



UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI - URCA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOPROSPECÇÃO MOLECULAR
MESTRADO ACADÊMICO EM BIOPROSPECÇÃO MOLECULAR

DARA ISABEL VIEIRA DE BRITO

**Avaliação da atividade antifúngica do óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham. e do timol
sobre cepas do gênero *Candida***

CRATO – CE,
2014

DARA ISABEL VIEIRA DE BRITO

Avaliação da atividade antifúngica do óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham. e do timol sobre cepas do gênero *Candida*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri como requisito para obtenção do título de MESTRE EM BIOPROSPECÇÃO MOLECULAR (Área de concentração: Bioprospecção de Produtos Naturais e Microbiologia).

Orientador:

Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho

Brito, Dara Isabel Vieira de.
B862a Avaliação da atividade antifúngica do óleo essencial de
Lippia sidoides Cham. e do timol sobre cepas do gênero *Candida*/
Dara Isabel Vieira de Brito. – Crato-CE, 2014
75p.; il.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri –
URCA. Área de concentração: Bioprospecção de Produtos Naturais
e Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho

1. *Lippia sidoides*, óleo essencial; 2. Concentração
Fungicida Mínima (CFM); 3. Concentração Inibitória
Mínima (CIM); 4. Micromorfologia fúngica; I. Título.

CDD: 615.321

DARA ISABEL VIEIRA DE BRITO

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri – URCA, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioprospecção Molecular.

Dissertação apresentada em: 24 / 02 / 2014

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho (Orientador)
Departamento de Ciências Biológicas - URCA

Prof. Dr. Djair dos Santos de Lima e Souza (Avaliador externo)
Universidade Federal Rural do Semi- Árido - UFERSA

Prof. Dra. Marta Regina Kerntopf (Avaliador Interno)
Universidade Regional do Cariri - URCA

Prof. Dr. Felipe Silva Ferreira (Suplente)
Universidade Regional do Cariri - URCA

CRATO – CE,

2014

Dedico aos meus pais, **Severino Joaquim de Brito** e **Maria Vieira Lopes**, assim como sempre dedicaram a mim as suas vidas. Todas as minhas conquistas são suas. Obrigada por tanto amor!

AGRADECIMENTOS

Á Deus, por ter iluminado os meus passos, me dado sabedoria, saúde e forças para superar os muitos obstáculos desta caminhada.

Ao meu orientador Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho, pela oportunidade, pela aprendizagem, sempre me auxiliando e aconselhando durante essa minha jornada. Obrigada por sua compreensão.

A Prof. Ms. Maria Flaviana Bezerra Morais Braga, por sua amizade, pelo seu carinho, por dividir comigo os prós e contras (que não foram poucos) da aprendizagem da metodologia do meu trabalho. Pelas inúmeras horas de bancada que passamos juntas! Obrigada pelo seu apoio, sua atenção, conselhos e dedicação, e por estar sempre disponível.

A Mayron Santos de Figueiredo Lima (meu chato) por tudo, pelo seu apoio, dedicação e amor, por sempre me acompanhar, por me ajudar, por ser meu motorista (risos), por sempre me apoiar e me entender. Sempre esteve presente, obrigada pela sua ENORME paciência. Desculpa por lhe incomodar nos domingos e feriados para que me acompanhasse nos meus testes.

A Rosimeire Sabino Albuquerque, minha “I.C. roubada de Nadghia”, pela amizade, sinceridade, companheirismo e pelas ótimas conversas. Obrigada por sempre me acompanhar tanto nos teste quanto no desenvolvimento deste trabalho, por me incentivar (bastante) a concluir essa etapa da minha vida acadêmica. Sem sua ajuda, isso não seria possível.

A Nadghia Figueredo Leite por sempre me ajudar, sem hesitar. Principalmente por tentar me fazer entender um pouco mais sobre informática. Desculpa as muitas vezes que lhe perturbei.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular pela oportunidade de crescimento intelectual durante este curso.

Aos meus colegas de mestrado pelo enorme incentivo e pelos bons momentos que desfrutamos durante esta caminhada. Em especial agradeço a Nadghia, Elba, Karyzia, pela amizade, pelas conversas, pelas experiências compartilhadas e pelos bons momentos.

Aos meus amigos do Laboratorio de Microbiologia e Biologia Molecular (LMBM), Rosimeire Sabino, Nadghia Leite, Elba Sobral, Joara Nalyda, Karyzia Lima, Flaviana Morais, Liscássia Beatriz, Audilene Freita, Saulo Relison, Ivanildo Pinho, Francisco Cunha e João Victor pela amizade, pelo acolhimento, pela ajuda, apoio e aprendizagem.

Ao Prof. Dr. José Galberto Martins da Costa e a equipe do LPPN por disponibilizar o laboratório para as etapas iniciais desta pesquisa.

A banca de defesa: Prof. Dr. Djair dos Santos de Lima e Souza, Prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes e Prof. Dr. Felipe Silva Ferreira pela disponibilidade.

Ao laboratório de Zoologia por disponibilizar seus equipamentos para realização dos testes.

Aos colegas e professores de outros laboratórios por serem sempre prestativos, amigáveis, e por me ajudarem sempre que precisei.

A Erlânio, por tentar me fazer entender um pouco sobre química.

Ao Programa de Mestrado em Bioprospecção Molecular, na pessoa do coordenador Dr. Allyson Pontes Pinheiro e o vice-coordenador Dr. Irwin Rose Alencar Menezes por sempre estarem dispostos a ajudar.

A professora Dr. Edeltrudes Lima da Universidade Federal da Paraíba – UFPB por nos acolher tão bem na UFPB, repassando o conhecimento para que esse projeto fosse realizado e também pelas doações dos micro-organismos.

Ao Herbário Caririense Dardano de Andrade Lima, sob supervisão da Prof. Dr, Maria Arlene Pessoa da Silva da Universidade Regional do Cariri – Urca, e ao amigo Antonio Carlito, pela catalogação das exsiccatas e encaminhamento para a identificação botânica.

A Universidade Regional do Cariri – URCA, por ceder o espaço para realização deste trabalho.

A FUNCAP, CNPQ e CAPES por ter colaborado financeiramente durante todo o desenvolvimento da pesquisa.

Enfim, os meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!!!

“Um homem que nunca muda de opinião, em vez de demonstrar a qualidade da sua opinião demonstra a pouca qualidade da sua mente.”

Marcel Achard

SUMÁRIO

LISTAS DE FIGURAS.....	i
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ii
LISTA DE ANEXOS.....	iii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v
1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Apresentação.....	16
1.2 Dados botânicos.....	18
1.2.1 Família Verbenaceae.....	18
1.2.2 O gênero <i>Lippia</i>	19
1.2.3 A espécie <i>Lippia sidoides</i> Cham.	19
1.3 Óleos essenciais.....	21
1.4 Atividades biológicas do óleo essencial de <i>Lippia sidoides</i>.....	21
1.5 Timol.....	22
1.6 Fungos.....	23
1.7 <i>Candida albicans</i>.....	24
1.7.1 Morfologia.....	24
1.8 <i>Candida tropicalis</i>.....	25
1.8.1 Morfologia.....	26
1.9 <i>Candida krusei</i>.....	26
1.9.1 Morfologia.....	27
2 OBJETIVOS.....	29
2.1 Objetivo geral.....	29
2.2 Objetivos específicos.....	29
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
3.1 Seleção e coleta do material botânico.....	31
3.2 Extração de Óleo Essencial.....	31
3.3 Análise do óleo essencial por CG-EM.....	31
3.4 Obtenção do timol.....	32

3.5 Micro-organismos.....	32
3.6 Meios de Cultura.....	32
3.7 Inóculo.....	32
3.8 Screening.....	33
3.9 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	34
3.10 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM).....	35
3.11 Avaliação do efeito do óleo essencial de <i>Lippia sidoides</i> Cham. e do Timol sobre a micromorfologia de <i>Candida</i>.....	36
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
4.1 Avaliação da atividade antifúngica do óleo essencial de <i>Lippia sidoides</i> Cham. e do timol sobre cepas de <i>Candida</i>.....	40
5 CONCLUSÕES.....	58
REFERÊNCIAS.....	60
ANEXOS.....	69

RESUMO

Lippia sidoides Cham. (Verbenaceae), é popularmente conhecida no Brasil como "alecrim-pimenta", é nativa das regiões semi-áridas do Nordeste brasileiro, e utilizada na medicina tradicional como anti-séptico. Esta espécie possui folhas muito aromáticas e picantes que apresentam óleo essencial rico em timol e carvacrol. O efeito terapêutico de *L. sidoides* tem sido atribuído principalmente à presença do timol, componente encontrado não só apenas no óleo essencial, mas também em extratos hidroalcoólicos. O presente estudo avaliou a atividade antifúngica do óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham. e do seu componente majoritário, o timol, sobre cepas de *Candida* através da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Fungicida Mínima (CFM) e de alterações morfológicas das cepas produzidas pelo produtos testados. Primeiramente foi realizada uma seleção com 16 cepas fúngicas pela técnica de difusão em meio sólido, os melhores resultados foram com as seguintes cepas: CK 01, CK 02, CA 62 e CT 20. A análise da composição química do óleo foi realizada por Cromatografia Gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), apresentando o timol como componente majoritário. Outros constituintes químicos como carvacrol, p-pineno, 1,8 cineol, γ -terpineno, éter metil carvacrol e β -cariofileno foram identificados. A CIM do óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham. (OELS), frente às cepas variou entre 64 e 256 $\mu\text{g/mL}$. A CIM do timol variou entre 32 e 64 $\mu\text{g/mL}$. A CFM do OELS variou entre 128 e 512 $\mu\text{g/mL}$, para o timol foram encontrados valores entre 64 e 128 $\mu\text{g/mL}$. Em relação à micromorfologia, quando utilizado o OELS, nas cepas CK 01 e CT 20, a presença de pseudohifas foi considerada ausente. Quando utilizado o timol, a presença de pseudohifas foi considerada ausente nas cepas CK 01 e CA 62, ocorrendo uma redução da morfogênese na cepa CT 20. Estes dados são promissores e poderão incentivar futuras pesquisas sobre os aspectos fitoquímicos, toxicológicos e farmacológicos tanto do óleo essencial de *Lippia sidoides* como também de seus componentes químicos.

Palavras-chaves: Concentração Fungicida Mínima (CFM), Concentração Inibitória Mínima (CIM), micromorfologia fúngica.

ABSTRACT

Lippia sidoides Cham. (Verbenaceae), is popularly known in Brazil as "pepper-rosmarin", is native to semi-arid regions of Brazil, and used in traditional medicine as an antiseptic. This species has leaves very aromatic and spicy presenting essential oil rich in thymol and carvacrol. The therapeutic effect of *L. sidoides* has been attributed primarily to the presence of thymol, only component found not only in the essential oil, but also in hydroalcoholic extracts. The present study evaluated the antifungal activity of the essential oil of *Lippia sidoides* Cham. and its major component, thymol on *Candida* strains through the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Fungicidal Concentration (MFC) and morphological changes of the strains produced by the tested products. First a selection of 16 fungal strains by diffusion technique was performed on solid medium, the best results were with the following strains: CK 01, CK 02, CA 62 and CT 20. The chemical composition of the oil was performed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS), with thymol as the major component. Other chemical constituents such as carvacrol, p-pinene, 1,8 cineole, γ -terpinene, methyl carvacrol and β -caryophyllene were found. The MIC of the essential oil of *Lippia sidoides* Cham. (OELS) against the strains ranged between 64 and 256 $\mu\text{g/mL}$. The MIC of thymol ranged between 32 and 64 $\mu\text{g/mL}$. MFC the OELS varied between 128 and 512 $\mu\text{g/mL}$, thymol were found to values between 64 and 128 $\mu\text{g/mL}$. Regarding micromorphology when OELS used in CT strains CK 01 and CT 20, the presence of pseudohyphae was regarded as absent. When used thymol, the presence of pseudohyphae was regarded as absent in strains CA CK 01 and 62, causing a reduction in the morphogenesis of strain CT 20. These data are promising and may encourage future research on aspects phytochemical, pharmacological and toxicological both the essential oil of *Lippia sidoides* as well as their chemical components.

Keywords: Minimum Fungicidal Concentration (MFC), Minimum Inhibitory Concentration (MIC), fungal micromorphology.

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1	– Fotografia de arbusto de <i>Lippia sidoides</i> Cham	20
Figura 2	– Estrutura molecular do timol	23
Figura 3	– Estruturas leveduriformes observadas em microscópio óptico.....	24
Figura 4	– Aspectos microscópicos da levedura <i>Candida albicans</i> após realização de microcultivo em Ágar-arroz	25
Figura 5	– Aspectos microscópicos da levedura <i>Candida tropicalis</i> após realização de microcultivo em Ágar-arroz	26
Figura 6	– Aspectos microscópicos da levedura <i>Candida krusei</i> após realização de microcultivo em Ágar-arroz	27
Figura 7	– Fluxograma demonstrando a preparação do inoculo.....	33
Figura 8	– Fluxograma demonstrando a técnica de difusão em cavidades.....	34
Figura 9	– Fluxograma demonstrando a determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	35
Figura 10	– Fluxograma demonstrando a determinação da concentração fungicida mínima (CFM).....	36
Figura 11	– Fluxograma demonstrando a técnica de microcultivo.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS

ASD – Agar Sabouraud Dextrose

C₁₀H₁₄O - Timol

CA – *Candida albicans*

CFM – Concentração Fungicida Mínima

CG-MS – Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa

Cham. – Chamisso

CHCl₃ - Clorofórmio

CIM – Concentração Inibitória mínima

CK – *Candida krusei*

CSD – Caldo Sabouraud Dextrose

CT - *Candida tropicalis*

DMSO – Dimetilsulfóxido

et al – e outros; e colaboradores (latim)

HCDAL – Herbário Caririense Dárdano de Andrade-Lima

HIV - Human Immunodeficiency Virus

ICS - infecção da corrente sanguínea

LMBM – Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular

LPPN – Laboratório de Pesquisas de Produtos Naturais

NaCl – Cloreto de Sódio

OELS – Óleo essencial de *Lippia Sidoides*

pH – Potencial Hidrogeniônio

SNC – Sistema Nervoso Central

UFC - Unidade formadora de colônia

UFC/mL – Unidades Formadoras de Colônia por mililitro

UFPB – Universidade Federal da Paraíba

URCA – Universidade Regional do Cariri

µg/mL - microgramas de soluto por mililitro de solvente

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1 – Comprovante de aceite para publicação

Avaliação da atividade citotóxica e potencial antiparasitário *in vitro* do α -pineno e carvacrol.

ANEXO 2 – Comprovante de publicação

Atividade antiparasitária *in vitro* e citotóxica de cariofileno e eugenol contra *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania brasiliensis*.

ANEXO 3 – Comprovante de aceite para publicação

Avaliação das potenciais atividades tripanocida e antileishmania do extrato de folhas de *Piper arboreum* (Piperaceae) e de suas frações.

ANEXO 4 – Comprovante de publicação

Use of natural products to enhance the antibiotic activity of gentamicin and other aminoglycosides: the future of antibiotic therapy.

ANEXO 5 – Comprovante de submissão

In vitro enhancement of the antibiotic activity by fractions of leaves of *Croton campestris* (Euphorbiaceae).

ANEXO 6 – Comprovante de publicação

Efeito antifúngico e atividade moduladora de *Lygodium venustum* SW

ANEXO 7 – Boletim analítico de timol cristalizado

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Apresentação

O arbusto *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae), é popularmente conhecida no Brasil como "alecrim-pimenta", é nativa das regiões semi-áridas do Nordeste brasileiro, e utilizada na medicina tradicional como anti-séptico (MATOS, 2000). Existem relatos sobre a atividade antimicrobiana de *L. sidoides*: a atividade do óleo essencial foi avaliada contra *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus* e *Microsporium canis* (BOTELHO *et al.*, 2007; FONTENELLE, 2008; AZUMA, K. *et al.*, 2003, VERAS *et al.*, 2011). O óleo essencial também demonstrou efeitos anti-inflamatórios, anti-oxidantes e gastroprotetor, associado com baixa toxicidade (FONTENELLE *et al.*, 2007, MONTEIRO *et al.*, 2006).

Pode-se considerar como planta medicinal aquela administrada sob qualquer forma e por alguma via ao homem, exercendo algum tipo de ação farmacológica. As plantas podem ser classificadas de acordo com sua ordem de importância, iniciando-se pelas plantas empregadas diretamente na terapêutica, seguidas daquelas que constituem matéria-prima para manipulação e, por último, as empregadas na indústria para obtenção de princípios ativos ou como precursores em semi-síntese. As plantas medicinais têm sido utilizadas tradicionalmente para o tratamento de várias enfermidades. Sua aplicação é vasta e abrange desde o combate ao câncer até microrganismos patogênicos (SILVA; CARVALHO, 2004; CALIXTO, 2000).

As plantas, além de seu uso na medicina popular com finalidades terapêuticas, têm contribuído, ao longo dos anos, para a obtenção de vários fármacos, até hoje amplamente utilizados na clínica, como a emetina, a vincristina, a colchicina e a rutina. A cada momento são relacionadas na literatura novas moléculas, algumas de relevante ação farmacológica como a forskolina, o taxol e a artemisinina (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998).

O advento dos quimioterápicos causou conforto às populações humanas durante algum tempo, pois se acreditava que enfermidades existentes seriam curadas e que a qualidade de vida seria primada e preservada. Desde os anos de 1940, o desenvolvimento de fármacos efetivos e seguros para lidar com as infecções bacterianas e outras revolucionou o tratamento médico, e a morbidade e a mortalidade associadas a estas doenças foram drasticamente diminuídas (RANGE *et al.*, 2007). Porém, a história tomou outro rumo quando se observou que as pessoas continuavam suscetíveis aos mais variados tipos de infecções, e que esta condição vinha sendo alarmantemente ampliada em relação a um grande número de

microrganismos (MORAIS-BRAGA, 2012). Em um curto espaço de tempo surgiam linhagens de micro-organismos resistentes à droga e capazes de sobreviver ao tratamento realizado (VERMELHO *et al.*, 2007). A resistência aos quimioterápicos também pode se desenvolver em outros microrganismos além das bactérias, como por exemplo, nos fungos (CASTRO *et al.*, 2006).

Um crescente número de cepas fúngicas vêm se tornando resistente aos fármacos antifúngicos atualmente comercializados. Kanafani e Perfect (2008) caracterizam dois tipos de resistência: a primária (ou intrínseca), encontrada naturalmente em certos fungos, sem exposição prévia a drogas. E a secundária (ou adquirida), que se desenvolve em cepas após exposição ao agente antifúngico, sendo dependente de expressão do gene alterado.

Nos fungos, dentre os principais mecanismos bioquímicos que contribuem para o aparecimento do fenótipo de resistência à drogas estão a redução da captação ou o aumento do efluxo celular, modificação ou degradação da droga dentro da célula, mudanças na interação da droga com o seu sítio alvo ou ainda a interação com outras enzimas (SEGATO, 2008). A resistência fúngica aos agentes terapêuticamente disponíveis vem aumentando como consequência do crescimento da população imunocomprometida e do uso cada vez mais frequente de profilaxia e auto-medicação (WANNMACHER; FERREIRA, 2007).

A candidíase superficial estabelece-se em decorrência de aumento no número local de *Candida* e lesão da pele ou do epitélio, permitindo a invasão local por leveduras e pseudo-hifas. Quando esse microrganismo penetra na corrente sanguínea e as defesas do hospedeiro são inadequadas para conter o crescimento e a disseminação das leveduras, ocorre candidíase sistêmica. A partir da circulação, a *Candida* pode infectar os rins, fixar-se a próteses valvares cardíacas ou provocar infecções em quase qualquer parte do corpo (MITCHELL, 2009).

A candidemia é a denominação para infecção da corrente sanguínea (ICS) causada por leveduras do gênero *Candida* e essa tem sido a infecção fúngica invasiva mais extensamente estudada, pois a mesma tornou-se um problema persistente em inúmeros hospitais ao redor do mundo tanto em países em desenvolvimento como em países desenvolvidos (MCNEIL *et al.*, 2001; WILSON *et al.*, 2002; PFALLER; DIEKEMA, 2007; GIOLO; SVIDZINSKI, 2010).

O processo de desenvolvimento de novos fármacos não tem conseguido acompanhar a rápida evolução dos microrganismos e a ciência tem reunido esforços para busca de novas substâncias que possam desarticular as defesas desenvolvidas por conta da exposição às drogas em uso. Neste contexto, produtos naturais de origem vegetal e animal, entre outros, têm sido o alvo de diversas pesquisas embasadas na existência de atividades biocidas,

naturalmente desenvolvidas por seres vivos, para garantia da sobrevivência entre as espécies e em variados ambientes (SIMÕES *et al.*, 2010).

Diante destas considerações, devido ao uso popular, assim de como registros na literatura evidenciando algumas atividades biológicas apresentadas por *L. sidoides*, resolveu-se analisar o potencial antifúngico do óleo essencial das suas folhas e do timol, seu composto majoritário, com ênfase em alterações micromorfológicas, frente às cepas do gênero *Candida*, sendo este o primeiro relato sobre a atividade do óleo essencial de *L. sidoides* e do timol sobre a micromorfologia fúngica.

1.2 Dados botânicos

1.2.1 Família Verbenaceae

A Família Verbenaceae abrange em torno de 36 gêneros e cerca de 1000 espécies de distribuição pantropical. No Brasil, ocorrem 17 gêneros e 250 espécies com potencial econômico largamente explorado (LORENZI e MATOS, 2002; SOUZA e LORENZI, 2005). Os exemplares dessa família são plantas herbáceas e arbustivas de folhas inteiras opostas ou alternas. As flores em geral são pequenas e reunidas em inflorescência densa e vistosa. Alguns exemplos no Nordeste do Brasil são os arbustos conhecidos como Camará Chumbinho (*Lantania camara*), Alecrins (*Lippia spp*) e as árvores Mangue-canoé (*Avicennia*), Tarumã (*Vitex spp*) (CRAVEIRO *et al.*, 1981). Em relação às dicotiledôneas com princípios aromáticos, esta família é bastante importante por alguns de seus representantes serem empregados na medicina popular principalmente por suas propriedades digestivas (FESTER *et al.* 1961, SORARÚ & BANDONI 1978, RATERA & RATERA 1980).

As espécies da família Verbenaceae tem seu potencial econômico vastamente explorado, tanto de forma ornamental (LORENZI & SOUZA 2001), quanto terapêutica, esta última forma se deve principalmente pela presença de óleos essenciais. Vários estudos apontam atividades analgésicas, antimicrobianas, antiespasmódicas, antitumorais, calmantes, citostáticas, sedativas, hepatoprotetoras, anti-inflamatórias e laxativas de algumas das espécies desta família (STEFANINI *et al.*, 2002). Os principais gêneros que apresentam espécies com propriedades medicinais são *Verbena*, *Stachytarpheta* e *Lippia* (DI STASI *et al.*, 2002).

1.2.2 O gênero *Lippia*

O gênero *Lippia* é um dos maiores da família Verbenaceae e foi descrito em 1.753 por Linnaeu (BRANDÃO, 2003), incluindo cerca de 200 espécies de ervas, arbustos e árvores de pequeno porte. As espécies deste estão distribuídas principalmente ao longo de países da América Central, América do Sul e África (TERBLANCHÉ & KORNELIUS, 1996). Este gênero possui muitas espécies de interesse medicinais, em torno de 150 espécies estão distribuídas por campos rupestres e cerrados no Brasil (SALIMENA, 2002). As diversas espécies do gênero *Lippia* apresentam-se, quase sempre, aromáticas e ornamentais. Para muitas espécies, estudos biológicos mostram atividades sobre o SNC, além de propriedades antivirais, analgésicas, entre outras (SOARES, 2001).

Plantas desse gênero são popularmente usadas para tratar doenças gastrointestinais, hepáticas e respiratórias, também são usadas de forma tópica no tratamento de feridas, doenças cutâneas, queimaduras e úlceras (PASCUAL *et al.*, 2001). Segundo Salimena (2002), são os óleos essenciais extraídos das folhas de muitas espécies que apresentam propriedades medicinais.

1.2.3 A espécie *Lippia sidoides* Cham.

A espécie *Lippia sidoides* pode ser encontrada de forma abundante no Nordeste do Brasil nos estados do Ceará e Rio Grande do Norte (ALMEIDA *et al.*, 2010). É popularmente conhecida como “alecrim-pimenta”, sendo uma planta bastante aromática (FONTENELLE, 2008). *L. sidoides* apresenta-se como um arbusto caducifólio, ereto, muito ramificado e quebradiço, que mede entre 2 e 3 m de altura (Figura 1). Suas folhas apresentam forte cheiro picante e as flores são pequenas, esbranquiçadas, reunidas em espigas de eixo curto nas axilas das folhas. É propagada por estaquia utilizando, de preferência, os ramos mais finos (MATOS, 2000; MATOS, 2002; LORENZI; MATOS, 2002). Os frutos são pequenas capsúlas agrupadas em infrutescências e originam sementes pequenas (SOUZA *et al.*, 2004).

Esta espécie possui folhas muito aromáticas e picantes que apresentam óleo essencial rico em timol e carvacrol (LORENZI & MATOS, 2002). Sua folhagem é comumente utilizada para tratamento de acne, ferimentos, infecções da pele e do couro cabeludo. A infusão tem sido usada na medicina popular em inalações, rinite alérgica e no tratamento das infecções vaginais, da boca e da garganta (MATOS e OLIVEIRA, 1998). Devido a sua

importância, esta espécie foi listada na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (Rennisus).

As folhas e flores constituem a parte medicinal desta planta. Seu óleo essencial possui elevado valor comercial, pois contém timol ou uma mistura de timol e carvacrol, dois fenilpropanoides com fortíssimas propriedades antimicrobianas e antissépticas (MATOS, 2000). O óleo essencial de *L. sidoides* tem um potencial valor econômico por causa de seu uso industrial na produção de perfumes, cremes, loções e desodorantes (BOTELHO *et al*, 2007). O efeito terapêutico de *L. sidoides* tem sido atribuído principalmente à presença do timol, componente encontrado não só apenas no óleo essencial, mas também em extratos hidroalcoólicos (MATOS e OLIVEIRA, 1998). Este óleo é uma das substâncias utilizadas na medicina tradicional brasileira, especialmente pelas comunidades locais pobres do Nordeste do Brasil para cortes na pele, picadas de insetos e dor de garganta (LEMOS *et al.*, 1990).

Figura 1. Fotografia de arbusto de *Lippia sidoides* Cham.



Fonte: FONTENELLE, 2008.

1.3 Óleos essenciais

Os óleos essenciais são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas, também sendo conhecidos como óleos voláteis, óleos etéreos ou essências, são obtidos de partes de plantas através de destilação por arraste de vapor d' água (SIMÕES *et al.*, 2010). Esses compostos são oriundos do metabolismo secundário das plantas e possuem composição química complexa, destacando-se a presença de terpenos e fenilpropanóides (FARIAS; LIMA, 2000).

Os constituintes químicos dos óleos essenciais variam desde hidrocarbonetos terpênicos, alcoóis simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas, até compostos contendo enxofre. Na mistura, tais compostos apresentam-se em diferentes concentrações, onde um ou mais deles são compostos majoritário, existindo outros em menores concentrações e alguns em baixíssimas quantidades (SIMÕES *et al.*, 2010). A composição química dos óleos essenciais encontrados em diferentes espécies é bastante complexa e sofre influência tanto do material genético da planta, quanto das condições climáticas e ambientais, assim como de qual parte da planta é extraído, o horário e a época do ano (LAVABRE, 1992).

A avaliação das atividades biológicas de óleos essenciais de algumas plantas revelaram que alguns destes apresentavam atividades bacterianas, inseticidas e antifúngicas (SILVA *et al.*, 2008). Outros estudos têm comprovado o efeito de compostos isolados, extraídos de óleos essenciais de plantas, que atuam como fungicidas naturais, inibindo a atividade fúngica, dentre os quais, um número bastante significativo destes constituintes se mostrou eficaz (ABDELGALEIL *et al.*, 2008; CHANG *et al.*, 2008; KORDALI *et al.*, 2008).

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 antimicrobiana pode estar relacionado a diferentes mecanismos de ação, o que dificulta a adaptação dos microrganismos (DAFERERA *et al.*, 2003).

1.4 Atividades biológicas do óleo essencial de *Lippia sidoides*

Em estudo realizado por Veras *et al.* (2012), o óleo essencial de *Lippia sidoides* e seu constituinte majoritário, o timol, ocorreram a potencializaram a atividade de aminoglicósidos por contato a vapor frente à *P. aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. Fontenelle *et al.* (2007) caracterizou efeito inibitório do óleo essencial de *Lippia sidoides* sobre o crescimento dos

fungos das espécies *Microsporum canis*, *Microsporum pachydermatis* e *Candida spp.* Quando testado contra diversas bactérias patogênicas, incluindo o *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, o óleo essencial de *L. sidoides* provou ser muito promissor como um composto antimicrobiano (OLIVEIRA *et al.*, 2006), demonstrando também atividade inibidora contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium smegmatis* (LEMOS *et al.*, 1990), e contra alguns micro-organismos que vivem sobre a pele dos pés e axilas (LACOSTE *et al.*, 1996).

Foi demonstrado que o óleo essencial de *L. sidoides* tem ação acaricida contra *Tetranychus urticae* Koch e *T. evansi* (CAVALCANTI *et al.*, 2010; DELFINO, 2012) atividade inseticida contra o *Tenebrio molitor* (LIMA *et al.*, 2011) e atividade larvicida contra *Aedes aegypti* Linn (CARVALHO *et al.*, 2003; COSTA *et al.*, 2005).

Os principais constituintes do óleo essencial de *L. sidoides* são timol e carvacrol, que na maioria das vezes são os responsáveis pela atividade inibidora marcante do óleo contra micro-organismos (BOTELHO, 2007; COSTA *et al.*, 2001; MORAIS, 2012). Algumas diferenças nos resultados obtidos nos ensaios comparativos sobre a atividade antimicrobiana levaram a conclusão de que o timol não é o único responsável (MATOS e OLIVEIRA, 1998).

1.5 Timol

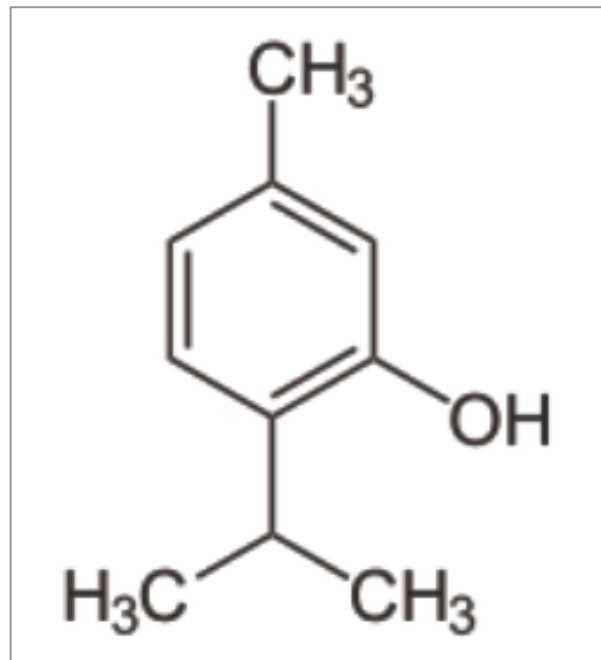
O timol é encontrado no óleo essencial das folhas de *L. sidoides* e nos extratos hidroalcoólicos (MATOS, 2000). É também chamado de 2-isopropil-5-metil-fenol e seu isômero de posição é o carvacrol (5-isopropil-2-metil-fenol). Esse composto é um terpeno de fórmula química $C_{10}H_{14}O$ (Figura 2) encontrado também em *Thymus vulgaris*, perfazendo em torno de 40 a 50% do óleo. (SIMÕES *et al.*, 2010). O timol também é encontrado no óleo essencial de hortelã, como grandes cristais incolores ou como pó cristalino branco. Apesar de ser um composto fenólico, é considerado terpenóide, mais especificamente um monoterpene, devido à via biossintética de que se origina. Esse composto é responsável pelas propriedades antifúngicas e antibacterianas das folhas e flores do *Origanum vulgare* e pela aromatização de alimentos na indústria alimentícia. (CARDOSO *et al.*, 2001).

Os compostos com estruturas fenólicas tais como timol, possuem alta atividade *in vitro* contra bactérias Gram negativas e Gram positivas (DORMAN; DEANS, 2000). Este composto tem alto poder anti-séptico, superior ao do próprio fenol, e ao mesmo tempo, menos toxicidade. O timol tem sido usado no tratamento de enfermidades da pele e por inalação,

associado a outras substâncias voláteis, para tratar enfermidades respiratórias (KORDALI *et al.*, 2008).

O timol é encontrado em formulações de cremes e anti-sépticos bucais (Euthymol® e Listerine®), pomadas descongestionantes (Vick®), adesivos antiinflamatórios (Salonpas®), pastilhas que aliviam tosse e irritação da garganta (Valda®) e como anti-séptico para higienização bucal de cães e gatos (Gelsept®) (VERAS, 2012).

Figura 2. Estrutura molecular do timol

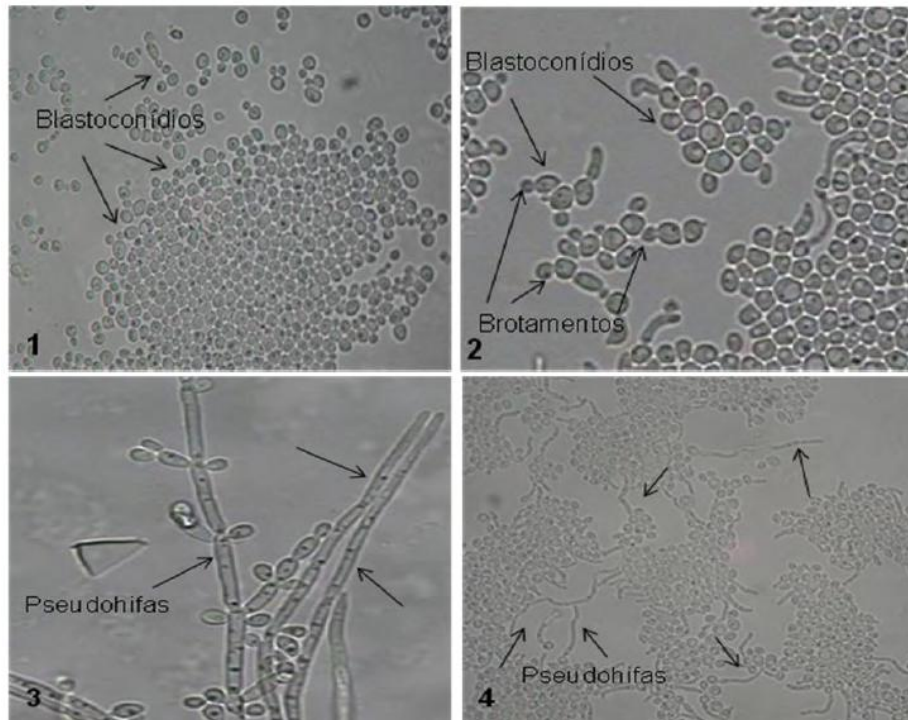


Fonte: TEÓFILO, 2012

1.6 Fungos

O gênero *Candida* produz diversos fatores de virulência, dentre os quais se destacam: a aderência, dimorfismo (formação de micélio), variabilidade fenotípica, produção de toxinas e enzimas proteinases e lipases (RIBEIRO *et al.*, 2004). Em relação à micromorfologia, lâminas preparadas a partir de um fragmento da colônia ou de uma amostra clínica positiva, permitem a visualização de estruturas, denominadas blastoconídeos, que podem estar isoladas ou apresentando brotamento (Figura 3) (MORETTI *et al.*, 2004).

Figura 3. Estruturas leveduriformes observadas em microscópio óptico.



1 e 2: Blastoconídios apresentando ou não brotamentos, 3: pseudohifas de cepas *Candida tropicalis* e de *Candida albicans* (4). (FONTE: MENDES, 2011).

1.7 *Candida albicans*

Dentre as espécies do gênero *Candida*, *C. albicans* é predominante nas infecções superficiais e invasivas de diferentes sítios anatômicos (VALLE; RENDE; OKURA, 2010). É um patógeno oportunista que habita o homem de forma comensal e é o maior causador de infecções fúngicas em humanos. Na maioria das vezes, estas infecções ocorrem como consequência de uma alteração na resposta imunológica e virulência da *C. albicans*, que apresenta considerável plasticidade morfológica (MONGE *et al.*, 2006).

O habitat de *C. albicans* e de outras espécies de *Candida* spp. é bastante amplo, estando ligado à espécie humana e todas as espécies de primatas. O espectro das candidíases é bastante extenso, ocorrendo desde manifestações clínicas banais, como a colonização de mucosas, até quadros sistêmicos, com a invasão de vários órgãos (SIDRIM; ROCHA, 2010).

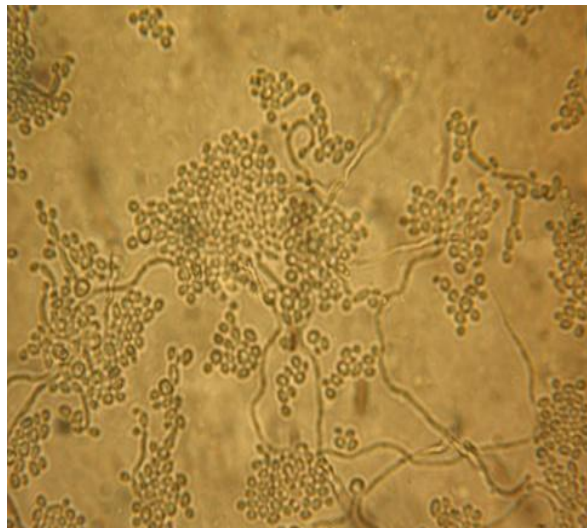
1.7.1 Morfologia

C. albicans é capaz de alterar sua morfologia em resposta às condições ambientais, passando de levedura para hifa, sendo que a forma de blastoconídios (forma leveduriforme)

predomina em meio rico de nutrientes, enquanto os filamentos são formados em resposta à falta de nutrientes (MITCHEL, 1998; MOLERO *et al.*, 1998; CALDERONE & FRONZI, 2001; VAN BURIK & MAGEE, 2001; CARLISLE *et al.*, 2009; KARKOWSKA-KULETA *et al.*, 2009; LEITO *et al.*, 2009).

As células de levedura de *C. albicans* podem sofrer três processos morfológicos diferentes: formação de blastopóros, formação de pseudohifas e hifas verdadeiras e formação de tubo germinativo. Os fatores que favorecem a formação dessas estruturas estão relacionados a composição química do meio, ao pH, tamanho do inóculo e temperatura de incubação. Em torno de 30°C, pseudomicélio e micélio verdadeiro são formados. Cachos de blastósporos são formados lateralmente nos pontos de constrição das pseudo-hifas. Clamidósporos arredondados, com paredes espessas e em pares são formados na extremidade das pseudo-hifas ou isoladamente (Figura 4) (SILVA, 2006).

Figura 4. Aspectos microscópicos da levedura *Candida albicans* após realização de microcultivo em Ágar-arroz



Fonte: Autora.

1.8 *Candida tropicalis*

C. tropicalis é geralmente encontrada na pele e no trato digestivo de hospedeiros humanos saudáveis (ODDS, 1998), porém pode tornar-se um patógeno oportunista quando o hospedeiro encontra-se neutropênico, tem a flora bacteriana suprimida pelo uso de antimicrobianos, possui danos na mucosa gastrointestinal ou ainda quando é um paciente com neoplasias, especialmente em leucemias (WINGARD, 1995).

Até algum tempo atrás, *C. albicans* era a espécie de maior interesse clínico, entretanto, com o aumento geral das candidemias observou-se também um aumento das infecções de corrente sanguínea por espécies de *Candida* não-*albicans*, sendo *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis* os patógenos mais importantes. As causas para essa inversão no padrão de distribuição das espécies pode estar intimamente relacionadas com o potencial de virulência destes micro-organismos e ao uso profilático e empírico de drogas antifúngicas (TSANG, 2000).

1.8.1 Morfologia

As pseudo-hifas são longas e ramificadas, originando blastósporos simples ou em cadeias e cachos nos pontos de constrição. Hifas verdadeiras podem ser produzidas. Algumas cepas produzem clamidósporos, especialmente em isolamento inicial, de aspecto globoso ou piriforme na extremidade de pseudo-hifas ou hifas verdadeiras, mas não são regularmente produzidos. Os clamidósporos diferem daquelas da *C. albicans* por não apresentarem células que os suportam (Figura 5) (SILVA, 2006).

Figura 5. Aspectos microscópicos da levedura *Candida tropicalis* após realização de microcultivo em Ágar-arroz



Fonte: Autora.

1.9 *Candida krusei*

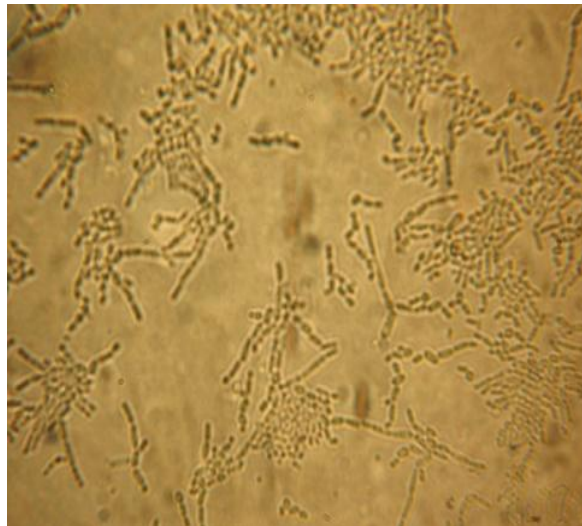
C. krusei é um patógeno que causa infecções em pacientes imunocomprometidos, sua incidência tem aumentado nos últimos anos. Encontra-se na microbiota da cavidade bucal, colonizam-se no trato gastrointestinal causando fungemias e formas sistêmicas de candidíase

(ABBAS *et al.*, 2000). *C. krusei* tem sido reconhecido como um patógeno resistente a um amplo repertório de antifúngicos, alguns estudos relatam a resistência desse micro-organismo aos antifúngicos, principalmente fluconazol, anfotericina B e a 5-fluorocitosina (BARBEDO & SGARDI, 2010).

1.9.1 Morfologia

Em temperatura de 30°C, utilizando o ágar *cornmeal*-Tween 80, as células são ovóides, alongadas ou cilíndricas, medindo 2,6-5,6 x 4-15 µm. Geralmente são produzidas pseudo-hifas com cachos de blastósporos. Os blastósporos são alongados, criando uma aparência de palito de fósforo (Figura 6) (SILVA, 2006).

Figura 6. Aspectos microscópicos da levedura *Candida krusei* após realização de microcultivo em Ágar-arroz



Fonte: Autora.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antifúngica *in vitro* do óleo essencial obtido das folhas de *Lippia sidoides* Cham. e do timol sobre cepas de *Candida* oriundas de isolamentos clínicos.

2.2 Objetivos específicos:

- Determinar os constituintes do óleo essencial de *L. sidoides* por meio de Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)
- Realizar *screening* com óleo essencial de *L. sidoides* para determinação da atividade antifúngica frente a linhagens de *Candida*;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do óleo essencial de *L. sidoides* e do timol sobre cepas de *Candida*;
- Determinar a Concentração Fungicida Mínima (CFM) do óleo essencial de *L. sidoides* e do timol sobre cepas de *Candida*;
- Avaliar a ação do óleo essencial de *Lippia Sidoides* Cham. e do timol sobre a micromorfologia fúngica.

MATERIAIS E MÉTODOS

3 Materiais e métodos

3.1 Seleção e coleta do material botânico

O material botânico de *Lippia sidoides* Cham. foi coletado na Horta de Plantas Medicinais, do Laboratório de Pesquisas de Produtos Naturais – LPPN, da Universidade Regional do Cariri - URCA Coordenadas: 07° 14' 19,2" de latitude Sul e 39° 24' 52,8" de longitude Oeste de Greenwich. As folhas foram selecionadas e postas pra secar a sombra e temperatura ambiente (25°C). Cinco ramos compostos de folhas e flores foram separados para preparação da exsicata, que foi depositada no Herbário Caririense Dárdano de Andrade Lima, da Universidade Regional do Cariri - URCA, sob o número de herbário 8096.

3.2 Extração de Óleo Essencial

Folhas de *Lippia sidoides* Cham. foram coletadas as 09:00 horas, \pm 30 minutos, 500 g desse material foi picotado em pedaços de aproximadamente 1 cm² e acondicionados em balão de vidro de 5 litros, sendo submetidas a extração com aparelho de Clevenger (modificado a partir de GOTTLIEB, 1960), obtendo-se 2,5g de óleo essencial, o qual foi submetido à Cromatografia Gasosa, acoplada a Espectrometria de Massa – CG-MS.

3.3 Análise do óleo essencial por CG-EM

A análise do óleo foi realizada utilizando um Shimadzu CG/EM - série QP2010 (sistema CG/EM): coluna capilar Rtx-5MS (30 m x 0,25 mm, 0,25 μ m de espessura do filme), o gás hélio a 1,5 mL/min, temperatura do injetor 250 °C; temperatura do detector 290 °C, temperatura da coluna 60 °C - 180 °C a 5 °C/min, em seguida, 180 ° - 280 °C a 10 °C/min (10 min). Velocidade de digitalização foi de 0,5 scan/seg de m/z 40 e 350. Relação Split (1:200). Volume injetado: 1 μ L de [25 μ L (óleo essencial) / 5 mL CHCl₃] (1:200). Tempo de corte do solvente = 2,5 min. O espectrômetro de massas foi operado com 70 eV de energia de ionização. Os componentes individuais foram identificados por correspondência dos seus espectros de massas com os da base de dados usando a biblioteca de espectro de massa NIST 08, índices de retenção, e comparação com os dados publicados (ADAMS, 2001).

3.4 Obtenção do timol

O timol cristalizado foi gentilmente cedido pelo Laboratório Synth, São Paulo, Brasil.

3.5 Micro-organismos

Para os ensaios de atividade antifúngica do óleo essencial de *L. sidoides* e do timol, foram utilizadas um total de 16 cepas de fungos leveduriformes. Da espécie *C. albicans* foram utilizadas 08 cepas codificadas como: CA 12, CA 62, CA 77, CA 106, CA 108, CA 109, CA 111, CA 122. Da espécie *C. tropicalis* foram utilizadas 06 cepas: CT 06, CT 10, CT 14, CT 18, CT 20, CT 23. Todas isoladas de amostras biológicas e cedidas pelo Laboratório de Micologia da Universidade Federal da Paraíba (UFPB-PB). Foram usadas também duas cepas de *C. krusei*, codificadas como CK LMBM 01 e CK LMBM 02 isoladas no Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LMBM) da Universidade Regional do Cariri. As linhagens foram mantidas em tubos de ensaio contendo Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) inclinado, sob-refrigeração (4 °C).

3.6 Meios de Cultura

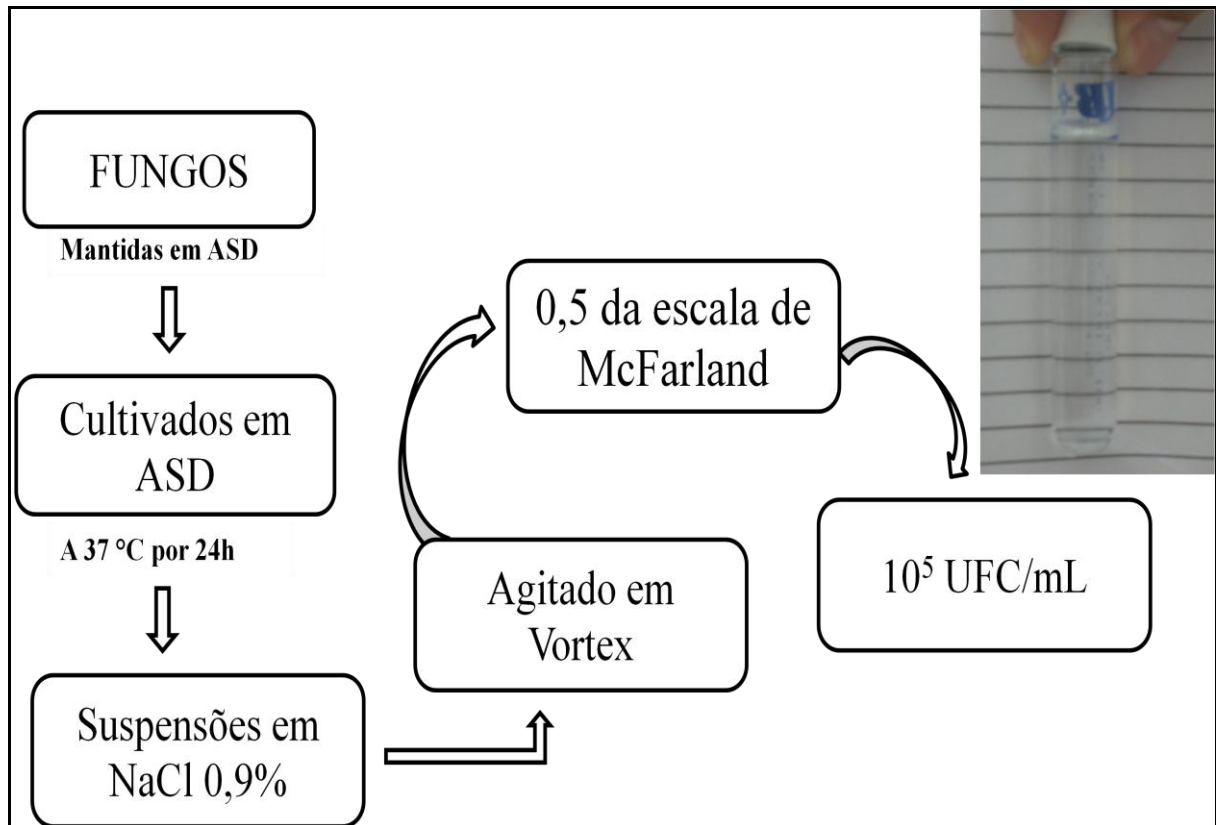
Foram utilizados nos ensaios para avaliação da atividade antifúngica o meio sólido Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) e o meio líquido Caldo Sabouraud Dextrose (CSD), adquiridos da Difco® e preparados de acordo com as instruções do fabricante. O Ágar-arroz foi produzido segundo Sidrim e Rocha (2010), com água destilada e esterilizados em autoclave, a 121 °C por 15 minutos.

3.7 Inóculo

Para o procedimento de preparação do inóculo dos fungos, primeiramente os isolados foram cultivados em meio ASD inclinado a 37 °C por 24 h (*overnight*) (Figura 07). Inicialmente foram preparadas suspensões dos micro-organismos em tubos contendo 5 mL de solução estéril (NaCl a 0,9%). Em seguida, essas suspensões foram agitadas por 2 minutos com auxílio do aparelho Vortex. Após agitação, cada suspensão teve sua turbidez comparada e ajustada àquela apresentada pela suspensão de sulfato de bário do tubo 0,5 da escala de McFarland, a qual corresponde a um inóculo de aproximadamente 10^5 Unidades Formadoras

de Colônias/mL – UFC/mL (CLEELAND; SQUIRES, 1991; HADACEK; GREGER, 2000; SOUZA *et al.*, 2007).

Figura 7. Fluxograma demonstrando a preparação do inoculo.

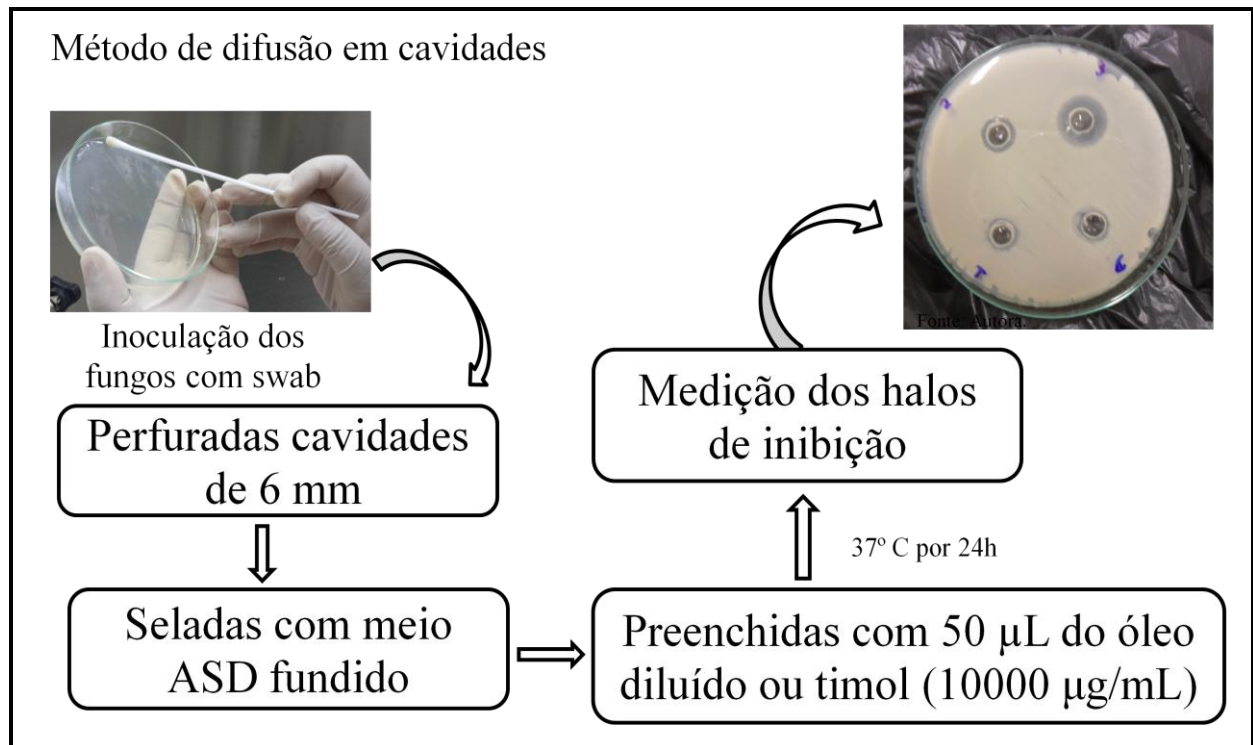


Fonte: Autora.

3.8 Seleção das cepas

O óleo essencial e o timol foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) fim de obter uma solução estoque na concentração de 10000 µg/mL. O ensaio foi realizado de acordo com Coutinho et al. (2008), pelo método da difusão em cavidades realizado em placas de Petri com ASD, nas quais foram inoculados os fungos e perfuradas cavidades de 6 mm, seladas posteriormente com meio ASD fundido e preenchidas com 50 µL do óleo diluído ou timol, sendo levadas posteriormente à incubadora por 24 h. Após isso foram feitas as medidas dos halos de inibição. Os fungos cultivados com halos iguais ou maiores do que 6 mm foram consideradas susceptíveis (Figura 8)(GEIDAM, 2007).

Figura 8. Fluxograma demonstrando a técnica de difusão em cavidades.

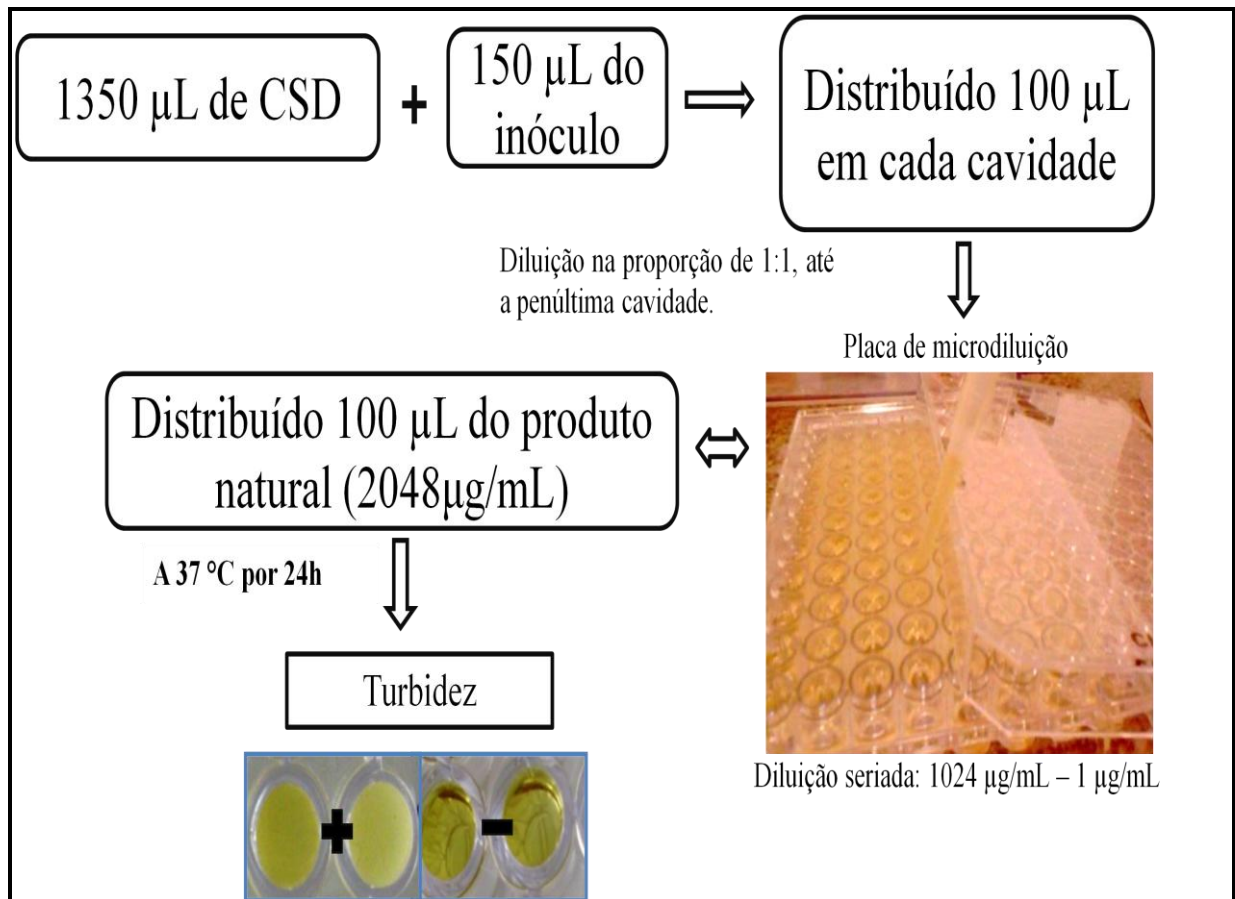


3.9 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da CIM do óleo essencial de *L. sidoides* e do timol foi realizada pela técnica de microdiluição, utilizando placas contendo 96 cavidades com fundo em forma de “U” e em triplicata (ELLOF 1998, SOUZA *et al.*, 2007). Em cada orifício da placa foi adicionado 100 µL do meio líquido CSD duplamente concentrado (Figura 9).

Para distribuição na placa de microdiluição foram preparados tubos *ependorf*® contendo cada um deles com 1,5 mL de solução contendo 1350 µL de CSD duplamente concentrado e 150 µL da suspensão fúngica. A placa foi preenchida no sentido numérico adicionando-se 100 µL desta solução em cada poço (placa de 96 poços) e em seguida procedendo-se a microdiluição seriada com a solução de 100 µL do produto natural, variando nas concentrações de 1024 a 1 µg/mL. As placas foram levadas à estufa por 24 h a 37 °C (JAVADPOUR *et al.*, 1996). A revelação da CIM foi feita pela observação da turbidez provocada pelo crescimento. Foi definido a CIM para os produtos testados, como a menor concentração capaz de inibir visualmente o crescimento fúngico verificado nos orifícios, quando comparado com o crescimento controle.

Figura 9. Fluxograma demonstrando a determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

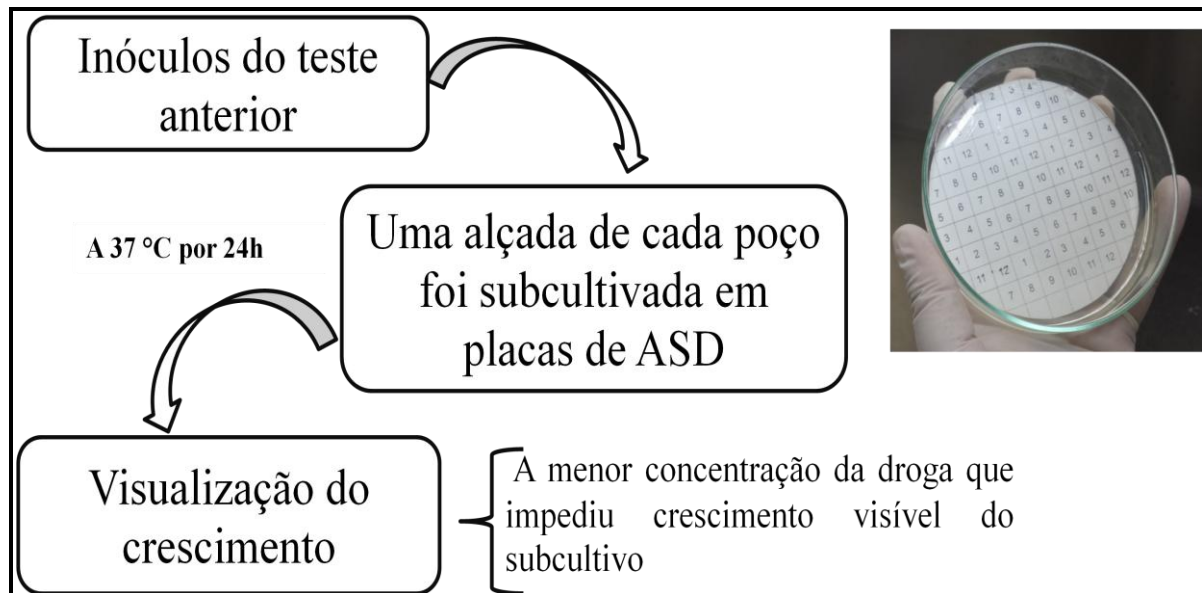


Fonte: Autora.

3.10 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)

A concentração fungicida mínima foi realizada a partir de cada inóculo do teste anterior que não apresentou crescimento e os controles positivos (Figura 10). Uma alçada de cada poço, ou seja, dos poços onde foram determinadas as CIMs, foi subcultivada em placas de Agar Sabouraud Dextrose, devidamente identificadas. Após 24 horas de incubação a 35 ± 2 $^{\circ}\text{C}$, realizou-se leitura, com a finalidade de observação do crescimento das colônias. As leituras das CFMs foram realizadas com base no crescimento dos controles, sendo considerada CFM, a menor concentração da amostra que impediu crescimento visível do subcultivo (SHADOMY, ESPINELINGROFF e CARTWRIGHT, 1985).

Figura 10. Fluxograma demonstrando a determinação da concentração fungicida mínima (CFM)



Fonte: Autora.

3.11 Efeito do óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham. e do Timol sobre a micromorfologia de *Candida*

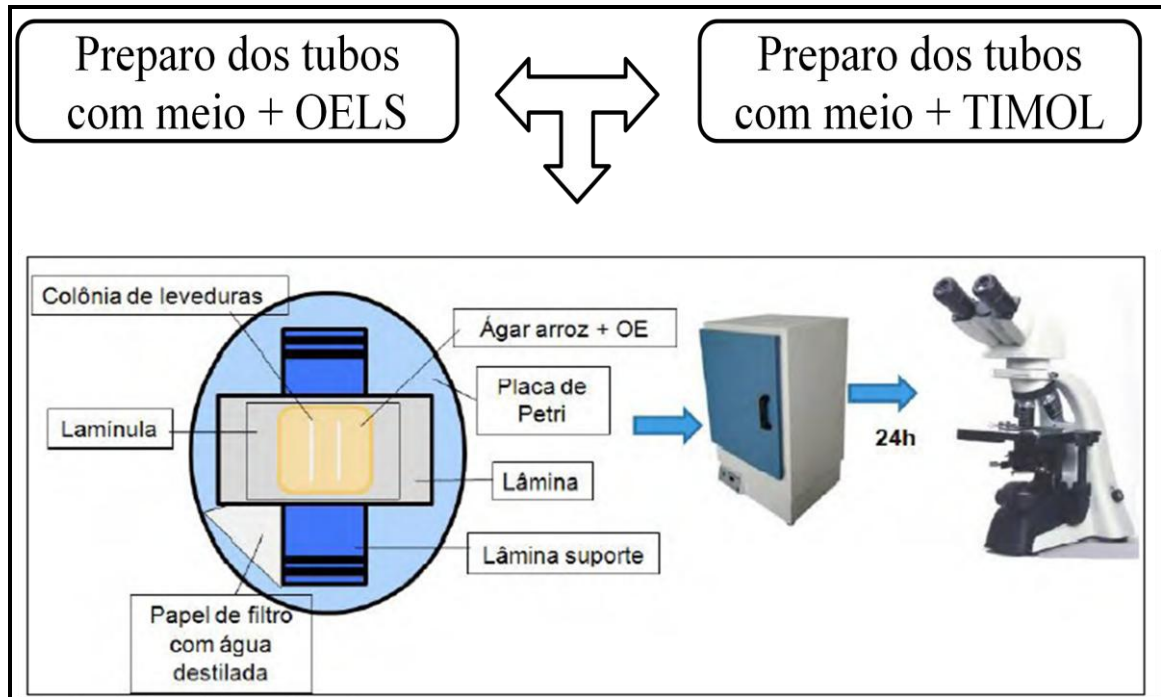
Para observação de alterações morfológicas das cepas de *Candida* foi empregada a técnica do microcultivo para leveduras, utilizando o meio ágar-arroz em câmara úmida e esse teste foi realizado em triplicata (SIDRIM; ROCHA, 2010; KURTZMAN; FELL, 1998). Foram considerados os resultados obtidos na determinação da CIM dos produtos avaliados sobre as mesmas cepas deste estudo e adicionadas quantidades suficientes das emulsões do óleo essencial de *L. sidoides* e do Timol ao meio de cultura ágar-arroz, nas variadas concentrações dos produtos, no referido meio (CIM, CIM x 2)(Figura 11).

Foi depositado 2 mL de ágar-arroz, associados aos produtos testes, nas respectivas concentrações, fundidos sobre uma lâmina estéril, contida sobre um suporte (outra lâmina) dentro de uma placa de Petri (Figura 07). Após solidificação do meio, foi semeada a levedura, com auxílio de uma agulha em “L”, fazendo 02 estrias paralelas. As estrias foram cobertas com lamínulas esterilizadas. Para evitar ressecamento do meio, foi preparada uma câmara úmida, acrescentando 1 mL de água destilada sobre um pedaço de papel filtro (3x3 cm) estéril na placa, durante o período de incubação.

Decorrido o tempo de incubação, cada preparação foi examinada em microscopia, com aumento de 40x, para a observação da formação ou não das estruturas características das leveduras, incluindo blastoconídeos, pseudohifas, e clamidoconídeos. Os microcultivos foram

fotografados e caracterizados de acordo com a presença das estruturas leveduriformes, as quais se encontravam presentes, ausentes ou raros.

Figura 10. Esquema da técnica de microcultivo



Fonte: modificado a partir de Mendes, 2011.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como resultado a produção de um artigo que relata a atividade antifúngica do óleo essencial de *L. sidoides* e do timol sobre cepas de *Candida* com ênfase em alterações na micromorfologia fúngica.

As referencias utilizadas no artigo encontram-se ao final do artigo.

PRODUÇÃO

O artigo está em fase de tradução para posterior submissão.

4.1 Avaliação da atividade antifúngica do óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham. e do timol sobre cepas de *Candida*

Avaliação da atividade antifúngica do óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham. e do timol sobre cepas de *Candida*

Dara I. V. Brito, Maria F. B. Morais-Braga, Francisco A. B. Cunha, Rosimeire S. Albuquerque, Joara N. P. Carneiro, Mayron S. F. Lima, Nadghia F. Leite, Celestina E. S. Souza, Jacqueline C. Andrade, Liscássia B. B. Alencar, Anne K. L. S. Lavor, Fernando G. Figueredo, Luciene F. Lima, Henrique D. M. Coutinho*.

Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular da Universidade Regional do Cariri.

*hdmcoutinho@gmail.com

Resumo

O presente estudo avaliou a atividade antifúngica do óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham. e do seu componente majoritário, o timol, sobre cepas de *Candida* através da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Fungicida Mínima (CFM) e de alterações morfológicas das cepas produzidas pelo produtos testados. Primeiramente foi realizada uma seleção com 16 cepas fúngicas pela técnica de difusão em meio sólido, os melhores resultados foram com as seguintes cepas: CK 01, CK 02, CA 62 e CT 20. A análise da composição química do óleo foi realizada por Cromatografia Gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), apresentando o timol como componente majoritário. Outros constituintes químicos como carvacrol, p-pineno, 1,8 cineol, γ -terpineno, éter metil carvacrol e β -cariofileno foram encontrados. A CIM do óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham. (OELS), frente às cepas variou entre 64 e 256 $\mu\text{g/mL}$. A CIM do timol variou entre 32 e 64 $\mu\text{g/mL}$. A CFM do OELS variou entre 128 e 512 $\mu\text{g/mL}$, para o timol foram encontrados valores entre 64 e 128 $\mu\text{g/mL}$. Em relação à micromorfologia, quando utilizado o OELS, nas cepas CK 01 e CT 20, a presença de pseudohifas foi considerada ausente. Quando utilizado o timol, a presença de pseudohifas foi considerada ausente nas cepas CK 01 e CA 62, ocorrendo uma redução da morfogênese na cepa CT 20. Estes dados são promissores e poderão incentivar futuras pesquisas sobre os aspectos fitoquímicos, toxicológicos e farmacológicos tanto do óleo essencial de *Lippia sidoides* como também de seus componentes químicos.

Palavras-chaves: Concentração Fungicida Mínima (CFM), Concentração Inibitória Mínima (CIM), micromorfologia fúngica.

Evaluation of antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. and thymol on strains of *Candida*.

Abstract

The present study evaluated the antifungal activity of the essential oil of *Lippia sidoides* Cham. and its major component, thymol on *Candida* strains through the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Fungicidal Concentration (MFC) and morphological changes of the strains produced by the tested products. First a selection of 16 fungal strains by diffusion technique was performed on solid medium, the best results were with the following strains: CK 01, CK 02, CA 62 and CT 20. The chemical composition of the oil was performed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS), with thymol as the major component. Other chemical constituents such as carvacrol, p-pinene, 1,8 cineole, γ -terpinene, methyl carvacrol and β -caryophyllene were found. The MIC of the essential oil of *Lippia sidoides* Cham. (OELS) against the strains ranged between 64 and 256 $\mu\text{g/mL}$. The MIC of thymol ranged between 32 and 64 $\mu\text{g/mL}$. MFC the OELS varied between 128 and 512 $\mu\text{g/mL}$, thymol were found to values between 64 and 128 $\mu\text{g/mL}$. Regarding micromorphology when OELS used in CT strains CK 01 and CT 20, the presence of

pseudohyphae was regarded as absent. When used thymol, the presence of pseudohyphae was regarded as absent in strains CA CK 01 and 62, causing a reduction in the morphogenesis of strain CT 20. These data are promising and may encourage future research on aspects phytochemical, pharmacological and toxicological both the essential oil of *Lippia sidoides* as well as their chemical components.

Keywords: Minimum Fungicidal Concentration (MFC), Minimum Inhibitory Concentration (MIC), fungal micromorphology.

Introdução

Nas infecções fúngicas, as leveduras do gênero *Candida* são as mais comuns causadoras de micoses superficiais ou invasivas em seres humanos (DIGNANI, SOLOMKIN E ANISSIE, 2003). As espécies de *Candida* colonizam as mucosas de todos os seres humanos durante ou após o nascimento, existindo sempre o risco de infecção endógena. A candidíase é a micose mais comum, sendo os agentes causadores mais frequentes a *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida guilliermondii* e *Candida dubliniensis* (MITCHELL, 2009).

Lippia sidoides Cham., conhecida popularmente como alecrim-pimenta, alecrim-do-nordeste e estrepa-cavalo, pertencente à família Verbenaceae, é um arbusto caducifólio, ereto, bastante ramificado e quebradiço, de 2-3 m de altura, próprio da vegetação do semi-árido nordestino do Brasil (LORENZI & MATOS, 2002). O óleo essencial obtido das folhas dessa planta possui uma ampla diversidade química, tendo como principal componente o timol, com teor variando entre 34,2 a 95,1% em várias determinações (LEAL et al, 2003). São nas folhas que se encontra até 4,5% de óleo sendo o timol responsável por seu cheiro característico (MATOS, 2002).

Os óleos essenciais são compostos voláteis naturais, possuem como característica forte odor e são produzidos por plantas aromáticas a partir do metabolismo secundário e contém de 20 a 60 constituintes em diversas concentrações. São conhecidos pela fragrância e por possuírem propriedades fungicidas, bactericidas, antivirais e medicinais, podendo ser empregados como antimicrobianos, analgésicos, sedativos e anti-inflamatórios (BAKKALI, 2008).

Diversos estudos têm evidenciado o efeito de compostos isolados, extraídos a partir de óleos essenciais de plantas, que agem como fungicidas naturais, inibindo a atividade fúngica, dentre os quais, um número bastante significativo destes constituintes se mostrou eficaz (ABDELGALEIL et al., 2008). Os constituintes químicos dos óleos essenciais variam desde

hidrocarbonetos terpênicos, fenóis, alcoóis simples, éteres, ésteres, aldeídos, ácidos orgânicos, cetonas, lactonas, cumarinas, até compostos contendo nitrogênio e enxofre (SIMÕES et al., 2004).

Diante destas considerações, o presente estudo teve como finalidade avaliar a atividade antifúngica, *in vitro*, do óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham. (alecrim-pimenta) e do timol frente a cepas de *Candida* com ênfase na ação dessas substâncias sobre a micromorfologia fúngica.

Materiais e métodos

Seleção e coleta do material botânico

O material botânico de *Lippia sidoides* Cham. foi coletado no Horto de Plantas Medicinais, do Laboratório de Pesquisas de Produtos Naturais – LPPN, da Universidade Regional do Cariri - URCA Coordenadas: 07° 14' 19,2" de latitude Sul e 39° 24' 52,8" de longitude West de Greenwich. As folhas foram selecionadas e postas pra secar a sombra e temperatura ambiente (25°C). Cinco ramos compostos de folhas e flores foram separados para preparação da exsicata, que foi depositada no Herbário Caririense Dárdano de Andrade Lima, da Universidade Regional do Cariri - URCA, sob o número de herbário 8096.

Extração de Óleo Essencial

Folhas de *Lippia sidoides* Cham. foram coletadas as 09:00 horas, ± 30 minutos, 500 g desse material foi picotado em pedaços de aproximadamente 1 cm² e acondicionados em balão de vidro de 5 litros, sendo submetidas a extração com aparelho de Clevenger (modificado a partir de GOTTLIEB, 1960), obtendo-se 2,5g de óleo essencial, o qual foi submetido à Cromatografia Gasosa, acoplada a Espectrometria de Massa – CG-MS.

Análise do óleo essencial por CG-EM

A análise do óleo foi realizada utilizando um Shimadzu CG/EM - série QP2010 (sistema CG/EM): coluna capilar Rtx-5MS (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm de espessura do filme), o gás hélio a 1,5 mL/min, temperatura do injetor 250 °C; temperatura do detector 290 °C, temperatura da coluna 60 °C - 180 °C a 5 °C/min, em seguida, 180 ° - 280 °C a 10 °C/min (10

min). Velocidade de digitalização foi de 0,5 scan/seg de m/z 40 e 350. Relação Split (1:200). Volume injetado: 1 μL de [25 μL (óleo essencial) / 5 mL CHCl_3] (1:200). Tempo de corte do solvente = 2,5 min. O espectrômetro de massas foi operado com 70 eV de energia de ionização. Os componentes individuais foram identificados por correspondência dos seus espectros de massas com os da base de dados usando a biblioteca de espectro de massa NIST 08, índices de retenção, e comparação com os dados publicados (ADAMS, 2001).

Obtenção do timol

O timol cristalizado foi gentilmente cedido pelo Laboratório Synth, São Paulo, Brasil.

Micro-organismos

Para os ensaios de atividade antifúngica do óleo essencial de *L. sidoides* e do timol, foram utilizadas um total de 16 cepas de fungos leveduriformes. Da espécie *C. albicans* foram utilizadas 08 cepas codificadas como: CA 12, CA 62, CA 77, CA 106, CA 108, CA 109, CA 111, CA 122. Da espécie *C. tropicalis* foram utilizadas 06 cepas: CT 06, CT 10, CT 14, CT 18, CT 20, CT 23. Todas isoladas de amostras biológicas e cedidas pelo Laboratório de Micologia da Universidade Federal da Paraíba (UFPB-PB). Foram usadas também duas cepas de *C. krusei*, codificadas como CK LMBM 01 e CK LMBM 02 isoladas no Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LMBM) da Universidade Regional do Cariri. As linhagens foram mantidas em tubos de ensaio contendo Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) inclinado, sob-refrigeração (4 °C).

Meios de Cultura

Foram utilizados nos ensaios para avaliação da atividade antifúngica o meio sólido Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) e o meio líquido Caldo Sabouraud Dextrose (CSD), adquiridos da Difco® e preparados de acordo com as instruções do fabricante. O Ágar-arroz foi produzido segundo Sidrim e Rocha (2010), com água destilada e esterilizados em autoclave, a 121 °C por 15 minutos.

Inóculo

Para o procedimento de preparação do inóculo dos fungos, primeiramente os isolados foram cultivados em meio ASD inclinado a 37 °C por 24 h (*overnight*). Inicialmente foram preparadas suspensões dos micro-organismos em tubos contendo 5 mL de solução estéril (NaCl a 0,9%). Em seguida, essas suspensões foram agitadas por 2 minutos com auxílio do aparelho Vortex. Após agitação, cada suspensão teve sua turbidez comparada e ajustada àquela apresentada pela suspensão de sulfato de bário do tubo 0,5 da escala de McFarland, a qual corresponde a um inóculo de aproximadamente 10^5 Unidades Formadoras de Colônias/mL – UFC/mL (CLEELAND; SQUIRES, 1991; HADACEK; GREGER, 2000; SOUZA *et al.*, 2007).

Seleção das cepas

O óleo essencial e o timol foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) fim de obter uma solução estoque na concentração de 10000 µg/mL. O ensaio foi realizado de acordo com Coutinho *et al.* (2008), pelo método da difusão em cavidades realizado em placas de Petri com ASD, nas quais foram inoculados os fungos e perfuradas cavidades de 6 mm, seladas posteriormente com meio ASD fundido e preenchidas com 50 µL do óleo diluído ou timol, sendo levadas posteriormente à incubadora por 24 h. Após isso foram feitas as medidas dos halos de inibição. Os fungos cultivados com halos iguais ou maiores do que 6 mm foram consideradas susceptíveis (GEIDAM, 2007).

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da CIM do óleo essencial de *L. sidoides* e do timol foi realizada pela técnica de microdiluição, utilizando placas contendo 96 cavidades com fundo em forma de “U” e em triplicata (ELLOF 1998, SOUZA *et al.*, 2007). Em cada orifício da placa foi adicionado 100 µL do meio líquido CSD duplamente concentrado.

Para distribuição na placa de microdiluição foram preparados tubos *ependorf*® contendo cada um deles com 1,5 mL de solução contendo 1350 µL de CSD duplamente concentrado e 150 µL da suspensão fúngica. A placa foi preenchida no sentido numérico adicionando-se 100 µL desta solução em cada poço (placa de 96 poços) e em seguida procedendo-se a microdiluição seriada com a solução de 100 µL do produto natural, variando

nas concentrações de 1024 a 1 µg/mL. As placas foram levadas à estufa por 24 h a 37 °C (JAVADPOUR *et al.*, 1996). A revelação da CIM foi feita pela observação da turbidez provocada pelo crescimento. Será definido a CIM para os produtos testados, como a menor concentração capaz de inibir visualmente o crescimento fúngico verificado nos orifícios, quando comparado com o crescimento controle.

Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)

A concentração fungicida mínima foi realizada a partir de cada inóculo do teste anterior que não apresentou crescimento e os controles positivos. Uma alçada de cada poço, ou seja, dos poços onde foram determinadas as CIMs, foi subcultivada em placas de Agar Sabouraud Dextrose, devidamente identificadas. Após 24 horas de incubação a 35 ± 2 °C, realizou-se leitura, com a finalidade de observação do crescimento das colônias. As leituras das CFMs foram realizadas com base no crescimento dos controles, sendo considerada CFM, a menor concentração da amostra que impediu crescimento visível do subcultivo (SHADOMY, ESPINELINGROFF e CARTWRIGHT, 1985).

Efeito do óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham. e do Timol sobre a micromorfologia de *Candida*

Para observação de alterações morfológicas das cepas de *Candida* foi empregada a técnica do microcultivo para leveduras, utilizando o meio ágar-arroz em câmara úmida e esse teste foi realizado em triplicata (SIDRIM; ROCHA, 2010; KURTZMAN; FELL, 1998). Foram considerados os resultados obtidos na determinação da CIM dos produtos avaliados sobre as mesmas cepas deste estudo e adicionadas quantidades suficientes das emulsões do óleo essencial de *L. sidoides* e do Timol ao meio de cultura ágar-arroz, nas variadas concentrações dos produtos, no referido meio (CIM, CIM x 2).

Foi depositado 2 mL de ágar-arroz, associados aos produtos testes, nas respectivas concentrações, fundidos sobre uma lâmina estéril, contida sobre um suporte (outra lâmina) dentro de uma placa de Petri. Após solidificação do meio, foi semeada a levedura, com auxílio de uma agulha em “L”, fazendo 02 estrias paralelas. As estrias foram cobertas com lamínulas esterilizadas. Para evitar ressecamento do meio, foi preparada uma câmara úmida, acrescentando 1 mL de água destilada sobre um pedaço de papel filtro (3x3 cm) estéril na placa, durante o período de incubação.

Decorrido o tempo de incubação, cada preparação foi examinada em microscopia, com aumento de 40x, para a observação da formação ou não das estruturas características das leveduras, incluindo blastoconídeos, pseudohifas, e clamidoconídeos. Os microcultivos foram fotografados e caracterizados de acordo com a presença das estruturas leveduriformes, as quais se encontravam presentes, ausentes ou raros.

Resultados

Na seleção das cepas realizada, pelo método de difusão por cavidade, com as 16 cepas foram obtidos halos com variação entre 5 e 9 mm para o OELS. As cepas que apresentaram melhores resultados foram: CK 01, CK 02, CA 62, CT 20, com as quais foram realizados os demais testes.

Tabela 1. Halos de inibição do DMSO e do óleo essencial *Lippia sidoides* Cham. sobre as linhagens.

LINHAGEM	Halos de inibição (mm)	
	DMSO	OELS
CA LM 12	0	5
CA LM 62	1	6
CA LM 77	2	5
CALM 106	0	6
CA LM 108	2	5
CA LM 109	2	5
CA LM 111	0	5
CA LM 122	1	5
CT LM 06	1	5
CT LM 10	0	5
CT LM 14	0	5
CT LM 18	2	5
CT LM 20	1	5
CT LM 23	1	5
CK LMBM 01	2	6
CK LMBM 02	2	9

OELS - óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham. CK – *Candida krusei*; CA - *Candida albicans*; CT – *Candida tropicalis*.

A CIM do óleo essencial de *L. sidoides* (OELS), frente às cepas variou entre 64 e 256 µg/mL, enquanto a CIM do timol variou entre 32 e 64 µg/mL (Tabela 02). Foi realizada a Concentração Fungicida Mínima (CFM) para confirmar a atividade do óleo e do timol. Esse ensaio foi considerado um teste confirmatório para a visualização do crescimento ou não das cepas. A CFM do OELS apresentou valores entre 256 e 512 µg/mL e para o timol, os valores ficaram entre 64 e 128 µg/mL, como pode ser visto na tabela 2. Os resultados obtidos indicam que tanto o OELS quanto o timol são produtos com boa atividade antifúngica.

Tabela 2. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) do óleo essencial *Lippia sidoides* Cham. e do timol.

MICRO-ORGANISMOS								
	CK 01		CK 02		CA 62		CT 20	
	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
OELS	128	256	64	128	256	512	128	256
TIMOL	32	64	32	64	64	128	32	64

OELS - óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham. CK – *Candida krusei*; CA - *Candida albicans*; CT – *Candida tropicalis*. Valores informados em µg/mL.

A Cromatografia Gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) realizada com o óleo essencial obtido das folhas de *L. sidoides* revelou os compostos químicos apresentados na tabela 3, apresentando como componente majoritário, o timol. No cromatograma (Figura 1) podem-se observar os picos dos compostos encontrados.

Figura. 1: Cromatograma do óleo essencial das folhas de *Lippia sidoides* Cham.

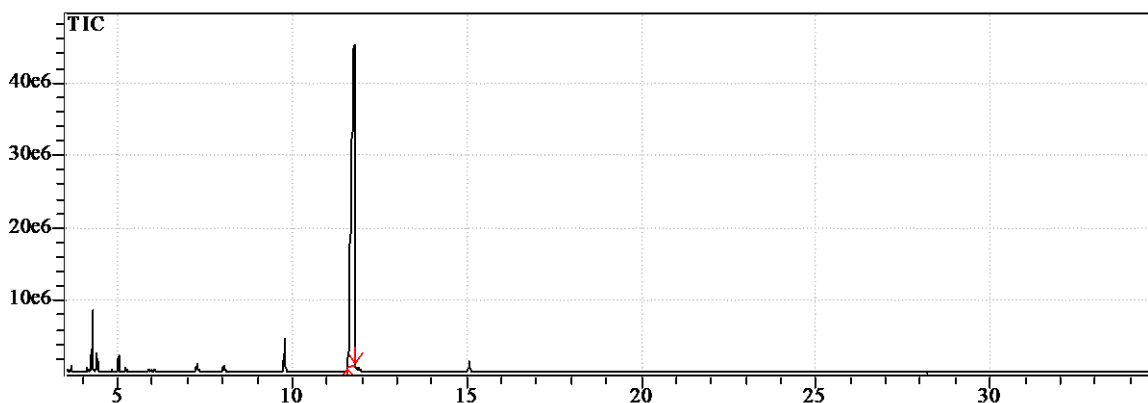


Tabela 3. Composição química (%) do óleo essencial das folhas de *Lippia sidoides* Cham.

Composto	TR ¹	IK Lit. ²	IK Calc. ³	(%)
p-cimeno	4.231	1025	1020	5.33
1,8-cineol	4.432	1031	1043	1.68
γ -terpineno	5.001	1060	1081	1.31
Éter metil carvacrol	9.722	1164	1194	3.01
Timol	11.803	1290	1288	84.95
Carvacrol	12.693	1299	1332	0,41
β - cariofileno	15.1	1418	1439	1.17
TOTAL				97.86

TR - Tempo de Retenção; IK Lit.- Índice Kovats encontrados na literatura; IK Calc. - Índice Kovats calculados; % - porcentagem.

A técnica do microcultivo para fungos foi empregada na determinação do efeito sobre a morfologia das amostras de *Candida*, utilizando-se o meio sólido ágar-arroz em câmara úmida. Ao meio de cultura ágar-arroz, foram adicionadas as emulsões do óleo essencial nas concentrações correspondentes a CIM e CIM x 2. O controle de crescimento e um controle de DMSO também foram realizados.

Em relação à interferência do óleo essencial sobre a micromorfologia fúngica, por meio da análise em microscopia, nos experimentos controle, verificaram-se as características morfológicas inerentes a cada espécie, deste modo, comprovando a viabilidade celular e a capacidade normal de morfogênese das mesmas. Contudo, as cepas CK 01 e CT 20 quando cultivadas em meio de cultura acrescido do OELS apresentaram alterações morfológicas, não tendo sido registrada a presença de pseudohifas, conforme visualizado na Figura 2. As alterações foram bastante semelhantes em todas as concentrações, entretanto pode-se observar um efeito de inibição diretamente proporcional à concentração.

As cepas CK 01 e CA 62 quando cultivadas em meio de cultura acrescido do timol apresentaram alterações morfológicas em todas as concentrações ensaiadas, não havendo registro de pseudohifas, como pode ser observado na Figura 3.

A cepa CT 20 quando cultivada na presença do timol sofreu uma redução no processo de morfogênese, diminuindo a emissão de brotos, quando utilizada a concentração CIM x 2 (Figura 3).

Figura 2. Fotos da micromorfologia dos fungos CK 01 (*C. krusei*) e CT 20 (*C. tropicalis*) cultivados em meio Agar-arroz em câmara úmida. OELS: óleo essencial de *L. sidoides*

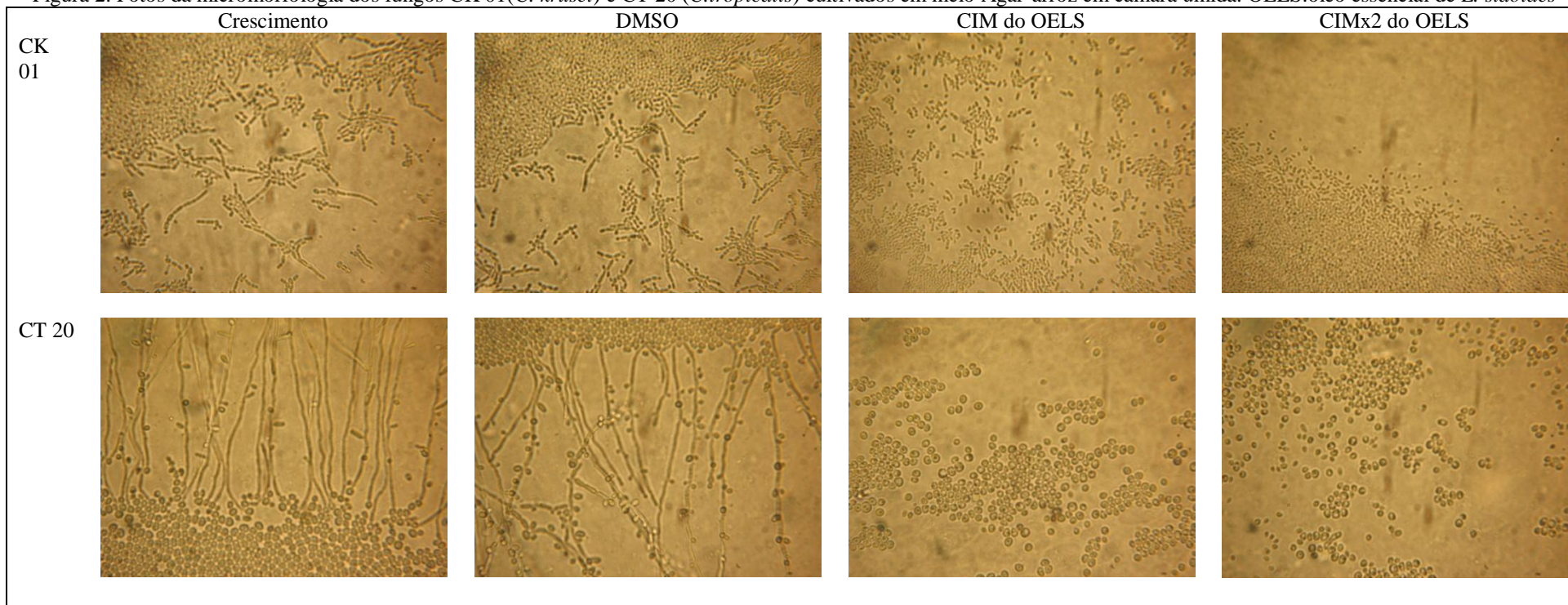
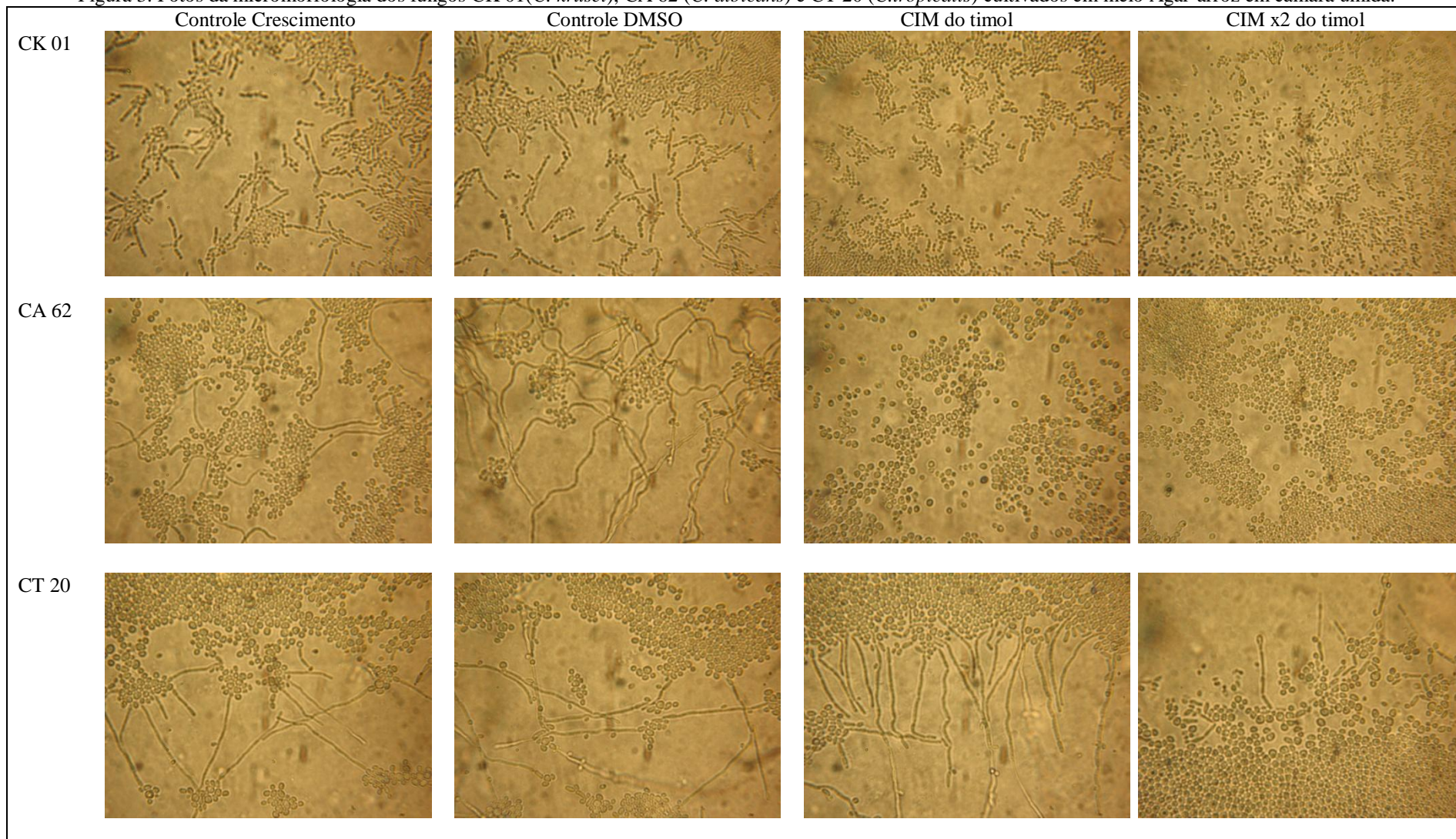


Figura 3. Fotos da micromorfologia dos fungos CK 01 (*C. krusei*), CA 62 (*C. albicans*) e CT 20 (*C. tropicalis*) cultivados em meio Agar-arroz em câmara úmida.



Discussão

O óleo essencial de *L. sidoides* apresentou atividade antifúngica contra cepas de *Candida* spp. e *Microsporum canis* em ensaios realizados por Fontenelle et al. (2007). Uma atividade elevada e mais ampla contra bactérias e fungos, incluindo leveduras, dermatófitos e fungos não dermatófitos foi relatada por Lemos et al. (1990). Um estudo comparativo sobre atividade antimicrobiana do óleo essencial e seus componentes majoritários, timol e carvacrol, contra diferentes espécies de bactérias e contra o fungo *C. albicans*, utilizando a diluição de caldo e ensaios de difusão em disco, demonstrou que os três compostos exibiram atividade antibacteriana e antifúngica, sendo os melhores resultados atribuídos ao timol e ao carvacrol (BOTELHO, 2007). O mesmo aconteceu no presente estudo onde observamos melhores resultados com o uso do timol. Em várias análises o timol tem sido reconhecido como o composto majoritário e pesquisas indicam que este pode estar relacionado com a propriedade antibacteriana e antifúngica do óleo essencial de *L. sidoides* (MATOS; OLIVEIRA, 1998).

Análises fitoquímicas do óleo essencial de *L. sidoides* realizadas em estudos anteriores revelaram a presença de constituintes como timol, carvacrol, α -pineno, p-pineno, 1,8 cineol, γ -terpineno, p-metadieno, metil-timol, metil-carvacrol, linalol, 4-terpineole, γ -elemeno (MATOS; OLIVEIRA, 1998; LEAL et al, 2003). Vários desses constituintes foram identificados na Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas realizada com o OELS.

A atividade dos óleos essenciais sobre bactérias Gram-positivas e fungos parece ocorrer de forma semelhante. Os constituintes dos óleos destroem a membrana citoplasmática e parede celular de bactérias e fungos, isso resulta em extravasamento do citoplasma e sua coagulação, além de inibir a respiração celular (COX et al., 2001). A ação de óleos essenciais contra fungos pode ser observada por meio das alterações morfológicas, que podem ser visualizadas tanto macroscopicamente como microscopicamente (KALEMBA; KUNICKA, 2003).

Segundo critérios propostos por Sartoratto et al (2004), os óleos essenciais com CIM entre valores de 50 e 500 $\mu\text{g/mL}$ são considerados com forte atividade antimicrobiana, com CIM entre 600 a 1500 $\mu\text{g/mL}$ possuem atividade moderada e CIM acima de 1500 $\mu\text{g/mL}$ é considerado com atividade fraca. Sendo assim o óleo essencial de *Lippia sidoides* e o timol podem ser considerados como produtos naturais de forte atividade antimicrobiana.

O óleo essencial obtido das folhas de *L. sidoides* exibe rendimento bastante variável, algumas vezes podendo chegar próximo a 6%, e possui como características sabor fortemente

picante e acentuado odor de timol (SOUZA et al., 2004). Na maioria dos estudos apresenta como composto majoritário o timol, um monoterpene fenólico (CRAVEIRO et al., 1981; MATOS; OLIVEIRA, 1998; FONTENELLE et al., 2007; DELFINO, 2012; VERAS et al., 2012). O mesmo componente foi encontrado na CG-EM realizada neste estudo. Outros componentes podem ser encontrados geralmente em concentrações menores, entre eles, β -cariofileno, Etil-metil-carvacrol, mirceno, p-cimeno, p-cineol e γ -terpineno (MATOS et al., 1998; FONTENELLE et al., 2007; MONTEIRO et al., 2007; CAVALCANTI et al., 2010; VERAS et al., 2012). A maioria destes compostos também foram identificados no OELS.

A formação de hifa e pseudohifa por fungos do gênero *Candida* são descritos como fatores de virulência, pois essas estruturas representam uma barreira para fagocitose impedindo sua eliminação no tecido epitelial. Mudanças morfológicas estão agregadas à patogenicidade do micro-organismo, e acredita-se que fatores ambientais possam alterar o estado fisiológico das leveduras comensais, induzindo alterações morfogenéticas que resultam na formação de micélio, o qual está associado com a evolução dos estados patológicos (ROMANI; BISTONI; PUCETTI, 2003; WHITEWAY; OBERHOLZER, 2004). Essas mudanças causam implicações na patogênese e no diagnóstico das infecções causadas por esses micro-organismos, e ocorrem tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Nos testes *in vitro*, a forma micelial ou de pseudo-micélio, é influenciada por fatores ambientais. O dimorfismo de fungos do gênero *Candida* spp foi observado em infecções ativas, com predominância da forma blastospórica (leveduriforme), estas formas estão associadas com a colonização inicial ao passo que a forma micelial (pseudohifas) encontra-se associada com a invasão do fungo (LO et al., 1997, ROMANI et al., 2003). Portanto, alterações na micromorfologia, como a inibição da formação de pseudohifas que ocorreram com o uso do OELS e do timol, são importantes para impedir o crescimento, a viabilidade e principalmente a virulência dos fungos.

Alterações na morfologia da célula fúngica causadas por óleos essenciais podem estar relacionadas com a interferência dos seus constituintes químicos sobre enzimas responsáveis pela biossíntese ou manutenção da parede celular, afetando o crescimento e morfogênese fúngica (ZAMBONELLI et al., 1996; DEBILLERBECK et al., 2001). Tanto o OELS quanto o timol provocaram inibição da formação de pseudohifas, que são fatores de virulência importantes no desenvolvimento das candidíases, sendo o efeito de inibição diretamente proporcional à concentração. Dessa maneira, na cepa CK 01, a inibição pode ter sido devido ao timol, que isoladamente, conseguiu impedir a formação das pseudohifas. Entretanto para a cepa CT 20, algum outro fitoconstituente do óleo foi responsável pela ação antifúngica, uma

vez que não foi observada a mesma atividade no ensaio com o timol. Em relação a cepa CA 62, enquanto o timol conseguiu inibir a formação das pseudohifas, o OELS não apresentou nenhum efeito sobre esta, sugerindo que possivelmente algum outro fitoconstituente presente no óleo tenha interagido com o timol e modificado o seu potencial de ação antifúngica.

Conclusão

O óleo essencial obtido das folhas de *L. sidoides* apresentou valores para CIM com relevância clínica para todas as cepas estudadas, assim como o seu componente majoritário, o timol, ambos causando alterações morfológicas nas células fúngicas, provocando inibição ou redução de seus fatores de virulência. Outros estudos serão necessários no sentido de investigar o mecanismo de ação destes produtos naturais sobre a morfologia das leveduras do gênero *Candida*.

Referências

- ABDELGALEIL, S. A. M.; ABBASSY, M. A.; BELAL, A. S.; RASOUL, M. A.A.A. Bioactivity of two major constituents isolated from the essential oil of *Artemia judaica* L. **Biosource Technology**, v. 99, p. 5947-5950, 2008.
- ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy**. Carol Stream, Illinois: Allured Publishing Corporation, 2001.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils: a review. **Food Chem. Toxicol.**, v.46, p. 446-475, 2008.
- BOTELHO, M. A.; BASTOS, G. M.; FONSECA, S. G. C.; MATOS, F. J. A.; MONTENEGRO, D.; RAO, V. S. and BRITO, G. A. C.; Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, cavacrol and thymol against oral pathogens. **Brazilian Journal Medical and Biological. Research**. v. 40, p. 349-356, 2007.
- CAVALCANTI, S. C. H. et al. Composition and acaricidal activity of *Lippia sidoides* essential oil against two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch). **Bioresource Technology**, v. 101, p. 829-832, 2010.
- CLEELAND, R.; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials “in vitro” and in experimental animal infections. In: LORIAN, V. M. D. **Antibiotics in laboratory medicine**. 3ª ed. Baltimore: Williams & Wilkins, p. 739-788, 1991.
- COUTINHO, H. D. M.; COSTA, J. G. M.; Siqueira-Júnior, J. P.; Lima, E. O. *In vitro* anti-staphylococcal activity of *Hyptis martiusii* Benth against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-MRSA strains. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 18, p. 670-675, 2008.

COX, S. D. et al. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **Journal of Applied Microbiology**, v.88, p.170-175, 2000.

CRAVEIRO, A. A. et al. Essential oils from Brazilian Verbenaceae. Genus *Lippia*. **Journal of Natural Products**, v. 44, p. 598-601, 1981.

DEBILLERBECK, V. G. et al. Effect of *Cymbopogon nardus* (L) W. Watson essential oil on the growth and morphogenesis of *Aspergillus niger*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.47, n. 1, p. 17-19, 2001.

DELFINO, M. M. S. Óleos essenciais no controle de *Tetranychus evansi* Baker & Pritchard e *Tetranychus urticae* Koch (acarí: tetranychidae). 85f. Dissertação (Mestrado em Bioprospecção Molecular) – Programa de Pós-graduação, Universidade Regional do Cariri, Crato, 2012.

DIGNANI, M. C.; SOLOMKIN, J. S.; ANAISSIE, E. *Candida*. In: Anaissie E, GINNIS M.R., PFALLER, M.A. **Medical Mycology**. 1. ed. Filadélfia, p. 195-239, 2003.

ELLOF, J. N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Medica**, v. 64, n. 8, p. 711-713, 1998.

ERNST, E. J.; KLEPSEK, M. E.; ERNST, M. E.; MESSER, S. A.; PFALLER, M. A. In vitro pharmacodynamic properties of MK-0991 determined by time-kill methods. **Mycology**, v. 33, p. 75-80, 1999.

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

GEIDAM, Y. A.; USMAN, H.; ABUDAKAR, M.B. IBRAHIM, B. Effects of an aqueous leaf extract of *Psidium guajava* on bacteria isolated from navel of day-old chicks. **Research Journal Of Microbiology** v.2: p.960-965,2007.

GOTTLIEB, O, R. Modified distillation trap. **Chemist Analyst**, v.49, p.114-116, 1960.

HADACEK, F.; GREGER, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. **Phytochemical Analysis**, v. 11, n. 3, p.137-147, 2000.

JAVADPOUR, M.M. et al. De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity, **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 39, n. 16, p. 3107–3113, 1996.

KALEMBA, D.; KUNICKA, A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. **Current Medicinal Chemistry**, v. 10, p. 813-829, 2003.

KLEPSEK, M. E.; ERNST, E. J.; ERNST, M. E.; MESSER, S. A.; PFALLER, M. A. Evaluation of endpoints for antifungal susceptibility determinations with LY303366. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 6, p. 1387-1391, 1998.

KURTZMAN, C.P; FELL, J.W. 1998. Definition, classification and nomenclature of the yeasts. In: **The Yeasts, A Taxonomic Study**, C.P. KURTZMAN and J.W. FELL (eds.) 4th edn. pp. 3-5. Elsevier Science B.V., Amsterdam.

LEAL, L. K. A. M.; OLIVEIRA, V. M.; ARARUANA, S. M.; MIRANDA, M. C. C.; OLIVEIRA, F. M. A. Análise do timol por CLAE na tintura de *Lippia sidoides* Cham. (alecrim-pimenta) produzida em diferentes estágios de desenvolvimento da planta. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.13, suplemento, p. 09-11, 2003.

LEMOS, T. L. G.; MATOS, F. J. A.; ALENCAR, J. W. et al. Antimicrobial activity of essential oils of Brazilian plants. **Phytother Res**;4:82-4, 1990.

LO, H. J. et al. Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. **Cell**, v. 90, p. 939-949, 1997.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil; nativas e exóticas**. Nova Odessa: instituto Plantarum, 2002. 512p.

MATOS, F. J. A. et al. Essential oil of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) a medicinal aromatic schrub from Northeast Brasil. **Journal Essential Oil Research**, 1998.

MATOS, F. J. A. **Fármacias vivas: sistemas de utilização de plantas medicinais em projetos para pequenas comunidades**. 4. ed. Fortaleza: UFC.2002. 267p.

MATOS, F. J. A.; OLIVEIRA, F. *Lippia sidoides* Cham. - Farmacognosia, química e farmacologia. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.79, p. 84-87, 1998.

MICHELL, T. G. Micologia médica. In: JAWETZ, MELNICK E ADELBERG: **Microbiologia Médica: um livro médico Lange/** Geo. F. Brooks...[et al]. – 24.ed. – Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil Ltda., 2009.

MONTEIRO, M. V. B. et al. Topical anti-inflammatory, gastroprotective and antioxidant effects of essential oil of *Lippia sidoides* Cham leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 378-382, 2007.

ROMANI, L.; BISTONI, F.; PUCETTI, 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, p. 338-343, 2003.

SARTORATTO, A. et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 275-280, 2004.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2010. 388 p.

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

SOUZA, M. P. et al. **Constituintes químicos ativos e propriedades biológicas de plantas**

medicinais brasileiras. 2ª Ed. Fortaleza: Editora UFC, p.51-85, 2004.

SOUZA, E. L.; STAMFORD, T. L. M.; LIMA, E. O.; TRAJANO, V. N. Effectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. **Food Control**, v. 18, n. 5, p. 409-413, 2007.

SHADOMY, S.; ESPINEL-INGROFF, A.; CARTWRIGHT, R. Laboratory studies with antifungal agents: susceptibility test and bioassay In: LENNETTE, E. H.; BALLOWS, A.; HAUSLERS JR. V.; SHADOMY, H. J. (Eds). **Manual of clinical microbiology**. 4. ed. Washington: American Society of Microbiology, 1985. p.991-999.

VERAS, H. N. H. et al. Synergistic antibiotic activity of volatile compounds from the essential oil *Lippia sidoides* and thymol. **Fitoterapia**, p. 1-5, 2012.

WHITEWAY, M.; OBERHOLZER, U. *Candida* morphogenesis and host-pathogen interactions. **Current Opinium in Microbiology**, v. 7, p. 350-357, 2004.

ZAMBONELLI, A. et al. Effects of essential oil on phytopathogenic fungi. **Phytopathology**, v. 144, n. 9-10, p. 491-494, 1996.

CONCLUSÕES

5 CONCLUSÕES

A composição química do óleo essencial das folhas de *L. sidoides* possui o timol como componente majoritário que está em conformidade com outros trabalhos relatados para essa espécie.

Quando realizada a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), o óleo essencial de *L. sidoides* e o timol apresentaram atividade antifúngica clinicamente relevante frente todas as cepas de *Candida* testadas neste estudo, no entanto, o timol apresentou melhores resultados.

A determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM) foi realizada para confirmação da atividade do óleo essencial de *L. sidoides* e do timol. Os resultados obtidos indicam que tanto óleo essencial de *L. sidoides* quanto o timol são produtos com boa atividade antifúngica.

Em relação à interferência do óleo essencial sobre a micromorfologia fúngica, tanto o óleo essencial de *L. sidoides* quanto o timol provocaram inibição da formação de pseudohifas, que são fatores de virulência importantes no desenvolvimento das candidíases.

A cepa CK 01 quando cultivada em meio de cultura acrescido do óleo essencial de *L. sidoides*, apresentou alterações morfológicas, não tendo sido registrada a presença de pseudohifas, o mesmo ocorreu quando utilizado o timol, dessa maneira a inibição pode ser devido ao timol, que isoladamente, conseguiu impedir a formação das pseudohifas, Entretanto para a cepa CT 20, algum outro fitoconstituente do óleo foi responsável pela ação antifúngica, uma vez que não foi observada a mesma atividade no ensaio com o timol.

Em relação à cepa CA 62, enquanto o timol conseguiu inibir a formação das pseudohifas, o óleo essencial de *L. sidoides* não apresentou nenhum efeito sobre esta, sugerindo que possivelmente algum outro fitoconstituente presente no óleo tenha interagido com o timol e modificado o seu potencial de ação antifúngica.

Enfim, o timol é capaz de causar alterar a micromorfologia fúngica, mas alterações micromorfológicas causadas pelo óleo essencial de *L. sidoides* sobre as cepas fúngicas, não podem ser atribuídas diretamente ao timol.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ABBAS, J. *et al.* *Candida krusei* fungemia. Uma infecção grave escalada em pacientes imunocomprometidos. **Arch Intern Med**.v.160: 2659-64, 2000.
- ABDELGALEIL, S. A. M.; ABBASSY, M. A.; BELAL, A.S.; RASOUL, M. A. A. A. Bioactivity of two major constituents isolated from the essential oil of *Artemia judaica* L. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 5947-5950, 2008.
- ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy**. Carol Stream, Illinois: Allured Publishing Corporation, 2001.
- ALMEIDA, M. C. S. et al. Flavonoides e outras substâncias de *Lippia sidoides* e suas atividades antioxidantes. **Química Nova**, v.33, p. 1877-1881, 2010.
- AZUMA, K. *et al.* *In vitro* antibacterial activity of extracts from four *Labiatae* herbs against *Helicobacter pylori* and *Streptococcus mutans*. **Bull Nat Inst Veg Tea Science**, v. 2, p. 83–91, 2003.
- BARBEDO, S. L.; SGARBI, B. G. D. DST – **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis** 22(1): 22-38 – INSS 0103-4065 – INSS on-line: 2177-8264, 2010.
- BRANDÃO, A. D. **Citogenética comparativa dos gêneros *Lippia*, *Lantana* e *Aloysia* (Lamiales)**. 2003. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Estrutural).Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2003.
- BOTELHO, M. A. et al. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. **Braz J Med Biol Res**, v.40, p.349–356, 2007.
- CALDERONE, R. A.; FRONZI, W. A. Virulence factors of *Candida albicans*. **Trends in Microbiology**, vol. 9, p. 327-335, 2001.
- CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents).**Brazilian Journal and Biological Research**, 33, p. 179-189, 2000.
- CARDOSO, M. G. *et al.* **Metabólitos secundários vegetais: visão geral, química e medicinal**. Lavras: UFLA, 81 p. (Textos acadêmicos), 2001.
- CARLISLE, P. *et al.* Expression levels of a filament-specific transcriptional regulator are sufficient to determine *Candida albicans* morphology and virulence, **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, p. 599-604, 2009.
- CARVALHO, A. F. Larvicidal activity of the essential oil from *Lippia sidoides* Cham. Against *Aedes aegypti* linn. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 98:569–571, 2003.
- CASTRO, T.L. *et al.* Mecanismos de resistência da *Candida sp* WW a antifúngicos. **Infarma**, v. 18, n. 9/10, 2006.

CAVALCANTI, S.C. *et al.* Composition and acaricidal activity of *Lippia sidoides* essential oil against two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch). **Bioresource Technology**, v. 101, p.829–832, 2010.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química nova**, v.21, p.99-105, 1998.

CHANG, H. T. *et al.* Antifungal activity of essential oil and its constituents from *Calocedrus macrolepis* var. *formosana* Florin leaf against plant pathogenic fungi. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 6266-6270, 2008.

CLEELAND, R.; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials “in vitro” and in experimental animal infections. In: LORIAN, V. M. D. **Antibiotics in laboratory medicine**. 3ª ed. Baltimore: Williams & Wilkins, p. 739-788, 1991.

COSTA, S. M. O. Chemical constituents from *Lippia sidoides* and cytotoxic activity. **J Nat Prod**, v. 64, p. 792–795, 2001.

COSTA, J.G.M. *et al.* Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzigium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 15(4): 304-309, 2005.

COUTINHO, H. D. M.; COSTA, J. G. M.; Siqueira-Júnior, J. P.; Lima, E. O. *In vitro* anti-staphylococcal activity of *Hyptis martiusii* Benth against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-MRSA strains. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 18, p. 670-675, 2008.

CRAVEIRO, A. A.; FERNANDES, A.G.; ANDRADE, C.H.S.; MATOS, F.J.A.;ALENCAR, J. W.; MACHADO, M. I. L. **Óleos essenciais de plantas do Nordeste**. Fortaleza, CE: Edições 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. 39-43, 2003.

DEBA, F.; XUAN, T. D.; YASUDA, M.; TAWATA, S. Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from *Bidens pilosa* Linn. Var. **Radiata**, v. 19, p. 346-352, 2008.

DELFINO, M. M. S. **Óleos essenciais no controle de *Tetranychus evansi* Baker & Pritchard e *Tetranychus urticae* Koch (acarí: tetranychidae)**. Dissertação (Mestrado em Bioprospecção Molecular) – Programa de Pós-graduação, Universidade Regional do Cariri, Crato, 2012.

DI STASI, L. C. *et al.* Asteridae medicinais na Amazônia e Mata Atlântica. Lamiales medicinais. In: DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2ª ed. São Paulo: UNESP, 2002. P. 406-448.

DIKBAS, N.; KOTAN, R.; DADASOGLU, F.; SAHIN, F. Control of *Aspergillus flavus* with essential oil and methanol extract of *Satureja hortensis*. **International Journal of Food**

Microbiology, Grugliascov. 124, p. 179-182, 2008.

DORMAN, H.J.D.; DEANS, S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **J Appl Microbiol.**, v. 88, p. 308–316, 2000.

ELLOF, J. N. A sensitive and quick microplate method to determined the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Medica**, v. 64, n. 8, p. 711-713, 1998.

FARIAS, N. M. P.; LIMA, E. O. Atividade antifúngicas de óleos essenciais obtidos de plantas medicinais contra leveduras do gênero *Candida*: uma alternativa no controle da infecção hospitalar. XVI Prêmio Jovem Cientista. Edição: Saúde da população, controle da infecção hospitalar. Porto Alegre, 2000.

FESTER, C.A., MARTINUZZI, E.A., RETAMARY, J.A. & RICCIARDI, A.I. **Aceites esenciales de La República Argentina**. Academia Nacional de Ciências, Córdoba, 1961.

FONTENELLE, R.O.S, *et al.* Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Journal Antimicrob Chemother**, v. 59, p. 934–40, 2007.

FONTENELLE, R. O. S. **Efeito antifúngico de óleos essenciais de *Lippia sidoides* Cham., *Croton argyrophyloides* Muell., *Croton zenhtneri* Pax et Hoffm., *Croton nepetaefolius* Baill. e de seus principais constituintes contra dermatófitos e *Candida* spp. isolados de cães**. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, 2008.

GEIDAM, Y. A.; USMAN, H.; ABUDAKAR, M.B. IBRAHIM, B. Effects of a aqueous leaf extracts of psidium guajava on bacteria isolated from navel of day-old chicks. **Research Journal Of Microbiology** v.2: p.960-965,2007.

GIOLO, M. P.; SVIDZINSKI T. I. E. Phisiopathogenesis, epidemiology and laboratory diagnosis of candidemia. **Jornal Brasileiro de Patologia Medicinal e Laboratorial**, v.46, n. 3, p. 225-234, 2010.

GOTTLIEB, O, R. Modified distillation trap. **Chemist Analyst**, v.49, p.114-116, 1960.

HADACEK, F.; GREGER, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choise. **Phytochemical Analysis**, v. 11, n. 3, p.137-147, 2000.

JAVADPOUR, M.M. *et al.* De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity, **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 39, n. 16, p. 3107–3113, 1996.

KANAFANI, Z.A.; PERFECT, J.R. Resistance to Antifungal Agents: Mechanisms and Clinical Impact, **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, n. 1, p. 120–8, 2008.

KARKOWSKA-KULETA, J. *et al.* Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. **Acta Biochimica Polonica**, v. 56, p. 211-224, 2009.

KORDALI, S.; ÇAKIR, A.; ÖZER, H.; ÇAKMAKCI, R.; KESDEK, M.; METE, E. Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from *Turkish Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and ρ -cymene. **Bioresource Technology**, doi: 10.1016/j.biortech.2008.04.048, 2008.

KURTZMAN, C. P; FELL, J. W. Definition, classification and nomenclature of the yeasts. In: **The Yeasts, A Taxonomic Study**, C.P. KURTZMAN and J.W. FELL (eds.) 4th edn. pp. 3-5. Elsevier Science B.V., Amsterdam, 1998

LACOSTE, E. *et al.* Antiseptic properties of essential oil of *Lippia sidoides* Cham. Application to the cutaneous microflora. **Annales Pharmaceutiques Françaises** 54, 228–230, 1996.

LAVABRE, M. **Aromaterapia – A cura pelos óleos essenciais**. 2. Ed. Rio de Janeiro: Record, 1992.

LEMOS, T.L. *et al.* Antimicrobial activity of essential oil of Brazilian plants. **Phytotherapy Research** 4, 82–84, 1990.

LEITO, J.T.D. *et al.* Identification of salivary components that induce transition of hyphae to yeast in *Candida albicans*. **Yeast Research**, v.9, p.1102-1110, 2009.

LIMA, K. M. *et al.* *Candida albicans* e *Candida tropicalis* isoladas de onicomicose em paciente HIV-positivo: co-resistência *in vitro* aos azólicos. **Revista de Patologia Tropical**, v. 37, n. 1, p. 57-61, 2008.

BAUMGART, A. M. K. **Avaliação da atividade das espécies *Piper mollicomum* e *hedyosmum brasiliense* Frente as espécies de *candida* spp.** Blumenau, 2007.

LIMA, R.K. *et al.* Chemical composition and fumigant effect of essential oil of *Lippia sidoides* Cham. and monoterpenes against *Tenebrio molitor* (L.) (coleoptera: tenebrionidae). **Ciênc agrotec**, v.35, p. 664–671, 2011.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: Nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 515 p, 2002.

LORENZI, H. & SOUZA, H.S. **Plantas ornamentais do Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras**. Instituto Plantarum de Estudos da Flora, Nova Odessa. p. 1030-1056, 2001.

MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais – Guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil**. Fortaleza: UFC, 2 ed., 346 p, 2000.

MATOS, F. J. A. **Farmácias vivas: sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades**. Fortaleza: UFC, 4 ed., 267 p, 2002.

MATOS, F.J.A; OLIVEIRA, F. *Lippia sidoides* Cham. – farmacognosia, química e farmacologia. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.70, n. 3-4 p. 84-87, 1998.

MCNEIL, M. M.; NASH, S. L.; HAJJEH, R. A.; PHELAN, M. A.; CONN, L. A.; PLIKAYTIS, B. D.; WARNOCK, D. W. Trends in mortality due to invasive mycotic diseases

in the United States, 1980-1997. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, p. 641-647, 2001.

MENDES, J. M. **Investigação da atividade antifúngica do óleo essencial de *Eugenia caryophyllata* Thunb. sobre cepas de *Candida tropicalis***. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, área de concentração: Farmacologia) – UFPB/CCS, João Pessoa, 2011.

MICHELL, T. G. Micologia médica. In: JAWETZ, MELNICK E ADELBERG: **Microbiologia Médica: um livro médico Lange/** Geo. F. Brooks...[et al]. – 24.ed. – Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil Ltda., 2009.

MITCHELL, A. P. Dimorphism and virulence in *Candida albicans*. **Current Opinion in Microbiology**, v.1, p. 687-692, 1998.

MOLERO, G. *et al.* *Candida albicans*: genetics, dimorphism and pathogenicity. **International Microbiology**, v.1, p. 95-106, 1998.

MONGE, R. A. *et al.* The MAP Kinase signal transduction network in *Candida albicans*. **Microbiology**, v. 152, n.4, p. 905-912, 2006.

MONTEIRO, M.V. *et al.* Topical anti-inflammatory, gastroprotective and antioxidant effects of the essential oil of *Lippia sidoides* Cham. leaves. **Journal Ethnopharmacol**, v.111, p.378–82, 2006.

MORAIS, S. R. Chemical constituents of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) leaves cultivated in Hidrolândia, Goiás, Brazil. **Int J Anal Chem** 2012, 4. doi:10.1155/2012/363919. Article ID 363919.

MORAIS-BRAGA, M. F. B. **PROSPECÇÃO QUÍMICA E BIOATIVIDADE DE *Lygodium venustum* SW (LYGODIACEAE)**. Dissertação de mestrado. Universidade Regional do Cariri - URCA, 2012.

MORETTI, A. *et al.* Diffuse cutaneous candidiasis in a dog. Diagnosis by PCR-REA. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 21, p. 139–142, 2004.

NUCCI, M., COLOMBO, A. L. Candidemia due to *Candida tropicalis*: clinical, epidemiologic, and microbiologic characteristics of 188 episodes occurring in tertiary care hospitals. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease** 58: 77-82, 2007.

ODDS, F.C. ***Candida and candidosis***, 2nd edn. London: Bailliere Tindall. 1998.

OLIVEIRA, F.P. *et al.* Effectiveness of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) essential oil in inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical material. **Braz J Pharmacogn** 2006, 16:510–516.

PASCUAL, M.E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; MATA, D.S.; VILLAR, A. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, p. 201–214, 2001.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of Invasive Candidiasis: a Persistent

Public Health Problem. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 1, p. 133-163, 2007.

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D. J.; RINALDI, M. G.; BARNES, R.; HU, B.; VESELOV, A. V., *et al.* Global Antifungal Surveillance Group. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study: a 6.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* and other yeast species to fluconazole and voriconazole by standardized disk diffusion testing. **J Clin Microbiol**, 43: 5848-5859, 2005.

RANGE, H.P. **Farmacologia**. 6^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007, 829 p.

RATERA, E.L. & RATERA, M.O. **Plantas de la flora Argentina empleadas en medicina popular**. Hemisfério Sur, Buenos Aires, 1980.

RIBEIRO, E. L. *et al.* Aspectos das leveduras de *Candida* vinculadas às infecções nosocomiais. **NewsLab**. n. 64, p.106-28, 2004.

SEGATO, F. **Expressão gênica envolvida nos mecanismos de resistência à acriflavina, griseofulvina e terbinafina em fungos filamentosos**. 2008. Tese (doutorado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, 2008.

SHADOMY, S.; ESPINEL-INGROFF, A.; CARTWRIGHT, R. Laboratory studies with antifungal agents: susceptibility test and bioassay In: LENNETTE, E. H.; BALLOWS, A.; HAUSLERS JR. V.; SHADOMY, H. J. (Eds). **Manual of clinical microbiology**. 4. ed. Washington: American Society of Microbiology, 1985. p.991-999.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 388, 2010.

SILVA, C. H. P. M. *et al.* **Bacteriologia e micologia para o laboratório clínico**. Rio de Janeiro: Revinter, 2006.

SILVA, C. B. *et al.* Antifungal activity of the lemongrass oil and citral against *Candida* spp. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 12, n. 1, p. 63-66, 2008.

SILVA, M. C.; CARVALHO, J. C. T. Plantas Medicinais: In: Carvalho, J. C. T. **Fitoterápicos. Antiinflamatórios. Aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. Ribeirão Preto, SP, Tecmedd, 480 p, 2004.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS / Editora da UFSC, 2010.

SOARES, L. **Estudo tecnológico, fitoquímico e biológico de *Lippia alba* (miller) n. E. Brown ex britt. & wils. (falsa-melissa) verbenaceae**. Dissertação (Mestrado em Farmácia). Universidade Federal de Santa Catarina. 2001.

SOARES, A. C. Se bem não fizer, mal também não fará. **Revista Eletrônica de Ciências**. n. 12. Outubro de 2002. Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo. Disponível em: <http://www.cdcc.usp.br/ciencia/artigos/art_12/medicamento.html> . Acesso em: 25 Maio 2010.

SORARÚ, S.B. & BANDONI, A. **Plantas de La medicina popular Argentina**. Albatros, Buenos Aires, 1978.

SOUZA, M. P. *et al.* **Constituintes químicos ativos e propriedades biológicas de plantas medicinais brasileiras**. 2ª Ed. Fortaleza: Editora UFC, p. 51-58, 2004.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Verbenaceae: Botânica sistemática**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, p. 529, 2005.

SOUZA, E. L.; STAMFORD, T. L. M.; LIMA, E. O.; TRAJANO, V. N. Effectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. **Food Control**, v. 18, n. 5, p. 409-413, 2007.

STEFANINI, M.B.; RODRIGUES, S.D.; MING, L.C. Ação de fitorreguladores no crescimento de erva-cidreira-brasileira. **Horticultura Brasileira** 20(1): 18-23, 2002.

TEÓFILO, T. M. N. G. **Efeito antiespasmódico do óleo essencial da *Lippia sidoides* Cham. e seus constituintes, timol, para-cimeno e beta-cariofileno, sobre o músculo liso traqueal de ratos**. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas). Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2012.

TERBLANCHÉ, F.C.; KORNELIUS, G. Essential oil constituents of the genus *Lippia* (Verbenaceae)-A literature review. **Journal of Essential Oil Research** 8, 471-485, 1996.

TSANG, C.S.; SAMARANAYAKE, L. P. Oral yeasts and coliforms in HIV-infected individuals in Hong Kong. **Mycoses** 43:303-308, 2000.

VALLE, G.C.; RENDE, J.C.; OKURA, M. H.; Estudo da Incidência do Gênero *Candida* em Hospital Público Universitário. **NewsLab**. Ed.101, 2010.

VAN BURIK, J.A.H.; MAGEE, P.T. Aspects of fungal pathogenesis in Humans. **Annu Rev Microbiol**, v.55, p. 743-772, 2001.

VERAS, H. N. H. **CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIINFLAMATÓRIA TÓPICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia sidoides* CHAM. (VERBENACEAE)**. Dissertação de mestrado. Universidade Regional do Cariri - URCA, 2011.

VERMELHO, A.B.; BASTOS, M.C.F.; BRANQUINHA, M. **Bacteriologia Geral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2007.

WANNMACHER, L. Antifúngicos. In: Wannmacher, L.; Ferreira, M.B.C. **Farmacologia Clínica para Dentistas**. 3 ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2007.


WILSON, L. S.; REYES, C. M.; STOLPMAN, M.; SPECKMAN, J.; ALLEN, K.; BENEY, J. The direct cost and incidence of systemic fungal infections. **Value in Health**, v. 5, p. 26-34, 2002.

WINGARD J.R. Importance of *Candida* species other than *C. albicans* as pathogens in oncology patients, **Clinical Infectious Diseases**, v. 20, n. 1, p. 115-125, 1995.

ANEXOS

ANEXO 1 – Comprovante de aceite para publicação

Avaliação da atividade citotóxica e potencial antiparasitário *in vitro* do α -pineno e carvacrol.


ASOCIACION TOXICOLOGICA ARGENTINA
 ASOCIACIÓN CIVIL
 (Adherida a la IUTOC)
ASOCIACION TOXICOLOGICA ARGENTINA
 PRESIDENTE
ASOCIACION CIVIL
 (Adherida a la IUTOC)
 VICE-PRESIDENTE
 Adriana Ridolfi
 SECRETARIO
 Gerardo D. Castro
 TESORERO
 Marta L. Oneto
 VOCALES
 Marcela M. López Nigro
 Patricia Quiroga
 Mónica C. Nipoll
 VOCALES SUPLENTE
 María C. Traverso
 Gabriela Florence
 Marta D. Masry
 COMITÉ CIENTÍFICO
 Nelson Albano
 José A. Castro
 Lucrécia Ferrari
 Mónica Nasotto
 María M. Salcedo
 TRIBUNAL DE HONOR
 Susana I. García
 Irma Giolito
 Augusto Piazza
 ORGANO DE FISCALIZACIÓN
 Mirta E. Ryzel
 Claudia V. Vasena
 Viriana V. Crapanzano
 DIRECCIÓN POSTAL
 A. ALSINA 1441 – Of. 302
 C1088AAK BUENOS AIRES
 REPÚBLICA ARGENTINA
 TEL/FAX
 (54 11) 4381-6919
 e-mail: ata@dd.com.ar
 Internet
www.ataonline.org.ar

Buenos Aires, 9 de novembro de 2013.

Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho
 Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular,
 Departamento de Química Biológica, Universidade Regional do Cariri – URCA,
 Crato-CE, Brasil.
 Rua Cel. Antonio Luis 1161, Pimenta, 63105-000.
 Fone: +55(88)31021212; Fax +55(88) 31021291.
 E-mail: hdmcoutinho@gmail.com

Estimado Dr. Henrique Coutinho

A presente carta tem por objetivo comunicar que o manuscrito “**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA E POTENCIAL ANTIPARASITÁRIO *IN VITRO* DO α -PINENO E CARVACROL.**” foi aceito para publicação como artigo na Acta Toxicológica Argentina.

Agradecemos por haver confiado seus resultados à revista.



Dr. Adolfo Rafael de Roodt
 Diretor
 Acta Toxicológica Argentina

ANEXO 2 – Comprovante de publicação

Atividade antiparasitária *in vitro* e citotóxica de cariofileno e eugenol contra *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania brasiliensis*.

Revista Cubana de Plantas Medicinales. 2013;18(4):522- 528

ARTÍCULO ORIGINAL

Atividade antiparasitária *in vitro* e citotóxica de cariofileno e eugenol contra *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania brasiliensis*

Actividad antiparasitaria *in vitro* citotóxica de cariofileno y eugenol contra *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania brasiliensis*

In vitro* cytotoxic and antiparasitic activity of caryophyllene and eugenol against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania brasiliensis

MSc. Nadghia F. Leite, MSc. Celestina E. Sobral-Souza, BSc. Rosimeire S. Albuquerque, MSc. Dara I. V. Brito, MSc. Anne K. L. S. Lavor, BSc. Liscássia B. B. Alencar, BSc. Saulo R. Tintino, BSc. João V. A. Ferreira, MSc. Fernando G. Figueredo, MSc. Luciene F. Lima, PhD. Francisco A. B. Cunha, PhD. Antônio I. Pinho, PhD. Henrique D. M. Coutinho

Universidade Regional do Cariri. Crato-CE, Brasil.

RESUMO

Introdução: as doenças negligenciadas persistem por conta de falhas da ciência e acometem principalmente países em desenvolvimento, como exemplos podemos citar a doença de Chagas e a leishmaniose.

Objetivo: avaliar o potencial antiparasitário *in vitro* de um terpenóide componente de óleo essencial, o cariofileno e o eugenol, contra as formas epimastigota e promastigota de *T. cruzi* e *L. brasiliensis*, respectivamente, bem como verificar sua citotoxicidade em células de mamíferos.

Métodos: para os estudos *in vitro* de *T. cruzi*, foi usado o clone B5-CL, estavelmente transfectadas com o gene de *Escherichia coli* β-galactosidase (lacZ). Os ensaios de inibição de promastigotas foram realizadas utilizando a estirpe de *L. brasiliensis*, cultivadas a 22 °C em meio de Schneider de *Drosophila* suplementado com FBS a 20 %. Para os testes de atividade antiepigastigota, antipromastigota foram utilizados placas de 96 poços com culturas que não tinham atingido a fase estacionária. Os ensaios de citotoxicidade utilizado estirpe de fibroblastos NCTC929 cultivadas em Meio Essencial Mínimo (Sigma). A viabilidade dessas linhagens através da utilização de resazurina como um método colorimétrico.

ANEXO 3 – Comprovante de aceite para publicação

Avaliação das potenciais atividades tripanocida e antileishmania do extrato de folhas de *Piper arboreum* (Piperaceae) e de suas frações.



Revista de Ciências
Farmacêuticas
Básica e Aplicada

Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences

Araraquara, 26 de junho de 2013.

Ref. RCFBA-2938-094/2013

Em nome da Editoria Científica, temos o prazer de informar que o artigo intitulado:

**AVALIAÇÃO DAS POTENCIAIS ATIVIDADES TRIPANOCIDA E ANTILEISHMANIA
DO EXTRATO DE FOLHAS DE *PIPER ARBOREUM* (PIPERACEAE) E DE SUAS
FRAÇÕES,**

De autoria de Fernando Gomes Figueredo, Saulo Relison Tintino, Dara Isabel Vieira de Brito, Maria Flaviana Bezerra Moraes Braga, Nadghia Figueiredo Leite, Bruno Feitosa Furtado Lucena, Celestina Elba Sobral-Souza, Maria Celeste Vega Gomez, Henrique Douglas Melo Coutinho, foi aceite para publicação na *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*.

Enviaremos, na época oportuna, a prova gráfica para correção final.

Atenciosamente,
Eliana Aparecida Varanda
Editora Chefe

Ilmo. Sr.
Fernando Gomes Figueredo

ANEXO 4 – Comprovante de publicação

Use of natural products to enhance the antibiotic activity of gentamicin and other aminoglycosides: the future of antibiotic therapy.

In: Gentamicin
Editor: Emilie Kruger

ISBN: 978-1-62808-841-0
© 2013 Nova Science Publishers, Inc.

Chapter 3

**USE OF NATURAL PRODUCTS TO ENHANCE
THE ANTIBIOTIC ACTIVITY OF GENTAMICIN
AND OTHER AMINOGLYCOSIDES:
THE FUTURE OF ANTIBIOTIC THERAPY**

*Cícera Natalia Figueirêdo Leite Gondim¹,
Nadghia Figueiredo Leite¹, Jacqueline Cosmo Andrade¹,
Maria Flaviana Bezerra Morais-Braga¹,
Gláucia Morgana de Melo Guedes¹,
Saulo Relison Tintino¹, Cícera Cislânia Araújo Tavares¹,
Maria Audilene de Freitas¹,
Liscássia Beatriz Batista Alencar¹,
Celestina Elba Sobral de Souza¹,
Rosimeire Sabino Albuquerque¹,
Edinardo Fagner Ferreira Matias¹,
Francisco Assis Bezerra da Cunha¹,
Dara Isabel Vieira de Brito¹,
Anne Karyzia Lima Santos de Lavor¹,
João Victor de Alencar Ferreira¹,
Fernando Gomes Figueredo¹, Luciene Ferreira de Lima¹
and Henrique Douglas Melo Coutinho²*

¹Departamento de Ciências Biológicas, ²Departamento de Química Biológica, Universidade Regional do Cariri, Crato, CE, Brasil

Complimentary Contributor Copy

ANEXO 5 – Comprovante de submissão

In vitro enhancement of the antibiotic activity by fractions of leaves of *Croton campestris* (Euphorbiaceae).

06/11/13 Gmail - JONM: A manuscript number has been assigned to In vitro Enhancement of the antibiotic activity by fractions from leaves of Croton campestris ...



Henrique Douglas Coutinho <hdmcoutinho@gmail.com>

JONM: A manuscript number has been assigned to In vitro Enhancement of the antibiotic activity by fractions from leaves of Croton campestris A. (Euphorbiaceae)

Journal of Natural Medicines (JONM) <arun.sundar@springer.com>

31 de outubro de 2013 12:36

Para: Henrique Coutinho <hdmcoutinho@gmail.com>

Dear Dr. Coutinho,

Your submission entitled "In vitro Enhancement of the antibiotic activity by fractions from leaves of Croton campestris A. (Euphorbiaceae)" has been assigned the following manuscript number: JONM-D-13-00491.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author. The URL is <http://jonm.edmgr.com/>.

Thank you for submitting your work to this journal.

With kind regards,
Arun Sundar
Springer Journals Editorial Office
Journal of Natural Medicines

ANEXO 2 – Comprovante de publicação

Efeito antifúngico e atividade moduladora de *Lygodium venustum* SW.EFEITO ANTIFÚNGICO E ATIVIDADE MODULADORA DE *LYGODIUM VENUSTUM*

SW.

ANTIFUNGAL EFFECT AND MODULATORY ACTIVITY OF *LYGODIUM VENUSTUM*

Submetido em: 20/08/2013.

Aprovado em: 15/11/2013.

MORAIS-BRAGA¹, Maria Flaviana Bezerra; SALES², Débora Lima; CARNEIRO³, Joara Nályda Pereira; OLIVEIRA⁴, Olga Paiva; ALBUQUERQUE⁵, Rosimeire Sabino; BRITO⁶, Dara Isabel Vieira de; FIGUEREDO⁷, Fernando Gomes; LEITE⁸, Nadghia Figueiredo; TINTINO⁹, Saulo Relison; COUTINHO¹⁰, Henrique Douglas Melo.

¹ Professora Mestra da Universidade Regional do Cariri, Departamento de Ciências Biológicas, URCA. Crato – CE, Brasil. Doutoranda em Etnobiologia e Conservação da Natureza, UFRPE/URCA/UEPB. E-mail: flavianamoraisb@yahoo.com.br

² Mestra em Bioprospeção Molecular, Departamento de Química Biológica, URCA. Crato – CE, Brasil. Doutoranda em Etnobiologia e Conservação da Natureza, UFRPE/URCA/UEPB. E-mail: debora.lima.sales@gmail.com

³ Graduanda em Ciências Biológicas Licenciatura, Departamento de Ciências Biológicas, URCA. Crato – CE, Brasil. E-mail: nalyda_05@hotmail.com

⁴ Mestra em Bioprospeção Molecular, Departamento de Química Biológica, URCA. Crato – CE, Brasil. E-mail: olgapaiva8@gmail.com

⁵ Graduanda em Ciências Biológicas Licenciatura, Departamento de Ciências Biológicas, URCA. Crato – CE, Brasil. E-mail: rosi_sabino87@hotmail.com

⁶ Mestranda em Bioprospeção Molecular, Departamento de Química Biológica, URCA. Crato – CE, Brasil. E-mail: daraisabelvb@hotmail.com

⁷ Mestrando em Bioprospeção Molecular, Departamento de Química Biológica, URCA. Crato – CE, Brasil. E-mail: fgfigueredo@gmail.com

⁸ Mestranda em Bioprospeção Molecular, Departamento de Química Biológica, URCA. Crato – CE, Brasil. E-mail: nadghia.fl@gmail.com

⁹ Graduando em Ciências Biológicas Bacharelado, Departamento de Ciências Biológicas, URCA. Crato – CE, Brasil. E-mail: saulorelison@gmail.com

¹⁰ Professor Doutor da Universidade Regional do Cariri, Departamento de Química Biológica, URCA. Crato-CE, Brasil. E-mail: hdmcoutinho@gmail.com

Resumo: Objetivo: Avaliar o potencial antifúngico e modulador de fármacos comerciais do extrato etanólico da samambaia *Lygodium venustum* SW. contra diferentes

ANEXO 7 – Boletim analítico de timol cristalizado

Boletim analítico de timol cristalizado

Labsynth Empresa Certificada ISO 9001 14001

DEPARTAMENTO DE CONTROLE DE QUALIDADE		FAB.: 03/04/2012
BOLETIM ANALÍTICO		VAL.: 03/04/2015
PRODUTO: TIMOL P.A.		
LOTE	FORMULA: C ₁₀ H ₁₄ O	P.M.: 150,22
Embalagem: 153682		

TESTES	LIMITES	RESULTADOS
01 CARACTERÍSTICAS	Cristal vítreo, branco	De acordo
02 PONTO DE FUSÃO	48 – 51°C	50,5°C
03 RESÍDUO NÃO VOLÁTIL	máx. 0,05%	0,004%
04 TEOR	99,0 – 101,0%	100,15%

Synth

DATA EMISSÃO	ANALISTA	RESPONSÁVEL	RESULTADO
04/04/2012	Giovana	Izilda Morelli	APROVADO

CERTIFICADO EMITIDO VIA SISTEMA INTEGRADO COM APROVAÇÃO ELETRÔNICA

Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda.

Dr. Dr. Ulysses Guimarães, 3857- Vila Mary - Diadema - SP - CEP 09990-080 - Tel.: (11) 4072-6100 - Fax: (11) 4072-6122 - C.N.P.J.-51.462.471/0001-52 - I.E.286.056.465
 www.labsynth.com.br E-mail: synth@synth.com.br