

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

**Atividade antifúngica do óleo essencial de *Melissa officinalis* L.
(erva-cidreira) e de sua associação com antifúngicos licenciados
sobre *Candida albicans*.**

Maíra Catherine de Negreiros Leitão

SAPIENTIA AEDIFICAT

2016

Maíra Catherine de Negreiros Leitão

**Atividade antifúngica do óleo essencial de *Melissa officinalis* L.
(erva-cidreira) e de sua associação com antifúngicos licenciados
sobre *Candida albicans*.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia – Área de Concentração em Ciências Odontológicas.

Orientador: Profa. Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima

João Pessoa

2016

L533a Leitão, Maira Catherine de Negreiros.
Atividade antifúngica do óleo essencial de *Melissa officinalis* L. (erva-cidreira) e de sua associação com antifúngicos licenciados sobre *Candida* / Maira Catherine de Negreiros Leitão.- João Pessoa, 2016.
42f. : il.
Orientadora: Edeltrudes de Oliveira Lima
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS
1. Odontologia. 2. Óleo essencial. 3. *Candida*. 4. *Melissa officinalis* L. 5. Candidíase bucal.

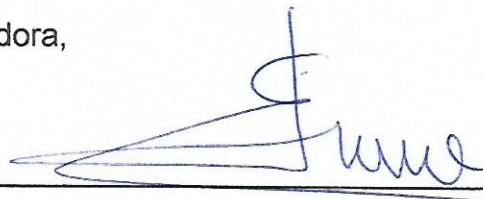
UFPB/BC

CDU: 616.314(043)

Maíra Catherine de Negreiros Leitão

**Atividade antifúngica do óleo essencial de *Melissa officinalis*
L.(erva-cidreira) e de sua associação com antifúngicos
licenciados sobre o gênero *Candida albicans*.**

Banca Examinadora,



Profa. Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima
Orientador – UFPB



Profa. Dra. Lindomar Farias de Belém
Examinador titular – UEPB



Prof. Dr. Lúcio Roberto Cancado Castellano
Examinador titular – UFPB

Prof. Dr. Hemerson Iury Ferreira Magalhaes
Examinador suplente – UFPB

Prof. Dr. André Ulisses Dantas Batista
Examinador suplente – UFPB

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a Deus por todas as graças alcançadas em minha vida.

Aos meus amados pais, lanternas da minha vida e exemplo, que sempre se sacrificaram para que eu pudesse realizar meus sonhos.

À Naiara Negreiros Fracaro e Andréa Amorim Leite pelos momentos de alegria, apoio, força e incentivos.

Aos meus amados sobrinhos Davi e Giovanna pelo amor, carinho e por serem minha principal fonte de energia.

AGRADECIMENTOS

À Deus, primeiramente, por ter me abençoado na seleção desse mestrado dando-me exatamente o que eu pedi. Por ter sido meu escudo, refugio e sustento durante as atribuições dessa caminhada.

Ao meu pai, Aleixo, um homem humilde que me ensina a cada dia a ser uma pessoa melhor. Pai você é o meu herói, exemplo de superação e vida. Obrigada pelo esforço contínuo e pela dedicação a nossa família.

À minha mãe, Elza, uma mulher de fibra que muitas vezes se esqueceu de si para que eu pudesse ir mais longe. Mamãe muito obrigada por me guiar, estar presente, pelas palavras de amor e incentivo. Você é a razão desse sonho se tornar realidade.

À minha irmã, Naiara, pelas orações, força, por acreditar em mim, pelas contribuições diárias e pelo apoio em todos os momentos.

À minha Andréa Amorim Leite, a quem admiro muito, pela força, amizade, apoio, torcida e incentivo constante durante essa jornada.

À minha orientadora, Edeltrudes de Oliveira Lima, a quem admiro, pela oportunidade de aprender cada dia mais, por depositar confiança em mim e por sempre estar disposta a ajudar.

Aos meus professores do Programa de Pós Graduação em Odontologia (PPGO) que com seus conhecimentos e experiências profissionais ensinaram-me a amar ainda mais essa profissão. Suas palavras de estímulo, no momento certo, inspiraram-me a buscar novos horizontes.

Aos meus colegas de laboratório a minha gratidão pela paciência, contribuições para o meu desenvolvimento e confecção desse trabalho.

Aos meus amigos da pós-graduação que compartilharam comigo alegrias, tristezas, conquistas e lutas.

Enfim a todos que de alguma maneira contribuíram para a conclusão desse sonho, que não está se encerrando, mas apenas começando, seja pela ajuda constante ou por uma palavra amiga.

Muito obrigada!

“E você aprende que realmente pode suportar... que realmente é forte, e que pode ir muito mais longe depois de pensar que não se pode mais. E que realmente a vida tem valor e que você tem valor diante da vida!”

(William Shakespeare)

RESUMO

A candidíase oral é uma infecção fungica causada por leveduras do gênero *Candida*, sendo a espécie *C. albicans* apontada como principal patógeno. O surgimento de espécies resistentes frente ao arsenal terapêutico disponível assim como seus efeitos adversos tem impulsionado novas pesquisas voltadas para os produtos naturais. Diante dessa problemática o presente trabalho buscou investigar a atividade antifúngica do óleo essencial (OE) obtido das folhas de *Melissa officinalis* L (erva-cidreira), isolado e associado a antifúngicos licenciados sobre cepas de *C. albicans*. Para tanto, foram selecionadas duas cepas da *American Type Culture Collection* (ATCC) e oito provenientes de cavidade oral (LM). Utilizou-se a técnica da microdiluição e semeadura de subcultivos para determinar, respectivamente, a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Fungicida Mínima (CFM). O antifungigrama foi realizado a partir da técnica de difusão de disco com os antifúngicos nistatina, anfotericina B, miconazol e fluconazol avaliando-os de forma isolada e associada ao OE. A CIM e CFM variaram, respectivamente, de 64 a 128 µg/mL e 256 a 512 µg/mL. Quanto ao teste de sensibilidade de forma isolada observou-se a presença de resistência das cepas aos antifúngicos nistatina (LM-38 e LM-65), anfotericina B (ATCC-76485, LM-3A, LM-38, LM-62 e LM-65) e fluconazol (LM-1A, LM-1B, LM-38, LM-62 e LM-65). Nos ensaios de associação os resultados mostraram influência do óleo essencial sobre a atividade dos antifúngicos sendo observado sinergismo (S), indiferença (I) e antagonismo (A). As porcentagens encontradas para cada antifúngico, na ordem (S, I e A), foram: nistatina (30%, 30% e 40%), anfotericina B (30%, 50%, 20%), fluconazol (20%, 40% e 40%) e miconazol (100%,0,0). Perante o exposto conclui-se que o OE de *M. Officinalis* pode se tornar um produto promissor no combate a candidose oral, visto que apresenta forte atividade antifungica contra *Candida albicans* e que o uso desse produto associado à antifungicos licenciados pode, em algumas situações, potencializar sua efetividade de uso no tratamento.

Palavras-chave: Óleo Essencial; *Candida*; *Melissa officinalis* L.; Candidíase bucal.

ABSTRACT

Oral candidiasis is a fungal infection caused by yeasts of the genus *Candida*, with *C. albicans* being the main pathogen. The emergence of resistant species against the available therapeutic arsenal as well as its adverse effects has driven new research on natural products. In view of this problem, the present study sought to investigate the antifungal activity of essential oil (OE) obtained from the leaves of *Melissa officinalis* L (lemon balm), isolated and associated with antifungal agents licensed on *C. albicans* strains. Two strains of the *American Type Culture Collection* (ATCC) and eight from the oral cavity (LM) were selected. The microdilution and sowing of subcultures were used to determine, respectively, the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Fungicidal Concentration (CFM). The antifungigram was performed using the disc diffusion technique with the antifungal agents nystatin, amphotericin B, miconazole and fluconazole, evaluating them in isolation and associated with OE. MIC and MFC ranged from 64 to 128 µg/mL and 256 to 512 µg/mL, respectively. The presence of resistance of the strains to the antifungal agents nystatin (LM-38 and LM-65), amphotericin B (ATCC-76485, LM-3A, LM-38, LM-62 and LM -65) and fluconazole (LM-1A, LM-1B, LM-38, LM-62 and LM-65). In the association tests, the results showed the influence of the essential oil on the antifungal activity, with synergism (S), indifference (I) and antagonism (A) being observed. The percentages found for each antifungal in the order (S, I and A) were: nystatin (30%, 30% , 40%), amphotericin B (30%, 50%, 20%), fluconazole (20% ,40% , 40%) and miconazole (100%, 0,0). In view of the above, it is concluded that the OO of *M. Officinalis* may become a promising product in the fight against oral candidiasis, since it has a strong antifungal activity against *Candida albicans* and that the use of this product associated with the licensed antifungal can, in some situations, potentiate its effectiveness of use in treatment.

Keywords: Essential oil; *Candida*; *Melissa officinalis* L.; Oral candidiasis.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µL	Microlitro
µg	Micrograma
UFC	Unidade formadora de colônia
nm	Nanômetro
mg	Miligrama
ml	Mililitro
mm	Milímetro
h	Hora
Min	Minuto
ASD	Aguar Sabouraud Dextrose
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
ATCC	American Type Culture Colletion
DMSO	Dimetilsulfoxido
OE	Óleo Essencial
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CA	<i>Candida albicans</i>
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana

SUMÁRIO

1 Introdução	1
2 Capítulo1	7
3 Considerações Gerais	24
4 Conclusão	25
Referências	26

1. INTRODUÇÃO

A cavidade bucal e seus tecidos adjacentes são considerados o microbioma mais complexo e diversificado do corpo humano. A maioria dos componentes da microbiota é composta por bactérias e fungos que se inter-relacionam através dos mecanismos de simbiose e competição. Essas relações são necessárias para o desenvolvimento de um ambiente equilibrado onde tais habitantes, em condições normais, são inofensivos ao indivíduo, ou seja, o desequilíbrio torna possível o desenvolvimento de processos patológicos [1,2].

Desde as últimas décadas, do século passado, as doenças fúngicas vem recebendo maior atenção devido ao uso indiscriminado de antibióticos, crescente comprometimento imunológico devido ao vírus HIV, terapia imunossupressora para transplantados, radioterapias e quimioterapia [3].

Das infecções micóticas que podem acometer a cavidade bucal a mais comumente encontrada, na clínica odontológica é a candidíase. Essa enfermidade é causada pelo gênero *Candida*, habitante natural da cavidade oral na forma comensal. Cerca de 25 a 50% das pessoas saudáveis podem apresentar *Candida* spp. Sua forma patológica está ligada a fatores gerais como o estado imunológico do indivíduo, virulência do micro-organismo e condição do meio oral. A espécie *Candida albicans* é apontada como principal patógeno da doença [4]. Dos fatores de virulência expressos por esse fungo destacam-se o processo de adesão e a formação de biofilme, sendo esses importantes para a sobrevivência e resistência aos tratamentos disponíveis [5]

A transição da forma comensal para a patológica está associada ao declínio da defesa imunológica, trauma, tabagismo, condições sistêmicas, higienização deficiente da prótese, do indivíduo e, por fim, a virulência deste fungo [6,7].

Clinicamente, essa infecção micótica, pode se manifestar nos tecidos orais de diversas maneiras sendo estas: eritematosa, pseudomembranosa, crônica hiperplásica, mucocultânea e hiperplásica [4]

A forma eritematosa é caracterizada pela presença de manchas ou áreas eritematosas avermelhadas. Essas manchas aparecem com maior frequência na região de palato bucal e ao longo do dorso da língua. Na maioria das vezes se

apresenta de forma assintomática, porém, quando sintomática pode causar grande desconforto devido à sensibilidade gerada a partir das numerosas áreas de erosão espalhadas pelos tecidos orais. Quando presente no palato, essa lesão, geralmente está relacionada ao uso de prótese dentária removível, considerada um fator local predisponente, podendo ser chamada de estomatite protética [8,9,10].

A candidose oral pseudomembranosa também conhecida popularmente por “sapinho” é a forma mais comumente encontrada na clínica. Podem estar presentes no palato, língua e orofaringe. Caracteriza-se pelo aparecimento de placas ou nódulos branco-amarelados removíveis à raspagem, deixando áreas eritematosas e hemorrágicas. Esse tipo é visto mais comumente em crianças e na forma assintomática, em casos mais extremos pode causar sintomas de ardência, disfagia e sensibilidade [8,9,10].

A forma crônica hiperplásica, também chamada de leucoplasia por cândida, caracteriza-se pela manifestação de placas esbranquiçadas que não são removidas através da raspagem [9,10].

A candidíase mucocutânea é, dentre todas, a que apresenta maior variação nos achados clínicos. Acomete mucosa bucal, unhas e mucosa vaginal de forma persistente e prolongada. Inicialmente apresenta-se como candidíase pseudomembranosa e posteriormente acomete unhas e pele [11,12].

A terapêutica direcionada para a candidíase conta com antifúngicos tópicos e sistêmicos. Esse arsenal pode ser dividido em quatro classes, de acordo com o seu modo de ação junto à célula fungica, sendo essas os polienos, azóis (imidazólicos e triazólicos), análogos das pirimidinas e quinocandinas [11,12].

Os polienos agem através da ligação do fármaco com o ergosterol, principal componente lipídico da membrana plasmática (MP) sendo responsável pela sua estrutura, fluidez e permeabilidade. Essa união resulta na formação de poros ou canais aquosos que aumentam da permeabilidade da MP e desta forma levará a perda de moléculas essenciais para a manutenção da vida celular, levando a morte da célula. Os principais representantes desse grupo são a anfotericina B, nistatina e suas formulações lipídicas [11,12].

Os azóis através da inibição de um sistema enzimático do citocromo P450 irá prejudicar a síntese de ergosterol e elevar a formação de metilesteroides. Com essa realidade ocorrerá distúrbios na formação membrana, no transporte e formação de quitina. Cetoconazol, miconazol e clotrimazol são os principais representantes dos imidazólicos, enquanto o fluconazol, voriconazol, posaconazol e itraconazol representam os triazólicos. [11,12].

Os análogos das pirimidinas agem na síntese de DNA e RNA através da desaminação da flucitosina, pró-farmaco, em 5-fluorouracila, um antimetabólico [11,12]. Já o grupo equinocandinas age interrompendo a formação da parede celular dos fungos por inibirem a β -1,3-glicano sintase, uma enzima, sendo representado pela caspofungina [13,14].

Com relação às infecções superficiais, de modo geral, a terapêuticas conta com uma infinidade de fármacos disponíveis. Geralmente são prescritos polienos (anfotericina B e nistatina), azóis (miconazol, terconazol, clotrimazol e tioconazol) e a flucitosina [11,12,15]

Os principais antifúngicos atualmente comercializados para o tratamento dessa enfermidade no âmbito superficial e sistêmicos são os poliênicos (anfotericina B e nistatina) e azólicos (fluconazol, itraconazol, clotrimazol, voriconazol, miconazol, cetoconazol). Para a terapia tópica, na cavidade oral, é preconizado o uso da nistatina e miconazol. Persistindo a patologia indica-se a terapia sistêmica sendo prescrito como antifúngico o fluconazol [16,17,18].

Essas opções de tratamento encontram-se cada vez mais limitadas devido ao advento de espécies resistentes e pelas reações adversas causadas nos usuários. Além desses problemas há um crescente aumento da população imunocomprometida fazendo-se necessária a pesquisa de novas opções de tratamento para a candidose oral [19,20]

Perante essa problemática, o estudo de substâncias de origem natural vem ganhado espaço com a perspectiva de obter melhor desempenho frente a diversos micro-organismos e aumentar as possibilidades terapêuticas [20,21,22].

A utilização de plantas medicinais e seus derivados pelo homem, com o intuito de promover e manter a saúde, são comprovadas historicamente por registros de

longa data. Nessa época os curandeiros indicavam a espécie correta para as mais derivadas afecções através do emprego de formulações simples, como cataplasma, chás, pós, defumadouros, tinturas entre outras formulações herbais [23,24].

As pesquisas envolvendo os produtos naturais têm recebido incentivos da Organização Mundial de Saúde (OMS) visando elucidar mais sobre as características principais das plantas medicinais. Em sua relação de drogas consideradas básicas e essenciais das 252 listadas 11% são consideradas exclusivamente de origem vegetal [25,26].

Diante de tamanho potencial das plantas medicinais produtos fabricados a partir dessas, como extratos e óleos essenciais, tem sido alvo de pesquisas laboratoriais com o intuito de conhecer o potencial antifúngico de algumas plantas [27,22].

Melissa officinalis L., um dos objetos de estudo desta pesquisa, pertence à família Lamiaceae, é uma espécie herbácea perene, originária da Ásia, norte da África e sul da Europa, onde essa planta é produzida em larga escala. No Brasil é cultivada há mais de um século e pode ser encontrada e/ou hortada em todo o território brasileiro. Melissa ou erva-cidreira é empregada principalmente para fins terapêuticos, culinários e pela indústria cosmética [28,29,30].

No saber popular utiliza-se essa planta como alternativa para o controle das emoções (crises nervosas, taquicardia, melancolia, histerismo e ansiedade). É considerada indutora do sono devido ao citral, seu constituinte majoritário, responsável pela ação relaxante [31,32].

Suas folhas e inflorescências frescas são empregadas na forma de chás, na forma de infusão, que tomado pela manhã ou à noite, combate dores de cabeça, problemas digestivos e cólicas intestinais, também são utilizadas as folhas maceradas no combate aos ferimentos [33,34].

Outra possível forma de utilização da erva-cidreira é através dos óleos essenciais que podem ser extraídos de várias partes das plantas como frutas, flores, cascas ou de plantas inteiras. São caracterizados quimicamente como misturas complexas de compostos de baixo peso molecular, sendo muitos deles

extremamente voláteis, capazes de gerar sabor e/ou aromas. Parte das propriedades farmacêuticas descritas para plantas medicinais são creditadas aos óleos essenciais (OE) [35,36,37].

O OE está presente nos tricomas secretores das folhas e flores, podendo ser extraído de matéria fresca ou seca, é considerado uma fonte rica em compostos bioativos. Por esse motivo a indústria farmacêutica tem explorado seu potencial devido à sua atividade antioxidativa, antimicótica, sedativa, antivirótica, principalmente sobre o vírus herpes simples (herpes labial) e caxumba, antibacteriana, analgésico, relaxante, expectorante, antialérgica, adstringente, antiséptica, antiinflamatória, antidiarreica, diurética antiespasmódico e até mesmo tônico revigorante da pele [28,29,33,34].

A composição do OE esta vinculada ao potencial de atividades biológicas que esse pode desenvolver. Os principais constituintes de interesse medicinal, como o citral, citronelal e geraniol, entre outros, são encontrados no óleo essencial obtido principalmente das folhas, as quais proporcionam rendimentos de 0,02 a 0,37%. Outros constituintes na planta são os ácidos hidroxicinâmicos, como o ácido rosmarínico, os flavonóides e taninos [38].

Em outro estudo foram descritos como principais constituintes o citral (neral e geranial), citronelal, geraniol, β -pineno, α -pineno e β -cariofileno, todos compreendendo 96% do OE [38].

Em outra pesquisa a análise da composição do OE revelou como constituinte majoritário o citral (39,9%), seguido do citronelal (13,7%), α -cariofileno (4,6%), geraniol (3,4%), germacreno D (2,4%).limoneno (2,2%) e óxido de cariofileno (1,7%) [39].

Diante de variações quanto a composição, vale a pena ressaltar que os OEs são caracterizados pela presença de dois ou três componentes principais apresentando valores de concentrações variando de 20 a 70% [40].

As diferenças encontradas entre as concentrações e componentes estão diretamente ligadas à qualidade do óleo. Inúmeros fatores podem estar correlacionados dentre eles o estágio de desenvolvimento da planta, parte da

planta utilizada para extração do OE, temperatura, qualidade do solo ou meio de cultura, dentre outros [41]

Algumas vezes a população, acrescida de saberes populares, faz uso da associação de medicamentos alopáticos e derivados das plantas medicinais sem conhecer os efeitos que essa união podem ocasionar. Esse tipo de comportamento pode trazer riscos para a saúde do indivíduo, visto que, essas associações podem resultar em efeitos sinérgicos ou antagônicos diante da droga sob a qual o indivíduo está sendo submetido [42].

Essa associação também conhecida como terapia combinada quando utilizada de forma correta, embasada em estudos, tem sido uma tentativa para melhorar a resposta de pacientes críticos [43].

O presente estudo teve como proposta a busca de uma nova alternativa de tratamento para a candidose oral através do óleo essencial de *Melissa officinalis* L., avaliando também os efeitos ocasionados a partir de sua associação à antifúngicos licenciados.

2. CAPÍTULO 1

O manuscrito a seguir será submetido para publicação no periódico “Planta Medica”.

Antifungal activity of essential oil of *Melissa officinalis* L. (lemon balm) and its association with antifungals licensed on the genus *Candida albicans*.

Maíra Catherine de Negreiros Leitão¹, Ana Luiza Alves de Lima Perez¹, Edeltrudes de Oliveira Lima²

1 Master's Degree Student, Post-Graduate Program in Dentistry, Universidade Federal da Paraíba – UFPB, João Pessoa, Paraíba, 58051-900, Brazil.
mairacatherine@hotmail.com; analuiza_perez@yahoo.com.br

2 Doctorate degree, Post-Graduate Program in Dentistry, Universidade Federal da Paraíba – UFPB, João Pessoa, Paraíba, 58051-900, Brazil.
edelolima@yahoo.com.br

Full institutional mailing addresses: Post-Graduate Program in Dentistry, Federal University of Paraíba, Campus I, João Pessoa, Paraíba, Brazil. 58.051-900. Email: edelolima@yahoo.com.br

ABSTRACT: The antifungal activity of the essential oil (OE) obtained from the leaves of *Melissa officinalis* L (lemon balm) was investigated in isolation and associated with antifungal agents licensed on strains of *Candida albicans*. Ten strains were used, two from the American Type Culture Collection (ATCC) and eight from the oral cavity (LM). Sensitivity studies were performed with nystatin (100 U.I.), amphotericin B (100 mcg), fluconazole (25 mcg) and miconazole (50 mcg) by the solid medium disc diffusion method. CIM and CFM ranged from 64 to 128 µg / mL and 128 to 512 µg / mL, respectively. The presence of resistance of the strains to the antifungal agents nystatin (LM-38 and LM-65), amphotericin B (ATCC-76485, LM-3A, LM-38, LM-62 and LM -65) and fluconazole (LM-1A, LM-1B, LM-38, LM-62 and LM-65). In the association tests, the results showed the influence of the essential oil on the antifungal activity, with synergism (S), indifference (I) and antagonism (A) being observed. The percentages found for each antifungal in the order (S, I and A) were: nystatin (30%, 30% and 40%), amphotericin B (30%, 50%, 20%), fluconazole (20%, 40% and 40%) and miconazole (100%, 0%). In view of the findings, it can be concluded that *Melissa officinalis* OE has strong antifungal activity, the existence of strains, standard and clinical, resistant and that before the association miconazole had excellent results.

Keyword: Essential Oil; *Candida*; *Melissa officinalis* L.; Oral candidiasis.

INTRODUCTION

Oral candidiasis is defined as a fungal infection that affects oropharyngeal tissues. This pathology is associated with the presence in the oral environment of *Candida spp.*, *Candida albicans* is the most commonly found species colonizing and / or infecting the oral cavity [1,2].

The therapy used to revert to the fungal infection in question has topical (nystatin and miconazole) and systemic antifungal agents (fluconazole). However, it should be emphasized that the treatment of this pathology is currently limited due to the resistance acquired by microorganisms, an increase in the immunocompromised population and undesirable side effects such as gastrointestinal problems, hepatotoxicity among others [3,4].

The search for a new treatment alternative through the combination of drugs, especially antifungals associated with natural products, has been studied in order to potentiate the therapy and to solve the limitations already described [5].

Melissa officinalis L. oil has varied biological activities as antibacterial and antifungal effects [6,7]. Other studies describe antiviral and anti-inflammatory effects [8,9]. However its effect associated with licensed antifungal agents used for the treatment of oral candidosis have not yet been reported.

In view of the above, this study aimed to evaluate, in vitro, the antifungal activity of *Melissa officinalis* L. OE and its association with licensed antifungal agents on strains of *Candida albicans* for a possible treatment route.

RESULTS

In the study the antifungal activity of the essential oil of *Melissa officinalis* L. on strains of *C. albicans* was evaluated. The results are shown in Table 1.

The essential oil of *M. officinalis*, at a concentration of 64 µg/ml, inhibited the growth of 7/10 (70%) of *C. albicans* strains including two ATCC standard and five of clinical origin. And 3/10 (30%) of the strains of clinical origin were sensitive to the product at the concentration (MIC) of 128 µg/ml.

As for MFC, it had a range of 128 to 512 µg / ml, with the *C. albicans* strains ATCC-76485, LM-38 and LM-62, with a CFM of 512 µg / ml (4x MIC).

In regard to the yeast growth controls in the absence of OE, and the sterility control of the medium (RPMI), both were respectively positive (yeast growth) and negative (no growth microorganimo).

Table 1 - Results of the evaluation of MIC and MFC (µg/mL) of *M. officinalis* OE on strains of *C. albicans*.

STRAIN	MIC µg/ml	MFC µg/ml	MFC/MIC
<i>C. albicans</i> ATCC-76485	64	512	8
<i>C. albicans</i> ATCC-60193	64	128	2
<i>C. albicans</i> LM – 1A	64	128	2
<i>C. albicans</i> LM – 1B	64	128	2
<i>C. albicans</i> LM – 3A	64	128	2
<i>C. albicans</i> LM – 3B	64	128	2
<i>C. albicans</i> LM – 38	64	512	8
<i>C. albicans</i> LM – 62	128	512	4
<i>C. albicans</i> LM – 65	128	256	2
<i>C. albicans</i> LM–122	128	128	1

The results of the evaluation of sensitivity and / or resistance to antifungal agents nystatin, amphotericin B, fluconazole and miconazole are expressed in table 2. Some strains from the oral cavity presented resistance to certain antifungal agents: CA LM-1A (fluconazole), CA LM-1B (fluconazole), CA LM-3A (amphotericin B), CA LM-38 (nystatin, amphotericin B and fluconazole), CA LM-62 (amphotericin B and fluconazole) and CA LM-65 (nystatin, amphotericin B and fluconazole). The values found from the arithmetic mean of the zone of inhibition and its interpretation, both for the isolated test and for the association test, are shown in Table 2.

As for the antifungal association test with *M. officinalis* OE, it was observed that some resistant strains in the first test became sensitive, such as the standard

strain CA ATCC-76485 (fluconazole and amphotericin B) and CA LM -38 (nystatin), CA LM-62 (amphotericin B) suggesting a synergistic effect. Clinical strains CA LM-3A and CA LM-3B became resistant to the antifungal fluconazole suggesting an antagonistic effect in the presence of OE. All strains in both the isolated and the association test were sensitive to miconazole.

Table 2. Results of the biological activity of the antifungal and the association with the O.E of *M. officinalis* (mm).

Strain <i>Candida albicans</i>	Isolated			Association		
	Antifungal	Zone of inhibition (Mm)	Interpretation*	Zone of inhibition (Mm)	Interpretation*	Effect of association
ATCC-76485	NY =	15	S	16	S	Indifferent
	AB =	9	I / R	12	S	Synergism
	FLU =	30	S	21	S	Antagonism
	MCZ =	34	S	36	S	Synergism
ATCC-60193	NY =	24	S	21	S	Antagonism
	AB =	16	S	13	S	Antagonism
	FLU =	27	S	24	S	Antagonism
	MCZ =	31	S	37	S	Synergism
LM – 1A	NY =	22	S	16	S	Antagonism
	AB =	14	S	14	S	Indifferent
	FLU =	0	R	0	R	Indifferent
	MCZ =	22	S	29	S	Synergism
LM – 1B	NY =	20	S	20	S	Indifferent
	AB =	15	S	15	S	Indifferent
	FLU =	0	R	0	R	Indifferent
	MCZ =	21	S	23	S	Synergism
LM – 3A	NY =	22	S	20	S	Antagonism
	AB =	0	I / R	10	I / R	Synergism
	FLU =	21	S	9	R	Antagonism
	MCZ =	24	S	30	S	Synergism
LM – 3B	NY =	20	S	18	S	Antagonism
	AB =	13	S	10	S	Antagonism
	FLU =	21	S	0	R	Antagonism
	MCZ =	23	S	27	S	Synergism
LM – 38	NY =	8	R	14	S	Synergism
	AB =	0	I / R	0	I / R	Indifferent

Continue

	FLU =	0	R	0	R	Indifferent
	MCZ =	29	S	40	S	Synergism
LM – 62	NY =	13	S	18	S	Synergism
	AB =	9	I / R	11	S	Synergism
	FLU =	0	R	13	R	Synergism
	MCZ =	33	S	35	S	Synergism
LM – 65	NY =	9	R	12	S	Synergism
	AB =	0	I / R	0	I / R	Indifferent
	FLU =	0	I / R	0	I / R	Indifferent
	MCZ =	32	S	35	S	Synergism
LM-122	NY =	20	S	20	S	Indifferent
	AB =	12	S	13	S	Indifferent
	FLU =	20	S	22	S	Synergism
	MCZ =	33	S	35	S	Synergism

Legend: NY: Nystatin (100 U.I.) / AB: Anfortricin B (100 mcg) / FLU: Fluconazole (25 mcg) / MCZ: Miconazole (50 mcg) /

S: Sensitive / I: Intermediate / R: Resistant.

* Made with reference to the Cecon's sensitivity profile table.

DISCUSSION

The composition of the OE used in this study was analyzed previously by our group. The geraniol (52%), citral (38.90%), trans- β -caryophyllene (1.22%) and germacrene D (0.84%) were identified by gas chromatography coupled to a mass spectrophotometer, totaling 92.96% of the total OE [10]. The findings in the OE in question are similar to those found in another study that associates the presence of monoterpenes and sesquiterpenes with antifungal activity [11].

Researches classify the intensity of this biological activity of an OE with the MIC concentration [12,13,14]. The value found for MIC 100% was 128 $\mu\text{g/mL}$, therefore, based on the above studies, the biological activity of *Melissa officinalis* OE on *Candida albicans* could be classified as strong.

The microbiological findings of this study, through the serial microdilution technique, demonstrate that the OE of *Melissa officinalis* L. has antifungal activity, and this result is similar to some studies [6,15,16].

The results of the ratio between MIC and MFC showed values that classified OE with fungicidal characteristics in 70% of strains and fungistatic in 30% [17]. It should be noted that clinically the fungicidal action becomes preferable to fungistática since the antifungal agents did not depend on the individual's immune response to kill the infection [18].

Others researches evidence the presence of licensed antifungal resistant strains of *Candida albicans*, these findings are compatible with the results found in this study, for the test isolated through disc diffusion [19,20]

In our isolated test we found 12 resistant strains being five resistant to fluconazole, five to amphotericin B and two to nystatin. It should be noted that ten of these are clinical and from the oral cavity. In the literature it is reported the resistance of *Candida albicans* isolates to fluconazole in patients with recurrent infection and attributed to this condition the modifications generated by cyclic exposure to the drug [20].

Studies have shown that the resistance mechanisms of *Candida albicans* decrease the permeability to drugs, regulate the transport of several drugs, modify the target enzyme (Cytochrome P450) and alterations in the biosynthesis of ergosterol [21,22].

In view of the association between antifungal and OE, it was observed that the best result for the synergic effect, considering the increase of at least 2mm of the inhibition halo, was observed in the presence of miconazole (100%) followed by nystatin and Amphotericin B (30%) and finally fluconazole (20%). The antagonistic effect, considering the decrease of at least 2mm of inhibition halo, was higher in the presence of nystatin and fluconazole (40%) followed by amphotericin B (20%). Indifference, when there was no significant change in the inhibition halo, had its highest percentage in amphotericin B (50%) followed by fluconazole (40%) and nystatin (30%).

It should be noted that there were changes in the sensitivity profile of the strains due to the synergistic effect observed in nistatin (ATCC-76485, LM-38) and amphotericin B (LM-62 and LM-65). In view of the antagonism in the presence of fluconazole, the clinical strains 3A and 3B went from sensitive to resistant.

The fact that OE is mostly composed of terpenes, naturally lipophilic structures, suggests that its interaction occurs at the cellular membrane level increasing its permeability and drug entry. In view of this, a plausible explanation is provided for the strains that showed synergistic effects. This positioning before OEs composed of high levels of terpenes is compatible with some researches [23,24].

The antagonistic findings present in this study may be related mainly to two factors: competition for the same site of action and adsorption to the cell which inhibits the binding of another substance [25].

In the literature are found some research of association of OEs and licensed drugs on strains of *Candida spp.* and *Candida albicans* by the solid medium disc diffusion method [26,27]. However, association studies between *Melissa officinalis* OE and licensed antifungal drugs do not make it difficult to compare results.

MATERIAL AND METHODS

Place of study

The biological assays related to the investigation of the antifungal activity of the essential oil of *M. officinalis* and its association with licensed antifungal were carried out in the Laboratory of Mycology of the Department of Pharmaceutical Sciences belonging to the Health Sciences Center of the Federal University of Paraíba.

Essential oil

The essential oil, obtained from leaves of the plant species, was purchased from Quinari Fragrances and Cosmetics Ltda. / Ponta Grossa, Paraná, Brazil. The oil was stored in an amber bottle and kept under refrigeration at a temperature of 4° C in the Mycology Laboratory. The emulsion of the essential oil was prepared at the time of the tests [28,29,30,31].

Antifungal Licensed

The products used in the association tests were purchased from Cecon®. The drugs chosen for the association study were amphotericin B, fluconazole, nystatin and miconazole, in the form of discs. The choice of these drugs is justified because they are commonly used for the treatment of candidiasis.

Microorganisms

For the antifungal activity assays, a total of ten *Candida albicans* strains were selected: ATCC-76485, ATCC-60193, LM-1A, LM-1B, LM-3A, LM-3B, LM-38, LM-62, LM-65, LM-122. These belong to the collection of the Mycology Laboratory/ Department of Pharmacological Sciences/ Health Sciences Center/ UFPB.

The stock strains used in the assays were maintained on sloping Sabraud Dextrose agar (ASD), under refrigeration (8° C) and at room temperature (28-30°C).

The suspension of the microorganisms was prepared according to the McFarland Scale 0.5 tube, adjusted by spectrophotometric reading (Leitz-

Photometer 340-800), to 90%T (530nm), corresponding to approximately 10^6 CFU/ml [29,30,32].

Culture media

The culture media used in the assays to determine antifungal activity were the solid medium Agar Sabouraud Dextrose (ASD) and the Roswell Park Memorial Institute 1640 liquid medium (RPMI) purchased respectively from Difco® / USA and Sigma-Aldrich®/ USA. They were prepared according to the manufacturers' instructions.

Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

The determination of the MIC was performed using the microdilution technique, using 96-well plates with a U-bottom and in duplicate [29,33,34].

Initially, 100µL of doubly concentrated RPMI 1640 was distributed into each well of the microdilution plate. Then, 100 µL of the essential oil emulsion was added to these wells to reach the initial concentration of 1024 µg/ml. This concentration was serially diluted from the withdrawal of an aliquot of 100µL from the more concentrated well into the successor well. The last aliquot withdrawn, at the end of each column, will be neglected. Finally, 10 µL of the inoculum of the *Candida* species was added to the wells, where each column of the plaque refers to a fungal strain. Concentrations of 1024 µg/ml to 8 µg/ml were obtained with serial dilution.

Controls for each microorganism were performed by placing 200µL RPMI1640 doubly concentrated and 10µL of the inoculum of each yeast previously described. Sterility control was also performed, where 200 µL of RPMI 1640 was placed in a well without fungus suspension.

The plates were incubated in an oven at 35 ± 2 ° C for 24-48h. Thereafter, visual reading of the results was performed from the observation of the formation or absence of fungal cell agglomerates at the bottom of the wells of the plate. From this it was considered as MIC the lowest concentration of the product that inhibited at least 50% of the strains used in the biological assays.

The antifungal activity of the products was interpreted and considered active or not, according to the following criteria: 50-500 $\mu\text{L/ml}$ = strong / optimal activity; 600-1500 = moderate activity; > 1500 $\mu\text{L/ml}$ = free activity or inactive product [12,13,14].

Minimal Fungicide Concentration (MFC)

The determination of CFM was performed from the results obtained in the test to determine MIC. 10 μL of the MIC and the two immediate MIC and x2 MIC concentrations were seeded in Petri dishes containing Sabouraud Dextrose Agar (ASD). The plates were incubated in an oven at 35 ± 2 ° C for 24-48h. After this period, the visual reading was performed in order to observe the fungal growth or not in the culture medium. In this way CFM was considered the lowest concentration capable of inhibiting the visible growth of the subculture [35,36].

The MFC / MIC ratio was calculated to determine whether the substance had a fungistatic activity ($\text{MFC} / \text{MIC} \geq 4$) or fungicide ($\text{MFC} / \text{MIC} < 4$) [17].

Antifungigrama

To perform this technique, Petri dishes containing ASD as solid medium were used. After the solidification of the medium, yeasts were cultured by the depletion technique and the plates were incubated for 48h. After this period the plaque was divided into quadrants where in each of these a disk containing the synthetic antifungal was deposited. In each plate we will have four different antifungals being these: nystatin, miconazole, fluconazole and amphotericin B. Finally, each disc was introduced into the plate with the aid of pre-flanged forceps and a small pressure was applied on it to ensure that the same Remained in the region of interest. The plates were incubated in an oven at 35 ± 2 ° C for a period of 24-48h. After this period the results were read, being expressed by the arithmetic mean found from the two largest measurements of the inhibition halo [33,37].

Study of association of O.E with licensed antifungal agentes

To perform this sensitivity test, in vitro, the solid disk technique was used. Initially the Petri dishes were filled with ASD medium, and after their solidification, 1 ml of the suspension of each strain was incubated by the depletion technique.

Then, the discs containing the antifungal association were deposited with 10 µl of the essential oil emulsion at a concentration of 128 µg/ml. Plates were incubated in an oven at 35 ± 2 ° C for a period of 24-48h. Then, the results were read where they were expressed by the arithmetic mean found from the two largest measurements of the inhibition halo [29,33,37].

Comparing the values obtained between the isolated test and the association, synergism was considered when the obtained value of the growth inhibition halo diameter is ≥ 2 mm, indifference if the change is equal to 0 and ≤ 1 and antagonism when the values Found are ≤ 2 mm [29].

Conflicts of Interest

All authors declare that there are no conflicts of interest regarding the publication of this article.

REFERENCES

1. Monge RA, Roma NE, Nombela C, Pla J. The MAP Kinase signal transduction network in *Candida albicans*. *Microbiology*. 2006; 152(1): 905-912.
2. Jorge AOC. *Microbiologia bucal*. São Paulo: Santos; 2007.
3. Giolo MP, Svidzinski TIE. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* 2010; 46(3): 225-234.
4. Jantan IB, Moharam BAK, Moharam K, Santhanam J, Jamal JA. Correlation Between Chemical Composition and Antifungal Activity of the Essential Oils of Eight *Cinnamomum* Species. *Pharm Biol.* 2008; 46(6): 406–12.
5. Chamilos G, Kontoyiannis DP. Defining the diagnosis of invasive aspergillosis. *Medical Mycology*. 2006; 44: 163-172.

6. Mimica-Dukic N, Bozin B, Sokovic M, Simin N. Antimicrobial and Antioxidant activities of *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) Essential Oil. *J. Agric. Food Chem.* 2004; 52(9): 2485-2489.

7. Pereira P, Tysca D, Oliveira P, Silva BLF, Picada JN, Ardenghi P. Neurobehavioral and genotoxic aspects of rosmarinic acid. *Pharmacology Research.* 2005; 52(3): 199-203.

8. Haber LL, Luz JMQ, Dóro LFA, Santos JE. Diferentes concentrações de solução nutritiva para o cultivo de *Mentha Piperita* e *Melissa officinalis*. *Horticultura Brasileira.* 2005; 23 (4): 1006-1009.

9. Blank AF, Fontes SM, Oliveira AS, Mendonça MC, Mann RS, Blank MFA. Produção de mudas, altura e intervalo de corte em melissa. *Horticultura Brasileira.* 2005; 23(3): 780-784.

10. Menezes CP, Guerra FQS, Pinheiro LS, Trajano VN, Pereira FO, Souza VG, Souza FS, Lima EO. Investigation of *Melissa officinalis* L. Essential Oil for Antifungal Activity against *Cladosporium carrionii*. *International Journal of TROPICAL DISEASE & Health.* 2015; 8(2): p.49-56.

11. Uysal B, Sozmen F, Buyuktas BS. "Solvent-free microwave extraction of essential oils from *Laurus nobilis* and *Melissa officinalis*: comparison with conventional hydro-distillation and ultrasound extraction," *Nat Prod Commun.* 2010; 5(1): 111-114.

12. Sartoratto A, Machado ALM, Delarmelina C, Figueira GM, Duarte MCT, Rehder VLG. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Braz J Microbiol.* 2004; 35: 275-280.

13. Houghton PJ, Howes MJ, LEE CC, STEVENTON G. Uses and abuses of in vitro tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. *J. ethnopharmacology.* 2007; 110(3): 391-400.

14. Mitscher L, Leu R, Bathala M, Wu W, BEAL J. Antimicrobial agents from higher plants. I. Introduction, rationale and methodology. *Lloydia.* 1972; 35(2): 157-166.

15. Rostami H, Kazemi M, Shafie I. Antibacterial activity of *Lavandula officinalis* and *Melissa officinalis* against some human pathogenic bacteria. *Asian Journal of Biochemistry*. 2016; 7(3): 133-142.
16. Edris AE. Pharmaceutical and Therapeutic Potentials of Essential Oils and Their Individual Volatile Constituents. *Phytotherapy Research*. 2007; 21: 308-323.
17. Siddiqui ZN, Farooq F, Musthafa TNM, Ahmad A, Khan AU. Synthesis, characterization and antimicrobial evaluation of novel halopyrazole derivatives. *J Saudi Chem Soc*. 2013; 17(2): 237–243.
18. Monk BC, Goffeau A. Outwitting multidrug resistance to antifungals. *Science*. 2008; 321(5887): 367-369.
19. Menezes EA, Mendes LG, Cunha FA. Resistência a antifúngicos de *Candida tropicalis* isoladas no Estado do Ceará. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*. 2009; 42(3): 354-355.
20. Morschhauser J. The genetic basis of fluconazole resistance development in *Candida albicans*. *Biochem Biophys Acta*. 2002; 1587(3): 240-248.
21. Sanglard D, Kuchler K, Ischer F, Pagani JI, Monod M, Bille, J. Mechanisms of Resistance to Azole Antifungal Agents in *Candida albicans* Isolates from AIDS Patients Involve Specific Multidrug Transporters. *Antimicrob. Agents Chemother*. 1995; 39(1): 2378-2386.
22. Kakeya H, Miyazaki T, Miyazaki Y, Kohno S. Azole resistance in *Candida* spp. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi*. 2003; 44(2): 87-92.
23. Brehm-Stecher BF, Johnson EA. Sensitization of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to antibiotics by the sesquiterpenoids nerolidol, farnesol, bisabolol, and apritone. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2003; 47(10): 3357-3360.

24. Ríos JL, Recio MC. Medicinal plants and antimicrobial activity. *J. Ethnopharmacol.* 2005; 100(2): 80-84.
25. Johnson MD, Dougall CM, Zeichner LO, Perfect JR, Rex JH. Combination Antifungal Therapy. *J Antimicrob Chemother.* 2004; 48(3): 693-715.
26. Quan H, Cao YY, Xu Z, Gao PH, Quin Xf, Jiang YY. Potent In Vitro synergism of fluconazole and Berberine Chloride against clinical isolates of *Candida albicans* resistant to fluconazole. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006; 50(3): 1096-1099.
27. Rosato A, Vitali C, Piarulli M, Mazzotta M, Argentieri M, Mallamaci R. In vitro synergic efficacy of the combination of Nystatin with the essential oils of *Origanum vulgare* and *Pelargonium graveolens* against some *Candida* species. *Phytomedicine.* 2009; 16(10): 972-975.
28. Allegrini M, Siméon M, Maillos H, Boiloot A 1973. Émulsions et applications en microbiologie. *Travaux de la Société de Pharmacie de Montpellier* 33: 73-86
29. Cleeland L, Squires E. Evaluation of new antimicrobials in vitro and experimental animal infections. In: Lorian VMD, organizador. *Antibiotics in Laboratory Medicine.* Baltimore: Williams & Wilkins; 1991. p.739-788.
30. Hadacek F, Greger H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. *Phytoch Anal.* 2000; 11(3): 137-147.
31. Eloff JN. A sensitive and quick method to determine the minimum inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Medica.* 1988; 64(8): 1–8.
32. National Committee for Clinical Laboratory Standards-NCCLS. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. 7 ed. Villanova. PA: NCCLS, 2000.
33. Amato Neto et al. Antibióticos na prática médica. São Paulo: Editora Roca, 1994. *Asian J.of Biochem.* v. 7, n. 3, p. 133-142, 2012.

34. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protocol M27-A2. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. 2nd edition. Pennsylvania: NCCLS, 2002. 51p.
35. Deswal DP, Chand U. Standardization of the tetrazolium test for viability estimation in rice bean (*Vigna umbellata* T.) seeds. *Seed Science and Technology*. 1997; 25: 409-417.
36. Rasooli I, Abyaneh MR. "Inhibitory effects of thyme oils on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*," *Food Control*. 2004; 15(6): 479-483.
37. Lima EO, Gompertz OF, Giesbrecht AM, Paulo MQ. In vitro antifungal activity of essential oils obtained from officinal plants against dermatophytes. *Mycoses*. 1993; 36(10): 333-336.

3. CONSIDERAÇÕES GERAIS

O óleo de *Melissa officinalis* possui varias atividades terapêuticas descritas na literatura [33,34]. O presente estudo reforça a existência de sua atividade antifúngica frente a cepas de *Candida albicans*.

Baseando-se em alguns estudos através da obtenção da CIM_{100%}, 128µg/mL nesse estudo, pode-se dizer que o OE possui forte atividade biológica [44,45,46].

Apesar de existirem variações em relação ao componente majoritário, estudos descrevem como principais componentes majoritários do OE de *Melissa officinalis* os mono e sesquiterpenos [40].

A terapêutica voltada para a candidose oral encontra-se limitada, por vários fatores, sendo preocupante a crescente resistência dos micro-organismos. Nesse estudo foram encontradas cepas resistentes ao fluconazol, nistatina e anfotericina B, antifúngicos utilizados no tratamento da candidose.

Diante disso a associação de drogas a produtos naturais pode ser uma saída para superar o fator resistência. Alguns estudos relatam resultados de sinergismos entre antibióticos ou antifúngicos associados a varias formulações de plantas medicinais [47,48].

Tornam-se necessários estudos futuros para entender melhor sobre o mecanismo de ação do OE de *Melissa officinalis* isolado e associado a antifúngicos licenciados.

4. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos nos ensaios de atividade antifúngica e associação conclui-se que:

- O óleo essencial de *Melissa officinalis* L. apresentou forte atividade antifúngica sobre as cepas de *Candida albicans*.
- Presença de cepas, provenientes de cavidade bucal, resistentes a nistatina, anfotericina B e fluconazol.
- A associação do óleo pode resultar em efeitos sinérgicos e/ou antagônicos frente a nistatina, anfotericina B e fluconazol.
- Todas as cepas foram sensíveis ao miconazol tanto no teste isolado quanto na associação.

Diante do exposto pode-se considerar o OE de *Melissa officinalis* uma alternativa promissora para o tratamento da candidíase oral, porém, faz-se necessário o desenvolvimento de estudos futuros acerca dos mecanismos de ação e toxicidade.

REFERÊNCIAS

1. Samaranayake YH, Dassanayake RS, Jayatilake JA, Cheung BP, Yau JY, Yeung KW, Samaranayake LP. Differential phospholipase gene expression by *Candida albicans* in artificial media and cultured human oral epithelium. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica, Copenhagen*. 2006; 114(12): 857-866.
2. Jorge AOC. *Microbiologia bucal*. São Paulo: Santos; 2007.
3. Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev* 2003; 67: 400-428.
4. Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. *Oral & Maxillofacial Pathology*. 2nd ed. Editor Saunders; 2002: 189-99, 788-91.
5. Giolo MP, Svidzinski TIE. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* 2010; 46(3): 225-234.
6. Monge RA, Roma'n E, NOMBELA C, PLA J. The MAP Kinase signal transduction network in *Candida albicans*. *Microbiology*. 2006; 152(1): 905-912.
7. Sardi JC, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida AM, Mendes Giannini MJ *Candida* species: current epidemiology, pathology, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J Med Microbiol*. 2013; 62: 10–24.
8. Martin Neto M, Danesi CC, Unfer DT. Candidíase bucal revisão da literatura. *Revista Saúde*. 2005; 31(1-2): 16-26.
9. Reichart PA, Samaranayake LP, Philipsen HP. Pathology and clinical correlates in oral candidiasis and its variants: a review. *Oral Dis*. 2000; 6: 85-91.
10. Ortega JR, Tarragó FM, Lugones HM, Garay JCS. Candidiasis de la mucosa bucal: Revisión bibliográfica. *Rev Cubana Estomatol* 2002; 39.

11. Goodman L, Gilman A. As bases farmacológicas daterapêutica. 12^a Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2012.
12. Williams DA, Lemke TL. Foye's Principles of Medicinal Chemistry. 5. ed. Philadelphia: Lippincot Williams & Wilkins, 2002.
13. Gonzalez GM, Tijerina R, Najvar LK, Bocanegra R, Luther M, Rinaldi MG, Graybill JR. Correlation between antifungal susceptibilities of *Coccidioides immitis* in vitro and antifungal treatment with caspofungin in a mouse model. *Antimicrob. Agents Chemother* 2001; 45: 1854–1859.
14. Graybill JR. Lipid Formulations for Amphotericin B: does the emperor need new clothes? *Ann Int Med.* 1996; 124: 921-923.
15. Korolkovas, A. Dicionário terapêutico guanabara. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2003; 18.18-18.19.
16. Sgarbi FC, Cavalcante, ASR, Cabral LAG. Candidíase bucal: aspectos de interesse ao cirurgião-dentista. *Rev Assoc Paul Dent.* 2006; 60(4): 324-327.
17. Wingeter MA, Guilhermetti E, Shinobu CS, Takaki I, Svidzinski TIE. Identificação microbiológica e sensibilidade in vitro de *Candida* isoladas da cavidade oral de indivíduos HIV positivos. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2007;40(3): 272–6.
18. Paiva, LCA; Ribeiro, RA; Pereira, JV; Oliveira, NMC. Clinical and laboratorial evaluation of *Uncaria tomentosa* (Cat's Claw) gel on oral candidiasis. *Rev. bras. farmacogn.* 2009, 19(2A): 423-428.
19. Jantan I, Abdul B, Moharam K, Santhanam J, Jamal JA. Correlation Between Chemical Composition and Antifungal Activity of the Essential Oils of Eight *Cinnamomum* Species. *Pharm Biol.* 2008; 46(6):406–12.
20. Khan R, Islam B, Akram M, Shakil S, Ahmad AA, Ali SM, Siddiqui M, Khan AU. Antimicrobial activity of five herbal extracts against multi drug

resistant (MDR) strains of bacteria and fungus of clinical origin. *Molecular Diversity Preservation International*. 2009, 14(2): 586-597.

21. Lima, IO, Oliveira RAG, Lima EO, Farias NMP, Souza EL. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. *Rev Bras Farmacogn*. 2006,16: 197-201.
22. Pozzatti P, Scheid LA, Spader TB, Atayde ML, Santurio JM, Alves SH. In vitro activity of essential oils extracted from plants used as spices against fluconazole-resistant and fluconazole-susceptible (2008). *Can J Microbiol*. 2008, 54(1): 950-956.
23. Balunas MJ, Kinghorn AD. Drug discovery from medicinal plants. *Life Sci*. 2005; 78: 431–441.
24. Halberstein RA. Medicinal plants: historical and cross-cultural usage patterns. *Annals of Epidemiology*; 2005; 15(9): 686-99.
25. Yunes RA, Filho VC. Breve análise histórica da química da Plantas Medicinais: Sua importância na atual concepção de fármaco segundo os paradigmas ocidental e oriental. In: Yunes RA, Calixto JB. *Plantas Medicinais sob a ótica da química medicinal moderna*. Chapecó: Argos, 2001: 17-44.
26. Loguercio AP, Battistin A, Vargas AC, Henzel A, Witt NM. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells). *Cienc Rural*. 2005; 35(2), 371-376.
27. Araújo JCLV, Lima EO, Ceballos BSO, Freire KRL, Souza EL, Santos-filho L. Ação antimicrobiana de óleos essenciais sobre microrganismos potencialmente causadores de infecções oportunistas. *Rev Patol Trop*. 2004; 33: 55-64.
28. Sorensen JM. *Melissa officinalis*, essential oil authenticity, production and pharmacological activity. *Int. J. Aromather*. 2000; 10: 1-8.
29. Gurcík, L, Dúbravská, R, Miklovičová, J. Economics of the cultivation of *Salvia officinalis* and *Melissa officinalis*. *Agricultural Economics*, West Lafayette. 2005, 51(8): 348-356.
30. Martins ER; Castro DM, Castellani DC; Dias JE. *Plantas medicinais*. Viçosa: Editora UFV: Universidade Federal de Viçosa, 2000. 220p.

31. Sadraei H, Ghannadi A, Malekshahi K. Relaxant effect of essential oil of *Melissa officinalis* and citral on rat ileum contractions. *Fitoterapia* 2003; 74: 445-52.
32. Blank AF, Fontes SM, Oliveira ASO, Mendonça MC, Silva-mann R, Arrigoni-blank MF. Produção de mudas, altura e intervalo de corte em melissa. *Hortic Bras.* 2005, 23: 780-784.
33. Lorenzi H, Matos FJA. *Plantas medicinais do Brasil: Nativas e exóticas.* Nova Odessa: Plantarum; 2008. 544 p.
34. Haber, LL; LUZ, J.M.Q.; Arvatidóro, L.F.; Santos, J.E. Diferentes concentrações de solução nutritiva para o cultivo de *Mentha Piperita* e *Melissa Officinalis*, *Hortic Bras.* 2005; 23(4): 1006-1009.
35. Trombetta D, Castelli F, Sarpietro MG, Venuti V, Cristani M, Daniele C, Saija A., Mazzanti G, Bisignano G. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005; 49: 2474–2478.
36. Edris AE. Pharmaceutical and therapeutic potentials os essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytother. Res.* 2007; 21: 308-323.
37. Dudareva N, Negre F, Nagegowda DA, Orlova I. Plant volatiles: recent advances and future perspectives. *Critical reviews in plant sciences.* 2006; 25(5), 417-440.
38. Moradkhani H, Sargsyan E, Bibak H, Naseri B, Meftahizade H. *Melissa officinalis* L ., a valuable medicine plant : A review. *J Med Plants Res.* 2010;4(25):2753–9.
39. Mimica-Dukic N, Bozin B, Sokovic M, Simin N. Antimicrobial and Antioxidant activities of *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) Essential Oil. *J. Agric. Food Chem.* 2004; 52(9): 2485-2489.
40. Uysal B, Sozmen F, Buyuktas BS. “Solvent-free microwave extraction of essential oils from *Laurus nobilis* and *Melissa officinalis*: comparison

with conventional hydro-distillation and ultrasound extraction,” *Nat Prod Commun.* 2010; 5(1): 111-114.

41. Polovka M, Suhaj M: Effect of irradiation and heat treatment on composition and antioxidant properties of culinary herbs and spices - a review. *Food Review.* 2010; 26: 2, 138-161.
42. Puppo E, Silva CP. Levantamento do perfil medicamentoso e frequência de associações entre o Ginkgo (*Ginkgo biloba* L.) e ácido acetilsalicílico, em usuários atendidos pela FarmaUSCS de São Caetano do Sul. *Rev Ciênc Farm Básica Apl* 2008; 29: 53-8.
43. Chamilos G, Kontoyiannis DP. Defining the diagnosis of invasive aspergillosis. *Medical Mycology.* 2006; 44: 163-172.
44. Sartoratto A, Machado ALM, Delarmelina C, Figueira GM, Duarte MCT, Rehder VLG. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Braz J Microbiol.* 2004; 35: 275-280.
45. Houchton PJ, Howes MJ, LEECC, STEVENTON G. Uses and abuses of in vitro tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. *J. of ethnopharmacology.* 2007; 110(3): 391-400.
46. Mitscher L, Leu R, Bathala M, Wu W, Beal J. Antimicrobial agents from higher plants. I. Introduction, rationale and methodology. *Lloydia.* 1972; 35(2): 157-166.
47. Rosato A, Vitali C, Piarulli M, Mazzotta M, Argentieri M, Mallamaci R. In vitro synergic efficacy of the combination of Nystatin with the essential oils of *Origanum vulgare* and *Pelargonium graveolens* against some *Candida* species. *Phytomedicine.* 2009; 16(10): 972-975.
48. Quan H, Cao Y, Xu Z, Zhao J, Gao P, Quin X, Jiang Y. Potent In Vitro synergism of fluconazole and Berberine Chloride against clinical isolates of *Candida albicans* resistant to fluconazole. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006; 50(3): 1096-1099.

* De acordo com as normas do PPGO/UFPB, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors - Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.