada), *S. terebinthifolius* Raddi (pimenta rosa), *Z. officinale* Roscoe apresentaram atividade fungicida sobre isolados biológicos de *C.albicans.*

- O óleo essencial de *C. cassia* (L.) J.Presl (canela) foi o que apresentou a menor concentração fungicida sobre os isolados de *C. albicans.*

- Nas doses subinibitórias os óleos essenciais de *C. cassia* (L.) J.Presl (canela), *M. fragans* Houtt (noz moscada), *S. terebinthifolius* Raddi (pimenta rosa), *Z. officinale* Roscoe não inibiram em todos os isolados a formação de tubo germinativo e clamidoconídeo, mas alteraram a produção de franjas.

- O composto químico majoritário aldeído cinâmico do óleo essencial de *C. cassia* (L.) J.Presl apresentou atividade fungicida sobre os isolados de *C. albicans*, mas pouca atividade inibitória na formação de tubo germinativo, clamidoconídeo e a produção de franja.

- O óleo essencial de *C. cassia* (L.) J.Presl (canela), apresentou as melhores concentrações fungicidas mínimas e inibição da formação de tubo germinativo em relação ao composto químico majoritário aldeído cinâmico.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

Akbar S. Handbook of 200 Medicinal Plants [Livro on line] pp 629-643, [acesso Setembro 2020]; Disponivel em: https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-3-030-16807-0_67

Albuquerque UP; Hanazaki N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e pespectivas; Revista Brasileira de Farmacognosia, [periodico on line] 2006, [acesso Agosto 2020]

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária Brasil Memento Fitoterápico da Farmacopeia Brasileira - 1ª edição, 2016.

ANVISA - Agência Nacional De Vigilância Sanitária – Microbiologia Clínica para O controle de Infecção Relacionada a Assistência à Saúde Módulo 4: Procedimentos Laboratoriais: da Requisição do Exame à Análise Microbiológica e Laudo Final. 2013.

Araújo JCLV, Lima EO, Ceballos BSO, Freire KRL, Souza EL, Filho LS. Ação antimicrobiana de óleos essenciais sobre microrganismos potencialmente causadores de infecções oportunistas. Rev Patol Trop. 2004; 33(1): 55-64. DOI: https://doi.org/10.5216/rpt.v33i1.3189

Araújo SM, Fontes CJF, Leite JDP, Hahn RC. Fungal agents in different anatomical sites in public health services in Cuiabá, state of Mato Grosso, Brazil. Rev. Inst. Med. Trop. [periódico on line] São Paulo. 2012, 54: 5-10. [acesso em 05 2019], Disponivel em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22370747/

Auger C, Laurent N, Laurent C, Bensançon P, Caporiccio P, Teissédre PL, Rouanet JM. Hydroxycinnamic acids do not prevent aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic Golden Syrian hamsters. Life Sciences. 2004;74(19):2365-77.

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

Bizzo HR, Hovell AMC, Rezende CM. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. Quim. Nova. 2009;32 (3): 588-94. http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422009000300005

Brasil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução Diretoria Colegiada n° 33 de 25/02/2003.ANVISA,seção I,p.13-16.

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

Castro MR, Figueiredo FF. Estudos e pesquisas sobre o uso de plantas medicinais e fitoterápicos no brasil: caminhos e desafios Revista electrónica de recursos en internet sobre geografía y ciencias sociales Universidad de Barcelona. 2020; 24. Disponível em https://revistes.ub.edu/index.php/aracne/article/view/30986 [acesso em Jun 2020]

Cavalcante YW, Aldeida LFD, Padrilha WWN. Atividade Antifúngica de Três Óleos Essenciais Sobre Cepas de *Candida.* Rev Odontol Bras Central. 2011;20(52).

CDC – Center for Disease Control and Prevention. Guidance for Detection of Colonization of *Candida auris*, Disponível em: https://www.cdc.gov/fungal/candida-auris/c-auris-guidance.html [acesso em Jun 2020]

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

Chami N, Chami F, Bennis S, Trouillas J, Remmal A. Antifungal treatment with carvacrol and eugenol of oral candidiasis in immunosuppressed rats. Braz J Infect Dis. 2004;8(3)217-26. doi: 10.1590/S1413-86702004000300005

Chang HC, Chang JJ, Chan SH, Huang AH, Wu TL, Lin MC, Chang TC. Evaluation of Etest for Direct Antifungal Susceptibility testing of Yeasts in Positive Blood Cultures; J Clin Microbiol. 2001; 39(4):1328–33. doi: 10.1128/JCM.39.4.1328-1333.2001

Colombo AL, Guimarães T. Epidemiology of Hematogenous Infections due to *Candida* spp. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2003;36: 599-607.

Felipe LO, Bicas L. Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais; Quím. Nova esc. – São Paulo - SP. 2017;39(2):120-30. http://dx.doi.org/10.21577/0104-8899.20160068

Ferrão SK, Butzge J, Mezzomo L, Cali LNl, Apel M, Mezzari A, Limberger RP. Atividade antifúngica de óleos essenciais frente a *Candida spp*. / Antifungal activity of essential oils against Candida spp. Brazilian Journal of health Review, Braz. J. Hea. Rev., Curitiba. 2020;3(1):100-113 DOI:10.34119/bjhrv3n1-007

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

Figueiredo CSSS, Oliveira PV, Saminez WFS, Diniz RM, Rodrigues JFS, Silva MSM, et al. Óleo essencial da Canela (Cinamaldeído) e suas aplicações biológicas. Rev. Investig, Bioméd. 2017; 9(2): 192-7. DOI: 10.24863/rib.v9i2.143

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

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

Gazim ZC, Rezende CM, Fraga SR, Svidzinski TIE, Cortez DAG. Antifungal activity of the essential oil from Calendula officinalis L. (asteraceae) growing in Brazil. Braz. J. Microbiol. 2008;39(1):61-3. http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822008000100015

Gilbert B, Favoreto R. *Schinus terebinthifolius* Raddi, Revista Fitos. 2011;6(1) [periódico on line] [acesso setembro 2020].

Giordani R, Regli P, Kaloustian J, Portugal H. Potentiation of antifungal activity of amphotericin B by essential oil from *Cinnamomum cassia*. Phytother Res. 2006;20(1):58-1. doi: 10.1002/ptr.1803

Grubb SEW, Murdoch C, Sudbery PE, Saville SP, Lopez-Ribot JL, Thomhill MH. Adhesion of *Candida albicans* to Endothelial Cells under Physiological Conditions of Flow. Infect. Immun. 2009;77(9): 3872-8. DOI: 10.1128/IAI.00518-09

Gruenwald J, Freder J, Armbruester N. Cinnamon and Health. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2010; 50:822–34.

Gucwa K, Milewski S, Dymerski T, Szweda P. Investigation of the Antifungal Activity and Mode of Action of *Thymus vulgaris, Citrus limonum, Pelargonium graveolens, Cinnamomum cassia, Ocimum basilicum*, and *Eugenia caryophyllus* Essential Oils. Molecules. 2018;23(5):1116. doi: 10.3390/molecules23051116.

Gullo FP. Antifúngicos naturais e sintéticos: estudo dos mecanismos de ação em sistema de infecção in vitro empregando cepas de *Cryptococcus* [Dissertação] Universidade estadual paulista - unesp "julio de mesquita filho" 2012, Disponível em: https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/94790/gullo_fp_me_arafcf.pdf?sequence=1&isAllowed=y [acesso em Jun 2020]

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

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

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

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

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

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

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

Levinson W. Microbiologia médica e imunologia [recurso eletrônico] /Warren Levinson; tradução: Martha Maria Macedo Kyaw. – 10. ed. – Dados eletrônicos. – Porto Alegre: AMGH, 2010.

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

Lu LC, Chen YW, Chou CC. Antibacterial activity of propolis against *Staphylococcus aureus*. Int J Food Microbiol. 2005;102(2):213-20.

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

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

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

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

Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms Virulence. 2013;4(2):119–28, Disponivel em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3654610/ [acesso em Junho 2020]

Michelin DP, Moreschi PE, Lima AC, Nascimento GGF, Paganelli MO, Chaud MV. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais, Revista Brasileira de Farmacognosia. 2005;15(4):316-320. https://doi.org/10.1590/S0102-695X2005000400010

Ministério da Saúde. Programa de Fitoterápico e Plantas Medicinais, Ministério da Saúde 2015 https://www.gov.br/saude/pt-br/acesso-a-informacao/acoes-e-programas/programa-de-fitoterapico-e-plantas-medicinais. Portaria De Consolidação Nº 5, de 28 de Setembro de 2017. [acesso em Ago 2020]

Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA; [trad Carlos Pelleschi Taborda... et al.]. Microbiologia médica 6ª ed - Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.700 – 730

Navarro-Arias, M.J.; Hernández-Chávez, M.J.; Garcia-Carnero, L.C.; Amezcua-Hernández, D.G.; Lozoya-Pérez, N.E.; Martínez-Duncker, I.; Franco, B.; Mora-Montes, H.M. Differential recognition of Candida tropicalis, Candida guilliermondii, Candida krusei, and Candida auris by human innate immune cells.Infect. Drug Resist. 2019, 12, 783–794.

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

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

Oliveira JC. Tópicos em Micologia Médica. 2012;3ª ed.51-58.

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

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

O'Neil MJ. (ed.). The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. Whitehouse Station, NJ: Merck and Co., Inc., 2006., p. 383. In: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/. [acesso em Out 2020).

Ooi LSM, Li Y, Kam SL, Wang H, Wong EYL, Ooi VEC. Antimicrobial Activities of Cinnamon Oil and Cinnamaldehyde from the Chinese Medicinal Herb *Cinnamomum cassia* Blume. Am J Chin Med. 2006; 34(3): 511-22. doi: 10.1142/S0192415X06004041

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

Paes ALV. Aspectos Clínicos, Epidemiológicos, Microbiológicos e Terapêuticos da Candidemia Nosocomial em Unidades Neonatal e Pediátrica em um Hospital Geral em Belém/ Pará. [Dissertação] Universidade Federal do Pará Núcleo de Medicina Tropical Curso de Mestrado em Doenças Tropicais, Belém/ Pará, 2005.

Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, Clancy CJ, Marr KA, Ostrosky- Zeichner L, et al; Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. Clinical Infectious Diseases. 2016;62(4):1-50. https://doi.org/10.1093/cid/civ933

Pereira RS, Sumita TC, Furlan MR, Jorge AOC, Ueno M. Antibacterial activity of essential oils on microorganisms isolated from urinary tract infection. Rev Saúde Pública 2004;38(2):326-8.

Pfaller MA, Messer AS, Karlsson A, Bolmstrom A. Evaluation of the Etest method for determining fluconazole susceptibilities of 402 clinical yeast isolates by using threen different agar media. J. Clin. Microbiol. 1998; 63: 2586 – 2589.

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

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

Pires MFC, Correa B, Gambale W, Paula CR. Experimental model of *Candida albicans* (serotypes a and b) adherence in vitro. Braz. J. Microbiol. 2001;32(3):163-9. ISSN 1678-4405, Disponivel em: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1517-83822001000300001&script=sci_abstract [acesso em Maio 2020]

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

Polachini CO. Avaliação in vitro de extratos de plantas e produtos diversos, frente a amostras de *Candida Albicans*/Anticandidal activity in vitro of plants extracts and diverses products in isolated from Candida albicans. [Tese] LILACS, 2004. Disponivel em: https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-398662 [acesso em Setembro 2020]

Pozzatti P, Scheid LA, Spader TB, Atayde ML, Santurio JM, and Alves SH. In vitro activity of essential oils extracted from plants used as spices against fluconazole-

resistant and fluconazole-susceptible *Candida* spp. Canadian Journal of Microbiology. 2008;4(11). https://cdnsciencepub.com/doi/abs/10.1139/W08-097

Powers CN, Osier JL, McFeeters RL, Brazell CB, Olsen EL, Moriarity DM, Satyal P, Setzer WN. Antifungal and Cytotoxic Activities of Sixty Commercially-Available Essential Oils. Molecules. 2018;23(7):1549.

Prasath KG, Sethupathy S, Pandian SK. Proteomic analysis uncovers the modulation of ergosterol, sphingolipid and oxidative stress pathway by myristic acid impeding biofilm and virulence in *Candida albicans*, Journal of Proteomics. 2019;208(30)103503 https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.103503

Ritter JM, Flower R, Henderson G, Loke YK, MacEwan D, Eang HP. Rang & Dale: Farmacologia/; [tradução] Gea textos SL: revisão científica Denis de Mello Souza, Rio de Janeiro: Gen editorial Nacional AS, Guanabara Koogan. 2016; 8ªed:716-1527.

Raimundo JS, Toledo CEM. Plantas com atividade antifúngica no tratamento da candidíase: uma revisão bibliográfica, Revista Uningá. 2017;29(2):75-80

Reynolds R, Braude AI. The filament inducing property of blood for *Candida albicans*; its nature and significance. Clinical Research Proceeding. 1956;4: 40-4.

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

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

Santos PS; Avaliação in vitro da Atividade Antifúngica dos óleos essenciais de *Eugenia caryophyllus*, *Thymus vulgaris* e seus compostos químicos majoritários sobre *Cryptococcus neoformans*. [dissertação] Programa de pós-graduação em ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, 2016.

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

Sarto MPM, Junior GZ. Atividade Antimicrobiana de Óleos Essenciais, Revista UNINGÁ. 2014;20(1):98-102, [acesso em Maio 2020].

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

Setty JV, Srinivasan I, Sathiesh RT, Kale M, Shetty VV, Venkatesh S. In vitro evaluation of antimicrobial effect of *Myristica fragrans* on common endodontic pathogens. J Indian Soc Pedod Prev Dent. 2020; 38:145-51

Sharifzadeh A, Shokri H. Antifungal activity of essential oils from Iranian plants against fluconazole-resistant and fluconazole-susceptible *Candida albicans*, Avicenna J Phytomed. 2016;6(2):215-22. Disponivel em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27222835/ [acesso em Fev 2020]

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

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

Sidrim JJC, Rocha MFG. Candidíase. In: Sidrim, José Júlio Costa; Rocha, Marcos Fábio Gadelha. Micologia médica à luz de autores contemporâneos. Rio de Janeiro; editora Guanabara-Koogan, 2004. p. 265-274.

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

Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre, RS: Ed. da UFSC, 2004.

Singh B, Kaur A, Singh N, Singh JP. Phenolic compounds as beneficial phytochemicals in pomegranate (Punica granatum L.) peel: a review. Food Chemistry, v. 261, p. 75-86, 2018.

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

Trabulsi LR, Alterthum F, Martinez MB, Campos LC, Gompertz OF, W.G, Rácz ML. Microbiologia, 6ª ed. – São Paulo, 2015.

Tsay S, Willians S, Mu Y, Epson E, Johnston H, Farley MM, et al. 363. National Burden of Candidemia, United States, 2017. 2018; 5(1): 142-3.

Vitti AS, Brito JO. Óleo Essencial de Eucalipto. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – Universidade de São Paulo. 2003; n.1.

Websites (figuras utilizadas na dissertação):

https://botany.cz/cs/cinnamomum-cassia/ [acesso em jul 2020]

https://www.britannica.com/topic/nutmeg [acesso em jul 2020]

https://chemicalize.com/ [acesso em nov 2020]

https://ervanarium.com.br/planta/noz-moscada-plantas-medicinais/ [acesso em jul 2020]

https://institutopinheiro.org.br/ [acesso em jul 2020]

https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-16807-0_67 [acesso em jul 2020]

https://www.infraestruturameioambiente.sp.gov.br/2016/05/aroeira-mansa-pequena-e-apimentada/ [acesso em jul 2020]

http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/637511 [acesso em nov 2020]

8. ANEXOS

1.*CANELA CASSIA*

FERQUIMA

LAUDO TÉCNICO
Óleo Essencial de Canela Cássia
(Cinnamomum cassia)

Lote: 225	CAS Number: 8007-80-5
Fabricação: Junho/2018	Validade: Junho/2021

Itens Controlados	Resultados	Especificações
Aparência	Líquido	Líquido
Cor	Amarelo	Amarelo a Marrom
Impurezas	Isento	Isento
Odor	Característico	Característico
Densidade (20°C)	1,053	1,045 – 1,065
Índice de Refração (20°C)	1,612	1,595 – 1,615
Rotação Ótica		[-1° ; +1°]
Data da Análise	24/08/2018	
Origem	China	
Resultado	**Aprovado**	
Principais Componentes (aprox.)	Aldeido cinâmico = 80% Cumarina = 2% Benzaldeído = 2% Álcool cinâmico= 2 % Estireno = 2%	
Extração	Destilação a vapor das folhas, talos, casca	
Obs.: não contem OGM nem foi utilizado para teste em animais.		
Este produto é 100% puro, isento de solvente e diluente e segundo a RDC 481/99, não suscetível a contaminação microbiológica.		

Recomendações Especiais	
Manuseio	Perigos mínimos, máscara e luvas recomendável. Não ingerir. Não colocar o produto em contato com a pele, olhos e mucosa. Se isso ocorrer, lavar imediatamente com água límpida em abundância. Pode causar irritação à pele sensível. Em caso de derramamento, absorver o material derramado com material absorvente (areia, terra).
Incêndio	Caso haja fogo, utilizar extintor de pó químico seco e água em forma de neblina, não utilizando jatos de água para não espalhar o produto. Flash Point: 91°C.
Explosividade	Nenhum perigo em condições normais.
Uso	Este produto destina-se exclusivamente ao uso profissional / industrial e como é elaborado a partir de substâncias naturais pode apresentar pequenas variações de cor e cromatografia sem causar qualquer problema na performance do produto.
Armazenamento	Armazenar em local seco, longe de umidade e do calor, protegido da luz, em recipiente original bem vedado. Não reutilizar a embalagem vazia.
Transporte	Número de risco:60 / Número da ONU:2810 / Classe ou Subclasse de risco: 6.1 / Descrição da classe ou subclasse: Tóxico, líquido, orgânico / Grupo de Embalagem: III

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

Engenheira Química Responsável: Alice Lasthaus CRQ: IV 04330754

Empresarial Raposo Tavares - Alameda 4, 76 • Vargem Grande. Paulista • SP • CEP: 06730-000
Tel.:11.3500.6108 / 11.3500.6109 - WhatsApp.:11.98346.0743
e-mail: atendimento@ferquima.com.br
www.ferquima.com.br
FERQUIMA Ind. e Com. Ltda

2. *MYRISTICA FRAGANS*

FERQUIMA

LAUDO TÉCNICO

Óleo Essencial de Noz Moscada

(Myristica Fragans)

Lote: 254	CAS Number: 8008-45-5
Fabricação: Fevereiro/2018	Validade: Fevereiro/2020

Itens Controlados	Resultados	Especificações
Aparência	Líquido Límpido	Líquido Límpido
Cor	Amarelo Palha	Incolor a Amarelo
Impurezas	Isento	Isento
Odor	Característico	Característico
Densidade (20ºC)	0,900	0,890 – 0,920
Índice de Refração (20ºC)	1,482	1,475 – 1,495
Rotação Ótica	+12.3ºC	[+6ºC ; +18ºC]
Data da Análise	19/04/2018	
Resultado	**Aprovado**	
Origem	Indonésia	
Extração	Destilação a vapor dos frutos	
Principais Componentes (aprox.)	Alfa-pineno = 22% Beta-pineno = 14% Terpineno-4-ol = 4% Gama terpinene = 3% Sabineno = 25% Miristicine = 9% Limoneno = 4%	
Obs.: não contem OGM nem foi utilizado para teste em animais.		

Recomendações Especiais	
Manuseio	Perigos mínimos. Não ingerir. Evitar contato do produto puro com olhos e mucosa. Se isso ocorrer, lavar imediatamente com água límpida em abundância. Em caso de derramamento, absorver o material derramado com material absorvente (areia, terra).
Riscos	Produto inflamável a temperatura acima de 42ºC. Perigo de fogo se exposto ao calor ou fonte de ignição. O líquido pode provocar irritação nos olhos, aparelho respiratório e digestivo. Polui as águas e o solo. O envio ao esgoto é proibido. As águas de combate ao fogo podem causar poluição.
Incêndio	Caso haja fogo, utilizar extintor de pó químico seco e água em forma de neblina, não utilizando jatos de água para não espalhar o produto.
Explosividade	Nenhum perigo em condições normais.
Uso	Este produto destina-se ao uso profissional / industrial e como é elaborado a partir de substâncias naturais pode apresentar pequenas variações de cor e cromatografia sem causar qualquer problema na performance do produto.
Armazenamento	Armazenar em local seco, longe de umidade e do calor, protegido da luz , em recipiente original bem vedado. Não reutilizar a embalagem vazia.
Transporte	Número de risco:30 / Número da ONU:1169 / Classe ou Subclasse de risco: 3 / Descrição da classe ou subclasse: Líquidos Inflamáveis / Grupo de Embalagem: III

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

Engenheira Química Responsável: Alice Lasthaus CRQ: IV 04330754

Estrada Mineração Ouro Branco, 2017 • Vargem Grande, Paulista • SP • CEP: 06730-000
Tel.:11.4159.1784 / 11.4158.3544 – Fax.:11.4158.3420
msn / e-mail: atendimento@ferquima.com.br
www.ferquima.com.br
FERQUIMA Ind. e Com. Ltda

3. *SCHINUS TEREBINTHIFOLIUS*

FERQUIMA

LAUDO TÉCNICO

Óleo Essencial de Pimenta Rosa

(Schinus terebinthifolius)

Lote: 102	CAS: 949495-68-5
Fabricação: Abril/2018	Validade: Abril/2020

Itens Controlados	Resultados	Especificações
Aparência	Líquido Límpido	Líquido Límpido
Cor	Amarelo Claro	Incolor a Verde Claro
Impurezas	Isento	Isento
Odor	Fresco, aromático	Fresco, aromático
Densidade (20°C)	0,860	0,830 – 0,870
Indice de Refração (20°C)	1,477	1,420 – 1,484
Rotação Otica	+34,50°	[+15° ; +45°]
Data da Análise	24/08/2018	
Resultado	**Aprovado**	
Origem	Brasil	
Extração	Destilação a vapor dos frutos maduros	
Principais componentes (valores aproximados)	Alfa-pineno = 10% Alfa-felandreno = 15% p-cimeno = 4% d-limoneno = 20% gama-terpineno = 32%	
Obs.: não contem OGM nem foi utilizado para teste em animais.		

Recomendações Especiais	
Manuseio	O uso de óculos de segurança e luvas é recomendável. Não inalar diretamente o produto. Evitar contato com a pele, olhos e mucosa: o produto pode causar irritação à pele sensível. Se isso ocorrer, lavar imediatamente com água límpida em abundância. Em caso de derramamento, absorver o material derramado com material absorvente (areia, terra).
Incêndio	Caso haja fogo, utilizar extintor de pó químico seco e água em forma de neblina, não utilizando jatos de água para não espalhar o produto. Emite vapores tóxicos em situação de incêndio.
Explosividade	Nenhum perigo em condições normais.
Uso	Este produto destina-se ao uso profissional / industrial e como é elaborado a partir de substâncias naturais pode apresentar pequenas variações de cor e cromatografia sem causar qualquer problema na performance do produto.
Armazenamento	Armazenar em local seco, longe de umidade e do calor, protegido da luz, em recipiente original bem vedado. Não reutilizar a embalagem vazia.
Transporte	Produto não enquadrado na portaria 204/97 em vigor sobre transporte de produtos perigosos.

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

Engenheira Química Responsável: Alice Lasthaus CRQ: IV 04330754

Empresarial Raposo Tavares - Alameda 4, 76 • Vargem Grande. Paulista • SP • CEP: 06730-000
Tel.: 11.3500.6108 / 11.3500.6109 - WhatsApp.: 11.98346.0743
e-mail: atendimento@ferquima.com.br
www.ferquima.com.br
FERQUIMA Ind. e Com. Ltda

4. *ZINGIBER OFFICINALE*

FERQUIMA

LAUDO TÉCNICO

Óleo Essencial de Gengibre

(Zingiber officinale)

Lote: 283	CAS Number: 8007-08-7
Fabricação: Junho/2018	Validade: Junho/2020

Itens Controlados	Resultados	Especificações
Aparência	Líquido Límpido	Líquido Límpido
Cor	Amarelo	Amarelo a Marrom
Impurezas	Isento	Isento
Odor	Típico – Especiaria	Típico – Especiaria
Densidade (20ºC)	0,877	0,870 – 0,885
Índice de Refração (20ºC)	1,488	1,485 – 1,495
Rotação Ótica	[-31.3º]	[-52º ; -25º]
Data da Análise	24/09/2018	
Resultado	**Aprovado**	
Origem	China	
Extração	Destilação a vapor da raiz	
Principais componetes (aprox.)	Alfa zingiberene = 33% Beta bisabolene = 6% Alpha pinene = 2% Beta sesquifelandrene = 13% alfa-curcumene = 8% Camphene = 6%	
Obs.: não contem OGM nem foi utilizado para teste em animais.		
Este produto é 100% puro, isento de solvente e diluente e segundo a RDC 481/99, não suscetível a contaminação microbiológica.		

Recomendações Especiais	
Manuseio	Perigos mínimos, máscara e luvas recomendável. Não ingerir. Evitar contato com a pele, olhos e mucosa. Se isso ocorrer, lavar imediatamente com água límpida em abundância. Em caso de derramamento, absorver o material derramado com material absorvente (areia, terra).
Incêndio	Caso haja fogo, utilizar extintor de pó químico seco e água em forma de neblina, não utilizando jatos de água para não espalhar o produto.
Explosividade	Nenhum perigo em condições normais.
Uso	Este produto destina-se ao uso profissional / industrial e como é elaborado a partir de substâncias naturais pode apresentar pequenas variações de cor e cromatografia sem causar qualquer problema na performance do produto.
Armazenamento	Armazenar em local seco, longe de umidade e do calor, protegido da luz, em recipiente original bem vedado. Não reutilizar a embalagem vazia.
Transporte	Número de risco:90 / Número da ONU:3082 / Classe ou Subclasse de risco: 9 / Descrição da classe ou subclasse: Substâncias perigosas diversas / Grupo de Embalagem: III

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

Engenheira Química Responsável: Alice Lasthaus CRQ: IV 04330754

Empresarial Raposo Tavares - Alameda 4, 76 • Vargem Grande, Paulista • SP • CEP: 06730-000
Tel.: 11.3500.6108 / 11.3500.6109 - WhatsApp.: 11.98346.0743
e-mail: atendimento@ferquima.com.br
www.ferquima.com.br
FERQUIMA Ind. e Com. Ltda