



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

LUCIANA DE BRITO SIEBRA E OLIVEIRA

**POTENCIAL ANTIMICROBIANO E MECANISMO DE AÇÃO DO ÓLEO
ESSENCIAL DE FOLHAS DE *OCIMUM GRATISSIMUM* (Linn.) SOBRE ESPÉCIES
DE *CANDIDA***

FORTALEZA

2015

LUCIANA DE BRITO SIEBRA E OLIVEIRA

POTENCIAL ANTIMICROBANO E MECANISMO DE AÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL
DE FOLHAS DE *OCIMUM GRATISSIMUM* L. SOBRE ESPÉCIES DE *CANDIDA*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Biologia para a Saúde.

Orientador: Profa. Dra. Nádia Accioly Pinto Nogueira.

FORTALEZA

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

O48p

Oliveira, Luciana de Brito Siebra e.

Potencial antimicrobiano e mecanismo de ação do óleo essencial de folhas de *Ocimum gratissimum* L. sobre espécies de *candida*/ Luciana de Brito Siebra e Oliveira. – Fortaleza, 2015.
89 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Fortaleza, 2015.

Área de concentração: Biologia para a Saúde.

Orientação: Profa. Dra. Nádia Accioly Pinto Nogueira.

1. Ocimum. 2. Óleos Voláteis. 3. Produtos com Ação Antimicrobiana. I. Nogueira, Nádia Accioly Pinto (Orient.). II. Título.

CDD 615.32396

LUCIANA DE BRITO SIEBRA E OLIVEIRA

POTENCIAL ANTIMICROBANO E MECANISMO DE AÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL
DE FOLHAS DE *OCIMUM GRATISSIMUM* L. SOBRE ESPÉCIES DE *CANDIDA*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Biologia para a Saúde.

Aprovada em: 18 / Dezembro / 2015.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Nádia Accioly Pinto Nogueira (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Cibele Barreto Mano de Carvalho
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Andréa Bessa Teixeira
Faculdade Metropolitana da Grande Fortaleza (Fametro)

À Deus.

Aos meus pais, João e Helena.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, **Profa. Dra. Nádia Accioly Pinto Nogueira**, pelo carinho, incentivo, paciência e ajuda. Eles foram essenciais na concretização desse projeto.

À **Deus** por sua presença em todos os momentos e por ter me dado força e coragem para continuar nessa caminhada – só Ele e eu sabemos que não foi fácil.

Aos meus pais, **João e Helena**, pelo amor e apoio incondicionais. A vocês devo tudo o que sou e tudo o que conquistei.

Ao meu namorado e melhor amigo, **João Marcelo**, pela paciência e por me incentivar a seguir em frente.

Aos amigos e companheiros do Laboratório de Microbiologia Aplicada pelo apoio e pela presença constantes. Principalmente **Gleilton Weyne, Andressa Moraes e Fabrício César**, por toda a ajuda na execução dos procedimentos experimentais desse trabalho. Com vocês minhas manhãs e tardes no *LabMicro* foram muito mais agradáveis!

Às amigas da graduação que continuaram ao meu lado nessa nova fase. **Jéssica, Luana e Maísa**: foi mais difícil sem vê-las todos os dias, mas saber que vocês estavam lá foi maravilhoso. Nas amizades verdadeiras o tempo nunca passa e a distância não existe.

Às amigas do **Vôlei Feminino da UFC**, pela entrega, pela partilha e por muitas das melhores lembranças desses dois últimos anos. Com vocês descobri o que quero fazer pelo resto da vida e o TIME que quero em quadra ao meu lado #pracimadelasUFC.

À **Sra. Amélia** e ao **Horto de Plantas Medicinais Prof. Francisco José de Abreu Matos da Universidade Federal do Ceará**, pelo auxílio na extração do óleo essencial de *Ocimum gratissimum* L.

Ao **PADETEC**, pelo auxílio na identificação e caracterização do óleo essencial.

Ao **Prof. Said Fonseca** por estar sempre presente e disposto a ajudar.

À **Profa. Dra. X e Profa. Dra.** por aceitarem o convite para participação da banca e, assim, contribuir nessa importante fase do meu trabalho.

À **Universidade Federal do Ceará (UFC)**, por me acolher por mais dois anos e assim me dar oportunidade de crescimento profissional e pessoal.

À **Raimundinha, Jéssica e Maxwilliam**, Secretários da Pós-Graduação, pela disponibilidade e atenção no decorrer do curso.

À **Funcap**, pelo apoio financeiro.

Enfim, a todos aqueles que contribuíram de alguma maneira para a realização desse trabalho, O MEU MUITO OBRIGADA!

“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez.”

George Bernard Shaw

RESUMO

A espécie *Ocimum gratissimum* (Linn.), popularmente conhecida como alfavaca-cravo, é muito utilizada na medicina popular. A planta apresenta inúmeros compostos, sendo o eugenol o constituinte majoritário do seu óleo essencial e o provável responsável pela sua atividade antimicrobiana. O objetivo deste estudo foi determinar o potencial antimicrobiano e o mecanismo de ação do óleo essencial extraído das folhas de *O. gratissimum* L. (OEOg) sobre cepas-padrão de *Candida*. A caracterização química dos constituintes do OEOg foi realizada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM). Para avaliação da atividade antimicrobiana foi determinada a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do OEOg, o efeito do tempo de exposição ao OEOg, o efeito modulador do OEOg na atividade de antifúngicos (ATF) de uso clínico e a ação do OEOg nas fases de crescimento exponencial e estacionário de leveduras do gênero *Candida*. O mecanismo de ação do OEOg foi verificado por captação do cristal violeta e avaliação da morfologia microbiana pela técnica de microcultivo de leveduras. Também foi avaliada a toxicidade do OEOg sobre hemácias humanas. Para isso foram utilizadas oito cepas-padrão de *Candida*: *C. albicans* ATCC 10231; *C. albicans* ATCC 44858; *C. albicans* ATCC 64124; *C. albicans* ATCC 90028; *C. albicans* ATCC 90029; *Candida parapsilosis* ATCC 90018; *Candida tropicalis* ATCC 750; *Candida tropicalis* ATCC 13803. O OEOg foi capaz de inibir o crescimento das cepas de *C. albicans* ATCC 10231 (CIM = 1,25 mg/mL), *C. albicans* ATCC 64124 (CIM = 0,625 mg/mL), *C. parapsilosis* ATCC 90018 (CIM = 1,25 mg/mL), *C. tropicalis* ATCC 13803 (CIM = 1,25 mg/mL), sendo capaz de reduzir a taxa de crescimento das cepas de *Candida* a partir de 4 horas de exposição. Para as associações OEOg-ATF, houve predominância de efeitos indiferentes e antagônicos para as cepas de *Candida* testadas, sendo o OE capaz de modular positivamente a ação do cetoconazol sobre a cepa *C. tropicalis* ATCC 13803. O OEOg foi capaz de reduzir o número de células viáveis em todas as fases de crescimento microbiano. O OEOg foi capaz de promover o aumento discreto da captação do cristal violeta e provocou alterações na micromorfologia das células de *Candida spp.*, sugerindo que seu alvo de ação seja o envoltório celular. Observou-se baixa toxicidade do OEOg sobre hemácias humanas. Os resultados encontrados mostraram que o OEOg possui uma boa atividade sobre leveduras do gênero *Candida*, com mecanismos de ação mediado possivelmente pela ocorrência de danos no envoltório celular, além de ter sido observada baixa toxicidade, indicando do OEOg é promissor o desenvolvimento e elaboração de um novo fármaco com potencial atividade para o tratamento de doenças fúngicas, necessitando, para isso, de estudos adicionais.

Palavras-chave: Ocimum. Óleos Voláteis. Produtos com Ação Antimicrobiana.

ABSTRACT

Ocimum gratissimum (Linn.) is a medicinal plant popularly known as “wild basil” widely used in folk medicine. The plant has numerous compounds, and eugenol is the major constituent of its essential oil and likely the responsible for its antimicrobial activity. The aim of this study was to determine the antimicrobial activity and the mechanism of action of the essential oil extracted from the leaves of *O. gratissimum* L. (OEOg) against standard strains of *Candida*. The chemical characterization of OEOg constituents was performed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). To evaluate the antimicrobial activity of OEOg the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was determined. The effect of time of exposure to OEOg and commercial antifungals, the modulating effect of OEOg in antifungal (ATF) activity for clinical use and the effects of the OEOg on different growth phases of *Candida spp* were another performed assays. The mechanism of action of OEOg was analyzed by the uptake of crystal violet test and the evaluation of microbial morphology by microculture of yeast technique. The effect of OEOg on red blood human cells was also evaluated. Eight standard strains of *Candida* were used to perform the assays: *Candida albicans* ATCC 10231; *Candida albicans* ATCC 44858; *C. albicans* ATCC 64124; *C. albicans* ATCC 90028; *C. albicans* ATCC 90029; *Candida parapsilosis* ATCC 90018; *Candida tropicalis* ATCC 750; *Candida tropicalis* ATCC 13803. OEOg was able to inhibit the growth of the strains *C. albicans* ATCC 10231 (MIC = 1,25 mg/mL), *C. albicans* ATCC 64124 (MIC = 0,625 mg/mL), *C. parapsilosis* ATCC 90018 (MIC = 1,25 mg/mL), *C. tropicalis* ATCC 13803 (MIC = 1,25 mg/mL), being able to reduce the growth rate of strains of *Candida* after 24 hours of exposure. For the OEOg-ATF associations, it was found a predominance of indifferent and antagonistic effects to *Candida* strains tested. The OE was able to positively modulate the action of ketoconazole against *C. tropicalis* ATCC 13803. OEOg was able to reduce the number of viable cells at all stages of microbial growth. The OEOg was able to promote a slight increase in uptake of crystal violet and caused changes in the ultrastructure of yeast, suggesting that its action target is the cell envelope. OEOg was slightly toxic to red blood human cells. The results showed that the OEOg has good activity against *Candida* yeasts, and its mechanism of action is possibly related to damage in the cell envelope. It has been observed low toxicity on human erythrocytes indicating that the “wild basil” is a promising plant for the development and elaboration of a new drug with potential activity for the treatment of fungal diseases, needing additional studies.

Keywords: Ocimum. Volatile Oils. Products with Antimicrobial Action.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– <i>Ocimum gratissimum</i> Linn	28
Figura 2	– Espécie de <i>Ocimum gratissimum</i> L. cultivada no Horto de Plantas Medicinais Professor Francisco José de Abreu Matos (UFC).....	31
Figura 3	– Fluxograma de preparo das diluições seriadas do OEOg.....	32
Figura 4	– Fluxograma do método da microdiluição em caldo de cultura para determinação da CIM (CLSI, 2008).....	34
Figura 5	– Fluxograma da determinação das curvas de crescimento microbiano de cepas padrão de <i>Candida</i>	35
Figura 6	– Fluxograma da determinação do efeito do tempo de exposição ao OEOg na viabilidade de cepas padrão de <i>Candida</i>	36
Figura 7	– Fluxograma da determinação do efeito do OEOg sobre cepas padrão de <i>Candida</i> nas fases de crescimento exponencial e estacionário.....	37
Figura 8	– Fluxograma da determinação do efeito modulador do OEOg na atividade de ATF de uso clínico sobre cepas padrão de <i>Candida</i> pelo método <i>Checkerboard</i>	38
Figura 9	– Fluxograma do ensaio de captação do cristal violeta para observação de alterações permeabilidade da membrana celular pelo OEOg em cepas padrão de <i>Candida</i> pela técnica do cristal violeta.....	40
Figura 10	– Fluxograma do ensaio do microcultivo para observação de alterações morfológicas pelo OEOg em cepas padrão de <i>Candida</i> pela técnica do microcultivo.....	41
Figura 11	– Fluxograma do ensaio de determinação da citotoxicidade do OEOg sobre hemácias humanas.....	42
Figura 12	– Cromatograma do OEOg obtido por cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massas (CG-EM).	43
Figura 13	– Micromorfologia de <i>C. albicans</i> ATCC 10231	63
Figura 14	– Micromorfologia de <i>C. albicans</i> ATCC 64124.	64
Figura 15	– Micromorfologia de <i>C. parapsilosis</i> ATCC 90018.....	65
Figura 16	– Micromorfologia de <i>C. tropicalis</i> ATCC 13803.....	66

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	– Atividade antimicrobiana do OEOg sobre a cepa <i>C. albicans</i> ATCC 10231.....	45
Gráfico 2	– Atividade antimicrobiana do OEOg sobre a cepa <i>C. albicans</i> ATCC 64124.....	45
Gráfico 3	– Atividade antimicrobiana do OEOg sobre a cepa <i>C. parapsilosis</i> ATCC 90018.....	46
Gráfico 4	– Atividade antimicrobiana do OEOg sobre a cepa <i>C. tropicalis</i> ATCC 13803.....	47
Gráfico 5	– Curva de crescimento de <i>C. albicans</i> ATCC 10231.....	48
Gráfico 6	– Curva de crescimento de <i>C. albicans</i> ATCC 64124.....	49
Gráfico 7	– Curva de crescimento de <i>C. parapsilosis</i> ATCC 90018.....	49
Gráfico 8	– Curva de crescimento de <i>C. tropicalis</i> ATCC 13803.....	49
Gráfico 9	– Efeito do tempo de exposição do OEOg na viabilidade de <i>C. albicans</i> ATCC 10231.....	50
Gráfico 10	– Efeito do tempo de exposição do OEOg na viabilidade de <i>C. albicans</i> ATCC 64124.....	51
Gráfico 11	– Efeito do tempo de exposição do OEOg na viabilidade de <i>C. parapsilosis</i> ATCC 90018.....	51
Gráfico 12	– Efeito do tempo de exposição do OEOg na viabilidade de <i>C. tropicalis</i> ATCC 13803.....	52
Gráfico 13	– Efeito do OEOg sobre <i>C. albicans</i> ATCC 10231 nas fases de crescimento exponencial e estacionário.....	53
Gráfico 14	– Efeito do OEOg sobre <i>C. albicans</i> ATCC 64124 nas fases de crescimento exponencial e estacionário.....	54
Gráfico 15	– Efeito do OEOg sobre <i>C. parapsilosis</i> ATCC 90018 nas fases de crescimento exponencial e estacionário.....	55
Gráfico 16	– Efeito do OEOg sobre <i>C. tropicalis</i> ATCC 13803 nas fases de crescimento exponencial e estacionário.....	56
Gráfico 17	– Captação do cristal violeta por <i>C. albicans</i> ATCC 10231 exposta ao OEOg.....	60
Gráfico 18	– Captação do cristal violeta por <i>C. albicans</i> ATCC 64124 exposta ao OEOg.....	61

	OEOg.....	
Gráfico 19	– Captação do cristal violeta por <i>C. parapsilosis</i> ATCC 90018 exposta ao OEOg.....	61
Gráfico 20	– Captação do cristal violeta por <i>C. tropicalis</i> ATCC 13803 exposta ao OEOg.....	62
Gráfico 21	– Atividade hemolítica do OEOg sobre hemácias humanas.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Constituintes químicos do OEObg.....	44
Tabela 2 – CIM do OEObg e de antifúngicos sobre cepas padrão de <i>Candida</i>	44
Tabela 3 – Efeito modulador do OEObg na atividade antifúngica do Cetoconazol sobre cepas padrão de <i>Candida</i>	57
Tabela 4 – Efeito modulador do OEObg na atividade antifúngica do Miconazol sobre cepas padrão de <i>Candida</i>	58
Tabela 5 – Efeito modulador do OEObg na atividade antifúngica da Nistatina sobre cepas padrão de <i>Candida</i>	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variação
ATCC	<i>American Type Cultura Collection</i>
ATF	Antifúngico
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>C. parapsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
<i>C. tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>
CET	Cetoconazol
CG/EM	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa
CIF	Concentração Inibitória Fracionada
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standard Institute</i>
CSD	Caldo Sabouraud Dextrose
DO	Densidade Óptica
DO _{550nm}	Densidade Óptica a 550 nanômetros
DO _{620nm}	Densidade Óptica a 620 nanômetros
EPM	Erro Padrão Médio
G	Gravidade
ICIF	Índice de Concentração Inibitória Fracionada
IK	Índice de retenção de Kovats
LabMicro	Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada
logUFC/mL	Logarítmo de unidades formadoras de células por mililitro
mg	Miligrama
MIC	Miconazol
min	Minutos
mL	Mililitros
NIS	Nistatina
nm	Nanômetro
OE	Óleo essencial
OEOg	Óleo essencial extraído das folhas frescas de <i>Ocimum gratissimum</i> L.
OEOg+ATF	Associação do óleo essencial extraído das folhas frescas de <i>Ocimum</i>

gratissimum L. e antifúngicos

PADETEC

Parque de Desenvolvimento Tecnológico do Ceará

PBS

Tampão Fosfato Salina

μL

Microlitro

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
β	Beta
\geq	Maior e igual
\leq	Menor e igual
$<$	Maior que
$>$	Menor que
*	Asterisco
α	Alfa
γ	Gama
δ	Delta
χ	Chi
ε	Épsilon
φ	Phi
η	Etá

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	19
2.1	Óleos essenciais.....	19
2.2	Mecanismo de ação de óleos essenciais.....	20
2.3	Resistência microbiana.....	21
2.4	Associações de produtos naturais a agentes antimicrobianos sintéticos....	23
2.5	O gênero <i>Candida</i>	24
2.6	Plantas medicinais.....	25
2.7	O gênero <i>Ocimum</i> e a espécie <i>Ocimum gratissimum</i> L.....	27
3	OBJETIVOS.....	30
3.1	Objetivo geral.....	30
3.2	Objetivos específicos.....	30
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
4.1	Aspectos éticos.....	31
4.2	Material botânico.....	31
4.3	Extração, análise fitoquímica e preparo das diluições do óleo essencial de folhas frescas de <i>Ocimum gratissimum</i> L. (OEOb).....	31
4.3.1	<i>Extração do OEOb</i>	31
4.3.2	<i>Análise fitoquímica do OEOb</i>	32
4.3.3	<i>Preparação das diluições seriadas do OEOb</i>	32
4.4	Cepas microbianas utilizadas.....	32
4.5	Antimicrobianos, meios de cultura e reagentes.....	33
4.6	Ensaio microbiológico.....	33
4.6.1	<i>Determinação da Atividade Antimicrobiana do OEOb</i>	33
4.6.2	<i>Efeito do tempo de exposição do OEOb na viabilidade de cepas padrão de Candida na fase de crescimento exponencial</i>	34
4.6.3	<i>Efeito do OEOb sobre cepas padrão de Candida nas fases de crescimento exponencial e estacionário</i>	36
4.6.4	<i>Estudo do efeito modulador do OEOb na atividade de antifúngicos de uso clínico pelo método do Checkerboard</i>	37
4.6.5	<i>Estudo do mecanismo de ação do OEOb</i>	39

4.6.5.1	<i>Detecção de alteração na permeabilidade da membrana celular de cepas padrão de Candida pelo ensaio de captação de cristal violeta.....</i>	39
4.6.5.2	<i>Detecção de alteração no fator de virulência de cepas padrão de Candida pela técnica do microcultivo.....</i>	40
4.7	<i>Estudo da citotoxicidade do OEObg sobre hemácias humanas.....</i>	41
4.8	Análise estatística.....	42
5	RESULTADOS.....	43
5.1	Composição química do OEObg.....	43
5.2	Ensaio microbiológicos.....	44
5.2.1	<i>Avaliação da atividade antimicrobiana do OEObg.....</i>	44
5.2.2	<i>Efeito do tempo de exposição do OEObg na viabilidade microbiana de cepas padrão de Candida na fase de crescimento exponencial.....</i>	47
5.2.3	<i>Efeito do OEObg sobre cepas padrão de Candida nas fases de crescimento exponencial e estacionária.....</i>	52
5.2.4	<i>Efeito modulador do OEObg na atividade de antifúngico de uso clínico.....</i>	57
5.2.5	<i>Mecanismo de ação do OEObg sobre cepas padrão de Candida.....</i>	59
5.2.5.1	<i>Alteração na permeabilidade da membrana celular.....</i>	59
5.2.5.2	<i>Alteração no fator de virulência leveduriforme.....</i>	62
5.3	<i>Atividade hemolítica do OEObg.....</i>	66
6	DISCUSSÃO.....	68
7	CONCLUSÃO.....	77
	REFERÊNCIAS.....	78
	ANEXO A: PARECER CONSUBSTANCIADO COMITÊ DE ÉTICA...	87

1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas no tratamento e na cura de enfermidades é tão antigo quanto a espécie humana (MACIEL; PINTO; VEIGA JUNIOR, 2002). Nas últimas décadas, é notável a intensificação das pesquisas pela busca de compostos farmacologicamente ativos, visando uma forma terapêutica mais segura e acessível à população, já que alguns desses compostos simbolizam o único recurso terapêutico de muitas comunidades (ALVES, 2011; CECHINEL; YUNES, 1998; NOLDIN, 2005).

Estudos de Matos (1998) demonstram que o principal uso de plantas medicinais é no tratamento das doenças respiratórias, seguido das inflamações em geral e das diversas formas de doenças intestinais. Esse autor documentou informações farmacológicas que justificam o uso popular de muitas espécies de plantas medicinais do nordeste brasileiro, entre elas encontra-se o *Ocimum gratissimum* Linn.

A espécie *Ocimum gratissimum* L. é originária da Ásia e subspontânea em todo o Brasil. Suas folhas e ramos são aromáticos e usados empiricamente nas práticas de medicina caseira como estimulante, carminativa e diurética, tendo também indicação no uso contra tosse e, na forma de banhos, contra gripe em crianças, moléstias nervosas e paralisias. É também excelente condimento em culinária (MATOS, 2007).

Recentemente as pesquisas sobre a atividade antimicrobiana de extratos de plantas, óleos essenciais e seus componentes têm-se centralizado no campo da medicina e terapêutica. Esse interesse é justificado pelo aumento da resistência aos antimicrobianos sintéticos comerciais por patógenos associados a doenças infecciosas (REICHLING *et al.*, 2009, TAVARES *et al.*, 2005).

Nas últimas décadas, houve um aumento no número de infecções fúngicas, especialmente em pacientes imuno-comprometidos ou em tratamento prolongado com antibióticos. *Candida albicans* é o agente causador da maioria das candidíases, mas outras espécies emergentes de *Candida*, incluindo *C. glabrata* e *C. krusei*, estão sendo responsáveis pela ocorrência de muitas infecções nosocomiais (AHMAD *et al.*, 2011).

A ocorrência de casos de resistência dessa levedura a antifúngicos vem fazendo com que o gênero *Candida* seja objeto cada vez mais frequente de estudos relacionados à atividade antimicrobiana (AHMAD *et al.*, 2010, DUARTE *et al.*, 2005). Assim, a pesquisa de novas substâncias capazes de combater infecções por *Candida*, ou mesmo melhorar a ação dos antifúngicos comumente usados na clínica, pode ser um caminho interessante a ser trilhado na luta contra a resistência e na redução das limitações do tratamento convencional,

como efeitos adversos e a alta toxicidade (ZUZARTE, *et al.*, 2012).

Portanto, sabendo que as plantas são capazes de produzir uma variedade de compostos com propriedades antimicrobianas, espera-se que programas de rastreio, como o que será realizado, possam levar à descoberta de compostos que auxiliem no desenvolvimento de novas drogas antimicrobianas, além de promoverem o enriquecimento de conhecimentos sobre a inesgotável fonte medicinal natural: a flora mundial (DUARTE, *et al.* 2005; MACIEL; PINTO; VEIGA JUNIOR, 2002).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Óleos essenciais

A demanda mundial de óleos essenciais tem aumentado durante os últimos anos (PANDEY; SINGH; TRIPATHI, 2014). Os óleos essenciais são relatados em plantas aromáticas, amplamente distribuídas em países mediterrâneos e tropicais em todo o mundo sendo utilizados como um componente fundamental dos sistemas de medicina nativos. Quase todos os órgãos de plantas aromáticas contêm óleos essenciais.

Atualmente se observa uma tendência à busca pela obtenção de fitoconstituintes a partir de extratos, frações, óleos fixos ou essenciais, obtidos de espécies vegetais visando uma possível aplicação na prática terapêutica no tratamento de processos infecciosos causados por fungos, bactérias, parasitas e vírus. Dentro desse escopo, os óleos essenciais assumem uma posição de destaque (MARTINS, 2009).

Os óleos essenciais, vegetais ou óleos voláteis, são misturas de compostos orgânicos que apresentam como principais propriedades a volatilidade, aroma intenso, imiscibilidade em água e solubilidade em solventes orgânicos (SOUZA, 2010). Constituem-se dos elementos contidos em muitos sítios vegetais e desempenham importante papel, sendo necessários à sobrevivência da espécie, principalmente na defesa contra micro-organismos (ROCHA, 2012).

Óleos essenciais são compostos líquidos, complexos, orgânicos, lipofílicos, voláteis, aromáticos, também conhecidos como óleos voláteis, óleos etéreos ou essenciais. São extraídos de diversas partes das plantas – como folhas, flores, sementes, brotos, galhos, cascas de caule, frutos e raízes – por alguns processos específicos, sendo um dos mais frequentemente utilizados, a destilação por arraste a vapor d'água (CRAVEIRO *et al.*, 1981; MARTINS, 2009).

Originam-se do metabolismo secundário das plantas e possuem composição química de enorme complexidade, sendo constituídos por uma mistura de cerca de 20 a 60 componentes em diferentes concentrações. Possuem normalmente dois ou três constituintes majoritários encontrados em maiores concentração (20-70%) quando comparados aos outros componentes presentes em quantidades traço (PANDEY; SINGH; TRIPATHI, 2014). Dentre seus constituintes, destacam-se principalmente a presença de terpenos e fenilpropanoides (GONÇALVES *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2003).

Sua composição bastante variável pode ser explicada pelo fato de o metabolismo primário e secundário das plantas ser afetado por diversos fatores externos (BIASI *et al.*, 2009). Estudos realizados comprovam que o meio ambiente no qual a espécie vegetal se desenvolve e o tipo de cultivo a qual foi submetida influenciam diretamente a composição química dos óleos essenciais (CHAVES, 2001). Outros fatores como temperatura, umidade relativa, a exposição ao sol e o regime de ventos também exercem influência na composição, principalmente em espécies que possuem estruturas de estocagem superficiais (DE MORAIS *et al.*, 2006; SALES, 2014).

Várias são as propriedades farmacológicas atribuídas aos óleos essenciais (OEs). Estudos já realizados constataam diversos efeitos biológicos apresentados por eles, tais como atividade antioxidante (CAMPÊLO *et al.*, 2011), antiparasitária (PESSOA *et al.*, 2002), analgésica (SILVA *et al.*, 2012), anti-inflamatória (MENDES *et al.*, 2010), antimicrobiana (TEXEIRA, 2009), antifúngica (FARIA *et al.*, 2006) e anticâncer (SYLVESTRE *et al.*, 2006).

O uso de óleos essenciais, como agentes antimicrobianos, oferece um baixo risco de desenvolvimento de resistência microbiana, pois sendo misturas de diferentes compostos, sua atividade pode estar relacionada a diferentes mecanismos de ação o que dificulta a adaptação dos micro-organismos (DAFERERA; ZIOGAS; POLISSIOU, 2003).

Tendo em vista a descoberta de compostos de origem natural com mecanismo de ação seletivo, o potencial terapêutico apresentado pelos óleos essenciais e seus fitoconstituintes e ainda o fato de vários antibióticos sintéticos apresentarem efeitos colaterais e espectro de ação limitada, fica fácil perceber os OEs como uma alternativa promissora na terapia antifúngica como na combinação de produtos naturais com a terapia antimicrobiana sintética. (MARTINS, 2009; SOUZA, 2010).

Por esse motivo, os óleos essenciais assumem importante papel como alternativa para o problema de resistência microbiana, que vem sendo motivo de preocupação constante no tratamento das doenças infecciosas.

2.2 Mecanismo de ação de óleos essenciais

Muitos óleos essenciais são conhecidos por exercer atividade antimicrobiana, mas seus mecanismos de ação não são totalmente compreendidos.

Segundo Burt (2004), considerando o grande número de diferentes grupos de compostos químicos presentes em óleos essenciais, o mais provável é que a sua atividade antimicrobiana não seja atribuível a um mecanismo específico, mas que existam vários alvos

celulares.

Uma característica importante dos OEs e de seus constituintes é a sua hidrofobicidade, o que lhes permite partição nos lipídios da membrana celular microbiana e mitocôndrias desarranjando as estruturas, tornando-as mais permeáveis. Os OEs também parecem agir nas proteínas de membrana e nas enzimas como as ATPases – que são cercadas por moléculas lipídicas. Além disso, sugere-se que os hidrocarbonetos cíclicos, lipofílicos, poderiam acumular-se na bicamada lipídica, distorcendo a interação lipídeo-proteína, ou que ocorra a interação direta dos compostos lipofílicos com as partes hidrofóbicas das proteínas (BURT, 2004). A presença de óleos essenciais interfere também no mecanismo de reparo necessário para a divisão celular dos micro-organismos. Assim, pode-se dizer que os óleos essenciais atuam sobre as membranas dos micro-organismos, promovendo sua ruptura (MARTINS, 2009).

Nakamura *et al.* (2004) citam que, apesar de apresentar atividade antifúngica bem definida, o mecanismo de ação do óleo essencial de *O. gratissimum* não é bem compreendido. Estudos realizados pelos autores sugerem que o efeito deletério do óleo essencial na parede celular dos fungos é o principal mecanismo de ação do óleo essencial de *Ocimum gratissimum* (OEOg) devido a observação de alterações na morfologia geral de leveduras quando expostas à ação do óleo.

Devi *et al.* (2010), descreveram como principal mecanismo de ação do eugenol, componente majoritário descrito no OEOg, o aumento da penetrabilidade na membrana citoplasmática, promovendo seu rompimento e aumentando sua permeabilidade não específica, o que levaria a um extravasamento do conteúdo celular e posterior morte do micro-organismo.

Muitos estudos comprovam cientificamente a atividade antimicrobiana de diversos óleos essenciais e seus constituintes, mas pouco se sabe sobre seu mecanismo de ação (FARIA *et al.*, 2006; TEIXEIRA, 2009; WALSH *et al.*, 2003). No entanto, o conhecimento desse mecanismo assume extrema importância para a segurança do uso desses produtos, assim como para o uso combinado de OEs e agentes sintéticos.

2.3 Resistência microbiana

A resistência microbiana é um tema amplamente pesquisado por diversos autores em decorrência do impacto desse evento na saúde coletiva, já que resulta em crescente morbidade e mortalidade, como também eleva os custos com saúde. À medida que os

antimicrobianos vão sendo utilizados indiscriminadamente, aumenta-se o número de cepas microbianas resistentes às drogas mais utilizadas na terapia humana (FRANCO *et al.*, 2010).

Resistência microbiana pode ser definida como a capacidade de uma cepa microbiana crescer, *in vitro*, na presença das concentrações que a droga atinge no sangue e pode ser de dois tipos: natural ou intrínseca e adquirida. A resistência natural ou intrínseca faz parte das características biológicas primitivas dos micro-organismos e é observada regularmente em uma determinada espécie microbiana. A resistência adquirida é aquela que surge em um micro-organismo, primitivamente sensível ao mesmo antimicrobiano, devido a mutações ou por meio de transferências do material genético (KONEMAN *et al.*, 2001, TAVARES, 2001; TORTORA; FUNKE; CASE, 2000).

Através de vários mecanismos de resistência o micro-organismo pode resistir total ou parcialmente à ação de um ou mais antimicrobianos pertencentes à mesma ou a diferentes classes terapêuticas (OTAIZA, 2002). Alguns deles são: alteração da estrutura molecular de antimicrobianos ou produção de enzimas que inativam a droga (por ex.: β -lactamases), alteração das proteínas ligantes da penicilina ou outros pontos-alvo nas paredes das células, alvos modificados da DNA-girase, mutações de permeabilidade e modificações ribossômicas (SOUZA, 2010).

Muitos fatores contribuem para o aumento da resistência microbiana dentro e fora dos hospitais, dentre eles o uso excessivo de antimicrobianos, o uso de doses inferiores às sugeridas em manuais terapêuticos, condições de higiene precárias, o aumento do número de pacientes imunocomprometidos e a lentidão para o diagnóstico das infecções (FERREIRA; PAES; LINCHTENSTEIN, 2008).

Com frequência, as infecções fúngicas são de difícil tratamento devido à aquisição, por parte de seus agentes etiológicos, de resistência frente à ação de antifúngicos (ARAÚJO, 2004). Além disso, observa-se que um maior número de cepas está se tornando resistente aos antifúngicos atualmente utilizados e o aparecimento de novas cepas de fungos comensais que se tornaram patogênicos (SOUZA, 2010).

De forma convencional, o tratamento de infecções por *Candida* é feito através do uso de agentes antifúngicos sintéticos, tópicos e/ou sistêmicos – sendo os derivados azólicos e os poliênicos os mais comuns – associado a medidas que visam melhorar a imunidade celular. Dentre os compostos poliênicos, destacam-se a nistatina e a anfotericina-B, e, dentre os compostos azólicos, os mais utilizados são o miconazol, cetoconazol e, mais recentemente, os tiazólicos fluconazol e itraconazol (MARTINS, 2009).

No entanto, as drogas antifúngicas disponíveis contra os micro-organismos

causadores de micoses severas possuem eficácia limitada, principalmente em pacientes imunodeprimidos, o que leva ao rápido desenvolvimento de micro-organismos resistentes, diminuindo ainda mais a capacidade terapêutica dessas substâncias (SVETAZ *et al.*, 2007). Outro problema é o fato de o tratamento convencional para as doenças fúngicas ser muito restrito devido ao espectro limitado dos antifúngicos atuais – particularmente quando comparado à quantidade de antibacterianos disponíveis – e por conta do alto custo do tratamento, ainda mais quando se necessita de uso prolongado (MARTINS, 2009).

Tendo em vista as limitações dos antifúngicos sintéticos existentes atualmente, quer seja com relação a efeitos colaterais ou à disponibilidade dos mesmos e o atual quadro de resistência dos micro-organismos aos antibióticos corriqueiramente utilizados na prática clínica, ressalta-se a importância da pesquisa por novos e melhores agentes antifúngicos para combatê-los.

2.4 Associações de produtos naturais a agentes antimicrobianos sintéticos

O uso de combinações de drogas antimicrobianas é extensivamente utilizado na terapia de doenças infecciosas, como por exemplo, no tratamento da tuberculose e hanseníase, especialmente para evitar a seleção de cepas resistentes. Além do efeito sinérgico alcançado pela utilização de combinações de dois ou mais compostos no tratamento de doenças infecciosas, essa prática geralmente é superior à utilização de um único composto, por evitar ou impedir o surgimento de cepas resistentes, por diminuir a toxicidade relacionada à dose utilizada – já que possibilita o uso de dosagens reduzidas – e por alcançar o amplo espectro de ação (ELIOPOULOS; MOELLERING, 1991).

Estudos relacionados à ação antimicrobiana de produtos vegetais e a possibilidade de seu sinergismo com agentes antimicrobianos convencionais tem sido frequente e os resultados apresentados são bastante satisfatórios (BETONI *et al.*, 2006; ROCHA, 2012).

O efeito da combinação de agentes antimicrobianos foi estudado por Rakholiya e Chanda (2012). Utilizando o extrato metanólico de duas plantas medicinais (*Terminalia catappa* e *Carica papaya*) em associação com antimicrobianos de uso comum contra bactérias Gram positivo e negativo, os autores encontraram efeito sinérgico em quase todos os antibióticos usados contra as bactérias testadas, o que permitiu a conclusão de que a combinação entre o extrato de plantas medicinais e os antibióticos pode ser útil no combate a micro-organismos com resistência emergente a drogas.

Amber *et al.* (2010), ao avaliarem a atividade antifúngica e os efeitos sinérgicos do óleo essencial de *Ocimum sanctum* (OSEO) com fluconazol e cetoconazol, observaram que o OSEO sozinho e em combinação com os antifúngicos apresentou uma intensa inibição do crescimento das cepas de *Candida*. Os autores obtiveram grande número de interações sinérgicas entre o óleo essencial e os antifúngicos de uso clínico.

Considerando que melhorias na eficácia da terapia de drogas antifúngicas pode ser conseguido usando terapia de combinação (AMBER *et al.*, 2010), a utilização de agentes antimicrobianos naturais como óleos essenciais de plantas, vem a ser uma alternativa eficaz no controle de micro-organismos resistentes, seja na inibição do micro-organismo, seja na interação sinérgica com os antimicrobianos (RIBERO; VELOZO; GUIMARÃES, 2013).

2.5 O gênero *Candida*

Os fungos são micro-organismos eucarióticos mais complexos, quando comparados às bactérias e aos vírus. Possuem espessa parede constituída por quitina (N-acetilglicosamina) e polissacarídeos, além de uma membrana celular, cujo principal componente é o ergosterol (SOUSA *et al.*, 2004).

Apesar da grande diversidade de fungos conhecidos, poucos invadem os tecidos humanos. Estes fungos são comumente saprófitos do solo e da vegetação sendo a transmissão de pessoa para pessoa bastante rara (MARTINS, 2010).

No organismo do hospedeiro, em condições normais, estes micro-organismos comportam-se de forma não patogênica. No entanto, em situações de imunossupressão ou alterações sistêmicas, alguns assumem o comportamento de patógenos causando manifestações infecciosas que vão desde infecções superficiais até disseminações sistêmicas graves com envolvimento em múltiplos órgãos. Dentre essas infecções oportunistas, a candidíase tem sido a mais documentada nos diferentes grupos de pacientes imunocomprometidos (SILVA, 2012).

Segundo Alves *et al.* (2006), a *Candida* é um micro-organismo saprófito e comensal, que, dependendo de fatores predisponentes capazes de alterar a integridade orgânica, sofre modificações na sua conformação leveduriforme para uma forma fusiforme, tornando-se patogênico. Considerando que a maioria dos pacientes infectados com agentes fúngicos oportunistas têm Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida (AIDS) ou doença neoplásica e/ou degenerativa, é evidente que a eficácia da terapia antifúngica é crítica (GOLDMAN *et al.*, 2004).

O gênero *Candida* conta com espécies que podem se apresentar sob a forma de leveduras (inócuas) ou hifas (patogênicas). Dependendo das condições ambientais, como pH, temperatura e reservas nutricionais, alteram seu fenótipo, formando pseudo-hifas, passando de blastoconídios para crescimento micelial. Também podem se desenvolver como hifas verdadeiras e clamidoconídios. A *C. albicans* pode se apresentar sob várias formas, chamadas de variações adaptativas, sendo a forma de hifa a mais virulenta e a mais aderente, quando comparada à célula leveduriforme. Dessa forma, a capacidade dessa espécie de formar tubos germinativos parece contribuir para sua virulência. (MARTINS, 2010). O gênero compreende cerca de 150 espécies e, dentre elas, sete representantes são reconhecidas como patógenos importantes: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. kefyr* e *C. guilliermondi*.

Nas últimas décadas, houve um aumento significativo no número de infecções fúngicas invasivas as quais são caracterizadas por alta morbidade e mortalidade e aumentam o tempo de internação dos pacientes, constituindo um importante problema de saúde pública (SILVA, 2012).

Os processos emergentes de resistência a drogas em *Candida spp.* têm sido principalmente atribuídos ao uso excessivo e prolongado de antifúngicos, causando sérios problemas quanto a eficácia no tratamento (SINGH, MAHTO, PRASAD, 2013), o qual é limitado pelo reduzido número de drogas antifúngicas disponíveis no mercado quando comparadas às antibacterianas.

Diante desses fatos, faz-se necessário o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas, como por exemplo, o uso de combinações de fármacos com atividade antifúngica (SILVA, 2012), o que mostra a importância da realização de pesquisas nas indústrias farmacêuticas, centros de pesquisas e Universidades em busca de novos fármacos com propriedades antifúngicas.

2.6 Plantas medicinais

A utilização de plantas na arte de curar possui raízes muito antigas, relacionadas ao início da prática médica, nas diferentes sociedades. Inicialmente seu emprego era, em grande medida, relacionado ao mítico, sobressaindo seu aspecto mágico (CORRÊA; SIQUEIRA-BATISTA; QUINTAS, 2008).

Ainda hoje, as plantas medicinais têm sido utilizadas em países em desenvolvimento como tratamentos alternativos para problemas de saúde. Observa-se uma intensificação do uso de plantas para fins medicinais, até mesmo pelas populações de países

mais industrializados, principalmente devido o alto custo das pesquisas voltadas à descoberta e fabricação de novos medicamentos sintéticos, aumento do número de doenças resultantes do uso excessivo de quimioterápicos e questões de ordem socioeconômicas (CHAVES, 2001).

Nos últimos anos, vem se percebendo um aumento na quantidade de estudos com produtos terapêuticos de plantas medicinais. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), as plantas medicinais são as fontes para se obter uma variedade de drogas, e cerca de 80% da população mundial usa a medicina tradicional na busca de alívio de alguma sintomatologia dolorosa ou desagradável. A seleção de plantas a partir de informações da medicina tradicional ou popular pode conduzir à descoberta de moléculas promissoras (SANTOS *et al.*, 2007).

Por apresentar a maior biodiversidade do mundo, o Brasil possui grande potencial para o desenvolvimento de fitomedicamentos. Outros fatores que influenciam o estudo de plantas medicinais são: a ampla sociodiversidade, o uso de plantas medicinais vinculado ao conhecimento tradicional e a disponibilidade de tecnologia para validar cientificamente esse aprendizado (MARTINS, 2010).

Em 2006, o governo federal instituiu o Grupo de Trabalho Interministerial para elaboração do Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF), o qual visa garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional e que tem como objetivos: inserir plantas medicinais, fitoterápicos e serviços relacionados à fitoterapia no SUS, desenvolver instrumentos de fomento à pesquisa, desenvolvimento de tecnologias e inovações em plantas medicinais e fitoterápicos, nas diversas fases da cadeia produtiva, promover e reconhecer as práticas populares e tradicionais de uso de plantas medicinais, fitoterápicos e remédios caseiros, bem como estabelecer uma política intersetorial para o desenvolvimento socioeconômico na área de plantas medicinais e fitoterápicos (BRASIL, 2009).

Muitos extratos de plantas e óleos essenciais têm apresentado atividade biológica *in vitro* e *in vivo*, o que justifica pesquisas na medicina tradicional focada na caracterização da atividade antimicrobiana dessas plantas (DUARTE *et al.*, 2005).

Segundo Maciel, Pinto e Veiga Junior (2002), a escolha da planta para utilização em estudos que avaliam suas propriedades farmacológicas é feita considerando o seu uso terapêutico, o estudo etnobotânico, a presença de determinadas substâncias e a sua disponibilidade. É nesse contexto que se enquadram os estudos relacionados à etnobotânica e/ou etnofarmacologia, ciências que se ocupam, respectivamente, da inter-relação direta entre

peças e plantas e do estudo de preparações tradicionais utilizadas em sistemas de saúde e doença que incluem isoladamente ou em conjunto plantas, animais, fungos ou minerais, importantes ferramentas na busca por substâncias naturais de ação terapêutica, auxiliando na aquisição de dados sobre as plantas medicinais, preservação do ecossistema, e na procura por substâncias naturais com ação terapêutica (OLIVEIRA, 2013).

Diante de um interesse crescente em torno de fitomedicamentos, justificado pelas inúmeras vantagens, quando comparados aos fármacos sintéticos, como a menor incidência de efeitos colaterais e adversos, toxicidade relativa diminuída, baixo custo, tudo isso aliado a enorme biodiversidade brasileira, o uso de plantas pode ser uma alternativa para a substituição de antissépticos e desinfetantes sintéticos convencionais, visando evitar o desenvolvimento de resistência microbiana a esses compostos, já que metabólitos vegetais podem atuar por variados tipos de mecanismos (ROCHA, 2012).

2.7 O gênero *Ocimum* e a espécie *Ocimum gratissimum* L.

O gênero *Ocimum*, pertence à família Lamiaceae e compreende mais de 150 espécies encontradas em regiões tropicais e subtropicais. (DAVID *et al.*, 2006). O maior número de espécies está nas florestas tropicais da África, sendo a África, América do Sul (Brasil) e Ásia os principais centros de diversidade do gênero (CHAVES, 2001).

A família Lamiaceae é uma das mais ricas famílias em óleos essenciais. É conhecida pela riqueza de espécies com propriedades medicinais, que têm sido utilizados desde tempos remotos. Muitas espécies de Lamiaceae tem longa história de utilizações como especiarias culinárias e em medicina popular. Alguns exemplos são orégano, alecrim, sálvia e tomilho. Os óleos essenciais extraídos das espécies Lamiaceae têm sido utilizados contra diferentes doenças como doenças intestinais e bronquite (PANDEY; SINGH; TRIPATHI, 2014).

O cultivo de espécies de *Ocimum* vem aumentando globalmente devido seu importante significado terapêutico e alta adaptabilidade a diferentes solos e condições climáticas. As folhas e inflorescências de *Ocimum* são ricas fontes de óleos essenciais com uma enorme variedade de terpenos em sua composição (PATEL *et al.*, 2015).

O elevado grau de polimorfismo do gênero *Ocimum* determina um grande número de subespécies, com diferentes variedades de formas e que produzem óleos essenciais com composições químicas diversas, oferecendo um vasto potencial medicinal (PANDEY; SINGH; TRIPATHI, 2014). Os critérios para classificação são muito complexos.

Características fenotípicas, como forma de folha, cor da folha, flor cor etc., tem sido tradicionalmente utilizadas para classificação taxonômica. Devido às extensas práticas de cultivo e hibridação inter e intra-específica, espécie *Ocimum* exibe enorme variabilidade morfogênica entre suas espécies, incluindo fenologia (cor, forma e tamanho das flores, folhas, caules) características de crescimento, comportamento reprodutivo e composição química (PATEL *et al.*, 2015).

No Brasil, o *Ocimum gratissimum* é conhecido como “alfavacão”, “alfavaca” e “alfavaca-cravo” é um subarbusto aromático, com até um metro de altura, originário do Oriente e subespontâneo em todo o Brasil (Figura 1). Possui folhas ovalado-lanceoladas, de bordos duplamente dentados, membranáceas, com 4 a 8 cm de comprimento. As flores são pequenas, roxo-pálidas, dispostas em racimos paniculados eretos, curtos e geralmente em grupos de três. O fruto é uma pequena cápsula seca possuindo quatro sementes (BIASI *et al.*, 2009; MATOS, 2007). Pode ser facilmente reconhecido pelo aroma forte e agradável que lembra o cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllus* Spreng) (MATOS, 1998; MATTOS *et al.*, 2007). A planta é muito cultivada em hortas, quintais e jardins a partir das sementes, adaptando-se bem a qualquer tipo de solo (MATOS, 1998).

Figura 1 – *Ocimum gratissimum* Linn.



Fonte: <http://www.prota4u.org/protav8.asp?p=Ocimum+gratissimum>

O óleo essencial (OE) de *Ocimum gratissimum* L., rico em eugenol e eucaliptol, é obtido das folhas e flores e possui evidenciado potencial farmacológico, apresentando:

atividade antibacteriana (NAKAMURA *et al.*, 1999; MATASYOH *et al.*, 2007); atividade antifúngica (FARIA, *et al.*, 2006; OLIVEIRA, 2013); atividade anti-helmíntica (PESSOA *et al.*, 2002); atividade inseticida (OGENDO *et al.*, 2008); atividade anestésica (SILVA *et al.*, 2012), entre outras.

O eugenol é descrito como o principal constituinte ativo da alfavaca. É analgésico e germicida local de uso tópico e foi muito usado na odontologia (SOUSA *et al.*, 2004; WALSH *et al.*, 2003).

Eugenol é um componente fenólico que corresponde a aproximadamente 85% do óleo no cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllis*). Concentrações sub-letais de eugenol são capazes de inibir a produção de amilase e proteases por *B. cereus*. Ele também causa a deterioração da parede celular e um elevado grau de lise celular. O grupo hidroxila do eugenol parece se ligar a proteínas, prevenindo a ação enzimática em *E. aerogenes* (BURT, 2004).

Embora possuam notável potencial antimicrobiano, os produtos derivados de plantas, como óleos essenciais e extratos vegetais, geralmente apresentam de fraca a moderada atividade, quando comparados aos agentes químicos, o que contribui para o uso preferencial desses. Uma forma de potencializar a atividade antimicrobiana de produtos naturais é a sua associação a drogas sintéticas, de uso prático. Além do possível efeito sinérgico alcançado pela utilização de associações, essa prática pode evitar ou impedir o surgimento de cepas resistentes, diminuir a toxicidade relacionada à dose utilizada e ampliar o espectro de ação (ROCHA, 2012).

Com base no exposto, o óleo essencial de *Ocimum gratissimum* foi escolhido para avaliação do potencial antimicrobiano sobre cepas de leveduras do gênero *Candida*.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Estudar o efeito do óleo essencial de folhas frescas de *O. gratissimum* L. (OEOg) na atividade de antifúngicos sobre cepas-padrão de *Candida*.

3.2 Objetivos Específicos

- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) *in vitro*, do OEOg sobre cepas-padrão de *Candida*;
- Avaliar o efeito do tempo de exposição ao OEOg na viabilidade das cepas-padrão de *Candida*;
- Avaliar o efeito modulador do OEOg na atividade de antifúngicos de uso clínico;
- Avaliar a ação do OEOg no envoltório celular de cepas-padrão de *Candida*;
- Avaliar a toxicidade, *in vitro*, do OEOg sobre hemácias humanas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará, com número do parecer: 751.168 (Anexo A).

4.2 Material botânico

As amostras de folhas frescas da espécie *Ocimum gratissimum* L. foram coletadas no Horto de Plantas Medicinais Prof. Francisco José de Abreu Matos da Universidade Federal do Ceará (Figura 2). A identificação botânica da espécie foi realizada no Departamento de Biologia Universidade Federal do Ceará, e a exsicata da espécie foi depositada no Herbário Prisco Bezerra, Departamento de Biologia-UFC, sob o número 52735.

Figura 2 – Espécie de *Ocimum gratissimum* L. cultivada no Horto de Plantas Medicinais Professor Francisco José de Abreu Matos (UFC).



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3 Extração, análise fitoquímica e preparo das diluições do óleo essencial de folhas frescas de *Ocimum gratissimum* L. (OE Og)

4.3.1 Extração do OE Og

O OE Og foi extraído no Laboratório de Produtos Naturais do Horto de Plantas

Medicinais Prof. Francisco José de Abreu Matos da Universidade Federal do Ceará, por arraste a vapor d'água em aparelho tipo Clevenger (CRAVEIRO *et al.*, 1981), no período da floração e do crescimento vegetativo da planta. As folhas foram coletadas em Novembro de 2013 às 12 horas. O rendimento da extração foi de 0,36% (p/v).

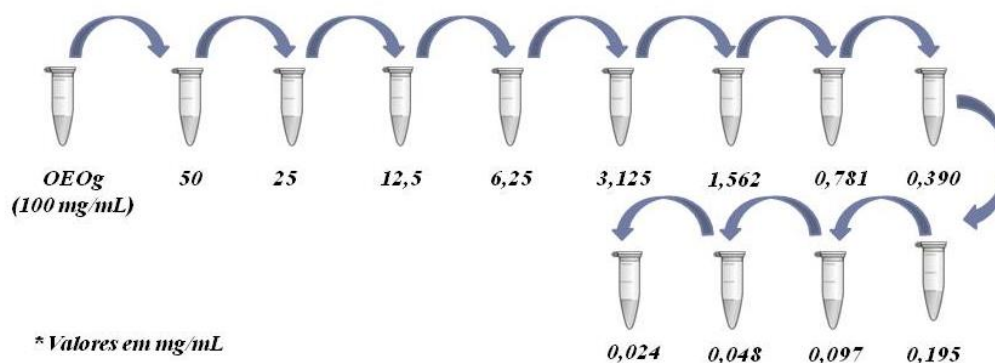
4.3.2 Análise fitoquímica do OEOg

A análise dos constituintes químicos do OEOg foi realizada no Parque de Desenvolvimento Tecnológico do Ceará (PADETEC - UFC), em cromatógrafo gasoso acoplado à espectrometria de massa (CG-EM) (MATOS *et al.*, 1998). A identificação dos constituintes do OEOg foi efetuada através da determinação dos índices de Kovats simulados (ADAMS, 2001).

4.3.3 Preparação das diluições seriadas do OEOg

Para a determinação do potencial antimicrobiano, foram preparadas diluições de OEOg, utilizando como solvente o Tween 80 a 1% em água. As concentrações de trabalho do OEOg foram de 50 mg/mL a 0,024 mg/mL (Figura 3).

Figura 3 – Fluxograma de preparo das diluições seriadas do OEOg.



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.4 Cepas microbianas utilizadas

Foram utilizadas oito cepas-padrão de *Candida*: *Candida albicans* ATCC 10231, *C. albicans* ATCC 44858, *C. albicans* ATCC 64124, *C. albicans* ATCC 90028, *C. albicans* ATCC 90029, *C. parapsilosis* ATCC 90018; *C. tropicalis* ATCC 750, *C. tropicalis* ATCC

13803.

Todas as cepas utilizadas são provenientes da *American Type Culture Collection* (ATCC) e fazem parte da coleção de culturas do Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada (LabMicro) e foram mantidas em ágar estoque sob refrigeração, de forma a conservarem inalteradas todas as suas características bioquímicas e perfil de sensibilidade a antimicrobianos. Periodicamente foram realizados repiques para meios de cultura estéreis e a pureza de cada cultura foi confirmada por microscopia, provas bioquímicas e antibiogramas.

4.5 Antimicrobianos, meios de cultura e reagentes

Os antimicrobianos cetoconazol, miconazol e nistatina foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA). Os meios de cultura e reagentes foram obtidos da Merck e da Laborclin LTDA, respectivamente.

4.6 Ensaios microbiológicos

4.6.1 Determinação da Atividade Antimicrobiana do OEOg

A determinação da atividade antimicrobiana foi feita pela Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do OEOg. Foram utilizadas as cepas de referência descritas no item 4.4.

A determinação da CIM foi realizada pelo método de microdiluição em caldo de cultura de acordo com a Norma M27-A2 (CLSI, 2008) modificada. Para realização dos ensaios foram utilizadas microplacas estéreis com 96 poços.

Culturas microbianas puras mantidas em ágar estoque sob refrigeração foram repicadas em caldo Sabouraud Dextrose 2 % (CSD) e incubadas a 35 °C até atingirem fase exponencial de crescimento. Após esse período, as culturas tiveram sua densidade celular ajustada em salina estéril, de modo a se obter uma turbidez equivalente à do tubo 0,5 da escala de McFarland, o que resulta em uma suspensão microbiana contendo aproximadamente 10^6 UFC/mL. Para a realização correta dessa etapa, foi utilizado um cartão de fundo branco com linhas pretas. Essa suspensão foi diluída 100 vezes em CSD estéril, para obtenção de uma suspensão com aproximadamente 10^4 UFC/mL.

Em cada poço da microplaca foram adicionados 100 µL de CSD, 20 µL das diferentes concentrações de óleo essencial (OE) ou dos antifúngicos de uso clínico

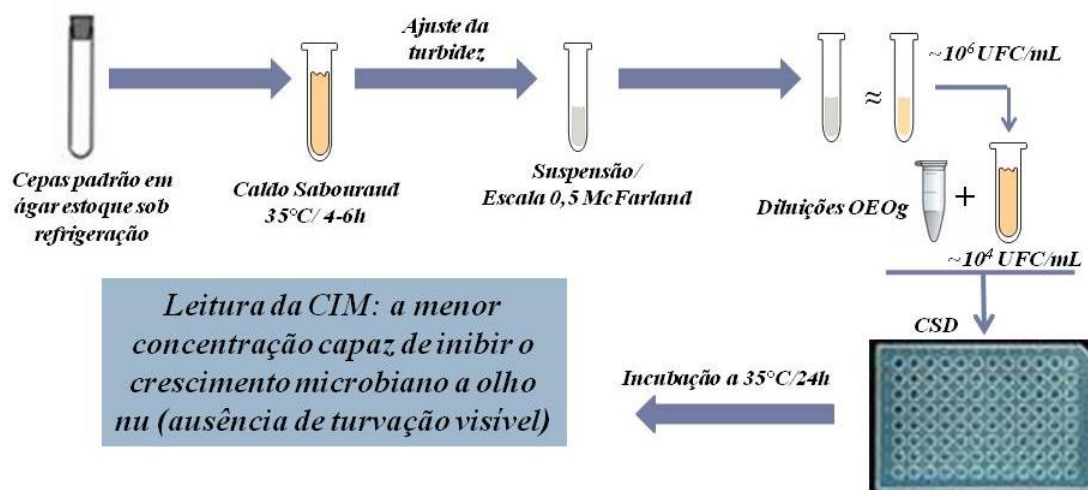
(miconazol, nistatina e cetoconazol) e 80 μ L da suspensão de micro-organismo.

Solução aquosa de Tween 80 a 1 % estéril (diluído do OEOg) e água destilada estéril foram utilizadas como controles dos experimentos.

As microplacas foram incubadas a 35 °C por 24h em estufa bacteriológica. Após esse período foi realizada inspeção visual do crescimento microbiano e a leitura da Densidade óptica a 620 nm (DO_{620nm}) em leitora de Elisa Bio-Tek.

A CIM foi considerada a menor concentração de OEOg ou de antimicrobiano capaz de inibir completamente o crescimento microbiano, mediante inspeção a olho nu (ausência de turvação visível) (Figura 4). Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos em mg/mL.

Figura 4 – Fluxograma do método da microdiluição em caldo de cultura para determinação da CIM (CLSI, 2008).



Fonte: Adaptado de TEIXEIRA, 2009.

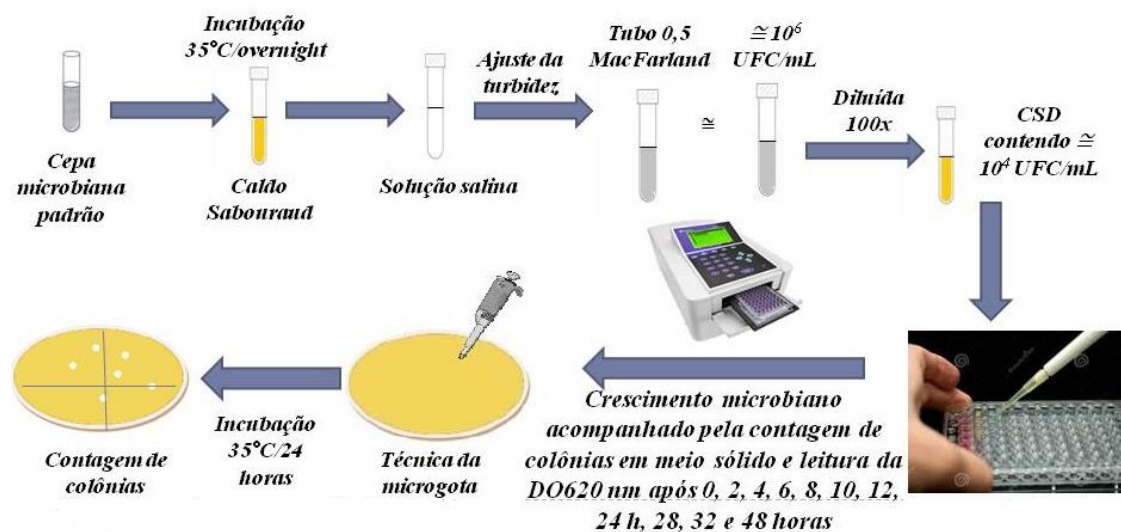
As quatro cepas mais sensíveis ao efeito do OEOg foram selecionadas, por meio da determinação da CIM, para realização dos demais experimentos.

4.6.2 Efeito do tempo de exposição do OEOg na viabilidade de cepas padrão de *Candida* na fase de crescimento exponencial

Curvas de crescimento das cepas-padrão de *Candida* foram determinadas previamente para que pudessem ser obtidas culturas microbianas nas fases de crescimento exponencial e estacionário. Para isso, culturas microbianas puras mantidas em ágar estoque

sob refrigeração, foram repicadas para CSD e incubadas a 35 °C durante 16-18h. Após esse período, as culturas tiveram sua densidade celular ajustada em solução salina 0,85 % estéril, em aproximadamente 10^4 UFC/mL, com descrito no item 4.6.1 As suspensões microbianas obtidas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35 °C. O crescimento microbiano foi acompanhado pela contagem de colônias em meio sólido e a leitura DO_{620nm} , no início da incubação (T=0) e após 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 28, 32 e 48 h (Figura 5). Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos em UFC/mL (SALES, 2014).

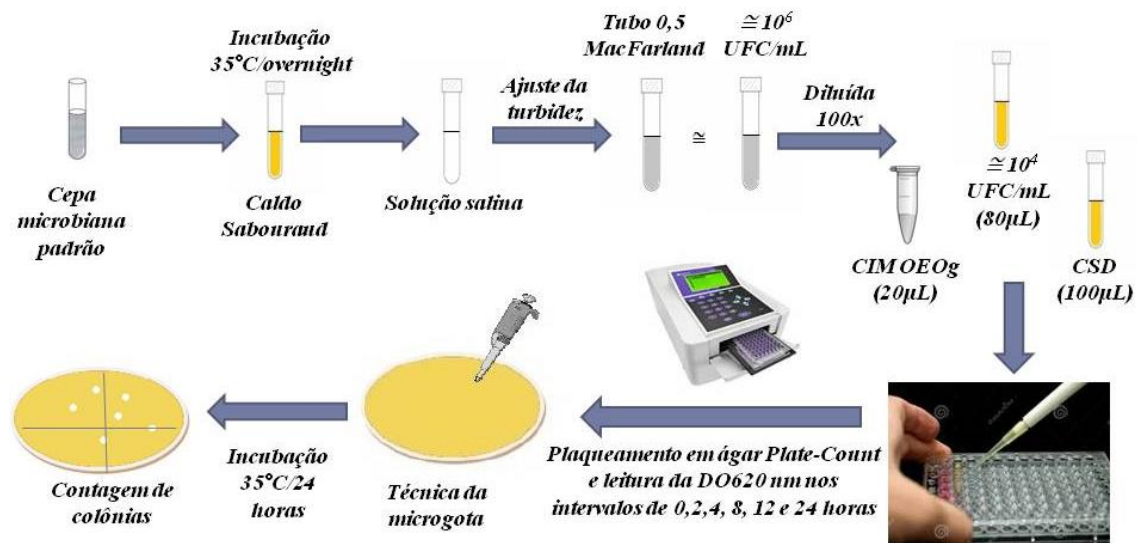
Figura 5 – Fluxograma da determinação das curvas de crescimento microbiano de cepas padrão de *Candida*.



Fonte: Adaptado de SALES, 2014.

Para determinar o efeito do tempo de exposição ao OEOg sobre a viabilidade celular de cepas de *Candida* foi seguida a metodologia descrita por Matasyoh (2007), com algumas modificações. Aliquotas de 20 μ L de OEOg, em CIM, foram adicionadas a poços de microplacas de 96 poços contendo 100 μ L de caldo Saboraud e 80 μ L de uma suspensão microbiana com aproximadamente 10^4 UFC/mL. As microplacas foram incubadas a 35 °C e alíquotas de 10 μ L foram retiradas e diluídas em solução salina 0,85% estéril que foram, então, semeadas em ágar *Plate-Count* pela técnica da microgota (ROMEIRO, 2007), em intervalos de tempo predeterminados (0, 4, 8, 12 e 24 horas). A contagem das colônias crescidas nas placas foi realizada após 24 horas de incubação a 35 °C. Foi utilizado como controle o Tween 80 1 % (diluyente do OEOg) (Figura 6). Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos em UFC/mL.

Figura 6 – Fluxograma da determinação do efeito do tempo de exposição ao OEOg na viabilidade de cepas padrão de *Candida*.



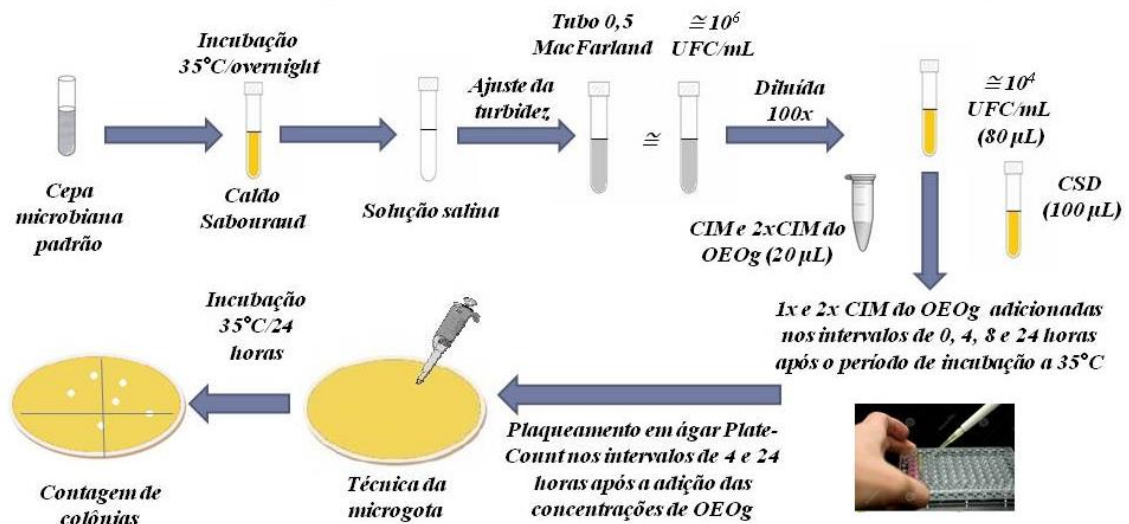
Fonte: Adaptado de SALES, 2014.

4.6.3 Efeito do OEOg sobre cepas padrão de *Candida* nas fases de crescimento exponencial e estacionário

Para avaliar o efeito do OEOg sobre *Candida spp.*, foram utilizadas suspensões microbianas contendo aproximadamente 10^4 UFC/mL. Alíquotas de 100 μ L dessas culturas foram adicionadas a microplacas com 96 poços contendo 125 μ L de CSD em cada poço.

No início do período de incubação ($T=0$), nas primeiras horas da fase exponencial de crescimento (4 e 8 horas) e após 24 horas (fase estacionária) de incubação a 35 °C foram adicionados 20 μ L de OEOg, para obtenção de concentrações finais iguais a 1 e 2 x CIM, previamente determinada. A contagem das células viáveis foi determinada após 4 e 24 horas da adição de OE. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos em UFC/mL (MUROI; KUBO, 1996) (Figura 7).

Figura 7 – Fluxograma da determinação do efeito do OEOb sobre cepas padrão de *Candida* nas fases de crescimento exponencial e estacionário.



Fonte: Adaptado de SALES, 2014.

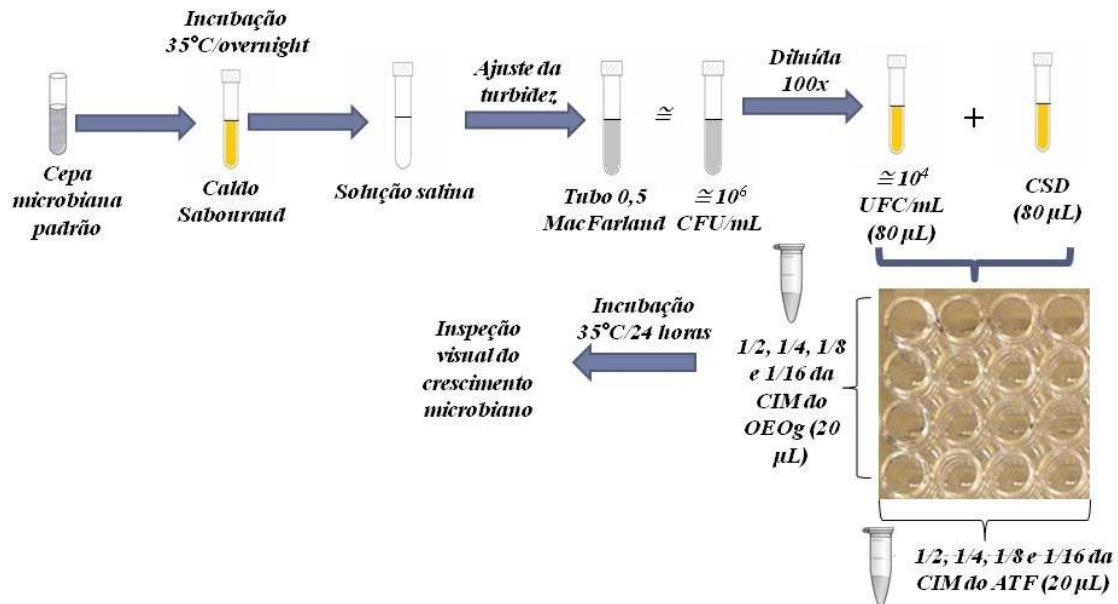
4.6.4 Estudo do efeito modulador do OEOb na atividade de antifúngicos de uso clínico pelo método do Checkerboard

O efeito modulador do OEOb na atividade de antifúngicos (ATF) de uso clínico foi avaliada pelo Método de *Checkerboard*, descrito por Cleeland e Squires (1991). Nesse experimento foram utilizadas microplacas com 96 poços, de fundo redondo, estéreis e com tampas.

Aos poços das microplacas foram adicionadas alíquotas de 80 µL de culturas microbianas contendo aproximadamente 10^4 UFC/mL, 80 µL de CSD, 20 µL do OEOb e 20 µL dos ATF selecionados para estudo (nistatina, cetoconazol, miconazol).

Os valores de CIM de OEOb e dos ATF, previamente determinados, foram utilizados para obtenção das diferentes combinações OEOb+ATF testadas. Foram utilizadas concentrações finais iguais a 1/2, 1/4, 1/8, e 1/16 x CIM de OEOb e de ATF (Figura 8). Os ensaios foram realizados em duplicata.

Figura 8 – Fluxograma da determinação do efeito modulador do OEOg na atividade de ATF de uso clínico sobre cepas padrão de *Candida* pelo método *Checkerboard*.



Fonte: Adaptado de SALES, 2014.

As microplacas foram incubadas durante 24 horas em estufa bacteriológica a 35°C e após esse período foi realizada a inspeção visual do crescimento microbiano. Os resultados obtidos foram avaliados quanto a modulação do OEOg na atividade antimicrobiana dos antifúngicos testados. Para isso foram calculadas as concentrações inibitórias fracionadas (CIF) do OEOg e dos ATF e o índice da concentração inibitória fracionada (ICIF) como descrito por Spader *et al.* (2013).

As seguintes fórmulas foram utilizadas para os cálculos de CIF e ICIF:

$CIF \text{ do OEOg} = CIM \text{ do OEOg na combinação} / CIM \text{ do OEOg isolado};$

$CIF \text{ do ATF} = CIM \text{ do ATF na combinação} / CIM \text{ do ATF isolado};$

$ICIF = CIF \text{ do OEOg} + CIF \text{ do ATF}$

Os valores obtidos para ICIF foram interpretados como: efeito sinérgico para $ICIF \leq 0,5$, efeito aditivo ou indiferente para $ICIF > 0,5$ e $< 1,0$, e efeito antagonista para $ICIF \geq 1,0$ (EUCAST, 2003).

4.6.5 Estudo do mecanismo de ação do OEOg

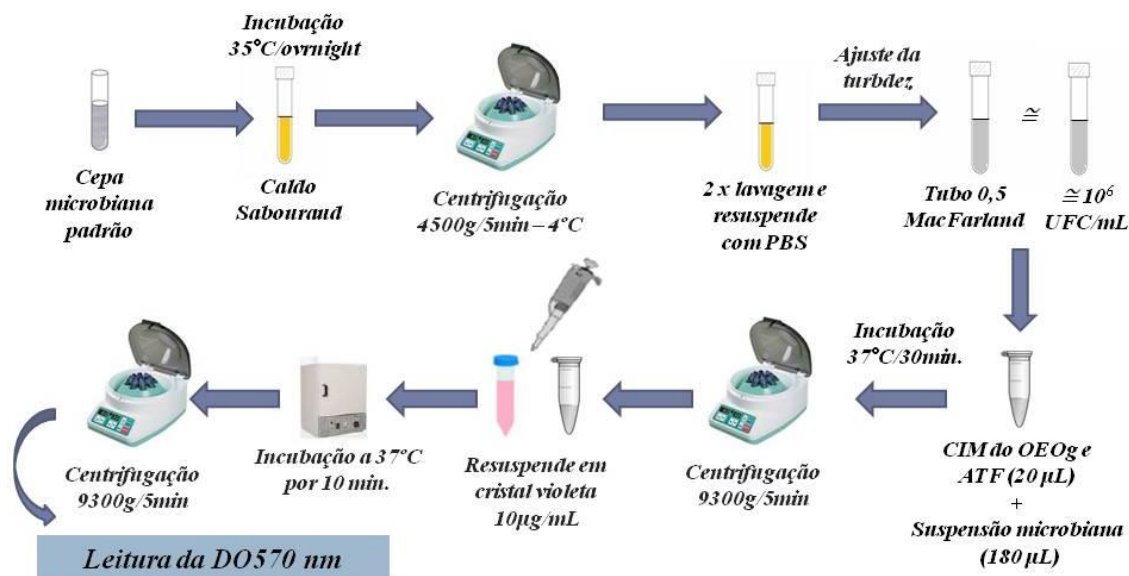
4.6.5.1 Detecção de alteração na permeabilidade da membrana celular de cepas padrão de *Candida* pelo ensaio de captação de cristal violeta

A alteração na permeabilidade da membrana celular foi detectada pelo ensaio do cristal violeta (VAARA; VAARA, 1981), com alterações. Suspensões microbianas (5 mL) de *Candida spp* foram incubadas *overnight* em CSD. As células foram centrifugadas a 4500 x g durante 5 minutos a 4 °C e o *pellet* de células foi lavado duas vezes e ressuspensão em PBS (pH 7,4). A densidade celular foi ajustada de forma a se obter aproximadamente 10⁶ UFC/mL. Aliquotas de 20 µL da CIM do OEOg e de nistatina foram adicionadas aos poços de uma microplaca contendo 180 µL das suspensões celulares. Após incubação a 37 °C durante 30 min, as células foram coletadas por centrifugação a 9300 x g durante 5 min, ressuspensas em 180 µL de cristal violeta (10 µg/mL em PBS) e incubadas durante 10 min a 37 °C. Culturas de *Candida spp* em CSD, preparadas de forma semelhante, mas sem tratamento com OEOg ou antifúngico, foram usadas como controle do experimento.

A suspensão foi centrifugada a 13400 x g durante 15 minutos, sendo as células descartadas. O sobrenadante foi coletado e a leitura da sua densidade óptica (DO) a 570 nm foi realizada em leitor de Elisa (Bio-Tek). O valor de DO_{570 nm} da solução de cristal violeta (10 µg/mL em PBS), utilizada no ensaio, foi considerado como 100% de absorção (Figura 9). O valor da captação do cristal pelas células tratadas e controle foi calculado usando a seguinte fórmula, os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos em % de captação de CV:

$$\text{DO da amostra/DO da solução de cristal violeta} \times 100.$$

Figura 9 – Fluxograma do ensaio de captação do cristal violeta para observação de alterações permeabilidade da membrana celular pelo OEOg em cepas padrão de *Candida* pela técnica do cristal violeta.



Fonte: Adaptado de SALES, 2014.

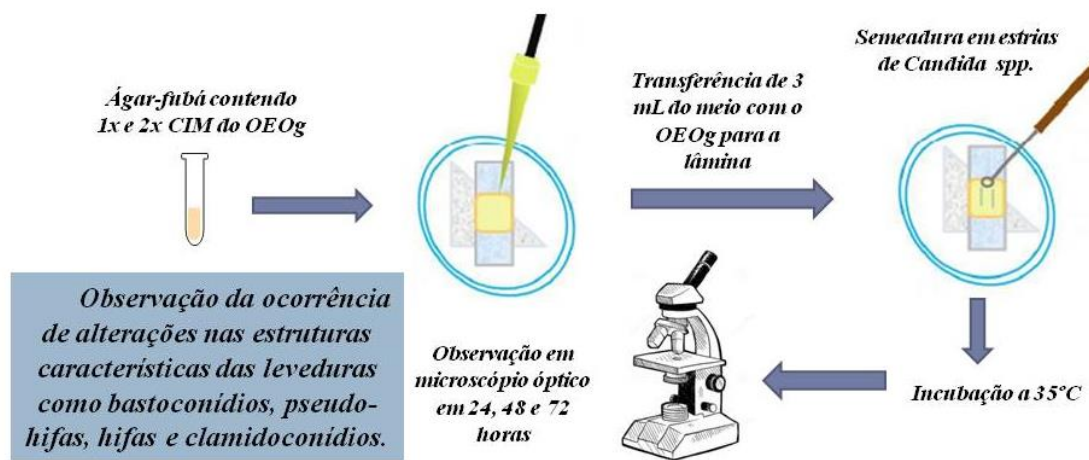
4.6.5.2 Detecção de alteração no fator de virulência de cepas padrão de *Candida* pela técnica do microcultivo

Para observação de alterações no fator de virulência da levedura do gênero *Candida* foi empregada a técnica do microcultivo para leveduras utilizando o meio sólido ágar-fubá em câmara úmida (ALVES, 2011).

Alíquotas de 3mL de ágar fubá, contendo 1x e 2x CIM de OEOg foram depositadas em lâminas estéreis apoiadas sobre um suporte contido em uma placa de Petri. Após solidificação do meio, inóculos das culturas de *Candida spp* foram semeados, com auxílio de uma agulha estéril, em duas estrias paralelas. Em seguida, as lâminas foram cobertas com lamínulas de vidro estéreis.

Para evitar o ressecamento do meio, as lâminas foram mantidas em câmara úmida. Para isso foram adicionados 2 mL de água destilada sobre pedaço de papel de filtro estéril, com 3 x 3 cm, contidos no interior das placas de Petri, que foram fechadas e incubadas a 35°C. Após 24h, 48h e 72h de incubação, as preparações foram examinadas em microscópio óptico. Foi observada a ocorrência de alterações de estruturas características das leveduras como bastoconídios, pseudo-hifas, hifas e clamidoconídios (Figura 10).

Figura 10 – Fluxograma do ensaio do microcultivo para observação de alterações morfológicas pelo OEObg em cepas padrão de *Candida* pela técnica do microcultivo.



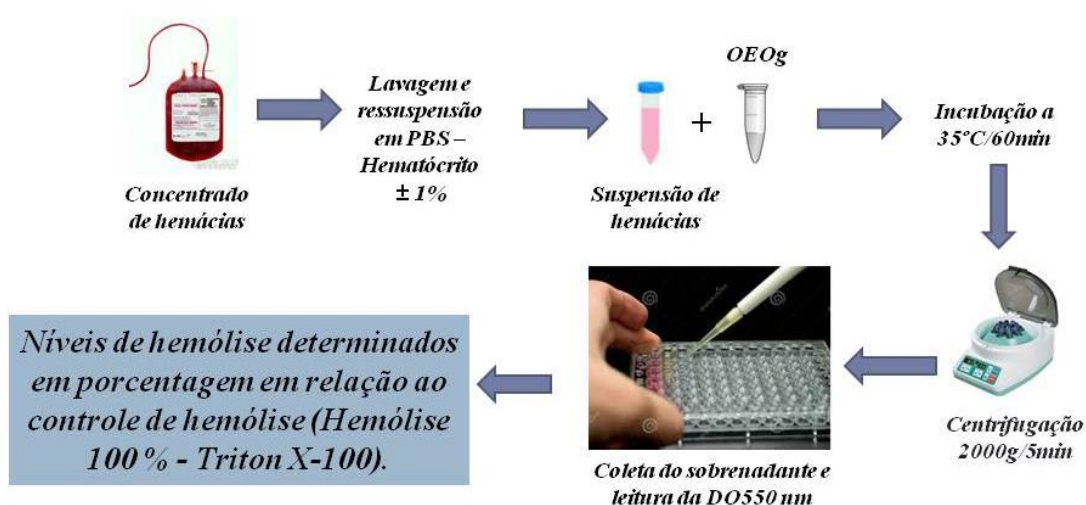
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.7 Estudo da citotoxicidade do OEObg sobre hemácias humanas

O ensaio hemolítico foi conduzido como descrito por Harris e Phoenix (1997). A bolsa de sangue periférico, obtida por punção de voluntários adultos e saudáveis, foi doada pelo Hemocentro do Ceará (HEMOCE).

Aproximadamente 1 mL de sangue foi lavado três vezes em Tampão PBS e centrifugado a 2000 x g por 5 minutos a 4 °C. Em seguida, o plasma e a camada de leucócitos foram retirados. A fim de obter uma concentração inicial de eritrócitos equivalente a um hematócrito de 1 %, os eritrócitos foram ressuspensos no mesmo tampão. Alíquotas de 180 µL da suspensão de eritrócitos foram incubadas com 20 µL do OEObg nas concentrações de 5 mg/mL a 0,04 mg/mL. Após os 60 minutos de incubação a 35 °C , as amostras foram centrifugadas 2000 x g por 5 minutos a 4 °C e o sobrenadante coletado para leitura da DO_{550nm} da hemoglobina livre em leitor ELISA (Bio-Tek) (Figura 11).

Figura 11 – Fluxograma do ensaio de determinação da citotoxicidade do OEOb sobre hemácias humanas.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Hemácias integras tratadas com Triton X-100 0,1 % (v/v) (100% de hemólise) e hemácias integras tratadas com tampão (PBS) (não hemólise) foram usadas como controles de experimento. Os experimentos foram realizados em triplicata e os níveis de hemólise foram determinados em porcentagem em relação ao controle de hemólise (Triton X-100 0,1 %), considerado como 100 % de hemólise.

4.8 Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o auxílio do programa *GraphPad Prism 5.0*. Os resultados foram expressos como Média \pm Erro Padrão da Média (EPM) de três experimentos. Para a verificação das diferenças estatísticas entre os grupos foi realizada análise de variância (Anova) e pós-teste de Dunnet e Bonferroni. As diferenças foram consideradas significantes quando $p < 0,05$.

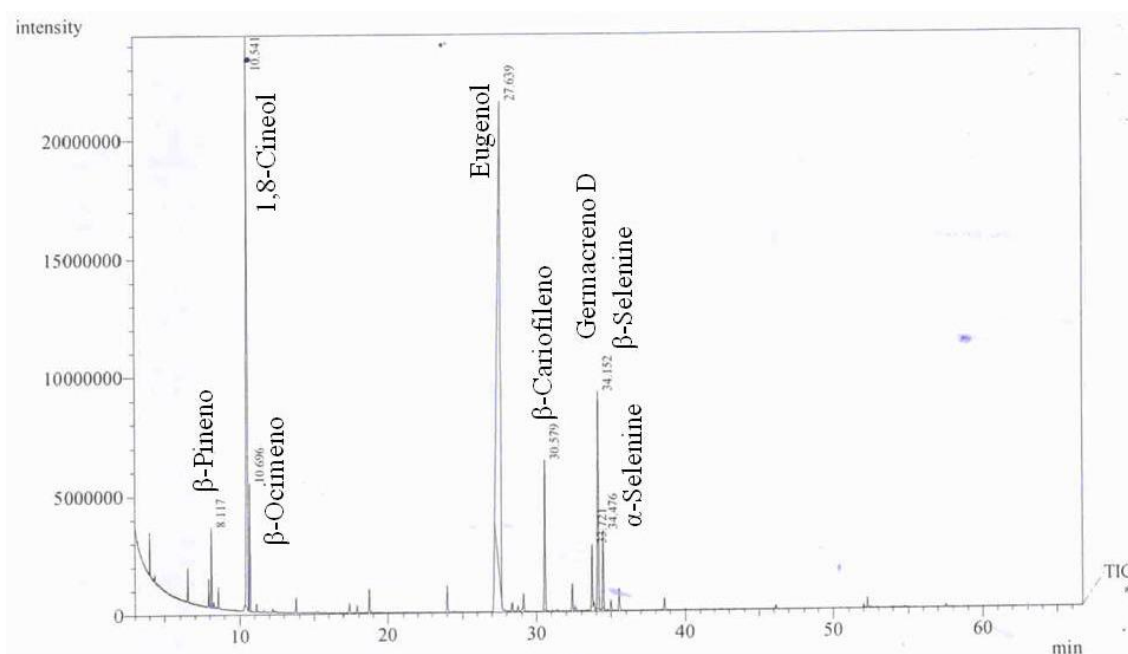
5 RESULTADOS

O óleo essencial extraído das folhas frescas de *Ocimum gratissimum* L. (OEOg) exibiu boa atividade antimicrobiana contra cepas padrão de *Candida*, apresentando melhores resultados de inibição para as cepas *C. albicans* ATCC 10231, *C. albicans* ATCC 64124, *C. parapsilosis* 90018 e *C. tropicalis* ATCC 13803. Dessa forma, essas quatro cepas foram utilizadas para os demais ensaios: avaliação da influência do tempo de exposição ao OEOg na viabilidade microbiana; avaliação do efeito do OEOg nas fases de crescimento exponencial e estacionário; ação moduladora do OEOg na atividade de antifúngicos de uso clínico; mecanismo de ação do OEOg e efeito do OEOg sobre hemácias humanas.

5.1 Composição química do OEOg

A análise cromatográfica realizada para a caracterização química do OEOg revelou a presença de oito componentes, dos quais o Eugenol (51,84%) e o 1,8-Cineol (23,81%), apresentaram-se como os constituintes majoritários (Figura 11 e Tabela 1).

Figura 12– Cromatograma do OEOg obtido por cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massas (CG-EM).



Fonte: PADETEC.

Tabela 1 – Constituintes químicos do OEObg.

Constituinte Químico	I.K	I.K _E	% Total
β-Pineno	965	964	1,60
1,8-Cineol	1004	1013	23,81
β-Ocimeno	1021	1016	3,18
Eugenol	1364	1358	51,84
β-Cariofileno	1418	1418	5,79
Germacreno D	1480	1481	2,19
β-Selenine	1482	1489	8,88
α-Selenine	1498	1496	2,71
Total Identificado			100%

I.K: Índice de Kovats da literatura. I.K_E: Índice de Kovats experimental.

5.2 Ensaio microbiológicos

5.2.1 Atividade antimicrobiana do OEObg

Na Tabela 2 estão os resultados de CIM do OEObg para as cepas selecionadas. As medidas de DO₆₂₀ em leitor de Elisa Bio-Tek, permitiram confirmar os valores obtidos para CIM por inspeção visual de crescimento, evitando erros de interpretação determinados pela turvação observada nos poços onde o OEObg foi adicionado nas maiores concentrações.

Tabela 2 – CIM do OEObg e de antifúngicos sobre cepas padrão de *Candida*

Cepa	OEObg	Cetoconazol	Miconazol	Nistatina
	CIM* (mg/mL)	CIM* (µg/mL)	CIM* (µg/mL)	CIM* (µg/mL)
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	1,25	8	4	8
<i>C. albicans</i> ATCC 64124	0,625	8	8	8
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 90018	1,25	0,0625	1	16
<i>C. tropicalis</i> ATCC 13803	1,25	4	4	16

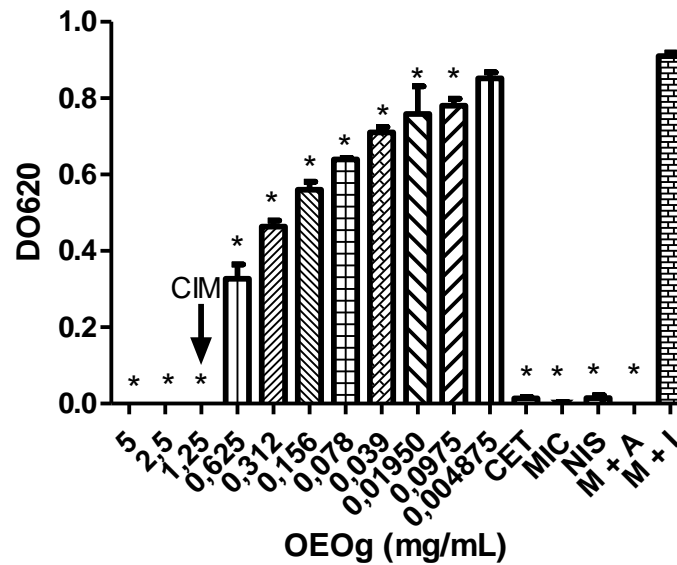
* Menor concentração de OEObg e do antifúngico capaz de inibir completamente o crescimento microbiano visível.

Controles de experimento: Cetoconazol, Miconazol, Nistatina e Tween 80 a 1% (sem atividade).

Volume de OE aplicado em cada poço: 20 µL.

Experimentos realizados em triplicata.

As leituras de DO_{620nm} das placas de microdiluição mostraram significância nos valores obtidos quando comparados com o correspondente controle da não inibição (M+I) (Gráficos de 1 a 4).

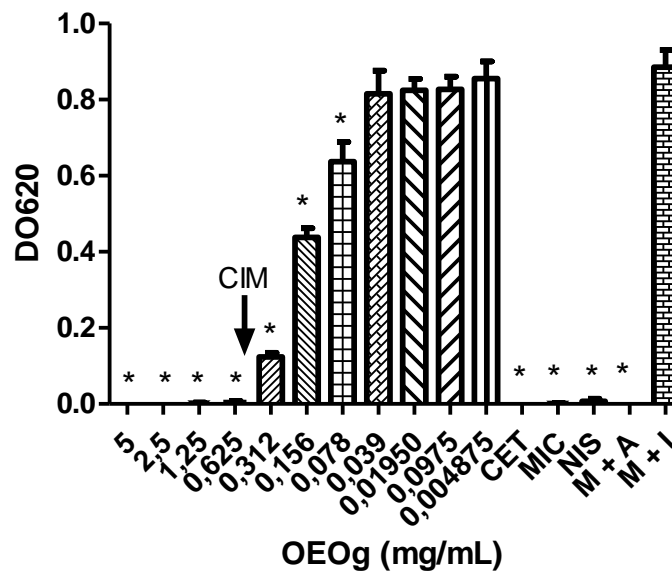
Gráfico 1 – Atividade antimicrobiana do OEOg sobre a cepa *C. albicans* ATCC 10231.

Valores estão expressos pela média \pm EPM de três ensaios. A análise foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Dunnet e valor de $*p < 0,05$ quando comparado ao controle da não inibição (M+I).

CET: Cetoconazol 8 $\mu\text{g/mL}$; MIC: Miconazol 4 $\mu\text{g/mL}$; NIS: 8 $\mu\text{g/mL}$; (M+I) – Meio + Inóculo; (M+A) – Meio + Água.

Leituras de DO realizadas em leitora de ELISA (Bio-Tek), a 620 nm.

Gráfico 2 – Atividade antimicrobiana do OEOg sobre a cepa *C. albicans* ATCC 64124.

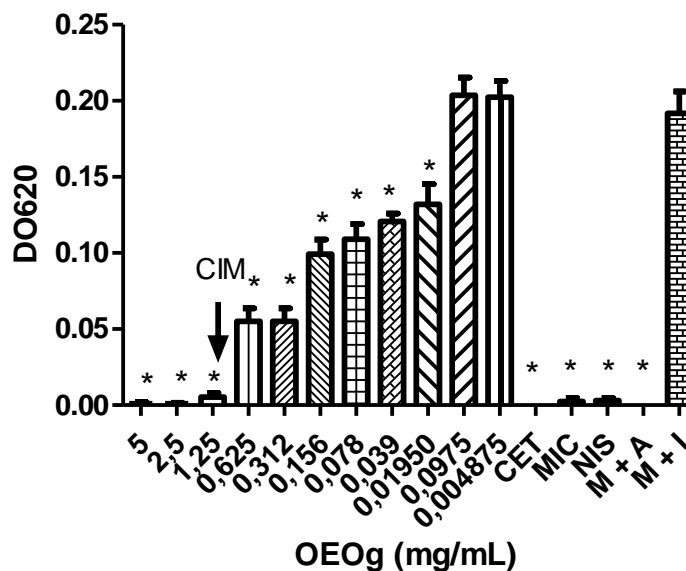


Valores estão expressos pela média \pm EPM de três ensaios. A análise foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Dunnett e valor de $*p < 0,05$ quando comparado ao controle da não inibição (M+I).

CET: Cetoconazol 8 $\mu\text{g/mL}$; MIC: Miconazol 8 $\mu\text{g/mL}$; NIS: 8 $\mu\text{g/mL}$; (M+I) – Meio + Inóculo; (M+A) – Meio + Água.

Leituras de DO realizadas em leitora de ELISA (Bio-Tek), a 620 nm.

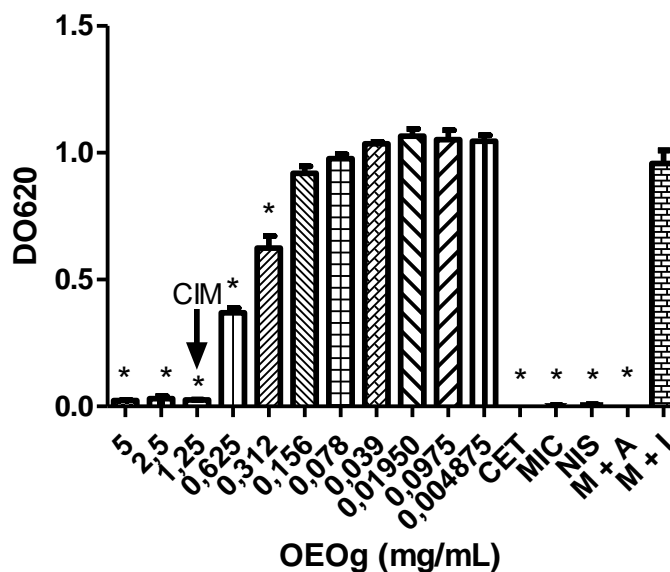
Gráfico 3 – Atividade antimicrobiana do OEOg sobre a cepa *C. parapsilosis* ATCC 90018.



Valores estão expressos pela média \pm EPM de três ensaios. A análise foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Dunnett e valor de $*p < 0,05$ quando comparado ao controle da não inibição (M+I).

CET: Cetoconazol 0,0625 $\mu\text{g/mL}$; MIC: Miconazol 1 $\mu\text{g/mL}$; NIS: 16 $\mu\text{g/mL}$; (M+I) – Meio + Inóculo; (M+A) – Meio + Água.

Leituras de DO realizadas em leitora de ELISA (Bio-Tek), a 620 nm.

Gráfico 4 – Atividade antimicrobiana do OEOg sobre a cepa *C. tropicalis* ATCC 13803.

Valores estão expressos pela média \pm EPM de três ensaios. A análise foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Dunnett e valor de $*p < 0,05$ quando comparado ao controle da não inibição (M+I).

CET: Cetoconazol 4 $\mu\text{g/mL}$; MIC: Miconazol 4 $\mu\text{g/mL}$; NIS: 16 $\mu\text{g/mL}$; (M+I) – Meio + Inóculo; (M+A) – Meio + Água.

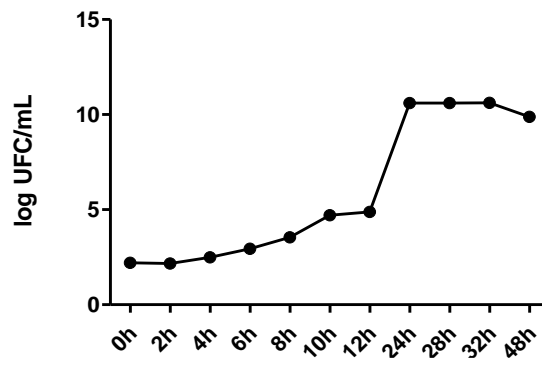
Leituras de DO realizadas em leitora de ELISA (Bio-Tek), a 620 nm

5.2.2 Efeito do tempo de exposição do OEOg na viabilidade microbiana de cepas padrão de *Candida* na fase de crescimento exponencial

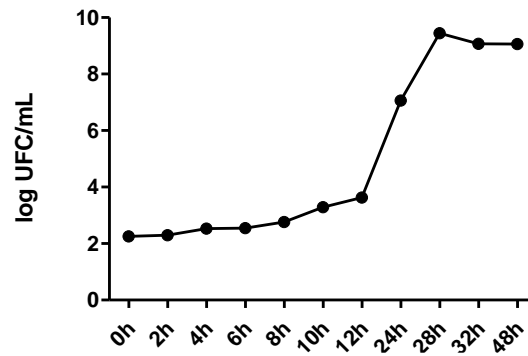
Segundo Sales (2014), o conhecimento da cinética de crescimento microbiano assume grande importância na medida em que fornece informações úteis para a realização de experimentos microbiológicos e de determinação do mecanismo de ação ao permitirem a avaliação da taxa de crescimento bacteriano e o estabelecimento dos tempos de incubação necessários para cada ensaio.

Para determinar o efeito do tempo de exposição de *Candida spp.* ao OEOg foram inicialmente obtidas curvas de crescimento (Gráficos 5 a 8). Após cerca de 4 e 24 horas de incubação a 37 °C, as cepas testadas atingiram as fases de crescimento exponencial e estacionário, respectivamente.

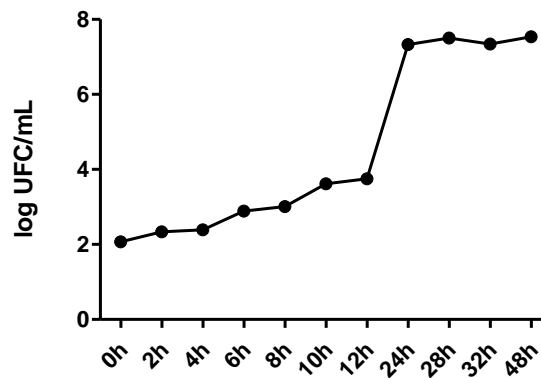
Gráfico 5 – Curva de crescimento de *C. albicans* ATCC 10231.



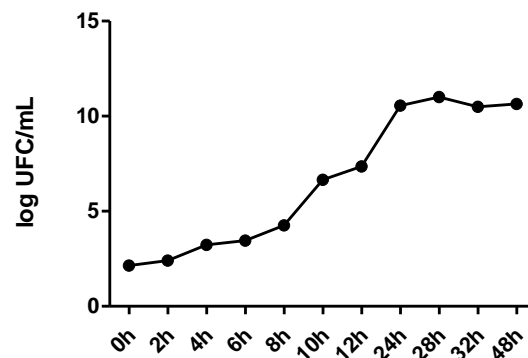
Os valores representam a média \pm EPM de três experimentos.

Gráfico 6 – Curva de crescimento de *C. albicans* ATCC 64124.

Os valores representam a média \pm EPM de três experimentos.

Gráfico 7 – Curva de crescimento de *C. parapsilosis* ATCC 90018.

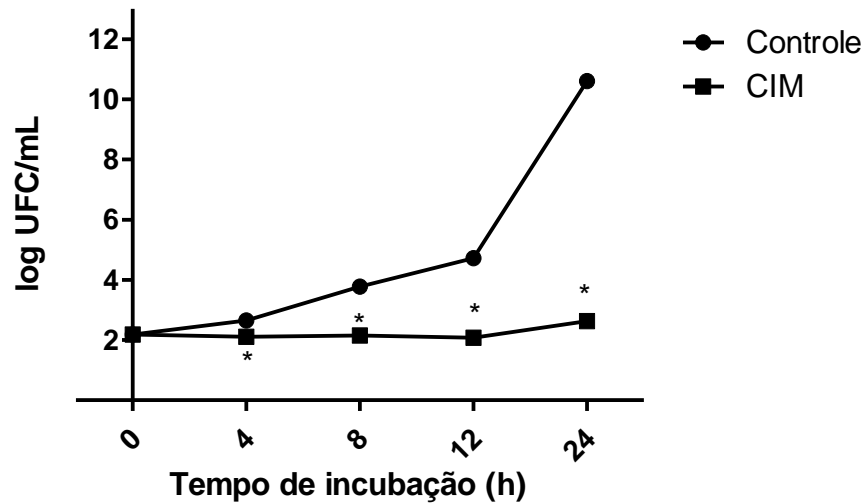
Os valores representam a média \pm EPM de três experimentos.

Gráfico 8 – Curva de crescimento de *C. tropicalis* ATCC 13803.

Os valores representam a média \pm EPM de três experimentos.

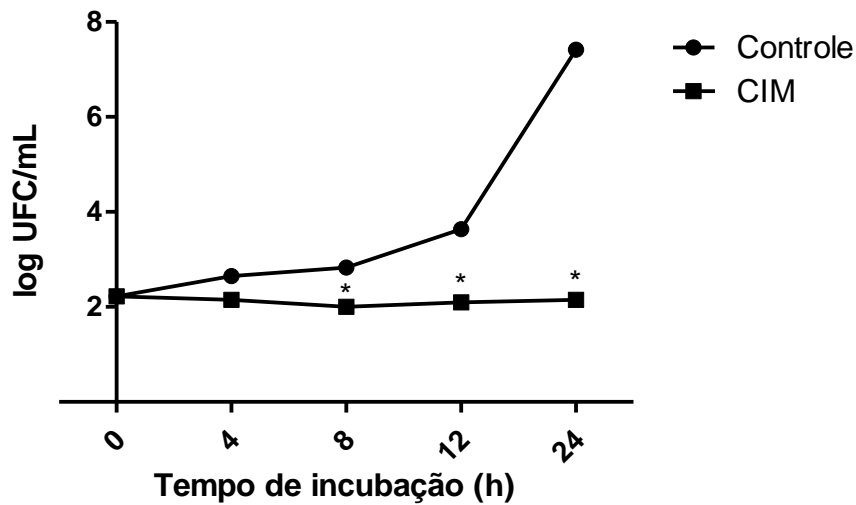
Os gráficos 9, 10, 11 e 12 apresentam a influência do tempo de exposição ao OEOg na viabilidade das cepas padrão de *Candida*.

Gráfico 9 – Efeito do tempo de exposição do OEOg na viabilidade de *C. albicans* ATCC 10231.



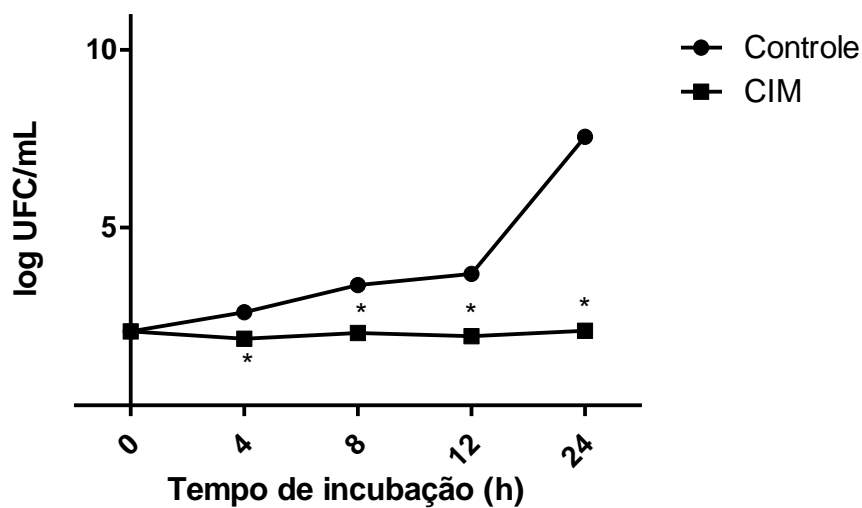
■ CIM: 1,25 mg/mL; ● Controle: sem tratamento. Os valores estão expressos pela média \pm EPM de três experimentos. A análise foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e valor de $*p < 0,05$ quando comparado ao controle.

Gráfico 10 – Efeito do tempo de exposição do OEOg na viabilidade de *C. albicans* ATCC 64124.



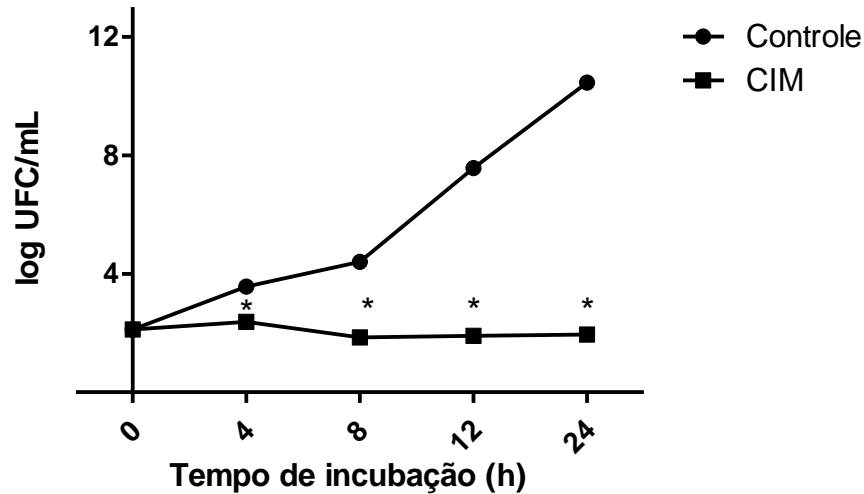
■ CIM: 0,625 mg/mL; ● Controle: sem tratamento. Os valores estão expressos pela média \pm EPM de três experimentos. A análise foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e valor de $*p < 0,05$ quando comparado ao controle.

Gráfico 11 – Efeito do tempo de exposição do OEOg na viabilidade de *C. parapsilosis* ATCC 90018.



■ CIM: 1,25 mg/mL; ● Controle: sem tratamento. Os valores estão expressos pela média \pm EPM de três experimentos. A análise foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e valor de $*p < 0,05$ quando comparado ao controle.

Gráfico 12 – Efeito do tempo de exposição do OEOb na viabilidade de *C. tropicalis* ATCC 13803.



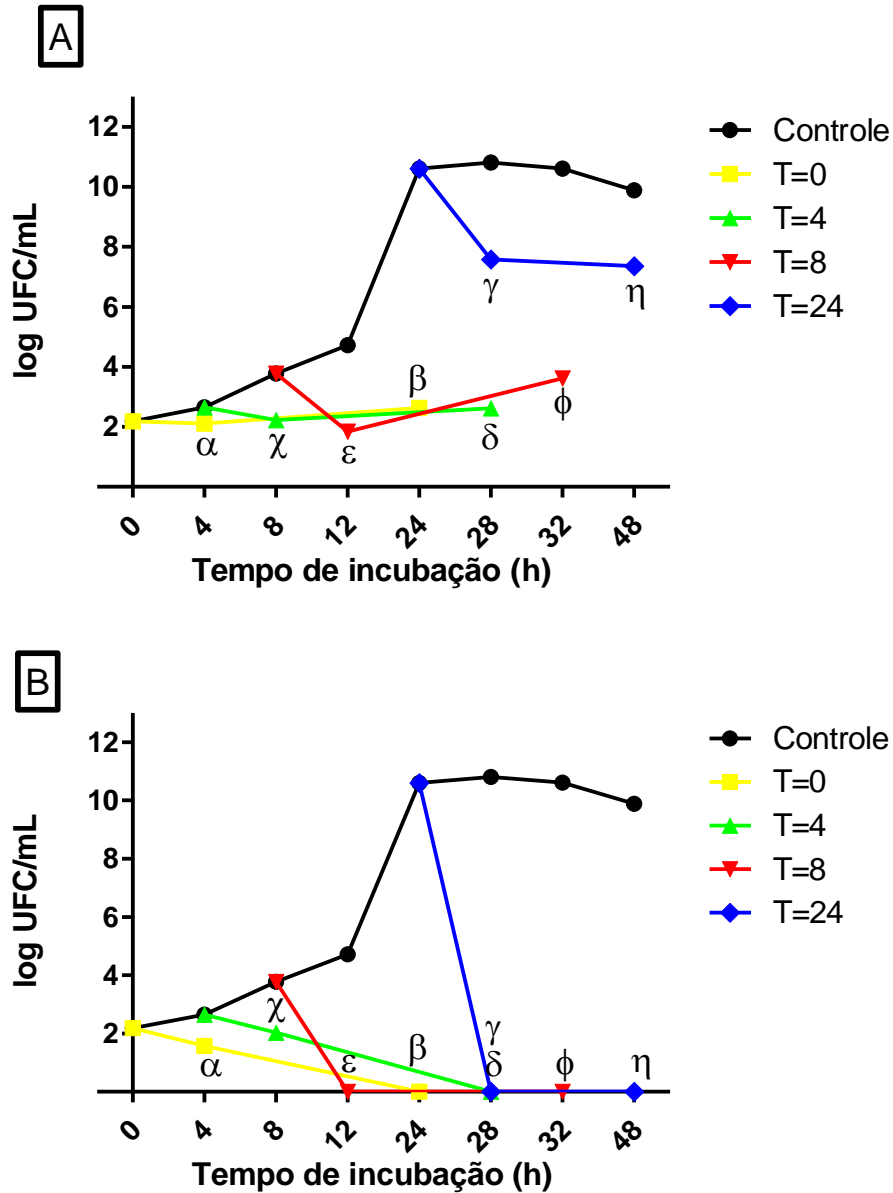
■ CIM: 1,25 mg/mL; ● Controle: sem tratamento. Os valores estão expressos pela média \pm EPM de três experimentos. A análise foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni e valor de $*p < 0,05$ quando comparado ao controle.

A exposição à CIM do OEOb, após 12h, reduziu o crescimento microbiano em 59%, 44,9%, 49,3% e 75,5%, para as cepas de *C. albicans* ATCC 10231, *C. albicans* ATCC 64124, *C. parapsilosis* ATCC 90018 e *C. tropicalis* ATCC 13803, respectivamente, quando comparado ao crescimento das culturas sem tratamento. Após 24h, essa redução foi ainda maior, com valores de 75,5%, 70,1%, 72% e 80,8%, para *C. albicans* ATCC 10231, *C. albicans* ATCC 64124, *C. parapsilosis* ATCC 90018 e *C. tropicalis* ATCC 13803, respectivamente.

5.2.3 Efeito do OEOb sobre cepas padrão de *Candida* nas fases de crescimento exponencial e estacionária

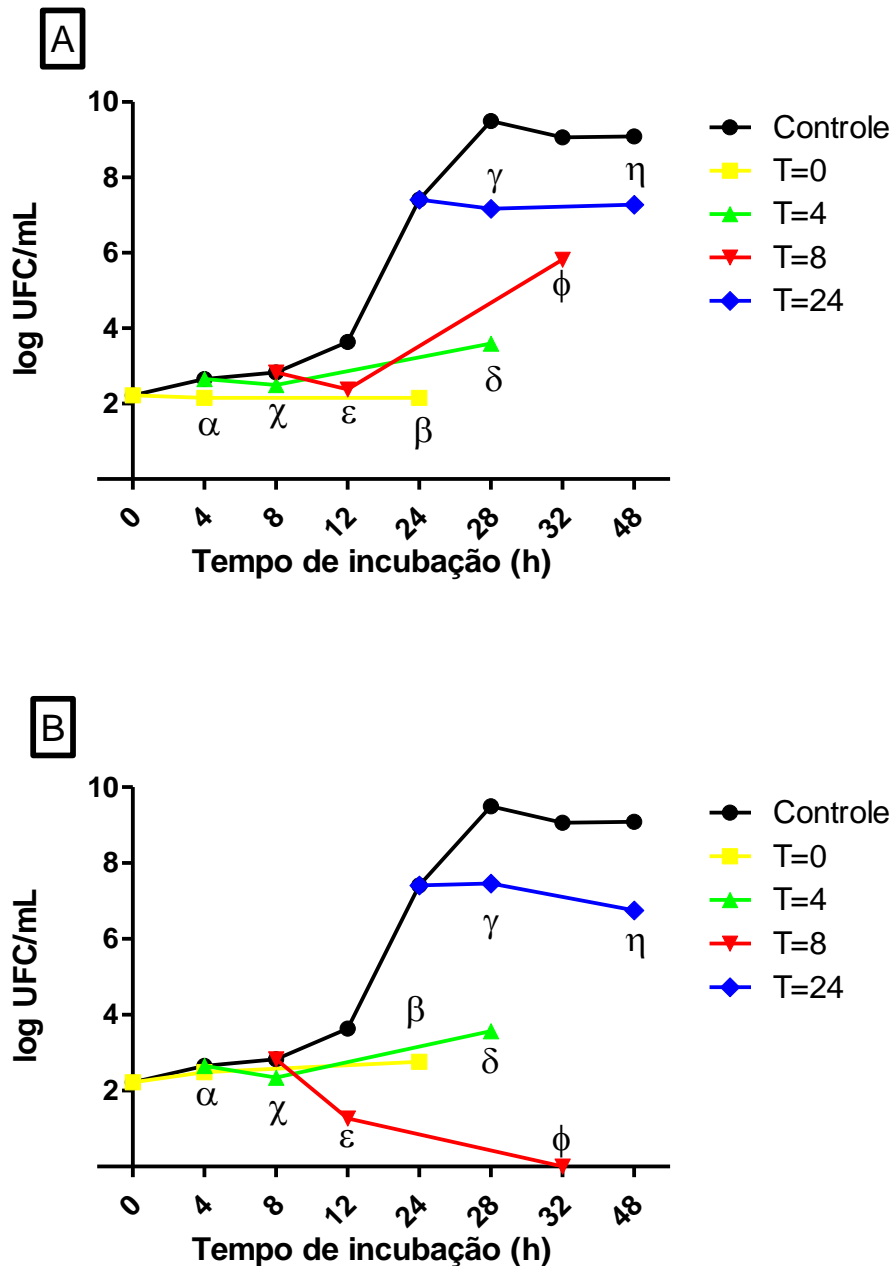
Os gráficos 13, 14, 15 e 16 apresentam o efeito do OEOb (1x e 2x CIM) sobre as cepas padrão de *Candida* utilizadas nesse estudo.

Gráfico 13 – Efeito do OEOg sobre *C. albicans* ATCC 10231 nas fases de crescimento exponencial e estacionário.



O OEOg foi adicionado nos tempos 0h (■), 4h (▲), 8h (▼) e 24h (◆) após o início da incubação. A contagem de células viáveis foi determinada após 4 e 24 horas da adição do OEOg. Controle (●) sem tratamento. (A): CIM; (B): 2 X CIM. A análise estatística foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni, com $p < 0,05$. α e β = comparação entre T=0 e o grupo controle, após 4 e 24 horas da adição, respectivamente, no tempo 0h; χ e δ = comparação entre T=4 e o grupo controle, após 4 e 24 horas da adição, respectivamente, no tempo 4h. ε e ϕ = comparação entre T=8 e o grupo controle, após 4 e 24 horas da adição, respectivamente, no tempo 8h; γ e η = comparação entre T=24 e o grupo controle, após 4 e 24 horas da adição, respectivamente, no tempo 24h.

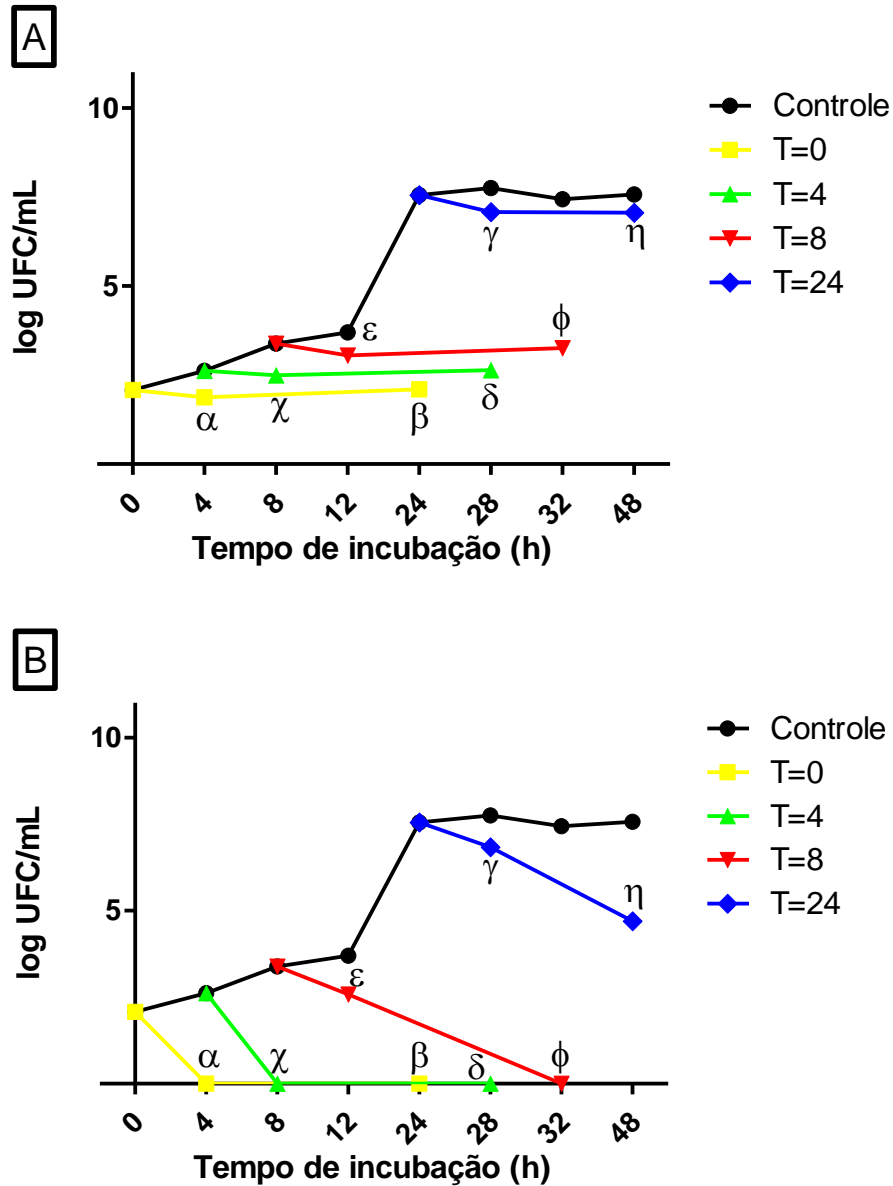
Gráfico 14 – Efeito do OEOg sobre *C. albicans* ATCC 64124 nas fases de crescimento exponencial e estacionário.



O OEOg foi adicionado nos tempos 0h (■), 4h (▲), 8h (▼) e 24h (◆) após o início da incubação. A contagem de células viáveis foi determinada após 4 e 24 horas da adição do OEOg. Controle (●) sem tratamento. (A): CIM; (B): 2 X CIM. A análise estatística foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni, com $p < 0,05$.

α e β = comparação entre T=0 e o grupo controle, após 4 e 24 horas da adição, respectivamente, no tempo 0h; χ e δ = comparação entre T=4 e o grupo controle, após 4 e 24 horas da adição, respectivamente, no tempo 4h. ϵ e ϕ = comparação entre T=8 e o grupo controle, após 4 e 24 horas da adição, respectivamente, no tempo 8h; γ e η = comparação entre T=24 e o grupo controle, após 4 e 24 horas da adição, respectivamente, no tempo 24h.

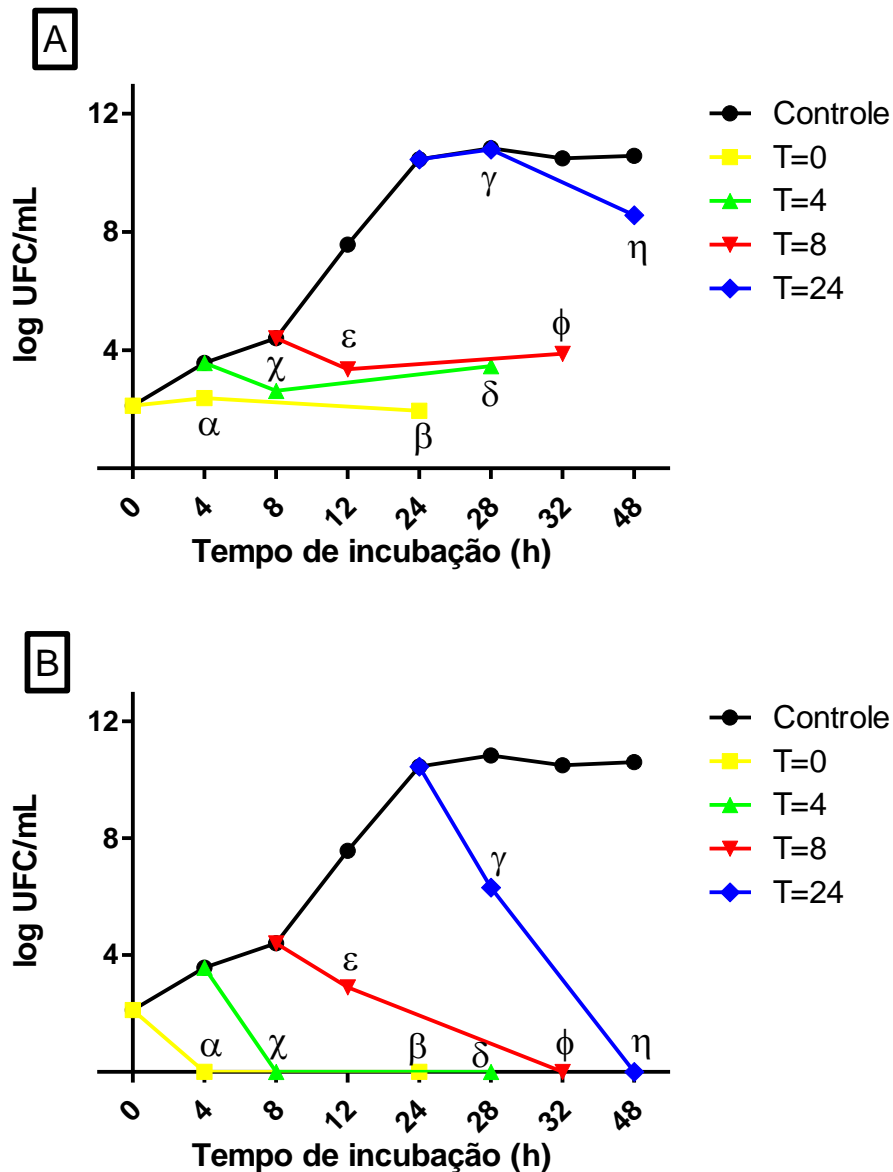
Gráfico 15 – Efeito do OEOg sobre *C. parapsilosis* ATCC 90018 nas fases de crescimento exponencial e estacionário.



O OEOg foi adicionado nos tempos 0h (■), 4h (▲), 8h (▼) e 24h (◆) após o início da incubação. A contagem de células viáveis foi determinada após 4 e 24 horas da adição do OEOg. Controle (●) sem tratamento. (A): CIM; (B): 2 X CIM. A análise estatística foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni, com $p < 0,05$.

α e β = comparação entre T=0 e o grupo controle, após 4 e 24 horas da adição, respectivamente, no tempo 0h; χ e δ = comparação entre T=4 e o grupo controle, após 4 e 24 horas da adição, respectivamente, no tempo 4h. ϵ e ϕ = comparação entre T=8 e o grupo controle, após 4 e 24 horas da adição, respectivamente, no tempo 8h; γ e η = comparação entre T=24 e o grupo controle, após 4 e 24 horas da adição, respectivamente, no tempo 24h.

Gráfico 16 – Efeito do OEOg sobre *C. tropicalis* ATCC 13803 nas fases de crescimento exponencial e estacionário.



O OEOg foi adicionado nos tempos 0h (■), 4h (▲), 8h (▼) e 24h (◆) após o início da incubação. A contagem de células viáveis foi determinada após 4 e 24 horas da adição do OEOg. Controle (●) sem tratamento. (A): CIM; (B): 2 X CIM. A análise estatística foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni, com $p < 0,05$.

α e β = comparação entre T=0 e o grupo controle, após 4 e 24 horas da adição, respectivamente, no tempo 0h; χ e δ = comparação entre T=4 e o grupo controle, após 4 e 24 horas da adição, respectivamente, no tempo 4h. ϵ e ϕ = comparação entre T=8 e o grupo controle, após 4 e 24 horas da adição, respectivamente, no tempo 8h; γ e η = comparação entre T=24 e o grupo controle, após 4 e 24 horas da adição, respectivamente, no tempo 24h.

O OEOg foi adicionado às culturas no início do período de incubação (T=0h), na fase de crescimento exponencial (T=4h e 8h) e na fase estacionária (24h) e foi capaz de reduzir o número de células viáveis em todas as fases, sendo mais eficaz no início da fase de crescimento exponencial, quando utilizado na concentração de 2xCIM. A ação antimicrobiana

do OEOf sobre *Candida spp.* foi dependente de concentração.

5.2.4 Efeito modulador do OEOf na atividade de antifúngico de uso clínico

A modulação do OEOf na atividade antimicrobiana do cetoconazol, do miconazol e da nistatina foi avaliada pelo método de *Checkerboard* (Tabelas 3 a 5).

Tabela 3 – Efeito modulador do OEOf na atividade antifúngica do Cetoconazol sobre cepas padrão de *Candida*.

Micro-organismo	CIM _{OEOf}		CIF _{OEOf}	CIM _{CET}		CIF _{CET}	ICIF
	I	A		I	A		
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	1,25	0,625	0,5	8	16	0,5	1
	1,25	0,625	0,5	8	8	0,25	0,75
	1,25	0,625	0,5	8	4	0,125	0,625
	1,25	0,625	0,5	8	2	0,0625	0,5625
<i>C. albicans</i> ATCC 64124	0,625	-	-	8	-	-	>1
	0,625	-	-	8	-	-	>1
	0,625	-	-	8	-	-	>1
	0,625	-	-	8	-	-	>1
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 90018	1,25	-	-	0,0625	-	-	>1
	1,25	-	-	0,0625	-	-	>1
	1,25	-	-	0,0625	-	-	>1
	1,25	-	-	0,0625	-	-	>1
<i>C. tropicalis</i> ATCC 13803	1,25	0,625	0,5	4	2	0,5	1
	1,25	0,3125	0,25	4	1	0,25	0,5
	1,25	0,156	0,125	4	0,5	0,125	0,250
	1,25	0,078	0,0625	4	0,25	0,0625	0,125

CIM_{OEOf}: CIM do OEOf (mg/mL); CIM_{CET}: CIM do CET (µg/mL); I: OEOf ou CET isolados; A: associação OEOf-CET; CIF_{OEOf}: CIM do OEOf na associação/CIM do OEOf isolado; CIF_{CET}: CIM do CET na associação/CIM do CET isolado. Índice CIF = CIF_{OEOf} + CIF_{CET}. ICIF ≤ 0,5: sinergismo; ICIF > 0,5 e <1,0: aditivo ou indiferente; ICIF ≥ 1: antagonismo (EUCAST, 2003).

Tabela 4 – Efeito modulador do OEOg na atividade antifúngica do Miconazol sobre cepas padrão de *Candida*.

Micro-organismo	CIM _{OEOg}		CIF _{OEOg}	CIM _{MIC}		ICIF	
	I	A		I	A		
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	1,25	-	-	4	-	-	>1
	1,25	-	-	4	-	-	>1
	1,25	-	-	4	-	-	>1
	1,25	-	-	4	-	-	>1
<i>C. albicans</i> ATCC 64124	0,625	-	-	8	-	-	>1
	0,625	-	-	8	-	-	>1
	0,625	-	-	8	-	-	>1
	0,625	-	-	8	-	-	>1
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 90018	1,25	0,625	0,5	1	1	0,5	1
	1,25	0,3125	0,25	1	1	0,5	0,75
	1,25	0,156	0,125	1	1	0,5	0,625
	1,25	0,078	0,0625	1	1	0,5	0,5625
<i>C. tropicalis</i> ATCC 13803	1,25	-	-	4	-	-	>1
	1,25	-	-	4	-	-	>1
	1,25	-	-	4	-	-	>1
	1,25	-	-	4	-	-	>1

CIM_{OEOg}: CIM do OEOg (mg/mL); CIM_{MIC}: CIM do MIC (μ g/mL); I: OEOg ou MIC isolados; A: associação OEOg- MIC; CIF_{OEOg}: CIM do OEOg na associação/CIM do OEOg isolado; CIF_{MIC}: CIM do MIC na associação/CIM do MIC isolado. Índice CIF = CIF_{OEOg} + CIF_{MIC}. ICIF \leq 0,5: sinergismo; ICIF > 0,5 e <1,0: aditivo ou indiferente; ICIF \geq 1: antagonismo (EUCAST, 2003).

Tabela 5 – Efeito modulador do OEObg na atividade antifúngica da Nistatina sobre cepas padrão de *Candida*.

Micro-organismo	CIM _{OEObg}		CIF _{OEObg}	CIM _{NIS}		CIF _{NIS}	ICIF
	I	A		I	A		
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	1,25	0,625	0,5	8	4	0,5	1
	1,25	0,3125	0,25	8	4	0,5	0,75
	1,25	0,156	0,125	8	4	0,5	0,625
	1,25	0,078	0,0625	8	4	0,5	0,5625
<i>C. albicans</i> ATCC 64124	0,625	0,3125	0,125	8	4	0,5	0,625
	0,625	0,3125	0,125	8	4	0,5	0,625
	0,625	0,3125	0,125	8	4	0,5	0,625
	0,625	0,3125	0,125	8	4	0,5	0,625
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 90018	1,25	0,625	0,5	16	8	0,5	1
	1,25	0,625	0,5	16	4	0,25	0,75
	1,25	0,625	0,5	16	2	0,125	0,625
	1,25	0,625	0,5	16	1	0,0625	0,5625
<i>C. tropicalis</i> ATCC 13803	1,25	0,625	0,5	16	8	0,5	1
	1,25	0,3125	0,25	16	8	0,5	0,75
	1,25	0,156	0,125	16	8	0,5	0,625
	1,25	0,078	0,0625	16	8	0,5	0,5625

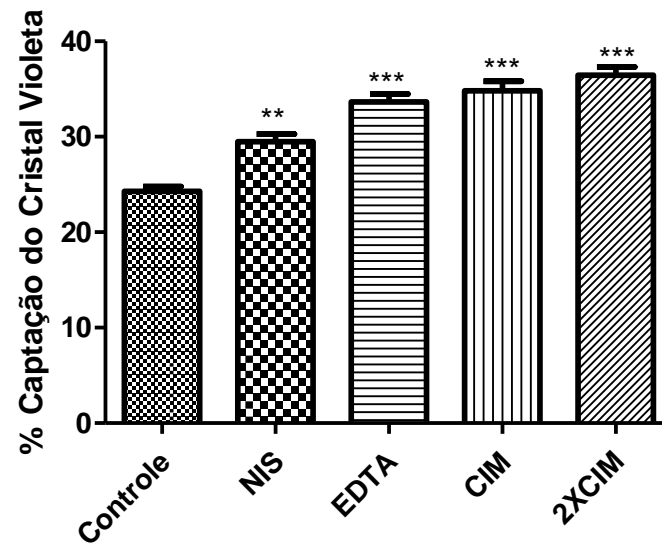
CIM_{OEObg}: CIM do OEObg (mg/mL); CIM_{NIS}: CIM da NIS (μ g/mL); I: OEObg ou NIS isolados; A: associação OEObg-NIS; CIF_{OEObg}: CIM do OEObg na associação/CIM do OEObg isolado; CIF_{NIS}: CIM da NIS na associação/CIM da NIS isolada. Índice CIF = CIF_{OEObg} + CIF_{NIS}. ICIF \leq 0,5: sinergismo; ICIF > 0,5 e < 1,0: aditivo ou indiferente; ICIF \geq 1: antagonismo (EUCAST, 2003).

Somente sobre a cepa *Candida tropicalis* ATCC 13803 o OEObg modulou positivamente a ação do cetoconazol, em três das combinações testadas, com valores de ICIF variando entre 0,5 e 0,125.

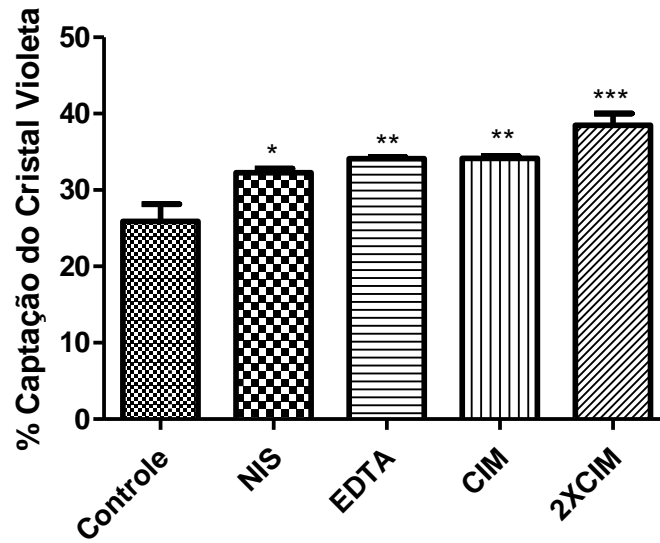
5.2.5 Mecanismo de ação do OEObg sobre cepas padrão de *Candida*.

5.2.5.1 Alteração na permeabilidade da membrana celular

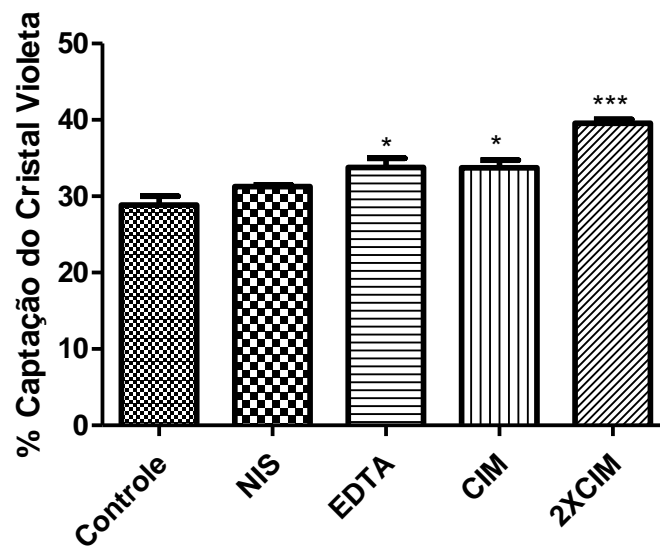
Os gráficos 17 a 20 representam a captação de cristal violeta por cepas padrão de *Candida* expostas a 1x e 2xCIM do OEObg com valores expressos em porcentagem de captação de cristal violeta. A CIM de OEObg foi capaz de promover um aumento na captação do cristal violeta em 10,5%, 8,27%, 7,63% e 4,9% pelas cepas de *C. albicans* ATCC 10231 e *C. albicans* ATCC 64124, *C. tropicalis* ATCC 13803 e *C. parapsilosis* 90018, respectivamente, quando comparado ao controle não tratado, indicando a ocorrência de alterações na membrana celular.

Gráfico 17 – Captação do cristal violeta por *C. albicans* ATCC 10231 exposta ao OEOg.

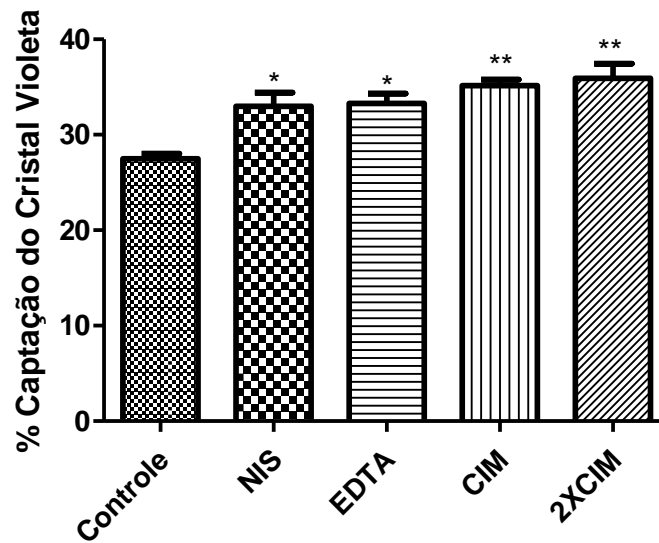
Os valores representam a média \pm EPM de três ensaios. * $p < 0,05$ comparado com o controle (sem tratamento). NIS (Nistatina 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$). EDTA – ácido etilenodiaminotetracético (controle positivo). CIM (1,25 mg/mL).

Gráfico 18 – Captação do cristal violeta por *C. albicans* ATCC 64124 exposta ao OEOg.

Os valores representam a média \pm EPM de três ensaios. * $p < 0,05$ comparado com o controle (sem tratamento). NIS (Nistatina 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$). EDTA – ácido etilenodiaminotetracético (controle positivo). CIM (0,625 mg/mL).

Gráfico 19 – Captação do cristal violeta por *C. parapsilosis* ATCC 90018 exposta ao OEOg.

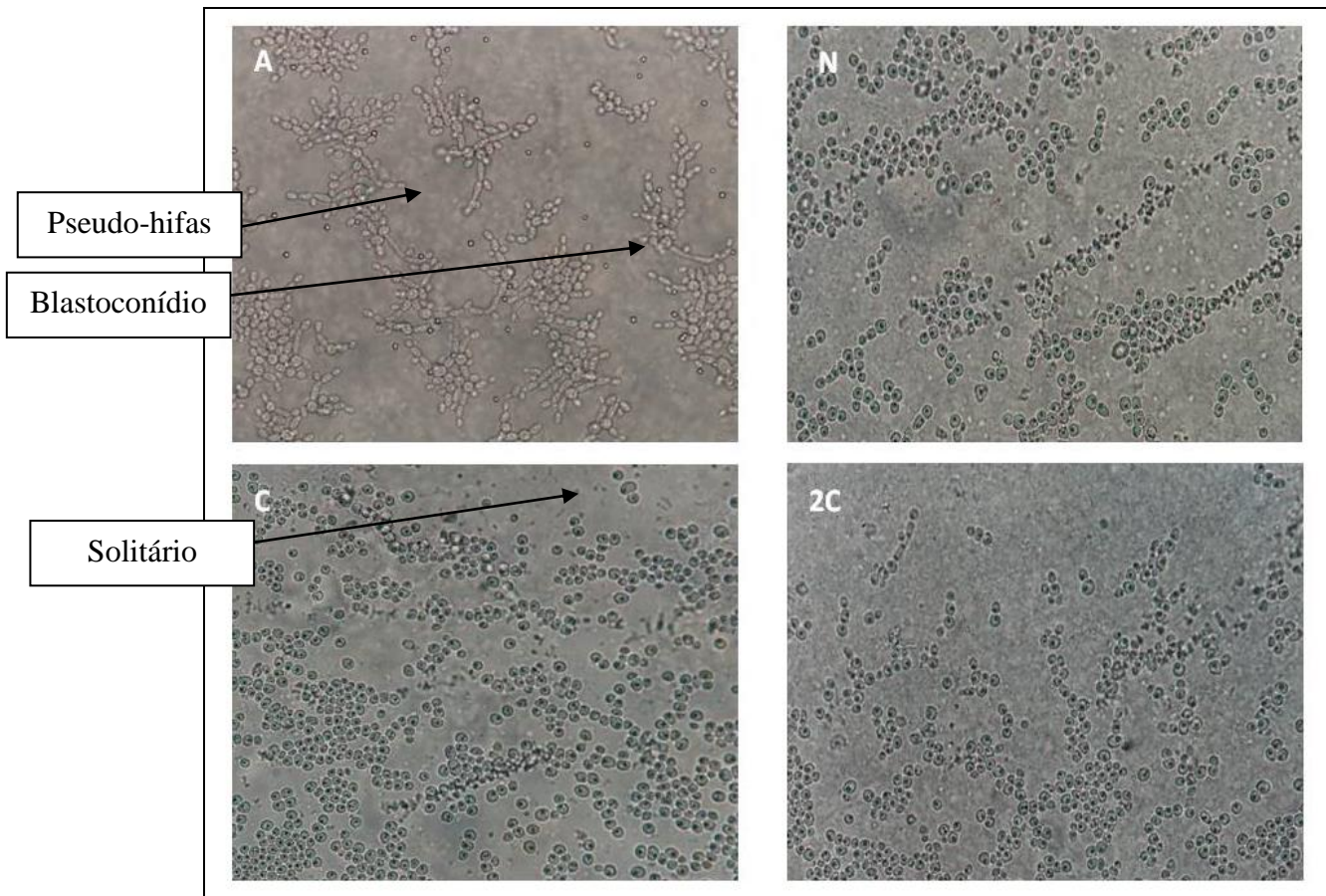
Os valores representam a média \pm EPM de três ensaios. * $p < 0,05$ comparado com o controle (sem tratamento). NIS (Nistatina 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$). EDTA – ácido etilenodiaminotetracético (controle positivo). CIM (1,25 mg/mL).

Gráfico 20 – Captação do cristal violeta por *C. tropicalis* ATCC 13803 exposta ao OEOg.

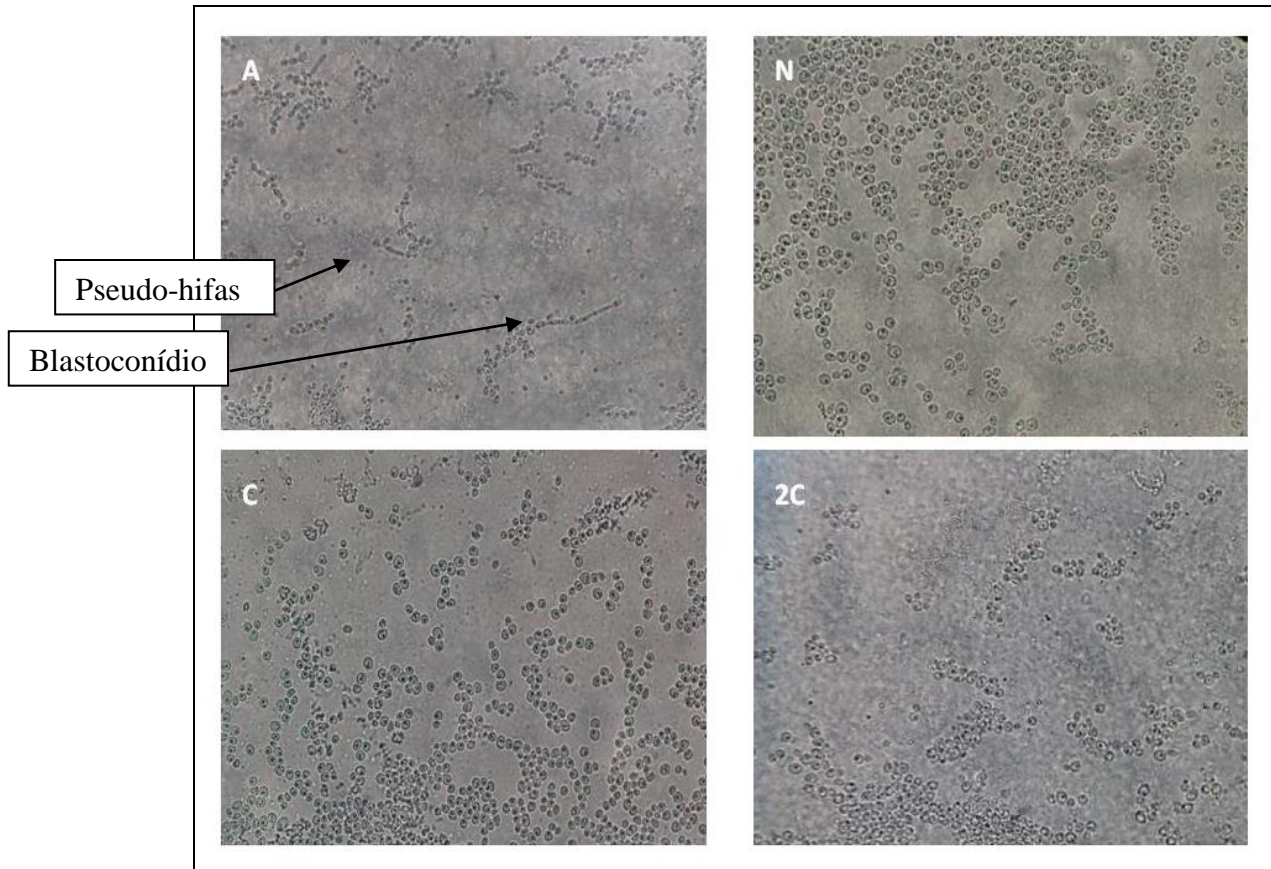
Os valores representam a média \pm EPM de três ensaios. * $p < 0,05$ comparado com o controle (sem tratamento). NIS (Nistatina 16 $\mu\text{g/mL}$). EDTA – ácido etilenodiaminotetracético (controle positivo). CIM (1,25 mg/mL).

5.2.5.2 Alteração no fator de virulência leveduriforme

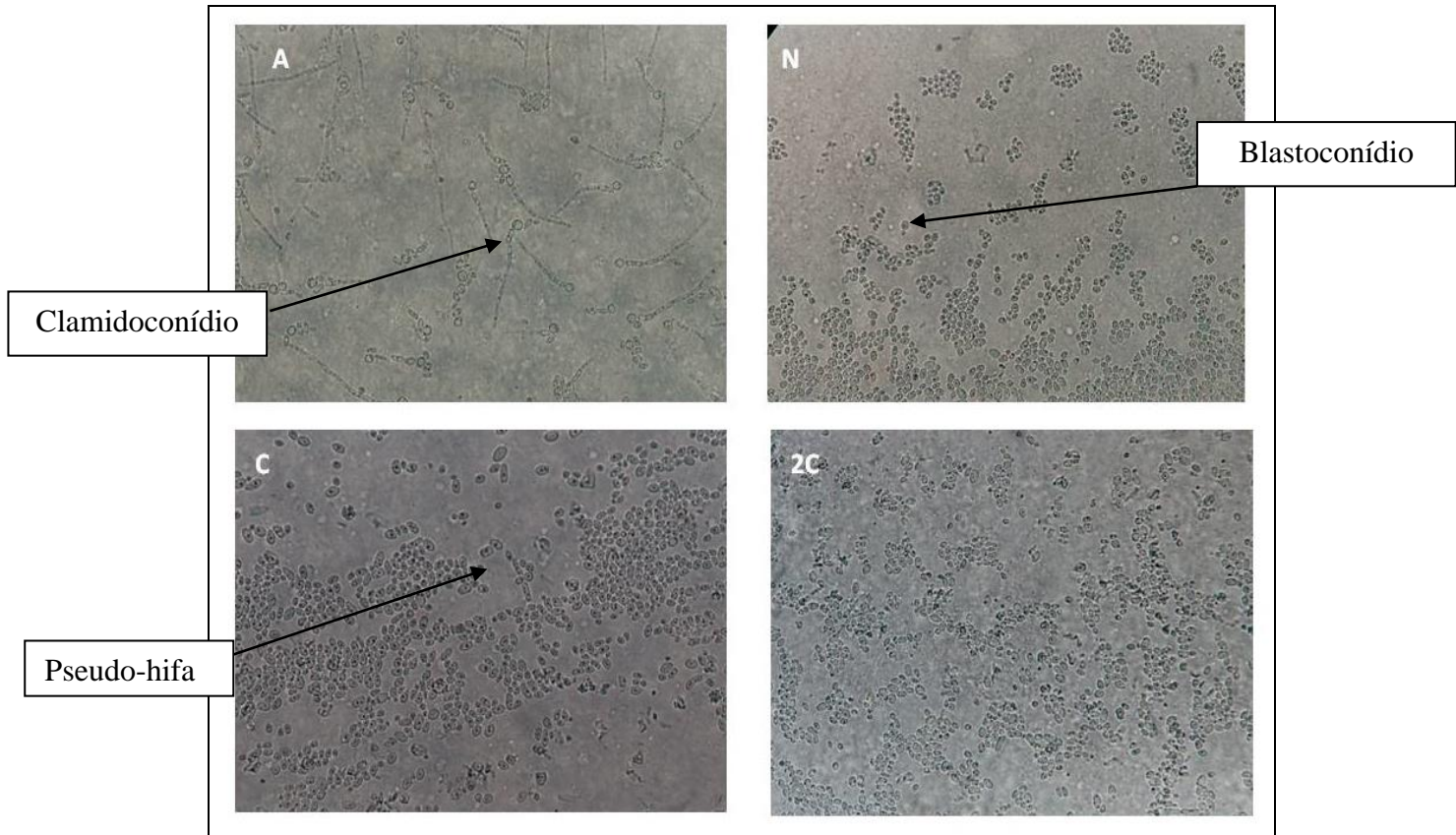
No ensaio da micromorfologia fúngica das cepas padrão de *Candida* foi observada, com auxílio de microscópio óptico, a presença de estruturas características do crescimento fúngico: como pseudo-hifas, blastoconídios e clamidoconídios (Figuras de 12 a 15). No controle de crescimento podemos notar a presença de blastoconídios, pseudo-hifas e clamidoconídios. Na presença do OEOg foram observados em sua maioria células isoladas, raras pseudo-hifas e blastoconídios. Já na nistatina foram visualizadas células isoladas e raros blastoconídios.

Figura 13 – Micromorfologia de *C. albicans* ATCC 10231.

A – Controle sem tratamento; N – Cultura tratada com nistatina (16 µg/mL); C – Cultura tratada com CIM do OEOg (1,25 mg/mL). 2C – Cultura tratada com 2xCIM do OEOg (2,5 mg/mL).
Leitura de 10 campos no aumento de 40X.

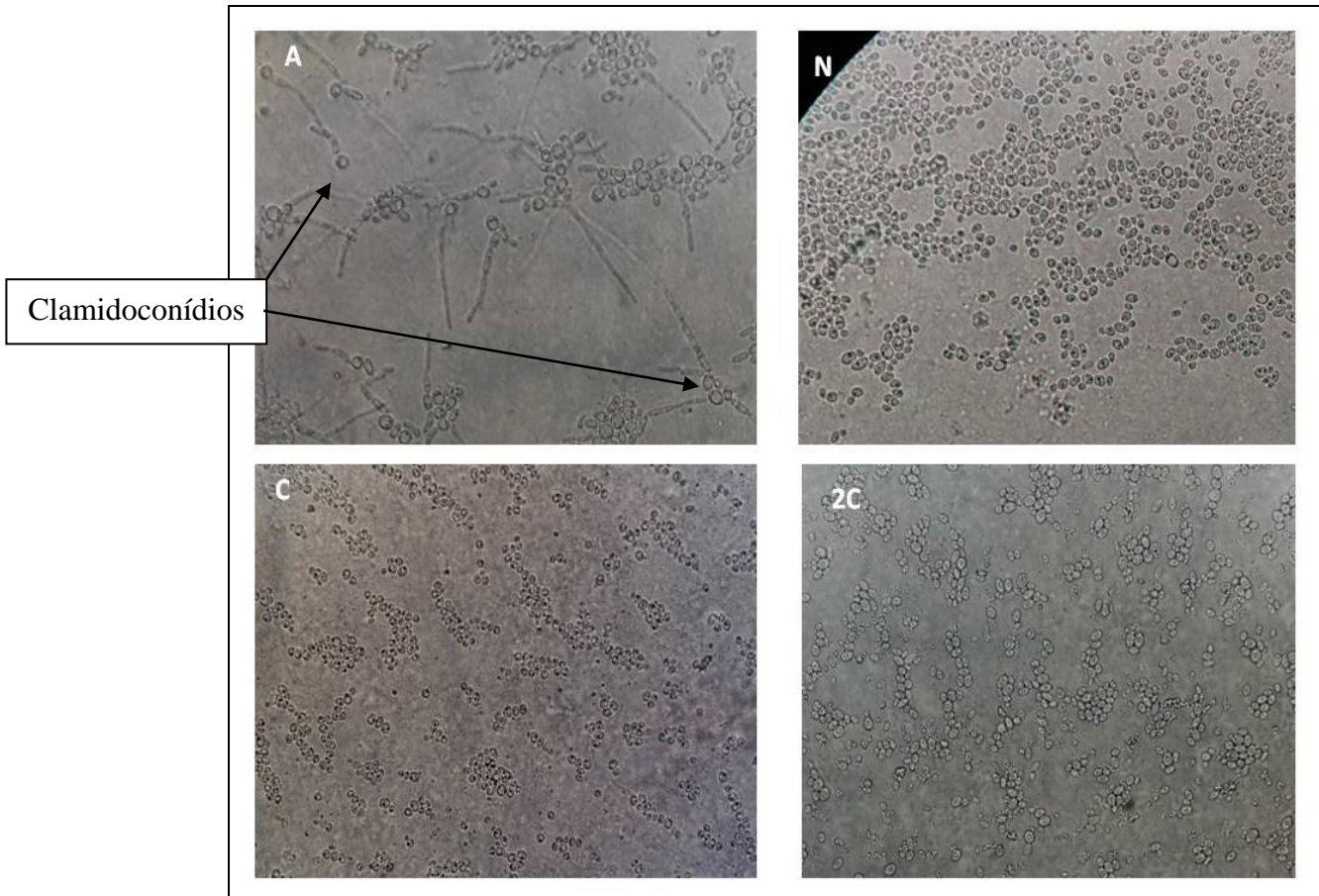
Figura 14 – Micromorfologia de *C. albicans* ATCC 64124.

A – Controle sem tratamento; N – Cultura tratada com nistatina (16 µg/mL); C – Cultura tratada com CIM do OEOg (0,625 mg/mL). 2C – Cultura tratada com 2xCIM do OEOg (1,25 mg/mL).
Leitura de 10 campos no aumento de 40X.

Figura 15 – Micromorfologia de *C. parapsilosis* ATCC 90018.

A – Controle sem tratamento; N – Cultura tratada com nistatina (16 µg/mL); C – Cultura tratada com CIM do OEOg (1,25 mg/mL). 2C – Cultura tratada com 2xCIM do OEOg (2,5 mg/mL).
Leitura de 10 campos no aumento de 40X.

Figura 16 – Micromorfologia de *C. tropicalis* ATCC 13803.

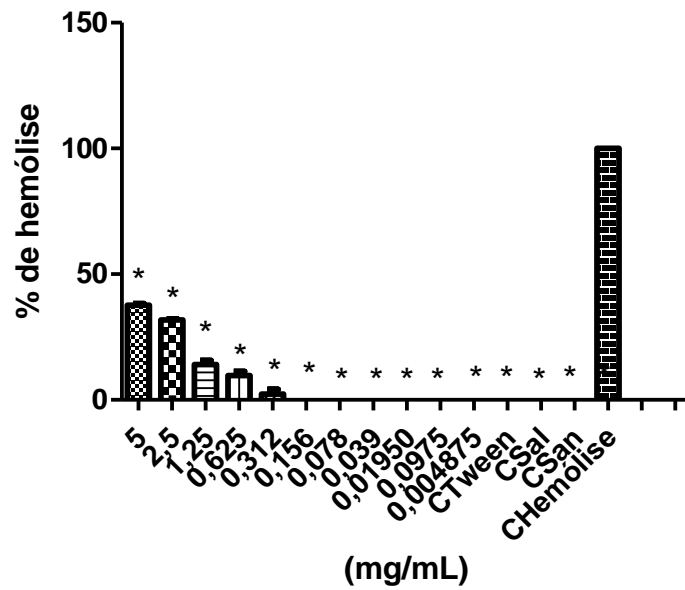


A – Controle sem tratamento; N – Cultura tratada com nistatina (16 µg/mL); C – Cultura tratada com CIM do OEOg (1,25 mg/mL). 2C – Cultura tratada com 2xCIM do OEOg (2,5 mg/mL).
Leitura de 10 campos no aumento de 40X.

5.3 Atividade hemolítica do OEOg

Para estes ensaios o OEOg, nas concentrações de 5mg/mL a 0,04875 mg/mL foi incubado com os eritrócitos (1×10^8 células) por 60 minutos e o percentual de hemólise foi mensurado através da liberação de hemoglobina das amostras em DO_{550nm} , comparado os valores obtidos ao controle de hemólise (100%). Hemácias tratadas com tampão PBS foram usadas para assegurar que a hemólise observada realmente se devia à atividade do OEOg. O Gráfico 21 ilustra os resultados obtidos nestes experimentos, onde a taxa de hemólise para OEOg em CIM foi de 14% e a atividade hematotóxica do OEOg foi concentração-dependente.

Gráfico 21 – Atividade hemolítica do OEOg sobre hemácias humanas.



Valores estão expressos pela média \pm EPM de três ensaios. A análise foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Dunnet e valor de $*p < 0,05$ quando comparado ao controle da hemólise (CHEmolise).

CTween: Tween a 1%; CSal: Salina; CSan: Controle da não hemólise (hemácias íntegras); CHEmolise: Triton X-100 a 1% (referência para 100% de hemólise).

6 DISCUSSÃO

Nos últimos anos tem sido possível notar um crescente interesse científico em investigações químicas e farmacológicas sobre as propriedades biológicas de plantas medicinais (MATIAS *et al.*, 2010).

O OE extraído das folhas frescas de *O. gratissimum* pela técnica de arraste a vapor d'água apresentou baixa viscosidade, cor amarela clara e forte odor de cravo. O rendimento da extração foi de 0,36% (p/v).

Segundo Sousa *et al.* (2004), espécimes de *O. gratissimum* que crescem em Fortaleza apresentam rendimento do OE das folhas frescas de 3,6%. Chaves (2001), em estudo avaliando a variação do rendimento do OE de folhas de alfavaca-cravo em função da adubação orgânica e época do corte, encontrou valores entre 1,08% e 3,8%. Sendo o maior rendimento encontrado no verão, enquanto o menor rendimento foi obtido no inverno.

Em 2015, Aguiar e colaboradores, obtiveram um rendimento de 0,45% para o OE extraído das folhas frescas de *O. gratissimum* proveniente do Cariri, resultado coerente com o encontrado no presente trabalho. Matasyoh *et al.* (2007) e Nakamura *et al.* (1999) encontraram rendimentos de 0,49% e 0,21%, respectivamente, para o OE extraído de folhas frescas, resultados semelhantes ao encontrado por nós.

Observa-se que, quando comparado a outros estudos, o rendimento do OEOg, pode ser considerado baixo. Segundo Chaves (2001), fatores como umidade e chuva estão associados à maior produção de biomassa e maior rendimento do OE. Assim, o baixo rendimento obtido no estudo, pode ser atribuído à época da colheita, já que a baixa umidade e a falta de chuva, características do mês de novembro no estado do Ceará, têm influência direta sobre a produção do óleo essencial.

A caracterização química do OEOg identificou oito componentes, sendo o eugenol (51,84%) e o 1,8-cineol (23,81%) os constituintes majoritários. O eugenol é um derivado fenilpropanóide, conhecido comumente como essência de cravo por estar presente em grande quantidade no OE de cravo da Índia (*Eugenia aromática*) (ESCOBAR, 2002). Segundo Linard (2008) o eugenol possui várias propriedades farmacológicas, dentre elas, antimicrobiana, anti-inflamatória, antioxidante, moduladora de respostas imunes, anticarcinogênica, cardiovascular, antinociceptiva e anestésica local.

Matos (2007), ao relacionar a caracterização química e atividade biológica do OEOg de plantas cultivadas em Fortaleza, relatou que a coleta para fins medicinais fica condicionada a horários definidos, uma vez que a composição do OE mostrou-se variável ao

longo do dia, com o eugenol aparecendo com maior teor ente 11 e 13 horas do dia. Isso explica os valores encontrados no presente estudo, uma vez que a coleta das folhas de *Ocimum gratissimum* foi realizada às 12h, período em que se espera que a concentração do eugenol esteja alta.

O 1,8-cineol (eucaliptol), outro componente majoritário do OEOg, é um monoterpenóide com odor semelhante à cânfora, sendo constituinte de uma variedade de OE como os das espécies de *Eucaliptus*, *Croton*, *Melaleuca* (BASTOS, 2009; TOSCAN, 2010). De acordo com Santos (2004), este composto é normalmente utilizado no tratamento de sintomas de doenças respiratórias exacerbadas por infecção e em aromaterapia.

Em 2007, Matasyoh *et al.*, em estudo realizado com variantes selvagens de *O. gratissimum* L. do leste do Quênia, encontraram como principais componentes voláteis do OE, o eugenol (68,81%) e o metil-eugenol (13,21%), além de componentes minoritários como o ocimeno (7,47%), germacreno-D (4,25%), o transcariofileno (1,69%) e o β -pineno (1,10%). Dambolena *et al.* (2010) referiram o eugenol como constituinte principal do OE extraído das folhas de *O. gratissimum* em duas localidades do Quênia, com variações entre 90,5% e 70,1%.

Como observado em outras espécies do mesmo gênero, a composição química do OEOg é bastante variável, sugerindo a existência de diferentes quimiotipos, sendo o quimiotipo eugenol bastante comum (BARRETO, 2008, BIASI *et al.*, 2009; CHAVES, 2001). Aguiar *et al.* (2015), em estudo realizado com folhas de *O. gratissimum* L. cultivadas no horto de plantas medicinais da Universidade Regional do Cariri (URCA), encontraram como principais componentes voláteis do OE, o eugenol (65,26%) e o *p*-Cineol (15,17%), corroborando os resultados encontrados no presente estudo.

Em Fortaleza, Sousa *et al.* (2004), descreveram que a essência das folhas da alfavaca-cravo (*O. gratissimum* L) contém eugenol (77,3%), 1,8-cineol (12,1%), β -cariofileno (2,3%), (*Z*)-ocimeno (2,1%). Barreto (2008), ao analisar a composição volátil das folhas e inflorescências de *O. gratissimum* coletadas no setor de Horticultura do Departamento de Fitotecnia da UFC, encontrou como componente majoritário o eugenol, com mais de 85% da composição total dos óleos, seguido pelo 1,8-cineol.

Os dados obtidos nesse trabalho quando comparados com os encontrados na literatura, mostram que plantas da mesma espécie podem sofrer interferência de fatores que coordenam ou alteram a taxa de produção de metabólitos secundários, como localização geográfica, época e horário de coleta, condições climáticas, entre outros (BARRETO, 2008), o que pode modificar as atividades biológicas encontradas para os OEs.

Segundo Pandey, Singh e Tripathi (2014), o uso indiscriminado de agentes antimicrobianos resultou no aparecimento de um grande número de bactérias e fungos resistentes a medicamentos. Para superar os problemas advindos pelo aumento da resistência de micro-organismos patogênicos é necessário desenvolver agentes antimicrobianos mais eficazes e com novos mecanismos de ação. O fato de atingirem muitos alvos simultaneamente e de não existirem relatos de induzirem resistência ou adaptação bacteriana, torna os OEs importantes candidatos a agentes antimicrobianos (BAKKALI *et al.*, 2008).

OEs extraídos de várias espécies de *Ocimum* têm sido referidos como sendo ativos contra bactérias Gram positivo e Gram negativo, assim como contra leveduras, devido à seus constituintes terpênicos (PANDEY, SINGH, TRIPATHI, 2014).

Estudos realizados com *O. gratissimum* L. comprovaram diversas atividades biológicas de seu OE, achados que reforçam a necessidade de serem realizadas mais pesquisas que corroborem e/ou esclareçam o potencial dessa espécie (FARIA, *et al.*, 2006; MATASYOH *et al.*, 2007; NAKAMURA *et al.*, 1999; OGENDO *et al.*, 2008).

Atualmente, diferentes técnicas são utilizadas para definir se uma determinada substância possui atividade antimicrobiana. A técnica de microdiluição em caldo de cultura, recomendada para leveduras, no protocolo M27-A3, do *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI, 2008) foi utilizada no presente estudo, por se tratar de uma técnica quantitativa e possibilitar, assim, o conhecimento da menor concentração necessária para inibir o crescimento microbiano.

O OEOg apresentou atividade sobre todas as cepas de *Candida* testadas. A atividade anticandida variou com a concentração do OE e a espécie. As CIM do estudo variaram de 0,625 a 1,25 mg/mL, podendo ser classificadas como inibições moderadas, levando em consideração os valores de referência propostos por Duarte *et al* (2005). Após avaliarem a atividade antimicrobiana de vários OE sobre vários micro-organismos, os autores propuseram os seguintes parâmetros: inibição alta – CIM até 0,5 mg/mL, inibição moderada – CIM entre 0,6 e 1,55 mg/mL e inibição baixa – CIM acima de 1,65 mg/mL.

A atividade antimicrobiana do OEOg sobre leveduras do gênero *Candida* está de acordo com os resultados obtidos em estudo feito por Nakamura *et al.* (2004). Nesse estudo, os autores analisaram a atividade *in vitro* do OE de *O. gratissimum* sobre quatro espécies de *Candida* provenientes de mucosa vaginal (*C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*) e *C. albicans* ATCC 10231 por meio da técnica de microdiluição em caldo de cultura. Os resultados de CIM para as amostras clínicas variaram de 0,38 mg/mL para *C. parapsilosis* a 1,5 mg/mL para *C. tropicalis*. Para *C. albicans* ATCC 10231, a CIM foi 1,5

mg/mL, resultado muito próximo ao encontrado para a mesma cepa utilizada no presente estudo (1,25 mg/mL).

Matasyoh *et al.* 2007, ao avaliarem a atividade antimicrobiana do OEOg pelo método da microdiluição, obtiveram CIM de 0,5 mg/mL para um isolado clínico de *C. albicans*.

A maior ou menor atividade antimicrobiana dos OE tem se mostrado dependente de sua composição química. Constituintes como citral, pineno, cineol, cariofileno, elemeno, furanodieno, limoneno, eugenol, eucaliptol, carvacrol e outros são responsáveis pelas propriedades antissépticas, antibacterianas, antifúngicas e antiparasíticas dos OEs (CRAVEIRO *et al.*, 1981; LIMA *et al.*, 2006; SOUSA *et al.*, 2004).

O caráter lipofílico da sua cadeia de hidrocarbonetos e o carácter hidrófilo dos seus grupos funcionais são de grande importância na ação antimicrobiana dos componentes de OEs (VIERA, *et al.*, 2014). O *ranking* de componentes de OEs com atividade antimicrobiana é: fenóis > aldeídos > álcoois > cetonas > éteres > hidrocarbonetos. Para os compostos fenólicos timol, carvacrol e eugenol, foram constatados os mais elevados potenciais antimicrobianos, o que pode ser explicado pela natureza ácida do grupo hidroxila, que forma uma ligação de hidrogênio com o centro ativo das enzimas dos micro-organismos, prevenindo a ação enzimática (BURT, 2004).

Nesse contexto, podemos inferir que a ação antimicrobiana constatada para o OEOg, no presente estudo, seja atribuída em grande parte ao composto fenólico eugenol, seu componente majoritário. No entanto, por se tratar de uma mistura complexa de componentes, não podemos excluir a possibilidade de efeito sinérgico entre os demais componentes do OE, mesmo quando presentes em baixas concentrações.

Vieira *et al.* (2014), ao estudarem a atividade antifúngica de OEs de espécies de *Ocimum* por meio da determinação da CIM, observaram que, dentre as cinco espécies estudadas, o OE de *O. micranthum* apresentou boa inibição para todas as cepas de *Candida* testadas, com CIM variando de 312,5 µg/mL a 1.250 µg/mL e a CLM de 625 µg/mL a 1.250 µg/mL. O OE de *O. micranthum* foi o que apresentou maior concentração de eugenol (64,8%), o que sugere que esse composto seja um dos principais responsáveis pela atividade antimicrobiana.

Com base nos valores de CIM encontrados para cada espécie de *Candida*, curvas de tempo de morte foram construídas a fim de avaliar o efeito do óleo essencial durante 24 horas em contato com as cepas microbianas estudadas. Diferente dos ensaios para determinação da CIM, esse método permite a determinação da cinética de morte microbiana

(AIYEGORO; AFOLAYAN; OKOH, 2009).

A CIM do OEOg foi capaz de inibir o crescimento celular das cepas de *Candida*, quando comparada ao grupo controle (sem tratamento), mantendo constante a contagem de células viáveis durante as 24 horas do estudo.

No estudo do efeito do OEOg nas diferentes fases de crescimento (exponencial e estacionário), observou-se que as leveduras do gênero *Candida* estudadas são suscetíveis ao efeito do OEOg nas duas fases de crescimento e que essa suscetibilidade é dependente da concentração. A influência do metabolismo microbiano na ação do OEOg variou entre as cepas testadas, mas ficou evidente sua maior atividade inibitória nas primeiras 4 horas de contato com as leveduras, o que pode ser atribuído a possível ocorrência de decomposição do OE após esse tempo.

A cepa *C. parapsilosis* ATCC 90018 quando exposta a CIM de OEOg, apresentou um padrão de crescimento diferente das demais, mantendo sua população viável constante até 24 horas. *C. albicans* ATCC 10231 foi a única entre as leveduras testadas que apresentou maior sensibilidade às concentrações testadas do OEOg durante a fase estacionária. Já as cepas *C. albicans* ATCC 64124 e *C. parapsilosis* ATCC 90018, em fase de crescimento estacionário, apresentaram elevada resistência ao OEOg mantendo-se viáveis mesmo quando expostas por 24h a 2 x CIM.

A concentração de 2 x CIM apresentou ação fungicida, sendo capaz de inviabilizar o crescimento de quase todas as cepas de *Candida* poucas horas após sua adição. Resultados semelhantes foram obtidos por Matasyoh *et al.* (2004).

Os melhores resultados de inibição foram obtidos quando o OEOg foi adicionado após 8 horas de incubação, início da fase exponencial, momento em que as células estavam com o metabolismo muito ativo.

O sinergismo entre agentes antimicrobianos conhecidos e compostos vegetais bioativos é um conceito novo e que pode trazer muitos benefícios à terapêutica convencional (RAKHOLIYA e CHANDA, 2012). Por serem capazes de modular a atividade antimicrobiana de medicamentos convencionais, o uso concomitante desses e de produtos vegetais merece uma análise cuidadosa (ROCHA, 2012).

Segundo Spader *et al.* (2013), a combinação de terapias antifúngicas pode ser uma estratégia potencial para melhorar o prognóstico de algumas infecções fúngicas e estudos *in vitro* envolvendo a associação de drogas têm reportado uma gama de combinações sinérgicas.

O método do *checkerboard* é um dos métodos tradicionais de medida de sinergismo entre antibióticos. Para ser considerada sinérgica, a associação de dois compostos

deve levar a uma redução de quatro vezes na CIM de ambos os antibióticos em comparação a CIM de cada um quando utilizado isoladamente, ou seja, um índice de concentração inibidora fracionada (índice FIC) de $\leq 0,5$ (RAND *et al.*, 1993).

No nosso estudo, o OEOg foi capaz de modular positivamente a atividade antifúngica do cetoconazol sobre a cepa *C. tropicalis* ATCC 13803. A associação OEOg+CET potencializou a atividade antifúngica do OEOg e do CET, até quando usados nas concentrações de 1/16 x CIM. Nenhuma das associações OEOg+ATF testadas foi capazes de modular positivamente a ação antifúngica de CET, NIS e MIC sobre as cepas *C. albicans* ATCC 10231, *C. albicans* ATCC 64124 e *C. parapsilosis* ATCC 90018.

Para as cepas *C. albicans* ATCC 10231 e *C. parapsilosis* ATCC 90018 as associações OEOg+ATF foram 50% antagônicas e 50% indiferentes. Em relação à cepa *C. albicans* ATCC 64124, 66,7% e 33,3% das associações tiveram efeito antagônico e indiferente, respectivamente. Para a cepa *C. tropicalis* ATCC 13803 foram observadas 50% de interações antagonistas, 25% indiferentes e 25% sinérgicas.

Tangarife-Castaño *et al.* (2011), ao analisarem a interação do OE de *Piper bredemeyera* Jacq com os ATF itraconazol e anfotericina B, pela técnica de *checkerboard*, observaram efeito sinérgico do OE com itraconazol na inibição de *C. albicans* ATCC 10231. O principal composto de OE de *P. bredemeyera* Jacq, o terpeno β -pineno (32,3 %), está presente no OEOg em baixas concentrações.

Matias *et al.* (2011) ao avaliarem a modulação de extratos metanólico e hexânico de *O. gratissimum* na atividade de antimicrobianos sobre cepas de *E. coli* e *S. aureus* obtidos de isolados clínicos, observaram que as cepas demonstraram um aumento na sensibilidade aos antibióticos quando esses foram combinados com os extratos. Segundo os autores, vários componentes dos extratos podem promover alterações na permeabilidade da membrana celular, aumentando assim a penetração de antimicrobianos na célula microbiana. Estudos anteriores demonstram que a alteração na permeabilidade da membrana celular é o mais provável mecanismo de ação antimicrobiana dos OE (BURT, 2004), o que pode explicar a modulação positiva da associação OEOg+CET, constatada por nós.

A estratégia de utilização de plantas e drogas em uma abordagem que utiliza uma ou várias combinações de componentes, com o objetivo de afetar não apenas um único alvo, mas vários alvos, onde diferentes componentes terapêuticos colaboram de forma sinérgica é conhecida como “herbal shotgun” ou “*synergistic multieffect targeting*”. Essa abordagem serve para combinações de extratos, combinações entre produtos naturais ou extratos e produtos sintéticos ou antibióticos (MATIAS *et al.*, 2011).

O potencial sinergismo entre OEs e antibióticos é estudado com o objetivo de aumentar a taxa de morte/inibição de micro-organismos, objetivando a redução na duração da terapia para que o surgimento de resistência a fármacos seja evitado, além de buscar a ampliação do espectro de ação e diminuição da toxicidade relacionada aos fármacos utilizados no tratamento convencional, na medida em que a associação entre dois compostos permite a redução de doses dos agentes antimicrobianos a serem administrados (TANGARIFE-CASTAÑO *et al.*, 2011).

O OEOg apresentou boa atividade antifúngica sobre cepas de *Candida*, sendo capaz de reduzir o número de células viáveis em todas as fases de crescimento, sendo mais eficaz no início da fase exponencial, além de ter modulado positivamente a atividade do cetoconazol sobre *C. tropicalis* ATCC 13803. A partir desses resultados, foram feitos estudos preliminares para determinar o possível mecanismo de ação do OE na inibição da levedura.

O OEOg foi capaz de promover um aumento na captação do cristal violeta (CV) em 10,5%, 8,27%, 7,63% e 4,9% pelas cepas de *C. albicans* ATCC 10231 e 64124, *C. tropicalis* ATCC 13803 e *C. parapsilosis* 90018, respectivamente, indicando a ocorrência de alterações na permeabilidade da membrana celular.

Devi *et al.* (2010), ao avaliarem o efeito do eugenol sobre a permeabilidade da membrana externa de *Salmonella typhi* pelo ensaio de absorção do CV, evidenciaram um aumento significativo na absorção de CV após as células serem tratadas com eugenol. Levando em consideração que o CV penetra pobremente na membrana externa íntegra, mas consegue fazê-lo facilmente quando a membrana está danificada, esse resultado mostra que o eugenol, componente majoritário do OEOg, altera a permeabilidade da membrana, tornando-a mais permeáveis a alguns solutos, como o CV.

Os resultados observados para a NIS, ATF utilizado como controle no experimento, comprovam essa alteração, já que seu mecanismo de ação consiste na ligação aos esteroides existentes na membrana celular dos fungos susceptíveis, com resultante alteração na permeabilidade da membrana celular e consequente extravasamento do conteúdo citoplasmático.

Os OEs, devido a seu caráter lipofílico/hidrofóbico, apresentam a capacidade de interagir com a membrana citoplasmática dos micro-organismos, podendo se dissolver na bicama lipídica, desestabilizando assim a membrana e levando ao aumento da sua fluidez, o que resulta em acréscimo na sua permeabilidade passiva (DEVI *et al.*, 2010; ULTEE *et al.*, 2000; ULTEE; BENNIK; MOEZELAAR, 2002).

Nos ensaios de micromorfologia das cepas de *Candida*, foi observada, em

microscópio óptico, a presença de estruturas características do crescimento fúngico, como pseudo-hifas, blastoconídios e clamidoconídios.

A formação de hifas e pseudo-hifas, por representarem uma barreira à fagocitose e permitirem que a levedura fique aderida ao tecido epitelial, está relacionada com fatores de virulência expressos por *C. albicans*. Assim, alterações morfológicas podem ser associadas com a patogenicidade do micro-organismo (ROMANI; BISTONI; PUC CETTI, 2003). Os resultados do nosso estudo mostram que o OEOg nas concentrações utilizadas (1 x e 2 x CIM) foi capaz de reduzir o desenvolvimento de hifas, pseudo-hifas e clamidoconídios.

Ao avaliarem a interferência de OE sobre a micromorfologia de fungos, Alves (2011) e Castro (2010) encontraram resultados que estão em concordância com os nossos. Castro (2010) observou que o OE de *Cinnamomum zeylanicum* na concentração de 312,5 µg/mL foi capaz de reduzir o desenvolvimento de estruturas morfológicas características de *C. albicans*, como pseudo-hifas, blastoconídios e clamicoconídios, e Alves (2011) mostrou que o tintura de *Schinus terebinthifolius* é capaz de inibir a formação de clamidoconídios e pseudo-hifas por cepa de *C. albicans*.

O ensaio hemolítico *in vitro* é uma ferramenta de triagem para estimar a toxicidade *in vivo* na células hospedeiras (AMBER *et al.*, 2010). As células vermelhas de sangue humano fornecem uma ferramenta útil para estudos de toxicidade de substâncias, por serem de fácil obtenção, por terem suas propriedades de membrana bem conhecidas, e por sua lise ser facilmente monitorada através da medição da liberação de hemoglobina (CHAMI, *et al.*, 2005).

Os resultados do nosso estudo mostram que o OEOg nas CIMs para as cepas de *Candida* testadas, apresenta baixa toxicidade, 14 e 10 %, quando comparadas a anfotericina B e fluconazol (Amber *et al.* 2010), sugerindo que o OEOg é seguro para uso *in vivo*. É importante descartar o fato de que nas combinações OEOg+CET, capazes de modular positivamente a atividade do CET sobre *C. tropicalis* ATCC 13803, a CIM do OEOg é reduzida em até 16 vezes (0,078 mg/mL) e que nessa concentração a taxa de hemólise é de 0%, tornando o OEOg um promissor candidato ao tratamento de infecções por esse levedura.

O aumento da captação do CV e a inibição do desenvolvimento de fatores de virulência de *Candida*, como a inibição da formação de pseudo-hifas, indicam que o mecanismo de ação do OEOg pode estar relacionado a alterações nos envoltórios celulares. Esses resultados, aliados aos que comprovam a atividade antimicrobiana do OE e sua baixa toxicidade, indicam boas perspectivas para uso experimental do OEOg. Estudos posteriores deverão investigar mais profundamente seu mecanismo de ação e também seu comportamento

in vivo, a fim de que o OEOg e seus derivados possam ser utilizados como uma alternativa aos fungicidas sintéticos.

7 CONCLUSÃO

Nossos resultados destacam o OEOg como um candidato promissor ao desenvolvimento de um novo antifúngico de uso clínico, uma vez que o ele foi capaz de reduzir a taxa de crescimento celular após contato com as leveduras estudadas, além de apresentar capacidade de modular positivamente a ação do cetoconazol e baixa toxicidade sobre hemácias humanas.

Embora o seu mecanismo de ação ainda não esteja totalmente esclarecido, os experimentos realizados permitem sugerir que o OEOg seja capaz de causar danos no envoltório celular e por consequência interferir no desenvolvimento de estruturas morfológicas ligadas à patogenicidade das leveduras. Deve-se ressaltar que, apesar de sua boa atividade antimicrobiana sobre *Candida spp.*, ainda são necessários estudos adicionais para que o OEOg possa vir a se tornar um novo agente antifúngico.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography: Quadrupole Mass Spectroscopy.** [S.l.]: Allured Publishing Corporation, 2001.
- AGUIAR, J. J. S. Antibacterial and modifying-antibiotic activities of the essential oils of *Ocimum gratissimum* L. and *Plectranthus amboinicus* L. **European Journal of Integrative Medicine**, v. 7, p. 151–156, 2015.
- AHMAD, A. *et al.* Evolution of ergosterol biosynthesis inhibitors as fungicidal against *Candida*. **Microbial Pathogenesis**, v. 48, p. 35–41, 2010.
- AHMAD, A. *et al.* Antifungal activity of *Coriaria nepalensis* essential oil by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*. **Yeast**, v. 28, p. 611-617, 2011.
- AIYEGORO, O.; AFOLAYAN, A.; OKOH, A. *In vitro* antibacterial time kill studies of leaves extracts of *Helichrysum longifolium*. **J Med PI Res.**, v. 3, n. 6, p. 462-467, 2009.
- ALVES, P. M. *et al.* Atividade antifúngica do extrato de *Psidium guajava* Linn. (goiabeira) sobre leveduras do gênero *Candida* da cavidade oral: uma avaliação *in vitro*. **Rev. Bras. Farmacog.**, v. 16, n. 2, p. 192-196, 2006.
- ALVES, L. A. **Ação antifúngica da Tintura de *Schinus terebinthifolius* (Aroeira) sobre *Candida albicans*.** 2011. 80f. Monografia – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2011.
- AMBER *et al.* Anticandidal effect of *Ocimum sanctum* essential oil and its synergy with fluconazole and ketoconazole. **Phytomedicine**, v. 17, p. 921–925, 2010.
- ARAÚJO, J. C. L. V. *et al.* Ação antimicrobiana de óleos essenciais sobre microrganismos potencialmente causadores de infecções oportunistas. **Revista de Patologia Tropical**, v. 33, p.55-64, 2004.
- BAKKALI, F. *et al.* Biological effects of essential oils: a review. **Food Chem. Toxicol.**, p.

446-475, 2008.

BARRETO, M. B. **Estudo químico de *Croton muscicapa* Müll. Arg. (Euphorbiaceae) e avaliação da composição química volátil de *Ocimum* spp (Lamiaceae).** 2008. 210 f. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

BASTOS, V. P. D. **Ação broncodilatadora e anti-inflamatória do 1,8-cineol e modelo experimental de asma em cobaias.** 164 f. 2009. Tese (Doutorado) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, 2009.

BETONI J E C. *et al.* Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 387-390, 2006.

BIASI, L. A. *et al.* Adubação orgânica na produção, rendimento e composição do óleo essencial da alfavaca quimiotipo eugenol. **Horticultura Brasileira**, v. 27, p. 035-039, 2009.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos.** Secretaria da Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Brasília, 2009.

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

CAMPÊLO, L. M. L. *et al.* Antioxidant and Antinociceptive Effects of *Citrus limon* Essential Oil in Mice. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2011, p.1-8, 2011.

CASTRO, R. D. **Atividade antifúngica do óleo essencial de *Cinnamomum zeylancum* Blume (canela) e de sua associação com antifúngicos sintéticos sobre espécies de *Candida*.** 2010. 170 f. Tese (Doutorado) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB, 2010.

CECHINEL, V. F.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Quím Nova**, v. 21, n.1, p. 99-105, 1998.

CHAMI N. *et al.* Study of anticandidal activity of carvacrol and eugenol *in vitro* and *in vivo*. **Oral Microbiol Immunol.**, v. 20, p. 106–111, 2005.

CHAVES, F. C. M. **Produção de biomassa, rendimento e composição do óleo essencial de alfavaca-cravo (*Ocimum gratissimum* L.) em função da adubação orgânica e épocas de corte.** 2001. 160 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP, 2001.

CLEELAND, L.; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials *in vitro* and experimental animal infections. In: LORIAN, V. M. D. **Antibiotics in Laboratory Medicine.** Baltimore, p.739-788, 1991.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Método de referência para testes de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade de leveduras à terapia antifúngica: Norma Aprovada.** 2ed. Norma M27-A2 do CLSI. Pennsylvania, 2008.

CORRÊA, A. D.; SIQUEIRA-BATISTA, R.; QUINTAS, L. E. M. **Plantas medicinais: do cultivo à terapêutica.** 7. ed. Petrópolis, RJ: Vozes, 2008. 247 p.

CRAVEIRO, A. A. *et al.* **Óleos essenciais de plantas do Nordeste.** Fortaleza: UFC, 1981.

DAFERERA, D. J.; ZIOGAS, B. N.; POLISSIOU, M. G. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. **Crop Protection**, v. 22, p. 39-443, 2003.

DAMBOLENA, J. S. *et al.* Essential oils composition of *Ocimum gratissimum* L. from Kenya and their inhibitory effects on growth and fumonisin production by *Fusarium verticillioides*. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.11, p. 410-414, 2010.

DAVID, E. F. S. *et al.* Influência da temperatura de secagem no rendimento e composição química do óleo essencial de *Ocimum selloi* Benth. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 8, n. 4, p. 61-76, 2006.

DE MORAIS, S. M. *et al.* Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de Croton do nordeste do Brasil. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 907, 2006.

DEVI, K. P. *et al.* Eugenol (an essential oil of clove) acts as antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, p. 107–115, 2010.

DUARTE, M. C. *et al.* Anti-*Candida* activity of brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 305-311, 2005.

ELIOPOULOS, G. M.; MOELLERING, R. C. **Antimicrobial combinations**. In *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 3rd ed. Lorian, v. 492pp. Baltimore: Williams & Wilkins. 1991.

ESCOBAR, R. G. Eugenol: Propriedades farmacológicas y toxicológicas. Ventajas y desventajas de su uso. **Rev. Cubana Estomatol.**, v. 39, 2002.

EUCAST. Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. **Clinical Microbiology Journal**, v. 9, n. 8, p. 1-7, 2003.

FARIA, T. J. *et al.* Antifungal activity of essential oil isolated from *Ocimum gratissimum* L. (eugenol chemotype) against phytopathogenic fungi. **Brazilian archives of biology and technology**, v. 49, n.6, p. 867-871, nov. 2006.

FERREIRA, M. V. C.; PAES, V. R.; LINCTENSTEIN, A. Penicilina: oitenta anos. **Rev. med. (São Paulo)**, v. 87, n. 4, p. 272-276, 2008.

FRANCO, R. M. *et al.*, Resistência Antimicrobiana de *Escherichia coli* Isoladas de Carne e Dejetos Suínos. **Acta Veterinaria Brasilica**. v. 4, n. 1, p. 31-36, 2010.

GOLDMAN, G. H. *et al.*, Evaluation of fluconazole resistance mechanisms in *Candida albicans* clinical isolates from HIV-infected patients in Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 50, p. 25–32, 2004.

GONÇALVES, L. A. *et al.*, Produção e composição do óleo essencial de alfavaquinha (*Ocimum selloi* Benth.) em resposta a dois níveis de radiação solar. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v. 6, p. 8-14, 2003.

HARRIS, F.; PHOENIX, D. A. An investigation into the ability of C-terminal homologues of *Escherichia coli* low molecular mass penicillin-binding proteins 4, 5 and 6 to undergo membrane interaction. **Biochimie**, v. 79, n. 4, p. 171-174, 1997.

KONEMAN, E. W. *et al.* **Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido**. 5ª Edição. Editora Médica e Científica Ltda, Rio de Janeiro-RJ, 2001.

LIMA, I. G. *et al.* Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 2, p. 197-201, 2006.

LINARD, C. F. B. M. **Estudo do efeito antinociceptivo do eugenol**. 2008. 90 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza-CE, 2008.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JUNIOR, V. F. Plantas Medicinais: A Necessidade de estudos multidisciplinares. **Quim. Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MARTINS, I. M. C. L. B. **Avaliação da ação antifúngica de *Citrus limon* Linn. frente a leveduras do gênero *Candida***. 2009. 76 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2009.

MARTINS, C. H. G. *et al.* Determinação *in vitro* da atividade antibacteriana dos extratos brutos da casca e polpa farinácea de *Hymenaea coubaril* L. **Investigação**, v. 10, n. 2-3, 2010.

MATASYOH, L. G. *et al.* Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. growing in Eastern Kenya. African. **Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 6, p. 760-765, 2007.

MATIAS, E. F. F. Atividade antibacteriana *In vitro* de *Croton campestris* A., *Ocimum gratissimum* L. e *Cordia verbenacea* DC. **R. Bras. Bioci.**, v. 8, n. 3, p. 294-298, 2010.

MATIAS, E. F. F. *et al.* Phytochemical screening and modulation of antibiotic activity by *Ocimum gratissimum* L. **Biomedicine & Preventive Nutrition**, v. 1, p. 57–60, 2011.

MATOS, F. J. A. **Farmácias vivas**. Fortaleza. UFC. 219 pp. 1998.

MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais**: Guia de seleção e emprego de plantas utilizadas em fitoterapia no nordeste do Brasil. Fortaleza: UFC, 2007.

MATTOS, S. H. *et al.* **Plantas Medicinais e Aromáticas cultivadas no Ceará**: Tecnologia de produção e óleos essenciais. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, 2007. (Série BNB Ciência e Tecnologia).

MENDES, S. S. *et al.* Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of the

essential oil of *Lippia gracilis* leaves. **J. Ethnopharmacol.**, v. 129, n. 3, p. 391-397, 2010.

MUROI, H.; KUBO, I. Antibacterial activity of anacardic acid and totarol, alone and in combination with methicillin, against methicillinresistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Bacteriology**. v. 80, p. 387-39, 1996.

NAKAMURA, C. V. *et al.* Antibacterial activity of *Ocimum gratissimum* L. essential oil, **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 94, p. 675-678, 1999.

NAKAMURA, C. V. *et al.* *In vitro* activity of essential oil from *Ocimum gratissimum* L. against four *Candida* species. **Research in Microbiology**, v. 155, p. 579-586, 2004.

NOLDIN, V. F. **Estudo fitoquímico das folhas e rizomas de *Simaba ferruginea* ST. HIL. e avaliação da atividade antiúlcera e antinociceptiva dos extratos e compostos isolados.** 2005. 91f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade do Vale do Itajaí, Santa Catarina, 2005.

OGENDO, J. O. *et al.* **Bioactivity of *Ocimum gratissimum* L. oil and two of its constituents against five insect pests attacking stored food products.** *Journal of Stored Products Research*, v.44, p.328-334, 2008.

OLIVEIRA, L. B. S. **Caracterização química e atividade antimicrobiana do óleo essencial de folhas de *Ocimum gratissimum* L.** 2013. 51f. Monografia – Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

OTAIZA, O. R. F. Políticas de control de antimicrobianos en el nivel hospitalario. **Rev. Chil. Infectol.**, v. 19, p. 219-221, 2002.

PANDEY, A. K.; SINGH, P.; TRIPATHI, N. N. Chemistry and bioactivities of essential oils of some *Ocimum* species: an Overview. **Asian Pac J Trop Biomed.**, v. 4, n.9, p. 682-694, 2014.

PATEL, R. P. *et al.* Phenotypic characterization and stability analysis for biomass and essential oil yields of fifteen genotypes of five *Ocimum* species. **Industrial Crops and Products**, v. 77, p. 21–29, 2015.

PESSOA, L. M. *et al.* Anthelmintic activity of essential oil of *Ocimum gratissimum* Linn. and

eugenol against *Haemonchus contortus*. **Veterinary parasitology**, v. 109, p. 59-63, 2002.

RAKHOLIYA, K.; CHANDA, S. *In vitro* interaction of certain antimicrobial agents in combination with plant extracts against some pathogenic bacterial strains. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, p. S876-S880, 2012.

RAND, K. H. *et al.* Reproducibility of the Microdilution Checkerboard Method for Antibiotic Synergy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 37, n. 3, p. 613-615, 1993.

REICHLING, J. *et al.* Essential Oils of Aromatic Plants with Antibacterial, Antifungal, Antiviral, and Cytotoxic Properties – an Overview. **Forsch Komplementmed**, v.16, p. 79-90, 2009.

RIBEIRO, D. S.; VELOZO, E. S.; GUIMARÃES, A. G. Interaction between the rosemary essential oil (*Rosmarinus officinalis* L.) and antimicrobial drugs in the control of bacteria isolated from foods. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 4, n. 1, p. 10-19, 2013.

ROCHA, L. Q. **Interferência do óleo essencial de folhas do quimiotipo II de *Lippia alba* (MILL.) N.En BROWN na atividade antimicrobiana da oxacilina sobre *Staphylococcus aureus* oxacilina-resistente.** 2012. 127 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

ROMANI, L.; BISTONI, F.; PUC CETTI, P. Adaptation of *Candida albicans* to the host environment: the role of morphogenesis in virulence and survival in mammalian hosts. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, n. 4, p. 338-343, ago.2003.

ROMEIRO, R. **Técnica de microgota para contagem de células bacterianas viáveis em uma suspensão:** UFV Viçosa 2007.

SALES, G. W. **Avaliação da atividade antimicrobiana e do mecanismo de ação do óleo essencial extraído da casca de frutos da *Hymenea courbail* L.** 2014. 141 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

SANTOS, F. A. *et al.* 1,8-cineole (eucalyptol), a monoterpene oxide attenuates the colonic damage in rats on acute TNBS-colitis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, p. 579-584, 2004.

- SANTOS, S. C. *et al.* Atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato de *Abarema cochliocarpos* (Gomes) Barneby; Grimes. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 17, n. 2, 2007.
- SILVA, A. F. *et al.* Composição química do óleo essencial de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. (Lamiaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 6, p. 1-7, 2003.
- SILVA, L. L. *et al.* Essential oil of *Ocimum gratissimum* L.: Anesthetic effects, mechanism of action and tolerance in silver catfish, *Rhamdia quelen*. **Aquaculture**, v. 350-353, p. 91–97, 2012.
- SINGH, A.; MAHTO, K. K.; e PRASAD, R.. Lipidomics and in Vitro Azole Resistance in *Candida albicans*. **Journal of Integrative Biology**, v. 17, n. 2, 2013.
- SOUSA, M. P. *et al.* **Constituintes químicos ativos e propriedades biológicas de plantas medicinais brasileiras**. Fortaleza: UFC, 2004.
- SOUZA, N. A. B. **Possíveis mecanismos de atividade antifúngica de óleos essenciais contra fungos patogênicos**. 2010. 150 f. Tese (Doutorado) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2010.
- SPADER, T. B. *et al.* Synergism of voriconazole or itraconazole with other antifungal agents against species of *Fusarium*. **Rev Iberoam Micol**, v.30, n.3, p. 200-204, 2013.
- SVETAZ, L. *et al.* Antifungal activity of *Zuccagnia punctata* cav.: Evidence for the mechanism of action. **Planta Med**, n. 73, p. 1-7, 2007.
- SYLVESTRE, M. *et al.* Essential oil analysis and anticancer activity of leaf essential oil of *Croton flavens* L. from Guadeloupe. **J Ethnopharmacol**, v. 103, p. 99–102, 2006.
- TANGARIFE-CASTAÑO, V. *et al.* Actividad contra *Candida albicans*, citotoxicidad e interacción com antifúngicos de aceites esenciales y extractos de plantas medicinales y aromáticas. **Infectio**, v. 15, n. 3, p. 160-167, 2011.
- TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos**. 2. ed, São Paulo: Atheneu, 2001.

TAVARES, E. S. *et al.* Análise do óleo essencial de folhas de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. (Verbenaceae) cultivados em condições semelhantes. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 15, p.1-5, 2005

TEIXEIRA, A. B. **Avaliação das atividades antimicrobiana e antioxidante dos óleos essenciais das folhas do quimiotipos I, II e III de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown.** 2009. 139 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C.L. **Microbiologia.** 6 ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2000.

TOSCAN, C. M. **Atividade antimicrobiana e antioxidante de terpenóides.** 84 f. 2010. Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências Agrárias e Biológicas, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul-RS, 2010.

ULTEE, A. *et al.* Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. **Archives of microbiology**, v. 174, n.4, p. 233-238, 2000.

ULTEE, A.; BENNIK, M.; MOEZELAAR, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and environmental microbiology**, v. 68, n. 4, p. 1561-1568, 2002.

VAARA, M.; VAARA, T. Outer membrane permeability barrier disruption by polymyxin in polymyxin-susceptible and resistant *Salmonella typhimurium*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 19, n. 4, p. 578-583, 1981.

VIEIRA, P. R. N. *et al.* Chemical composition and antifungal activity of essential oils from *Ocimum* species. **Industrial Crops and Products**, v. 55, p. 267-271, 2014.

WALSH, S. E. *et al.* Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on Gram-positive and Gram-negative bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, p. 240–247, 2003.

ZUZARTE M. *et al.* Antifungal activity of phenolic-rich *Lavandula multifida* L. essential oil. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 31, p. 1359-1366, 2012.

ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO COMITÊ DE ÉTICA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
CEARÁ/ PROPESQ



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO DO SINERGISMO E MECANISMO DE AÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS DE *Ocimum gratissimum* L. SOBRE ESPÉCIES DE *Candida*

Pesquisador: Luciana de Brito Siebra e Oliveira

Área Temática:

Versão:

CAAE: 32878314.0.0000.5054

Instituição Proponente: Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 751.168

Data da Relatoria: 14/08/2014

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de dissertação do Mestrado em Ciências Farmacêuticas que visa estudar o efeito do óleo essencial de folhas de *O. gratissimum* L. (OEOg) na atividade de antifúngicos comerciais sobre cepas-padrão *Candida*, o OEOg foi escolhido para avaliação do potencial antimicrobiano sobre cepas de *Candida albicans* resistentes a azóis, isoladamente e quando associado ao fluconazol.

Objetivo da Pesquisa:

GERAL

Estudar o efeito do óleo essencial de folhas de *O. gratissimum* L. (OEOg) na atividade de antifúngicos comerciais sobre cepas-padrão *Candida*.

ESPECÍFICOS

- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal Mínima (CLM), in vitro, do OEOg e de antifúngicos comerciais sobre cepas-padrão de *C. albicans* e não *albicans*;

Continuação do Parecer: 751.168

- Determinar o mecanismo de ação do OEOg na inibição/morte de cepas-padrão nas fases de crescimento exponencial e estacionário;
- Avaliar a ação do OEOg na parede celular de cepas-padrão de espécies de *Candida*;
- Avaliar o efeito do tempo de exposição ao OEOg, aos antifúngicos e às combinações OEOg-antifúngicos sobre inibição/morte de cepas-padrão de *Candida*;
- Avaliar a citotoxicidade e a hematotoxicidade do OEOg *in vitro*.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:risco mínimo

Benefícios:A descoberta de um produto natural que tenha efeito sinérgico com antifúngicos comerciais pode levar a mais estudos que visem a produção de um tratamento para infecções fúngicas de menor custo e com possível diminuição dos efeitos tóxicos causados por esses agentes sintéticos atualmente. utilizados nos tratamentos atuais.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O OEOg será extraído, analisado e determinado seu potencial antimicrobiano em cepas padrão de *Candida* provenientes da American Type Culture Collection (ATCC): *Candida albicans* ATCC 10231; *Candida albicans* ATCC MYA-574; *C. albicans* ATCC 96901; *C. albicans* ATCC 90028; *C. albicans* ATCC 76485; *Candida krusei* ATCC 6252; *C. krusei* ATCC 6258; *Candida tropicalis* ATCC 750; *Candida glabrata* ATCC 90030; *Candida parapsilosis* ATCC 90018. Será realizado o estudo do efeito das associações OEOg e antifúngicos comerciais sobre cepas de *Candida*.

Será ainda avaliada a hematotoxicidade do OEOg em sangue periférico feita por punção de voluntários adultos e saudáveis será realizado pelo Hemocentro do Ceará (HEMOCE).

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados de forma adequada a Folha de Rosto, Currículo do pesquisador, autorização autorização do local onde a pesquisa será realizada, anuência dos pesquisadores, solicitação de dispensa do TCLE, termo de Fiel Depositário, cronograma e orçamento.

Continuação do Parecer: 751.168

Na carta de encaminhamento ao CEP, a pesquisadora ainda se refere a resolução 198/96

Recomendações:

Atualizar a legislação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

FORTALEZA, 14 de Agosto de 2014

Assinado por:
FERNANDO ANTONIO FROTA BEZERRA
(Coordenador)