



UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA EDUCAÇÃO – ICED
PROGRAMA DE CIÊNCIAS NATURAIS – PCNAT
CURSO DE LICENCIATURA INTEGRADA EM BIOLOGIA E QUÍMICA-
BIOLOGIA

VANESSA MACIEL FERNANDES

COMPOSIÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-
CANDIDA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia origanoides* Kunth
(Verbenaceae)

Santarém-PA
Março de 2018

VANESSA MACIEL FERNANDES

COMPOSIÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-CANDIDA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia origanoides* Kunth (Verbenaceae)

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado ao Instituto de Ciências da Educação, da Universidade Federal do Oeste do Pará, como requisito parcial para a obtenção do título de Licenciatura Integrada em Biologia e Química.

Área de habilitação: Biologia

ORIENTADOR

Dr. RICARDO BEZERRA DE OLIVEIRA

Coorientador(a): SANDRA LAYSE FERREIRA SARRAZIN

Santarém-PA
Março de 2018

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

F363c Fernandes, Vanessa Maciel
Composição química e avaliação da atividade anti-cândida do óleo essencial de *Lippia origanoides* Kunth (Verbenaceae) / Vanessa Maciel Fernandes. – Santarém, Pará, 2018.
47 fls.
Inclui bibliografias.

Orientador Ricardo Bezerra de Oliveira
Coorientadora Sandra Layse Ferreira Sarrazin
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Federal do Oeste do Pará, Instituto de Ciências da Educação, Curso de Licenciatura Integrada em Biologia e Química.

1. Fungos. 2. Óleos essenciais. 3. Cândida. I. Oliveira, Ricardo Bezerra de, orient. II. Sarrazin, Sandra Layse Ferreira, coorient. III. Título.

CDD: 23 ed. 616.969

TERMO DE APROVAÇÃO

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi analisado pelos membros da Banca Examinadora, abaixo assinados, sendo considerado com conceito: _____

APROVADO EM: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Dr. Ricardo Bezerra de Oliveira – UFOPA

Dr^a. Valéria Mourão de Moura - UFOPA

Prof^a Msc. Chieno Suemitsu – UFOPA

Santarém-PA
Março de 2018

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

Marthin Luther King

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Composição química do óleo essencial de <i>Lippia organoides</i> Kunth.....	26
Tabela 2	Potencial antifúngico do óleo essencial de <i>Lippia organoides</i> contra espécies do gênero <i>Candida</i>	39

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Aspecto geral da espécie <i>Lippia origanoides</i> Kunth.....	19
Figura 2	Distribuição geográfica de <i>Lippia origanoides</i> Kunth.....	20
Figura 3	Folhas e inflorescências de <i>Lippia origanoides</i> Kunth.....	21

LISTA DE ABREVIATURAS

$\mu\text{l}/\text{mL}$ – microlitros por mililitros

AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

ATCC – Coleção de Culturas Tipo Americana

CG-EM – Cromatografia Gasosa – Espectrometria de Massa

CO_2 – dióxido de carbono

DO – Densidade Ótica

eV – eletron volts

FID - Detector por ionização de chama

GP - Galato de Propila

GPS – Sistema de Posicionamento Global

H_2O - água

MIC/CIM: Concentração Inibitória Mínima

mL – mililitro

MOPS - 3 (N- morfolino) propanosulfônico

NCCLS – National Commite for clinical laboratory standarts

nm – Nanômetro

OE – Óleo Essencial

p/v - partes por volume

Psi - libra força por polegada quadrada

RPMI – Roswell Park Memorial Institute

UNESCO – Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura

AGRADECIMENTOS

À Deus pela benção da vida e por sempre me permitir amadurecer através dos obstáculos.

À minha família que esteve ao meu lado em todos os momentos. Em especial à minha mãe Lucilena, pelo exemplo de coragem, perseverança e força, meu pai José Carlos pelo apoio e confiança, minhas tias Nazaré e Bia por todo carinho e ótimas conversas de conforto, minha sobrinha Bianca por todos os sorrisos e por ser a esperança de dias melhores.

Ao meu querido e amado Jhonata, pelo companheirismo, compreensão e amor. Passei por muitas aflições e você sempre segurou a minha mão e conseguiu uma forma de me tranquilizar. Tenho certeza que nossa relação é especial e única.

À Dra. Sandra Layse Ferreira Sarrazin pela orientação, paciência e disponibilidade em ensinar. Sua compreensão e dedicação foram fundamentais.

Aos meus professores da Graduação, Alfredo, Teston, Thais, Michella, Ricardo, Yukari, Fábio, Hamilton, Chieno, Gabriel, Ademir e Kátia por toda dedicação em ensinar e preparar cada um de seus alunos.

Ao Prof. Drº Fábio Rogério Rodrigues dos Santos, por toda dedicação em passar conhecimento, amizade sincera e apoio.

À Profª Msc. Chieno Suemitsu, por compartilhar conosco toda a sua sabedoria em ciências, assim como as valiosas lições de vida.

Aos meus queridos colegas de graduação, Carlos, Daiane, Elaine, Fernanda, Heldervan, Janeclissier, Leandro, Lorena, Maria Cristiane, Patrick, Rogério e Samela, por todas as risadas, brigas e choros, tudo isso de alguma forma contribuiu para nossa formação profissional e pessoal. Em especial, Heldervan que com seu conhecimento nerd de computadores muito me salvou durante a graduação.

Ao querido amigo Carlos Rafael Melo Dezincourt por todo apoio, incentivo, assistência e pela grande parcela de ajuda na finalização desse trabalho, dando sentido a frase “amigo é coisa pra se guardar...”

As minhas queridas amigas, Gabriela Pedostos, Lorena Viana, Relly Lima, Paula Buchalle, Sabrina Almeida e Daianny Andrade por toda amizade e torcida, nesse percurso e na vida.

Ao Laboratório de Bioprospecção e Biologia Experimental por ceder espaço e material para que as pesquisas e testes fossem realizados.

Agradeço a todos que de certa forma tornaram meu caminho mais feliz e, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Infecções fúngicas compõem um crescente e significativo problema de saúde pública. Das infecções causadas por fungos, a Candidíase destaca-se por seu comportamento oportunista endógeno, uma vez que ocorre em tecidos de hospedeiros que apresentam comprometimento de seus sistemas específicos ou inespecíficos de. O constante surgimento de cepas resistentes aos principais antifúngicos convencionais tem levado pesquisadores à corrida em busca de novas alternativas eficazes e seguras. Dessa forma, importante estudo relacionado com a atividade antifúngica de produtos de origem vegetal vem apresentando resultados promissores na descoberta de princípios ativos que poderão ser utilizados no tratamento de infecções causadas por microorganismos, entre eles, os fungos. O objetivo da pesquisa foi determinar a composição química e avaliar o potencial anti-candida do óleo essencial de *Lippia origanoides* Kunth. A composição química do óleo essencial de *L. origanoides* foi determinada por meio da técnica de CG-EM (Cromatografia Gasosa - Espectrometria de Massa), apresentando carvacrol (47,2%) e timol (12,8%) como principais compostos voláteis. Para avaliar o potencial anti-*Candida* de *L. origanoides*, foram utilizadas duas metodologias: disco difusão em agar e microdiluição em caldo. O óleo essencial de *L. origanoides* foi testado contra 3 cepas de leveduras: *Candida albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, apresentando eficácia na inibição de crescimento das três cepas avaliadas, com halos de inibição variando entre de $44,1 \pm 0,3$, $30,6 \pm 0,2$ e $24,0 \pm 0,1$ mm de diâmetro, respectivamente. As CIM (Concentração Inibitória Mínima) foram determinadas em $0,62 \mu\text{l/mL}$ frente a *C. albicans*, $0,30 \mu\text{l/mL}$ frente a *C. tropicalis* e $0,18 \mu\text{l/mL}$ frente a *C. parapsilosis*. Fluconazol, revelou valores de CIM de $0,125$ para *C. albicans* e *C. tropicalis*, e $0,010$ para *C. parapsilosis*. Assim, observa-se que o óleo essencial de *L. origanoides* apresentou atividade contra três cepas de *Candida*, e que sua capacidade de diminuir ou eliminar o microorganismo depende da concentração ensaiada.

PALAVRAS-CHAVE: *Fungos, óleos essenciais, Candida*

ABSTRACT

Fungal infections make up a growing and significant public health problem. Of the infections caused by fungi, Candidiasis stands out for its endogenous opportunistic behavior, since it occurs in host tissues that present compromise of its specific or non-specific defense systems. The constant emergence of strains resistant to the main conventional antifungals has led researchers to race in search of new effective and safe alternatives. Therefore, important studies related to the antifungal activity of products of plant origin have shown promising results in the discovery of active principles that can be used in the treatment of infections caused by microorganisms, among them fungi. The objective of the research was to determine the chemical composition and to evaluate the anti-candida potential of the essential oil of *Lippia organoides* Kunth. The chemical composition of the essential oil of *L. organoides* was determined by means of the GC-EM (Gas Chromatography - Mass Spectrometry) technique, presenting carvacrol (47.2%) and thymol (12.8%) as the main volatile compounds. To evaluate the anti-*Candida* potential of *L. organoides*, two methodologies were used: disc diffusion in agar and microdilution in broth. The essential oil of *L. organoides* was tested against 3 yeast strains: *Candida albicans*, *C. tropicalis* and *C. parapsilosis*, showing efficacy in the inhibition of growth of the three strains evaluated, with inhibition halos ranging from $44.1 \pm 0,3$, 30.6 ± 0.2 and 24.0 ± 0.1 mm in diameter, respectively. The MICs (Minimal Inhibitory Concentration) were determined in $0.62 \mu\text{l} / \text{mL}$ against *C. albicans*, $0.30 \mu\text{l} / \text{mL}$ against *C. tropicalis* and $0.18 \mu\text{l} / \text{mL}$ against *C. parapsilosis*. Fluconazole, revealed MIC values of 0.125 for *C. albicans* and *C. tropicalis*, and 0.010 for *C. parapsilosis*. Thus, it is observed that the essential oil of *L. organoides* showed activity against three strains of *Candida*, and that its ability to decrease or eliminate the microorganism depends on the concentration tested.

KEYWORDS: *Fungi*, *Essential Oils*, *Candida*

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	
LISTA DE FIGURAS.....	
LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS.....	
RESUMO.....	
ABSTRACT.....	
1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
2.1 Fungos.....	13
2.2 O Gênero <i>Candida</i>	14
2.3 Resistencia antifúngica.....	15
2.4 Plantas com potencial antifúngico.....	16
2.5 Família Verbenaceae.....	17
2.6 Gênero <i>Lippia</i>	17
2.7 Espécie <i>Lippia origanoides</i>	18
2.8 Óleos essenciais.....	20
3. OBJETIVOS.....	22
3.1 . Geral.....	22
3.2 . Específicos.....	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
4.1 Coleta e identificação da amostra vegetal.....	23
4.2 Extrações de óleo essencial.....	23
4.3 Determinações da composição química.....	23
4.4 Avaliação da atividade antifúngica.....	24
4.2.1 Microrganismos selecionados.....	24
4.2.2 Método de disco difusão em Agar.....	24
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
7. REFERÊNCIAS.....	31

1. INTRODUÇÃO

Infecções fúngicas compõem um crescente e significativo problema de saúde pública (COLOMBO *et al.*, 2007). Das infecções causadas por fungos, a Candidíase destaca-se por seu comportamento oportunista endógeno, uma vez que ocorre em tecidos de hospedeiros que apresentam comprometimento de seus sistemas específicos ou inespecíficos de defesa (ABRANTES *et al.*, 2013).

Candida albicans representa o agente etiológico mais frequente, porém, outras leveduras não *Candida albicans* tais como *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. stellatoidea*, *C. tropicalis*, entre outras espécies, têm apresentado importância como agente etiológico das infecções fúngicas (OLIVEIRA LIMA *et al.*, 2006)

O tratamento convencional da candidíase tem encontrado barreiras relacionadas principalmente à reduzida quantidade de agentes antifúngicos disponíveis, bem como pela toxicidade atribuída à diferentes classes de antimicrobianos convencionais, além do crescente aumento de espécies resistentes à esses medicamentos (ABRANTES *et al.*, 2013).

O constante surgimento de cepas resistentes aos principais antifúngicos convencionais tem levado pesquisadores à corrida em busca de novas alternativas eficazes e seguras. Dessa forma, importantes estudos relacionados com a atividade antifúngica de produtos de origem vegetal (COUTINHO *et al.*, 2009; ZAPATA *et al.*, 2010; YAYA *et al.*, 2011 e OLIVEIRA *et al.*, 2011) vem apresentando resultados promissores na descoberta de princípios ativos que poderão ser utilizados no tratamento de infecções causadas por microorganismos, entre eles, os fungos.

Nesse contexto, os óleos essenciais (OE), produto derivado do metabolismo secundário de plantas (BURT, 2004), constituem uma rica fonte de compostos biologicamente ativos, que podem representar uma alternativa viável contra os mecanismos de resistência antifúngica (CASTRO, 2010).

A espécie *Lippia origanoides*, pertencente à família Verbenaceae, apresenta OE rico em carvacrol e timol, dois compostos conhecidos por apresentarem potencial contra diferentes microrganismos (PASCUAL *et al.*, 2001). Neste contexto, a avaliação do potencial anti-*Candida* do OE de *L. origanoides* pode contribuir como uma nova alternativa no combate à resistência antifúngica, uma vez que abrange uma vasta linha de microrganismos contra os quais tem sido testado, incluindo microrganismos que deterioram alimentos (DAFERERA, 2003; PEREIRA *et al.*, 2006; SINGH *et al.*, 2008; SARRAZIN *et al.*, 2015), fungos patogênicos (EZZAT, 2001; MANOHAR *et al.*, 2001; CHUANG *et al.*, 2007; GAZIM *et al.*, 2008),

fitopatógenos (ZHAO *et al.*, 2010) e bactérias produtoras de toxinas alimentares (LISBALCHIN e DEANS, 1997; ULTEE *et al.*, 1999; KOTZEKIDOU *et al.*, 2008).

Considerando o potencial farmacológico da referida espécie vegetal, bem como a importância de fontes alternativas ao uso de antifúngicos tradicionais; neste trabalho analisamos a composição química do OE extraído de folhas de *L. origanoides* proveniente da cidade de Santarém, Pará, Brasil, bem como seu potencial antifúngico frente a cepas de *Candida albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Fungos

Fungos são microrganismos eucarióticos, classificados como seres heterotróficos por não apresentarem pigmentos fotossintéticos, capazes de realizar absorção de energia luminosa e utilizá-la para síntese de compostos orgânicos, e aproveitarem a energia inclusa nas ligações químicas de vários nutrientes (SIDRIM *et al.*, 2004).

Estes microrganismos constituem um grupo abundante e diversificado na natureza, integrados em vários nichos no ambiente, incluindo a microbiota de homens e animais. Conforme sua morfologia, os fungos podem ser classificados em filamentos, leveduras e dimórficos, e podem ser caracterizados como estruturas unicelulares ou multicelulares (PRADO, 2007). Esta diferenciação faz-se em resposta a alterações de fatores ambientais, tais como temperatura, nutrientes, tensão de CO₂ e os potenciais de oxidação-redução. (FERREIRA *et al.*, 2006).

Os fungos são responsáveis por infecções conhecidas como micoses, e podem ser classificadas conforme os tecidos que atingem, em: micoses superficiais, localizadas nas camadas mais superficiais da pele ou dos pêlos; micoses cutâneas ou dermatomicoses, que localizam-se na pele, pêlo ou unhas; micoses subcutâneas; localizadas na pele e tecidos subcutâneos, micoses sistêmicas ou profundas atingindo órgãos internos e vísceras, e micoses oportunistas que atingem os pacientes imunocomprometidos por doenças de base, como diabetes, ou então os que são submetidos a tratamentos com uso de corticoidoterapia, imunossupressores e antibioticoterapia (TRABULSI e ALTERTHUM, 2004).

Infecções fúngicas compõem um crescente e significativo problema na saúde pública, devido ao aumento gradual de ocorrência nas últimas décadas, muitas vezes em ambiente hospitalar. Assim, a mortalidade e morbidade, ocasionadas por esta patologia têm apresentado proporções mais elevadas nos últimos anos (GARCÍA-RUIZ *et al.*, 2004; ALANGADEN, 2011). Entre os fungos oportunistas, as espécies pertencentes ao gênero *Candida* são os principais agentes etiológicos causadores das infecções nosocomiais (infecções contraídas durante estadia em hospital) (COLOMBO *et al.*, 2007).

2.2 O Gênero *Candida*

O gênero *Candida* é constituído de fungos leveduriformes, unicelulares e hialinos, que formam colônias de coloração branca, textura glabrosa úmida e superfície lisa (RAPOSO *et al.*, 1996; MORETTI *et al.*, 2004), taxonomicamente inclusos no grupo dos Ascomycetos.

É uma levedura que integra a microbiota do corpo humano, colonizando a pele e mucosas dos tratos digestivos e urinário, bucal e vaginal. Hoje existem aproximadamente duzentas leveduras inclusas no gênero *Candida*, e destas, pouco mais de 20 espécies são responsáveis por infecções no homem. São consideradas o principal grupo de fungos patógenos oportunistas, representando cerca de 8 a 10% das causas de infecções nosocomiais (HOSSAIN *et al.*, 2003, BORG-VON *et al.*, 2007, KUMAR *et al.*, 2008, KARKOWSKA-KULETA *et al.*, 2009, NEGRI *et al.*, 2010).

Dos fungos considerados patógenos humanos, *Candida* spp. é importante causa de morbidade e mortalidade substanciais (DEORUKHKAR e SAINI, 2016). *Candida albicans*, por exemplo, está entre as causas mais comuns de infecções fúngicas humanas em todo o mundo; no entanto, espécies não-*C. albicans*, tais como *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* e *Candida glabrata* são frequentemente identificadas como patógenos humanos (SILVA *et al.*, 2012).

Candida albicans é a principal espécie causadora de infecções conhecidas como candidíase. É considerado o patógeno oportunista mais comum na espécie humana (OLIVEIRA; MAFFEI; MARTINEZ, 2007), representando 50% do total das infecções causadas pelo gênero *Candida* (CASTÓN-OSORIO *et al.*, 2008; WEINDL *et al.*, 2010; ALANGADEN, 2011). Foi o primeiro fungo patogênico a ter o genoma sequenciado, o que tornou uma variedade de experimentos possíveis, além de um considerável avanço na biologia deste fungo (MAGEE e MAGEE, 2005).

Candida parapsilosis é um microrganismo ubíquo comumente isolado do ambiente no solo, na água e nas plantas (LUPETTI *et al.*, 2002). É considerada como um agente de infecções exógenas, conseguindo colonizar a pele (ALANGADEN, 2011), apresenta-se como a principal responsável por candidíase invasiva, sendo observada por diferentes pesquisadores (CELEBI *et al.*, 2007). Tornou-se um patógeno emergente de grande importância, pois é um dos principais agentes causadores de doenças em alguns centros hospitalares, sendo relatada em 15,5% das candidemias na América do Norte, 16,3% na Europa e, em maior incidência, 23,4%, na América Latina (MATTIELLO, 2015).

Candida tropicalis é considerada atualmente a segunda causa de candidíases graves em pacientes imunocomprometidos, depois de *C. albicans* (FISHER e COOK, 2001). Possui relevante potencial biológico como agente oportunista, e vem sendo relatada como o segundo ou terceiro agente etiológico mais comum de candidemia em pessoas com neoplasias, sendo sua maior ocorrência em leucemias e menor em tumores sólidos (WINGARD, 1995).

2.3 Resistência antifúngica

A constante ocorrência de infecções por espécies de *Candida* tem aumentando nas últimas décadas, fazendo com que a candidemia seja uma infecção presente nos ambientes hospitalares (ZARDO, 2004), e atingem principalmente indivíduos que usam drogas imunossupressoras para transplante de órgãos, debilitados por câncer e em tratamento intensivo de quimioterápicos, que fazem vasto uso de antibióticos, que possuem alimentação parental, além de pacientes soropositivos (WANKE e HARVEY, 2008).

O considerável aumento no índice de infecções fúngicas em pacientes imunodeprimidos/imunocomprometidos gera um uso maciço de antifúngicos por via sistêmica, de forma profilática ou terapêutica, o que vem revelando o problema de desenvolvimento de resistência antifúngica (MAFFEI, 2016).

Os frequentes erros no tratamento de infecções micóticas têm alertado para o relevante problema do mecanismo de resistência aos agentes antifúngicos. O aumento da resistência a antifúngicos chama a atenção para a necessidade do desenvolvimento de estratégias que evitem a sua dispersão entre os fungos (MENEZES, 2009).

Os primeiros relatos que apresentam resistência à *Candida* aconteceram em pacientes com candidíases mucocutâneas, tratados com cetoconazol, porém, a partir da epidemia de AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida), esse problema ganhou grande importância (NUCCI e COLOMBO, 2002). *C. albicans*, por exemplo, apresenta sensibilidade a todas as

drogas antifúngicas de uso sistêmico, contudo, casos de resistência adquirida a azólicos são conhecidos em pacientes que foram expostos prolongadamente a tais medicamentos (SILVA *et al.*, 2002).

O surgimento de cepas resistentes e um maior número de pacientes imunocomprometidos ou em fatores de risco, tem determinado um crescimento na ocorrência de infecções fúngicas nas últimas décadas (SANTOS JR., 2005). Este fato, relacionado ao progressivo uso de drogas antifúngicas tem colaborado para o surgimento de leveduras resistentes, dessa forma tem-se buscado através de pesquisas, alternativas para que tal problema seja solucionado por meio da produção de novas moléculas antimicrobianas a partir de recursos naturais, que causem menores efeitos colaterais aos pacientes.

2.4 Plantas com potencial antifúngico

Os problemas de saúde pública exigem modelos médicos de baixo custo que possam garantir práticas de promoção e recuperação da saúde (LUZ, 2003). Assim, a fitoterapia vem se destacando, o crescimento da procura pelos consumidores, a evolução no que diz respeito à regulamentação e a estudos científicos tem sido observado em todo o mundo (BRANDÃO, 2005).

O Brasil é um país conhecido por sua variedade de produtos de origem vegetal. Segundo a UNESCO (Organização das Nações Unidas para a Educação, Ciência e Cultura), o Brasil apresenta cerca de 20% das 250 mil espécies medicinais catalogadas, tornando viável a aplicação do potencial curativo dos vegetais para o tratamento de doenças (NUNES, 1999; SOUSA *et al.*, 2012). Isso gera um crescente interesse científico na corrida pela busca de produtos de origem vegetal com propriedades medicinais.

Tem-se verificado na literatura o registro da eficiência de extratos vegetais e OE adquiridos de diversas espécies botânicas, tais como cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) (PINTO *et al.*, 2009), alho (*Allium sativum* L.) (Khan e Katiyar, 2000), mático (*Piper aduncum* L.) (SANTOS *et al.*, 2014), alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) (OZCAN e CHALCHAT, 2008), manjerona (*Origanum majorana* L.) (VÁGI *et al.*, 2005), manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) (SAGGIORATTO *et al.*, 2012).

2.5 Família Verbenaceae

A família Verbenaceae possui cerca de 34 gêneros e 480 espécies (STEVENS, 2001), e encontra-se vastamente distribuída em regiões temperadas e tropicais (JUDD *et al.*, 2009), e é composta por subarbustos e ervas anuais a perenes (SALIMENA, 2000).

A família pertence à ordem Lamiales cujo vínculo entre famílias permanece mal resolvido (SOLTIS *et al.*, 2005). Verbenaceae ocorre em regiões tropicais, subtropicais e temperadas da América, África e Índia, bem como um dos centros de maior diversidade as regiões subtropicais da América do Sul (SANDRES, 2001).

Na flora brasileira constam para Verbenaceae, 17 gêneros e cerca de 250 espécies (SOUZA e LORENZI, 2005). Esta família dispõe de um enorme potencial em variadas indústrias, tais como, cosmética e perfumaria, têxtil, alimentícia e farmacêutica (STASHENKO *et al.*, 2003). Nesta última, os principais gêneros que englobam espécies medicinais são *Lippia*, *Verbena* e *Stachytarpheta* (SISTASI *et al.*, 2002). O valor econômico de espécie pertencentes a este gênero é conferido ao seu uso como fonte de OE e extratos com uma diversidade de propriedades, entre elas, antifúngica, larvicida, antibacteriana, dentre outras (BARRETO *et al.*, 2014; SARTORATTO *et al.*, 2004; STASHENKI *et al.*, 2013).

2.6 Gênero *Lippia*

O gênero *Lippia* inclui cerca de 120 espécies de ervas, com vasta distribuição na América do Sul, América Central e África Tropical (PASCUAL *et al.*, 2001; TERBLANCHÉ *et al.*, 1996). No Brasil, o gênero *Lippia* é representado por aproximadamente 88 espécies que compartilham semelhanças estruturais durante o período de floração e por seu aroma, que geralmente é forte e agradável (OLIVEIRA *et al.*, 2007), sendo principalmente localizadas nos Estados de Minas Gerais, Goiás e Bahia (GOMES *et al.*, 2011).

O Brasil é um dos principais centros de diversidade do gênero *Lippia*, abrangendo cerca de 70 a 75% das espécies conhecidas, sendo a ampla representatividade na Cadeia do Espinhaço em Minas Gerais e nos Campos rupestres do estado de Goiás (VICCINI *et al.*, 2005).

Na região Nordeste do Brasil, algumas espécies de *Lippia* são utilizadas na medicina popular para tratar gripes, tosses, bronquites e resfriados, outras têm uso contra estados de excitação, náuseas e hipertensão (DI STASI *et al.*, 2009; HENNEBELLE *et al.*, 2008). Geralmente, as partes utilizadas são as folhas e flores, sendo utilizadas na forma de infusão ou decocção; por meio de emplastos ou ainda consumidos via oral em forma de chá (MESA *et al.*,

2009). Além de suas funcionalidades medicinais, as folhas de grande parte das espécies são utilizadas na preparação de alimentos (MORTON, 1981).

Pesquisas realizadas com OE de espécies deste gênero têm demonstrado importantes propriedades farmacológicas, tais como atividade antibacteriana, antifúngica e antiparasitária (BOTELHO *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2007).

Os principais componentes químicos encontrados nos OE de espécies do gênero *Lippia* são: α -pineno, *p*-cimeno, limoneno, β -cariofileno, linalol, cânfora, carvacrol e timol. Entre tais, carvacrol e timol são descritos como potenciais agentes antimicrobianos (KUNLE *et al.*, 2003; NOSTRO *et al.*, 2004, 2007; TROMBETTA *et al.*, 2005; KORDALI *et al.*, 2008; LIOLIOS *et al.*, 2009; RIVAS *et al.*, 2010).

2.7 Espécie *Lippia origanoides*

Lippia origanoides é uma árvore de pequeno porte ou arbusto aromático, com aproximadamente 3 m de altura (VICUÑA, 2010) (Fig. 1).



Figura 1: Aspecto geral da espécie *Lippia origanoides* Kunth

Esta espécie é uma planta medicinal oriunda da América Central (México, Guatemala e Cuba) e Norte da América do Sul (Guiana, Venezuela, Brasil e Colômbia) (PARRA, 2007).



Figura 2. Distribuição geográfica de *Lippia origanoides* Kunth

É abundantemente utilizada na culinária e na medicina popular, principalmente para tratar doenças respiratórias e gastrointestinais (OLIVEIRA, 2004; PASCUAL *et al.*, 2001). Possui diferentes nomes populares, como alecrim pimenta, alecrim-do-campo, alecrim-d'Angola e salva-de-Marajó (PASCUAL *et al.*, 2001). Na Colômbia, é chamada de “orégano de monte” e na Venezuela é conhecido como orégano selvagem. No México, *L. origanoides* é chamado de orégano, e na farmacopéia mexicana é reconhecido como um substituto para o orégano comum – *L. graveolens* Kunth (SOUZA, 2015).

Este arbusto apresenta folhas simples e opostas, de tamanhos alternados, em decorrência de adaptações fisiológicas e morfológicas em resposta a exposição à luz (PARRA e RODRIGUEZ, 2007) (Fig. 3). Caracteriza-se por pubescência em órgãos vegetativos e reprodutivos, com relatos de tricomas não regulares retos, rígidos e pontiagudos, além de tricomas glandulares. Apresenta inflorescência frondosa, livre e com brácteas apicais (O'LEARY *et al.*, 2012). Normalmente é encontrada em ambientes secos, onde os solos são rasos, pobres em matéria orgânica e pedregosos (ALBESIANO *et al.*, 2003).



Fig. 3. Folhas e inflorescências de *Lippia origanoides* Kunth

No decorrer dos anos a espécie vem sendo amplamente estudada, principalmente no que diz relação à composição de seu OE, assim como suas prováveis atividades. Os resultados obtidos são volumosos e apresentam-se propícios no que se refere a ensaios de atividade contra diversos microrganismos, dentre eles *Spongospora subterranea*, *Sclerotium rolfii*, *Macrophomina phaseolina*; *Rhizoctonia solani*, *Bipolaris maydis*, *Mycosphaerella fijiensis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Candida sp.*, *Leishmania chagasi*, *Trypanosoma cruzi*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp* (VICUÑA; STASHENKO; FUENTES, 2010; SILVA *et al.*, 2010; CAVALCANTI *et al.*, 2010; REIS *et al.*, 2011; FERNANDES *et al.*, 2012, entre outros). Entre os microrganismos mais testados estão: *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*. Atividades acaricidas foram relatadas por Cavalcanti *et al.*, (2010) e atividade moluscicida e larvicida contra *Biomphalaria glabrata* e *Aedes aegypti* também é descrito em Matos e Oliveira (1998).

2.8 Óleos essenciais

Os OE também chamados de óleos voláteis, óleos etéreos ou essências, são líquidos aromáticos de baixa densidade, derivados do metabolismo secundário de plantas (BURT, 2004).

A volatilidade, sabor e aroma específicos são apontados como principais características dos OE, e por agregarem sabor a alimentos e bebidas, devido seu aroma. São estudados por serem produtos naturais muito bem aceitos pelos consumidores, possivelmente pela forte razão de não apresentarem riscos à saúde e conter propriedades multifuncionais. Entre tais propriedades, citam-se a antibacteriana, antifúngica, inseticida, antiparasitária e a sequestradora de radicais (SACCHETTI *et al.*, 2005).

Nas plantas, os OE desempenham um importante papel em função de protegê-las de possíveis pragas ou infecções, por meio de sua ação inseticida, antibacteriana e antifúngica. Continuamente tem sido estabelecido cientificamente que aproximadamente 60% dos OE possuem propriedades antifúngicas e 35% exibem propriedades antibacterianas (BHAVANANI; BALLOW, 1992).

Através de seus fortes sabores ou odores, os OE também conseguem afastar animais herbívoros, fazendo com que o apetite pela planta em questão seja reduzido. Em contrapartida, podem apresentar também a função de atrair determinados insetos para que seja retirado o pólen da planta e assim a polinização seja facilitada (BAKKALI *et al.*, 2008, CUNHA *et al.*, 2012).

Os OE podem ser encontrados em diferentes partes das plantas, tais como, folhas, caules, flores, raízes, sementes ou rizomas. Ainda que extraídos de diferentes partes de uma mesma planta e apresentarem coloração e aspecto parecidos, os OE podem apresentar composição química, características físico-químicas e odores diferentes de acordo com sua localização na espécie vegetal. (ROBBERS *et al.*, 1997).

Quimicamente, apresentam desde hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas, até compostos de enxofre. O perfil terpênico geralmente apresenta substâncias formadas de moléculas de dez e de quinze carbonos (monoterpenos e sesquiterpenos), porém, de acordo com o método de extração e a composição da planta, terpenos menos voláteis podem surgir na composição do OE (OLIVEIRA *et al.*, 2006; SIMÕES *et al.*, 2010).

A extração do OE pode ser realizada por meio de diversos métodos, utilizando solvente orgânico, CO₂, arraste a vapor, prensagem de pericarpos, enfloração, hidrodestilação, entre outros. O tipo de extração pode variar de acordo com o uso do óleo, assim como a quantidade do produto obtido pode variar em quantidade, qualidade e composição em decorrência do clima, solo, idade, ciclo vegetativo e órgão da planta (ANGIONI *et al.*, 2006). Grande maioria dos OE são obtidos através de destilação a vapor, ou, de forma geral, por hidrodestilação (GUENTHER, 1972). Este método é baseado no poder de volatilização dos constituintes dos vegetais. Para que seja obtido o OE, o material vegetal é posto em contato com a água, e posteriormente são levados à ebulição. O equipamento que realiza esse processo de extração em escala laboratorial é o aparelho de Clevenger modificado (SIMÕES *et al.*, 2007), que

funciona de acordo com o sistema de destilação por arraste a vapor em consenso com o preconizado pela quarta edição da Farmacopéia Brasileira (SIMÕES; SPITZER, 2004).

Das diferentes propriedades biológicas atribuídas aos OE, observa-se um crescente interesse em pesquisas por fitoterápicos capazes de combater infecções causadas por microrganismos (KUETEA *et al.*, 2009; ZHAO *et al.*, 2010), uma vez que o uso indiscriminado de antibióticos tradicionais, formulados principalmente a partir de substâncias isoladas de bactérias e fungos, favorecem uma pressão seletiva, o que contribui para o surgimento de cepas resistentes a vários agentes antimicrobianos e antifúngicos (MOTA *et al.*, 2005).

Neste contexto, a avaliação do potencial anti-*Candida* do OE de *L. origanoides* pode contribuir como uma nova alternativa no combate à resistência antifúngica.

3. OBJETIVOS

3.1 . Geral

- Determinar a composição química e avaliar o potencial anti-*Candida* do OE de *L. origanoides* Kunth.

3.2 . Específicos

- Determinar a composição química do OE de *L. origanoides*;
- Avaliar a atividade anti-*Candida in vitro* do OE de *L. origanoides* frente a leveduras do Gênero *Candida*;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do OE de *L. origanoides*, capaz de inibir o crescimento de leveduras do Gênero *Candida*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Coleta e identificação da amostra vegetal

Partes aéreas (folhas e ramos finos) de *L. origanoides* foram coletadas na comunidade de Alter do Chão, cidade de Santarém, Pará, Brasil, em Maio de 2015. A posição geográfica intermediária das amostras foi determinada utilizando o Sistema de Posicionamento Global (GPS), resultando nas seguintes coordenadas: 02°30'870"S e 54°56'416"W, a uma altitude de aproximadamente 52 m acima do nível do mar. O material botânico foi morfológicamente identificado pela Dra. Fátima Regina Gonçalves Salimena - Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora, Brasil, onde um exemplar foi depositado e catalogado sob o código CESJ 64029.

4.2 Extração do óleo essencial

Para que fossem obtidos os componentes voláteis de *L. origanoides*, foram usadas ramos frescos e folhas trituradas (100g) imersos em água destilada na proporção 1:10 partes por volume (p:v). A extração foi realizada pela técnica de hidrodestilação em aparelho modelo Clevenger, adaptado a um balão de fundo redondo com capacidade de 6.000 mL (MING *et al.*, 1996).

O tempo de extração foi firmado em 180 minutos, sendo determinado a partir do início da fervura da água disposta no balão. A extração do OE foi obtida em triplicata.

Após a realização da extração, o OE obtido foi conservado em recipientes de vidro âmbar, com etiquetas de identificação e acomodados sob refrigeração à temperatura de 5° C, passando a compor a extratoteca aromática do laboratório de Bioprospecção e Biologia Experimental da Universidade Federal do Oeste do Pará, com uso destinado aos ensaios biológicos e determinação da composição química.

4.3 Determinações da composição química

A análise química do OE foi realizada em cromatógrafo gasoso (CG-EM-6890 Plus Series) munido com detector seletivo de massa (Agilent, MSD 5973) e um amostrador automático (Agilent, 7863), sob as seguintes condições: DB-5 ms (60 m x 0,25 mm; espessura da película = 0,25 mm) coluna capilar de sílica fundida; temperatura programada em 50 °C (5 min. em modo isotérmico), 150 °C (4 °C min⁻¹ + 2 min. em modo isotérmico), 250 °C (5 °C min⁻¹ + 5 min. em modo isotérmico), 275 °C (10 °C min⁻¹, mais 15 min. em modo isotérmico); temperatura do injetor à 250 °C, injeção tipo split (1 mL) e divisão de fluxo ajustado para uma

razão de 30:1. O gás hélio foi utilizado como gás de arraste, com fluxo ininterrupto de 0,6 mL min⁻¹ e pressão de entrada de 16,5 psi. Os espectros de massa foram alcançados por impacto eletrônico a 70 eV de energia. As temperaturas da câmara de ionização e a linha de transferência foram mantidas a 230-285°C, respectivamente. Os dados quantitativos sobre os constituintes voláteis foram obtidos por normalização de área de pico, utilizando um CG 6890 Plus Series, acoplado ao detector FID, operado sob condições parecidas do sistema de CG-EM. O índice de retenção foi calculado para todos os componentes voláteis, utilizando uma série homóloga de n-alcenos (C8-C32, Sigma-Aldrich). Os componentes individuais foram identificados por comparação de ambos os dados dos espectros de massas e índices de retenção de compostos autênticos, previamente analisados e armazenados em biblioteca particular, bem como com o auxílio de bibliotecas comerciais contendo índices de retenção e espectros de massas dos compostos voláteis comumente encontrados em óleos essenciais.

4.4 Avaliação da atividade antifúngica

Para avaliar o potencial anti-*Candida* de *L. origanoides*, foram utilizadas duas metodologias: disco difusão em agar e microdiluição em caldo.

4.4.1 Microrganismos selecionados

As cepas de microrganismos utilizadas nos ensaios biológicos foram obtidas comercialmente em forma liofilizada. Para o presente estudo foram utilizadas 3 diferentes cepas de leveduras: *Candida albicans* (ATCC 24433), *Candida parapsilosis* (ATCC 90018) e *Candida tropicalis* (ATCC 750).

4.4.2 Método de disco difusão em Agar

Os ensaios para verificar o perfil de atividade anti-*Candida* do OE de *L. origanoides* foram efetuados em triplicata pelo método padrão de difusão em agar, segundo Bauer *et al.*, (1966). Este método baseia-se na difusão, através do agar, de um antifúngico impregnado em um disco de papel-filtro. O microrganismo selecionado é então desafiado contra a substância biologicamente ativa, cuja difusão leva à formação de halo de inibição de crescimento. Esse método é qualitativo, e permite classificar o microrganismo em sensível ($MIC \leq 1 \mu\text{l/mL}$), intermediário ($MIC = 2 \mu\text{l/mL}$) ou resistente ($MIC \leq 4 \mu\text{l/mL}$) ao antimicrobiano (SEJAS *et al.*, 2003). Neste ensaio, o OE de *L. origanoides* foi testado contra 3 cepas de leveduras. Este

método é estabelecido como padrão pelo NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards).

4.4.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) - método de microdiluição em caldo

O meio de cultura RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute) foi utilizado como meio de rotina para crescimento dos microrganismos. Foi preparado dissolvendo-se 10,4g do meio em pó, em 900mL de H₂O destilada e posteriormente tamponado com MOPS (3 (N-morfolino) propanosulfônico), na concentração final de 0,165mol/L.

Para determinar a CIM, menor concentração do OE capaz de inibir o crescimento de microrganismos, foi utilizada a técnica de microdiluição em caldo, utilizando placas de 96 poços (NCCLS, 2002). O método consiste em diluir o OE em solução Tween 80 a 1 %, para obtenção das concentrações finais de 10; 5; 2,5; 1,25; 0,62; 0,31, 0,15 e 0,07 µL/mL.

Os testes foram realizados em placas de 96 poços, onde cada poço recebeu 90 µL da concentração específica de OE (2X concentrado), 90 µL de meio líquido RPMI (2 X concentrado) e 20 µL do inóculo correspondendo a $1,5 \times 10^5$ UFC mL⁻¹. As culturas foram incubadas a $27 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 h (NCCLS/CLSI, 2002). Para fins comparativos, Fluconazol (Sigma-Aldrich, São Paulo - Brasil), em concentração variando entre 0,125 µg/mL a 64 µg/ml, foi utilizado como controle padrão positivo. Transcorrido o período de incubação, realizou-se a leitura da absorbância, utilizando filtro com DO (densidade ótica) de 625nm. Os testes foram realizados em triplicata.

4.5 Análises estatísticas

Os resultados serão expressos como média \pm desvio padrão dos valores obtidos. A significância estatística será avaliada usando o teste de Tukey's, considerando como significativos valores de $p \leq 0,05$. As análises foram realizadas no programa Prism, versão 3.0, com nível de confiança estabelecido em 95%.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Determinações da composição química do óleo essencial

Os compostos químicos presentes no OE de *L. origanoides* foram identificados por meio da técnica CG-EM (Cromatografia Gasosa - Espectrometria de Massa). Dentre eles, os principais compostos voláteis encontrados foram carvacrol (47,2%) e timol (12,8%), totalizando aproximadamente 60% do OE. Os demais componentes, em quantidades relevantes foram *p*-cimeno (9,7%) e *p*-metoxitimol (7,4%). A tabela 01 exhibe os resultados cromatográficos, demonstrado como percentual de área.

Tabela 01 - Composição química do óleo essencial de *Lippia origanoides*.

Componentes	IR _{Calc.}	IR _{Lit.}	Óleo %
(Z)-Hexen-3-ol	854	859	0,2
α -Tujeno	926	924	0,6
α -Pinoeno	934	932	0,4
1-Octen-3-ol	976	974	0,1
Mirceno	990	988	1,1
α -Terpineno	1016	1014	0,5
ρ-Cimeno	1025	1020	9,7
Limoneno	1026	1024	0,2
1,8-Cineol	1032	1026	1,3
γ -Terpineno	1056	1054	0,2
Linalol	1098	1095	2,9
Umbellulona	1169	1167	0,3
Terpinen-4-ol	1176	1174	1,5
Timol metil éter	1234	1232	1,3
Isômero do timol/carvacrol (MW=150)	1282	-	0,4
Timol	1292	1289	12,8
Carvacrol	1299	1298	47,2
Timol acetato	1351	1349	0,4
Carvacrol acetato	1372	1370	0,6
Geranil acetato	1382	1379	0,6
(E)-Cariofileno	1418	1416	2,3
<i>trans</i> - α -Bergamoteno	1434	1432	0,2
α -Humuleno	1455	1452	0,3
ρ-Metoxitimol	1487	1484	7,4
β -Bisaboleno	1506	1505	0,3
(Z)- α -Bisaboleno	1508	1506	0,2
ρ -Metoxicarvacrol (tent.)	1555	-	1,3
Óxido de cariofileno	1584	1582	1,6

2-feniletil tiglatto	1587	1584	0,2
Epóxido de humuleno II	1611	1608	0,2
α -Eudesmol	1656	1653	0,1
α -Bisabolol	1686	1685	0,2
Sesquiterpenos não identificados			1,2
Total			97,8

IR_{Calc} = Índice de Retenção calculado em coluna DB-5ms; IR_{Lit} = Índice de Retenção da literatura (Adams, 2007).

Nos estudos de Oliveira *et al.*, (2007), o OE extraído das folhas e flores de *L. origanoides* apresentou em sua composição química, predominantemente carvacrol (38,6%). Estudos realizados por Sarrazin *et al.*, (2015) demonstraram que a composição química do OE de *L. origanoides*, coletada em distintas estações do ano, apontou como compostos principais o carvacrol (42,6%), timol (10,6%) e p-cimeno (9,9%), independente da época de colheita. Cerqueira (2014), também identificou o monoterpene carvacrol como componente majoritário (40,24%), seguido de γ -terpineno (11,46%), linalol (9,17%) e p-cimeno (8,47%). Franco (2012) relatou como componente principal o timol (45,8%), seguido de p-cimeno (14,3%), γ - terpineno (10,5%) e carvacrol (9,9%).

Inúmeras pesquisas analisaram a composição do OE destas espécies quando ainda eram classificadas como espécies distintas. Grande parte dos trabalhos apontam carvacrol e timol como componentes majoritários, reforçando assim, suas similaridades e possível sinonímia (JESUS *et al.*, 2006; FONTENELLE *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2007; CAMURÇA-VASCONCELOS *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2009; CAVALCANTI *et al.*, 2010; ESCOBAR *et al.*, 2010; FARIAS-JÚNIOR *et al.*, 2012; GOMES *et al.*, 2012; MOTA *et al.*, 2012; MORAIS *et al.*, 2012; RONDON *et al.*, 2012; CARVALHO *et al.*, 2013; VERAS *et al.*, 2013).

A partir dos dados supracitados, é possível verificar que existem alterações qualitativas e quantitativas na composição química do OE de *L. origanoides*, que podem ser resultado de variações genéticas e/ou interferência de condições ambientais efetivas nos pontos de amostragem.

5.2 Ensaio de atividade antifúngica do óleo essencial de *L. origanoides* frente a leveduras do gênero *Candida* – Determinação de Concentração Inibitória Mínima (CIM) do óleo essencial de *L. origanoides*.

No presente estudo, avaliou-se o espectro de inibição do OE de *L. origanoides* frente a cepas de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*. Estas espécies apresentaram alto grau de

sensibilidade frente ao OE em estudo, com halos de inibição de crescimento de $44,1 \pm 0,3$, $30,6 \pm 0,2$ e $24,0 \pm 0,1$ mm de diâmetro, respectivamente. As concentrações inibitórias mínimas foram determinadas em $0,62 \mu\text{l/mL}$ frente a *C. albicans*, $0,30 \mu\text{l/mL}$ frente a *C. tropicalis* e $0,18 \mu\text{l/mL}$ frente a *C. parapsilosis*.

Os valores de concentração inibitória mínima para o Fluconazol, antifúngico comercial, frequentemente utilizado contra infecções causadas por leveduras do gênero *Candida*, revelou valores de CIM de $0,125$ *C. albicans* e *C. tropicalis* e, $0,010$ para *C. parapsilosis*. Dessa forma, mostramos que o OE de *L. origanoides* apresentou atividade antifúngica contra três cepas de *Candida*, e que sua capacidade de diminuir ou eliminar o microrganismo depende da concentração ensaiada. Os resultados podem ser observados na tabela 02.

Tabela 02 - Potencial antifúngico do óleo essencial de *L. origanoides* contra espécies do gênero *Candida*

<i>Microorganismos</i>	<i>Óleo essencial de Lippia origanoides</i> (10 μL)		Fluconazol
	DD ^a (mm)	CIM ($\mu\text{l mL}^{-1}$)	CIM (mg mL^{-1})
<i>C. albicans</i> 24433	$44,1 \pm 0,3$	0,62	0,125
<i>C. tropicalis</i> 750	$30,6 \pm 0,2$	0,30	0,125
<i>C. parapsilosis</i> 90018	$24,0 \pm 0,1$	0,18	0,010

^a Diâmetro da zona de inibição decrescimento expresso em milímetros.
DD – disco difusão; CIM – Concentração Inibitória Mínima.

Infecções fúngicas comumente apresentam maiores problemas terapêuticos se comparados a infecções bacterianas. Especialmente espécies que pertencem ao gênero *Candida* são altamente resistentes a drogas antifúngicas, e tal fato justifica a busca de novos meios terapêuticos (AHMAD *et al.*, 2011).

A utilização de OE de origem vegetal para estudos de efeito em *Candida spp.* é descrito em alguns estudos laboratoriais, objetivando analisar o potencial antifúngico das substâncias (POZZATTI, 2008; ARAÚJO *et al.*, 2004, BARBARO e STELATO, 2009).

A atividade antifúngica do OE de *Zingiber officinalis* (gengibre), *Cominum cyminum*

(cominho), *Coriandrum sativum* (coentro), *Thymus vulgaris* (tomilho), *Ocimum basilicum* (Manjeriçã) e *Myristica fragrans* (noz moscada) foi observada por Barbaro e Stelato (2009), e foi concluído que os produtos apresentam atividade antifúngica relevante contra as cepas de *Candida*. A ação antibacteriana e antifúngica de outras espécies como *Cinnamomum zeylanicum* (canela), *Eucalyptus citriodora* (eucalipito) e *Eugenia uniflora* (pitanga) foi descrita por Araújo *et al.*, (2004). Outros OE de espécies vegetais como *Syzygium aromaticum* (cravo), *Ocimum basilicum* (manjeriçã), *Rosmarinus officinalis* (alecrim), *Anethum graveolens* (endro), *Zingiber officinalis* (gingibre) e *Cinnamomum zeylanicum* (canela) tiveram suas atividades antimicrobianas analisadas frente ao *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella choleraesuis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Penicillium islandicum* e *Aspergillus flavus*. Apurou-se que as espécies mais sensíveis à ação das substâncias foram as fúngicas (LÓPEZ *et al.*, 2005).

Alves *et al.*, (2003) relataram a eficácia dos OE de *Cymbopogon nardus*, *C. citratus* e *Eucalyptus citriodora* no controle *in vitro* dos fungos *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. musae* e *Fusarium subglutinans* e Ananás, Almeida *et al.*, (2004), avaliando *in vitro* extratos de folhas e OE em combate ao fungo *Diaporthe citri*, observou que o óleo de nim (*Cymbopogon nardus*) foi que apresentou maior eficiência na inibição do crescimento leveduriforme do fungo.

O gênero *Lippia* (Verbenaceae) apresenta um perfil consistente quanto à utilização popular, propriedades farmacológicas e composição química. É comumente utilizado em tratamento de doenças, onde algumas espécies apresentam atividade analgésica, antiespasmódica, anestésica, antisséptica, antimicrobiana, anti-inflamatória, antifúngica, entre outras (LEAL *et al.*, 2003; LORENZI e MATOS, 2002; PASCUAL *et al.*, 2001).

O OE de *Lippia sidoides*, por exemplo, tem apresentado relevante atividade antimicrobiana, *in vitro*, contra: *Staphylococcus aureus*, em infecções de pele e garganta; *Streptococcus mutans*, causador da cárie dentária, *Corynebacterium xerosis*, causador do odor nas axilas e nos pés; *Candida albicans* e *Candida* sp. encontradas em aftas e corrimento vaginal; *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton interdigitale*, agentes responsáveis por causar micoses na pele; *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium smegmatis* e uma pequena atividade contra *Pseudomonas aeruginosa* (LACOSTE *et al.*, 1996; LEMOS *et al.*, 1990; LORENZI e MATOS, 2002).

Queiroz (1998), através da técnica de difusão em agar, avaliou a susceptibilidade de 14 cepas de leveduras do gênero *Candida*, incluindo *C. albicans*, *C. stellatoidea*, *C. guilliermondii*, *C. krusei* e *C. tropicalis* frente aos extratos e OE obtido de plantas medicinais, nas concentrações que variam entre 156 a 5.000 µg/mL e 0,02 mL/disco respectivamente. Mediante os resultados obtidos com os extratos foi revelada atividade antifúngica a partir das concentrações de 2.500 µg/mL para a maioria das espécies de *Lippia*.

Entre as espécies de *Lippia*, *L. organoides* Kunth (Verbenaceae) está classificada como uma das plantas da flora Brasileira, que produzem OE com potencial antimicrobiano e antisséptico (ANDRADE *et al.*, 2014, OLIVEIRA *et al.*, 2014, GUIMARÃES *et al.*, 2014, QUEIROZ *et al.*, 2014), onde carvacrol e timol são os compostos majoritários que apresentam características antimicrobianas (SARRAZIN *et al.*, 2012, Oliveira *et al.*, 2014).

Dentre vários compostos que podem ser encontrados na composição química do OE, timol e o carvacrol tem grande destaque pelas atividades antimicrobiana e antifúngica relatadas. Tais monoterpenos aromáticos são os principais constituintes dos OE de diversas plantas aromáticas, como *Thymus vulgaris* L. (Lamiaceae), *Origanium compactum* (Lamiaceae), *Acalypha phleoides* (Euphorbiaceae) e *Lippia organoides* (Verbenaceae) (PEIXOTO-NEVES *et al.*, 2010). OE com alta concentração de timol e carvacrol tem sido reportada para atividade antifúngica em espécies do gênero *Candida* (KHAN *et al.*, 2015).

Ahmad e colaboradores (2011) realizaram estudos para verificar os mecanismos de ação antifúngica dos compostos, timol e carvacrol, com relação as alterações causadas na permeabilidade da membrana celular de espécies de *Candida*, com sensibilidade e resistência ao fluconazol, assim como cepas padronizadas de *Candida albicans*. Os resultados demonstraram que os compostos possuem atividade fungicida por meio de alteração da permeabilidade da membrana citoplasmática, como resultado a inibição da biossíntese do ergosterol (tornam-no útil para ação de antifúngicos) de um modo parecido.

6. CONCLUSÃO

Os principais componentes químicos identificados do OE de *L. origanoides* foram carvacrol (47,2%) e timol (12,8%), totalizando 60% dos compostos identificados. O OE obtido de ramos frescos e folhas trituradas apresentou potencial antifúngico relevante para as cepas testadas, *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, representando uma nova fonte eficaz no combate a estes microrganismos. As concentrações inibitórias mínimas do OE de *L. origanoides* com capacidade de inibir o crescimento de leveduras do gênero *Candida* foram determinadas em 0,62 µg/mL frente a *C. albicans*, 0,30 µg/mL frente a *C. tropicalis* e 0,18 µg/mL frente a *C. parapsilosis*.

7. REFERÊNCIAS

- ABRANTES, M.R.; LIMA E. O.; MEDEIROS, M. A. P.; MENEZES, C.P.; GUERRA, F. Q. S.; MILAN E. P. **Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre leveduras *Candida* não *albicans*.** *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 94 (3): 227 – 233, 2013
- AHMAD, A.; KHAN, A.; AKHTAR, F.; YOUSUF, S.; XESS, I.; KHAN, L. A.; MANZOOR N. **Fungicidal activity of thymol and carvacrol by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*.** *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 30:41-50, 2011.
- ALANGADEN GJ. **Nosocomial fungal infections: epidemiology, infection control, and prevention.** *Infectious Disease Clinics of North America*. 25:201-225, 2011.
- ALBESIANO, S.; RANGELCH, J. O.; CADENA A. **La vegetación del cañón del río Chicamocha** (Santander, Colombia). *Caldasia*; 25:73-99, 2003.
- ALMEIDA T. F.; PEREIRA C. F., CAMARGO, M. & PANIZZI, R.C. **Efeito do óleo de nim e extratos vegetais de *Azadirachia indica*, *Cymbopogon citratus* e *Zingiber officinale* no crescimento micelial in vitro de *Diaporthe citri*.** *Summa Phytopathologica* 30:116. 2004.
- ALVES, E.S.S.B.; PUPO, M. S.; MARQUES, S.S.; VILCHES, T.T.B.; SANTOS, R.B.; VENTURA, J.A. & FERNANDO, P.M.A. **Avaliação de óleos essenciais na inibição do crescimento de fungos de fruteiras tropicais.** *Fitopatologia Brasileira* 28 (Supl.) 2003.
- ANDRADE, V. A.; ALMEIDA, A.C.; SOUZA, D. S.; COLEN, K. G. F.; MACÊDO, A. A.; MARTINS, E. R.; FONSECA, F. S. A. & Santos, R. L. **Antimicrobial activity and acute and chronic toxicity of the essential oil of *Lippia organoides*.** *Pesq. Vet. Bras.* 34(12):1153-1161, 2014.
- ANGIONI, A.; BARRA, A.; CORONEO, V.; DESSI, S.; CABRAS, P. **Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers.** *J. Agric. Food Chem.* 54, 4364–4370. 2006.
- ARAÚJO, J. C. L. V.; LIMA, E O.; CEBALLOS, B. S. O.; FREIRE, K. R. L.; SOUZA, E. L.; SANTOS FILHO, L. **Ação antimicrobiana de óleos essenciais sobre microrganismos potencialmente causadores de infecções oportunistas.** *Rev. Patol. Trop.* 33(1): 55-64, 2004.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. **Biological effects of essential oil: a review.** *Food and Chemical Toxicology*, Oxford, v. 46, n. 2, p. 446-475, Sept.

2008.

BARBARO, N. R.; STELATO, M. M. **Atividade anti-candida de óleos essenciais de plantas utilizadas na culinária.** Anais do XIV Encontro de Iniciação Científica da PUC Campinas. 2009.

BARRETO, H. M.; LIMA, I. S.; COELHO, K. M. R. N.; OSÓRIO, L. R.; ALMEIDA MOURÃO, R.; SANTOS, B. H. C. & LOPES, J. A. D. **Effect of *Lippia origanoides* H.B.K. essential oil in the resistance to aminoglycosides in methicillin resistant *Staphylococcus aureus*.** European Journal of Integrative Medicine, pp. 560-564, 2014.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; TRUCK, M. **Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method.** American Journal Clinical Pathology, Hagerstown, v. 45, n. 4, p. 493-496, 1966.

BHAVANANI, S. M.; BALLOW, C. H. **New agents for Gram-positive bacteria.** Curr Opin Microbiol 13: 528-534, 1992.

BORG-VON, Z, M.; KUNZ, L.; RÜCHEL, R.; REICHARD, U.; GROSS, U.; WEIG, M. **Epidemiology and antifungal susceptibilities os *Candida* spp. to six antifungal agents: results from a surveillance study on fungaemia in Germany from July 2004 to August 2005.** J. Antimicrob Chemother 60: 424-8, 2007.

BOTELHO, M. A.; NOGUEIRA N. A. P.; BASTOS, G. M.; FONSECA, S. G. C.; LEMOS, T. L. G., MATOS, F. J. A.; MONTENEGRO, D.; HEUKELBACH, J.; RAO, V. S.; BRITO, G. A. C. **Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens.** Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v.40, p. 449-356, 2007.

BRANDÃO, D.C. **O registro de fitoterápicos no Brasil.** Fármacos e Medicamentos. (37): 20-22, 2005.

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

CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F.; BEVILAQUA, C. M. L.; MORAIS, S. M.; MACIEL, M. V.; COSTA, C. T. C.; MACEDO, I. T. F.; OLIVEIRA, L. M. B. **Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils.** Veterinary Parasitology, v. 148, p. 288-

294, 2007.

CARVALHO, R. R. C.; LARANJEIRA, D.; CARVALHO-FILHO, J. L. S.; SOUZA, P. E.; BLANK, A. F.; ALVES, P. B.; JESUS, H. C. R.; WARWICK, D. R. N. **In vitro activity of essential oils of *Lippia sidoides* and *Lippia gracilis* and their major chemical components against *Thielaviopsis paradoxa*, causal agent of stem bleeding in coconut palms.** Química Nova, v. 36, n. 2, p. 241-244, 2013.

CASTÓN-OSORIO, J.J.; RIVVERO, A.; TORRE-CISNEROS, J. **Epidemiology of invasive fungal infection.** International Journal of Antimicrobial Agents. 32(2):S103-S109, 2008.

CASTRO, R. D. **Atividade antifúngica do óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Canela) e de sua associação com antifúngicos sintéticos sobre espécies de *Candida*.** Tese. Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa. 2010.

CAVALCANTI, S. C. H.; NICULAU, E. S.; BLANK, A. F.; CÂMARA, C. A. G.; ARAÚJO, I. N.; ALVES, P. B. **Composition and acaricidal activity of *Lippia sidoides* essential oil against two-spotted spidermite (*Tetranychus urticae* Koch).** Bioresource Technology, v. 101, p. 829–832, 2010.

CELEBI, S.; HACIMUSTAFAOGLU, M.; OZDEMIR, O.; OZKAYA, G. **Nosocomial candidemia in children: results of a 9-year study.** Mycoses 51: 248-257, 2007.

CHUANG, P.H.; LEE, C.W.; CHOU, J.Y.; MURUGAN, M.; SHIEH, B.J.; CHEN, H.M. **Antifungal activity of crude extracts and essential oil of *Moringa oleifera* Lam.** Bioresour. Technol. 98, 232–236, 2007.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T.; SILVA, L. R.; DE ALMEIDA MONFARDINI, L. P.; CUNHA, A. K.; RADY, P.; ALVES, T.; ROSAS, R. C. **Prospective observational study of candidemia in Sao Paulo, Brazil: incidence rate, epidemiology, and predictors of mortality.** Infect Control Hosp Epidemiol 28:570-576, 2007.

COUTINHO, H. D. M.; COSTA, J. G. M.; LIMA, E. O.; SILVA, V. S. F.; SIQUEIRA JR, J. P. **Potentiating effect of *Mentha arvensis* and chlorpromazine in the resistance to aminoglycosides of methicillin – resistant *Staphylococcus aureus*.** In vivo 23:287-290, 2009.

CUNHA, A. P.; NOGUEIRA, M. T.; ROQUE, O. R. **Plantas aromáticas e óleos essenciais: composição e aplicações.** Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2012.

DAFERERA, D. J.; ZIOGAS, B. N.; POLISSIOU, M. G. **The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp., and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.** Journal of Crop Protection, v.22, p.39-44, 2003.

DEORUKHKAR, S. C., & SAINI, S. **Why *Candida* species have emerged as important nosocomial pathogens?** International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 5(1), 533-545. doi: 10.20546/ijcmas.2016.501.054, 2016.

ESCOBAR, P.; LEAL, S. M.; HERRERA, L. V.; MARTINEZ, J. R.; STASHENKO, E. **Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippia* spp essential oils and their major components.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 105, n. 6, p. 184-190, 2010.

EZZAT, S.M. **In vitro inhibition of *Candida albicans* growth by plant extracts and essential oils.** World Journal of Microbiology & Biotechnology, v.17, p.757-759, 2001.

FARIAS-JUNIOR, P. A.; RIOS, M. C.; MOURA, T. A.; ALMEIDA, R. P.; ALVES, P. B.; BLANK, A. F.; FERNANDES, R. P. M.; SCHER, R. **Leishmanicidal activity of carvacrol-rich essential oil from *Lippia sidoides* Cham.** Biology Research, v. 45, p. 399-402, 2012.

FERNANDES, L. P.; CANDIDO, R. C.; OLIVEIRA, W. **Spray drying microencapsulation of *Lippia sidoides* extracts in carbohydrate blends.** Food and Bioproducts Processing, v. 90, p. 425-432, 2012.

FERREIRA, H.; PITTNER, E.; SANCHES, H.F.; MONTEIRO, M.C. **Aflatoxinas: um risco a saúde humana e animal.** Ambiência, n.1, v.2, p.113-27, 2006.

FISHER, F.; COOK, N.B. **Micologia: Fundamentos e diagnóstico.** Rio de Janeiro, RJ: Revinter, 116-147, 2001.

FONTENELLE, R. O. S.; MORAIS, S. M.; BRITO, E. H. S.; KERNTOPF, M. R.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; TOMÉ, A. R.; QUEIROZ, M. G. R.; NASCIMENTO, N. R. F.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 59, p. 934-940, 2007.

GARCÍA-RUIZ, J. C.; AMUTIO, E.; PONTÓN, J. (2004) **Invasive fungal infection in immunocompromised patients.** Revista Iberoamericana de Micología. 21:55-62, 2004.

GAZIM, Z.C.; REZENDE, C.M.; FRAGA, S.R.; SVIDZINSKI, T.I.E.; CORTEZ, D.A.G. **Antifungal activity of the essential oil from *Calendula officinalis* L. (Asteraceae) growing in Brazil.** *Braz. J. Microbiol.*, v.39, n.1, p.61-63, 2008.

GOMES, G. A.; MONTEIRO, C. M. O.; SENRA, T. O. S.; ZERINGOTA, V.; CALMON, F.; MATOS, R. S.; DAEMON, E.; GOIS, R. W. S.; SANTIAGO, G. M. P.; CARVALHO, M. G. **Chemical composition and acaricidal activity of essential oil from *Lippia sidoides* on larvae of *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) and larvae and engorged females of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae).** *Parasitology Research*, v. 111, p. 2423- 2430, 2012.

GOMES, S. V. F.; NOGUEIRA, P. C. L.; MORAES, V. R. S. **Aspectos químicos e biológicos do gênero *Lippia* enfatizando *Lippia gracilis* Schauer.** *Eclética Química*, v. 36, n. 1, p. 64-77, 2011.

GUENTHER, E. **The essential oils.** Krieger Publishing Company, New York, 453-454, 1972.

GUIMARÃES, L. G. L.; CARDOSO, M. G.; SOUZA, R. M.; ZACARONI, A. B. & SANTOS, G. R. **Óleo essencial de *Lippia sidoides* nativas de Minas Gerais: composição, estruturas secretoras e atividade antibacteriana.** *Revta Ciênc. Agron. Centro Ciênc. Agrárias* 45(2):267-275, 2014.

HENNEBELLE, T.; SAHPAZ, S.; HENRY, J.; BAILLEUL, F. **Ethnopharmacology of *Lippia alba*.** *J. Ethnopharmacol.* v.116, p.211-222, 2008.

HOSSAIN, H.; ANSARI, F.; SCHULZ-WEIDNER, N.; WETZEL, W. E.; CHAKRABORTY, T.; DOMA, E. **Clonal identity of *Candida albicans* in the oral cavity and the gastrointestinal tract of pre-school children.** *Oral Microbiol and Immunol* 18: 302-308, 2003.

JESUS, H. C. R.; SANTOS, D. A.; ALVES, P. B.; CRUZ, E. M. O.; BLANK, A. F. **Composição química do óleo essencial de três espécies do gênero *Lippia* cultivadas em Sergipe.** IN: 33º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2006.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F.; DONOGHUE, M. J. **Sistemática Vegetal: um enfoque filogenético.** 3 ed. Porto Alegre, Artmed, 2009.

KARKOWSKA-KULETA, J.; RAPALA-KOZIK, M.; KOZIK, A. **Fungi pathogenic to**

humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. Acta Biochimica Polonica, 56: 211-224, 2009.

KHAN, A.; AHMAD, A.; KHAN, L.A.; PADOA, C.J.; VAN VUUREN, S.; MANZOOR, N. **Effect of two monoterpene phenols on antioxidant defense system in *Candida albicans*.** Microbial Pathogenesis, 80: 50-56, 2015.

KHAN, Z. K.; KATIYAR, R. **Potent antifungal activity of garlic (*allium sativum*) against experimental murine disseminated cryptococcosis.** Pharm Biol.; 38 (2):87-100, 2000.

KORDALI, S.; CAKIR, A.; OZER, H.; CAKMAKCI, R.; KESDEK, M.; METE, E. **Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish *Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and ρ -cymene.** Bioresource Technology, 99: 8788-8795, 2008.

KOTZEKIDOU, P.; GIANNAKIDIS, P.; BOULAMATIS, A. **Antimicrobial activity of some plant extracts and essential oils against food borne pathogens in vitro and on the fate of inoculated pathogens in chocolate.** Food Sci. Tech. 41:119–127, 2008.

KUETEA, V.; FOZING, D.C.; KAPCHE, W.F.G.D.; MBAVENG, A.T.; KUIATEA J.R.; NGADJUI, B.T. **Antimicrobial activity of the methanolic extract and compounds from *Morus mesozygia* stem bark.** Journal of Ethnopharmacology, 124: 551- 555, 2009.

KUMAR, C. P. G.; MENON, T.; RAJASEKARAN, S.; SEKAR, B.; PRABU, D. **Carriage of *Candida* species in oral cavities of HIV infected patients in South India.** Mycoses 52: 44-54, 2008.

KUNLE, O.; OKOGUN, J.; EGAMANA, E.; EMOJEVWE, E.; SHOK, M. **Antimicrobial activity of various extracts and Carvacrol from *Lippia multiflora* leaf extract.** Phytomedicine, 10: 59-61, 2003.

LACOSTE, E.; CHAUMONT, J. P.; MANDIN, D.; PLUMEL, M. M. and de ABREU MATOS F. J. **Antiseptic properties of essential oil of *Lippia sidoides* Cham.: application to the cutaneous microflora.** Annales Pharmaceutiques Françaises, v.54, p.228-230, 1996.

LEAL, I.R.; A. Vicente & M. Tabarelli. **Herbivoria por caprinos na caatinga: uma estimativa preliminar.** In: I.R. Leal, M. Tabarelli & J.M.C. Silva (eds.). Ecologia e conservação da Caatinga. pp. 695-715. Editora Universitária, Universidade Federal de

Pernambuco, Recife, Brasil, 2003.

LEMOS, T. L. G.; MATOS, F. J. A.; ALENCAR, J. W.; CRAVEIRO, A. A.; CLARK, A. M.; MCCHESENEY, J. D. **Antimicrobial activity of essential oils of Brazilian plants.** *Phytotherapy Research*, v.4, n.2, p.82- 4, 1990.

LIMA, E. O.; LIMA, I. O.; OLIVEIRA, R. A. G.; FARIAS, N. M. P.; SOUZA, E. L. **Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*.** *Revista Brasileira de Farmacognosia. Brazilian Journal of Pharmacognosy.* 16(2):197-201, 2006.

LIOLIOS, C.C.; GORTZI, O.; LALAS, S.; TSAKNIS, J.; CHINOI, I. **Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of *Origanum dictamnus* L. and *in vitro* antimicrobial activity.** *Food Chemistry*, 112: 77-83, 2009.

LIS-BALCHIN, M.; DEANS, S. G. **Bioatividade de óleos essenciais da planta selecionados contra *Listeria monocytogenes*.** *J Appl Bacteriol.* 1997.

LÓPEZ, P.; SANCHEZ, C.; BATLLE, R.; NERIN, C. **Solid- and Vapor-Phase Antimicrobial Activities of Six Essential Oils: Susceptibility of Selected Foodborne Bacterial and Fungal Strains.** *J. Agric. Food Chem.* 53(17): 6939-46, 2005.

LORENZI, H. & MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas.** Nova Odessa SP. Instituto Plantarum. 2002.

LUPETTI, A.; DANESI, R.; CAMPA, M.; TACCA, M. D. E. L.; KELLY, S. **Molecular basis of resistance to azole antifungals.** *Trends in Molecular Medicine*, v. 8, n. 2, p. 76– 81, 2002.

LUZ, M.T. **Novos saberes e práticas em saúde coletiva - estudo sobre racionalidade médicas e atividades corporais.** São Paulo: Hucitec; 2003.

MAFFEI, C. M. L. FMRP – USP. 2006 Disponível em: <http://rbp.fmrp.usp.br/sites/default/files/antifungicos.pdf>

MAGEE, B. B.; MAGEE, P. T. **Recent advances in the genomic analysis of *Candida albicans*.** *Rev Iberoam Micol.* 22: 187-193, 2005.

MAIA, J.G.S.; TAVEIRA, F.S.N.; ANDRADE, E.H.A.; SILVA, M.H.L.; ZOGHBI, M.G.B. **Essential oils of *Lippia grandis* Schau.** *Flavour and Fragrance J.* 18: 417-420, 2003.

MANOHAR, V.; INGRAM, C.; GRAY, J. et al. **Antifungal activities of origanum oil against**

Candida albicans. Mol Cel. Biochem., v.228, p.111-117, 2001.

MATOS, F. J. A.; OLIVEIRA, F. ***Lippia sidoides* cham. Pharmacognosy chemistry and pharmacology**. Revista Brasileira de Farmacognosia, Maringá, v. 79, p. 84-87, 1998.

MENEZES, E. A.; MENDES, L. G.; CUNHA, F A. **Resistência a antifúngicos de *Candida tropicalis* isoladas no Estado do Ceará**. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Ed 42(3), p 354- 355, 2009.

MESA-ARANGO, A.C.; MONTIEL-RAMOS, J.; ZAPATA, B.; DURÁN, C.; BETANCUR-GALVIS, L.; STASHENKO, E. **Citral and carvone chemotypes from the essential oils of Colombian *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown: composition, cytotoxicity and antifungal activity**. Mem. I. Oswaldo Cruz 104, 878-884, 2009.

MING, L. C.; FIGUEIREDO, R. O.; MACHADO, S. R.; ANDRADE, R. M. C. **Yield of essential oil of and citral content in different parts of lemongrass leaves (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) Poaceae**. Acta Hort 426: 555-559, 1996.

MORAIS, S. R.; OLIVEIRA, T. L. S.; BARA, M. T. F.; CONCEIÇÃO, E. C.; REZENDE, M. H.; FERRI, P. H.; PAULA, J. R. **Chemical Constituents of Essential Oil from *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) Leaves Cultivated in Hidrolândia, Goiás, Brazil**. International Journal of Analytical Chemistry, doi: 10.1155/2012/363919, 2012.

MORETTI, A.; POSTERARO, B.; BONCIO, L.; MECHELLI, L.; GASPERIS, E.; AGNETTI, F.; RASPA, M. **Diffuse cutaneous candidiasis in a dog. Diagnosis by PCRREA**. Revista Iberoamericana de Micologia, v. 21, p. 139-142, 2004.

MORTON, J.F. **Atlas of Medicinal Plants of Middle America**. Vol. I. Springfield, Illinois, USA: Thomas Publisher, p. 745-750, 1981.

MOTA, M. L.; LOBO, L. T. C.; COSTA, J. G. M.; COSTA, L. S.; ROCHA, H. A. O.; SILVA, L. F. R.; POHLIT, A. M.; ANDRADE-NETO, V. F. A. **In Vitro and In Vivo Antimalarial activity of essential oils and chemical components from three medicinal plants found in Northeastern Brazil**. Planta Medica, v. 78, p. 658-664, 2012.

MOTA, R. A.; SILVA, K.P.C.; FREITAS, M. F. L.; PORTO, W. J. N.; SILVA, L. B. G. **Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana**. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science. V. 42, n. 6, 2005.

NEGRI, M.; MARTINS, M.; HENRIQUES, M.; SVIDZINSK, T. I.; AZEREDO J.; OLIVEIRA, R. **Examination of potential virulence factors of *Candida tropicalis* clinical isolates from hospitalized patients.** Mycopathologia. 169: 175-182, 2010.

NOSTRO, A.; BLANCO, A. R.; CANNATELLI, M. A.; ENEA, V.; FLAMINI, G.; MORELLI, I.; ROCCARO, A. S.; ALONZO, V. **Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol.** FEMS Microbiology Letters, 230:191-195, 2004.

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

O'LEARY N, S.S.; DENHAM, F. SALIMENA; M.E., MÚLGURA. **Species delimitation in *Lippia* section *Goniostachyum* (Verbanaceae) using the phylogenetic species concept.** Botanical Journal of Linnean Society, v.170, p. 197-219, 2012.

OLIVEIRA, D. R.; LEITÃO, G. G.; BIZZO, H. R.; LOPES, D.; ALVIANO, D. S.; ALVIANO, C. S.; LEITÃO, S. G. **Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia origanoides* H.B.K.** Food Chemistry, v. 101, p. 236–240, 2007.

Oliveira, D.R. **Levantamento Etnobotânico das Plantas Medicinais Utilizadas pela Comunidade de Oriximiná (Pará) com enfoque etnofarmacológico para o Gênero *Lippia*.** Master Thesis. Rio de Janeiro: UFRJ/NPPN, p. 111, 2004.

OLIVEIRA, M. L. M.; BEZERRA, B. M. O.; LEITE L. O.; GIRÃO V. C. C. & NUNES-PINHEIRO, D. C. S. **Topical continuous use of *Lippia sidoides* Cham. essential oil induces cutaneous inflammatory response, but does not delay wound healing process.** J. Ethn. 153(1):283-289, 2014.

OLIVEIRA, R. A. G.; LIMA, E. O.; VIEIRA, W. L.; FREIRE, K. R. L.; TRAJANO, V. N.; LIMA, I. O.; SOUZA, E. L.; TOLEDO, M.S.; SILVA-FILHO, R. N. **Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica.** Rev Bras Farmacogn 16: 77-82, 2006.

OLIVEIRA, R. D. R.; MAFFEI, C. M. L.; MARTINEZ, R. **Infecção urinária hospitalar por levedura do gênero *Cândida*.** Rev Ass Med, Brasil. 47(3): 231-5, 2001.

OLIVEIRA, V. C. S.; MOURA, D. M. S.; LOPES, J. A. D.; ANDRADE, P. P.; SILVA, N. H.; FIGUEIREDO, C. B. Q. **Effects of essential oils from *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., *Lippia sidoides* Cham., and *Ocimum gratissimum* L. on growth and ultrastructure of *Leishmania chagasi* promastigotes.** Parasitology Research, v. 104, p. 1053-1059, **2009**.

OLIVEIRA, W. A.; PEREIRA, F. O.; LUNA, G. C. D. G.; LIMA, I. O.; WANDERLEY, P. A.; LIMA, R. B.; LIMA, E. O. **Antifungal activity of *Cymbopogon winterianus* jowitt ex bor against *Candida albicans*.** Brazilian Journal of Microbiology. 42(2):433-41, 2011.

OZCAN, M. M.; CHALCHAT, J. C. **Chemical composition and antifungal activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) oil from Turkey.** Int J Food Sci Nutr. 59(7-8):691-8, 2008.

PARRA, E. T.; RODRIGUEZ, N. L. **Plasticidad fenotípica de *Lippia alba* y *Lippia origanoides* (Verbenaceae) em resposta a la disponibilidad de luz.** Acta Biologica Colombiana. v. 12, p. 91–102. 2007.

PASCUAL, M. E.; SLOWING, K.; CARRETERO, M. E.; VILLAR, A. **Antiulcerogenic activity of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae).** Farmaco. v.56, p. 501-504. **2001**.

PASCUAL, M.E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; MATA, D.S.; VILLAR, A. ***Lippia*: Traditional uses, chemistry and pharmacology: A review.** *J. Ethnopharmacol.* 76, 201–214, 2001.

PEIXOTO-NEVES, D.; SILVA-ALVES, K. S.; GOMES, M. D.; LIMA, F. C.; LAHLOU, S.; MAGALHÃES, P. J.; CECCATTO, V. M.; COELHO-DE-SOUZA, A. N.; LEAL-CARDOSO, J. H. **Vasorelaxant effects of the monoterpenic phenol isomers, carvacrol and thymol, on rat isolated aorta.** Fundam Clin Pharmacol 24: 341-350, 2010.

PEREIRA, M. C.; VILELA, G. R.; COSTA, L. M. A. S. **Inibição do desenvolvimento fúngico através da utilização de óleos essenciais de condimentos.** Ciência Agrotecnológica, 30 (4): 731-733, 2006.

PINTO, E.; VALE-SILVA, L.; CAVALEIRO, C.; SALGUEIRO, L. **Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species.** J Med Microbiol. 58 (Pt 11):1454-62, 2009.

POZZATTI P. **In vitro activity of essential oils extracted from plants used as aspices**

against fluconazole-resistant and fluconazole-susceptible *Candida* spp. *Can. J. Microbiol.*, 54(6): 950-6, 2008.

PRADO, M. R. **Isolamento de *Microsporium canis*, *Malassezia* spp. e *Candida tropicalis* em cães: um destaque para teste de sensibilidade de *Malassezia pachydermatis* in vitro.** Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Universidade Estadual do Ceará. 2007.

QUEIROZ, M. L. F. **Atividade antifúngica in vitro de plantas medicinais frente a leveduras do gênero *Candida* isoladas da cavidade bucal.** (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 1998.

QUEIROZ, M. R. A.; ALMEIDA, A. C.; ANDRADE, V. A.; LIMA, T. S.; MARTINS, E.R.; FIGUEIREDO, L. S. & CARELI, R. T. **Avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial de *Lippia organoides* frente à *Staphylococcus* sp. isolados de alimentos de origem animal.** *Revta Bras. Plantas Medic.* 16(3):737- 743, 2014.

RAPOSO, B. R.; NOBRE, M. O.; FERNANDES, C. G.; PORTO, M. **Candidíase cutânea em um canino.** *Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia*, 2-3, 11-14, 1996.

REIS, F. B.; SOUZA, V. M.; THOMAZ, M. R. S.; FERNANDES, L. P.; OLIVEIRA, W. P.; MARTINS, E. C. P. **Use of *Carnobacterium maltaromaticum* cultures and hydroalcoholic extract of *Lippia sidoides* Cham. against *Listeria monocytogenes* in fish model systems.** *International Journal of Food Microbiology*, v. 146, p. 228-234, 2011

RIVAS, L.; MCDONNELL, M. J.; BURGESS, C. M.; O'BRIEN, M.; NAVARRO-VILLA, A.; FANNING, S.; DUFFY, G. **Inhibition of verocytotoxigenic *Escherichia coli* in model broth and rumen systems by carvacrol and thymol.** *International Journal of Food Microbiology*, 139: 70-78, 2010.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e farmaco biotecnologia.** São Paulo: Premier, 1997.

RONDON, F. C. M.; BEVILAQUA, C. M. L.; ACCIOLY, M. P.; MORAIS, S. M.; ANDRADEJÚNIOR, H. F.; CARVALHO, C. A.; LIMA, J. C.; MAGALHÃES, H. C. R. **In vitro efficacy of *Coriandrum sativum*, *Lippia sidoides* and *Copaifera reticulata* against *Leishmania chagasi*.** *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 21, n. 3, p. 185-191, 2012.

SACCHETTI, G.; MAIETTI S.; MUZZOLI, M.; SCAGLIANTI, M.; MANFREDINI, S.; RADICE, M.; BRUNI, R. **Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods.** Food Chemistry, 91: 621–632, 2005.

SAGGIORATO, A G; GAIO, I.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; CICHOSKI, A. J.; CANSIAN, R. L. **Antifungal Activity of Brasil essential Oil (*Ocimum basilicum* L.): Evaluation *In Vitro* and on an Italian type Sausage Surface.** Food and Bioprocess Technology. 5(1): 378-84, 2012.

SAMILENA, F. R. G. **Revisão taxonômica de *Lippia* L. sect. *Rodholippia* Schauer (Verbenaceae).** Tese de Doutorado. Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo, 2000.

SANDERS, R.W. **The genera of Verbenaceae in the southeastern United States.** Harvard Papers in Botany 5(2): 303-358, 2001.

SANTOS JR, I. D.; SOUZA, I. A. M.; BORGES, R. G.; SOUSA, L. B. S.; SANTANA, W. J.; COUTINHO, H. D. M. **Características gerais da ação do tratamento e da resistência fúngica ao fluconazol.** Scientia Medica, Porto Alegre: PUCRS, v. 15, n. 3, jul./set. 2005

SANTOS, M. L.; MAGALHÃES, C. F.; ROSA, M. B.; SANTOS, D. A.; BRASILEIRO, B. G.; CARVALHO, L. M, ET AL. **Antifungal activity of extracts from *Piper aduncum* leaves prepared by diferente solvents and extraction techniques against dermatophytes *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton interdigitale*.** Braz K Microbiol. 2014.

SARRAZIN, S. L. F.; OLIVEIRA, R. B.; BARATA, L. E. S. & MOURÃO, R. H. V. **Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Lippia grandis* Schauer (Verbenaceae) from the western Amazon.** Food Chem. 2012.

SARRAZIN, S. L. F.; SILVA, L. A.; ASSUNÇÃO, A. P. F.; OLIVEIRA, R. B.; CALAO, V. Y. P.; SILVA, R. STASHENKO, E. E.; MAIA, J. G. S.; MOURÃO, R. H. V. **Antimicrobial and seasonal evaluation of the carvacrol-chemotype oil from *Lippia origanoides* Kunth.** Molecules, 20: 1860-1871, 2015.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A.L.M.; DELARMELENA, C.; FIGUEIRA, G.M.; DUARTE, M. C.T.; REHDER, V.L.G. **Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil.** Brazilian Journal of Microbiology, v. 35, p. 275-280, 2004.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Candidíase. In: SIDRIM, J. J. C. & ROCHA, M. F. G. **Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos**, Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., p.265-274, **2004**.

SILVA V.; M CRISTINA DÍAZ J.; NALDY FEBRÉ Y. Red De Diagnóstico En Micología Médica. **Vigilancia De La Resistencia De Leveduras A Antifúngicos**. Rev. Chil. Infectol. Santiago v.19 Supl.2 **2002**.

SILVA, S.; NEGRI, M.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D. W., & AZEREDO, J. **Candida glabrata, Candida parapsilosis and Candida tropicalis : biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance**. FEMS Microbiology Reviews, 36(2), 288–305, 2012.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, **2007**.

SIMÕES, C.A. & SPITZER, V. **Óleos voláteis**. In: C.M.O. SIMÕES, E.P. SCHENKEL, G. GOSMANN, J. C. P.; MELLO, L. A.; MENTZ & P. R. PETROVIK (orgs.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Editora da UFSC, pp. 467-495. **2004**.

SINGH, G.; KAPOOR, I.P.S.; SINGH, P.; HELUANI, C. S.; LAMPASONA, M. P.; CATALAN, C. A. N. *Chemistry, antioxidant and antimicrobial investigations on essential oil and oleoresins of Zingiber officinale*. Food and Chemical Toxicology, 46: 3295-3302, 2008.

SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S.; CHASE, M. W.; ENDRESS, P. **Phylogeny and evolution of angiosperms**. Sunderland, MA Sinauer Associates, 2005.

SOUSA, R. M. S.; SERRA, I. M. R. S.; MELO, T. A. **Effect of essential oils as na alternative in the controlo f Colletotrichum gloesporioides in pepper**. Summa Phytopathologica, v.38, n.1, p.42-47, **2012**.

SOUZA, L. M. **Flavonoides totais, atividade antioxidante e variação sazonal da composição química do óleo essencial de alecrim-pimenta (Lippia organoides Kunth)**. Dissertação (Mestrado em Produção Animal), Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros, **2015**.

SOUZA, V.C. & LORENZI, H. **Verbenaceae. Botânica sistemática.** Instituto Plantarum de Estudos da Flora, Nova Odessa. Pp. 529-532, 2005.

STASHENKO, E. E.; JARAMILLO, B. E.; MARTINEZ, J. R. **Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its in vitro antioxidant activity,** *J Chromatogr A* 1025: 93-103, 2003.

STASHENKO, E. E.; MARTÍNEZ, J. R.; CALA, M. P.; DURÁN, D. C.; AND CABALLERO D. **Chromatographic and mass spectrometric characterization of essential oils and extracts from *Lippia* (Verbenaceae) aromatic plants.** 192-202, 2013

STEVENS, P. F. onwards. Angiosperm phylogeny website. Available at <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/> Takhtajan A. 1997. Diversity and classification of flowering plants. New York: Columbia University Press, 2001.

TERBLANCHÉ, F.C.; KORNELIUS, G. **Essential oil constituents of the genus *Lippia* (Verbenaceae) – a literature review.** *Journal Essential Oil Research*, Carol Stream, v. 8, n. 3, p. 471-485, May 1996.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. ***Microbiologia***, 4 ed. São Paulo: Atheneu, 2004.

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

ULTEE, A.; KETS, E. P. W, SMID, E. J. **Mecanismos de ação do carvacrol no patógeno transmitido pelos alimentos.** *Appl. Environ. Microbiol.* 65 , 4606-4610, 1999.

VÁGI, E.; SIMÁNDI, B.; SUHAJDA, Á.; HÉTHELYI, É.; **Essential oil composition and antimicrobial activity of *Origanum majorana* L. extracts obtained with ethyl alcohol and supercritical carbon dioxide.** *Food Research International.* 38(1):51-7, 2005.

VERAS, H. N. H.; ARARUNA, M. K. A.; COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M.; KERNTOPF, M. R.; BOTELHO, M. A.; MENEZES, I. R. A. **Topical antiinflammatory activity of essential oil of *Lippia sidoides* Cham: possible mechanism of action.** *Phytotherapy Research*, v. 27, p. 179-185, 2013.

VICCINI, L. F.; PIERRE, P. M. O.; PRAÇA, M. M.; COSTA, D. C. S.; ROMANEL, E. C.; SOUSA, S. M.; PEIXOTO, P. H. P.; SALIMENA, F. R. G. **Chromosome numbers in the genus *Lippia* (Verbenaceae)**. *Plant Systematics and Evolution*, v. 256, n. 4, p. 171-179, **2005**.

VICUÑA, G. C.; STASHENKO, E. E.; FUENTES, J. L. **Chemical composition of the *Lippia organoides* essential oils and their antigenotoxicity against bleomycin-induced DNA damage**. *Fitoterapia*, v. 81, p. 342-349, Oct. **2010**.

WEINDL G., WAGENER J., SCHALLER M. **Epithelial cells and innate antifungal defense**. *Journal of Dental Research*. 89(7):666-675, 2010.

WINGARD, J.R. **Importance of *Candida* species other than *C. albicans* as pathogens in oncology patients**. *Clin. Infect. Dis.* 20. 115-125, **1995**.

YAYA, R.; HAN, S.; YYONG, D.; JAE-KWAN, H. **Atividade in vitro de Xanthorrhizol contra *Candida glabrata*, *C. guilliermondii* e *C. parapsilosis* isoladas de biofilmes**. *Medical Mycology*. 49: 1–9, **2011**.

ZAPATA, B.; DURÁN, C.; STASHENKO, E.; BETANCUR-GALVIS, L.; ARANGO, A. C. M. **Actividad antimicótica y citotóxica de aceites esenciales de plantas de la familia Asteraceae**. *Revista Iberoamericana de Micología*. 27(2):101–103, **2010**.

ZARDO, V.; MEZZARI, A. **Os antifúngicos nas infecções por *Candida* SP**. *NewsLab*. 2004(63):136-46. Wanke e Harvey, **2008**

ZHAO, J.; ZHOU, L.; WANG, J.; SHAN, T.; ZHONG, L.; LIU, X.; GAO, X. **Endophytic fungi for producing bioactive compounds originally from their host plants**. In: **MENDEZVILAS, A.** (Ed.). *Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology*. Badajoz: Formatex Research Center, Microbiological bo series, 2), 2010.