UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CURSO DE FARMÁCIA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Mentha spicata* SOBRE CEPAS DE *Candida não albicans*

ALZIMARY ALZIRA CAVALCANTE

JOÃO PESSOA
2017

ALZIMARY ALZIRA CAVALCANTE

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Mentha spicata* SOBRE CEPAS DE *Candida não albicans*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado em atendimento à exigência de conclusão do curso de graduação em Farmácia – Departamento de Ciências Farmacêuticas (DCF), Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal de Paraíba (UFPB).

ORIENTADOR: Prof. Dr. Felipe Queiroga Sarmento Guerra

JOÃO PESSOA- PB
2017

C376a Cavalcante, Alzimary Alzira.

Avaliação da atividade antifúngica do óleo essencial de mentha spicata sobre cepas de candida não albicans / Alzimary Alzira Cavalcante. - - João Pessoa, 2017.
43f. : il. -
Orientador: Felipe Queiroga Sarmento Guerra.
Monografia (Graduação) – UFPB/CCS.

1. Candidíase. 2. Candida spp. 3. Mentha spicata. 4. Farmacologia.

BS/CCS/UFPB CDU: 616.97(043.2)

ALZIMARY ALZIRA CAVALCANTE

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Mentha spicata* SOBRE CEPAS DE *Candida não albicans*

Monografia aprovada em 28 / 11 / 17 para obtenção de título de Farmacêutico.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Felipe Queiroga Sarmento Guerra
DCF/ CCS/ UFPB (Orientador)

Profa. Dra. Zélia Braz Vieira da Silva Pontes
DCF/ CCS/ UFPB (1° MEMBRO)

Profa. Me. Neuza Maria Cavalcante Oliveira
DCF/ CCS/ UFPB (2° MEMBRO)

À minha mãe, Alzira – in memoriam.

AGRADECIMENTOS

Um agradecimento especial a DEUS, por ser sempre o meu guia, por me mostrar que ter paciência é fundamental e por me dar uma fé inabalável. Por me guiar e dar forças em momentos que as cargas – da vida e acadêmicas – pareciam ser maiores do que eu podia suportar. A ele agradeço também por colocar vários anjos na minha vida, os quais chamo de amigos.

Ao meu pai, Francisco Antonio, por sempre fazer tudo aquilo que estava ao seu alcance para que hoje eu pudesse estar concluindo mais essa etapa da minha vida acadêmica. Também por sonhar comigo e não medir esforços para transformar tais sonhos em realidade. Bem como por se fazer presente e se alegrar com cada etapa vencida por mim.

À minha mãe, Alzira, que, embora não esteja mais presente fisicamente para ver a conclusão deste trabalho, sempre me deu seu apoio incondicional, e eu sei que se estivesse aqui estaria muito orgulhosa. A quem agradeço também por ser minha maior inspiração de mãe, amiga e mulher.

À minha irmã, Francimary, que, entra tapas e socos, é uma pessoa que eu sei que sempre que eu precisar, ela estará lá para me defender. A quem agradeço por todo apoio recebido e por sempre torcer por mim.

Aos meus avós, tios, primos, sobrinhos e irmãos das minhas famílias materna, paterna e daquela de coração, por sempre estarem ao meu lado dando apoio e incentivo. E também por compreenderem os momentos em que eu não pude estar presente.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Felipe Queiroga Sarmento Guerra, por toda contribuição durante a construção deste trabalho, por toda paciência e tempo dedicados a tal pesquisa e principalmente por ter aceito me orientar há poucos meses do término do periodo pra defesa.

Às professoras Zélia Braz Vieira da Silva Pontes e Neuza Maria Cavalcante Oliveira , pela disponibilidade em participar da banca examinadora e por darem importantes contribuições a fim de tornar este trabalho mais rico desde os momentos iniciais

À minha farmundiça, por todo apoio e pelos laços de amizades construídos ao longo desses cinco anos de curso, os quais levarei comigo mesmo após o fim dessa jornada. Agradeço também por todo aprendizado coletivo e por tornarem a vida na universidade mais leve.

Ao meu grupinho (Bianca, Valgricia, Namibia, Thaynara e Nayara), por serem mais que amigas, verdadeiras irmãs, sempre uma apoiando a outra. Vocês são a prova viva que pra ser irmã, não precisa ser de sangue. Obrigada por cada ensinamento, por cada noite de estudos, por cada fds juntas, por cada conselho, por tudo. Obrigada por serem exatamente como são. Vocês tornam a minha vida mais feliz.

Ao meu círculo de EJC, vermelhOrar, por me ajudarem a permenecer na fé e me levarem para mais próximo de Deus. Vocês são luz na minha vida. Sou muito grata a cada um em particular, pessoas que tenho certeza que foram enviadas por Deus para me ajudarem em muitos momentos, servindo de apoio e me apresentando a minha melhor versão.

A Jarrinho, Pablo e Bruninho, três aperreios na minha vida, e que apesar das brincadeiras, construimos uma amizade verdadeira que quero levar pra sempre.

A Ramon e Manu por dividirem teto comigo durante todo esse tempo, por aguentarem meus estresses e me ajudarem em tudo. Também por servirem de suporte durante todos esses anos da graduação, onde criamos um laço que nem mesmo a convivência foi capaz de romper.

Agradeço, por fim, a todos os meus professores por abrirem os horizontes e servirem de inspiração e àqueles que direta ou indiretamente contribuíram para este momento.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. CIM; CFM ; CFM:CIM; Efeito do Oléo essencial CIM da anfotericina B e fluconazol em cepas de *Candida albicans.*

LISTA DE ABREVIATURAS

ASD: Ágar Sabouraud Dextrose

ATCC: American Type Culture Collection

C. albicans: *Candida albicans*

C. não albicans: *Candida não albicans*

C. glabrata: *Candida glabrata*

C. krusie: *Candida krusie*

C: tropicalis: *Candida tropicalis*

C. guilliermondie: *Candida guilliermondie*

CFM: Concentração Fungicida Mínima

CIM: Concentração Inibitória Mínima

DMSO: Dimetilsulfóxido

M. spicata: *Mentha spicata*

OE: óleo essencial

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

sp: espécie

spp: espécies

µg/mL: microgramas por mililitro

µg: micrograma

mL:mililitro

RESUMO

Candidíase é a mais frequente infecção fúngica oportunista, causada por leveduras do gênero *Candida*. Dentre as espécies causadoras, a mais comum é *C. albicans.* Entretanto, nas últimas decadas, outras espécies de *Candida* são comumentes isoladas de material clínico. Além disso, existe uma grande dificuldade no tratamento, relacionado aos seus efeitos adversos, tóxicos e alto custo dos antifúngicos. Sendo assim, é de fundamental importância a busca por novos fármacos com ação antifúngica, sendo os óleos essenciais excelentes alternativas para esse propósito. Portanto, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade do óleo essencial de *M. spicata* na inibição do crescimento de *C. glabrata, C. tropicalis, C. krusei e C. guilliermondie.* Foi realizada a avaliação das atividades antifúngicas *in vitro* através da determinação da CIM e CFM. Os resultados mostraram que o óleo essencial de *M. spicata* apresentou uma CIM de 512 µg/mL, em 70% das cepas estudadas, sendo a mais sensível a cepa ATCC 90030 (*C. glabrata*), que apresentou uma CIM de 256 µg/mL e as mais resistentes as cepas LM 512 e LM 221 (*C. glabrata*), que apresentaram uma CIM maior 512 µg/mL. Os dois antifúngicos comerciais testados apresentaram os seguintes resultados, a anfotericina B CIM de 0,5 µg/mL, para 80% das cepas testadas e as mais resistentes as cepas LM 802 e LM 713 *(C. krusie* e *C. tropicalis*, respectivamente), que apresentaram uma CIM maior que 8µg/mL. Já o fluconazol apresentou CIM de 1µg/mL para 50% das cepas testadas e uma CIM maior que 16 µg/mL para as outras 50%. O óleo apresentou uma moderada atividade antifúngica frente às cepas de *C. krusie, C. tropicalis e C. guilliermondie*, entretanto, das três cepas de *C. glabrata* testadas, duas (LM 512 e LM 221) apresentaram moderada ou fraca atividade, mas a cepa ATCC 90030 demostrou uma forte atividade antifúngica. Neste estudo todas as cepas demostraram uma CFM de 8192 µg/mL, apresentando uma razão CFM/CIM > 2, determinando assim um efeito prevalecente fungistático. O óleo essencial *Mentha spicata* demonstrou moderada atividade antifúngica contra a grande maioria das cepas de *Candida não albicans* testadas, com efeitos bacteriostáticos observados. Os resultados do presente estudo indicam que este óleo deve ser estudado mais extensivamente para explorar seu potencial no tratamento de doenças infecciosas, principalmente a partir do estudo dos seus constituintes químicos.

Palavras-chave: Candidíase, *Candida* spp.*, Mentha spicata.*

ABSTRACT

Candidiasis is the most frequent fungal opportunistic infection caused by yeast of the genus Candida. Among the causative species, the most common is C. albicans. However, in the last decades other species of Candida are commonly isolated from clinical material. In addition, there is great difficulty in treatment, related to its adverse effects, toxic and high cost of antifungal. Therefore, the search for new drugs with antifungal action is of fundamental importance, and essential oils are excellent alternatives for this purpose. Therefore, the objective of this work was to evaluate the activity of the essential oil of M. spicata in inhibiting the growth of C. glabrata, C. tropicalis, C. krusei and C. guilliermondie. The evaluation of in vitro antifungal activities was performed through the determination of MIC and CFM. The results showed that the essential oil of M. spicata presented a MIC of 512 µg / mL in 70% of the strains studied, the most sensitive being the ATCC 90030 strain (C. glabrata), which had a MIC of 256 µg / mL and the most resistant strains LM 512 and LM 221 (C. glabrata), which presented a MIC of 512 µg / mL. The two commercial antifungal agents tested showed the following results, amphotericin B MIC 0.5 µg / ml, for 80% of the strains tested and the most resistant strains LM 802 and LM 713 (C. krusie and C. tropicalis, respectively) , who presented an MIC of more than 8 µg / mL. On the other hand, fluconazole had a MIC of 1µg / mL for 50% of the strains tested and a MIC greater than 16 µg / mL for the other 50%. The oil had a moderate antifungal activity against C. krusie, C. tropicalis and C. guilliermondie strains; however, of the three strains of C. glabrata tested, two (LM 512 and LM 221) presented moderate or weak activity, but the strain ATCC 90030 demonstrated strong antifungal activity. In this study all strains showed a CFM of 8192 µg / mL, presenting a CFM / MIC ratio> 2, thus determining a prevailing fungistatic effect. The essential oil Mentha spicata showed moderate antifungal activity against the great majority of non-albicans Candida strains tested, with observed bacteriostatic effects. The results of the present study indicate that this oil should be studied more extensively to explore its potential in the treatment of infectious diseases, mainly from the study of its chemical constituents.

Keywords: Candidiasis, *Candida spp., Mentha spicata.*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 12
2. REFERENCIAL TEÓRICO 14
2.1 *Candida* spp e candidíase 14
2.1.1Fatores de virulência 16
2.1.2 *Candida glabrata* 19
2.1.3 *Candida parapsilosis* 19
2.1.4 *Candida tropicalis* 19
2.1.5 *Candida krusei* 20
2.1.6 Candida guilliermondii 20
2.2 Terapias com antifúngicos 20
2.3 Produtos naturais 22
2.3.1 *Mentha spicata* 23
3 OBJETIVOS 25
3.1 Geral 25
3.2 Específicos 25
4 METODOLOGIA 26
4.1 Tipo de estudo 26
4.2 Local da pesquisa 26
4.3 Óleo essencial 26
4.4 Antifúngicos licenciados 26
4.5 Micro-organismos 26
4.6 Meios de cultura 27
4.7 Avaliação das atividades antifúngicas in vitro 27
4.7.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) 27
4.7.2 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM) 28
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 29
6 CONCLUSÃO 33
REFERÊNCIAS 34

1. INTRODUÇÃO

As infecções fúngicas alcançaram uma importância considerável ao longo das últimas décadas devido a um aumento na prevalência. Isso ocorre em consequência de uma alta significativa na incidência de agentes oportunistas. Elas ocasionam um problema sanitário mundial. A epidemiologia dos agentes etiológicos varia de acordo com vários fatores, dentre eles, o clima e as características culturais e socioeconômicas da população. (WILLE, ARANTES E SILVA, 2009; PEREIRA, C.A et al., 2014)

Candidíase é a mais frequente infecção fúngica oportunista, sendo causada por leveduras do gênero *Candida*. Estas atingem superfícies cutâneas e membranas mucosas resultando em infecções, como candidíase oral, candidíase vaginal e onicomicoses. A depender do comprometimento dos sistemas específicos ou inespecíficos de defesa do hospedeiro, as infecções também podem evoluir a estados sistêmicos, resultando em septicemias, meningites e endocardites, causando mortalidade e morbidade. (RUKAYADI et al., 2011; YANG et al., 2011; KOTHAVADE et al., 2010).

Dentre os especies causadores da candidíase a mais comum é *C. albicans.* Entretanto, ultimamente, as espécies de *Candida não albicans,* como *C. glabrata, C. tropicalis, C. parapsilosis, C. krusei, C. guilliermondii, C. kefyr, C. lusitaniae, C. famata e C. norvegensis*, sao comumentes isoladas de material clínico, ganhando destaque como agentes causadoras de infecções.(OBEROI et al., 2012; RUKAYADI et al., 2011; COUTO et al., 2011; SANTOS, 2009).

Em consequência desse aumento significativo das infecções fúngicas, houve um crescente uso de antifúngicos, como fluconazol, itraconazol, cetoconazol, caspofuginas, nistatina e anfotericina B, consequentemente os fungos desenvolveram uma rápida resistência a vários desses medicamentos disponíveis. Além disso, um outro motivo do agravamento dessas infecções é a grande dificuldade no tratamento, relacionado aos seus efeitos adversos, tóxicos e alto custo, sendo observada uma alta taxa de mortalidade em pacientes imunocomprometidos (BONI; FEIRIA; HOFLING, 2017; PEIXOTO, 2010).

Portanto, devido à necessidade de novas alternativas de tratamento, o uso de plantas medicinais na forma de extratos purificados, óleos ou compostos bioativos tem sido alvo de muitas pesquisas nos últimos anos, com o objetivo de descobrir

compostos efetivos contra esses organismos resistentes e que possuam uma menor toxicidade ao hospedeiro. (BONI; FEIRIA; HOFLING, 2017).

Entre as plantas medicinais, o gênero *Mentha* da família Lamiaceae, desmostrou em estudos sua atividade antibacteriana, antiviral e antifúngica, devido a presença de compostos bioativos, como os óleos essenciais (SAHARKHIZ et al., 2012). Dentre os compostos mais comumente encontrados no óleo essencial de *Mentha* spp. estão a carvona (MKADDEN et al, 2009), limoneno, mentofurano (SAHARKHIZ et al., 2012) e pulegona (JALILZADEH et al., 2014).

Os óleos essenciais são constituídos de misturas de compostos voláteis e ricos em compostos biologicamente ativos (SILVA et al., 2013; LIMA et al., 2012; SAAD et al., 2010) possuem atividade, antioxidante (MASKOVIC et al., 2013; XU et al., 2013), anti-inflamatória (RAMOS et al., 2013; ARUMUGAM et al., 2008) antibacteriana (GUERRA et al., 2013; CASTRO, et al., 2011) e antifúngica (TYAGI et al., 2013; KHAN & MALIK, 2012; OLIVEIRA et al., 2011). A atividade dos óleos essenciais contra fungos do gênero *Candida*, vem sendo muito estudada nos últimos anos, na busca por alternativas terapêuticas para o tratamento da candidíase. Contudo, os mecanismos de ação desses compostos não estão completamente elucidados, mas, supõe-se que a maioria desses óleos possuam ação antifúngica através de modificações na estrutura da parede celular (PALMEIRA - DE - OLIVEIRA et al., 2009; ABRANTES, 2013).

A pesquisa de um novo antifúngico com ação sobre fungos potencialmente patogênicos ou oportunistas se faz necessária, levando-se em consideração a crescente importância clínica e epidemiológica dispensada às infecções micóticas à necessidade de alternativas viáveis aos tratamentos destas enfermidades. Portanto, este trabalho propõe avaliar a eficácia do oléo essencial de *Mentha spicata L.* na inibição do crescimento de leveduras pertencentes à espécie *Candida não albicans.*

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Candida spp* e candidíase

Leveduras de *Candida spp*. pertencem ao Reino Fungi, Divisão *Eumycota*, Subdivisão *Deuteromycotina*, Classe *Hemiascomycetes*, Ordem *Saccharomycetales*, Família Sacchamycetaceae (HOOG et al., 2011). Apresentam-se de forma arredondada ou oval, medindo aproximadamente 2,0 a 6,0 µm. No cultivo apresentam-se colônias de coloração branca a creme, com superfície lisa ou rugosa. Replicam-se normalmente de forma assexuada, por brotamento, e crescem em condições de aerobiose ou microaerofilia. (SCHULZE, 2009).

Dependendo da espécie, podem apresentar-se de três formas diferentes, leveduriforme, hifa e/ou pseudo-hifa (THOMPSON, CARLISLE, & KADOSH, 2011). Todas as espécies possuem capacidade de crescer na sua forma leveduriforme por gemulação, originando os blastoconídios, estruturas com forma redonda a oval e tamanho compreendido entre 2-5 × 3-7 µm. A morfologia das formas filamentosas é influenciada pelo seu modo de formação (SILVA et al., 2012).

As hifas verdadeiras se desenvolvem a partir de uma estrutura inicial, o tubo germinativo, e o citoplasma se encontra dividido por septos (invaginações da parede celular que dividem as hifas em compartimentos), já as pseudohifas formam-se por gemulação a partir da célula leveduriforme, verificando-se a ausência de septos, em que as gémulas formadas não se destacam da célula-mãe, constituindo um protoplasma contínuo (DEORUKHKAR & SAINI, 2015; SILVA et al., 2012).

As leveduras do gênero *Candida* embora sejam habitantes comensais de diversas partes do corpo, colonizando o trato gastrointestinal em 80% da população adulta saudável e a vagina em 20 a 30% das mulheres, nos hospitais correspondem a cerca de 80% das infecções fúngicas documentadas (AVRELLA; GOULART, 2008; ÁLVARES; SVLDZLNSKI; CONSOLARO, 2007).

São conhecidas mais de 200 espécies de leveduras desse gênero, entretanto, as de interesse clínico são: *C. albicans, C. parapsilosis, C. tropicalis, C. glabrata, C. krusei, C. guilliermondii, C. lusitaniae, C. dubliniensis, C. kefyr, C. rugosa, C. famata, C. utilis, C. lipolytica, C. norvegensis e C. inconspícua* (PEIXOTO et al., 2014). Apesar de em 80-90% dos casos ser causada por *C. albicans*, as espécies de *Candida não albicans*, são responsáveis por cerca de 10-20% dos casos, atribuídos

a *C. tropicalis, C. glabrata, C. krusei, C. parapsilosis e C. guilliermondii* (BHAWNA, SANGEETA, & UDAYAN, 2015; MILHOMENS, MACHADO, MORAES, BORGES, & DINIZ, 2014). A taxa de mortalidade média associada é de 50% (30-80%), 29% e 40% (30-70%) para C. glabrata, C. parapsilosis e C. tropicalis, respectivamente (KOŁACZKOWSKA & KOŁACZKOWSKI, 2016).

A candidíase é a quarta doença que mais afeta pessoas no mundo dentre as infecções sanguíneas hospitalares, superando infecções causadas por bactérias gram negativas. A frequência de infecções por *Candida*s vem aumentando regularmente em hospitais de todo o mundo. (PFALLER e DIEKEMA, 2007). No Brasil, a candidíase foi a segunda micose que mais matou pacientes HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana) positivos entre os anos de 1996 e 2006, sendo as regiões Sudeste e Nordeste as que apresentaram um maior número de mortes. (PRADO et al., 2009).

Esta doença pode apresentar um quadro agudo, subagudo ou crônico, podendo ainda ser superficial ou profundo, mas sempre de caráter oportunista. Os locais mais acometidos são as mucosas oral e vaginais, a pele, brônquio, pulmão, trato gastrointestinal, rim, baço, fígado e coração, podendo se tornar sistêmica. (PAPPAS et al., 2006)

Dentre os tipos de candidíase, uma das mais comuns é a oral, diagnosticada pelos aspectos clínicos, são observadas numerosas formas de expressão, sendo a forma aguda pseudomembranosa, conhecida popularmente como sapinho, a mais comum. A candidíase vaginal ocupa o segundo lugar dentre as vaginites. Aproximadamente 75% das mulheres adultas apresentam pelo menos um episódio de candidíase vaginal em sua vida, os sintomas são geralmente leucorréia, fissuras, dor, prurido, entre outros. (SOBEL, 2007). Já a candidíase cutânea ocorre em regiões mais úmidas do corpo como axilas, espaços interdigitais, mamas, virilhas e unhas (PEIXOTO et al., 2014).

A candidíase sistêmica ou candidemia, geralmente ocorrem em pacientes com doenças debilitantes, neoplásicos, HIV positivos e/ou pacientes que passaram por procedimentos cirúrgicos e cateterismos. A infecção pode acometer diferentes órgãos e tecidos mais internos, como articulações, coração, fígado, meninges, rins, bexiga, pulmões e olhos (PEIXOTO et al., 2014).

Os fatores de predisposição para a doença são, extremos de idade como idade avançada e neonatos, doenças hormonais, a incidência de HIV, exposição frequente

a antifúngicos, tratamentos com quimioterápicos, resistência a antifúngicos, desnutrição aguda, dietas ricas em carboidratos, uso de próteses dentárias, doenças crônicas e baixa imunidade (MARSH & MARTIN, 2005; MONTERO ET AL., 2012; MARTINS NETO ET AL., 2005).

2.1.1 Fatores de virulência

Quando ocorre um desequilíbrio entre a microbiota e as leveduras do gênero Candida isso propicia o estabelecimento da candidíase. Este fungo leveduriforme apresenta como principais fatores de virulência, aderência, pleomorfismo, variabilidade fenotípica (“switching”), produção de toxinas e enzimas extracelulares (RIBEIRO et al., 2004)

A capacidade que o micro-organismo tem de aderir à superfície das células do hospedeiro, representa o primeiro estágio de patogênese. A adesão é mediada por proteínas específicas – adesinas – localizadas na parede celular fúngica, bem como por fatores inespecíficos, onde se incluem propriedades físicoquímicas como a hidrofobicidade, forças electrostáticas e de Van der Walls e pontes de hidrogénio (GIOLO & SVIDZINSKI, 2010; SILVA et al., 2012). A hidrofobicidade da superfície da mucosa, a presença de açúcar no meio e formação de tubo germinativo parecem interferir no processo de adesão (MANFREDI et al. 2007).

Espécies desse gênero podem também aderir a superfícies de dispositivos médicos e formar biofilmes. A adesão de *Candida* sp. em dispositivos como o cateter facilita o aparecimento de candidemia e a formação de uma massa de micro-organismos, incluindo *Candida* sp., denominada de biofilmes, que torna o micro-organismo mais resistente aos antifúngicos (CHANDRA et al. 2001, AULER et al. 2009). Os biofilmes podem ser constituídos por células de diferentes morfologias, hifas e células leveduriformes (blastoconídios), exceto os de *C. glabrata*, constituídos apenas por blastoconídios (FINKEL & MITCHELL, 2011; RODRIGUES, SILVA, & HENRIQUES, 2014; SARDI et al., 2013).

A ALS (agglutinine-like sequence) é uma família de oito genes que codificam glicoproteínas (adesinas) que possuem capacidade de adesão à célula hospedeira e a outros micro-organismos, podendo desencadear infecções mistas a sua expressão vai depender, entre outros fatores, da morfologia da espécie fúngica. Foram relatadas em C. tropicalis três proteínas Als, em *C. parapsilosis* cinco proteínas Als e

seis Pga (outras proteínas de membrana) e em C. dubliniensis as adesinas são codificadas por um gene semelhante ao de C. albicans, podendo apresentar diferenças na sua regulação (SILVA et al., 2012; SULLIVAN et al., 2004). Em C. *glabrata* Als não foi relatada, foi identificada uma outra família de genes, genes EPA, codifica as proteínas Epa (epithelial adhesin), principais responsáveis pelo processo de adesão às células epiteliais (BRUNKE & HUBE, 2013; MODRZEWSKA & KURNATOWSKI, 2015).

O pleomorfismo se dá pela capacidade de algumas espécies de *Candida* se alterarem reversível entre a forma leveduriforme (crescimento isotrópico) e a filamentosa, hifa e/ou pseudo-hifa (crescimento apical). Essas transições na morfologia podem ocorrer devido a modificações ambientais como por exemplo, mudança de pH e exposição ao soro sanguíneo (GOW et al., 2012; VYLCOVA et al., 2011; JACOBSEN et al., 2012). Esse mecanismo de virulência aumenta a patogenicidade de algumas espécies de *Candida*, como a C*. albicans, C. tropicalis e C. dubliniensis*, atribuindo-lhes uma maior resistência à fagocitose e facilitando a invasão da célula hospedeira (SARDI et al., 2013; SILVA et al., 2012). Esse pleomorfismo é significativo para a patogenicidade desse gênero, e está envolvido no seu processo de infecção (MAYER et al., 2013).

As espécies C. *albicans*, C. *tropicalis* e C. *dubliniensis* por possuírem capacidades de formação de hifas, apresentam uma maior predileção a adesão e invasão subsequente. Já a virulência de C. *glabrata* não depende da sua morfologia (BRUNKE & HUBE, 2013).

As enzimas hidrolíticas extracelulares constituem o fator de virulência com maior significado na infecção por *Candida* spp.*,* por degradarem a célula hospedeira, o que facilita a colonização e o estabelecimento da infecção (DEORUKHKAR & SAINI, 2013). As enzimas são, aspartil proteinases (Saps), fosfolipases, lipases, e hemolisinas, sendo as proteases e fosfolipases as de maior relevância (DEORUKHKAR et al., 2014b; SARDI et al., 2013; SILVA et al., 2012).

As proteases são enzimas que degradam a queratina, o colagéno e mucina que são proteínas que formam as membranas epitelial e mucosa da célula hospedeira, além disso, degradam também componentes de defesa do sistema imunológico, como as imunoglobulinas, complemento e citoquinas, comprometendo o sistema imune do hospedeiro (DEORUKHKAR et al., 2014b; GIOLO & SVIDZINSKI, 2010; WILLIAMS & LEWIS, 2011).

Segundo estudos *C. albicans* é a espécie com maior atividade proteolítica, embora se tenha verificado em outras espécies como, C. *tropicalis*, C. *glabrata,* C. *guilliermondii*, C. *parapsilosis* e C. *dubliniensis* (DEORUKHKAR & SAINI, 2015a; DEORUKHKAR & SAINI, 2013; SARDI et al., 2013). Na espécie de C. *parapsilosis*, foram identificados 3 genes que codificam Saps (SAPP1-SAPP3), em C. *tropicalis* pelo menos 4 genes que codificam Saps (SAPT1-SAPT4) e em C. *glabrata* um tipo de Sap, não especificado. No caso de C. *dubliniensis,* estão descritos 8 genes que codificam Saps (WHIBLEY & GAFFEN, 2015).

Fosfolipases (PLs) são proteínas que hidrolisam as ligações éster dos fosfolípidos da membrana da célula hospedeira, transformando-os em ácidos graxos, assim expõem os receptores de membrana, facilitando os processos de adesão e invasão, destruindo a célula hospedeira (DEORUKHKAR & SAINI, 2015a; DEORUKHKAR et al., 2014a; SILVA et al., 2012; WILLIAMS & LEWIS, 2011). Foram identificados 7 genes que codificam fosfolipases, PLA, PLB1, PLB2, PLC1, PLC2, PLC3 e PLD1 (SARDI et al., 2013; WILLIAMS & LEWIS, 2011). Dentre as espécies de *C. não albicans* que possuem atividade fosfolipídica estão a *C. parapsilosis, C. glabrata, C. tropicalis* e *C*. *dubliniensis* (DEORUKHKAR & SAINI, 2015a).

As lipases são enzimas que hidrolisam os triacilgliceróis para a obtenção de nutrientes. Estas enzimas favorecem a adesão à célula hospedeira e desencadeiam processos inflamatórios ao afetarem o sistema imunológico (SARDI et al., 2013). A grande maioria das espécies de *C. não albicans* possuem a capacidade de produzir hemolisinas, um fator hemolítico essencial, que culmina com a destruição dos eritrócitos da célula do hospedeiro (RODRIGUES et al., 2014; SARDI et al., 2013; SILVA et al., 2012).

Um outro fator de virulência importante é a capacidade de switch fenotípico entre colónias geneticamente semelhantes, dentre as *C. não albicans* que possuem esse mecanismo está a *C. lusitaniae, C. guilliermondii, C. dubliniensis, C. tropicalis e C. glabrata*, onde se encontram descritos diferentes fenótipos baseados na cor que apresentam em meio de cultura com Sulfato de Cobre (CuSO4) (DEL VALLE, 2015; LASTAUSKIENĖ, CEPUTYTĖ, GIRKONTAITĖ, & ZINKEVICIENĖ, 2015; TSCHERNER, SCHWARZMULLER, & KUCHLER, 2011).

2.1.2 *Candida glabrata*

A *Candida glabrata* surge como um importante patógeno hospitalar, constituindo-se na segunda ou terceira espécie mais comum na maioria das candidiases, está associada a candidemias e infecções em pacientes imunocomprometidos. C. *glabrata* é de especial importância porque apresenta resistência natural ao fluconazol, mas não apresenta a capacidade de formação de hifas, responsável pela invasão tecidual. A produção de proteínas relacionadas à adesão celular é pouco estudada nessa espécie. Outro aspecto interessante sobre a epidemiologia deste patógeno é sua maior ocorrência em pacientes idosos. (FIDEL JR ET AL., 1999; BARBEDO & SGARBI, 2010).

2.1.3 *Candida parapsilosis*

A *Candida parapsilosis* é uma espécie de micro-organismo que pode ser isolada de mucosas, pele e unhas de seres humanos e são pertencentes a microbiota, observada mais frequentemente em crianças e recém-nascidos prematuros internados em unidades de terapia intensiva. O aumento desse micro-organismo como agente etiológico de candidemia está envolvido com a hospitalização prolongada e baixa do sistema imunológico dos pacientes. Infecções por C. *parapsilosis* estão associadas com manifestações clínicas como fungemia, endocardite, peritonite e artrite (BARBEDO & SGARBI, 2010). Prolifera-se em soluções contendo glicose, tem grande capacidade de produzir biofilme, secreção de proteases extracelulares e resistência a fármacos conhecidos. Como fatores de virulência, a C. *parapsilosis* apresenta produção de proteinases e fosfolipases e formação de pseudohifa, porem, de uma forma menos virulenta que C. *albicans* (BARBEDO & SGARBI, 2010; COLOMBO & GUIMARÃES, 2003).

2.1.4 *Candida tropicalis*

A *Candida tropicalis* tem sido relatada como o segundo ou terceiro agente etiológico mais comum de candidemia em pacientes com neoplasias, sendo sua frequência maior em leucemias (COLOMBO & GUIMARÃES, 2003). Essa levedura possui alta virulência e característica de baixa susceptibilidade a antifúngicos azólicos. Na Índia, C. *tropicalis* é a principal causa de candidemia hospitalar, fato evidenciado pelo uso extensivo de antifúngicos para medidas profiláticas

(KOTHAVADE et al. 2010; BARBEDO & SGARBI, 2010). Estudos mostram que a C. *tropicalis* é ainda mais invasiva do que a C. *albicans,* em intestino humano. (KOTHAVADE et al., 2010).

2.1.5 *Candida krusei*

A *Candida krusei* apresenta células em formato mais alongado que outras espécies de *Candida* spp., encontrada na forma de leveduras e pseudohifas, tem-se mostrado como um patógeno hospitalar ocasional, particularmente, em pacientes portadores de doenças hematológicas malignas e/ou submetidos a transplante de medula óssea (BARBEDO & SGARBI, 2010, COLOMBO & GUIMARÃES, 2003). Essa espécie de levedura já foi isolada de muitos ambientes naturais, sendo amplamente distribuída na natureza, mas pode ser encontrada em mucosas animais, sendo pouco encontrada em indivíduos saudáveis. Como fator de virulência, tem capacidade de se apresentar como pseudohifa, mas de uma forma menos agressiva do que a C. *albicans* (BARBEDO & SGARBI, 2010).

2.1.6 *Candida guilliermondii*

A *Candida guilliermondii* é raramente relatada em casos de infecções fúngicas, mesmo em indivíduos imunocomprometidos. É uma levedura que apresenta baixa virulência, mas ficou evidenciada por ter apresentado resistência á antifúngicos conhecidos no mercado (PASQUALETTO ET AL., 2006; BARBEDO & SGARBI, 2010).

2.2 Terapias com antifúngicos

No tratamento de candidiase superficiais são utilizados, geralmente, antifúngicos tópicos e para as invasivas são utilizados os sistemicos. (PEIXOTO et al., 2014; SARDI et al., 2013). Esses antifúngicos são divididos entre classes e os mais utilizados são os azóis, polienos e equinocandinas.

Os azóis formam a maior classe de fármacos antifúngicos. (PAPPAS et al., 2015). Os mais utilizados no tratamento das candidíase invasivas são os triazóis (fluconazol, voriconazol, itraconazol e posaconazol). Estes atuam Inibindo a atividade da enzima lanosterol 14-α- desmetilase responsável pela biossíntese de ergosterol no retículo endoplasmático da célula fúngica, levando à acumulação de um esterol tóxico (14-α-metil-3,6-diol) e à perda da integridade da membrana.

(DEORUKHKAR & SAINI, 2015A; SPAMPINATO & LEONARDI, 2013; VERMES, GUCHELAAR, & DANKERT, 2000). Normalmente, atuam como fungistáticos, estando mais propensos a resistências (ALCAZAR-FUOLI & MELLADO, 2014; MENDES, 2012).

Os polienos são a nistatina, utilizada topicamente em algumas formas cutâneas, e a anfotericina B, essa tem sua utilização limitada devido à efeitos toxicos. (NEUMANN, BAGINSKI, WINCZEWSKI, & CZUB, 2013; PEIXOTO et al., 2014; DERAY, 2002). A anfotericina B atua ligando-se ao ergosterol e interferindo os poros transmembranares (formação de poros aquosos), perturbando o fluxo de iões e aumentando a permeabilidade da membrana, causando morte celular fúngica por perda dos seus componentes. (DEORUKHKAR & SAINI, 2015A; SPAMPINATO & LEONARDI, 2013; VERMES, GUCHELAAR, & DANKERT, 2000).

As equinocandinas é classe mais recente, formada por, caspofungina, icafungina e anidulafungina (PARAMYTHIOTOU et al., 2014). Atuam por Inibição não-competitiva da enzima 1,3-β-D-glucano sintetase, o que inibe a síntese de 1,3-β-D-glucano e afecta a integridade da parede celular fúngica, que se traduz numa maior vulnerabilidade à ocorrência de lise osmótica. (DEORUKHKAR & SAINI, 2015a; SPAMPINATO & LEONARDI, 2013; VERMES, GUCHELAAR, & DANKERT, 2000). Mesmo possuindo um elevado custo, o espectro de atividade e o excelente perfil de segurança faz desta classe uma primeira opção no tratamento de candidíases invasivas (MENDES, 2012; PARAMYTHIOTOU et al., 2014).

A resistência aos medicamentos antifúngicos vem se tornando cada vez mais um problema de saúde pública mundial, isso pelo aumento drástico na incidência de infecções fúngicas oportunistas e sistêmicas. A resistência é classificada em primária e secundaria, sendo considerada primaria quando o micro-organismo é resistente ao fármaco antes da exposição, e secundária quando a resistência se desenvolve em resposta a exposição do micro-organismo ao fármaco (JABRA RIZK et al., 2004).

Leveduras do gênero Candida tem sido descritas na literatura por serem resistentes a diversas drogas antifúngicas (JABRA RIZK et al., 2004). As principais classes de antifúngicos para o tratamento de infecções por *Candida* spp. são os poliênicos (nistatina e anfotericina B), que atuam na membrana celular fúngica; azóis (miconazol, fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol, cetoconazol) que atuam na enzima associada a biossíntese do ergosterol componente da membrana

celular fúngica e equinocandinas (caspofungina, micafungina e anidulafungina que agem na enzima b-1,3-D-glucano sintase da parede celular fúngica (MARSH & MARTIN, 2005; RODRIGUES *et al*., 2014; MAUBON *et al*., 2014).

Os fármacos mais frequentemente empregados para tratamento das infecções causadas por *Candida são* o fluconazol, voriconazol, itraconazol e anfotericina B. Mesmo com uma ampla variedade de medicamentos antifúngicos disponíveis no mercado, a literatura cita que grande parte desses medicamentos podem já não serem eficazes no combate as infecções causadas por *Candida* spp. devido ao aumento drástico do uso nas últimas décadas. (COSTA et al. 2004, GUALCO et al. 2007).

A resistência aos derivados azólicos se dá principalmente pela imunossupressão dos pacientes, uso prolongado do agente antifúngico, uso de outras substâncias quimioterápicas e resistência intrínseca de espécies de *Candida não albicans* (LATTIF et al. 2004). Em pacientes HIV positivo, o uso frequente de terapia antifúngica em decorrência de constantes recidivas de candidíase bucal ou esofágica, é o fator que provavelmente tenha maior influência na ocorrência de resistência ao fluconazol. C. *glabrata* e C. *krusei* tem se mostrado comumente resistentes ao fluconazol (TAYLOR et al. 2000, COLOMBO et al. 2002).

A resistência a anfotericina B pode ocorrer devido a uma alteração dos lipídios na membrana celular do fungo, sendo que o ergosterol dá lugar à formação de outros lipídios (SANGLARD 2002). Apesar de poucos relatos de resistência dos isolados a este fármaco, seu uso tem sido limitado devido aos graves efeitos colaterais como os nefrotóxicos.

2.3 Produtos naturais

A utilização das plantas como recurso terapêutico no tratamento de doenças é conhecida milenarmente por muitas civilizações, tendo seu uso descrito por praticamente todos os povos que se têm relatos desde os tempos mais remotos. Devido a essa utilização das plantas medicinais na cura ou prevenção de doenças, o cultivo dessas tornou-se uma alternativa cada vez mais importante aos produtos sintéticos (REIS & MARIOT, 2001).

Umas das principais fontes dos fármacos, atualmente, são os produtos biologicamente ativos das plantas, dentre as quais as aromáticas que são bastante estudadas devido aos seus interesses terapêuticos e benefícios. Esses benefícios

dependem dos seus princípios ativos. Constituem uma importante fonte de novos compostos biologicamente ativos e podem ser utilizadas como uma nova possibilidade de intervenção terapêutica (DEL CASTILLO et al, 2004).

As potencialidades do uso das plantas medicinais encontram-se longe de estarem esgotadas, e nessa perspectiva se faz necessarios mais estudos. Portanto, o estudo apropriado da química e farmacologia de plantas medicinais se apresenta como um instrumento relevante de investigação de suas propriedades, novos conhecimentos e novas necessidades certamente encontrarão soluções no reino vegetal, seja através da descoberta e desenvolvimento de novas moléculas com atividade terapêutica, ou com aplicações na tecnologia farmacêutica, ou no desenvolvimento de fitoterápicos com maior eficiência (SCHENKEL et al, 2001; SAAD, 2010).

2.1.7 Mentha spicata

Dentre as plantas mais exploradas na produção de compostos bioativos, destacam-se as do gênero *Mentha* L.*,* da família Lamiaceae que compreende aproximadamente 30 espécies de plantas (LORENZI & MATOS, 2002), algumas dessas espécies tem se destacado e ganhado grande interesse da indústria farmacêutica, alimentícia, cosmética e medicinal, devido a seus metabolitos. (DESCHAMPS et al., 2008; LORENZI & MATOS, 2002). De origem europeia, a Índia produz cerca de 80% do total de óleo de menta, embora oito espécies desse gênero sejam cultivadas na Índia, apenas três (*Mentha arvensis* L., *Mentha piperita* L. e *Mentha spicata* L.) foram aprovadas pela *International Standard Organization* (ISO). Esse gênero apresenta dificuldades para a sua classificação devido à grande variabilidade em suas características morfológicas. (FERREIRA, 2008).

Os constituintes químicos encontrados no óleo essencial de *Mentha* spp. variam de acordo com diversos fatores como a idade da planta, espécie, região geográfica, clima, temperatura, disponibilidade de nutrientes e incidência de raios UV. Os principais compostos identificados, presentes no óleo essencial de Mentha spp. são, mentol, mentona, isomentona, 1,8 cineol (eucaliptol), acetato de metila, mentil, mentofurano, limoneno, β-mirceno, β-cariofileno, pulegona e carvona (MKADDEM et al., 2009; SAHARKHIZ et al., 2012; DURU et al., 2004).

Mentha spicata é uma planta aromática, comestível e medicinal. É uma rizomatosa rastejante, erva perene glabra e com um forte odor aromático. É

conhecida popularmente como hortelã peluda, hortelã rateiro, hortelã vilhoça ou hortelã verde. É um hibrido entre M. *sylvestris* e M. *suavealens*. A carvona e o limoneno são os principais constituintes químicos do óleo essencial (GOVINDARAJAN et al. 2012, MIKADDEM, 2009, FERREIRA, 2008).

Na medicina popular é muito utilizada no tratamento de problemas respiratórias, como calmante, como estimulante gástrico, antiflatulento, antigripal e vermifurgo. Outras propriedades são as de antisséptico, antiespasmódica, adstringente, carminativa, descongestionante, digestivo, diurético e pode ser utilizada como aromatizante. Utilizada em perfumes confeitarias, temperos, em gomas de mascar, bombons, pastas dentais, creme de barbear, não só pelas suas características aromatizantes, como também pelas suas propriedades bactericida e antisséptica. (FERREIRA, 2008).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliação da atividade antifúngica do óleo essencial de *Mentha spicata* l. sobre cepas de *Candida não albicans*

3.2 Específicos

- ✓ Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e fungicida mínima (CFM) do óleo essencial de *Mentha spicata L*. sobre as cepas de *Candida não albicans*.
- ✓ Verificar a concentração inibitória mínima (CIM) dos antifúngicos licenciados sobre as cepas de *Candida não albicans*.

4. METODOLOGIA

4.1 Tipo de estudo

Trata-se de uma pesquisa experimental, exploratória, transversal, de natureza aplicada, pautada na abordagem quantitativa. A fundamentação teórica construída com argumentos bibliográficos por artigos, livros, monografias, dissertações de mestrado e doutorado.

4.2 Local da pesquisa

O trabalho foi realizado no Laboratório de Micologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas, do Centro de Ciências da Saúde (CCS), da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

4.3 Óleo essencial

O óleo essencial de *Mentha spicata L*. foi adquirido na Empresa Ferquima Indústria e Comércio Ltda. (Vargem Grande Paulista, São Paulo, Brasil).

4.4 Antifúngicos licenciados

Os produtos utilizados na execução das metodologias foram adquiridos da Sigma-Aldrich®. Os fármacos de escolha foram anfotericina B e fluconazol comumente utilizados como produtos de escolha para o tratamento de infecções por *Candida* spp. As soluções foram preparadas no momento de execução dos testes.

4.5 Micro-organismos

Foram utilizadas nove espécies de *Candida: C. glabrata* ATCC 90030, LM 512, LM 221; *C. krusie* ATCC 6258, LM 656, LM 802; *C. tropicalis* LM 802, LM 713 e *C. guilliermondii* LM 752, LM 420, do acervo do Laboratório de Micologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba.

4.6 Meios de cultura

Os meios de cultura utilizados nos ensaios para avaliação da atividade antifúngica foram o meio sólido ágar batata (AB) e o meio líquido RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute*) adquiridos da Difco®, preparado de acordo com as instruções do fabricante. Os meios foram solubilizados com água destilada e esterilizados em autoclave, a 121°C por 15 minutos.

4.7 Avaliação das atividades antifúngicas *in vitro*

4.7.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da CIM do óleo essencial foi realizada pela técnica de microdiluição, utilizando placas contendo 96 cavidades com fundo em forma de “U” e em duplicata (CLEELAND & SQUIRES, 1991; HADACEK; GREGER, 2000; SAHIN et al., 2004; MOREIRA et al., 2010). Em cada orifício da placa, foi adicionado 100 µL do meio líquido RPMI 1640 duplamente concentrado. Posteriormente, 100 µL da solução dos produtos, também duplamente concentrado, foram dispensados nas cavidades da primeira linha da placa. E por meio de uma diluição seriada a uma razão de dois, foram obtidas concentrações de 1024 µg/mL até 16 µg/mL, de modo que na primeira linha da placa se encontrou a maior concentração e na última, a menor concentração. Por fim, foi adicionado 10 µL do inóculo das espécies nas cavidades, onde cada coluna da placa refere-se a uma cepa fúngica, especificamente.

Um controle de micro-organismo foi realizado colocando-se nas cavidades 100 µL do mesmo RPMI duplamente concentrado, 100 µL de água destilada estéril e 10 µL do inóculo de cada espécie. Um controle de esterilidade foi realizado, onde colocou-se 100 µL do RPMI em um orifício sem a suspensão dos fungos. As placas foram seladas e incubadas a 25-28°C por 24-48 horas para ser realizada a leitura. Paralelamente, foi realizado o mesmo experimento com o antifúngico anfotericina B e o fluconazol, o qual foi testado nas mesmas concentrações dos produtos.

Define-se a CIM para os produtos testados como a menor concentração capaz de inibir visualmente o crescimento fúngico verificado nos orifícios, quando comparado com o crescimento controle. Os ensaios foram realizados em duplicata e o resultado expresso pela média aritmética das CIM’s obtidas nos dois ensaios.

4.7.2 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)

A concentração fungicida mínima (CFM) do óleo essencial de *Mentha spicata* também foi determinada para as dez cepas de *C. não albicans*. Após a leitura da CIM em 48 horas, alíquotas de 20 µL foram retiradas de cada poço da placa de microdiluição que não apresentaram crescimento fúngico, e transferidas para poços de uma nova placa de microdiluição contendo 100 µL de RPMI, desprovidas de qualquer antifúngico. As placas inoculadas foram assepticamente fechadas e incubadas a 35 °C, e as CFMs foram registradas após 48 h. A CFM foi definida como a menor concentração dos óleos essenciais que resultou em inibição visível do crescimento do micro-organismo (PEREIRA, 2011).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como citado anteriormente, aumento da candidíase está se tornando cada vez mais frequente, dificultando o tratamento de tais infecções devido à susceptibilidade de *Candida spp*. a alguns antifúngicos. O surgimento e disseminação de micro-organismos resistentes a agentes antifúngicos convencionais, (TSANG et al., 2012; LEWIS, 2013) incentivou a busca por novas alternativas ao tratamento de tais infecções (SAHARKHIZ et al., 2012; BONI; FEIRIA; HOFLING, 2017).

Para a determinação da CIM e CFM do óleo essencial testado e os respectivos antifúngicos licenciados foi utilizado o método de microdiluição pois este se desenvolve de um modo simples, econômico, rápido de avaliar, possui grande reprodutibilidade, sendo mais sensível que outros métodos utilizados, e requer pequena quantidade de amostra e meios de cultura (SCORZONI et al., 2007, OSTROSKY et al., 2008). Os resultados obtidos da CIM e CFM encontram-se representados na tabela 1.

Segundo Sartoratto e colaboradores (2004), produtos com CIM entre 50 e 500 µg/mL apresentam forte atividade antifúngica, entre 600 e 1500 µg/mL moderada atividade antifúngica, e acima de 1500 µg/mL fraca atividade antifúngica.

Os resultados mostraram que o óleo essencial de *M. spicata* apresentou uma CIM de 512 µg/mL, em 70% das cepas estudadas, sendo a mais sensível a cepa ATCC 90030 (*C. glabrata*), que apresentou uma CIM de 256 µg/mL e as mais resistentes as cepas LM 512 e LM 221 (*C. glabrata*), que apresentaram uma CIM maior 512 µg/mL. Os dois antifúngicos comerciais testados apresentaram os seguintes resultados: a anfotericina B uma CIM de 0,5 µg/mL, para 80% das cepas testadas e as mais resistentes as cepas LM 802 e LM 713 *(C. krusie* e *C. tropicalis*, respectivamente), que apresentaram uma CIM maior que 8µg/mL. Já o fluconazol apresentou uma CIM de 1µg/mL para 50% das cepas testadas e uma CIM maior que 16 µg/mL para as outras 50%.

De acordo com a classificação de Sartoratto, o óleo essencial de *Mentha spicata* apresentou uma moderada atividade antifúngica frente às cepas de *C. krusie, C. tropicalis e C. guilliermondie*, entretanto, das três cepas de *C. glabrata* testadas, duas (LM 512 e LM 221) apresentaram moderada ou fraca atividade, mas a cepa ATCC 90030 demostrou uma forte atividade antifúngica.

Tabela 1. Efeito do Oléo essencial CIM da anfotericina B e fluconazol em cepas de *Candida não albicans.* CIM; CFM ; CFM:CIM;

Leveduras	Óleo Essencial de *Mentha spicata*				AnfB (µg/mL)	Fluc. (µg/mL)	Controle das cepas
	CIM	CFM	CFM:CIM	Efeito	CIM	CIM	
C. glabrata							
ATCC 90030	256	8192	1:32	FGT	0,5	1,0	+
LM 512	1024	8192	1:16	FGT	0,5	1,0	+
LM 221	1024	8192	1:16	FGT	0,5	1,0	+
C. krusei							
ATCC 6258	512	8192	1:16	FGT	0,5	≥16	+
LM 656	512	8192	1:16	FGT	0,5	≥16	+
LM 802	512	8192	1:16	FGT	≥8,0	≥16	+
C. tropicalis							
LM 802	512	8192	1:16	FGT	0,5	1,0	+
LM 713	512	8192	1:16	FGT	≥8,0	≥16	+
C. guilliermondii							
LM 752	512	8192	1:16	FGT	0,5	1,0	+
LM 420	512	8192	1:16	FGT	0,5	≥16	+

Legenda: CIM, concentração inibitória mínima; CFM, concentração fungicida mínima; AnfB, anfotericina B; Fluc, fluconazol; FGT: fungistático;+: crescimento fúngico em RPMI-1640; DMSO (5%), e Tween 80 (2%), sem antifúngicos ou óleo essencial**.**

Hafidh et al. (2011), a razão entre CFM/CIM, quando apresentam valores de 1 ou 2, indicam que o efeito antifúngico de compostos naturais é fungicida e maior que 2 é fungistático. Neste estudo todas as cepas demostraram uma concentração fungicida mínima (CFM) de 8192 µg/mL. Portanto, todas as cepas apresentaram uma razão CFM/CIM maior que dois, determinando assim um efeito prevalecente fungistático.

Estudos anteriores demonstraram que o óleo essencial de *Mentha spp.* possui uma moderada atividade antifúngica (ALIGIANIS et al. (2001); MOSCATO, 2016), resultados que corroboram com os achados deste trabalho.

Segundo Yigit et al. (2008), cepas padrões (ATCC) de *Candida glabrata* e *Candida tropicalis* também apresentaram resistência a óleos essenciais de *Mentha* testados (FEIRIA, 2015), provavelmente, a discordância entre os entre os estudos,

pode ser atribuída aos diferentes modos de extração e tipos da planta , à variação natural da composição dos óleos essenciais, metodologias de CIM e sensibilidades das cepas de *Candida*.

Os constituintes químicos majoritários determinam as propriedades biológicas dos óleos essenciais, Hussain e colaboradores (2010) reconheceram a carvona (63,24%) e o limoneno (9,09%) como os componentes predominates no óleo de *M. spicata* (MOSCATO et al. 2016).

Samber e colaboradores (2015) relataram que a carvona e a mentona apresentaram atividade antimicótica contra *C. glabrata e C. tropicalis*. Além disso, no mesmo estudo, observou-se que, quando incubados com as cepas, estes compostos inibiram 100% a biossíntese de ergosterol, o principal componente da membrana de células fúngicas responsável pela integridade e manutenção da função celular fúngica. (BONI; FEIRIA; HOFLING, 2017). Nossos dados corroboram com este estudo, pois, tanto as cepas de *C. glabrata* como as de *C. tropicalis* apresentaram alguma atividade antimicótica, ressaltando que o óleo em estudo apresentou uma forte atividade antifúngica sobre a cepa *C. glabrata* ATCC 90030.

Um dos principais antifúngicos utilizados para o tratamento de infecções por *Candida* spp. é o fluconazol (MARSH & MARTIN, 2005; RODRIGUES et al., 2014; MAUBON et al., 2014). E sabe-se que essas leveduras têm desenvolvido cada vez mais resistência a várias drogas existentes no mercado, entre elas o fluconazol, pois estudos mostram que a sua eficácia está cada vez mais comprometida, especialmente em pacientes com AIDS, uma vez que o uso prolongado deste antifúngico leva à resistência (SANGLARD, 2003). Sendo assim, o fluconazol foi uma das drogas de escolha para esta metodologia. Os resultados revelaram sensibilidade para as três cepas de *C. glabrata* (ATCC 90030, LM 512 e LM 221), uma cepa de *C. tropicalis* (LM 802) e uma cepa de *C. guilliermondie* (LM 752). Para as demais cepas testadas, fluconazol apresentou resistência à cepa de *C. tropicalis* (LM 713), à cepa de *C. guilliermondie* (LM 420) e às três cepas de *C. krusie* (ATCC 6258, LM 656 e LM 802), como já é descrito na literatura que esta levedura apresenta uma resistência intrínseca ao fluconazol (TAN et al., 2008).

Os resultados obtidos no presente estudo, demonstraram que 50% das cepas testadas não se mostraram sensíveis ao Fluconazol. Esses resultados corroboram com Ramesh e colaboradores (2010) os quais mostraram também, que cepas de *Candida spp.* isoladas de infecções em pacientes HIV positivos apresentaram

resistência ao Fluconazol. Outros estudos também mostraram resistência natural espécies de *Candida Krusei* e de *Candida glabrata* ao fluconazol (SINGH-BABAK et al., 2012, BONI; FEIRIA; HOFLING, 2017). No nosso estudo, todas as cepas testadas de *Candida glabrata* se mostraram sensiveis a este antifúngico, essa divergência, possivelmente, é devido a sensibilidade das cepas.

Um outro antifúngico muito utilizado nos tratamentos de infecções fúngicas é a anfotericina B (FRAMIL, 2012), segunda droga de escolha para a metodologia desta pesquisa. Dentre as cepas testadas 80% apresentaram sensibilidade, porém, uma cepa de *C. krusie* (LM 802) e uma cepa de *C. tropicalis* (LM 713) demonstraram resistência. Já existem relatos que *C. tropicalis* é resistente a anfotericina B e a maioria dos triazólicos (CASTRO et al., 2006) Os dados deste estudo demonstram que uma das duas cepas testadas de *C. tropicalis* apresentou resistência a este antifúngico, assemelhando-se a relatos da literatura (PFALLER et al., 2014).

Em 2008, um estudo realizado por Yang e colaboradores, com um total de 964 isolados de *Candida* coletados em Taiwan, onde os autores observaram que 16 dos 17 isolados anfotericina B - resistentes pertenciam a espécies de *Candida não albicans.* E além disso, estudos realizados por Filippin e Souza (2006) relataram que Anfotericina B está associada ao desenvolvimento de nefrotoxicidade, o que é um agravante para os pacientes imunocomprometidos acometidos pela infecção. Evidenciando assim a importância de se estudar mais o uso de óleos essenciais enquanto agentes antifúngicos.

6. CONCLUSÃO

O óleo essencial *Mentha spicata* demonstrou uma CIM 512 µg/mL frente a 70% das cepas de *Candida não albicans* testadas, com efeitos bacteriostáticos observados. No entanto tendo CIM inferior aos antifúngicos licenciados testados.

Os resultados obtidos se mostraram interessantes, já que o oléo de *Mentha spicata* revelou atividade antifúngica para cepas testadas e ainda apresentou uma sensibilidade para as quais os antifúngicos fluconazol e anfotericina B não apresentaram, sugerindo o mesmo como possível fonte para novos medicamentos.

Logo, os resultados do presente estudo são muito encorajadores e indicam que este óleo deve ser estudado mais extensivamente para explorar seu potencial no tratamento de doenças infecciosas, principalmente a partir do estudo dos seus constituintes químicos.

REFERÊNCIAS

ABRANTES, MR. Avaliação da atividade biológica de óleos essenciais sobre *Candida não albicans* de origem clínica. -- Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal-RN. 2013.

ALCAZAR-FUOLI, L.; MELLADO, E. Current status of antifungal resistance and its impact on clinical practice. **British Journal of Haematology.** p. 471–484. 2014.

ALIGIANS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINOU, I. B.Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two Origanum species. Journal of Agricultural and Food Chemistry. v.49, p. 4168-4170. 2001

ALVARES, C. A.; SVIDZINSKI, T. I. E.; CONSOLARO, M. E. L. Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. J Bras Patol Med Lab., Rio de Janeiro, v. 43, p. 319-327, out. 2007.

ARUMUGAM P.; PRIYA N.G.; SUBATHRA M.; RAMESH A. Anti-inflammatory activity of four solvent fractions of ethanol extract of *Mentha spicata* investigated on acute and chronic inflammation induced rats. Environmental Toxicology and Pharmacology. v. 26, p. 92-95. 2008.

AULER M. E.; MORREIRA D.; RODRIGUES F. F. O.; ABRÃO M. S.; MARGARIDO P. F. R.; MATSUMOTO F. E.; SILVA E. G.; SILVA B. C. M.; SCHNEIDEER R. P.; PAULA C. R. Biofilm formation on intrauterine devices in patients with recurrent vulvovaginal candidiasis. Medical Mycology p. 1-6. 2009.

AVRELLA, D.; GOULART, L. S. Isolamento de Candida spp. da mucosa oral de pacientes submetidos ao tratamento quimioterápico. RBAC, v. 40, p. 205-207. 2008.

BARBEDO, L. S.; SGARBI, D. L. S. Candidíase. DST – J Bras Doenças Sex Transm., v. 22, p. 22-38. 2010.

BHAWNA, S.; SANGEETA, D.; UDAYAN, G. Vulvovaginal candidiasis in women of reproductive age group: importance of proper diagnosis and alarm for emerging non-albicans Candida among candidal vulvovaginitis cases. International Journal of Recent Scientific Research, v. 6, p. 7561–7564. 2015.

BONI, G. C.; FEIRIA, S. N. B. de; HOFLING, J. F. Purified bioactive compounds from Mentha spp. oils as a source of Candidosis treatment. A brief review. **Revista Fitos Eletrônica**. 2017.

BRUNKE, S.; HUBE, B. Two unlike cousins: Candida albicans and C. glabrata infection strategies. Cellular Microbiology, v. 5, p. 701–708. 2013.

CASTRO, C.E.; RIBEIRO, J.M.; DINIZ, T.T.; ALMEIDA, A.C.; FERREIRA, L.C.; MARTINS, E.R.; DUARTE, E.R. Antimicrobial activity of Lippia sidoides Cham. (Verbenaceae) essential oil against Staphylococcus aureus and Escherichia coli. **Rev. Bras. Pl. Med**. V. 13. P. 293-297. 2011.

CASTRO, T. L.; COUTINHO, H. D. M.; GEDEON, C. C.; SANTOS, J. M.; SANTANA, W. J.; SOUZA, L. B. S. Mecanismos de resistência da *Candida* sp. a antifúngicos. **Revista Infarma**. v. 18, p. 30- 34, 2006.

CHANDRA, J.; KUHN, D.M.; MUKHERJEE, P. K.; HOYER, L. L.; MCCORMICK, T.; GHANNOUM, M. A. Biofilm formation by the fungal pathogen Candida albicans: development, architecture, and drug resistance. Journal of Bacteriology. v. 183. p. 5385-5394. 2001.

COLOMBO, A.L.; MATTA. D.; ALMEIDA, L.P.; ROSAS, R. Fluconazole susceptibility of Brazilian Candida isolates assessed by a disk diffusion method. J Infect Dis v. 6. p. 118-123. 2002.

COSTA, M.; PASSOS, X.S.; MIRANDA, A.T.B.; ARAÚJO, R.S.C.; PAULA, C.R.; SILVA, M.R.R. Correlation of in vitro itraconazole and fluconazole susceptibility with clinical outcome for patients with vulvovaginal candidiasis. Mycophatol v.157. p. 43-47. 2004.

COUTO, E.M.P. Candidíase em neonatos: uma revisão epidemiológica. Ensaios e Ciência. Ciências Biológicas, Agrária e da Saúde v.15. p.197-213.2011.

DAGDEVIREN, M.; CERIKCIOGLU, N.; KARAVUS, M. Acid proteinase, phospholipase and adherence properties of Candida parapsilosis strains isolated from clinical species of hospitalised patients. Mycoses v.48. p. 321-326. 2005.

DEL CASTILLO, M. L. R.; BLANCH, G. P.; HERRAIZ, M. Natural variability of enatiomeric composition of bioactive chiral terpenes in Mentha piperita. Journal of Chromatography A, 2004.

DEL VALLE, G. M. M. Candida glabrata: an emerging pathogen. Biociencias, v.1.p. 89–102. 2015.

DEORUKHKAR, S. C.; SAINI, S. Non albicans Candida species : A review of epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **Pravara Medical Review,** v. 7 p. 7–15. 2015a.

DEORUKHKAR, S. C., & SAINI, S. Virulence factors attributed to pathogenicity of non albicans Candida species isolated from Human Immunodeficiency virus infected patients with oropharyngeal candidiasis. Annals of Pathology and Laboratory Medicine,v. 2. P. A62–A66. 2015b.

DEORUKHKAR, S.; SAINI, S. Non albicans Candida species: its isolation pattern, species distribution, virulence factors and antifungal susceptibility profile. International Journal of Medical Science and Public Health, v. 2. P. 533–538. 2013.

DERAY, G. Amphotericin B nephrotoxicity. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. P. 37–41. 2002.

DESCHAMPS, C.; ZANATTA, J.L.; BIZZO, H.R.; OLIVEIRA, M.C.; ROSWALKA, L.C. Seasonal evaluation of essential oil yield of mint species. **Ciênc e Agrotecnologia**. v. 3. p. 725–30. 2008.

DURU, M.E.; OZTURK, M.; UGUR, A.; CEYLAN, O. The constituents of essential oil and in vitro antimicrobial activity of Micromeria cilicica from Turkey. J Ethnopharmacol.V. 94. P.43-8. 2004.

FEIRIA, S. N. B. Avaliação do efeito antifúngico e inibição de fatores morfológicos em Candida spp. por espécies de Mentha- tese de doutorado – Piracicaba, SP. 2015.

FERREIRA, PC. Caracterização química e morfológica de genótipos de Mentha spp. Dissertação de mestrado em Ciências Agrárias. Brasília / DF. UNB - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária. 2008.

FILIPPIN, F.B.; SOUZA, L.C. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. Rev. Bras. Ciências farmacêuticas. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, vol. 42.2006.

FINKEL, J. S.; MITCHELL, A. P. Genetic control of Candida albicans biofilm development. **Nature Reviews Microbiology**. V.9. P.109–118. 2011.

GIOLO, M. P.; SVIDZINSKI, T. I. E. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial. V.46 p.225–234. 2010

GOVINDARAJAN, M.; RAJESWARL, M.; YOGALASKSHML, K. (2012). Chemical composition and larvicidal activy of essential oil ftom Mentha spicata (Linn.) against three mosquito species. **Parasitol Res**. V.110. p. 2023-2032. 2012.

GOW, N.A.; HUBE, B. Importance of the Candida albicans cell wall during commensalism and infection. Current Opinion in Microbiol. V.15. P. 406-12. 2012.

GUALCO, L.; DEBBIA, E.A.; BANDETTINI, R.; PESCETTO, L.; CAVALLERO, A.; OSSI, M.C.; SCHITO, A.M.; MARCHESE, A. Antifungal resistance in Candida spp isolated in Italy between 2002 and 2005 from children and adults. International Journal of Antimicrobial Agents. V. 29 p.179-184. 2007.

GUARRO, J.; GENE, J.; STCHIGEL, A. M. Developments in fungal taxonomy. **Clin Microbiol Rev. V.** 12. P. 454-500. 1999.

GUERRA-BOONE L, ÁLVAREZ-ROMÁN R, SALAZAR-ARANDA R, TORRES-CIRIO A, MAYELA V, RIVAS-GALINDO, WAKSMAN NT, GONZÁLEZ GMG, PÉREZ-LÓPEZ LA. Chemical compositions and antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils from Magnolia grandiflora, Chrysactinia mexicana, and Schinus molle found in Northeast Mexico. **Natural Product Communications**. P.8. v. 135-138. 2013.

HAFIDH, R. R. et al. Inhibition of growth of highly resistant bacterial and fungal pathogens by a natural product. **Current Opinion in Mibrobiology**. v. 5, p. 96- 106, 2011.

HOOG, G. S.; GUARRO, J.; GENE, J.; FIGUERAS, M.J. Atlas clinic fungi. Virgili: lenteal bureau voor clhinmel cultures. 2011.

HUSSAIN, A.I.; ANWAR, F.; SHAHID, M.; ASHRAF, M.; PRZYBYLSKI, R. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of spearmint (*Mentha spicata)* from Pakistan. **J Essent Oil Res** v.22. p.78-84. 2010.

JABRA-RIZK, M.A.; FALKLER, W.A.; MEILLER, T.F. Fungal biofilms and drug resistance. Emerging Infectious Diseases. 2004.

JACOBSEN, I.D.; WILSON, D.; WACHTLER. B.; BRUNKE, S.; NAGLIK, J,R.; HUBE, B. *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target. **Expert Rev Anti Infect Ther.** V.10. p.85– 93. 2012.

JALILZADEH, A.; MAHAM, M. Antidiarrheal activity and acute oral toxicity of Mentha longifolia L. essential oil. Avicenna J Phytomed. V. 5 p.128-137.2015.

KHAN, M.S.; MALIK, A.; AHMAD, I. Anti-candidal activity of essential oils alone and in combination with amphotericin B or fluconazole against multi-drug resistant isolates of *Candida albicans*. Med Mycol.v. 50. P. 33-42. 2012.

KOŁACZKOWSKA, A.; KOŁACZKOWSKI, M. Drug resistance mechanisms and their regulation in *non-albicans Candida* species. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. v.71 p.1–13. 2016.

KOTHAVADE, R.J.; KURA, M.M.; VALAND, A.G.; PANTHAKI, M.H. *Candida tropicalis;* its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole Journal of Medical Microbiology. V.8. p.873-880. 2010.

LASTAUSKIENĖ, E.; CEPUTYTE, J.; GIRKONTAITĖ, I.; ZINKEVICIENĖ, A. Phenotypic switching of *Candida guilliermondii* is associated with pseudohyphae formation and antifungal resistance. Mycopathologia. V.179.p.205–211. 2015.

LATTIF, A.B.; BANERJEE, U.; PRASAD, R.; BISWAS, A.; WIG, N.; SHARMA, N.; HAQUE, A.; GUPTA, N.; BAQUER, N.Z.; MUKHOPADHYAY, G. Susceptibility pattern and molecular type of species-specific *Candida* in oropharyngeal lesions of Indian human immunodeficiency virus-positive patients. J Clin Microbiol.v. 42. P. 1260-1262. 2004.

LEWIS, K. Platforms for antibiotic discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**. v. 12. p. 371-387. 2013.

LIMA, I.O.; MEDEIROS, N. F.; OLIVEIRA, W.A.; OLIVEIRA, L. E.; ALBUQUERQUE M.E.; CUNHA, F.A.; FORMIGA, M. D.M.F. Anti-*Candida albicans* effectiveness of citral and investigation of mode of action. Pharm Biol.v. 50.p. 1536-41.2012.

LORENZI, H.; MATTOS, F.J.A. Plantas Medicinais no Brasil - Nativas e Exóticas. 2a ed. Plantarum; 2002.

MANFREDI, M.; MERIGO, E.; SALATI, A.; CONTI, S.; SAVI, A.; POLONELLI, L.; BONANINI, M.; VESCOVI, P. In vitro candidacidal activity of a synthetic killer decapeptide (KP) against *Candida albicans* cells adhered to resin acrylic discs. J Oral Pathol Med. v. 36. p.468-471. 2007.

MARSH, P.; MARTIN, M. V. Microbiologia oral. 4° ed.Santos: São Paulo-SP, 2005

MARTINS-DINIZ, J. N.; SILVA, R. A. M.; MIRANDA, E. T.; MENDES-GIANNINI, M. J. S. Monitoramento de fungos anemófilos e de Leveduras em Unidade hospitalar. **Rev Saúde Pública.** v. 39. p. 398-405. 2005.

MASKOVIC, P.; RADOJKOVIC, M.; RISTIC, M.; SOLUJIC, S. Studies on the Antimicrobial and Antioxidant Activity and Chemical Composition of the Essential Oils of Kitaibelia vitifolia. **Natural Product Communications**.v. 8. P. 667- 670. 2013.

MAUBON, D.; GARNAUD, C.; CALANDRA, T.; SANGLARD, D.; CORNET, M. Resistance of *Candida* spp. to antifungal drugs in the ICU: where are we now? Intensive Care Med. V.40 p.1241–55. 2014.

MAYER, F. L.; WILSON, D.; HUBE, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. Virulence.v. 4. p.119–128. 2013.

MENDES, J. Abordagem diagnóstica e terapêutica da candidíase invasiva em doentes adultos não-neutropénicos internados em unidades de cuidados intensivos. **Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas**.v .8. p.76–84. 2012.

MILHOMENS, P. M.; MACHADO, M. C. A. M.; MORAES, F. C.; BORGES, K. R. A.; DINIZ, M. R. DE F. (2014). Prevalência dos agentes etiológicos das vulvovaginites através de resultados de exames citopatológicos. **Revista de Investigação Biomédica.** v.6. p.92–102. 2014.

MKADDEM, M.; BOUAJILA, J.; ENNAJAR, M.; LEBRIHI, A.; MATHIEU, F.; ROMDHANE, M. Chemical composition and antimicrobial and antioxidant activities of Mentha (longifolia L. and viridis) essential oils. J Food Sci.v.74. p.358–63. 2009.

MODRZEWSKA, B.; KURNATOWSKI, P. Adherence of Candida sp. to host tissues and cells as one of its pathogenicity features. Annals of Parasitology.v. 61. p.3–9. 2015.

MONTERO, J.G.; MARTÍN, A.D.; PIAPPÓN, M.R.P DE.; CABRERA, E.G.; Infección fúngica invasiva em los pacientes ingresados em las áreas de críticos. Enferm Infecc Microbiol Clin. v.30. p.338-343. 2012.

MOSCATO, A. M. et al, Composição química e atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *Mentha spicata* e *Mentha piperita* cultivadas por hidroponia. **Revista Multiciência Online**. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – Campus Santiago. 2016.

NEUMANN, A.; BAGINSKI, M.; WINCZEWSKI, S.; CZUB, J.The effect of sterols on amphotericin B self-aggregation in a lipid bilayer as revealed by free energy simulations. Biophysical Journal. v.104. p.1485–1494. 2013.

OBEROI, JK.; WATTAL, C.; GOEL, N.; RAVEENDRAN, R.; DATTA, S.; PRASAD, K. Non-*albicans Candida* species in blood stream infectionsin a tertiary care hospital at New Delhi, India. **Indian J Med Res**. V. 136. P. 97-1003. 2012.

OLIVEIRA, F.Q.; GOBIRA, B.; GUIMARÃES, C.; BATISTA, J.; BARRETO, M.; SOUZA, M. Plants species indicated in odontology. **Rev Bras Farmacogn**. V.17. p.466–76.2007.

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. V.42. p.433-41. 2011.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana de determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia.**, v. 18. p. 301- 307, 2008.

OUMZIL, H.; GHOULAMI, S.; RHAJAOUI, M.; ILIDRISSI, A.; FKIH-TETOUANI, S.; FAID, M.; BENJOUAD, A. Antibacterial and antifungal activity of essencial oils of *Mentha suaveolens*. Wiley. *Phytoterapy Research*. v. 16. p. 727-31. 2002.

PALMEIRA, O. A.; SALGUEIRO, L.; PALMEIRA, O. R.; MARTINEZ, O. J.; PINA, V. C.; QUEIROZ, J.A.; RODRIGUES, A.G. Anti-candida activity of essential oils. Mini **Reviews in Medicinal Chemistry.** v.9. p.1292-305. 2009.

PAPPAS, P. G.; KAUFFMAN, C. A.; ANDES, D. R.; CLANCY, C. J.; MARR, K. A.; OSTROSKYZEICHNER, L.; SOBEL, J. D. Clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America. Clinical Infectious Diseases. 62. p.1–50. 2015.

PAPPAS, P. G.; ANDES, D.; SCHUSTER, M.; HEADLEY, S.; RABKIN, J.; MERION, R. M; KAUFFMAN, C. A.; HICKABEE, C; CLOUD, G. A.; DISMUKES, W. E.; KARCHMER, A. W. Invasive fungal infections in low-risk liver transplant recipients a multi- center prospective observational study. AM. J. Transplant. V.6. p. 396-91, 2006.

PARAMYTHIOTOU, E.; FRANTZESKAKI, F.; FLEVARI, A.; ARMAGANIDIS, A.; DIMOPOULOS, G. Invasive fungal infections in the ICU: how to approach, how to treat. Molecules. v.19. p.1085–1119. 2014.

PASQUALOTTO, A.C; ANTUNES, A.G.V; SEVERO, L.C. *Candida guilliermondii* as the aetiology of candidosis. **Rev Inst Med Trop.** P.123–7. 2006.

PEIXOTO, ITA. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de diferentes acessos de Mentha spp. em Candida albicans e Candida dubliniensis -- Tese (Doutorado) –

Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.Piracicaba,SP. 2010.

PEIXOTO, J. V.; ROCHA, M. G.; NASCIMENTO, R. T. L.; MOREIRA, V. V.; KASHIWABARA, T. G. B. (2014). Candidíase: uma revisão de literatura. Brasilian Journal of Surgery and Clinical Research.v.8. p.75–82. 2014.

PEREIRA, C.A.; SOUSA, N.M.; FRANCO, P.I.R.; REIS, A.F.; BARBOSA, M.S. Análise das principais micoses encontradas na rotina de um laboratório de análises clínicas na cidade de Jataí, estado de Goiás, Brasil. Ver. Saúde e Biol., v.9. p.108-114, 2014.

PFALLER, M.A; DIEKEMA, D.J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clin Microbiol Rev. v.**20. p.133-163. 2007.

PFALLER, M. A. et al. Multicenter Study of Anidulafungin and Micafungin MIC Distributions and Epidemiological Cutoff Values for Eight *Candida* Species and the CLSI M27-A3 Broth Microdilution Method. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** p. 916–922. 2014.

PRADO, M.; DA SILVA, M. B.; LAURENTI, R; TRAVASSOS, L. R; TABORDA, C. P. Mortality due to systemic mycoses AA a primary cause of death or in association with AINDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v. 104. p. 513-21, 2009.

RAMESH, N.; PRIYADHARSINI, M.; SUMATHI, C.S.; BALASUBRAMANIAN, V.; HEMAPRIYA, J.; KANNAN, R. Virulence Factors and Anti-Fungal Sensitivity Pattern of *Candida* sp. Isolated from HIV and TB Patients. Indian J Microbiol.v.51. p.273–8. 2010.

RAMOS; J.M.O.; SANTOS, C.A.; SANTANA, D.G.; SANTOS, D.; ALVES, P.B.; THOMAZZI, S.M. (2013). Chemical constituents and potential antiinflammatory activity of the essential oil from the leaves of Croton argyrophyllus. Brazilian Journal of Pharmacognosy.v.23. p.644-650. 2013.

REIS, M. S; MARIOT, A. Diversidade natural e aspectos agronômicos de plantas medicinais. In: Farmacognosia: da planta ao medicamento. 3.ed.ver. – Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/ Ed. Da UFSC. 2001.

RIBEIRO, E. L. et. al. Aspectos das Leveduras de Candida vinculadas as infecções nosocomiais. NewsLab, Goiás, p. 106-128, 2004.

RODRIGUES, M.E.; SILVA, S.; AZEREDO, J.; HENRIQUES, M. Novel strategies to fight Candida species infection. **Crit Rev Microbiol**. V.10. p.1–13. 2014.

RODRIGUES, C. F.; SILVA, S.; HENRIQUES, M. (2014). *Candida glabrata*: a review of its features and resistance. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. v.33. p.673–688. 2014.

RUKAYADI, Y.; HAN, S., YONG, D.; HWANG JAE-KWAN. *In vitro* activity of xanthorrhizol against *Candida glabrata*, C. *guilliermondii,* and C. *parapsilosis* biofilms. Medical Mycology .v.49.p.1-9. 2011.

SAAD, A.; FADLI, M.; BOUAZIZ, M.; BENHARREF, A.; MEZRIOUI, N.E.; HASSANI, L. Anticandidal activity of the essential oils of Thymus maroccanus and Thymus broussonetii and their synergism with amphotericin B and fluconazol. Phytomedicine.v.17.p.1057-1060. 2010.

SAHARKHIZ, M.J.; MOTAMEDI, M.; ZOMORODIAN, K.; PAKSHIR, K.; MIRI, R.; HEMYARI, K. Chemical Composition, Antifungal and Antibiofilm Activities of the Essential Oil of *Mentha piperita* L. *ISRN Pharmaceutics*. p. 1-6. 2012.

SAMBER, N.; KHAN, A.; VARMA, A.; MANZOOR, N. Synergistic anti-candidal activity and mode of action of *Mentha piperita* essential oil and its major components. *Pharmaceutical Biology.* p. 1495-1504. 2015.

SANGLARD, D. Resistance of human fungal pathogens to antifungal drugs. Current Opinion in Microbiology v.5.p.379–385. 2002.

SANGLARD, D. Resistance and tolerance mechanisms to antifungal drugs in fungal pathogens. Elsevier. *Mycologist.* v. 17. p. 74-78. 2003.

SANTOS, FP. Comparações genotípicas e fenotípicas de diferentes isolados clínicos de colonização e candidemia por Candida albicans. [Tese - Mestrado]. Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós Graduação em Infectologia. 2009.

SARDI, J. C. O.; SCORZONI, L.; BERNARDI, T.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; MENDES GIANNINI, M. J. S. (2013). Candida species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. Journal of Medical Microbiology.62.p.10–24. 2013.

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

SCHENKEL, E. P; GOSMANN, G; PETROVICK, P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: Farmacognosia: da planta ao medicamento. 3.ed.ver. – Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/ Ed. Da UFSC, 2001;

SCHULZE, J.; ONNENBORN, U.; Yeasts in the gut: from commensals to infections agentes. Deutsches Ärzteblatt International.106. p.837-841. 2009.

SCORZONI, L.; BENADUCCI, T.; ALMEIDA, A. M. F.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; GIANINNI, M. J. S. M. The use os Standard Methodology for Determination of Antifungal activity of natural products against medical yeasts *Candida* sp. and *Cryptococcus* sp. Brazilian Journal of Microbiology., v. 38, p. 391- 397, 2007.

SILVA, F.; PARK, K.J.; MAGALHÃES, P.M.; MARTINS, G.N.; GAMA, V.S. (2013). Avaliação do teor de óleo essencial de Baccharis trimera (Less.) DC. em diferentes embalagens durante o armazenamento. **Rev. Bras. Pl. Med.** v.15.p.54-58. 2013.

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.** v.36. p.288–305. 2012.

SINGH-BABAK, S. D.; BABAK, T.; DIEZMANN, S.; HILL, J. A.; XIE, J. L.; CHEN, Y-L.; POUNTANEN, S. M.; RENNIE, R. P.; HEITMAN, J.; COWEN, L. E. Global analysis of the evolution and mechanism of echinocandin resistance in *Candida glabrata*. *PLoS Pathogens*. v. 8. 2012.

SOBEL, J.D. Vulvovaginal candidosis. Lancet, v.369, p.1961-71,2007.

SPAMPINATO, C.; LEONARDI, D. Candida infections, causes, targets, and resistance mechanisms: traditional and alternative antifungal agents. BioMed Research International, 2013, 1–13. 2013.

SULLIVAN, D.; COLEMAN, D. *Candida dubliniensis*: characteristics and identification. Journal of Clinical Microbiology 36: 329- 334, 1998.

SULLIVAN, D.J.; WESTERNENG, T.J.; HAYNES, J.A.; BENNETT, D.E.; COLEMAN D.C. 1995*. Candida dubliniensis* sp. Nov.: Phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. Microbiology. v.141.p.1507-1521. 1995.

TAYLOR, B.N.; FICHTENBAUM, C.; SAAVEDRA, M.; SLAVINSKI, J.; SWOBODA, R.; WOZNIAK, K.; ARRIBAS, A.; POWDERLY, W.; FIDEL, P.L.J.R. In vivo virulence of *Candida albicans* isolates causing mucosal infections in people infected with the human Immunodeficiency Virus. J Infect Dis .v.182.p.955-959. 2000.

THOMPSON, D. S.; CARLISLE, P. L.; KADOSH, D. Coevolution of morphology and virulence in Candida species. Eukaryotic Cell. v.10. p.1173–1182. 2011.

TSANG, P. W-K.; BANDARA, H. M. H. N.; FONG, W-P. Purpurin suppresses *Candida albicans* biofilm formation and hyphal development. PloS One. v. 7. 2012.

TSCHERNER, M.; SCHWARZMULLER, T.; KUCHLER, K. Pathogenesis and antifungal drug resistance of the human fungal pathogen *Candida glabrata.* Pharmaceuticals. v.4.p.169–186. 2011.

TYAGI, A.K.; GOTTARDI, D.; MALIK, A.; GUERZONI, M.E. Anti-yeast activity of mentha oil and vapours through in vitro and in vivo (real fruit juices) assays. Food Chemistry.v.137.p.108-114. 2013.

VERMES, A.; GUCHELAAR, H. J.; DANKERT, J. Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. Journal of Antimicrobial Chemotherapy.v.46. p.171–179. 2000.

VYLKOVA, S.; CARMAN, A.J.; DANHOF, H.A.; COLLETTE, J.R.; ZHOU, H.; LORENZ, M.C. The fungal pathogen Candida albicans autoinduces hyphal morphogenesis by raising extracellular pH. mBio. v.2. p.00055–00011. 2011.

WHIBLEY, N.; GAFFEN, S. L. (2015). Beyond Candida albicans: Mechanisms of immunity to *non-albicans. Candida* species. Cytokine.v.76. p.42–52. 2015.

WILLE, M.P.; ARANTES, T.D.; SILVA, J.L.M. Epidemiologia das dermatomicoses em população da periferia de araraquara – SP. **Rev. Bras. Clin. Med**, V. 7. P. 295-298, 2009.

WILLIAMS, D.; LEWIS, M. Pathogenesis and treatment of oral candidosis. Journal of Oral Microbiology. v.3. p.5771. 2011.

XU, D.H.; HUANG, Y.S.; JIANG, D.Q.; YUAN, K. (2013). Composições químicas e atividades antioxidante, antimicrobianas e toxicidade de óleos essenciais de três espécies de Hyptis. Pharm Biol. v.51. p.1125-30. 2013.

YANG, Y.L.; LEAW, S.N.; WANG, A.H.; CHENG, H.T.; CHENG, W.T.; LO, H.J. Characterization of yeasts colonizing in healthy individuals. Medical Mycology. V.49. p.103–106. 2011.