



UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ
LICENCIATURA INTEGRADA EM BIOLOGIA E QUÍMICA

FRANKYRLEY LAISON JESUS BAIA

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E COMPOSIÇÃO QUÍMICA
DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Pectis elongata* KUNTH

Santarém - PA
2019

FRANKYRLEY LAISON JESUS BAIA

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E COMPOSIÇÃO QUÍMICA
DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Pectis elongata* KUNTH**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Licenciatura
Integrada em Biologia e Química para a
obtenção do grau de Licenciado em
Biologia, da Universidade Federal do Oeste
do Pará – UFOPA.

Orientador (a): Prof. Dr. Ricardo Bezerra de
Oliveira

Co-orientador (a): Dra Sandra Layse
Ferreira Sarrazin

Santarém – PA

2019

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIB/UFOPA

- B152a Baia, Frankyrley Laison Jesus
 Atividade antifúngica e composição química do óleo essencial de *Pectis
 elongata* Kunth / Frankyrley Laison Jesus Baia . – Santarém, Pará, 2019.
 43 fls.
 Inclui bibliografias.
- Co-orientadora: Sandra Layse Ferreira Sarrazin
 Orientador: Ricardo Bezerra de Oliveira
- Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Federal do
 Oeste do Pará, Instituto de Ciências da Educação, Licenciatura em Biologia.
1. *Pectis elongata*. 2. Antimicrobiana. 3. Citral. 4. Discofusão. I. Sarrazin, San-
 dra Layse Ferreira. II. Oliveira, Ricardo Brzerra de. *orient.* II. Título.

CDD: 23 ed. 574

Bibliotecária - Documentalista: Selma Souza – CRB/2 1096

FRANKYRLEY LAISON JESUS BAIA

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E COMPOSIÇÃO QUÍMICA
DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Pectis elongata* KUNTH**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Licenciatura
Integrada em Biologia e Química para a
obtenção do grau de Licenciado em
Biologia, da Universidade Federal do Oeste
do Pará – UFOPA.

Orientador (a): Prof. Dr. Ricardo Bezerra de
Oliveira

Co-orientador (a): Dra Sandra Layse
Ferreira Sarrazin

Data de Aprovação __/__/____

Doutor Ricardo Bezerra de Oliveira - Orientador
Universidade Federal do Oeste do Pará

Doutora Valéria Mourão de Moura
Universidade Federal do Oeste do Pará

Doutor Elissandro Fonseca dos Banhos
Universidade Federal do Oeste do Pará

À Deus, à Universidade, aos meus professores. Em especial aos meus familiares. E a cada um que torceu por mim!

AGRADECIMENTOS

A meu orientador Professor Doutor Ricardo Bezerra de Oliveira por ter me aceito em cima da hora para orientação.

A minha querida Coorientadora Doutora Sandra Sarrazin por todo apoio e paciência ao longo da elaboração do meu projeto final e pelo exemplo de ser humano e profissional.

Ao Dr. Elissandro Banhos, pelo grande apoio que me deu nos experimentos.

A mestrandia Laís, por ter compartilhado comigo amostra do óleo e do citral.

Gostaria de deixar meu profundo agradecimento a todos os professores que me mostraram o valor da profissão e do ser humano.

A minha mãe, a minha Avó, a minha sogra e sogro, aos meus tios, pela força e encorajamento.

A minha amada esposa Daila, que apesar de todas as dificuldades, me ajudou a realizar este sonho.

Ao meu filho Francisco, por ser meu porto seguro e meu maior incentivo.

Aos meus colegas, pela parceria, ajuda e apoio durante essa grande jornada, tão importante na minha vida.

RESUMO

Óleos essenciais são uma rica fonte de metabólitos secundários voláteis, comumente associados às importantes atividades biológicas. Entre as plantas produtoras de óleo essencial, destaca-se a representatividade da Família Asteraceae, destacando-se no grupo as espécies do gênero *Pectis*. O presente trabalho determinou a composição química do óleo essencial de *Pectis elongata*, bem como sua atividade antifúngica contra fungos do gênero *Candida* (*C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*). Para a extração do óleo foi usada a técnica de hidrodestilação, em aparelho tipo Clevenger por 2 horas, seguida por caracterização química através de CG-EM. Os ensaios de atividade antimicrobiana foram realizados in vitro usando as técnicas de Disco Difusão em Ágar e Microdiluição em Caldo. Quanto a composição química do óleo essencial o Neral e Geranial, que juntos dão origem ao Citral, representam 92,63% da composição do óleo. No teste de Disco Difusão em Ágar, as cepas fúngicas testadas foram sensíveis frente ao óleo, bem como ao citral, ambos apresentaram halos de inibição maiores que 40 mm. Já no teste de Microdiluição em Caldo, o óleo essencial apresentou valores de CIM variando de 0,55 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 17,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e CFM, variando entre 281,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a 562,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O citral apresentou valores de CIM entre 2,19 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 35 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Fluconazol apresentou valores de CIM variando entre 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 64 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e CFM de 128 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para todas as cepas testadas. Assim, o óleo essencial, extraído de galhos e folhas frescas da espécie *P. elongata*, exibiu forte atividade antifúngica, provavelmente devido alta concentração do composto Citral (formado pela mistura dos isômeros Neral e Geranial). A presença do linalol no óleo essencial de *P. elongata*, assim como de outros compostos, presentes em menor concentração, também pode ter contribuído, de maneira sinérgica, para a atividade antimicrobiana.

Palavras-Chave: *Pectis elongata*. Antimicrobiana. Citral. Disco difusão.

ABSTRACT

Essential oils are a rich source of volatile secondary metabolites commonly associated with important biological activities. Among the essential oil-producing plants, the Asteraceae Family stands out, especially in the group the species of the genus *Pectis*. The present work determined the chemical composition of the essential oil of *Pectis elongata*, as well as its antifungal activity against fungi of the genus *Candida* (*C. albicans*, *C. parapsilosis* and *C. tropicalis*). For oil extraction, the hydrodistillation technique was used in Clevenger type apparatus for 2 hours, followed by chemical characterization by GC-MS. Antimicrobial activity assays were performed in vitro using Disc Agar Diffusion and Broth Microdilution techniques. As for the chemical composition of the essential oil, Neral and Geranial, which together give rise to Citral, represent 92.63% of the oil composition. In the agar diffusion disc test, the fungal strains tested were sensitive to oil as well as citral, both presented inhibition halos greater than 40 mm. In the Broth Microdilution test, the essential oil presented MIC values ranging from 0.55 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and 17.6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and CFM, ranging from 281.3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ to 562.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The citral presented MIC values between 2.19 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and 35 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Fluconazole showed MIC values ranging from 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ to 64 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and CFM of 128 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for all strains tested. Thus, the essential oil, extracted from fresh *P. elongata* branches and leaves, exhibited strong antifungal activity, probably due to the high concentration of the Citral compound (formed by the mixture of the Neral and Geranial isomers). synergistically for antimicrobial activity.

Keywords: *Pectis elongata*. Antimicrobial. Citral. Disk diffusion.

LISTA DE TABELAS E FÍGURAS

Figura 01: Terpeno e Sequiterpeno.....	17
Fígura 02: Espécie coletada - <i>Pectis elongata</i>	19
Tabela 01. Composição química do óleo essencial de <i>Pectis elongata</i>	26
Tabela 2: Teste de Disco Difusão em ágar para determinação do perfil de sensibilidade de <i>Candida albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i> e <i>C. tropicalis</i> frente ao óleo essencial (OE) de <i>Pectis elongata</i> e do citral.....	28
Tabela 3: Valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM), obtidos para o óleo essencial (OE) de <i>P. elongata</i> e citral, frente à <i>C. albicans</i> , <i>C. Parapsilosis</i> e <i>C. tropicalis</i> . Para fins comparativos, Fluconazol foi utilizado como padrão positivo.....	29
Figura 03 – Inibição do crescimento de <i>Candida Parapsilosis</i> , <i>C. albicans</i> e <i>C. tropicalis</i> na presença do Óleo Essencial de <i>P. elongata</i> em concentrações variando de 10 a 0,00025 $\mu\text{g mL}^{-1}$	30
Figura 04 – Inibição do crescimento de <i>Candida Parapsilosis</i> , <i>C. albicans</i> e <i>C. tropicalis</i> , na presença do Citral, em concentrações variando de 10 a 0,00025 $\mu\text{g mL}^{-1}$	30
Figura 05 – Inibição do crescimento de <i>Candida Parapsilosis</i> , <i>C. albicans</i> e <i>C. tropicalis</i> , na presença do Fluconazol, em concentrações variando de 128 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a 0,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$	31
Tabela 4: Valores da Concentração Fungicida Mínima (CFM), obtidos para o óleo essencial (OE) de <i>P. elongata</i> e citral, frente à <i>C. albicans</i> , <i>C. Parapsilosis</i> e <i>C. tropicalis</i> . Para fins comparativos, Fluconazol foi utilizado como padrão positivo.....	32

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

ATCC	Colection Culture Type American
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CG-EM	Cromatografia Gasosa por Espectro de Massa
CIM	Concentração Inibitória Mínima
DD	Disco de Difusão
DP	Desvio Padrão Médio
IRCalc	Índice de Retenção Calculada em Coluna DB-Sms
IRLit	Índice de Retenção da Literatura
NCCLS	National Comittee for Clinical Laboratory Standards
OEs	Óleos Essenciais
OMS	Organização Mundial da Saúde
PNPIC	Política Nacional de Praticas Integrativas e Complementares
PNPMF	Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
RENAME	Relação Nacional de Medicamentos Essenciais
RENISUS	Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde
SDA	Ágar Sabouraund Dextrose
SDB	Caldo Sabouraund Dextrose
SUS	Sistema Único de Saúde
UFC	Unidade Formadora de Colônia

Sumário

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1. Fungos	13
2.2. O gênero <i>Candida</i>	14
2.3. O uso de plantas medicinais no tratamento de doenças	15
2.4. Óleos essenciais	17
2.6. <i>Pectis elongata</i> Kunt	20
3. OBJETIVOS	21
3.1. Objetivos gerais	21
3.2. Objetivos específicos	21
4. MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1. Material vegetal e citral	21
4.2. Extração do óleo essencial e determinação do rendimento	21
4.3. Análise da composição química do óleo essencial (OE)	22
4.4. Microrganismos e condições de cultivo	23
4.5. Teste de Disco Difusão em Ágar	23
4.6. Teste de Microdiluição em caldo - determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	24
4.7. Cálculo da viabilidade microbiana	24
4.8. Leitura da concentração Inibitória Mínima com corante revelador	25
4.9. Concentração Fungicida Mínima (CFM)	25
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5.1. Determinação do rendimento e análise da composição química do óleo essencial	26
5.2. Atividade anticandida do óleo essencial de <i>P. elongata</i> e citral	28
5.2.1. Teste de disco difusão em ágar	28
5.2.2. Teste de microdiluição em caldo – determinação da concentração inibitória mínima	30
6. CONCLUSÕES	34
7. REFERÊNCIAS	34

1. INTRODUÇÃO

Ao longo dos últimos anos 90, a incidência de fungos invasivos, promovendo infecções, tais como candidíase, aumentaram significativamente em todo o mundo. Fato preocupante, pois infecções fúngicas invasivas são de difícil diagnóstico, prevenção e tratamento (COLOMBO, 2000; NUCCI & COLOMBO, 2002, MEDRANO *et al.*, 2006; MORGAN, 2006;). O gênero *Candida* está associado a quase 80% de todos os casos de infecções fúngicas nosocomiais, representando a principal causa de fungemia, com altas taxas de mortalidade (40%) (COLOMBO *et al.*, 1999; BRITO *et al.*, 2006; COLOMBO *et al.*, 2006; MEDRANO *et al.*, 2006).

O Surgimento de resistência a drogas entre isolados de *Candida spp.*, e entre espécies não *C. albicans*, em situações clínicas, aumentou a taxa de mortalidade associada a candidíase (REX *et al.* 1995; ALBERTSON *et al.* 1996; CALABRESE *et al.* 2000; COWEN *et al.* 2000; KREMERY & BARNES 2002). Este fenômeno está ligado de alguma forma ao uso indiscriminado de antifúngicos que, por um processo de seleção, tornaram alguns fungos menos susceptíveis a determinadas drogas (FRANZ *et al.*, 1999; PANIZZO, *et al.*, 2000; NUCCI *et al.*, 2002; CIRAK *et al.*, 2003). Nesse contexto, torna-se também crescente o número de estudo envolvendo propriedades terapêuticas de plantas que podem representar uma alternativa no combate à diferentes infecções, incluindo a candidíase (HOFLING *et al.* 2010, NEWMAN & CRAGG, 2012). Além disso, as plantas são consideradas os primeiros medicamentos utilizados pelas civilizações, bem como, é utilizado até hoje em diversos tipos de tratamentos, devido as suas diferentes atividades biológicas (CUNHA *et al.* 2012).

Os óleos essenciais, substâncias obtidas do metabolismo secundário de plantas, podem ser sintetizados por todos os órgãos das plantas: flores, folhas, caules, galhos, sementes, frutas, raízes, madeira e cascas da árvore e dos frutos (denominados cítricos) (Bizzo *et al.* 2009). São composições de substâncias com diferentes funções químicas, tais como aldeídos, alcoóis, fenóis, cetonas, etc. (SELL, 2010).

A família Asteraceae, com cerca de 1535 gêneros e aproximadamente 23000 espécies, representa cerca de 10% da flora mundial (BREMMER, 1994). Dentre as espécies de plantas pertencentes à família Asteraceae, produtoras de óleos essenciais, destacam-se as pertencentes ao Gênero *Pectis*. A espécie

Pectis elongata, rica em óleo essencial, é uma planta herbácea que ainda é pouco estudada. No norte do Brasil, esta espécie é conhecida como 'cuminho', devido ao seu perfume, que lembra o cominho (*Cuminum cyminum*, Apiaceae). Nesta região, a espécie tem sido utilizada empiricamente para o tratamento de febre, dor de estômago e gripe (DEFILIPPS *et al.*, 2004).

Os principais compostos voláteis encontrados no óleo essencial de *P. elongata* são citral (neral e geranial) e limoneno (GRENAND *et al.*, 1987; HEYWOOD *et al.*, 1977). Tais compostos apresentam propriedades antibacterianas e antifúngicas já comprovadas (PRUDENT *et al.*, 1995).

Com o surgimento de cepas fúngicas que apresentam resistência aos atuais antifúngicos de mercado, faz-se necessária a busca de novos produtos com propriedades antifúngicas, que sejam economicamente viáveis, e com eficácia comprovada. Assim, no presente trabalho, avaliou-se o potencial antifúngico de *Pectis elongata* frente a fungos do gênero *Candida*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Fungos

Os fungos são organismos comuns no meio ambiente, incluindo ar, solo e água ou podem ainda colonizar outros organismos como plantas e animais. (MARTINS *et al.*, 2015). São dotados de parede celular, cujas principais funções são manter a forma das células e mediar a comunicação entre estas e o meio ambiente, no que respeita à nutrição e à capacidade de funcionar como uma barreira que protege o microrganismo de danos físicos e osmóticos. Os principais componentes da parede celular (80 a 90 %) são polímeros de manose, covalentemente associados com proteínas para formar glicoproteínas, β -glucanos, polímeros de glicose contendo ligações β -1,3 e β -1,6, e quitina, polímero de N-acetil-D-glucosamina contendo ligações β -1,4 (SANTOS & SATO, 2009). As proteínas e lípidos são constituintes da parede celular presentes em menor proporção. Os polímeros estruturais, β -glucano e quitina, são responsáveis pela rigidez da parede celular. Os polímeros de manose constituem uma matriz amorfa na qual os polímeros estruturais estão inseridos. Proteínas e manoproteínas são capazes de induzir uma potente

resposta imune humoral no hospedeiro, incluindo a produção de alguns anticorpos, o que pode ser utilizado como uma estratégia para o desenvolvimento de vacinas, por exemplo (LÓPEZ-RIBOT *et al.*, 2004).

2.2. O gênero *Candida*

Algumas espécies fúngicas são capazes de promover doenças em seres humanos, dentre estas, destacam-se as pertencentes ao Gênero *Candida*. As infecções ocasionadas por espécies deste Gênero são genericamente conhecidas como candidíases, sendo a espécie *C. albicans* o principal agente etiológico. Porém, outras espécies não *C. albicans*, tais como *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*, também podem ser responsáveis por desenvolver candidíase (OLIVEIRA *et al.* 2001; LACAZ *et al.* 2002).

Estas infecções são cada vez mais comuns em pacientes imunodeprimidos ou nos que foram submetidos a regimes terapêuticos especiais. Essas infecções apresentam um custo hospitalar elevado, pois aumentam o tempo de internação do paciente, além de causarem elevada mortalidade (ALANGADEN, 2011).

A espécie *C. albicans* é um fungo dimórfico, que se apresenta sob formas leveduriformes (blastoconídios) no estado saprofítico, estando associado à colonização assintomática; ou como formas filamentosas (pseudo-hifas e hifas verdadeiras), observadas em processos patogênicos. Além disso, sob condições de crescimento subótimas, nesse fungo pode ocorrer a formação de clamidósporos (esporos arredondados que possuem uma espessa parede celular). Dessa forma, o fungo tem a capacidade de se adaptar a diferentes nichos biológicos, podendo ser considerado, a rigor, um organismo “pleomórfico”. (CHAFFIN, 1998; LACAZ, 1991).

Candida parapsilosis tem emergido nos últimos anos, sendo um isolado comum em candidemias, sobretudo em alguns grupos de pacientes, como neonatos e transplantados (ALMIRANTE *et al.*, 2006; HORN *et al.*, 2009; RODRÍGUES *et al.*, 2010; ALANGADEN, 2011). Em muitas regiões do mundo, é considerada a segunda espécie mais isolada em amostras de candidemia. Esse aumento da sua incidência de isolados tem sido explicado, em parte, por sua considerável capacidade de formar biofilme e, portanto, alta afinidade com

dispositivos intravasculares e de nutrição parenteral (ALMIRANTE *et al.*, 2006; LOCKHART *et al.*, 2008; MEDRANO *et al.*, 2006, TROFA *et al.*, 2008).

A espécie *Candida tropicalis* surge como uma das espécies mais importantes do gênero *Candida* em termos de epidemiologia e virulência. É capaz de produzir hifas verdadeiras, uma propriedade exclusiva de *Candida albicans* e de sua espécie irmã *Candida dubliniensis*. *C. tropicalis* também tem sido considerada uma forte espécie produtora de biofilme e é altamente aderente às células epiteliais e endoteliais (MARCOS-ZAMBRANO *et al.*, 2014). Além disso, várias investigações recentes relataram a emergência de *C. tropicalis* resistente aos medicamentos antifúngicos atualmente disponíveis, como os derivados de azóis, anfotericina B e equinocandinas (CHOI *et al.*, 2016; SENEVIRATNE *et al.*, 2016). Esta espécie tem sido considerada um microrganismo osmotolerante, e essa capacidade de sobreviver a altas concentração de sal pode ser importante para a persistência de fungos em ambientes salinos, contribuindo para a expressão da virulência e resistência a antifúngicos (ZUZA-ALVES *et al.*, 2016).

As dificuldades quanto ao tratamento da candidíase (alto custo, longo tempo de administração, toxicidade e resistência aos atuais antifúngicos de mercado), levaram a uma intensificação das pesquisas científicas na busca por alternativas eficazes, seguras e economicamente viáveis, tais como compostos antifúngicos derivados de produtos vegetais (GIORDANI *et al.*, 2015).

2.3. O uso de plantas medicinais no tratamento de doenças

A preocupação com a cura de doenças sempre se fez presente ao longo da história da humanidade. Desde os tempos antigos, as civilizações primitivas notaram que algumas plantas, dotadas de maior ou menor toxicidade, ao serem experimentadas no combate às doenças, revelaram o seu potencial curativo, ainda que empiricamente (REZENDE; COCCO, 2002). Embora o Brasil possua a maior diversidade vegetal do mundo, com mais de 60.000 espécies vegetais catalogadas, apenas uma pequena fração é estudada para pesquisas de compostos bioativos e avaliação de suas propriedades medicinais (GUERRA *et al.*, 2001).

Estima-se que, aproximadamente, 40% dos medicamentos disponíveis foram desenvolvidos direta ou indiretamente a partir de fontes naturais, sendo estes 25% provindo de plantas (CALIXTO, 2000). Das 252 drogas consideradas básicas e essenciais pela OMS 11% são originárias de plantas e um número significativo são drogas sintéticas obtidas de precursores naturais (RATES, 2001; ABIFISA, 2011).

A utilização de plantas medicinais para tratamento de doenças é favorável à saúde humana, desde que o usuário tenha conhecimento prévio de sua finalidade, riscos e benefícios (ISERHARD et al., 2009). As plantas medicinais apresentam uma ou mais substâncias químicas com ação farmacológica capazes de interagir com o organismo humano e de outros animais. Muitas vezes os constituintes químicos responsáveis pela atividade farmacológica não são conhecidos e envolvem a interação de várias moléculas presentes no extrato ou em outros componentes do vegetal (EMBRAPA, 2004). Logo, pelo fato de desconhecer a ação de determinados compostos, se faz necessário cada vez mais estudos acerca da ação dos mesmos.

A partir de 2006, novos marcos regulatórios brasileiros apoiam e fomentam o uso seguro e racional de plantas medicinais e fitoterápicos como a **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos** (PNPMF), **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares** (PNPIC) e a **Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde** (RENISUS), tais medidas tem como principal objetivo a ampliação das opções terapêuticas aos usuários do SUS, garantindo acesso às plantas medicinais, fitoterápicos e serviços relacionados à fitoterapia, com segurança, eficácia e qualidade, na perspectiva da integralidade da atenção e promoção à saúde (BRASIL, 2009).

Em 2018, criou-se o (RENAME) - Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (BRASIL, 2018). A lista é composta por 12 medicamentos fitoterápicos, sendo estes formulados a partir de algumas espécies medicinais listadas na RENISUS, e que são ofertados gratuitamente à população como forma de incentivo ao seu uso.

Em 2019, Rempel e colaboradores apresentaram uma revisão bibliográfica sobre o efeito antimicrobiano das plantas que pertencem à lista RENISUS e que constam na lista de fitoterápicos do RENAME, a fim de

disseminar sua comprovação científica e garantir o conhecimento a respeito de sua eficácia.

Com o surgimento da problemática da resistência antimicrobiana, a tendência atual nas pesquisas com produtos naturais é a obtenção de princípios ativos, contidos nas espécies vegetais, para uma possível aplicação no tratamento de infecções causadas por microrganismos, entre eles, os fungos. Nesse contexto destacam-se os óleos essenciais, compostos químicos oriundos do metabolismo secundário das espécies vegetais, que constituem uma rica fonte de compostos biologicamente ativos, que pode representar uma alternativa contra os mecanismos de resistência que inativam antifúngicos padrões (ABRANTES, *et al.*, 2013).

2.4. Óleos essenciais

Os óleos essenciais (OEs) são produtos naturais, voláteis e complexos, oriundos do metabolismo secundário das plantas, podendo ser encontrados em várias partes das mesmas, tais como folhas, caule, cascas, frutos, sementes e flores. Esses compostos apresentam grande potencial terapêutico e farmacológico, possuem diferentes propriedades, sendo uma delas a ação antimicrobiana (BIZZO *et al.*, 2009; CHINSEMBU, 2015). Devido ao seu grande uso, os OEs vêm sendo estudados, em busca da caracterização de seus componentes químicos e suas propriedades terapêuticas (HERMAN, A; TAMBOR, K.; HERMAN, A., 2016).

Os óleos essenciais geralmente apresentam odor e fragrância característica. Em sua mistura complexa podem ser encontrados terpenos, terpenos oxigenados, sesquiterpenos e sesquiterpenos oxigenados. Também podem conter pequenas quantidades de diterpenos e outros componentes em função da planta aromática (SERAFINI *et al.*, 2001). Além disso, eventualmente pode-se encontrar fenilpropanóides, acrescidos de moléculas menores, como alcoóis, aldeídos, cetonas de cadeias curtas e o perfil terpênico, podendo apresentar substâncias constituídas de moléculas de dez e de quinze carbonos (SIANI, 2000).

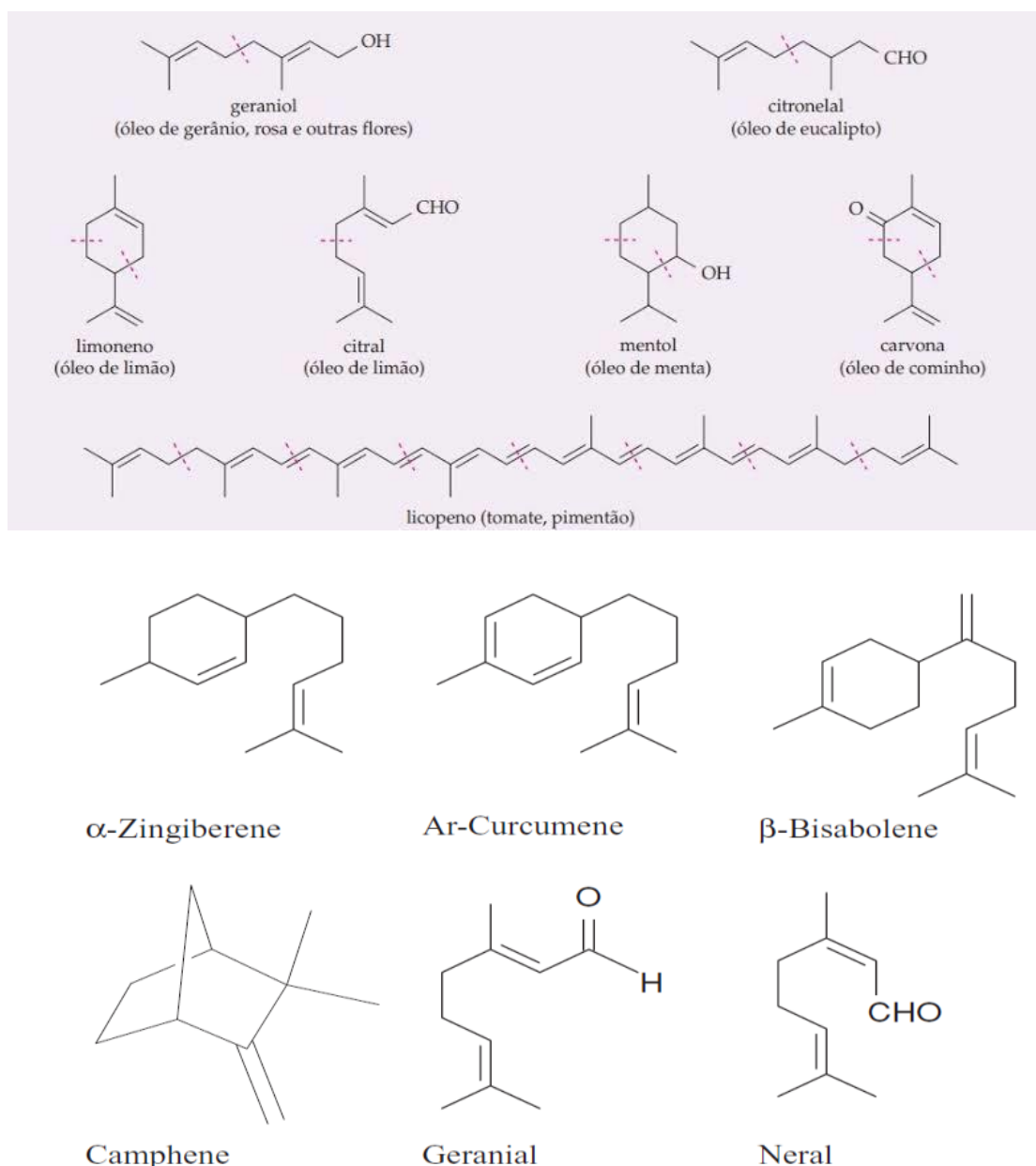


Figura 1: Terpeno e Sequiterpeno

A região geográfica onde a planta se encontra, bem como as condições de cultivo da planta, podem influenciar na produção de seus metabólitos secundários. Ambientes com baixas temperaturas e baixos níveis de oxigênio também contribuem para uma maior produção desses compostos, melhorando a ação dos OEs após sua extração, já que esses metabólitos são produzidos a fim de proteger a planta contra predadores (BURT, 2004; OLIVEIRA et al., 2006; BIZZO et al., 2009).

Ao longo dos últimos anos, estudos *in vitro* demonstraram a atividade antimicrobiana dos OEs frente as bactérias Gram positivas e negativas isoladas

de diferentes amostras de seres humanos e de animais domésticos e silvestres, além de bactérias oriundas de alimentos, fungos e vírus (HILL; EVANS; VENESS, 1997; PARANAGAMA et al., 2003; BURT, 2004; FISHER; PHILLIPS, 2006). Devido à variedade de compostos químicos presentes nos OEs, é provável que sua atividade antimicrobiana não seja atribuída a um mecanismo específico, mas sim, um conjunto de compostos (BURT, 2004).

Diferentes métodos são usados para separar óleos de várias partes das plantas. Embora pareça relativamente simples isolar tais óleos, a composição do óleo pode variar em grande parte dependendo do método da extração usado. As vantagens e as desvantagens de alguns métodos foram discutidas por Scheffer (1993) e Cassel e Vargas (2006).

Existem inúmeros processos industriais e artesanais de extração, alguns deles são: Extração a vapor (mais conhecido e comum); Extração por hidrodestilação (utilizado em laboratório); Extração supercrítica (utilizado em pesquisas); Extração subcrítica; Extração por gás refrigerante; Extração por extrusão ou prensagem (utilizado pela indústria de sucos cítricos); Extração a vácuo; Extração enfleurage (tradicional e ainda utilizado); Extração por solvente; Extração por óleo (para fins culinários e massagens). Não se pode declarar indistintamente que exista um método de extração melhor que todos os outros, pois cada um deles gera um óleo essencial puro com composição química específica (Simões et al. 2004; Saito & Scramin, 2000; Carlson, 2012).

2.5. Cromatografia gasosa na identificação dos constituintes voláteis presentes nos óleos essenciais

A técnica mais utilizada em laboratório para a análise dos constituintes voláteis presentes em óleos essenciais é a Cromatografia Gasosa acoplada à espectrometria de massas. Esta técnica consiste numa fase móvel e uma fase estacionária, onde a fase móvel é um gás (geralmente He, N₂ ou H₂) e a fase estacionária é geralmente um líquido não-volátil, podendo ser também um sólido. Na cromatografia gasosa, o constituinte gasoso (ou líquido volátil) é transportado pela coluna por uma fase móvel gasosa, chamada gás de arraste. A escolha do gás de arraste depende do detector e da eficiência e velocidade de separação desejada. De maneira geral, a cromatografia gasosa é aplicável

para a separação e análise de misturas cujos constituintes tenham pontos de ebulição de até 300°C e que sejam termicamente estáveis (STEFFENS, 2010).

2.6. *Pectis elongata* Kunt



Autora: Laís Massing

Figura 02: Espécie coletada - *Pectis elongata*

Classe: Angiospermas

Subclasse: Eudicotiledoenas

Clado: Asteridea- subclado nuclear Campanuliidea,

Ordem: Asterales

Família: Asteraceae,

Subfamília: Asteroideae,

Tribo: Tageteae

Gênero: *Pectis*

Pectis elongata Kunth [sin. *Pectis fasciculiflora* DC., *P. floribunda* A. Rich., *P. oerstediana* Rydb., *P. elongata* var. *fasciculiflora* (DC.) DJ Keil, *P. elongata* var. *floribunda* (A. Rich.) DJ Keil, *P. elongata* var. *oerstediana* (Rydb.) DJ Keil] pertence à família Asteraceae e é encontrado na América Central e do Sul, em todo o Brasil, Guiana, Colômbia, Venezuela e Índias Ocidentais (KEIL, 1983; BAUTISTA, 1987). É uma pequena erva anual, com cerca de 80 cm de altura. Nos estados do Pará e Amapá (Norte do Brasil), é conhecido como “cuminho”, devido ao seu perfume, que lembra o cominho (*Cuminum cyminum*, Apiaceae). Albuquerque *et al.* (2007) em artigo de revisão de espécies da caatinga cita o uso de *P. elongata* no tratamento para influenza, resfriados, distúrbios gástricos e hipotensão. Há também relatos do uso de *P. elongata* em substituição à citronela, (*Cymbopogon citratus*), e para o tratamento sintomas

de febre, dor de estômago e gripe (DEFILIPPS et al., 2004). A espécie é rica em óleo essencial, apresentando como constituinte majoritário o citral (PRUDENT et al., 1995). Este constituinte aromatizante é comumente utilizado nas indústrias de alimentos, bebidas e fragrâncias (SHI, et al., 2016). Estudos experimentais e clínicos demonstraram que o citral possui efeito antimicrobiano já comprovado (SHI, et al., 2016).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos gerais

Avaliar a atividade antifúngica e determinar a composição química do óleo essencial de *Pectis elongata* Kunth.

3.2. Objetivos específicos

- Identificação dos compostos voláteis da espécie *Pectis elongata*;
- Avaliar a atividade antifúngica de *Pectis elongata* frente à três potenciais patógenos humanos: *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material vegetal e citral

Partes aéreas (folhas, flores e ramos finos) de *Pectis elongata* foram coletados entre 8 e 10h em agosto de 2018, em um campo experimental da Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA), município de Santarém, Pará, Brasil (02°, 25'03.2" S e 054° 44'25.1" W, a uma altitude de 26 m acima do nível do mar) exsicatas estão depositadas no Herbário HSTM da UFOPA sob o número 003432. Citral (pureza de 95%), foi obtido comercialmente da Sigma-Aldrich (Darmstadt, Alemanha)

4.2. Extração do óleo essencial e determinação do rendimento

O óleo essencial de *Pectis elongata* foi obtido de 180 g de partes aéreas, previamente secas em estufa de circulação de ar, sob temperatura

controlada de 37 ± 2 °C. Após secagem, o material vegetal foi submetido ao processo de hidrodestilação, utilizando aparelho tipo Clevenger, por 2 horas. Para determinação do teor de umidade, em % (calculado em leituras em triplicata) as amostras vegetais foram secas em temperatura de 100° C, até não haver variação na pesagem. O óleo obtido foi seco com sulfato de sódio anidro, e o seu teor (rendimento em %) foi determinado com base no peso seco da planta, que corresponde ao volume (mL) de óleo essencial em relação à massa seca (Equação 01, proposta por Santos *et al.*, 2004):

$$TO = \frac{Vo}{Bm - \left(\frac{Bm \times U}{100} \right)} \times 100$$

Onde:

TO = teor de óleo (mL de óleo essencial em 100 g de biomassa seca) ou rendimento de extração (%).

VO = volume de óleo extraído (mL), lido diretamente na escala do tubo separador.

Bm = biomassa aérea vegetal (folhas e ramos finos), medida em gramas.

$\left(\frac{Bm \times U}{100} \right)$ = quantidade de umidade ou água presente na biomassa.

$Bm - \left(\frac{Bm \times U}{100} \right)$ = quantidade de biomassa seca, livre de umidade.

100 = fator de conversão para porcentagem.

4.3. Análise da composição química do óleo essencial (OE)

A extração do óleo foi feita por uma equipe do Laboratório de Bios prospecção e Biologia Experimental (LABBex), bem como a identificação dos compostos. A análise da composição química do OE foi realizada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), utilizando um equipamento QP-2010-Plus (Shimadzu Corporation, Tokyo, Japan), com auxílio do software MS Solution e de bibliotecas-padrões (Adams, 2007; NIST, 2011). A análise foi realizada em coluna capilar de sílica (Rtx-5ms,

30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). A temperatura do forno foi estabelecida a 60°C), com gradiente de 3°C/min até 240 °C; temperatura do injetor de 250°C. Hélio foi utilizado como gás de arraste, com fluxo constante de 1,0 mL min⁻¹ e pressão de entrada de 16,5 psi. Amostras do óleo essencial (1,0 µL) foram diluídas em hexano e injetadas em modo split. Os espectros de massa foram obtidos por impacto eletrônico a 70 eV de energia. As temperaturas da câmara de ionização e a linha de transferência foram mantidas a 200 e 250°C, respectivamente. Os compostos foram identificados pelo tempo de retenção dos padrões e por comparação dos seus respectivos espectros de massas com aqueles das bibliotecas acima referidas.

4.4. Microrganismos e condições de cultivo

O presente estudo utilizou as seguintes cepas de referência: *Candida albicans* ATCC 24433, *Candida parapsilosis* ATCC 90018, e *Candida tropicalis* ATCC 750. As cepas foram adquiridas comercialmente em sua forma liofilizada (Cefar diagnóstico, São Paulo – Brasil). Os microorganismos foram rehidratados em Caldo Sabouraud Dextrose (SDB) (Himedia, Mumbai - Índia), e acondicionados em estufa à 27 ± 2 °C, durante 48h. Os inóculi foram preparados através da inoculação direta de colônias em 1 mL de solução salina estéril, e ajustados ao padrão 0,5 na escala de McFarland, correspondendo 2 - 5 × 10⁶ UFC mL⁻¹ (NCCLS/CLSI - National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002).

4.5. Teste de Disco Difusão em Ágar

O teste de disco difusão em ágar foi preparado de acordo com metodologia padronizada por Bauer *et al.* (1966). Esta metodologia foi empregada para avaliar o espectro de inibição do óleo essencial de *P. elongata* e do citral, composto majoritário presente no óleo essencial, frente aos microorganismos ensaiados. Os inóculi, previamente ajustados ao padrão 0,5 na escala de McFarland, foram semeados em ágar Sabouraud dextrose (SDA) e, logo após, discos estéreis de papel de filtro (6 mm de diâmetro), contendo 10

μL de OE não diluído, ou 10 μL do citral, foram levemente pressionados contra a superfície do ágar. Após 30 minutos à temperatura ambiente, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 a 48 h. No final do período de incubação, o diâmetro da zona de inibição foi mensurado em milímetros. Os testes foram realizados em triplicata.

4.6. Teste de Microdiluição em caldo - determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

O Teste de Microdiluição em caldo, utilizado para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), foi preparado de acordo com a Norma M27-A2 - Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo (NCCLS,2002).

Para determinação da CIM, diluições em série do OE de *Pectis elongata* ($10 - 0,00025 \mu\text{g mL}^{-1}$) e do citral ($10 - 0,00025 \mu\text{g mL}^{-1}$), foram preparadas utilizando Tween 80 (solução a 0,5%) como solvente (Sigma-Aldrich, São Paulo - Brasil). Os testes foram realizados em placas de 96 poços, onde cada poço recebeu 90 μL da concentração específica de composto teste (OE ou citral), 90 μL de meio líquido Sabouraud Dextrose (SDB) e 20 μL do inóculo, previamente ajustado na concentração de $1,5 \times 10^5 \text{ UFC mL}^{-1}$. As culturas foram incubadas a $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 h (NCCLS/CLSI, 2002). Decorrido o período de incubação, e para testar a possível inibição de crescimento desencadeada pelo OE de *P. elongata* e do citral, procedeu-se a leitura da absorbância das culturas, utilizando espectrofotômetro de microplacas (BIO RAD, modelo 680), com filtro de 595 nm. Os valores obtidos foram considerados para a confecção de gráficos que expressam a porcentagem de viabilidade dos microorganismos, de acordo com metodologia descrita por GUDIÑA *et al.*, (2010), com modificações. Para fins comparativos, Fluconazol foi utilizado como controle padrão positivo, em concentrações variando entre $128 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$. Os testes foram realizados em triplicata.

4.7. Cálculo da viabilidade microbiana

A partir da leitura espectrofotométrica, determinou-se a viabilidade microbiana para cada microorganismo, que foi calculada através da porcentagem de inibição do crescimento microbiano, em diferentes concentrações das substâncias testadas (óleo essencial, citral e fluconazol), para cada microorganismo de acordo com a equação 3:

$$\% \text{ Inibição do crescimento microbiano} = [1 - (A_c/A_0)] \times 100$$

Onde:

A_c representa a média das absorbâncias por concentração de substância testada, já subtraída do valor da absorbância obtida para cada concentração de substância sem a adição do inóculo e **A₀** a média das absorbâncias do controle de crescimento microbiano (sem a substância testada) (GUDIÑA et al., 2010). Este resultado representa a porcentagem de células microbianas que a substância testada foi capaz de inibir, evidenciada pela ausência de crescimento no meio, onde a CIM é determinada pela menor concentração da amostra teste capaz de inibir o crescimento de 90% das cepas (HAWSER & ISLAM, 1999; HORNER *et al*, 2008).

4.8. Leitura da concentração Inibitória Mínima com corante revelador

Para confirmação dos resultados de CIM, utilizou-se o método colorimétrico, onde 20 µL de solução aquosa de resazurina a 0,02% (Vetec, Rio de Janeiro - Brasil) foram adicionados a cada poço, com posterior re-incubação por mais 3 h. A mudança de cor de azul para rosa, resultante do processo de redução de resazurina à refazurina, indicou a presença de microorganismos viáveis. Os valores de CIM foram definidos pela menor concentração do OE capaz de inibir o crescimento dos microorganismos. Os testes foram realizados em triplicata.

4.9. Concentração Fungicida Mínima (CFM)

Os poços que não mostraram crescimento aparente no teste de microdiluição em caldo (permanência da coloração azul), foram selecionados para avaliação da CFM, que foi determinada pela ausência de crescimento microbiano após semeio de amostras contidas nos poços, sobre placas contendo SDA estéril. Após período de incubação a 27°C, por 48h, realizou-se a leitura visual das placas e CFM foi definida como a menor concentração do OE capaz de eliminar 99,99% dos microorganismos. Em todos os ensaios foram utilizados um controle negativo (caldo SDB acrescido de Tween 80 a 0,5 % e óleo essencial ou citral), e um controle positivo, contendo SDB, acrescido de Tween 80 a 0,5% e inóculo bacteriano. Os testes foram realizados em triplicata.

Os resultados de rendimento e atividade antimicrobiana foram expressos como média $\pm$ desvio padrão dos valores obtidos. As análises foram realizadas no programa Prism, versão 3.0, com nível de confiança estabelecido em 95%;

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Determinação do rendimento e análise da composição química do óleo essencial

No presente trabalho, o rendimento do óleo essencial de *P. eongata* foi de 1,2%. Na análise da composição química, foi possível identificar 35 componentes voláteis. Seus compostos majoritários são Geranial (55,4%) e Neral (37,23%). Juntos, estes dois derivados isoméricos dão origem ao Citral, totalizando, 92,63% da composição total do óleo essencial (Tabela 01).

Tabela 01. Composição química do óleo essencial de *Pectis elongata*

Componente	IR _{calc}	IR _{lit}	OE (%)
2-hexanona	788	786	-
1- Octeno	792	788	0,01
Octano	796	800	0,01
4E-Octeno	799	801	0,03
3-metil-Pentanol	827	833	0,04
NI	848	-	0,02
Metanetiol butirato	942	950	0,04
2-Acetoxihexano	951	941	0,05
isopropil-Tiglato	965	970	0,01
Sabineno	972	969	-
6-metil-Hept-5-en-2-ona	985	981	0,15
Decano	1000	1000	0,01
Limoneno	1028	1024	0,21
E-beta-ocimeno	1046	1046	0,03
n-nonanal	1091	1100	0,05
Linalol	1100	1101	0,18
Exo-isocitral	1143	1140	0,11
Citronelal	1152	1152	0,05
Z-isocitral	1163	1160	1,05
Dill eter	1179	1184	0,05
Isogeranial	1181	1179	1,38
Alia-terpineol	1190	1195	0,02
Mirtanal	1206	1200	0,02
Nerol	1228	1229	0,95
*Neral	1242	1235	37,23
Geraniol	1254	1255	1,65
*Geranial	1273	1264	55,4
Dihidro-Linalol acetato	1279	1272	0,1
n-Tridec-1-eno	1291	1290	0,41
1-hidroxi-Undec-2-eno	1373	1370	0,03
Trans-ascardiol glicol	1275	1266	-
Hidroxi citronelal	1281	1286	-
Beta-elemeneno	1391	1389	0,11
Cipereno	1399	1398	0,03
Z-cariofileno	1417	1413	0,06
Alfa-humuleno	1453	1452	0,36
Humuleno epoxido II	1607	1613	0,15
Total			97,14

IRCalc = Índice de Retenção calculado em coluna DB-5ms; IRLit = Índice de Retenção da literatura (Adams, 2007). *Formam o Citral

Os resultados de rendimento e composição química de *Pectis elongata* Kunth, foram próximos dos encontrados por Prudent *et al.* (1995), o qual em sua análise, com a referida espécie coletada em três diferentes regiões da Martinica-França (Sainte-Anne, Robert e Schoelcher), obtiveram rendimento de 0,6 a 1,1%. Ao analisar a composição química do óleo essencial de *P. elongata* coletados no mesmo período, em diferentes estádios de maturidade, os autores encontraram valores de 16,68%, 15,65% e 27,47% para Neral e 28,47% 24,56%, e 40,15% para Geranial, cuja soma, que representa o composto citral, totalizou 45,15%, 40,21% e 67,62%, respectivamente.

Silva *et al.* (2005), obtiveram rendimento de 0,7 a 1,5% e identificaram a presença de aldeído perila (51,7-64,6%) e limoneno (43,7-33,7%) em espécimes de *P. elongata* coletadas em Belém, Pará-Brasil, já em Ferreira Gomes, Amapá-Brasil, estes autores identificaram como majoritários os constituintes aldeído perila (89,1%), álcool perila (5,6%) e ácido perila (4,0%). Essa divergência na composição química pode ser explicada pela presença de quimiotipos distintos dentro da espécie *P. elongata* (SILVA *et al.*, 2005).

5.2. Atividade anticandida do óleo essencial de *P. elongata* e citral

5.2.1. Teste de disco difusão em ágar

No presente estudo, com intuito de se determinar a sensibilidade de *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis*, frente ao óleo essencial de *P. elongata* e a seu composto isolado, o citral, realizou-se inicialmente o teste de disco difusão em ágar. Os resultados podem ser observados na Tabela 2.

Tabela 2: Teste de Disco Difusão em ágar para determinação do perfil de sensibilidade de *Candida albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* frente ao óleo essencial (OE) de *Pectis elongata* e do citral

Amostras teste	DD (mm)* $\pm$ DP		
	Microorganismos		
	<i>Candida albicans</i> ATCC 24433	<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 90018	<i>Candida tropicalis</i> ATCC 750
OE <i>Pectis elongata</i>	$>40 \pm 0$	$>40 \pm 0$	$>40 \pm 0$
Citral	$>40 \pm 0$	$>40 \pm 0$	$>40 \pm 0$

* Diâmetro da zona de inibição de crescimento expresso em milímetros. DD – disco difusão. DP - Desvio Padrão da Média

Foram utilizados, como parâmetros, os padrões de sensibilidade adotados por Moreira *et al.* (2005), que classificaram a atividade de diferentes óleos essenciais de acordo com o tamanho do halo de inibição: não sensível (-) para diâmetros ≤ 8 mm; sensível (+) para diâmetros de 9-14 mm; muito sensível (++) para 15-19 mm e extremamente sensível (+++) para os halos com diâmetros ≥ 20 mm. No presente trabalho, foi possível verificar que as três cepas ensaiadas (*C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*) foram consideradas extremamente sensíveis (+++) frente ao OE de *Pectis elongata* Kunth, assim como para o citral, uma vez que apresentaram halos de inibição com diâmetro > 40 mm, para ambos os compostos testados.

O potencial antimicrobiano de plantas está diretamente associado à composição química das espécies. Estudos com o citral (neral+geranial), composto majoritário presente no óleo essencial de *P. elongata*, já foram anteriormente reportados. Silva *et al.* (2008), avaliaram o potencial antifúngico do citral frente à diferentes espécies de *Candida* spp, especialmente *C. albicans*, e reportaram resultados com diâmetro da zona de inibição superior a 40 mm, quando empregado um volume de 8,0 μ L da amostra por disco.

5.2.2. Teste de microdiluição em caldo – determinação da concentração inibitória mínima

Para se determinar qual a menor concentração do OE ou do citral, capaz de inibir ou impedir o crescimento de microorganismos, as amostras foram analisadas pelo método da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM). Os resultados são mostrados nas Tabela 03 e 04 respectivamente. As figuras 02, 03 e 04 representam o percentual de inibição do crescimento de microrganismos contemplando todas as concentrações de Óleo Essencial e Citral utilizadas, bem como para o Fluconazol.

Tabela 3: Valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM), obtidos para o óleo essencial (OE) de *P. elongata* e citral, frente à *C. albicans*, *C. Parapsilosis* e *C. tropicalis*. Para fins comparativos, Fluconazol foi utilizado como padrão positivo.

CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) - <i>Candida albicans</i> ATCC 24433	
Substâncias teste	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Fluconazol	32
OE <i>Pectis elongata</i>	0,55
Citral 95%	2,19
CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) - <i>Candida parapsilosis</i> ATCC 90018	
Substâncias teste	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Fluconazol	2
OE <i>Pectis elongata</i>	0,55
Citral 95%	2,19
CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) - <i>Candida tropicalis</i> ATCC 750	
Substâncias teste	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Fluconazol	64
OE <i>Pectis elongata</i>	17,6
Citral 95%	35

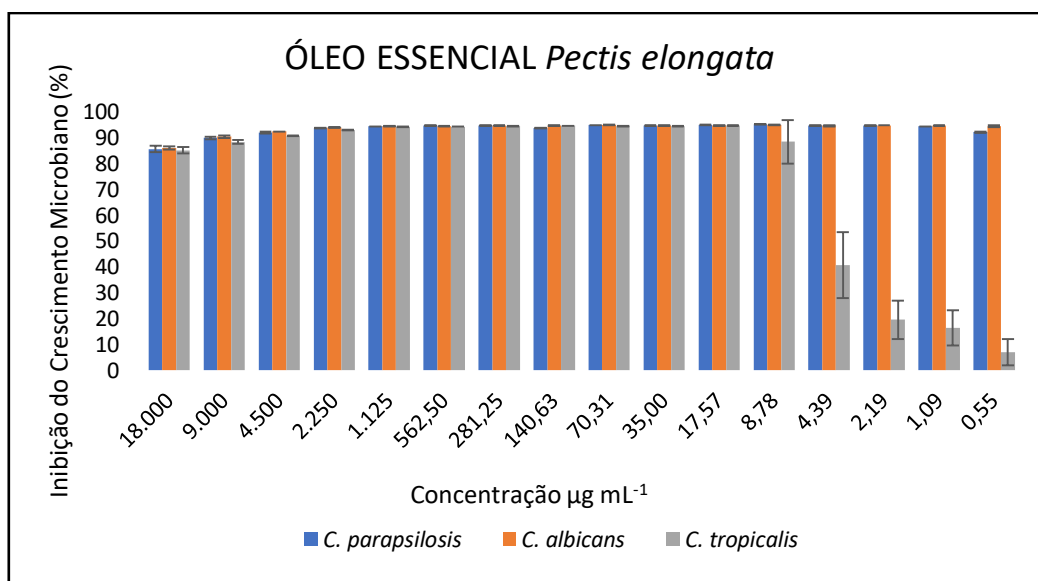


Figura 03 – Inibição do crescimento de *Candida Parapsilosis*, *C. albicans* e *C. tropicalis* na presença do Óleo Essencial de *P. elongata* em concentrações variando de 18.000 a 0,55 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

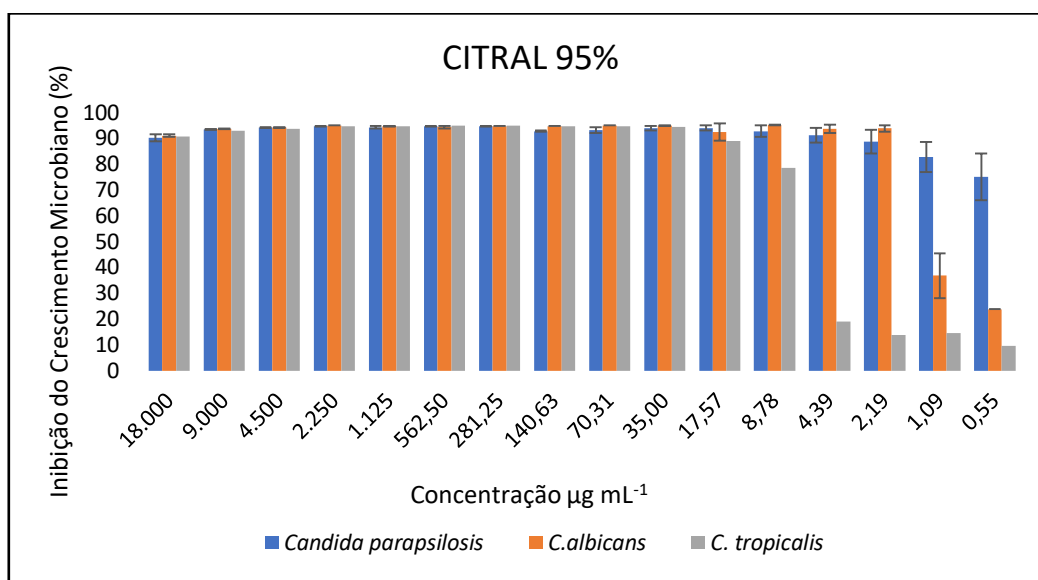


Figura 04 – Inibição do crescimento de *Candida Parapsilosis*, *C. albicans* e *C. tropicalis*, na presença do Citral, em concentrações variando de 18.000 a 0,55 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

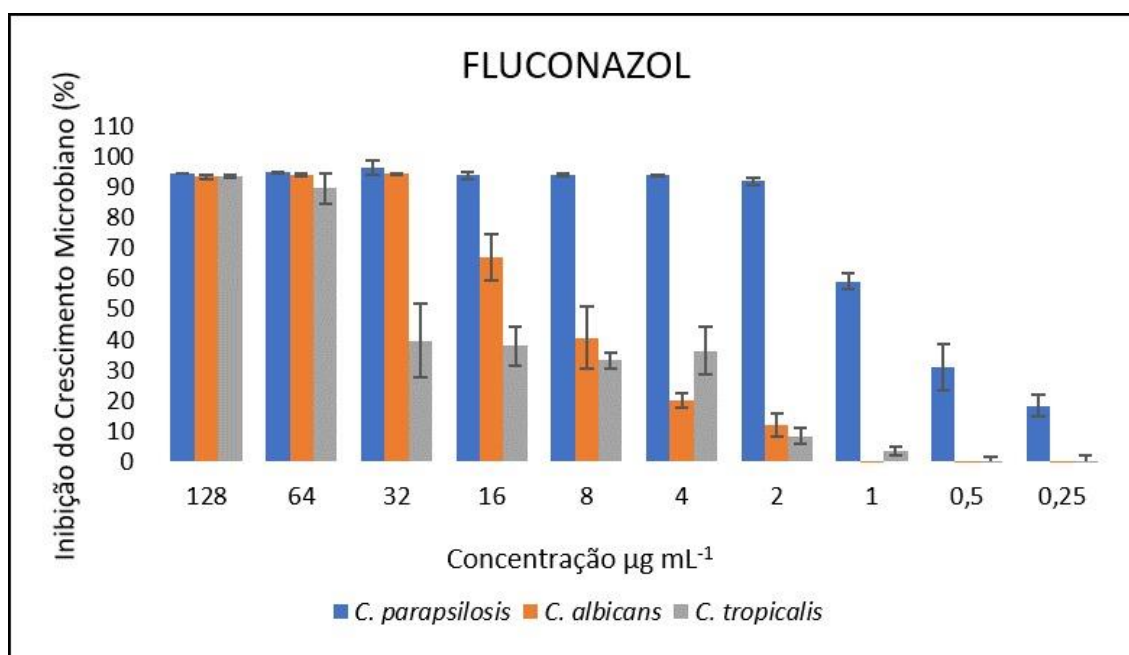


Figura 05 – Inibição do crescimento de *Candida Parapsilosis*, *C. albicans* e *C. tropicalis*, na presença do Fluconazol, em concentrações variando de $128 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Para o óleo essencial de *P. elongata*, os valores de CIM foram de 0,5, 0,5 e $17,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ frente à *C. albicans*, *C. parapsiloses* e *C. tropicalis*, mostrando-se mais eficaz que o antifúngico padrão frente às três cepas ensaiadas. Prudent *et al.* (1995), avaliaram o óleo essencial de *P. elongata*, quimiotipo citral (neral + geranial), frente à *C. albicans*, e encontraram valores de CIM entre 0,25 e $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, para exemplares coletados em três diferentes regiões da Martinica, França.

Tabela 4: Valores da Concentração Fungicida Mínima (CFM), obtidos para o óleo essencial (OE) de *P. elongata* e citral, frente à *C. albicans*, *C. Parapsilosis* e *C. tropicalis*. Para fins comparativos, Fluconazol foi utilizado como padrão positivo.

CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM) - <i>Candida albicans</i> ATCC 24433	
Substâncias teste	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Fluconazol	> 128
OE <i>Pectis elongata</i>	281,3
Citral 95%	281,3
CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM) - <i>Candida parapsilosis</i> ATCC 90018	
Substâncias teste	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Fluconazol	> 128
OE <i>Pectis elongata</i>	562,5
Citral 95%	562,5
CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM) - <i>Candida tropicalis</i> ATCC 750	
Substâncias teste	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Fluconazol	> 128
OE <i>Pectis elongata</i>	281,3
Citral 95%	1125

Os valores de CFM para o óleo essencial de *P. elongata* variaram de 281,3 a 562,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ frente à *C. albicans*, *C. parapsiloses* e *C. tropicalis*, respectivamente.

O citral é um composto bastante estudado como um agente antifúngico. Zore *et al.* (2011), relataram o potencial anticandida de seis terpenóides, incluindo citral, contra vários isolados de *Candia albicans* (n = 39) e não *C. albicans* (n = 9). Todos os seis terpenóides exibiram excelente atividade sinérgica com fluconazol, incluindo cepas resistentes a este composto azólico. Também foi relatado que o citral apresenta potente atividades antifúngica contra *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C.*

tropicalis (SILVA *et al.*, 2008). O citral tem mostrado alta eficiência sobre cepas de *C. albicans*, inclusive superando antifúngicos como a nistatina e cloreto de benzalcônio (SCHUCK *et al.*, 2001; ONAWUNMI, 1989; SILVA *et al.*, 2008; ABE *et al.*, 2003).

Segundo Silva *et al.* (2008), o citral atua como agente fungicida porque é capaz de formar um complexo de transferência de carga com um doador de elétrons em células fúngicas, resultando na morte do fungo.

6. CONCLUSÕES

O óleo essencial de galhos e folhas da espécie *P. elongata* exibiu forte atividade antifúngica, provavelmente devido alta concentração do composto Citral (formado pela mistura dos isômeros Neral e Geranial), composto com atividade antifúngica e antibacteriana já comprovada. A presença do linalol no óleo essencial de *P. elongata*, assim como de outros compostos, presentes em menor concentração, também pode ter contribuído, de maneira sinérgica, para a atividade antimicrobiana deste óleo essencial. O método de extração por Cromatografia Gasosa possibilitou a identificação de vários componentes do óleo essencial, identificando Neral e Geranial como componentes majoritários.

7. REFERÊNCIAS

ABE, S. *et al.* Anti-*Candida albicans* activity of essential oils including lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil and its component, citral. **Jpn. J. Med. Mycol.** 44(4): p. 285-291, 2003.

ABIFISA, **Associação Brasileira das Empresas do setor de Fitoterápicos, Suplemento Alimentar e de Promoção da Saúde**. Disponível em: http://www.abifisa.org.br/noticias_ver.asp?news=947. Acesso em: 20/03/2019.

ABRANTES, M. R. *et al.* Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre leveduras *Candida* não albicans. **Rev. Bras. Farm.** 94 (3): 227-233, 2013.

ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, 4th ed.; **Allured Publ. Corp.**: Carol Stream, IL, USA, 2007.

ALANGADEN G. J. **Nosocomial fungal infections: epidemiology, infection control, and prevention. Infectious Disease Clinics of North America.** 25: p. 201-225, 2011.

ALBERTSON, G. D., NIIMI, M., CANNON, R. D., JENKINSON, H. F. Multiple efflux mechanisms are involved in *Candida albicans* fluconazole resistance. **Antimicrob. Agents Chemother.** 40, p. 2835–2841, 1996.

ALBUQUERQUE, M. R. J. R. *et al.* Nematicidal and larvicidal activities of the essential oils from aerial parts of *Pectis oligocephala* and *Pectis apodocephala* Baker. **An. Acad. Bras. Cienc.** 79, p. 209–213, 2007.

ALMIRANTE, B. *et al.* Epidemiology, risk factors, and prognosis of *Candida parapsilosis* bloodstream infections: case-control population based surveillance study of patients in Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. **J Clin Microbiol**, v. 44, n. 5, p. 1681-1685, 2006.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J.C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, 45: p. 493-496, 1966.

BAUTISTA, H. P. *Pectis* L. (Compositae – Tageteae), espécies ocorrentes no brasil. **Arquivos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, 1987.

BIZZO, H.R.; HOVELL, A.M.C.; REZENDE, C.M. Óleos essenciais no Brasil: Aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Quim. Nova**, v.32, p. 588-594, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília: Ministério da Saúde. 60 p. 2009

BRASIL. Relação Nacional de Medicamentos Essenciais: RENAME 2018. Brasília: MS, 2018.

BREMER, H. Asteraceae. Cladistics and Classification. Timber Press, Portland, 1994.

BRITO, L. R. *et al.* Clinical and microbiological aspects of candidemia due to *C. parapsilosis* in Brazilian tertiary care hospitals. **Medical Mycology**, 44: p. 261-266, 2006.

BUCHBAUER, G. (Ed.). Handbook of essential oils, science, technology and applications. Boca Raton, FL: **CRC Press**, p. 353-548, 2010.

BURT, S.A.; Essential oils: their antibacterial properties and potencial applications in foods – a review. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 94, p. 223-253, 2004.

CALABRESE, D.; BILLE, J.; SANGLARD, D. A novel multidrug efflux transporter gene of the major facilitator superfamily from *Candida albicans* (FLU1) conferring resistance to fluconazole. **Microbiology**, 146, p. 2743–2754, 2000.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Cienc. Cult.**, São Paulo, v. 55, n. 3, p. 37-39, 2003.

CARLSON, L. H. C. **Extração de óleo essencial de capim-limão com dióxido de carbono a altas pressões**. 2012. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina Florianópolis: UFSC/, 2012.

CASSEL, E.; VARGAS, R. M. F. Experiments and modeling of the *Cymbopogon winterianus* essential oil extraction by steam distillation. J. Mex. **Chem. Soc.** v. 55, p. 57-60, 2006.

CHAFFIN, W. L. *et al.* Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. **Microbiol Molec Biol Rev**, v. 62, p. 130-180, 1998.

CHINSEMBU, K. C. Plants and other natural products used in the management of oral infections and improvement of oral healthy. **Acta Trop.**, v. 154, p. 6-18, 2005.

CHOI, M. J. *et al.* Resistance mechanisms and clinical features of fluconazole-nonsusceptible *Candida tropicalis* isolates compared with fluconazole-less-susceptible isolates. **Antimicrob. Agents Chemother.** 60, p. 3653–3661, 2016.

CIRAK, M. Y.; KALKANCI, A.; KUSTIMUR, S.; Use of molecular methods in identification of *Candida* Species and evaluation of fluconazole resistance. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** Rio de Janeiro, v.98, n.8, 2003.

COLOMBO, A. Epidemiology and treatment of hematogenous candidiasis: a Brazilian prospective. **Braz. J. Infect. Dis.**, 4(3): p. 113-118, 2000.

COLOMBO, A. L. *et al.* Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. **J. Clin. Microbiol.**, 44(8): p. 2816-2823, 2006.

COLOMBO, A.L. *et al.* High rate of non - albicans in Brazilian tertiary care hospitals. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, 34: p. 281-286, 1999.

COWEN, L. E. *et al.* Evolution of drug resistance in experimental populations of *Candida albicans*. **J. Bacteriol.** 182, p. 1515–1522. 2000.

CUNHA, A. P. *et al.* *Plantas Aromáticas e Óleos Essenciais Composição e Aplicações*, Lisboa, 2012.

DA SILVA, C.B.; GUTERRES, S.S.; WEISHEIMER, V.; SCHAPOVAL, E.E.S. Antifungal Activity of the Lemongrass Oil and Citral Against *Candida* spp. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases.** 12(1): p. 63-66, 2008.

DEFILIPPS, R. *et al.* Medicinal plants of the Guianas (Guyana, Surinam, French Guiana). Washington, D.C.: **Dept. of Botany, National Museum of Natural History, Smithsonian Institution**, 2004.

DURÁN MT, *et al.* Susceptibilidad antifúngica de aislados de *Candida* spp. De hemocultivos en un período de cinco años (1997-2001). **Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.**; v. 21, n. 9, p. 488-92, 2003.

EMBRAPA - **Empresa brasileira de pesquisas agropecuária**. Disponível em: <<http://www.cenargen.embrapa.br/recgen/plantasmed.html>>. Acessado em: setembro de 2017.

FISHER, K.; PHILLIPS, C.A. The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* 0157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* in vitro and in food systems. **J. Antim. Ag. Chemoth**; v. 101, p. 1232-1240, 2006.

FRANZ, R.; RUHNKE, M.; MORSCHHA, J.; Molecular aspects of fluconazole resistance development in *Candida albicans*. **Mycoses**; n. 42, p. 453–458. 1999.

GIORDANI, C.; SANTIN, R.; CLEFF, M.B. Levantamento de extratos vegetais com ação anti-*Candida* no período de 2005-2013. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.17, n.1, p.175-185, 2015.

GRENAND P, MORETTI C, JACQUEMIN H. **Pharmacopées Traditionnelles en Guyane—Créoles, Palikur, Wayãpi**. Editions de l'ORSTOM: Paris, 1987.

GUERRA, TÂNIA M. *et al.* Ecologia da polinização de *Momordica charantia* L. (Cucurbitaceae). **Revista brasileira de Botânica**; v. 28, n. 3, 2005.

HAWSER, S.; ISLAM, K. Comparisons of the effects of fungicidal and fungistatic antifungal agentes on the morphogenetic transformation of *Candida albicans*. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 43, n. 3, p. 411-412, 1999.

HERMAN, A.; TAMBOR, K.; HERMAN, A. Linalool effects antimicrobial efficacy of essential oils. **Curr. Microbiol.**, v. 72, p. 165-172, 2016.

HEYWOOD, V. H.; HARBORNE, J. B.; TURNER, B. L. *The Biology and Chemistry of the Compositae*. **Academic Press**: London, 1977.

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

HOFLING, J. F. *et al.* Antimicrobial potential of some plant extracts against *Candida* species. **Brazilian Journal of Biology**, 2010.

HORN D. L. *et al.* Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry. **Clin Infect Dis**, v. 48, n. 12, p. 1695-703. 2009.

HORNER, M. *et al.* Triazenos e atividade antibacteriana. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 3, p. 441-449, 2008.

ISERHARD, A. R. M. *et al.* Práticas culturais de cuidados de mulheres mães de recém-nascido de risco do Sul do Brasil. **Escola Anna Nery**, v.13, n.1, p.116-122. 2009.

KEIL, D. J. Biogeografia de *Pectis* (Asteraceae) nas Índias Ocidentais. **Sou. J. Bot.**; 70: p. 119-122, 1983.

KREMERY, V.; BARNES, A. J. Non-albicans *Candida* spp. causing fungemia, pathogenicity and antifungal resistance. **J. Hosp. Infect.** 50, p. 243–260, 2002.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACARRI, E. M.; MELLO, N. T. **Tratado de Micologia Médica**. 9. ed. São Paulo: Savier; p. 307-52, 2002.

LACAZ, C. S; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C. **Micologia médica: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico**. 8 ed. São Paulo: Sarvier, 1991.

LINARES M. J.; *et al.* CHROMAgar *Candida* más fluconazol: comparación con técnicas de microdilución. **Enferm Infecc Microbiol Clin**; v 21, n 9, p 493-7. 2003.

LOCKHART, S. R. *et al.* Geographic distribution and antifungal susceptibility of the newly described species *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* in comparison to the closely related species *Candida parapsilosis*. **J Clin Microbiol**, v. 46, n. 6, p. 2659-64, 2008.

LÓPEZ-RIBOT J. L. *et al.* Antibody response to *Candida albicans* cell wall antigens. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. 41:187-196. 2004.

MARCOS-ZAMBRANO, L. J. *et al.* Production of biofilm by *Candida* and non-*Candida* spp. isolates causing fungemia: comparison of biomass production and

metabolic activity and development of cut-off points. *Int. J. Med. Microbiol.* 304, 1192–1198, 2014.

MARTINS, N.; BARROS, L.; HENRIQUES, M.; SILVA, S. Activity of phenolic compounds from plant origin against *Candida* species. **Industrial Crops and Products**, 74: 648-670, 2015.

MEDRANO, D. J. A. *et al.* Candidemia in a Brazilian hospital: the importance of *Candida parapsilosis*. **Ver Inst Med Trop S. Paulo**, v. 48, n. 1, p. 17-20, 2006.

MICHELIN, D. C. *et al.* Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Ver Bras Farmacogn** 15: p. 316-320, 2005.

MINAMI, O. S.; OLIVEIRA, F. Atividade antifúngica de *Bidens pilosa* L. **Rev Bras Farmacogn** 1: p. 118-122, 1986.

MORACE, G. *et al.* Antifungal drug resistance in *Candida* species, **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, 2014.

MOREIRA, M. R.; PONCE, A. G.; del VALLE, C. E.; ROURA, S. I. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. **LWT- Food Science and Technology**, v. 38, n.5, p. 565-570, 2005.

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast.** Approved Standard, document M27-A2, 2002.

NCCLS. **Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras;** Norma Aprovada—Segunda Edição. Norma M27-A2 do NCCLS (ISBN 1-56238-469-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898. Estados Unidos, 2002.

NEWMAN, D. J. & CRAGG, G. Produtos naturais como fontes de novos medicamentos ao longo dos 30 anos de 1981 a 2010. **Journal of Natural Products**, 2012.

NIST - National Institute of Standards and Technology. **Mass Spectral Library (NIST/EPA/NIH) and NIST Mass Spectral Search Program** (Version 2.0g), 2011.

NUCCI, M.; COLOMBO, A. L.; Emergence of resistant *Candida* in neutropenic patients. **Braz J Infect Dis**. Salvador, v.6 n.3 jun. 2002.

OLIVEIRA, R. D. R.; MAFFEI, C. M.; MARTINEZ, R. Infecção Urinária Hospitalar por Leveduras do Gênero *Cândida*. **Rev Ass Med Brasil**. 47:231-5, 2001.

ONAWUNMI, G. O. Evaluation of the antifungal activity of lemon grass oil. **Int J Crude Drug Res**, 27(2): p. 121-126, 1989.

PANIZZO, M. M.; PÉREZ, C. Y MANISCALCHI, M. T. Susceptibilidad in vitro a los antifúngicos de *Candida* sp. y serotipos de *Candida albicans* aisladas de pacientes con vaginitis primaria y resurgente. **BSVM** v.20 n.1 Caracas ene. 2000.

PARANAGAMA, P.A.; ABEYSEKERA, K.H.T.; ABEYWICKRAMA, K.; NUGALIYADDE, L. Fungicidal and anti-aflatoxigenic effects of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. (lemongrass) against *Aspergillus flavus* Link. isolated from stored rice. **Lett. App. Microbiol.**, v. 37, p. 86-90, 2003.

PRUDENT, D.; PERINEAU, F.; BESSIERE, J. M.; MICHEL, G. Analysis of the essential of *Pectis elongata* Kunth from Martinique. Evaluation of its bacteriostatic and fungistatic properties. **J. Essent. Oil Res**. 7: p. 63–68, 1995.

QUEIROZ, M. V. F. **Atividade antifúngica in vitro de plantas medicinais frente a leveduras do gênero *Candida* isoladas da cavidade bucal**. 1998. João Pessoa, 98f. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-graduação em Odontologia, Universidade Federal da Paraíba, 1998.

RATES, S. M. K. **Plants as source of drugs**. **Toxicon**, v. 39, p. 603-613, 2001.

REMPEL, C.; MACIEL, M. J.; BERGMANN, P. C.; MORÁS, A. P.; GOETTENS, C. **Efeito antimicrobiano de plantas medicinais: uma revisão de estudos**

científicos. Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais, v.10, n.4, p. 57-82, 2019.

REX, J. H.; RINALDI, M. G.; PFALLER, M. A. Resistance of *Candida* species to fluconazole. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 39: p. 1–8, 1995.

REZENDE, H. A., COCCO, M. I. M. A utilização de fitoterapia no cotidiano de uma população rural. **Revista Escola de Enfermagem, USP.** v.36, n.3, p.282-8. 2002.

RODRÍGUEZ, D. *et al.* Predictors of candidaemia caused by non-albicans *Candida* species: results of a population based surveillance in Barcelona, Spain. **Clin Infect Dis**, v. 16, n. 3, p. 1676-82, 2010.

SAITO, M. L.; SCRAMIN, S. **Plantas aromáticas e seu uso na agricultura**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 48p. 2000.

SANTOS, A.S.; ALVES, S.M.; FIGUEIRÊDO, F.J.C.; NETO, O.G.R. **Descrição de sistema e de métodos de extração de óleos essenciais e determinação de umidade de biomassa em laboratório**. Belém: Embrapa, 6p. 2004. (Comunicado Técnico, 99).

SANTOS, F. L. & SATO, H. H. **Isolamento de polímeros da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* e avaliação da atividade antioxidante da manana-proteína isolada**. Quim. Nova, Vol. 32, No. 2, 322-326, 2009.

SCHEFFER, J. J. C. The isolation of essential oils-factors influencing the oil composition. **Acta Hort.** 344, p. 2-8, 1993.

SCHUCK, V.J. A. *et al.* Avaliação da atividade antimicrobiana de *Cymbopogon citratus*. **Rev Bras Ciên Farm**, 37(1): p, 45-49, 2001.

SELL, C. Chemistry of essential oils. In: Base, K.H.C.; BUCHBAUER, G. (Ed.). **Handbook of essential oils, science, technology and applications**. Boca Raton, FL: CRC Press, p.121-150, 2010.

SENEVIRATNE, C. J. *et al.* Antifungal susceptibility in serum and virulence determinants of *Candida* bloodstream isolates from Hong Kong. **Front. Microbiol.** 7:216, 2016.

SERAFINI, L. A.; CASSEL, E. Produção de óleos essenciais: uma alternativa para a agroindústria nacional. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. **Biotecnologia na agricultura e na agroindústria**. Guaíba: Agropecuária, 2001.

SHI, C. *et al.* **Antimicrobial Activity and Possible Mechanism of Action of Citral against *Cronobacter sakazakii***. PLoS ONE 11(7): e0159006. 2016.

SIANI, A. C. Óleos essenciais. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 2, p. 38-43. Brasil. 2000.

SILVA, C. B. *et al.* Antifungal activity of the lemongrass oil and citral against *Candida* spp. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, 2008; 12(1): 63-6

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis:Editora da Universidade UFRGS / Editora da UFSC, 2004.

STEFFENS, A. H. **Estudo da composição química dos óleos essenciais obtidos por destilação por arraste a vapor em escala laboratorial e industrial**. Porto Alegre. 2010. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais, PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL, 2010.

TROFA, D. *et al.* *Candida* parapsilosis, an emerging fungal pathogen. **Clin Microbiol Rev**, v. 21, n. 4, p. 606-25, 2008.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. D. J. A. Generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography A**, 11, p. 463-471, 1963.

ZORE, G. B. *et al.* Terpenoids inhibit *Candida albicans* growth by affecting membrane integrity and arrest of cell cycle. **Phytomed.** 18: p. 1181-1190, 2011.

ZUZA-ALVES, D. L. *et al.* Evaluation of virulence factors in vitro, resistance to osmotic stress and antifungal susceptibility of *Candida tropicalis* isolated from the coastal environment of Northeast Brazil. **Front. Microbiol.** 7:1783, 2016.