



Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

**Prospecção Tecnológica de Óleos Essenciais de *Schinus terebinthifolius*
e Desenvolvimento de um Creme Vaginal à base de *Ocimum basilicum*
para Tratamento de Candidíase**

Mônica Batista de Almeida

São Cristóvão – SE

2013



Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

**Prospecção Tecnológica de Óleos Essenciais de *Schinus terebinthifolius*
e Desenvolvimento de um Creme Vaginal à base de *Ocimum basilicum*
para Tratamento de Candidíase**

Mônica Batista de Almeida

São Cristóvão – SE

2013

Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Universidade Federal de Sergipe

MÔNICA BATISTA DE ALMEIDA

**Prospecção Tecnológica de Óleos Essenciais de *Schinus terebinthifolius*
e Desenvolvimento de um Creme Vaginal à base de *Ocimum basilicum*
para Tratamento de Candidíase**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Biotecnologia, Rede Nordeste de Biotecnologia
RENORBIO - Universidade Federal de Sergipe, em
Cumprimento às Exigências da defesa de Tese de
Doutorado em Biotecnologia.

Orientador: Prof^o. Dr^o. Edilson Divino Araújo

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rita de Cássia Trindade

São Cristóvão – SE

2013

Mônica Batista de Almeida

Prospecção Tecnológica de óleos essenciais de *Schinus terebinthifolius* e desenvolvimento de um creme vaginal à base de *Ocimum basilicum* para tratamento de candidíase

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Rede Nordeste de Biotecnologia RENORBIO - Universidade Federal de Sergipe, em Cumprimento às Exigências da defesa de Tese de Doutorado em Biotecnologia.

Aprovada em: __/__/__

Orientador: Profº. Drº. Edilson Divino Araújo
Universidade Federal de Sergipe (UFS)

1º Examinador: Profº Dr. Roberto Rodrigues de Souza
Universidade Federal de Sergipe (UFS)

2º Examinador: Profº. Drª. Jane de Jesus da Silveira Moreira
Universidade Federal de Sergipe (UFS)

3º Examinador: Profº. Dr. Charles dos Santos Estevam
Universidade Federal de Sergipe (UFS)

4º Examinador: Profº. Dr Arie Fitzgerald Blank.
Universidade Federal de Sergipe (UFS)

**Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas...
Que já têm a forma do nosso corpo...
E esquecer os nossos caminhos que nos levam sempre aos
mesmos lugares...**

**É o tempo da travessia...
E se não ousarmos fazê-la...
Teremos ficado... para sempre...
À margem de nós mesmos...**

Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

A Deus toda a honra deste esforço, porque sem Ele nada seria feito.

A minha mãe, Edenice Batista de Almeida, por ter me ensinado sobre caráter, força, amor e dedicação, pelo esforço de toda uma vida para me fazer chegar.
até aqui.

Ao meu pai, exemplo de dignidade e trabalho.

A minha irmã Denise, que mesmo distante torce e acredita!

Ao meu orientador Edilson Divino de Araújo por ter acreditado que podíamos conseguir.

A minha Co-orientadora Rita de Cássia Trindade, sempre amiga e companheira.

A Daniela Travassos, estagiária dedicada, parceira, braço direito e amiga, meu apreço.

A Jéssica Oliveira, estagiária, obrigada pelos esforços.

Ao meu amor Mário Vidal, por estar sempre ao meu lado, por me fazer aprender o exercício da paciência e tolerância, por me ajudar a ser uma pessoa melhor.

A minha amiga Brenna por ter acompanhado o meu empenho e dedicação, me ajudando nos momentos difíceis com toda paciência, meu carinho!

Aos meus queridos amigos que sempre torceram por mim, agradeço a paciência, dedicação e me desculpo pela minha ausência em muitos momentos.

A Tatiana Arruda, minha amiga, por ter me proporcionado o tempo que precisava para o término desta tese, obrigada!

A minha amiga Elisângela Mércia, amiga querida que com sua humildade e paciência me ajudou nos mais difíceis momentos, valeu Eli!

A professora Jane Moreira por ter contribuído em muitos momentos de dúvidas.

Ao professor Arie Blank, que me deixou utilizar muitas vezes o seu laboratório para meus experimentos.

A todos que confiaram em mim, torceram e acreditaram, o meu carinho imenso!

SUMÁRIO

RESUMO.....	II
ABSTRACT.....	III
LISTA DE TABELAS.....	IV
LISTA DE FIGURAS.....	V
LISTA DE QUADROS.....	VI
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	VII
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	5
CAPÍTULO I - FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	6
1.1. Plantas Medicinais.....	6
1.2. <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi.....	8
1.3. <i>Ocimum basilicum</i> L. (cultivar Maria-Bonita).....	11
1.4. Óleos Essenciais.....	14
1.5. Gênero <i>Candida</i>	17
1.6. Doenças causadas por <i>Candida</i> spp. – Candidíase vaginal.....	20
1.7. Resposta da <i>Candida</i> spp aos antifúngicos utilizados no tratamento da candidíase vaginal.....	22
1.8. Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: a busca por compostos com atividade anti- <i>Candida</i>	24

CAPÍTULO II - *Schinus terebinthifolius* Raddi - Avaliação da Ação Antifúngica do Óleo Essencial de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira) sobre Cepas do Gênero *Candida* spp.....27

CAPÍTULO III- *Ocimum basilicum* L. (cultivar Maria-Bonita) - desenvolvimento de um creme vaginal para tratamento de candidíase.....49

RESUMO

A candidíase vaginal é uma doença com alta prevalência em mulheres na idade adulta. Este trabalho teve como objetivos: (I) avaliar a atividade anti*Candida* do óleo essencial (OE) de *S. terebinthifolius* frente a linhagens de casos de candidíase vaginal recorrente; (II) produzir um creme vaginal anti*Candida* a partir do OE do *O. basilicum* e avaliar o processo tecnológico e a atividade anti*Candida* deste creme *in vitro*. Os compostos majoritários do OE das folhas e frutos secos de *S. terebinthifolius*, foram respectivamente, o (+) - Camphene (20,1%) e o R- α -pinene (22,1%). Em se tratando das concentrações inibitórias mínimas (CIM) e fungicidas mínimas, o OE do fruto de *S. terebinthifolius* apresentou faixas entre 25 – 200 mg/ml, demonstrando atividade contra *C. parapsilosis* (ATCC 22019) e sua linhagem clínica, *C. albicans* (ATCC 18804) e *C. glabrata* (ATCC 2001), não sendo ativo aos isolados clínicos destas. Em relação ao OE das folhas, nenhuma ação significativa foi observada. O OE dos frutos secos apresentou ação fungistática, porém, não houve ação fungicida de ambos os OE, em contrapartida, as folhas e frutos frescos apresentaram atividade anti*Candida*, salvo, a linhagem padrão de *C. glabrata* pelo óleo essencial dos frutos frescos. O composto majoritário do OE de *O. basilicum* (Maria-Bonita) foi o linalol (72,08%). Os valores das CIM deste OE variaram entre 0,78 a 1,56 mg/ml. Diante de sua ação fungicida, foi produzido um creme vaginal. As amostras deste foram armazenadas em condições distintas: temperatura controlada, refrigerador e estufa. Em temperatura controlada e refrigerador, não houve modificações na fórmula, entretanto, as amostras à 45° C, apresentaram modificações leves na textura a partir do 15° dia. Pode-se concluir que os OE de folhas e frutos secos da *S. terebinthifolius* Raddi não apresentam atividade anti*Candida*, porém, os OE extraídos do material botânico fresco demonstram tal atividade. O *O. basilicum* apresenta ação anti*Candida*. Os testes de atividade antimicrobiana do creme vaginal em suas concentrações distintas demonstraram resultados satisfatórios em comparação a um antifúngico sintético. **Palavras-Chave:** Candidíase vaginal, óleos essenciais, *Candida* spp., *Schinus terebinthifolius* Raddi, *Ocimum basilicum*, creme vaginal, anti-*Candida*.

ABSTRACT

Vaginal candidiasis is a disease with high prevalence in adult women. This study aimed to : (i) assess the anti*Candida* activity of essential oil (EO) of *S. terebinthifolius* front lines of cases of recurrent vaginal candidiasis ; (II) produce a anti*Candida* vaginal cream from OE *O. basilicum* and evaluate the technological process and this cream anti*Candida* activity in vitro . The major compounds of OE leaves and dried fruits of *S. Terebinthifolius* were, respectively, the (+) - camphene (20.1%) and R- α - pinene (22.1%). In terms of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal , OE Fruit *S. terebinthifolius* showed bands between 25-200 mg / ml , demonstrating activity against *C. parapsilosis* (ATCC 22019) and a clinical strain , *C. albicans* (ATCC 18804) and *C. glabrata* (ATCC 2001) , not being active on these clinical isolates. Regarding OE leaves, no significant action was observed. The OE dried fruit showed fungistatic , however , no fungicide both OE action, in contrast, leaves and fresh fruits showed anti*Candida* activity, unless the standard strain of *C. glabrata* the essential oil from fresh fruits . The major compound of OE *O. basilicum* (Maria - Bonita) was linalol (72.08%). MIC values ranged between this SO 0.78 to 1.56 mg / ml. Before its antifungal action, was produced a vaginal cream. The samples were stored in these distinct conditions: controlled, refrigerator and oven temperature. In controlled and cooler temperatures, no changes in the formula, however, samples at 45 ° C showed slight changes in texture from the 15th day. It can be concluded that the EO of dried leaves and fruits of *S.terebinthifolius* Raddi not have anti*Candida* activity, however, the EO extracted from fresh material Botanical demonstrate such activity . The *O. basilicum* presents anti*Candida* action. Tests for antimicrobial activity of vaginal cream in its various concentrations showed satisfactory results compared to a synthetic antifungal.**Keywords:** Vaginal candidiasis, essential oils, *Candida* spp., *Schinus terebinthifolius* Raddi, *Ocimum basilicum*, vaginal cream, anti-*candida*.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Teores (%) dos compostos identificados dos óleos essenciais dos frutos maduros de *Schinus terebinthifolius* Raddi.....36
- Tabela 2.** Teores (%) dos compostos identificados dos óleos essenciais das folhas secas de *Schinus terebinthifolius* Raddi.....37
- Tabela 3.** Valores de CIM e CFM (0,39 a 400 mg/mL) dos óleos essenciais de *Schinus terebinthifolius* Raddi.....42
- Tabela 4.** Diâmetros dos halos de inibição (mm) dos óleos essenciais de folhas e frutos de *S.terebinthifolius* frente às cepas de *Candida* estudadas.....45
- Tabela 5.** Constituintes químicos do óleo essencial das folhas secas de *Ocimum basilicum* obtido por hidrodestilação.....53
- Tabela 6.** Resultados dos testes de estabilidade organolépticos e físico-químicos (cor, odor, aparência - temperatura) das amostras de creme vaginal analisadas durante o período de 60 dias.....61
- Tabela 7.** Diâmetro dos halos de inibição (mm) do creme vaginal de *Ocimum basilicum* frente às cepas de *Candida* estudadas.....62
- Tabela 8.** Planilha de escopo de busca de anterioridade.....65

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Exemplos de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Folhas e frutos).....32
- Figura 2.** Perfil cromatográfico do óleo essencial das folhas secas de *Schinus terebinthifolius* Raddi.....39
- Figura 3.** Perfil cromatográfico do óleo essencial dos frutos maduros secos de *Schinus terebinthifolius* Raddi.....40
- Figura 4.** Teste de microdiluição para determinação de CIM e CFM.....42
- Figura 5.** Teste de difusão em meio sólido das folhas e frutos frescos da *S.terebinthifolius*.....44
- Figura 6.** Exemplos de *Ocimum basilicum* (Maria-Bonita) cultivadas no campo rural da Universidade Federal de Sergipe, município de São Cristóvão, Sergipe, Brasil.....51
- Figura 7.** Determinação da Atividade Antifúngica *in vitro* - Técnica do poço.....59
- Figura 8.** Amostras do creme vaginal com concentrações de 0,5%, 1%, 2,5% e amostra controle.....60
- Figura 9.** Halos de inibição (mm) do creme vaginal de *Ocimum basilicum* frente às cepas de *Candida* estudadas.....63

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Avaliação das características organolépticas do creme vaginal de <i>Ocimum basilicum</i> , L.....	57
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ASD – Ágar Sabouraud Dextrose

ATCC – American Type Culture Collection

BHT - Butilhidroxitolueno

CG – Cromatografia Gasosa

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CFM – Concentração Fungicida Mínima

CV – Candidíase Vaginal

CVV – Candidíase Vulvovaginal

CVVR – Candidíase Vulvovaginal Recorrente

DIC – Detector de ionização de Chamas

DIU – Dispositivo Intrauterino

DMAPP – Difosfato de Dimetilalila

DMSO – Dimetilsulfóxido

EDTA – Ácido Etilenodiaminatetracético

EM – Espectrometria de Massa

INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

IPP – Difosfato de Isopentenila

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MOPS –Ácido Morfolinepropanosulfônico

ÓE – Óleo Essencial

OF – Óleo Essencial das Folhas secas

OFM – Óleo Essencial dos Frutos Maduros

OMS – Organização Mundial de Saúde

RNC – Registro Nacional de Cultivares

UFC – Unidades Formadoras de Colônias

VB – Vaginose Bacteriana

1. INTRODUÇÃO

Os produtos naturais são utilizados pela humanidade, desde tempos imemoriais, como importantes ferramentas nos procedimentos das terapias naturais, objetivando a busca por alívio e cura de doenças através do uso de ervas e consistindo, possivelmente, uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais. O conhecimento sobre plantas medicinais simboliza muitas vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos, sendo as plantas importantes fontes de produtos naturais biologicamente ativos (MUKHERJEE et al., 2010).

O uso de plantas na medicina popular guarda uma estreita relação com os efeitos produzidos que são comprovados pela recuperação dos pacientes que usam esses medicamentos (JÚNIOR e PINTO, 2005).

Têm-se buscado no Brasil e no mundo inovações cosméticas e farmacêuticas que demonstram a necessidade de mais pesquisas em relação ao uso de diferentes matérias-primas de origem vegetal (MUKHERJEE et al., 2010).

No Brasil e no mundo, têm sido desenvolvidas inovações cosméticas e farmacêuticas que demonstram a necessidade de mais pesquisas em relação ao uso de diferentes matérias-primas de origem vegetal (JÚNIOR e PINTO, 2005).

Dentre os gêneros de plantas estudados na medicina popular, encontra-se o *Ocimum*, cujas espécies são largamente usadas na medicina tradicional iraniana. O manjeriço, *Ocimum basilicum* L., pertencente à família Lamiaceae, é uma planta anual originária do Sudoeste asiático e da África Central, utilizada como planta medicinal, aromática, constituída por substâncias de interesse para as indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética (VIEIRA, 2009).

Na medicina popular, as espécies de manjeriço são indicadas como estimulante digestivo, antiespasmódico, gástrico, galactogogo, béquico, carminativo (SAJJADI, 2006). Vários estudos têm demonstrado seu grande potencial antimicrobiano e antioxidante (POLITEO et al., 2007).

A qualidade da planta de manjeriço é definida pela composição de seu óleo essencial (CARVALHO FILHO et al., 2006). Esta planta está incluída em

um importante grupo de plantas aromáticas que produzem óleo essencial rico em constituintes como: ácidos fenólicos, linalol, geraniol, citral, alcanfor, eugenol, timol, 1,8-cineol, acetato de nerila, e outros compostos (BOZIN et al., 2006).

A atividade antimicrobiana do óleo essencial do manjeriço tem sido relatada como sendo predominantemente associada aos seus constituintes majoritários, o metil chavicol e o linalol. Estes compostos, por sua vez, apresentam as mais variadas atividades farmacológicas, tais como: bactericida, fungicida, antiparasitária e, até mesmo, como repelente de insetos (BOZIN et al., 2006).

Outro gênero de plantas bastante estudado por seu uso popular e pelo seu efeito antimicrobiano é o *Schinus*. A *Schinus terebinthifolius* Raddi, conhecida popularmente como aroeira vermelha, aroeira da praia e pimenta rosa pertence à família Anacardiaceae. O médico Alfredo da Matta cita o uso do decocto e da resina da casca desta planta como antifebril e antireumático, respectivamente e Chernoviz descreve o uso do decocto da casca em banho contra o edema nas pernas e cita o emprego da resina das folhas desta e de outras espécies do gênero em emplastro para o reumatismo, ou sobre úlceras (GILBERT e FAVORETO, 2011).

No Brasil, é encontrada desde o Estado de Pernambuco até o Rio Grande do Sul. A *Schinus terebinthifolius* Raddi possui importância comercial por se tratar de uma planta com propriedades medicinais, fitoquímicas e alimentícias, pelo uso de seus frutos na cozinha nacional e internacional (GUERRA et al., 2000, LENZ & ORTH, 2004). A aroeira (*Schinus terebinthifolius*) é uma planta medicinal de uso amplamente difundido no Nordeste brasileiro para tratamento de diversas infecções. Várias substâncias presentes no extrato desta planta apresentam ação antimicrobiana e antiinflamatória, tendo sido demonstrada, *in vitro*, atividade contra diversas espécies de bactérias e fungos (MARTORELLI et al., 2011).

A literatura apresenta estudo das propriedades medicinais da aroeira, dentre as quais se destaca a ação cicatrizante (LUCENA et al., 2006). Popularmente, também é empregada no tratamento da diarreia e inflamações, para promover a transpiração e a eliminação de líquidos.

Os principais responsáveis por essas ações terapêuticas são os óleos essenciais, compostos formados por várias funções orgânicas combinadas em

diferentes prevalências. Os óleos essenciais constituem os elementos voláteis contidos em muitos órgãos vegetais, e, estão relacionados com diversas funções necessárias à sobrevivência vegetal, exercendo papel fundamental na defesa contra microrganismos (SIQUI et al., 2000). Ainda, tem sido estabelecido cientificamente que cerca de 60% dos óleos essenciais possuem propriedades antifúngicas e 35% exibem propriedades antibacterianas (LIMA et al, 2006). Dentre as várias classes de compostos isolados de plantas com propriedades antimicrobianas, os óleos essenciais são reconhecidos por apresentarem atividade contra um grande número de microrganismos, incluindo espécies resistentes a antibióticos e antifúngicos (BERTINI et al., 2005).

Devido à sua composição complexa, os óleos essenciais demonstram uma variedade de ações farmacológicas, tornando-os potenciais fontes para o desenvolvimento de novas drogas (AMARAL, 2004).

A pesquisa de novos agentes antifúngicos se faz necessária devido à grande incidência das infecções fúngicas resistentes às principais drogas clinicamente utilizadas. Esse fato é agravado pelo limitado arsenal antifúngico disponível, associado aos efeitos colaterais e alto preço dessas drogas (GALE e GIANINNI, 2004; FERRAZA et al. 2005; ALVES et al., 2010).

A resistência aos antifúngicos tem representado um grande desafio para a clínica, frente às dificuldades observadas no tratamento da candidíase. Este aumento pode ser decorrente do uso de terapias seletivas com doses inadequadas ou devido ao uso crescente de fármacos na profilaxia de infecções fúngicas, possibilitando a seleção da resistência clínica. Nas mulheres a candidíase vaginal afeta uma elevada proporção em idade adulta, estima-se que aproximadamente 75% destas, apresentem pelo menos um episódio de vulvovaginite fúngica em sua vida, onde 40 a 50% vivenciam novos surtos e 5% tornam-se recorrentes. A espécie isolada mais freqüente de secreções vaginais continua sendo *Candida albicans*, entretanto, outras espécies também estão envolvidas neste tipo de infecção (GALE et al., 2004; FERRAZA et al. 2005; ALVES et al., 2010).

Estudos bioprospectivos de novos agentes farmacológicos são de extrema importância, principalmente em países como o Brasil, que oferecem uma imensa biodiversidade. Desta forma, o estudo da atividade antifúngica dos óleos essenciais de espécies como *Ocimum basilicum* e *Schinus*

terebinthifolius, pode contribuir significativamente na busca por substâncias mais eficazes e menos tóxicas com atividade contra fungos. Assim, em um contexto de investigação analítica experimental, este estudo tem como objetivo principal corroborar com a atividade *antiCandida in vitro* do óleo essencial de *Ocimum basilicum*, no qual já apresenta resultados obtidos com relação às cepas de *Candida* para produzir um creme vaginal à base deste, fazendo testes de estabilidade do mesmo e avaliar sua eficácia em sua ação *antiCandida*, além de verificar a atividade *antiCandida in vitro* do óleo essencial obtido da *Schinus terebinthifolius* Raddi.

O interesse dessa pesquisa é produzir um creme vaginal com propriedades terapêuticas produzido com matéria prima vegetal em abundância na nossa região, com a probabilidade do mesmo apresentar menos efeitos colaterais e menor nível de resistência aos microrganismos que os cremes comerciais habitualmente usados.

Além da importância científica, este estudo poderá contribuir para um maior aprofundamento na compreensão e interpretação dos procedimentos da medicina popular, de forma a promover avanços na área da etnobotânica, farmacologia, microbiologia, fitoterapia, ginecologia e saúde pública. No âmbito social, os resultados deste estudo poderão ser de grande relevância para a melhoria da qualidade de saúde da população, possibilitando uma nova alternativa para o tratamento da Candidíase e em especial as *Candidas* que causam vaginites.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a atividade anti*Candida in vitro* do óleo essencial de *Schinus terebinthifolius* e aplicar a atividade anti*Candida* de *Ocimum basilicum* para desenvolvimento de um creme vaginal anti*Candida*.

2.2. Objetivos Específicos

2.2.1. Identificar os constituintes químicos presentes no óleo essencial de *Schinus terebinthifolius*;

2.2.2. Determinar a Concentração Inibitória Mínima – CIM do óleo essencial de *Schinus terebinthifolius*, frente a linhagens padrão e clínicas de *Candida*;

2.2.3. Determinar a Concentração Fungicida Mínima – CFM do óleo essencial de *Schinus terebinthifolius*;

2.2.4. Avaliar a atividade anti*Candida* do óleo essencial de *Schinus terebinthifolius* frente a linhagens envolvidas em casos de candidíase vaginal recorrente;

2.2.5. Produzir um creme vaginal anti*Candida* a partir do óleo essencial extraído de *O. basilicum* cultivar Maria Bonita;

2.2.6. Desenvolver o processo tecnológico para produção de um creme vaginal anti*Candida*, avaliando as características de estabilidade (temperatura controlada (20° C - 25° C), geladeira (5° C) com temperatura controlada e estufa (45° C) com temperatura controlada) e características organolépticas do mesmo.

2.2.7. Avaliar a atividade anti*Candida* do creme vaginal produzido a partir do óleo essencial de *Ocimum basilicum in vitro*.

CAPÍTULO I

Fundamentação Teórica

1.1. Plantas Medicinais

As primeiras descrições sobre plantas medicinais feitas pelo homem retomam as escrituras e ao Papiro de Ébers. Este papiro foi descoberto e publicado por Georg Ebers, sendo traduzido pela primeira vez, em 1890, por H. Joachin. Esse material foi encontrado nas proximidades da casa mortuária de Ramsés II, porém pertence à época da XVIII Dinastia, no Egito, e relata aproximadamente 100 doenças e um grande número de drogas da natureza animal, vegetal ou mineral (ARGENTA et al., 2011; VILELA, 1977). Há evidências arqueológicas que mostram que o uso de drogas vegetais era amplo em culturas antigas (ARGENTA et al., 2011).

Os trabalhos relacionados à atividade antimicrobiana de plantas tiveram início na década de 40. Em 1943, Osborn, pesquisando a atividade de 2.300 plantas superiores, *in vitro*, contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, verificou que 63 gêneros continham substâncias que inibiram o crescimento de um ou de ambos os microrganismos (SARTORI, 2005).

No Brasil, as pesquisas sobre substâncias antimicrobianas de origem vegetal tiveram início com Cardoso e Santos (1948), os quais avaliaram extratos de 100 diferentes espécies vegetais, indicadas na terapêutica popular como antiinflamatórias ou cicatrizantes. Destas, apenas cinco extratos apresentaram atividade inibitória contra *S. aureus*, *E. coli* e *Proteus X-19*. A partir de 1950, foram isolados os primeiros compostos de espécies vegetais: o diterpeno biflorinina e o triterpeno maitenina. Posteriormente, compostos flavonóides com propriedades antimicrobianas efetivas contra *S. aureus* resistentes a meticilina foram isolados, tais como a primina, a mocinidina, lapachol e derivados, a plumbagina, a xantoxilina, a filantimida, a leteolina e a mirecetina (SARTORI, 2005). Porém, a primeira descrição sobre o uso de plantas como remédio foi feita por Gabriel Soares de Souza, autor do Tratado

Descritivo do Brasil, de 1587. Esse tratado descrevia os produtos medicinais utilizados pelos índios de “as árvores e ervas da virtude”. Com vinda dos primeiros médicos portugueses ao Brasil, diante da escassez, na colônia, de remédios empregados na Europa, perceberam a importância das plantas utilizadas pelos indígenas como medicamento. (ARGENTA et al, 2011, VEIGA, 2002).

Uma vez que as plantas medicinais são classificadas como produtos naturais, a lei permite que sejam comercializadas livremente, além de poderem ser cultivadas por aqueles que disponham de condições mínimas necessárias. Com isto, é facilitada a automedicação orientada nos casos considerados mais simples e corriqueiros de uma comunidade, o que reduz a procura pelos profissionais de saúde, facilitando e reduzindo ainda mais o custo do serviço de saúde pública (LÓPEZ, 2006; LORENZI & MATOS, 2002).

A procura por drogas vegetais como recurso terapêutico tem aumentado. Entre os fatores que motivam esse aumento estão a insatisfação com os resultados obtidos em tratamentos com a medicina convencional, os efeitos indesejáveis e prejuízos causados pelo uso abusivo e/ou incorreto dos medicamentos sintéticos, a falta de acesso aos medicamentos e à medicina institucionalizada, a consciência ecológica e a crença popular de que o natural é inofensivo (HEINZMANN & BARROS, 2007).

A fitoterapia é considerada uma alternativa ao uso de medicamentos sintéticos, geralmente considerados mais caros e agressivos ao organismo. Porém, é importante ressaltar que, quando não utilizadas corretamente, incluindo dosagem, forma e via de administração, intervalos entre as doses, podem oferecer riscos à saúde. Os fitoterápicos também podem desencadear reações alérgicas, efeitos tóxicos, mutagênicos e interações medicamentosas (TONIAL, 2010).

O uso de plantas medicinais pela população mundial tem sido significativo nos últimos tempos. Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) divulgou no início da década de 90 que 60% a 80% da população dos países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados da saúde (VEIGA et al., 2005).

Aproximadamente 25% dos fármacos lançados no mercado são provenientes de fitoterápicos (YBARRA et al., 2005). O Brasil é o país com a maior diversidade genética vegetal do mundo, contando com mais de 55.000

espécies catalogadas de um total estimado entre 350.000 e 550.000. Em contrapartida, apenas 8% das espécies vegetais da flora brasileira foram estudadas em busca de compostos bioativos e 1.100 espécies vegetais foram avaliadas em suas propriedades medicinais (PONZI et al., 2010).

O crescente interesse da comunidade científica pela fitoterapia nas duas últimas décadas levou ao desenvolvimento de várias pesquisas baseadas em práticas populares.

A exploração dos recursos vegetais pode levar a identificação de metabólitos secundários valiosos que podem servir como drogas ou conduzir ao desenvolvimento de novas substâncias terapêuticas (GOBBO-NETO & LOPES, 2007). O metabolismo das plantas é composto por um conjunto de reações químicas que estão ocorrendo continuamente nas células (MORAIS & BRAZ-FILHO, 2007). Dentre os metabólitos secundários, vários compostos têm mostrado ação antifúngica, tais como os alcalóides esteroidais cuja atividade está relacionada com a capacidade de desestabilizar membranas biológicas (CASTILHOS et al., 2007).

Outras classes de compostos tais como as quinonas, têm apresentado atividade antifúngica. O timol (2-isopropil-5-metil fenol) e seu isômero de posição, carvacrol (5-isopropil-2-metil fenol) possuem ação antibacteriana e antifúngica maiores que o fenol, e ao mesmotempo, menor toxicidade que esse composto. Os taninos, presentes na pitangueira, por exemplo, possuem ação bactericida e fungicida (VIEIRA, 2009).

1.2. *Schinus terebinthifolius* Raddi

A *Schinus terebinthifolius* é uma árvore de pequeno a médio porte, pertencente à família Anacardiaceae que possui 70 gêneros e cerca de 600 espécies conhecidas por serem frutíferas e apresentarem madeira de boa qualidade (PIO CORRÊA, M., 1984). O gênero é chamado de *Schinus*, nome grego para a árvore Mastic (*Pistacia lentiscus*), a qual se assemelha (SALVI JÚNIOR, 2009). Classifica-se no Reino: Plantae, Divisão: Anthophyta, Classe: Magnoliopsida, Ordem: Sapindales.

Apresenta propriedades adstringentes, antisséptica e antiinflamatória na medicina popular e usos em preparações cosméticas (BIAVATTI et al., 2007; AGRA et al., 2007, 2008).

É uma planta originária da América do Sul, especialmente do sul do Brasil, do Paraguai e da Argentina, porém é comum da vegetação litorânea do nordeste brasileiro desde o Rio Grande do Norte até Sergipe (LUCENA et al., 2006). É encontrada em algumas partes da América Central e algumas regiões da Europa, África, Ásia e, nos Estados Unidos, ocorre no Havaí, nos Estados da Califórnia, do Arizona e da Flórida onde foi introduzida para fins ornamentais (RIBAS et al., 2006; SALVI JÚNIOR, 2009). No Brasil, também ocorre espontaneamente na costa litorânea, em áreas remanescentes da Mata Atlântica, e em outros tipos de formações vegetais, devido à sua grande plasticidade ecológica, popularmente é conhecida como aroeira-da-praia, mas, possui outros nomes comuns como: aroeira-vermelha, aroeira-mansa, aroeira-branca, aroeira-do-paraná, araguaraiaba, corneiba, fruto-de-sabiá, árvore-da-pimenta, aroeira-brasileira, aroeira-negra, aroeira-do-brejo, aroeira-do-iguapé, aroeira-do-campo, aroeira-pimenteira, aroeira-precoce, aguará-yba, aguaraiába, bálsamo, cabuí, cambuí, e pimenta-rosa. (FREIRE et al., 2011; SALVI JÚNIOR, 2009). A aroeira também é designada pelas suas sinonímias botânicas: *Schinus mucronulata*, *Schinus weinmanniifolius*, *Schinus riedeliana*, *Schinus selloana*, *Schinus damaziana*, *Schinus raddiana*. As denominações internacionais utilizadas são: Brazilian pepper, Brazilian holly, Brazilian pepper tree, Christmas berry e Florida holly (EUA), Mexican pepper, pimienta de Brasil (Porto Rico), faux poivrier e poivre rose (França), Rosapfeffer (Alemanha), warui (Ilhas Fiji) (SALVI JÚNIOR, 2009).

Um levantamento bibliográfico etnobotânico sobre plantas utilizadas para infecções fúngicas na medicina popular destaca o uso de *S. terebinthifolius* Raddi dentre 409 espécies de plantas (FENNER et al., 2006).

A *Schinus terebinthifolius* Raddi possui importância comercial por se tratar de uma planta com propriedades medicinais, fitoquímicas e alimentícias, pelo consumo de seus frutos na cozinha nacional e internacional (NICOLLINI et al, 2009). Assim, o fruto da aroeira vermelha destaca-se entre as muitas especiarias existentes, sendo utilizado como condimento (em função de seu sabor suave e levemente picante) e de forma decorativa (devido a seu aspecto pequeno e de cor vermelha bem forte e brilhante). Deste modo, vem sendo utilizado de forma crescente na culinária mundial. Foi introduzida na cozinha européia, com o nome de “poivre rose” (pimenta-rosa), acrescentando um sabor tropical à culinária (NICOLLINI et al., 2009).

A literatura apresenta estudo das propriedades medicinais da *Schinus*, dentre as quais se destaca a ação cicatrizante (LUCENA et al., 2006). As partes utilizadas que apresentam propriedades medicinais são: casca, folhas e frutos. É considerada pela medicina popular como adstringente, antidiarréica, antiinflamatória, depurativa, diurética e febrífuga. Não é utilizada como componente para cosmetologia. Devido à composição de seus óleos essenciais, é usada no tratamento de distúrbios respiratórios, ainda tem sido usado tratamento de úlceras, feridas, reumatismo, gota, doenças de pele e artrite, bem como antisséptico e anti-inflamatório (SANTANA et al., 2012). Popularmente também é empregada no tratamento da diarreia, inflamações, para promover a transpiração e a eliminação de líquidos. A casca da aroeira tem ação contra febre, hemoptises e afecções uterinas, em geral (BORNHAUSEN, 2011).

A partir do início da década de 1980, o interesse em encontrar agentes antimicrobianos naturais para o emprego em produtos alimentícios ou para uso farmacêutico aumentou consideravelmente, com o intuito de promover ação sinérgica com conservantes químicos, os quais têm sido restringidos devido ao seu potencial de carcinogênese (RAUHA et al., 2000).

Tem sido comprovada cientificamente ação antimicrobiana (SIDDIQUI et al., 1995; GUERRA et al., 2000) e antioxidante da *Schinus terebinthifolius* Raddi (VELÁZQUEZ et al., 2003). Além destas aplicações, esta espécie produz, entre outros compostos, flavonóides, taninos e óleos essenciais (SANTOS et al., 2010).

De todos os metabólitos secundários sintetizados pelos vegetais, os alcalóides e os óleos essenciais formam o grupo de compostos com maior número de substâncias biologicamente ativas (SANTOS et al., 2010).

O perfil fitoquímico, obtido a partir de extrato oriundo das cascas do caule de *Schinus terebinthifolius*, demonstrou uma predominância de compostos polifenólicos e terpenóides, as quais são atribuídas muitas das propriedades medicinais de várias espécies vegetais. Dentre os polifenóis, confirmou-se a existência de forte concentração de taninos catéquicos, algumas vezes imputados como amplamente responsáveis pela bioatividade desta planta. O *S. terebinthifolius* tem ação antimicrobiana, cicatrizante e antiinflamatória (MARTORELLI et al., 2011).

Em estudos pré-clínicos, utilizando o decocto, ficou comprovado a sua eficácia como protetor gástrico, elevando o pH do suco gástrico de 5,85 para 6,57 (PAULO et al., 2009).

Foi comprovada também, em estudos clínicos a ação terapêutica em cervicites e cérvico-vaginites crônicas, utilizando tampões intravaginais, em contato com a cérvix durante 24 horas (LIMA et al., 2006). Ensaios de toxicidade foram realizados e detectados que a resina produzida por esta planta, em contato com a pele causadematite alérgica (MORAES et al., 2004). O hidrolato de um preparado medicamentoso, composto por três plantas, entre elas, o *S. terebinthifolius*, mostrou propriedades antiinflamatórias (MEDEIROS et al., 2007).

Outra pesquisa relacionada com a propriedade antifúngica desta planta testou seus extratos, aquoso e alcoólico, contra *C. albicans*, *T. rubrum* e *Cryptococcus neoformans*. O resultado foi de atividade contra *C. albicans* com o uso do extrato aquoso, porém quando as macromoléculas foram separadas de outros metabólitos houve perda de atividade (SCHMOURLO et al., 2005).

Um trabalho relacionado com a atividade antimicrobiana de um extrato de *Shinus terebinthifolius* Raddi também verificou que o fracionamento do mesmo induzia a perda da capacidade de inibição de bactérias (BOROS, 2007). Johann et al. (2007) verificaram que o extrato etanólico das folhas de *Schinus terebinthifolius* apresentou potencial atividade antifúngica contra *Candida glabrata* e *Sporothrix schenckii*.

Tonial (2010), afirma que a atividade antimicrobiana de extratos de *Schinus terebentifolius* Raddi é inquestionável.

1.3. *Ocimum basilicum* L. (cultivar Maria Bonita)

O manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) é originário do Sudoeste da Ásia e África Central e de ocorrência subespontânea no Brasil. A depender do local em que é cultivado, poderá ser uma planta anual ou perene (BLANK et al., 2007).

O gênero *Ocimum*, da família Lamiaceae, é uma importante fonte de óleos essenciais, tendo uso na medicina popularmente em todos os continentes. Compreendem aproximadamente trinta espécies de ervas e subarbustos dispersos das regiões tropicais e subtropicais da Ásia, África,

Américas Central e do Sul, sendo a África considerada o principal centro de diversidade deste gênero (AL-MASK et al., 2013).

Nos Estados Unidos da América o cultivo é de média escala e para fins culinários, ornamentais e extração de óleo essencial. Essa espécie é comercialmente cultivada para utilização de suas folhas verdes e aromáticas, usadas frescas ou secas como aromatizante ou tempero (PEREIRA e MOREIRA, 2011).

Entre as espécies de manjeriço de maior importância encontram-se *Ocimum gratissimum* (manjeriço-doce), *Ocimum basilicum* (manjeriço branco), *Ocimum tenuiflorum*, *Ocimum selloi* Benth (elixir paregórico) que são produtores de óleos essenciais para produção de fármacos, perfumes e cosméticos (PEREIRA & MOREIRA, 2011).

Dentre estas, encontra-se a cultivar Maria Bonita que é proveniente do acesso PI 197442, oriundo do Banco de Germoplasma North Central Regional PI Station, Iowa State University, EUA. É a primeira cultivar de manjeriço melhorada e registrada no Registro Nacional de Cultivares (RNC) pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento no Brasil, e foi obtida a partir do programa de melhoramento genético da Universidade Federal de Sergipe (BLANK et al., 2007). Apresenta forma de copa arredondada, com pétala rósea e sépala roxa. A cultivar Maria Bonita possui comprimento médio de folha de 6,5 cm e largura de folha de 2,8 cm, largura média de copa de 45,70 cm, diâmetro médio do caule de 1,32 cm, altura média de 45,50 cm e hábito de crescimento ereto, o que, em conjunto, favorece a sua colheita, tanto manual como mecanizada. Possui cerca de 85% de umidade nas folhas e inflorescências e 80% no caule, com ciclo médio de 80 dias para o florescimento (BLANK et al., 2007).

A nomenclatura botânica correta para as espécies e variedades do gênero *Ocimum* da família Lamiaceae, da qual o manjeriço comercial está incluído, é de grande interesse, uma vez que mais de 60 espécies e formas têm sido relatadas, sendo questionável a verdadeira identidade botânica do manjeriço citado em algumas literaturas (AQUINO et al., 2011).

A dificuldade em classificar mais de 60 variedades de *Ocimum basilicum* L. provavelmente se deve à ocorrência de polinização cruzada facilitando hibridações, resultando em grande número de subespécies, variedades e formas (BLANK et al., 2007).

O *Ocimum basilicum* L. faz parte de um grupo de plantas medicinais, aromáticas e condimentares de grande valor econômico, muito utilizado para diversos fins: ornamental, condimentar, medicinal, aromático, na indústria de perfumaria e de cosméticos (BLANK et al., 2007).

As folhas secas fazem parte da composição de temperos ou são utilizadas isoladamente na culinária, especialmente em massas. Esta planta caracteriza-se por ser bem adaptada ao Nordeste Brasileiro, além de apresentar um alto teor e rendimento do óleo essencial, bem como, do seu composto majoritário, o linalol. O óleo essencial é empregado para a produção de xampus, sabonetes e perfumes, apresentando também propriedades inseticidas e repelentes (ROSADO et al., 2011).

Na medicina popular, as espécies de manjeriço são indicadas como estimulante digestivo, antiespasmódico, gástrico, galactagogo, béquico, carminativo (SAJJADI, 2006). Estudos têm demonstrado seu grande potencial antimicrobiano e antioxidante (SARTORATO et al., 2004; POLITEO et al., 2007).

O óleo essencial extraído de várias partes da planta tem apresentado atividade antimicrobiana frente a bactérias, (*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* dentre outras) (AQUINO et al, 2010). A atividade antimicrobiana do óleo essencial do manjeriço tem sido relatada como sendo predominantemente associada aos seus constituintes majoritários, o metil chavicol e o linalol (MARTINS et al., 2010).

Os óleos essenciais constituem a matéria prima de maior valor agregado nos mercados nacional e internacional, obtida a partir de folhas e ápices com inflorescências das plantas do gênero *Ocimum* em estágio de maturidade ideal (SILVA et al., 2006). A produção de óleos essenciais é destinada a fabricação de fármacos, perfumes, além de aplicações como ingredientes em alimentos e aditivos nos produtos cosméticos e de higiene pessoal, devido às suas propriedades antioxidantes e antibacterianas (VANI et al., 2009).

1.4. Óleos Essenciais

O uso dos óleos essenciais como agentes medicinais é conhecido desde a remota antigüidade. Há registros pictóricos de seis mil anos atrás, entre os egípcios, de práticas religiosas associadas à cura de males, às unções da realeza, e à busca de bem estar físico, através dos aromas obtidos de partes específicas de certos vegetais, como resinas, folhas, flores, sementes, etc. As substâncias aromáticas também já eram populares nas antigas China e Índia, centenas de anos antes da era cristã, quando eram incorporados em incenso, poções e vários tipos de acessórios, usados diretamente sobre o corpo (TYRREL, 1990).

No entanto, foi apenas a partir da Idade Média, através do processo de destilação, introduzido pelos cientistas muçulmanos, que se iniciou a real comercialização de materiais aromáticos (TYRREL, 1990).

São misturas de metabólitos secundários voláteis contidos em vários órgãos das plantas e assim são denominados devido à composição lipofílica que apresentam quimicamente diferentes da composição glicerídica dos verdadeiros óleos e gorduras (AQUINO et al., 2010).

Possuem baixo peso molecular, geralmente são odoríferos e líquidos, constituídos na maioria das vezes, por moléculas de natureza terpênica e eventualmente de fenilpropanóides, acrescidos de moléculas menores, como alcóois, ésteres, aldeídos e cetonas de cadeia curta. São também denominados de óleos etéreos ou essências (MORAIS, 2009).

Em temperatura ambiente apresentam aspecto oleoso, tendo como principal característica a volatilidade. Isto os diferencia dos óleos fixos, que são misturas de substâncias lipídicas, geralmente provenientes de sementes (e.g.: óleo de rícino, manteiga de cacau e óleo de linhaça). Apresentam-se geralmente incolores ou levemente amarelados, com sabor ácido e picante, pouco estáveis em presença de luz, calor e ar, além de serem pouco solúveis em água (MORAIS, 2009).

Os óleos essenciais constituem um dos mais importantes grupos de matérias primas para as indústrias de alimentos, farmacêutica, perfumaria e afins (BIZZO et al., 2009).

Quimicamente, em sua maioria são constituídos de substâncias terpênicas, acrescidos de moléculas menores, como alcoóis, ésteres, aldeídos e cetonas de cadeia curta. O perfil terpênico apresenta-se normalmente constituído de moléculas de dez e de quinze carbonos, monoterpenos e sesquiterpenos, respectivamente. Os terpenos são biossintetizados a partir da condensação de unidades de cinco carbonos, o difosfato de isopentenila (IPP) e o difosfato de dimetilalila (DMAPP), derivadas, da rota biossintética do ácido mevalônico. Posteriormente as estruturas básicas dos terpenos podem ser modificadas por reduções, oxidações e ciclizações (BANDONI; CZEPAK, 2008).

Estão associados a várias funções necessárias à sobrevivência do vegetal em seu ecossistema, exercendo papel fundamental na defesa contra microrganismos e predadores, e também na atração de insetos e outros agentes fecundadores. Na prática médica popular, os óleos essenciais possuem uma larga tradição de uso (BIZZO et al., 2009).

As propriedades farmacológicas atribuídas aos OE são diversas e algumas são preconizadas por apresentarem vantagens importantes, quando comparadas a outros medicamentos, como, por exemplo, a sua volatilidade, que os torna ideal para uso em nebulizações, banhos de imersão ou simplesmente em inalações. A volatilidade e o baixo peso molecular de seus componentes possibilitam que eles sejam rapidamente eliminados do organismo através das vias metabólicas. (BANDONI; CZEPAK, 2008).

As bases da indústria de óleos essenciais foram concebidas e desenvolvidas no Oriente, especialmente no Egito, Índia e Pérsia e no Ocidente alcançou seu pleno desenvolvimento (SIANI et al., 2000).

De acordo com a família a que pertencem, as diversas espécies de plantas acumulam esses elementos voláteis em órgãos anatômicos específicos (SANTANA et al., 2012).

Os óleos essenciais são conhecidos pela fragrância e propriedades fungicidas, antivirais, bactericidas e medicinais e podem ser utilizados como antimicrobianos, analgésicos, sedativos e antiinflamatórios (AQUINO et al., 2010). Ainda, tem sido estabelecido cientificamente que cerca de 60% dos óleos essenciais possuem propriedades antifúngicas e 35% exibem propriedades antibacterianas (LIMA, 2006). Constituem-se em um dos principais grupos dos produtos naturais com potencial para o desenvolvimento

de novos agentes antimicrobianos (SAAD et al., 2010). Vários estudos têm descrito este potencial para uma variedade de microrganismos isolados de diversos sítios anatômicos (SANTANA et al., 2012).

Entre os principais métodos de extração dos óleos essenciais estão a hidrodestilação, a destilação por arraste de vapor d água e a extração com CO₂ supercrítico. A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas constitui uma das técnicas mais utilizadas para a identificação dos constituintes dos óleos essenciais (MONTANARI, 2010).

O produto extraído pode variar em qualidade, quantidade e composição, de acordo com o clima, solo, órgão da planta, idade e estágio do ciclo vegetativo (ANGIONI et al., 2006). A composição química dos óleos essenciais é determinada por fatores genéticos, porém, outros fatores podem acarretar alterações significativas na produção dos metabólitos secundários. Os estímulos decorrentes do ambiente, no qual a planta se encontra, podem redirecionar a rota metabólica, ocasionando a biossíntese de diferentes compostos (ANGIONI et al., 2006).

Dentre estes fatores, podem-se ressaltar as interações planta/microrganismos, planta/ insetos e planta/ planta; idade e estágio de desenvolvimento, fatores abióticos como luminosidade, temperatura, pluviosidade, nutrição, época e horário de coleta, bem como técnicas de colheita e pós – colheita. É válido ressaltar que estes fatores podem apresentar correlações entre si, não atuando isoladamente, podendo exercer influência conjunta no metabolismo secundário (MORAIS, 2009).

Assim, para se obter um óleo essencial com composição constante, deve-se realizar a extração sob as mesmas condições, a partir dos mesmos órgãos vegetais cultivados no mesmo solo e nas mesmas condições climáticas.

Devido a sua composição complexa, os óleos essenciais demonstram uma variedade de ações farmacológicas, tornando-os potenciais fontes para o desenvolvimento de novas drogas (AMARAL, 2004).

Santana et al (2012) demonstraram que os óleos essenciais de folhas, flores e frutos de *S. terebinthifolius* de diferentes regiões foram previamente analisados, os quais se mostraram compostos basicamente por derivados mono e sesquiterpênicos. No que se refere à avaliação da atividade biológica, os óleos voláteis dos frutos foram analisados e apresentaram

atividade alelopática, citotóxica e tripanocida, enquanto que o óleo das folhas mostrou atividade citotóxica.

Houghton et al. (2007) descreveram que pela análise dos constituintes químicos dos óleos essenciais não é possível afirmar que o componente majoritário é o que realiza a atividade biológica em estudo. Assim, o efeito pode ser atribuído a um constituinte em menor proporção ou de um sinergismo entre os compostos existentes naquele óleo (MACHADO & JUNIOR, 2011).

1.5. Gênero *Candida*

O gênero *Candida* é composto por fungos leveduriformes hialinos, taxonomicamente enquadrados no grupo dos ascomicetos (SIDRIM & ROCHA, 2004).

As leveduras do Gênero *Candida* são classificadas no Reino Fungi como membros da Divisão Eumycota; Filo Ascomycota; Classe Saccharomycetes, Ordem Saccharomycetales, Família Saccharomycetaceae (BARBEDO & SGARBI, 2010). Este gênero compreende aproximadamente 200 espécies. As principais espécies de interesse clínico são: *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilliermondii* e *C. lusitaniae*. Entretanto, tem sido progressivo o relato de casos de doenças superficiais e invasivas relacionadas a espécies emergentes de *Candida*, envolvendo isolamentos de *C. dubliniensis*, *C. kefyr*, *C. rugosa*, *C. famata*, *C. utilis*, *C. lipolytica*, *C. norvegensis*, *C. inconspicua*, dentre outras (COLOMBO & GUIMARÃES, 2003). A reprodução ocorre assexuadamente por brotamento.

As leveduras do gênero *Candida*, em particular a *C. albicans*, são patógenos oportunistas freqüentemente isolados das superfícies mucosas de indivíduos normais. Estão muito bem adaptadas ao corpo humano, por isso podem colonizá-lo sem produzir sinais de doença em condições de normalidade fisiológica (ÁLVARES. et al., 2007).

C. albicans é uma levedura diplóide com história de dimorfismo fúngico invertido, enquanto outros fungos se encontram na natureza na fase miceliana e causam doenças no homem na fase leveduriforme, *C. albicans* comporta-se de modo contrário (SANTOS, 2011).

A biologia de *C. albicans* apresenta diferentes aspectos, entre eles, a habilidade de se apresentar com distintas morfologias. A fase unicelular leveduriforme pode gerar um broto e formar hifas verdadeiras. Entre esses dois extremos, brotamento e filamentação, o fungo ainda pode exibir uma variedade de morfologias durante seu crescimento, formando assim as pseudo-hifas, que na realidade são leveduras alongadas unidas entre si. A mudança na morfologia de fase leveduriforme para filamentosa pode ser induzida por uma variedade de condições ambientais, como variação de temperatura e de pH (BARBEDO & SGARBI, 2010).

Mudanças na micromorfologia ocorrem em função da expressão genética, que se reflete na macromorfologia do desenvolvimento leveduriforme quanto à cor, que pode ser do branco ao creme, e ao aspecto, pastoso, brilhoso ou opaco. Porém, o estado leveduriforme pode evoluir para filamentoso, ou até mesmo uma mescla de células fúngicas leveduriformes e filamentosas (BARBEDO & SGARBI, 2010).

O critério para a diferenciação entre hifa verdadeira e pseudo-hifa está na observação da formação do tubo germinativo (hifaverdadeira). A partir da célula leveduriforme, na formação da hifa verdadeira não há a constrição entre a célula-mãe e o filamento, já pseudo-hifas possuem a constrição entre a célula-mãe e o comprimento do filamento (WHITEWAY & BACHEWICH, 2007). Diferença maior entre a hifa verdadeira e a pseudo-hifa está na organização de seus ciclos celulares. Em *C. albicans*, os termos hifa e tubo germinativo são considerados freqüentemente sinônimos. A hifa que se projeta do primeiro ciclo celular, antes da formação do septo, é chamada de tubo germinativo, termo que deveria ser usado para descrever o alongamento que desenvolve a hifa. O termo hifa refere-se a toda não ramificação e aos filamentos que contêm mais de um septo e ausência de constrições (WHITEWAY & BACHEWICH, 2007).

Além das características da hifa, outras estruturas estão fortemente ligadas à definição da espécie de maior virulência, como a presença de Clamidoconídios (clamidosporos) e a produção de tubo germinativo. Os clamidosporos são estruturas arredondadas com paredes espessas formadas por um alongamento no interior (intercalar) ou extremidade (terminal) da hifa e ocasionalmente em pseudo-hifas; são ricos em ácidos nucléicos e podem germinar em alguns casos, são formadas quando o fungo se encontra em um local onde não há todos os nutrientes necessários para seu desenvolvimento,

como por exemplo, meios de cultura feitos à base de arroz e milho, como o industrializado *corn meal*. A formação de clamidoconídios sob condições específicas é uma das maneiras eficientes de se distinguir *C. albicans* de *C. dubliniensis* (SANTOS, 2011).

Em relação às suas características bioquímicas, as espécies de *Candida* possuem tanto a capacidade fermentativa como assimilativa, sendo capazes de crescer em uma variedade de substratos orgânicos. As amostras patogênicas em sua maioria crescem bem em cultivos aeróbicos, embora possam crescer também em presença de altas concentrações de gás carbônico atmosférico e em meios pobres ou ricos em nutrientes com um pH entre 2,5 e 7,5 (SANTOS, 2011).

No exame direto do material clínico, o gênero apresenta-se como uma estrutura unicelular ovalada, Gram-positiva com tamanho variável de 2 a 6 µm, e como células alongadas com brotamentos, semelhantes a hifas, denominadas pseudo-hifas. As espécies de *Candida* apresentam colônias de coloração branca, superfície lisa ou levemente rugosa e textura glabrosa úmida (MORETTI et al, 2004), que crescem bem dentro de 48 horas, entre temperaturas de 25 e 37°C (SIDRIM & ROCHA, 2004). Com relação à microscopia caracterizam-se por blastoconídios esféricos ou levemente ovais, paredes finas e ausência de cápsula, sendo que algumas espécies apresentam clamidoconídios terminais ou intercalares (VIEIRA, 2009).

Estas características são úteis à identificação das espécies de *Candida*, porém não são suficientes para garantir uma identificação precisa. Para a identificação das espécies do gênero *Candida* muitos aspectos são levados em consideração, como morfologia, capacidade de formar tubo germinativo, assimilação de carboidratos, assimilação de nitrogênio e fermentação de carboidratos (VIEIRA, 2009). Além destas, o ideal é a utilização de várias técnicas que abordem estas características fenotípicas, bem como aquelas que se utilizam de seqüências específicas do DNA. A amplificação do DNA alvo é particularmente promissora por causa da simplicidade, especificidade e sensibilidade (SANTOS, 2011). Além disso, ela pode ser associada a várias outras técnicas moleculares aumentando seu poder discriminatório.

1.6. Doenças causadas por *Candidasp.* – Candidíase vaginal

Candidíase ou candidose é uma micose causada por leveduras do gênero *Candida*, em que a lesão pode ser branda, aguda ou crônica, superficial ou profunda, e de espectro clínico bem variável (BARBEDO & SGARBI, 2010).

O principal agente das candidíases é a *C. albicans*. A maioria dos estudos mostra que esta espécie constitui 60% dos isolados de amostras clínicas. Uma vez que esta levedura faz parte da microbiota humana, ela é considerada uma micose oportunista. No entanto, algumas considerações devem ser levadas em conta, e freqüentemente na literatura encontramos outros agentes da candidíase, como por exemplo: *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. glabrata*, *C. kefyr*, *C. lusitaniae*, *C. viswanathii*, *C. famata*, dentre outras, sendo que todas estas espécies têm sido isoladas de casos clínicos (ÁLVARES et al., 2007).

As leveduras do gênero *Candida*, em particular a *C. albicans*, são patógenos oportunistas freqüentemente isolados das superfícies mucosas de indivíduos normais. Estão muito bem adaptadas ao corpo humano, por isso podem colonizá-lo sem produzir sinais de doença em condições de normalidade fisiológica. Colonizam as mucosas de todos os seres humanos no decorrer ou pouco depois do nascimento, havendo sempre o risco de infecção endógena (ÁLVARES et al., 2007). Quando há uma ruptura no balanço normal da microbiota ou o sistema imune do hospedeiro encontra-se comprometido, as espécies do gênero *Candida* tendem a manifestações agressivas, tornando-se patogênicas (BARBEDO & SGARBI, 2010).

A *candida* é um microrganismo dimórfico, e pode ser tido como comensal ou patogênico, na dependência dos seus fatores próprios de virulência e dos fatores de defesa do hospedeiro. Para que ocorra a candidíase vaginal clínica, o fungo precisa vencer a batalha com o meio vaginal e invadir a mucosa, causando sintomatologia. Geralmente isso é favorecido por alguns fatores classicamente reconhecidos como predisponentes para a CV: gravidez, uso de anticoncepcionais orais de alta dosagem, diabetes melitus descompensado, uso de corticóides, imunossupressores e antibióticos. Além

disso, com alterações na resposta imunológica, hábitos de higiene e vestuário inadequados, e contatos com alérgenos e/ou irritantes da genitália (ÁLVARES et al., 2007).

A candidíase vaginal (CV) continua sendo extremamente comum, uma vez que quase todas as mulheres experimentam esse desagradável quadro genital pelo menos uma vez em algum momento de suas vidas. Dentre as vulvovaginites, a candidíase vulvovaginal (CVV) é a segunda mais freqüente, estimada em 17 a 39% dos casos, atrás somente da vaginose bacteriana (VB) com 22 a 50%. A CVV acomete 75% das mulheres em alguma fase da vida, sendo que 50% apresentam outros episódios e 5% têm candidíase vulvovaginal recorrente (CVVR), definida como quatro ou mais episódios em um ano. É causada por um único agente, porém o mecanismo de transformação da colonização em infecção é multifatorial. A *Candida albicans* é responsável por 85 a 90% dos casos, seguida pelas espécies *C. Glabrata* com 5 a 15% dos casos de segunda espécie mais frequente nas candidíases vulvovaginais. Outras espécies detectadas em infecções ginecológicas com menor frequência são *C. tropicalis*, *C. pseudotropicalis* e *C. krusei* (FEUERSCHUETTE, et al., 2010).

A candidíase vulvovaginal é uma das infecções mais comuns na prática clínica ginecológica. É um processo infeccioso e/ou inflamatório do trato geniturinário inferior feminino relevante na medicina devido ao acentuado número de atendimentos em consultórios de ginecologia. Prurido, leucorréia, placas esbranquiçadas, edema e eritema na vulva e vagina têm sido as manifestações clínicas mais comuns nesse tipo de infecção. A CVV é um dos diagnósticos mais freqüentes na prática diária em ginecologia e sua incidência tem aumentado drasticamente, tornando-a a segunda infecção genital mais freqüente nos Estados Unidos e no Brasil. A CVV representa 20% a 25% dos corrimentos vaginais de natureza infecciosa, precedida apenas pela vaginose bacteriana. Na Europa, é a primeira causa de vulvovaginite (ÁLVARES, 2007). Atividade sexual (traumas de mucosa), diferentes tipos de proteção menstrual e substâncias de higiene íntima, uso contínuo de roupas apertadas, peças íntimas de tecidos sintéticos, gravidez, anticoncepcionais orais e o dispositivo intrauterino (DIU), dentre outros, são alguns dos fatores predisponentes para as candidíases vulvovaginais (BARBEDO & SGARBI, 2010).

A sintomatologia das vulvovaginites fúngicas não é patognomônica e a suspeita clínica pode ser confirmada por testes que evidenciam a natureza do agente etiológico. Por essa razão, os exames laboratoriais devem ser realizados para o diagnóstico diferencial de outras vaginites infecciosas, resultando em benefícios aos pacientes pelos tratamentos específicos, que evitam o agravamento da infecção, procedimentos médicos e custos desnecessários (BOATTO et al., 2007).

Com relação à candidíase vulvovaginal recorrente, a patogênese desta entre mulheres que não têm condições predisponentes aparentes, que é a grande maioria, está sob investigação. Uma elevação na resistência de espécies de *Candida* não tem sido observada na maioria dos casos, embora se analisarmos essas pacientes como um grupo, mulheres com recorrência têm uma prevalência discretamente mais elevada de *C. glabrata*, menos sensível às drogas imidazólicas, comumente utilizadas no tratamento de CVV e CVVR (BARBEDO & SGARBI, 2010).

1.7. Resposta da *Candida* spp aos antifúngicos utilizados no tratamento da candidíase vaginal

Uma grande quantidade de fármacos obtida através da síntese orgânica têm sido utilizada no tratamento de infecções micóticas. A candidíase vaginal pode ser tratada com agentes antifúngicos tópicos ou sistêmicos. Os antisépticos como tintura de iodo, violeta de genciana, ácido salicílico e benzóico, derivados sulfamídicos, corantes, quinonas, antifúngicos poliênicos (e.g. nistatina, anfotericina) têm sido amplamente utilizados na terapia antimicótica. Ainda, faz-se uso dos chamados antifúngicos modernos, a citar os azóis (cetoconazol, econazol, sulconazol, miconazol, clotrimazol, fluconazol), alilaminas (naftina, terbinafina), hidroxipiridona, morfolina, compostos de selenium e anfotericina B lipossômica (SANTOS, 2011).

Estudos têm demonstrado que o tratamento oral com fármacos como fluconazol, cetoconazol e itraconazol são eficazes no tratamento da candidíase; no entanto, apresentam toxicidade sistêmica que deve ser controlada, especialmente com o uso de cetoconazol. Esses agentes podem estar associados com elevação das enzimas hepáticas (GLEHN e RODRIGUES, 2012).

O fluconazol tem sido utilizado como droga de primeira escolha, pois, ele é bem tolerado pelo organismo, tem boa disponibilidade oral e é eficaz contra um número significativo de leveduras do gênero *Candida* (SANTOS, 2011). No entanto, ele tem sido mais utilizado para candidíase sistêmica devido ao alto preço. Por este motivo, a nistatina tem sido utilizada no Brasil como primeira alternativa no tratamento de CV, entretanto, são poucas as publicações sobre os resultados *in vitro* da nistatina. A anfotericina B no tratamento da CV só pode ser através de formulações tópicas, devido sua alta toxicidade (SANTOS, 2011).

Com frequência, as infecções fúngicas são de difícil tratamento, segundo LIMA, et al, 2006, este fato está intrinsecamente relacionado à aquisição por parte de seus agentes etiológicos de resistência frente à ação de antifúngicos.

O uso de roupas íntimas sintéticas e justas leva a ocorrência de prurido, mucorréia, hiperemia, que, associado com a positividade de colonização de *Candida albicans* anal, aumenta em 3,7 vezes o resultado para candidíase vaginal sugerindo possível contaminação a partir do ânus. A realização de estudos mais aprofundados que abordem fatores de risco pode identificar formas de prevenção a partir de mudanças de comportamento e hábitos (GLEHN e RODRIGUES, 2012).

O tratamento de candidíase vaginal mudou e evoluiu muito nos últimos anos. Não há evidências de que a *Candida* seja resistente aos antibióticos poliênicos nem aos derivados imidazólicos. Entretanto, alguns cuidados devem ser observados para a obtenção de melhores resultados: iniciar sempre com terapêutica local, não interromper o tratamento durante o fluxo menstrual, controlar os fatores predisponentes e repudiar associações medicamentosas, sobretudo com o metronidazol (FEUERSCHUETTE et al, 2010).

O tratamento do parceiro sexual não é obrigatório para o sucesso terapêutico, mas deve ser considerado em casos de mulheres com CVV recorrente.

O sucesso do tratamento da CVVR impõe inicialmente regime de supressão com dose prolongada de antifúngico oral, como fluconazol 150 mg (três doses, dias 1, 4 e 7) ou qualquer azólico tópico por sete a 14 dias, para alcançar remissão clínica e microbiológica antes de iniciar o regime de

manutenção. Utilização de tratamento inicial de curta duração aumenta a chance de recidiva para 50% em três meses. O uso de cetoconazol e itraconazol é uma boa opção nos episódios eventuais ou para supressão, não sendo escolha para manutenção por apresentarem mais efeitos colaterais (FEUERSCHUETTE et al., 2010).

A *Candida glabrata* e outras espécies não-*albicans* apresentam maior resistência à terapia convencional com derivados azólicos, principalmente fluconazol. O diagnóstico clínico pode ser meramente suspeitado frente à secreção menos típica e mais aquosa, queixa de ardor/queimor mais intenso que de prurido, e nos casos resistentes e recorrentes, devendo sempre ser confirmado pela cultura em meio específico. O uso indiscriminado de antimicóticos azólicos elimina as cepas mais sensíveis, selecionando as mais resistentes e as não-*albicans*.

Na realidade, apesar de existirem fatores de risco para o seu desenvolvimento, na maioria das pacientes com CVVR tais fatores não são identificados. Gravidez, *diabetes mellitus* mal controlada, imunossupressão, indivíduos com falha na produção de antígeno de Lewis, sexo oral passivo e atopia são situações relacionadas à CVV (FEUERSCHUETTE et al, 2010).

O aumento na incidência de infecções fúngicas tem exacerbado a necessidade de uma nova geração de agentes antifúngicos. Esforços contínuos para o estudo dos mecanismos de resistência e o desenvolvimento de esquemas experimentais ou novas biomoléculas são primordiais para o controle da resistência e para o desenvolvimento de combinações mais seguras e mais potentes para o futuro.

1.8. Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: a busca por compostos com atividade anti-*Candida*.

As plantas são fontes importantes de compostos biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em modelos para a síntese de um grande número de fármacos.

Estima-se que existam de 25.000 a 75.000 espécies vegetais utilizadas nas medicinas tradicionais do mundo, das quais apenas 1% foi validada por estudos científicos, com demonstração de seu valor terapêutico, quando administradas em seres humanos (VIEIRA, 2009).

O uso de plantas na medicina popular guarda uma estreita relação com os efeitos produzidos que são comprovados pela recuperação dos pacientes que usam esses medicamentos (VIEIRA, 2009).

Em decorrência do alto custo dos medicamentos e da baixa condição financeira de 80% da população mundial, as plantas voltaram a ser um importante aliado nos serviços de saúde. A Organização Mundial de Saúde (OMS), reconhecendo essa realidade lançou, em 1972, um incentivo à chamada Medicina Tradicional, em que a Fitoterapia se destaca como uma das práticas mais importantes (SANTOS, 2011).

Atualmente, no Brasil e no mundo, têm sido desenvolvidas inovações cosméticas e farmacêuticas que demonstram a necessidade de mais pesquisas em relação ao uso de diferentes matérias-primas de origem vegetal.

Os compostos químicos presentes nas plantas resultam de dois processos metabólicos básicos: o primário e o secundário. Devido ao metabolismo primário são capazes de sintetizar os compostos necessários para a realização de suas funções vitais, como a fotossíntese e a reprodução.

O metabolismo secundário é regulado pela capacidade genética das plantas responderem a estímulos num determinado momento (SANTOS, 2011). Sendo assim, os metabólitos secundários são específicos para cada espécie vegetal e os produtos resultantes do metabolismo secundário geralmente não são vitais para as plantas. No entanto, representam os compostos químicos – princípios ativos – responsáveis pelos efeitos terapêuticos ou tóxicos ao organismo humano e animal (SANTOS, 2011).

Os principais responsáveis por essas ações terapêuticas são os óleos essenciais, compostos formados por várias funções orgânicas combinadas em diferentes prevalências. Os óleos essenciais constituem os elementos voláteis contidos em muitos órgãos vegetais, e, estão relacionados com diversas funções necessárias à sobrevivência vegetal, exercendo papel fundamental na defesa contra microrganismos. Ainda, tem sido estabelecido cientificamente que cerca de 60% dos óleos essenciais possuem propriedades antifúngicas e 35% exibem propriedades antibacterianas (LIMA et al., 2006), apresentam atividade contra um grande número de microrganismos, incluindo espécies resistentes a antibióticos e antifúngicos (VIEIRA, 2009).

Praticamente todos os óleos essenciais constituem uma mistura de princípios químicos muito complexa e variam amplamente em sua composição,

sendo a maior parte constituídos principalmente de terpenos. Os constituintes variam desde hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas e compostos com enxofre. Na mistura, tais compostos apresentam-se em diferentes concentrações; normalmente um deles é o composto majoritário, existindo outros em menores teores e alguns em baixíssimas quantidades. Geralmente, os componentes que apresentam as maiores concentrações determinam as propriedades biológicas do óleo essencial (BAKKALI et al., 2008). Devido a sua composição complexa, os óleos essenciais demonstram uma variedade de ações farmacológicas, tornando-os potenciais fontes para o desenvolvimento de novas drogas (AMARAL, 2004).

A pesquisa de novos agentes antifúngicos se faz necessária devido à grande incidência das infecções fúngicas resistentes às principais drogas clinicamente utilizadas. Esse fato é agravado pelo limitado arsenal antifúngico disponível, associado aos efeitos colaterais e alto preço dessas drogas.

Em ginecologia, os óleos essenciais podem ser utilizados no tratamento de infecções agudas, crônicas ou recorrentes, a exemplo de infecções causadas por leveduras, infecção do trato urinário ou vaginal (SANTOS, 2010). Os óleos essenciais de várias espécies têm demonstrado eficiência *in vitro* no controle de *Candida spp.* envolvida em infecções vaginais (SANTOS, 2011).

Estudos sobre as atividades antimicrobianas de extratos e óleos essenciais de plantas nativas têm sido relatados em muitos países tais como Brasil, Cuba, Índia, México e Jordânia, que possuem uma flora diversificada e uma rica tradição na utilização de plantas medicinais para uso como antibacteriano ou antifúngico (DUARTE, 2006).

A resistência aos antifúngicos tem representado um grande desafio para a clínica, frente às dificuldades observadas no tratamento da candidíase. Este aumento pode ser decorrente do uso de terapias seletivas com doses inadequadas ou devido ao uso crescente de fármacos na profilaxia de infecções fúngicas, possibilitando a seleção da resistência clínica.

Nas mulheres a candidíase vaginal afeta uma elevada proporção em idade adulta, estima-se que aproximadamente 75% destas, apresentem pelo menos um episódio de vulvovaginite fúngica em sua vida, onde 40 a 50% vivenciam novos surtos e 5% tornam-se recorrentes (FREIRES et al., 2011).

CAPÍTULO II

Schinus terebinthifolius Raddi

Composição Química e Ação Antifúngica do Óleo Essencial de *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira) sobre Cepas do Gênero *Candida* spp.

M. B. Almeida^{1,3}, D. L. Travassos², E. D. Araújo³, J. O. Carvalho⁴, J. J. S. Moreira⁵, E. M. O. Cruz⁶.

^{1,2,4} Departamento de Morfologia, Centro de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal de Sergipe, 49100-000 São Cristóvão - SE, Brasil

³ Departamento de Biologia no Laboratório de Genética e Conservação de Recursos naturais Universidade Federal de Sergipe, 49100-000 São Cristóvão - SE, Brasil

⁵ Departamento de Engenharia de Alimentos – Universidade Federal de Sergipe, 49100-000 São Cristóvão - SE, Brasil

⁶ Departamento de Engenharia Agrônômica – Universidade Federal de Sergipe, 49100-000 São Cristóvão - SE, Brasil

RESUMO

Composição Química e Ação *AntiCandida* do Óleo Essencial de *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira) sobre Cepas do Gênero *Candida* spp.

Nos últimos anos, as candidíases vêm se tornando cada vez mais recorrentes e de difícil tratamento, principalmente em função da emergência de novas espécies de *Candida*, bem como, da diminuição da susceptibilidade aos antifúngicos. Considerando a necessidade de obtenção de novos agentes terapêuticos voltados para o combate da candidíase vaginal, o objetivo deste estudo foi investigar a atividade anti*Candida in vitro* do óleo essencial de frutos e folhas da *Schinus terebinthifolius* Raddi frente às espécies de *Candida* spp. Os frutos e folhas da *Schinus terebinthifolius* Raddi foram testados em duas etapas: uma etapa em que foram utilizados folhas e frutos, secos por um período de cinco dias em estufa à temperatura de 40°C controlada, e, uma segunda etapa, onde o material botânico (folhas e frutos) foi utilizado fresco.

Em ambas as etapas houve extração dos óleos essenciais em aparelho tipo Clevenger. As determinações das concentrações inibitórias mínimas e fungicidas mínimas foram realizadas com base no documento M27-A2 do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

No presente estudo foi observado um alto índice de resistência para o óleo essencial das folhas secas, e os frutos maduros secos demonstraram melhor eficácia sobre as linhagens testadas. Porém, não houve ação antifúngica de ambos os óleos para as linhagens testadas, apenas ação fungistática. Em se tratando das folhas e frutos frescos da *S. terebinthifolius* Raddi, com a técnica de disco de difusão, os frutos apresentaram atividade anti*Candida* contra as linhagens testadas, com exceção da *C. glabatra*. As folhas apresentaram atividade anti*Candida* para todas as linhagens testadas (clínicas e padrão).

Palavras chave: Planta medicinal; candidíase vulvovaginal; óleo essencial; *Candida* spp

ABSTRACT

Action and Chemical Composition of Essential Oil Anti*Candida* *Schinus terebinthifolius* Raddi (mastic) on strains of the genus *Candida* spp.

In recent years, candidiasis are becoming increasingly recurrent and difficult to treat, mainly due to the emergence of new species of *Candida*, as well as the decreased susceptibility to antifungal agents. Considering the need to obtain new therapeutic agents aimed at fighting vaginal candidiasis, the aim of this study was to investigate the in vitro activity anti*Candida* of essential oil from fruits and leaves of *Schinus terebinthifolius* Raddi front of *Candida* spp. The fruit and leaves of *Schinus Terebinthifolius* Raddi were tested in two steps: a step in which the leaves and fruits , dried for a period of five days in an oven at 40 ° C controlled , and a second step where the material botanical (we used leaves and fruits) was used fresh . In both phases was extraction of essential oils in Clevenger type apparatus. The determination of minimum inhibitory and minimum fungicidal concentrations was based on document M27 - A2 of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). In the present study a high rate of resistance to the essential oil of dried leaves was observed, and the dried ripe fruits showed better efficacy against the tested strains. However, no antifungal action of both oils against the tested strains,

only fungistatic. In the case of leaves and fresh fruits of *S. terebinthifolius* Raddi, with the disk diffusion technique, the fruits showed antiCandida activity against all strains tested, except *C. glabrata*. Leaves showed antiCandida activity for all tested strains (clinical and standard).

Keywords: Medicinal plant ; vulvovaginal candidiasis ; essential oil ; *Candida* spp

1. INTRODUÇÃO

Espécies de *Candida* são reconhecidas como as leveduras mais usualmente envolvidas na etiologia de infecções micóticas.

Uma infecção fúngica que continua sendo extremamente comum é a candidíase vaginal (CV), que representa uma das ginecopatias mais freqüentes, acometendo pelo menos uma vez na vida cerca de 75% da população feminina sexualmente ativa. A grande maioria das cepas isoladas da vagina corresponde a espécies da *C.albicans*, estimando-se que a proporção de infecções por cepas *não-albicans* venha aumentando progressivamente nos últimos anos. Com freqüência, as infecções fúngicas são de difícil tratamento, fato intrinsecamente relacionado à aquisição por parte de seus agentes etiológicos de resistência frente à ação de antifúngicos (ARAÚJO et al, 2004).

Diante disto, o uso de medicina alternativa pela população mundial tem sido significativo nos últimos tempos. Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) divulgados em meados de 1990 citam que 60% a 80% da população dos países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados da saúde (VEIGA, PINTO & MACEL, 2005).

A *Schinus terebinthifolius* Raddi é uma espécie da família Anacardiaceae, nativa da América Central e do Sul, especialmente do sul do Brasil, do Paraguai e da Argentina, porém é comum na vegetação litorânea do nordeste brasileiro desde o Rio Grande do Norte ao Estado de Sergipe (LUCENA et al., 2006). Pode também ser encontrada em regiões semitropicais e tropical dos Estados Unidos, África, além da Ásia e, nos Estados Unidos, ocorre no Havaí, nos Estados da Califórnia, do Arizona e da Flórida onde foi introduzida para fins ornamentais (RIBAS et al., 2006; FREIRES et al., 2011). Apresenta as seguintes sinonímias botânicas: *Schinus aroeira* Vell, *Sarcotheca*

bahiensis Turcz., *Schinus antiarthritica* Mart., *Schinus mucromulata* Mart. *Schinus chichita* Speg., *Schinus lentiscifolia* e *Schinus rhoifolus* Mart. (SALVI JÚNIOR, 2009). Popularmente esta árvore é conhecida como aroeira, aroeira pimenteira, aroeira precoce, aroeira do campo, aroeira da praia, aroeira negra, aroeira branca, aroeira vermelha, aroeira mansa, aroeira do brejo, fruto de raposa, fruto de sabi, coração de bugre, cambuí, bálsamo, aroeira do campo, aroeira de sabiá, aroeira do Paraná, aguaraiba e careiba (SALVI JÚNIOR, 2009).

Possui ação antimicrobiana, antiinflamatória e antiulcerogênica, sendo utilizada como antisséptico e no tratamento de estomatites. A literatura apresenta estudo das propriedades medicinais da aroeira, dentre as quais se destaca a ação cicatrizante (LUCENA et al., 2006).

As partes utilizadas que apresentam propriedades medicinais são: casca, folhas e frutos. É considerada pela medicina popular como adstringente, anti-diarréica, antiinflamatória, depurativa, diurética e febrífuga. Não é utilizada como componente para cosmetologia. Popularmente, é empregada no tratamento da diarreia, inflamações, para promover a transpiração e a eliminação de líquidos. A casca da aroeira tem ação antitérmica, hemoptises e afecções uterinas, em geral (BORNHAUSEN, 2011).

Várias substâncias presentes no extrato desta planta apresentam ação antimicrobiana e antiinflamatória, tendo sido demonstrada, *in vitro*, atividade a diversas espécies de bactérias e fungos.

Os principais responsáveis por essas ações terapêuticas são os óleos essenciais, compostos formados por várias funções orgânicas combinadas em diferentes prevalências.

Os óleos essenciais são misturas de metabólitos secundários voláteis contidos em vários órgãos das plantas e assim são denominados devido à composição lipofílica que apresentam quimicamente diferentes da composição glicerídica dos verdadeiros óleos e gorduras (AQUINO et al, 2010).

A *Schinus terebinthifolius* Raddi produz, entre outros compostos, flavonóides, taninos e óleos essenciais. De todos os metabólitos secundários sintetizados pelos vegetais, os alcalóides e os óleos essenciais formam o grupo de compostos com maior número de substâncias biologicamente ativas (SANTOS et al., 2010).

As folhas e frutos avermelhados são também ricos em óleo essencial, e as investigações anteriores relataram altas concentrações de monoterpenos, juntamente com alguns hidrocarbonetos de sesquiterpeno (AFFONSO et al., 2012).

Tem sido estabelecido cientificamente que cerca de 60% dos óleos essenciais possuem propriedades antifúngicas e 35% exibem propriedades antibacterianas (LIMA et al., 2006).

Pessini et al. (2003) avaliaram 13 plantas usadas freqüentemente na medicina popular para o tratamento de doenças infecciosas. Entre as plantas, *Eugenia uniflora* inibiu o desenvolvimento de algumas cepas de bactérias e fungos. Os resultados obtidos vêm corroborar com a crença popular que utiliza essas plantas no tratamento de várias doenças infecciosas. Da casca de *Schinus terebinthifolius* Raddi, extrai-se óleo empregado contra tumores e doenças da córnea (BORNHAUSEN, 2011).

Desoti et al (2011), confirmam o grande potencial das plantas medicinais para o desenvolvimento de novos antimicrobianos. Há perspectivas inegáveis para aplicação destes produtos naturais, pois, além de possuir atividade individual, podem ainda ser associados a outros antimicrobianos usados na clínica.

Nesta perspectiva, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia do óleo essencial de frutos e folhas de *Schinus terebinthifolius* Raddi na inibição do crescimento de espécies de leveduras pertencentes ao gênero *Candida*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material Botânico

As folhas e frutos da *Schinus terebinthifolius* Raddi (Figura 1) foram colhidos na Fazenda Experimental “Campus Rural da UFS”, localizada no município de São Cristóvão, Sergipe, Brasil, (11^o 04`08``S, 37^o08`11``W). O material botânico foi utilizado em duas etapas de testes: 1) Frutos e folhas de *S. terebinthifolius* Raddi coletados no período de Junho a Outubro de 2011, constituindo a matéria prima utilizada na primeira etapa dos testes. Esta foi

colocada em estufa (model MA- 037/18) com renovação de ar à temperatura de 40°C durante cinco dias até a desidratação completa e posterior extração dos óleos essenciais; 2) Uma segunda coleta de folhas e frutos foi realizada no período de Dezembro de 2012 a Janeiro de 2013, constituindo a matéria prima utilizada na segunda etapa de testes, onde a matéria prima foi utilizada fresca.



Figura 1. Folhas e frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi.

2.2. Obtenção dos óleos essenciais, identificação e normalização dos compostos químicos

A matéria prima para a 1ª etapa de testes foi seca em estufa (model MA- 037/18) com renovação de ar à temperatura de 40°C durante cinco dias até a desidratação completa e posterior extração dos óleos essenciais. Já para a 2ª etapa foi utilizado material fresco. Na primeira etapa, os óleos essenciais das folhas secas e dos frutos maduros secos de *Schinus terebinthifolius* Raddi foram pesados, retirados os caules e inflorescências dos mesmos e colocados intactos em aparelho tipo Clevenger. Na segunda etapa, as folhas trituradas frescas e os frutos frescos também foram colocados em aparelho tipo Clevenger onde ocorreu a hidrodestilação (por 1,5 horas) em ambas as etapas no Laboratório de Fitotecnia e de Engenharia de Alimentos da UFS, respectivamente. O óleo essencial depois de extraído em ambas as etapas, foi separado da solução aquosa (hidrolato) e transferido para frasco âmbar, sendo conservado à temperatura de - 20°C até o momento do uso.

2.3. Cromatografia Gasosa – Espectrometria de Massas (CG-EM)

As análises de identificação e normalização de área dos compostos voláteis presentes nas frações de OEs foi realizada em um cromatógrafo a gás (Varian modelo 3900) equipado com coluna apolar (HP-5MS (30m x 25mm x 0,25µm)) com programação de temperatura de forno de 60-250°C (3°C/min), segundo Adams (1995), injetor operando no modo Split (razão 1:10) a temperatura de 250 °C. A detecção dos analitos foi realizada em um espectrômetro de massas (Varian *Ion Trap*, modelo 3900) com *transferline* na temperatura de 250°C, com fonte de ionização por impacto de elétrons de 70eV. A faixa de “*scanning*” de massa foi de 35 a 350 m/z. A demora no início de atuação do espectrômetro de massas (*delay*) foi de 4 minutos. A identificação dos compostos orgânicos voláteis dos OEs, em ambos os equipamentos, foi realizada usando o Índice de Retenção linear (IRL) (ADAMS, 2007) obtido a partir dos padrões autênticos e auxílio da biblioteca de espectros de massas do NIST (National Institute of Standard and Technology, 2008), ADAMS (2007), literatura e data base acessada online “Odour and Pherobase (ODOUR, 2013).

2.4. Microrganismos

Os microrganismos utilizados nos experimentos anti*Candida* foram três linhagens padrão obtidas da American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA) fornecidas pelo INCQS (Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde) e três pertencentes ao banco de linhagens do Laboratório de Microbiologia Aplicada da Universidade Federal de Sergipe e aqui utilizadas em testes anteriores: *Candida albicans* (ATCC 18804), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019), *Candida glabrata* (ATCC 2001), *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* e *Candida glabrata*. As linhagens clínicas foram isoladas de mulheres com candidíase vaginal recorrente, obtidas em estudos anteriores. Os isolados clínicos foram identificados através de métodos fenotípicos e moleculares (seminested-PCR), (SANTOS, 2011).

As cepas foram mantidas em ágar Sabouraud dextrose - ASD a uma temperatura de 4 °C, sendo utilizados para os ensaios repiques de 24 horas em

ASD incubados a 35°C. No estudo da atividade antimicrobiana utilizou-se um inóculo fúngico de aproximadamente 10⁵ UFC/mL padronizado de acordo com a turbidez do tubo 0,5 da escala de McFarland. Utilizou-se como meio de cultura o Roswell Park Memorial Institute – 1640 (RPMI 1640) contendo L-glutamina e glicose a 2%; o pH foi ajustado a 7.0 com ácido morfolinepropanosulfônico (MOPS) numa concentração final <1%.

2.5. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Fungicida Mínima (CFM)

A avaliação da atividade *antiCandida* foi realizada pela técnica de microdiluição para as folhas e frutos secos, de acordo com a metodologia descrita no Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008). A determinação da CIM foi realizada através de ensaios de microdiluição em meio Roswell Park Memorial Institute – 1640 (RPMI 1640) contendo L-glutamina e glicose a 2%; o pH foi ajustado a 7.0 com ácido morfolinepropanosulfônico (MOPS). Para auxiliar na dissolução do óleo essencial foi utilizado o DMSO (dimetilsulfóxido) numa concentração final < 1%.

A CIM foi interpretada como a menor concentração capaz de inibir o crescimento visível das leveduras em comparação com a amostra controle (sem o agente antimicrobiano).

Para verificar o efeito fungicida do óleo essencial foram plaqueados em ágar Sabouraud 100 µl das concentrações que não apresentaram nenhum crescimento visível após 48h de incubação, em seguida, as placas foram incubadas a 37°C por 48h. As concentrações que não apresentaram crescimento nas placas correspondentes foram consideradas como fungicidas (SANTOS, 2011).

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e a média dos valores calculados.

2.6. Técnica de difusão em meio sólido

O ensaio de atividade *antiCandida* utilizado para as folhas e frutos frescos da *S. terebinthifolius* foi realizado através da técnica de difusão em meio

sólido (Ostrosky et al., 2008). Adicionou-se 20 mL do meio de cultura Agar Sabouraud Dextrose (HIMEDIA®, São Paulo, Brasil) - (ASD) em cada placa de Petri descartável. Sobre o ASD foram semeadas as linhagens fúngicas (inóculos preparados em solução salina), utilizando-se swabs alginatados. Em seguida, foram inseridos sobre superfície do ASD discos absorventes estéreis previamente imersos em 5 µL do óleo essencial das folhas e frutos frescos de *S. terebinthifolius*. Como controle negativo foram utilizados discos imersos em solução salina.

A utilização de material fresco na pesquisa foi acrescentado ao final do projeto como uma forma de comparação com o protocolo utilizado de secagem do material botânico. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e a média dos valores calculados.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A composição química do óleo essencial presente na amostra de folhas secas (OF) de *Schinus terebinthifolius* Raddi, está representada na Tabela 2 e o seu perfil cromatográfico pode ser observado na Figura 2. A Tabela 2 demonstra os registros de 44 compostos, dos quais 34 foram identificados no presente trabalho, correspondente a 100,0% do óleo essencial. Nesta amostra os compostos majoritários foram: Canfeno (20,121%), α -Felandreno (19,207%), R- α -Pinoeno (19,129%), Beta-Cariofileno (13,279%), 3-Careno (6,009%), representando aproximadamente 78% da composição do óleo.

Trinta e quatro compostos, incluindo mono e sesquiterpenos foram identificados, com um teor de cerca de 0,45% (m / m) de peso das folhas secas.

O óleo essencial presente na amostra de frutos maduros (OFM) representado na Tabela 1 e o perfil cromatográfico observado na Figura 3 demonstra o registro de 38 compostos, dos quais 33 foram identificados no presente trabalho, correspondendo a aproximadamente 100% do óleo. Nesta amostra, os compostos: R- α -pinoeno (22,149), β -Pinoeno (18,276), α -Felandreno (17,412), Canfeno (11,519), 3-Careno (5,614) representam aproximadamente 75% da composição do óleo.

Trinta e três componentes, incluindo mono e sesquiterpenos foram identificados, com um teor de cerca de 2,8% (m / m) de peso do fruto maduro seco.

Tabela 1- Teores (%) dos compostos identificados dos óleos essenciais de frutos maduros secos de *Schinus terebinthifolius* Raddi

Nº	Tr	Composto	IRL	AREA %	Ref. Adams (2007)
1	5,404	α-Pineno	931	22,149	932
2	6,71	β-Pineno	986	18,276	974
3	7,347	α-Felandreno	1002	17,412	1002
4	7,52	3-Careno	1007	5,614	1008
5	7,977	m-Cimeno	1020	4,422	1082
6	8,131	Canfeno	1024	11,519	946
7	10,223	α- Terpinoleno	1083	1,126	1086
8	12,048	cis-p-Menta-2,8-dien-1-ol	1130	0,175	1133
9	12,18	trans-Pinocarveol	1134	0,508	1135
10	12,433	Canfor	1140	0,082	1141
11	12,578	NI	1145	0,048	
12	13,037	trans-3-Caren-2-ol	1155	0,13	
13	13,31	NI	1162	0,723	
14	13,387	NI	1164	0,173	
15	13,53	NI	1167	0,896	
16	13,733	δ-Terpineol	1172	0,88	
17	13,93	m-Cimen-8-ol	1177	0,184	1176
18	14,058	p-Cimen-8-ol	1180	0,201	1179
19	14,144	Criptona	1182	0,145	1183
20	14,294	α-Terpineol	1186	0,772	
21	14,535	Mirtenol	1191	0,238	1194
22	14,74	cis-Pinocarveol	1197	1,316	1182
23	14,994	cis-Piperitol	1198	0,082	1195
24	15,641	Diidro acetato de mircenal	1214	1,636	
25	16,21	NI	1228	3,272	
26	17,794	Felandral	1266	0,239	
27	18,29	Acetato de bornila	1278	0,473	1287
28	18,945	p-Cimen-2-ol=Carvacrol	1295	0,182	1298
29	23,786	beta-Cariofileno	1413	1,487	
30	25,159	Aloaromadendreno	1446	0,11	1458
31	26,277	Germacreno D	1473	0,461	1484
32	28,978	Elemol	1543	2,032	1548

Tabela 1- Teores (%) dos compostos identificados dos óleos essenciais maduros secos de *Schinus terebinthifolius* Raddi

33	30,243	Óxido de cariofileno	1577	0,375	1582
34	31,616	γ-Eudesmol	1614	0,075	1622
35	32,077	epi-Cubenol	1627	0,901	
36	32,744	Cubenol	1644	0,728	1645
37	32,845	Agarospírol	1647	0,83	1646
38	33,398	Eudesm-7(11)-en-4-ol	1662	0,07	
TOTAL				100%	

IRL – Índice de Retenção Linear, NI – Não Identificado

Tabela 2- Teores (%) dos compostos identificados dos óleos essenciais das folhas secas de *Schinus terebinthifolius* Raddi

Nº	Tr	Composto	IRL	Area %	Ref. Adams (2007)
1	5,489	α-Pineno	934	19,129	932
2	6,621	β-Pineno	976	1,677	974
3	7,447	α-Felandreno	1005	19,207	1002
4	7,593	3-Carene	1009	6,009	1008
5	7,74	m-Cimeno	1013	0,141	1082
6	8,365	Canfeno	1031	20,121	
7	9,151	trans-3-Caren-2-ol	1053	0,091	
8	10,184	α- Terpinoleno	1082	0,524	1086
9	11,49	NI	1117	0,141	
10	12,195	trans-Pinocarveol	1134	0,058	1135
11	12,547	Canfor	1143	0,015	1141
12	13,736	δ-Terpineol	1172	0,046	1162
13	13,889	m-Cimen-8-ol	1176	0,051	1176
14	14,019	p-Cimen-8-ol	1179	0,008	1179
15	14,126	Criptona	1182	0,035	1183
16	14,289	α-Terpineol	1186	0,295	1186
17	14,484	Mirtenol	1190	0,009	1194
18	14,74	cis-Pinocarveol	1197	0,12	1182
19	14,996	cis-Piperitol	1198	0,029	1195
20	16,91	(-)-cis-Sabinol	1245	0,467	
21	17,602	Felandral	1262	0,058	
22	18,292	Acetato de bornila	1279	0,035	1287
23	18,944	p-Cimen-2-ol=Carvacrol	1294	0,072	1298
24	20,435	NI	1331	0,109	
25	22,011	NI	1369	0,31	
26	22,745	NI	1387	2,621	
27	23,946	beta-Cariofileno	1416	13,279	1417
28	25,184	Aloaromadendreno	1447	1,296	1458

Tabela 2- Teores (%) dos compostos identificados dos óleos essenciais das folhas secas de *Schinus terebinthifolius* Raddi

29	26,26	Germacreno D	1475	5,446	1484
31	26,513	NI	1479	0,607	1582
32	26,862	NI	1488	0,525	
33	26,919	β -Selineno	1489	0,789	1489
34					
35	27,294	α -Selineno	1498	2,546	1498
36	27,985	δ -Cadineno	1517	0,476	1522
37	28,508	NI	1531	0,019	
38	30,259	Óxido de cariofileno	1578	1,127	1582
39	31,232	NI	1604	0,11	
40	31,54	γ -Eudesmol	1612	0,12	1622
41	32,656	Agarospírol	1642	1,666	1646
42	33,405	Eudesm-7(11)-en-4-ol	1662	0,142	1662
43	34,874	NI	1701	0,4	
44	35,326	NI	1714	0,043	
TOTAL			100,00%		

IRL - Índice de Retenção Linear, NI – Não Identificado

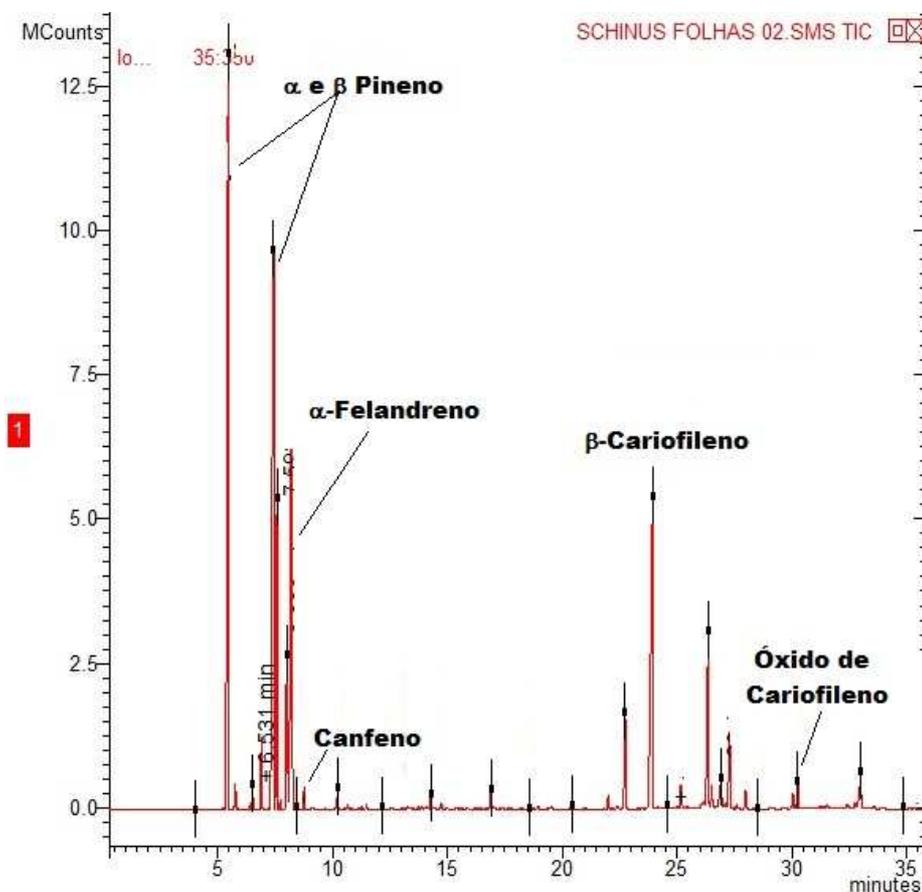


Figura 2. Perfil cromatográfico do óleo essencial das folhas secas de *Schinus terebinthifolius* Raddi.

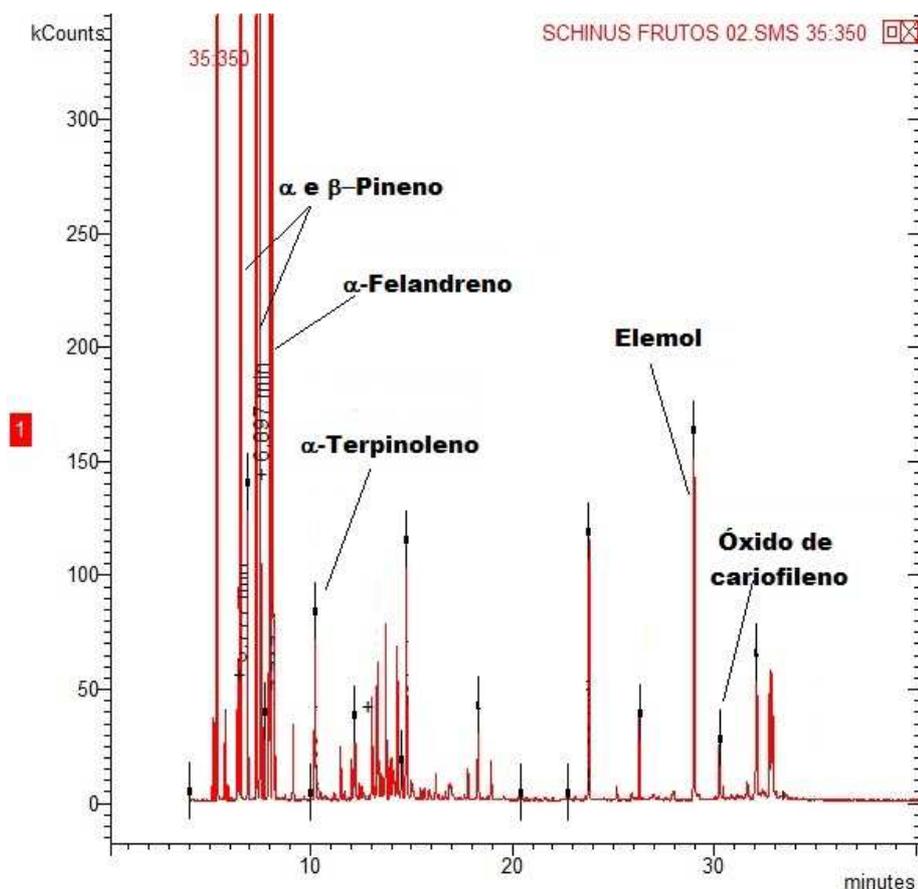


Figura 3. Perfil cromatográfico do óleo essencial dos frutos maduros secos de *Schinus terebinthifolius* Raddi.

Em comparação com o presente estudo, podemos citar o trabalho de Santos et al. (2009) que identificou os compostos sabineno, alfa-pineno, cariofileno e germacreno-D como principais compostos, em análise química com folhas de *Schinus terebinthifolius* Raddi.

Santos et al. (2010), destacaram como compostos em maior proporção os monoterpenos α -3-careno, limoneno e α -felandreno em óleo essencial dos frutos maduros de *S. terebinthifolius*. Gehrke et al. (2008), observaram que os principais compostos encontrados no óleo essencial dos frutos de *S. terebinthifolius* da região noroeste do estado do Rio Grande do Sul foram os monoterpenos, α -3-careno e o α -pineno representando aproximadamente 40% dos constituintes. Affonso et al (2012) identificaram como componentes principais α -fencheno (20,75%), β -pineno (10,11%), β -mirceno (9,30%), α -felandreno (14,94%), limoneno (20,81%) e isosylvestrene (13,87%). Alguns compostos como o β -pineno e o α -felandreno aparecem com porcentagens

próximas às encontradas no presente trabalho, porém, os outros compostos encontrados, distanciam-se nos valores percentuais.

Richter et al. (2010), indicou que α -pineno (16,9%), α -felandreno (21,1%), β -felandreno (10,8%) e limoneno (23,7%) foram os principais constituintes de frutos de *S.terebinthifolius*.

Outra análise cromatográfica de óleos essenciais obtidos de frutos da aroeira encontrou sesquiterpenos, como o β -eudesmol e elemol, sobre os quais há relatos de potencial terapêutico contra amnésia induzida por doenças como o Alzheimer (MONTANARI, 2010).

Leite et al (2007) avaliou a efetividade de eugenol, β -pineno e α -pineno em inibir o crescimento de linhagens de bactérias Gram-positivas potencialmente causadoras de endocardite infecciosa. Eles mostraram a efetividade destes fitoconstituintes em inibir todas as linhagens bacterianas de *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae* e *S. pyogenes* utilizadas como microrganismos testes, apresentando valores de CIM entre 2.5 e 40 μ L/mL.

A maioria das amostras de óleo essencial a partir de folhas, flores e/ou frutos de *S.terebinthifolius* recolhidos em diferentes locais revelou α -pineno como o principal componente, em especial naqueles de origem Indiana (51,82%) (AFFONSO et al, 2012), o que corrobora com nossa pesquisa em relação aos frutos de *S. terebinthifolius*. Enquanto que em plantas do Egito destacou-se o α -felandreno (24,2%) (SOUZA, 2012).

Nas atividades antifúngicas foi verificado que as linhagens fúngicas avaliadas mostraram-se mais susceptíveis à ação do óleo essencial dos frutos maduros e secos da aroeira em relação ao óleo das folhas secas.

A Tabela 3 mostra, com base nos valores das concentrações inibitórias mínimas (CIM) e fungicidas mínimas (CFM) obtidos nos testes de microdiluição (Figura 4), que o óleo essencial do fruto maduro apresentou atividade contra *C. parapsilosis* (ATCC 22019) e seu isolado clínico (CIM de 25mg/ml) e *C. albicans* (ATCC 18804) e *C. glabrata* (ATCC 2001) (CIM 200mg/ml), não sendo ativo frente aos isolados clínicos destas. Em se tratando das cepas padrão, a ação fungistática observada, pode indicar, possivelmente, uma resistência intrínseca, já que, por estas não estarem em interação constante e direta com o ambiente, mantêm suas características genéticas preservadas com possibilidade extrema de adquirir fatores de resistência externos, ou seja, o

comportamento das cepas sugere uma resistência inerente às leveduras, também denominada, resistência natural.

Em relação ao óleo essencial das folhas secas não foi observada ação significativa frente às linhagens em estudo. Em se tratando da ação fungicida, a mesma não foi demonstrada em relação aos óleos essenciais das folhas e frutos secos de *S. terebinthifolius* Raddi.

Tabela 3 – Valores de CIM e CFM (0,39 a 400mg/mL) dos óleos essenciais dos frutos e folhas de *Schinus terebinthifolius* Raddi

Espécies de <i>Candida</i>	Óleo essencial das folhas secas		Óleo essencial dos frutos maduros secos	
	CIM	CFM	CIM	CFM
<i>C.albicans</i> (ATCC 18804)			200	
<i>Candida glabrata</i> (ATCC 2001)			200	
<i>Candida parapsilosis</i> (ATCC 22019)			25	
<i>C.albicans</i> (isolado clínico)				
<i>Candida glabrata</i> (isolado clínico)				
<i>Candida parapsilosis</i> (isolado clínico)			25	

|=Inativo

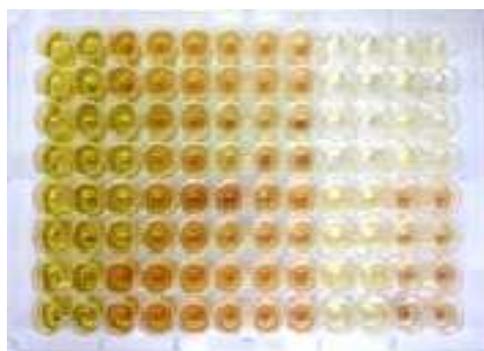


Figura 4 – Teste de microdiluição para obtenção das concentrações inibitórias mínimas (CIM) e fungicidas mínimas (CFM).

Santos et al (2010) em estudos com extratos etanólicos das sementes de *Schinus terebinthifolius* em cepas de *Candida albicans* e *Candida tropicalis* demonstrou a não atividade nas cepas avaliadas, já o extrato das folhas inibiu significativamente o crescimento de *Candida albicans* (ATCC18804).

Freires et al (2011) verificaram que as linhagens fúngicas de *Candida albicans* (ATCC 289065), *C. tropicalis* (ATCC 40147) e *C. krusei* (ATCC 40042) avaliadas, mostraram-se susceptíveis à ação da tintura da casca da aroeira.

Catão et al (2012) demonstraram que o tratamento com a tintura da aroeira foi eficaz no tratamento da estomatite protética, promovendo remissão do processo inflamatório e da infecção por *Candida* spp.

Alves et al (2009) avaliaram a ação antimicrobiana *in vitro* do extrato hidroalcoólico da aroeira sobre *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus sanguis* e *Lactobacillus casei*, verificando atividades bacteriostática e bactericida do produto sobre os microrganismos testados. Além disso, também exerceu ação antifúngica sobre *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei*.

Além do potencial antifúngico, confirmaram, *in vitro*, as atividades bacterianas da aroeira frente à *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus sanguis* e *Lactobacillus casei* (ALVES et al., 2009)

Degáspari et al (2005) em seu estudo antibacteriano com o extrato alcoólico obtido a partir dos frutos de *Schinus*, apresentou efeito inibitório destes sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*, já o extrato aquoso não apresentou efeito inibitório sobre o crescimento dos microrganismos testados.

Paulo et al (2009) demonstrou que em estudos científicos realizados com a casca do caule de *Schinus terebinthifolius* foi detectada a presença de taninos, que lhe conferem a ação adstringente, desinfetante e antiinflamatório. Paulo et al, 2009 mostra ainda que em estudos pré-clínicos, utilizando o decocto, ficou comprovado a sua eficácia como protetor gástrico, elevando o pH do suco gástrico de 5,85 para 6,57. Paulo et al, 2009 afirma que foi comprovada também, em estudos clínicos a ação terapêutica em cervicites e

cérvico-vaginites crônicas, utilizando tampões intravaginais, em contato com a cérvix durante 24 horas. Paulo et al, 2009 ainda afirma que o hidrolato de um preparado medicamentoso, composto por três plantas, entre elas, o *S. terebinthifolius*, mostrou propriedades antiinflamatórias.

Montanari (2010) em estudo com o óleo essencial das folhas de *S. terebinthifolius*, demonstrou que o mesmo possuía atividade moderada para bactérias Gram positivas (*Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*) e bactérias Gram negativas (*Escherichia coli*).

Os ensaios realizados com as folhas e frutos frescos da *S. terebinthifolius*, no presente trabalho, por meio da técnica de difusão em meio sólido apresentaram resultados significativos comparados aos materiais botânicos secos (Figura 5).

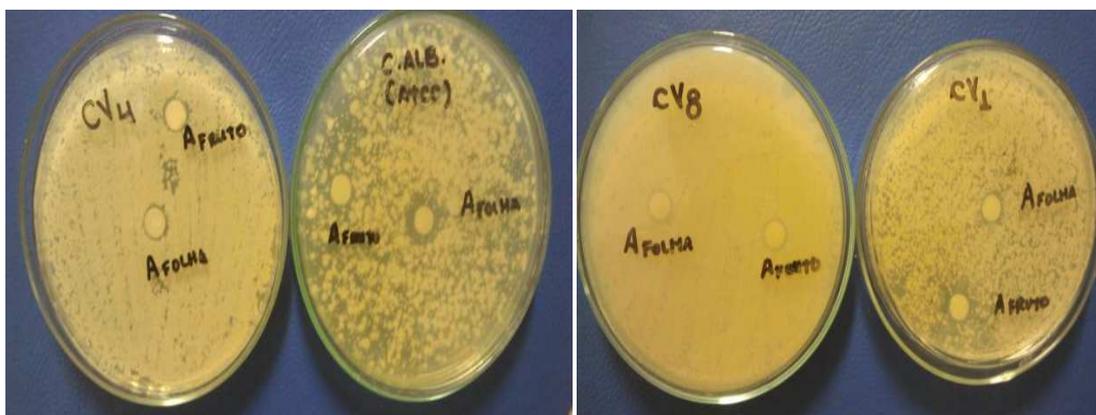


Figura 5. Teste de difusão em meio sólido das folhas e frutos frescos da *S. terebinthifolius*

Nestes ensaios foi observada a atividade anti*Candida* nos testes feitos com os óleos das folhas e frutos frescos da *S. terebinthifolius* em praticamente todas as cepas testadas, com exceção da linhagem padrão de *C. glabrata* resistente ao óleo essencial dos frutos frescos. Os diâmetros dos halos de inibição variaram entre 05 a 14 mm para o óleo das folhas frescas e, entre 07 a 12 mm, para o óleo dos frutos frescos (Tabela 4).

Comparando o resultado de atividade anti*Candida* obtido para o óleo essencial extraído a partir de material vegetal seco e o óleo essencial obtido de material vegetal fresco, foi concluído que o material fresco apresentou melhores resultados, sendo potencial para testes de CIM posteriores.

Tabela 4. Diâmetro dos halos de inibição (mm) dos óleos essenciais de folhas e frutos frescos de *S. terebinthifolius* frente às linhagens de *Candida* estudadas

	CV1 (<i>C.glabatra</i>)	CV4 (<i>C.albicans</i>)	CV8.3 (<i>C.parapsilosis</i>)	(<i>C.glabatra</i>) ATCC	(<i>C.albicans</i>) ATCC	(<i>C.parapsilosis</i>) ATCC
FOLHAS	07 mm	05 mm	07 mm	07 mm	14 mm	08 mm
FRUTOS	12 mm	07 mm	07 mm	Resistente	10 mm	07 mm

Os resultados desta pesquisa propiciam a continuidade dos estudos sobre *S. terebinthifolius*, levando-se em consideração que não foram encontrados estudos sobre a atividade antifúngica do óleo essencial de *S. terebinthifolius* relacionados à *Candida* sp..

4. CONCLUSÃO

Comparando o presente trabalho com a literatura, observamos que muitos dos principais compostos presentes nos óleos essenciais da *S. terebinthifolius* Raddi, são os mesmos, tendo uma maior variação em seus teores (%).

Diante destes resultados, foi observado, que a composição química dos óleos essenciais de *Schinus terebinthifolius* Raddi mostrou variações as quais podem estar relacionados com as estratégias reprodutivas e interações ambientais, as variações genéticas dentro das mesmas espécies, época de coleta, forma de plantio, adubação, irrigação, idade da planta, processamento pós-colheita do material vegetal, variações geográficas (latitude, longitude e altitude), assim como os tipos climáticos e do solo, técnicas de extração, variando assim as características químicas dos constituintes ativos.

Em se tratando dos resultados microbiológicos, este estudo demonstrou uma maior sensibilidade das *C. parapsilosis* padrão (ATCC 22019) e clínica, *C. albicans* (ATCC 18804) e *C. glabrata* (ATCC 2001) frente ao óleo essencial dos frutos de *S. terebinthifolius* Raddi. Com relação ao óleo essencial das folhas secas não houve nenhuma ação inibitória contra as linhagens testadas. Apesar de se ter observado uma ação inibitória (ação fungistática) do óleo essencial dos frutos secos da planta em estudo, não houve ação fungicida

dos óleos essenciais dos frutos e folhas secos da *Schinus terebinthifolius* Raddi.

Com relação aos testes com as folhas e frutos frescos da *S. terebinthifolius* Raddi, a atividade anti*Candida* foi demonstrada em praticamente todas as linhagens, salvo, a linhagem padrão de *C. glabrata* resistente ao óleo essencial dos frutos frescos.

Pode-se concluir que os óleos essenciais de folhas secas e frutos maduros secos da *Schinus terebinthifolius* Raddi não apresentam atividade anti*Candida* perante as espécies aqui estudadas, porém, o mesmo material botânico fresco apresenta resultados promissores e abre novas linhas de pesquisa e continuidade sobre esta planta.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R.P. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy. Allured Publ. Corp., Carol Stream, Chicago, 2007.

AFFONSO, C.R.G; FERNANDES, R.M; OLIVEIRA, J.M.G.; CARVALHO e MARTINS, M.C.; LIMA, S.G.; JÚNIOR, G.R.; FERNANDES, M.Z.L.C.M.; ZANINI, S.F. Effects of the Essential Oil from Fruits of *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) on Reproductive Functions in Male Rats. **J. Braz. Chem. Soc.**, Vol. 23, No. 1, 180-185, 2012.

ALVES P.M.; QUEIROZ, L.M.G.; PEREIRA, J.V.; PEREIRA, M.S.V. Atividade antimicrobiana, antiaderente e antifúngica *in vitro* de plantas medicinais brasileiras sobre microrganismos do biofilme dental e cepas do gênero *Candida*. **Rev Soc Bras Med Trop.** 42(2): 222-4.2009.

ARAÚJO, J.C.L.V.; LIMA, E.O.; CEBALLOS, B.S.O.; FREIRE, K.R.L.; SOUZA, E.L.; SANTOS FILHO, L. Ação antimicrobiana de óleos essenciais sobre microrganismos potencialmente causadores de infecções oportunistas. **Rev Patol Trop.** 33: 55-64. 2004.

BRUN, G.R.; MOSSI, A. J. Chemical characterization and antimicrobial activity of the volatile oil of pitanga "Brazilian Cherry" (*Eugenia uniflora* L.) **PERSPECTIVA**, Erechim. v.34, n.127, p. 135-142, Setembro/2010.

CATÃO, M.H.C.V.; SILVA, M.S.P.; SILVA, A.D.L.; COSTA, R.O. Clinical Study using Medicinal Plants for the Treatment of Oral Diseases. UNOPAR, **Cient Ciênc Biol Saúde**. 14(4):279-85. 2012.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Zone diameter interpretive standards, corresponding minimal inhibitory concentration (MIC) interpretive breakpoints, and quality control limits for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts; Informational supplement, 2nd ed, CLSI document M44-S2, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA 2008.

DEGÁSPARI, C.H.; WASZCZYNSKYJ, N.; PRADO, M.R.M. Atividade antimicrobiana de *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Ciênc. agrotec.** vol. 29 no.3 Lavras May/June 2005.

DESOTI, V.C.; MALDANER, C.L.; CARLETTO, M.S.; HEINZ, A.A.; COELHO, M.S.; PIATI, D.; TIUMAN, T. S. Triagem fitoquímica e avaliação das atividades antimicrobiana e citotóxica de plantas medicinais nativas da região oeste do estado do Paraná. **Arq. Ciênc. Saúde UNIPAR**, Umuarama, v. 15, n. 1, p. 3-13, jan./abr. 2011.

FREIRES, I.A., ALVES, L.A., JOVITO, V.C., CASTRO, R.D. Antifungal activity of *Schinus terebinthifolius* (Aroeira) on *Candida* strains. **Rev Odontol Bras Central**. 20(52). 2011.

GEHRKE, I.T.S.; STOLZ, E.D. & MOREL, A.F. Identificação dos principais constituintes do óleo essencial dos frutos de *Schinus terebinthifolius* da região noroeste do RS. In: 30a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 2008.

GILBERT, B.; FAVORETO, R. *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Revista Fitos**. Vol.6, n. 1. Dez. 2011.

LEITE, A.M., LIMA, E.O., SOUZA, E.L., DINIZ, M.F.F.M., TRAJANO, V.N., MEDEIROS, I.A. Inhibitory effect of β -pinene, α -pinene and eugenol on the growth of potential infectious endocarditis causing Gram-positive bacteria Revista Brasileira de

Ciências Farmacêuticas **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. vol. 43, n. 1, jan./mar., 2007.

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

LUCENA, P.L.H., FILHOS, J.M.R., CZECZKO, M.M.N.G., DIETZ, U.A., NETO, M.A. C., HENRIQUES, G.S., SANTOS, O.J., CESCHIN, A.P., THIELE, E.S. Evaluation of the aroreira (*Schinus terebinthifolius Raddi*) in the healing process of surgical incision in the bladder of rats. 46 - **Acta Cirúrgica Brasileira** - Vol 21 (Suplemento 2) 2006.

MONTANARI, R.M. Composição Química e atividades biológicas dos óleos essenciais de espécies de Anacardiaceae, Siparunaceae e Verbenaceae. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agroquímica da Universidade Federal de Viçosa, UFV, Minas Gerais, 2010.

ODOUR and PHEROBASE, 2013. Disponível em: <<http://www.odour.org.uk> e [pherobase.com](http://www.pherobase.com)>. Acesso em: 10 Janeiro. 2013.

OSTROSKY, E.A.; MIZUMOTO, M.K.; LIMA, M.E.L.; KANEKO, T.M.; NISHIKAWA, S.O.; FREITAS, B.R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Rev bras farmacogn**. vol.18 no. 2 João Pessoa Apr./June 2008.

PAULO. P.T.C.; DINIZ, M.F.F.M.; MEDEIROS, I.A., MORAIS, L.C.S.; ANDRADE, F.B., SANTOS, H.B. Ensaios clínicos toxicológicos, fase I, de um fitoterápico composto (*Schinus terebinthifolius Raddi*, *Plectranthus amboinicus Lour* e *Eucalyptus globulus Labill*). **Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy** 19(1A): 68-76, Jan./Mar. 2009.

PESSINI, G.L. et al. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de extratos de plantas utilizados na medicina popular. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.13, supl., p.21-24, 2003.

RIBAS, M.O. et al. Efeito da *Schinus terebinthifolius Raddi* sobre o processo de reparo tecidual das lesões ulceradas induzidas na mucosa bucal do rato. **Rev. Odonto Cienc.** – Fac. Odonto/PUCRS, v.21, nº 53, pág. 245-252, 2006.

RICHTER, R.; VON REUB, S. H.; KÖNIG, W. A.; Spirocyclopropane-type sesquiterpene hydrocarbons from *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Phytochemistry**. 71, 1371.2010.

SALVI JÚNIOR, ADEMIR. *Schinus terebinthifolius* Raddi: estudo anatômico e histoquímico das folhas e investigação do potencial farmacêutico do extrato etanólico e suas frações. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP Araraquara, 2009.

SANTOS, E.B.; DANTAS, G.S.; SANTOS, H.B.; DINIZ, M.F.F.M.; SAMPAIO, F.C. Estudo etnobotânico de plantas medicinais para problemas bucais no município de João Pessoa, Brasil. **Rev. bras. farmacogn.** 19(1B): 321-4. 2009.

SANTOS, A.C.A., ROSSATO, M., SERAFINI, L.A., BUENO, M., CRIPPA, L.B., SARTORI, V.C., DELLACASSA, E., MOYNA, P. Efeito fungicida dos óleos essenciais de *Schinus molle* L. e *Schinus terebinthifolius* Raddi, Anacardiaceae, do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Farmacognosia**.20(2): 154-159, Abr./Mai. 2010.

SANTOS, P.O. Caracterização fisiológica e molecular de *Candida albicans* envolvidas em casos de candidíase vaginal e prospecção de óleos essenciais anti-*Candida*. Tese (Doutorado em Biotecnologia) Universidade federal de Sergipe, 2011.

SOUZA, D.C.L. Diversidade genética, produção de frutos e composição química em *Schinus terebinthifolius* Raddi. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas) – Universidade Federal de Sergipe, 2012.

THOMPSON, A.; TAYLOR, B.N. Guia para o Uso do Sistema Internacional de Unidades (**SI**). NIST Special Publication 811. Ed. 2008.

VEIGA JÚNIOR, V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

CAPÍTULO III

***Ocimum basilicum* L. (cultivar Maria Bonita) - desenvolvimento de um creme vaginal para tratamento de candidíase**

1. Introdução

O gênero *Ocimum*, família Lamiaceae, compreende em torno de 3200 espécies orinárias do sudeste asiático e da África Central que se adaptaram bem aos solos brasileiros. Pode ser anual ou perene atingindo em média um metro de altura, sendo cultivado praticamente em todas as regiões do Brasil, principalmente na região Nordeste (ALVES, 2012). As plantas deste gênero apresentam grande diversidade de espécies, sendo conhecidas, popularmente, como alfavacas e manjericões (VIEIRA, 2009; BLANK et al., 2004; LORENZI & MATOS, 2002). A nomenclatura botânica correta para as espécies do gênero *Ocimum* é de grande interesse, devido a grande ocorrência de polinização cruzada, facilitando hibridações e resultando em um grande número de subespécies, variedades e formas.

A cultivar Maria Bonita é proveniente do acesso PI 197442, oriundo do Banco de Germoplasma North Central Regional PI Station, Iowa State University, EUA. É a primeira cultivar de manjericão melhorada e registrada no Registro Nacional de Cultivares (RNC) pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento no Brasil, e foi obtida a partir do programa de melhoramento genético da Universidade Federal de Sergipe (BLANK et al., 2007).

O manjericão (*Ocimum basilicum*) é uma planta tradicionalmente utilizada como erva medicinal no tratamento de cefaléia, tosse e diarréia, entre outros; é também considerado fonte de componentes aromáticos (REIS et al., 2012). A planta inteira de *Ocimum basilicum* L. tem valor medicinal, embora na maior parte, as folhas, e às vezes as sementes, são usados. As folhas de *Ocimum basilicum* L. são demonstradas como uma promessa de componentes biologicamente ativos como repelente de insetos, nematocida, antibacteriana, antifúngica e apresenta propriedades antioxidantes. É também usada como um agente anti-emético (SAHA et al., 2012).

O óleo essencial extraído de várias partes da planta tem apresentado atividade antimicrobiana frente a bactérias, (*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* dentre outras) (AQUINO et al, 2010). A atividade antimicrobiana do óleo essencial do manjeriço tem sido relatada como sendo predominantemente associada aos seus constituintes majoritários, o metil chavicol e o linalol (MARTINS et al., 2010). Porém, outros estudos revelam que o sinergismo entre os compostos presentes no óleo essencial de *O. basilicum* L. é que é determinante na ação anti-*Candida* (SANTOS, 2011).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material Botânico

Os exemplares de *Ocimum basilicum* L. (cultivar Maria Bonita) foram obtidos na Fazenda Experimental do “Campus Rural da UFS”, localizada no município de São Cristóvão, Sergipe, Brasil (10^o55`32``S, 37^o06`08``W), as folhas e inflorescências foram coletadas em junho de 2009 e colocadas em estufa (model MA- 037/18) com renovação de ar à temperatura de 40°C, por 120 horas até a desidratação completa (SANTOS, 2011).



Figura 6. Exemplares de *Ocimum basilicum* (Maria-bonita) cultivadas no campo rural da Universidade Federal de Sergipe, município de São Cristóvão, Sergipe, Brasil.

Fonte: (SANTOS, 2011).

2.2. Obtenção dos óleos essenciais, identificação e quantificação dos compostos químicos

O óleo essencial das folhas secas de *Ocimum basilicum* L. (cultivar Maria-Bonita) foi obtido por hidrodestilação (por 140 min) em aparelho Clevenger modificado (EHLERT et al, 2006). O óleo essencial depois de extraído foi separado da solução aquosa (hidrolato) e transferido para frasco âmbar, sendo conservado à temperatura de - 20°C até o momento do uso (SANTOS, 2011).

2.3. Cromatografia Gasosa – Espectrometria de Massas (CG-EM)

A realização da análise da composição química do óleo essencial foi realizada em cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas CG-EM (Shimadzu, modelo QP 5050A), equipado com um autoinjeter AOC-20i (Shimadzu) e coluna capilar de sílica fundida J&W Scientific (5%-fenil-95%-dimetilpolissiloxano) de 30m x 0.25mm d.i., 0.25 µm de filme; hélio (99.999%) foi usado como fase móvel a uma vazão constante de 1,2 mL min⁻¹. Um volume de injeção de 0.5 µL (em acetato de etila; razão de split de 1:100); foi usada temperatura do injetor de 250 °C e temperatura do detector de 280 °C. A temperatura do forno foi programada iniciando em 50 °C por 1,5 min, seguido de um aumento de 4°C/min até atingir 200 °C, depois a 10 °C até atingir 250 °C e mantendo-se constante esta temperatura por 5 min. O espectrômetro de massas usado constituiu-se de analisador de captura iônica operando por impacto de elétrons a 70 eV; velocidade de varredura 1.000; intervalo de varredura de 0,50 fragmentos/s e fragmentos registrados na faixa de 40 a 450 Da (SANTOS, 2011).

2.4. Cromatografia em fase Gasosa – Detector de Ionização de Chamas (CG-DIC)

A quantificação dos componentes foi realizada em Cromatógrafo a Gás equipado com detector de ionização de Chamas (DIC), usando um equipamento Shimadzu, modelo GC-17A, nas seguintes condições: coluna capilar de sílica fundida ZB-5MS (5%-fenil-95%-dimetilpolissiloxano) com 30m x 0.25mm d.i., 0.25 µm de filme, sob as mesmas condições do CG-EM. Os componentes foram expressos por normalização da área (%). Os teores relativos dos compostos foram calculados a partir da área e colocados em ordem de eluição do CG. Os índices de retenção experimentais (IR) foram calculados através de uma série homóloga de hidrocarbonetos lineares (faixa de nC8 – nC18), aplicando a equação de Van den Dool e Kratz (1963). A identificação dos componentes foi então realizada através da comparação dos espectros obtidos com os do banco de dados do equipamento (NIST05, NIST107 e WILEY8) e pela comparação dos índices de retenção com aqueles da literatura (ADAMS, 2007).

Tabela 5 - Constituintes químicos do óleo essencial das folhas secas de *Ocimum basilicum* obtidos por hidrodestilação

Nº	TR (min)	Composto	(%) GC-FID	IRR exp.*	IRR lit.**
1	8.050	Sabineno	0,21	970	975
2	8.208	β-Pineno	0,44	975	979
3	10.100	1,8 Cineol	4,87	1030	1032
4	12.625	Linalol	72,08	1100	1096
5	16.108	α-Terpineol	0,58	1194	1188
6	18.133	Geraniol	13,00	1249	1252
7	19.350	Acetato de isoborneol	0,27	1282	1285
8	22.633	Acetato degeraniol	2,88	1376	1381
9	23.008	β-Elemeno	0,32	1386	1390
10	24.475	α-trans-Bermagoteno	1,61	1430	1434
11	26.050	Germacreno D	0,80	1477	1485
12	27.075	γ-Cadineno	0,60	1509	1513
13	31.067	epi-α-Cadinol	1,85	1638	1640
Total			99,51		

*IR exp = Índice de Retenção experimental. **IR lit =Índice de Retenção descrito na literatura.
Fonte: (ADAMS, 2007) (SANTOS, 2011).

2.5. Microrganismos

Os microrganismos utilizados nos experimentos anti-*Candida* foram três linhagens padrão obtidas da American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA) fornecidas pelo INCQS (Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde) e três pertencentes ao banco de linhagens do Laboratório de Microbiologia Aplicada da Universidade Federal de Sergipe e aqui utilizadas em testes anteriores: *Candida albicans* (ATCC 18804), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019), *Candida glabrata* (ATCC 2001), *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* e *Candida glabrata*. As cepas clínicas foram isoladas de mulheres com candidíase vaginal recorrente, obtidas em estudos anteriores. Os isolados clínicos foram identificados através de métodos fenotípicos e moleculares (seminested-PCR) (SANTOS, 2011).

As linhagens foram mantidas em ágar Sabouraud dextrose - ASD a uma temperatura de 4 °C, sendo utilizados para os ensaios repiques de 24 horas em ASD incubados a 35°C. No estudo da atividade antimicrobiana utilizou-se um inóculo fúngico de aproximadamente 10⁵ UFC/mL padronizado de acordo com a turbidez do tubo 0,5 da escala de McFarland. Utilizou-se como meio de cultura o Roswell Park Memorial Institute – 1640 (RPMI 1640) contendo L-glutamina e glicose a 2%; o pH foi ajustado a 7.0 com ácido morfolinepropanosulfônico (MOPS) numa concentração final <1%.

2.6. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Fungicida Mínima (CFM)

A determinação da CIM para os óleos essenciais de *Ocimum basilicum* (0,78 a 1,56 mg/mL) e seu respectivo composto majoritário: Linalol a 97% (SIGMA) (5.58 a 11.7 mg/mL) foi realizada através de ensaios de microdiluição em meio Roswell Park Memorial Institute – 1640 (RPMI 1640) contendo L-glutamina e glicose a 2%; o pH foi ajustado a 7.0 com ácido morfolinepropanosulfônico (MOPS). Os ensaios de microdiluição foram realizados de acordo com o Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008). Para auxiliar na dissolução do óleo essencial foi utilizado o DMSO (dimetilsulfóxido) numa concentração final <1%.

A CIM foi interpretada como a concentração mais baixa capaz de inibir o crescimento visível das leveduras em comparação com a amostra controle (sem o agente antimicrobiano).

Para verificar o efeito fungicida dos óleos essenciais, foram plaqueadas em ágar Sabouraud 100 µl das concentrações que não apresentaram nenhum crescimento visível após 48h de incubação, em seguida, as placas foram incubadas 37°C por 48h. As concentrações que não apresentaram crescimento nas placas correspondentes foram consideradas como fungicidas. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e a média dos valores calculados (SANTOS, 2011).

2.7. Produção de um creme vaginal anti*Candida* a partir do óleo essencial extraído do *Ocimum basilicum*

Composição do creme não iônico: Cera Polawax® (18%), propilenoglicol (5%), EDTA (0,1%), metilparabeno (0,2%), propilparabeno (0,15%), butilhidroxitolueno (BHT) (0,05%), Crodalan L.A. (4%) e água destilada(q.s.p. 100 %).

Os cremes foram preparados em concentrações de 0,5%, 1% e 2,5% de óleo essencial das folhas do *Ocimum basilicum*.

Modo de preparo:

Os componentes da fase 1 foram pesados: Metilparabeno (Nipagin®), Propilenoglicol e água destilada e levados ao aquecimento até 70°C até a completa uniformização dos componentes.

Os componentes da fase 2 foram pesados: Cera Polawax®, EDTA, BHT, Propilparabeno (Nipazol®) e Crodalan e levados ao aquecimento até total dissolução à 70°C, em seguida verter a fase aquosa na oleosa, de forma lenta, homogeneizar e levar para aquecimento por mais 5 minutos, homogeneizando. Depois, retirar do aquecimento e resfriar, à temperatura controlada (20°C - 25°C), sob agitação constante, adicionar o óleo essencial de *Ocimum basilicum* na temperatura de aproximadamente 30° C.

As amostras com 10g de cada formulação foram acondicionadas em recipientes fechados, opacos, e, colocadas em diferentes condições de armazenamento.

2.8. Avaliação das características organolépticas e da estabilidade do creme vaginal

2.8.1. Estudos de estabilidade da formulação

A estabilidade é definida como o tempo durante o qual a especialidade farmacêutica ou mesmo a matéria prima considerada isoladamente, mantém dentro dos limites especificados e durante todo o período de estocagem e uso, as mesmas condições e características que possuía quando da época de sua fabricação (SILVA et al, 2009).

Os estudos de estabilidade têm por objetivo gerar evidências sobre como varia a qualidade de um fármaco ou de um medicamento em função do tempo, diante de uma série de fatores ambientais, como temperatura, umidade e luz. As informações obtidas também orientam sobre o prazo de validade do medicamento e as condições de armazenamento (FORMULÁRIO NACIONAL DA FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2011).

Diversos fatores podem influenciar na estabilidade das formulações. Os fatores extrínsecos ou externos considerados no estudo da estabilidade são: processos de envelhecimento que ocorrem em consequência do tempo, temperatura de armazenamento e de exposição à luz (fotosensibilidade dos componentes), oxigênio (geração de radicais livres e reações de oxi-redução), umidade, além do material de acondicionamento, contaminação microbiológica e vibração relacionada ao transporte (LARENTES, 2009).

As amostras de creme vaginal com óleo essencial de *Ocimum basilicum* foram armazenadas em recipientes plásticos, opacos, sob três condições distintas: condições de temperatura controlada (20° C - 25° C), refrigerador (5° C) e estufa (45° C) com temperatura controlada. Os testes para análise foram realizados nos tempos 0, 15, 30 e 60 dias (FRIEDRICH et al, 2007).

2.8.2. Avaliação das Características Organolépticas

Para avaliar a estabilidade da formulação foram analisados parâmetros organolépticos do creme vaginal por meio de metodologia de avaliação da estabilidade preliminar apresentada pelo Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos (ANVISA, 2004; ANVISA, 2007).

Os testes de estabilidade representam uma etapa crucial na produção de produtos farmacêuticos, uma vez que a instabilidade de uma formulação modifica seus três requisitos essenciais, que são segurança, qualidade e eficácia.

As amostras do creme vaginal em estudo foram analisadas, levando-se em consideração as características organolépticas, por meio de visualização, considerando qualquer alteração de coloração, odor ou sinal de separação de fases. Para análise dos resultados, foram utilizados critérios apresentados no Quadro 1, adaptado por Bühler & Ferreira (2008) (SOUZA e FERREIRA, 2010).

Quadro 1 - Teste de características organolépticas

N	Normal
LMA	Leve Modificação da Aparência
LMC	Leve Modificação da Cor
LMO	Leve Modificação do Odor
MA	Modificação da Aparência
MC	Modificação da Cor
MO	Modificação do Odor
IMA	Intensamente Modificada da Aparência
IMC	Intensamente Modificada da Cor
IMO	Intensamente Modificada do Odor

Fonte: Bühler & Ferreira (2008)

2.9. Determinação da Atividade AntiCandida *in vitro*

2.9.12. Técnica de perfuração de poços

A determinação da atividade antimicrobiana de fármacos é uma análise microbiológica *in vitro* essencial na avaliação da qualidade de medicamentos antimicrobianos produzidos pelas indústrias farmacêuticas. A Farmacopéia Brasileira IV (1988) recomenda os ensaios microbiológicos por difusão em ágar e turbidimetria como adequados para a avaliação da atividade antimicrobiana quantitativa de antibióticos. A Farmacopéia Brasileira, 4ª edição (1988) também normatiza os principais parâmetros de análise aos diversos antimicrobianos, descritos em monografias. Para a difusão dos fármacos em ágar, indica a perfuração de poços, cilindros de aço inoxidável ou porcelana e discos de papel (VITAL et al, 2004). A atividade antimicrobiana foi avaliada através da técnica de difusão em meio sólido pelo método de perfuração de poços.

Os testes de atividade antimicrobiana dos cremes vaginais, em três concentrações distintas (0,5%, 1,0% e 2,5%) foram testados em comparação a um antibiótico sintético encontrado no mercado, e que, no Brasil tem sido utilizado como primeira alternativa no tratamento de CV, a nistatina (creme vaginal), contudo, são poucas as publicações sobre os resultados *in vitro* desta droga (SANTOS, 2011). Todos os testes foram feitos em triplicata

Com o auxílio de ponteiras estéreis, foram realizadas no Agar, já com os microrganismos semeados, cavidades (poços) de 6 mm de diâmetro, onde foram depositados 0,3g do creme vaginal em suas diferentes concentrações (0,5%, 1% e 2,5%) (Figura 7) e 0,3g de Nistatina (creme vaginal) como controle positivo. Em seguida, a placa foi incubada por 24h a 37°C. Após este período, com o auxílio de um paquímetro manual, foram procedidas as leituras dos halos de inibição (mm), e a atividade antimicrobiana de cada produto avaliado foi positiva, quando a média dos halos de inibição foi igual ou superior a 10mm (Técnica adaptada de CAVALCANTE, 2010).

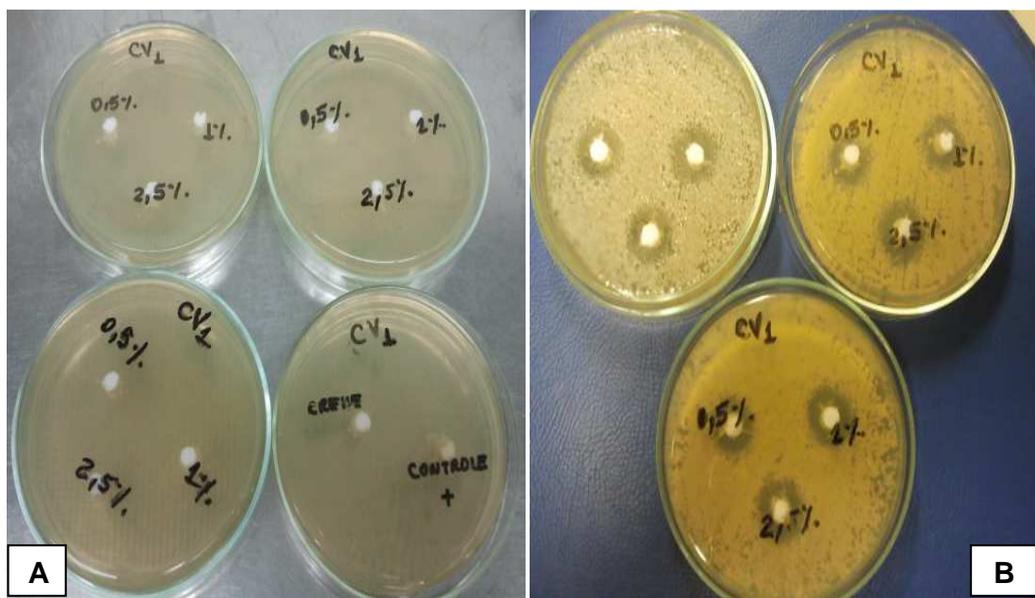


Figura 7. Técnica do poço. **A.** Preparação das placas com o creme vaginal. **B.** Ação do creme vaginal com demonstração dos halos de inibição contra as *Candidas* após 24h à 37°C.

3. RESULTADOS PARCIAIS E DISCUSSÃO

Os valores das concentrações inibitórias mínimas (CIM) do óleo essencial de *Ocimum basilicum* (Maria-Bonita) foram entre 0,78 a 1,56 mg/ml. As linhagens padrão *C. albicans* (ATCC 18804), *C. glabrata* e *C. parapsilosis* (ATCC 22019) e o isolado clínico de *C. albicans* apresentaram CIM de 0,78mg/ml e os isolados clínicos *C. glabrata* e *C. parapsilosis* apresentaram valor de CIM de 1,56 mg/ml (SANTOS, 2011). Em comparação aos dados encontrados neste estudo e os obtidos por Hussain et al. (2008) testando os óleos essenciais de *O. basilicum* ricos em linalol, as CIMs apresentadas aqui demonstraram uma forte atividade anti*Candida* do óleo essencial de *O. basilicum* (cultivar Maria Bonita) (SANTOS, 2011).

Diante das ações anti*Candida* do óleo essencial, foi produzido um creme vaginal com o óleo das folhas do *Ocimum basilicum* (Maria-bonita) em concentrações de 0,5%, 1% e 2,5%. O creme apresenta-se de cor branca (Figura 8), odor característico, consistência adequada para a formulação e fácil espalhabilidade.



Figura 8. Amostras do creme vaginal com concentrações de 0,5%, 1%, 2,5% e amostra controle

As amostras do creme vaginal testadas foram observadas e avaliadas durante um período de armazenamento de 60 dias e, de acordo com os resultados observados na Tabela 5, todas as amostras acondicionadas na geladeira (5° C) não sofreram modificações em relação à cor, odor e aparência. As amostras que permaneceram em condições de temperatura controlada (20° C – 25° C) também não tiveram mudanças na cor, aparência e odor. Em se tratando das amostras dos cremes expostas à temperatura de 45° C, a aparência (textura) dos mesmos, apresentaram modificações leves a partir do 15° dia, caracterizadas pelo leve endurecimento da superfície dos mesmos, intensificando-se no 30° dia e permanecendo estável até o 60° dia, também foi observada diminuição do brilho do creme, corroborando com Balbino (2012) em avaliação de estabilidade físico-química de emulsões, na qual observou que a exposição a elevadas temperaturas, as mesmas demonstraram diminuição do brilho e alteração significativa da cor das formulações, fato que não foi observado nas amostras estudadas no creme de *O. basilicum*. As leves modificações apresentadas pelo endurecimento da superfície dos mesmos a partir do 15° dia resultaram da perda dos componentes hidrofílicos por evaporação durante o aquecimento, o que se dá de forma mais intensa na superfície, aumentando, com isso, a concentração dos componentes menos voláteis, geralmente mais consistentes.

Apesar dos cremes possuírem umectante na fórmula (propilenoglicol), provavelmente, as suas concentrações não foram suficientes para evitar a perda de água por evaporação na temperatura avaliada (SOUZA & FERREIRA, 2010).

Friedrichet et al, (2007) não evidenciaram em amostras de cremes não-iônicos, alterações de cor e odor quando estas foram submetidas à temperatura ambiente, geladeira ou estufa durante o período de análise.

Possivelmente, a não alteração no odor dos cremes vaginais em estudo foi devido à presença do antioxidante (BHT) na formulação. Souza e Ferreira (2010), em um estudo sobre o desenvolvimento de estabilidade de cremes e géis contendo sementes e extratos do bagaço da uva Isabel, demonstraram que as alterações ocorridas no odor das amostras dos géis produzidos, coincidiram com a ausência de antioxidantes na formulação, sugerindo que os odores apresentados eram resultados de reações de oxidação.

Os testes de estabilidade realizados neste trabalho demonstraram que a formulação contendo *Ocimum basilicum* é estável por pelo menos 60 dias em temperatura controlada, preservando as características iniciais. Entretanto, é necessário que o prazo de validade e outros testes de estabilidade como análise da densidade ao longo do tempo sejam determinados, a fim de se alcançar uma melhor qualidade e segurança no uso desta formulação.

Tabela 6 – Resultados dos testes de estabilidade organolépticos e físico-químicos (cor, odor, aparência - temperatura) das amostras de creme vaginal analisadas durante o período de 60 dias.

Dias	Condições de Temperatura Controlada 20°C-25°C											
	5° C								45 °C			
	0	15	30	60	0	15	30	60	0	15	30	60
CSO	N	N	N	N	N	N	N	N	N	LMA ^s	LMA ^s	LMA ^s
C 0,5%	N	N	N	N	N	N	N	N	N	LMA ^s	LMA ^s	LMA ^s
C 1,0%	N	N	N	N	N	N	N	N	N	LMA ^s	LMA ^s	LMA ^s
C 2,5%	N	N	N	N	N	N	N	N	N	LMA ^s	LMA ^s	LMA ^s

CSO = Creme sem óleo essencial de *Ocimum basilicum*, C 0,5% = Creme com 0,5% de óleo essencial de *Ocimum basilicum*, C 1,0% = Creme com 1,0% de óleo essencial de *Ocimum basilicum*; C 2,5% = Cremecom 2,5% de óleo essencial de *Ocimum basilicum*; N = Normal, LMO = Leve Modificação do Odor, LMA = Leve Modificação na Aparência, MC = modificação da cor. s = Endurecimento da Superfície.

Avaliando os resultados dos testes da técnica de perfuração de poços, observamos que, os cremes vaginais testados em suas distintas concentrações (0,5%, 1,0% e 2,5%) apresentaram atividade antimicrobiana frente aos microrganismos testados (Figura 9), e, halos de inibição que variaram entre 12 a 22 mm de acordo com as linhagens testadas e a comparação com a referência nistatina como controle positivo, corroboraram com tais resultados, conforme dados da Tabela 7.

Tabela 7. Diâmetro dos halos de inibição (mm) do creme vaginal de *Ocimum basilicum* frente às linhagens de *Candida* estudadas

Concentrações / Controle	CV1 (<i>C.glabatra</i>)	CV4 (<i>C. albicans</i>)	CV8.3 (<i>C. parapsilosis</i>)	(<i>C.glabatra</i>) ATCC	(<i>C. albicans</i>) ATCC	(<i>C. parapsilosis</i>) ATCC
0,5%	14 mm	13 mm	17 mm	12 mm	15 mm	16 mm
1,0%	16 mm	14 mm	18 mm	14 mm	18 mm	19 mm
2,5%	18 mm	15 mm	18 mm	14 mm	18 mm	22 mm
Nistatina	13 mm	13 mm	16 mm	20 mm	17 mm	27 mm

Em se tratando das espécies de *Candida* isoladas de pacientes com Candidíase vaginal recorrente (*C. glabatra*, *C. albicans* e *C. parapsilosis*) frente ao creme vaginal de *Ocimum basilicum* em suas diferentes concentrações (0,5%, 1,0% e 2,5%) e o creme vaginal de nistatina, percebeu-se que, as linhagens clínicas obtiveram halos de inibição variando entre 13 a 18 mm e entre 13 a 16 mm, respectivamente. Quando o creme vaginal de *Ocimum basilicum* foi confrontado com o creme vaginal de referência (Nistatina), o mesmo apresentou resultados similares e/ou superiores à nistatina, corroborando com os efeitos *antiCandida* em todas as suas concentrações (Figura 8) observados para o creme desenvolvido neste trabalho .

Em comparação com as linhagens padrão (ATCC), a linhagem de *C. albicans* frente ao creme vaginal de *O. basilicum* nas concentrações de 1,0% e 2,5% apresentou também efeito superior à nistatina com halos de 18 mm, a qual apresentou halo de inibição de 17 mm. Efeito inverso aconteceu nos ensaios entre as linhagens padrão de *C. glabatra* e *C. parapsilosis* (ATCC) em comparação com as linhagens clínicas, onde, os valores dos halos de inibição do creme vaginal de *Ocimum basilicum*, apesar de corroborar com suas ações *antiCandida*, o controle positivo (nistatina) apresentou halos de inibição que

variaram entre 20 a 27 mm e os do creme de *O. basilicum* apresentaram halos de inibição entre 12 a 22 mm.

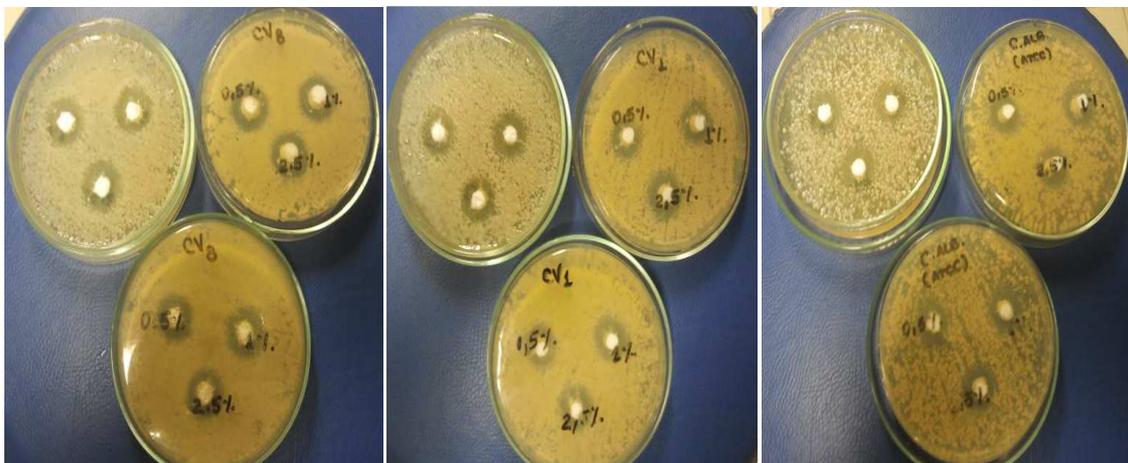


Figura 9. Halos de inibição (mm) do creme vaginal de *Ocimum basilicum* frente às cepas de *Candida* estudadas

Os resultados apresentados no presente estudo apontam para o potencial de utilização do creme vaginal de *Ocimum basilicum* no tratamento de candidíase vaginal, tendo em vista que o tratamento dos casos de vaginites com os antifúngicos disponíveis não é sempre efetivo, pois, produzem recorrência.

4. CONCLUSÃO

As investigações de bioprospecção que são classificadas como etnofarmacológicas e etnobotânicas têm sido reconhecidas por cientistas em todo o mundo, como a principal estratégia para a seleção de plantas medicinais (CAVALCANTE, 2010).

➤ O óleo essencial de *Ocimum basilicum* (cultivar Maria-Bonita) inibiu o crescimento de todas as linhagens de *Candidas* testadas, sejam, as linhagens padrão, ou, os isolados clínicos. O óleo essencial da mesma, apresentou CIM com valores entre 0,78 mg/ml a 1,56 mg/ml. Com estes dados foi produzido seu creme vaginal.

➤ Os estudos de estabilidade do creme vaginal de *Ocimum basilicum* e as características organolépticas avaliadas deste creme em suas diversas concentrações (0,5%, 1,0% e 2,5%) foram satisfatórios de acordo com os padrões adotados.

➤ Os testes de atividade *antiCandida* do creme vaginal de *Ocimum basilicum*, em três concentrações distintas (0,5%, 1,0% e 2,5%) em comparação com um creme vaginal de nistatina como controle positivo para linhagens isoladas clinicamente de pacientes com candidíase vaginal recorrente, apresentaram atividade comprovada.

Em anexo encontram-se a tabela de busca de anterioridade e patente (relatório descritivo) de uma formulação de creme vaginal para tratamento de candidíase à base de óleo essencial de *Ocimum basilicum* L..

5. ANEXO

5.1. Planilha de escopo de busca de anterioridade

Tabela 8 - Planilha de escopo de busca de anterioridade

PC1/Classificação	PC2	PC3	Base de Dados	Qtde	Observação
	-	-	INPI	340	-
Creme					
Creme	vaginal	-	INPI	01	Preparação, forma farmacêutica
A61K9/02		-		37	Pesquisa por classificação – forma farmacêutica
Óleo	Essencial	-	INPI	24	-
<i>Candida</i>			INPI	17	-
<i>Ocimum</i>	-	-	INPI	00	-
<i>Ocimum</i>	basilicum	-	INPI	00	-
<i>Ocimum</i>	-	-	ESPACENET	151	-
<i>Ocimum</i>	-	-	ESPACENET	14	Busca avançada
<i>Ocimum</i>	<i>basilicum</i>	-	ESPACENET	75	-
Cream	-	-	ESPACENET	39014	-
Vaginal cream	-	-	ESPACENET	118	-
<i>Ocimum</i>	-	-	USPTO	282	-
<i>Ocimum</i>	<i>basilicum</i>	-	USPTO	127	-
Vaginal cream	-	-	USPTO	5832	-

PC: Palavra-chave

5.2. Relatório Descritivo da Patente

FORMULAÇÃO DE CREME VAGINAL PARA TRATAMENTO DE CANDIDÍASE À BASE DE ÓLEO ESSENCIAL DE *OCIMUM BASILICUM* L.

A presente invenção refere-se à formulação de um creme vaginal para tratamento de candidíase contendo óleo essencial de *Ocimum basilicum* L. como constituinte único ou misturado com outros óleos essenciais ou isoladamente o Linalol que é um de seus componentes majoritários.

O manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) é originário do Sudoeste da Ásia e África Central e de ocorrência subespontânea no Brasil (Blank, A.F.; Souza, E.M.; Arrigoni-Blank, M.F.; Paula, J.W.A.; Alves, P.B. Maria Bonita: cultivar de manjeriço tipo linalol. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 12, p. 1811-1813, 2007).

O gênero *Ocimum* está representado por mais de 150 espécies e tem uma distribuição geográfica por todas as regiões de clima tropical e subtropical (Brito, A.C.; Souza, J.D.; Rebouças, T.N.H.; Amaral, C.L.F. Propriedades do pólen e do estigma de *Ocimum basilicum* L. (cultivar Maria Bonita) para aumentar a eficiência de cruzamentos em programas de melhoramento. **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**, v.12, n.2, p.208-214, 2010).A depender do local em que é cultivado, o *Ocimum basilicum* poderá ser uma planta anual ou perene (Blank, A.F.; Carvalho Filho, J.L.S.; Santos Neto, A.L.; Alves, P.B.; Arrigoni-Blank, M.F.; Silva-Mann, R.; Mendonça, M.C. Caracterização morfológica e agrônômica de acessos de manjeriço e alfavaca. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.22, n.1, p. 113-116, 2004.). O gênero *Ocimum*, da família Lamiaceae, é uma importante fonte de óleos essenciais, tendo uso na medicina popularmente em todos os continentes. Compreendem aproximadamente trinta espécies de ervas e subarbustos dispersos das regiões tropicais e subtropicais da Ásia, África, Américas Central e do Sul, sendo a África considerada o principal centro de diversidade deste

gênero (Pereira, R.C.A. e Moreira, A.L.M. **Manjeriço: cultivo e utilização** – Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 31 p. il, 2011).

Na medicina popular, as espécies de manjeriço são indicadas como estimulante digestivo, antiespasmódico, gástrico, galactagogo, béquico, carminativo (Sajjadi, Analysis of the essential oil of two cultivated basil (*Ocimum basilicum*) from Iran. **Daru**, Iran, v. 14, n.3, p.128-130, 2006).

Estudos têm demonstrado seu grande potencial antimicrobiano e antioxidante (Sartoratto, A.; Machado, A.L.M.; Delarmelina, C.; Figueira, G.M; Duarte, M.C.T; Rehder, V.L.G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo,v.35, p.275-280, 2004; Politeo, O; Jukic, M; Milos, M. Chemical composition and antioxidant capacity of free volatile aglycones from basil (*Ocimum basilicum* L.) compared with its essential oil. **Food Chemistry**, Oxford,v.101, n.1, p. 379-385, 2007).

A atividade antimicrobiana do óleo essencial do manjeriço tem sido relatada como sendo predominantemente associada ao seu constituinte majoritário, o linalol (Martins, A.G.L.A; Nascimento, A.R; Filho, J.E.M; Filho, N.E.M; Souza, A.G; Aragão, N.E; Silva, D.S.V. Antibacterial activity of essential basil oil against serogroups of enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from lettuce. **Ciência Rural**, v.40, n.8, 2010). Porém, outros estudos revelam que o sinergismo entre os compostos presentes no óleo essencial de *O. basilicum* L. é que foi determinante na ação anti-*Candida* (Santos, P. O. Caracterização fisiológica e molecular de *Candida albicans* envolvidas em casos de candidíase vaginal e prospecção de óleos essenciais anti-*Candida*. **Tese (Doutorado em Biotecnologia)** Universidade federal de Sergipe, 2011).

O principal agente das candidíases é a *Candida albicans*. A maioria dos estudos mostra que esta espécie constitui 60% dos isolados de amostras clínicas. Uma vez que esta levedura faz parte da microbiota humana, ela é considerada uma micose oportunista. Entretanto, existem outras espécies de interesse clínico que são: *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilliermondii* e *C. lusitaniae* (Barbedo, Leonardo S.; Sgarbi, Diana B.G.Candidíase. DST - **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v.22, p.22-38 ISSN on-line: (2177-8264, 2010). O gênero *Candida* é composto por fungos leveduriformes hialinos, taxonomicamente enquadrados no grupo dos ascomicetos (Sidrim e Rocha, **Micologia Médica à**

Luz de Autores Contemporâneos, Rio de Janeiro; Guanabara Koogan, 2004). As leveduras do gênero *Candida*, em particular a *C. albicans*, são patógenos oportunistas freqüentemente isolados das superfícies mucosas de indivíduos normais. Estão muito bem adaptadas ao corpo humano, por isso podem colonizá-lo sem produzir sinais de doença em condições de normalidade fisiológica (Álvares, C. A; Svidzinski, T.I.E; Consolaro, M.E. Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. **Jornal Brasileiro de Patologia Médica Laboratorial**, v. 43, n. 5, p. 319-327, 2007). *Candida albicans* é uma levedura diplóide com história de dimorfismo fúngico invertido, enquanto outros fungos se encontram na natureza na fase miceliana e causam doenças no homem na fase leveduriforme, sendo que a *C. albicans* comporta-se de modo contrário (Barbedo, Leonardo S.; Sgarbi, Diana B.G. Candidíase. DST - **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v.22, p.22-38 ISSN on-line: 2177-8264, 2010).

Espécies de *Candida* residem como comensais, fazendo parte da microbiota normal dos indivíduos sadios. Todavia, quando há uma ruptura no balanço normal da microbiota ou o sistema imune do hospedeiro encontra-se comprometido, as espécies do gênero *Candida* tendem a manifestações agressivas, tornando-se patogênicas (Barbedo, Leonardo S.; Sgarbi, Diana B.G. Candidíase). DST - **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v.22, p.22-38 ISSN on-line: (2177-8264, 2010). A candidíase vaginal (CV) continua sendo extremamente comum, uma vez que quase todas as mulheres experimentam esse desagradável quadro genital pelo menos uma vez em algum momento de suas vidas (Rosa, M.I.; Rumel, D. Fatores Associados à Candidíase Vulvovaginal: Estudo Exploratório. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia** - v. 26, nº 1, 2004).

Uma grande quantidade de fármacos obtida através da síntese orgânica tem sido utilizada no tratamento de infecções micóticas (Redo, M.C; Rios J.L; Villar, A. A review of some antimicrobial compounds isolated from medicinal plants reported in the literature 1978-1988. **Phytherapeutic Research**, v.3, p.117-125, 1989). Os antisépticos como tintura de iodo, violeta de genciana, ácido salicílico e benzóico, derivados sulfamídicos, corantes, quinonas, antifúngicos poliênicos (e.g. nistatina, anfotericina) têm sido amplamente utilizados na terapia antimicótica (Crissey, J. T., Lang, H., Paris, L. C. Manual of medical mycology. **Blackwell Science**, p. 106-110, 1995).

Ainda, faz-se uso dos chamados antifúngicos modernos, a citar os azóis (cetoconazol, econozal, sulconazol, miconazol, clotrimazol, fluconazol), alilaminas (naftina, terbinafina), hidroxipiridona, morfolina, compostos de selenium e anfotericina B lipossômica (Redo, M.C; Rios J.L; Villar, A. A review of some antimicrobial compounds isolated from medicinal plants reported in the literature 1978-1988. **Phytotherapy Research**, v.3, p.117-125, 1989). Com freqüência, as infecções fúngicas são de difícil tratamento, fato intrinsecamente relacionado à aquisição por parte de seus agentes etiológicos de resistência frente à ação de antifúngicos (Lima, I. O; Oliveira, R.A.G; Lima, E.O; Farias, N.M.P; Souza, E.L. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.16, p.197-201, 2006).

A resistência aos antifúngicos tem representado um grande desafio para clínica médica em decorrência das dificuldades observadas no tratamento da candidíase. Este aumento de resistência pode ser decorrente ao uso de terapias seletivas com doses inadequadas ou devido ao uso crescente de fármacos na profilaxia de infecções fúngicas. Para combater microrganismos resistentes no século XXI, os esforços de pesquisa têm se voltado na busca de novos fármacos, sendo os produtos naturais, uma alternativa viável e possivelmente sustentável, quando comparados aos sintéticos.

Nesse contexto, a fitoterapia pode ser uma ferramenta importante como terapia alternativa para o tratamento da Candidíase e em especial as *Candidas* que causam vaginites. Com o intuito de produzir um produto com menos efeitos colaterais e menor nível de resistência aos microrganismos que os habitualmente usados comercialmente, desenvolveu-se a presente invenção que apresenta vantagem sobre os produtos ora no mercado, promovendo avanços na área da etnobotânica, farmacologia, microbiologia, fitoterapia, ginecologia e saúde pública, além do impacto social que poderá ser de grande relevância para a melhoria da qualidade de saúde da população, além da possibilidade de geração de renda para o cultivo desta planta.

Algumas patentes de invenção na área clínica demonstram maior interesse no estudo da composição do creme vaginal como é o caso da **PI0404688-9** que se refere a uma composição para tratamento vaginal, podendo ser introduzida em forma de um óvulo, de um creme ou de um unguento, ou com o tampão, diretamente na vagina, ou sobre um forro de

calcinha diante da vagina. Além disso, a invenção refere-se a um bastonete para uretra com uma composição para tratamento vaginal correspondente.

Além de invenções com cremes vaginais para o tratamento de doenças vulvovaginites, existem patentes que apresentam estudos com géis vaginais como visto na **PI0904121-4** que está representado por uma solução inventiva com objetivo de promover um eficaz efeito antiinflamatório contendo extratos tipificados de própolis e pode ser usado em portadoras de cervicite grau inflamatório II. Na **PI0609104-0** que visa a Composições de gel lubrificante fabricadas com polímeros solúveis em água e água destilada podem evitar não somente a gravidez, mas também doenças sexualmente transmissíveis (DST) inclusive AIDS devido a suas funções como paredes bloqueadoras físicas e espermicidas.

Na patente de invenção **PI9006793** o objetivo principal foi de preparar uma forma farmacêutica para o tratamento intravaginal de vaginose e/ou tricomoníase bacteriana com formulações metronidazola amortecida para o pH vaginal. Outras invenções como a **PI1005319-0** podem ser vistas na literatura onde buscam a saúde da vagina compreendendo também um cuidado com os aplicadores a ser utilizados. Em outra invenção depositada na França a **PI0915829-4**, encontra-se um estudo de composições que tem o objetivo de promover o desenvolvimento e crescimento de uma microflora vaginal benéfica.

A **PI 0706925-1** depositada nos Estados Unidos teve como objetivo principal a composição farmacêutica para administração vaginal em um indivíduo e método para tratar sintomas urogenitais de vaginite atrófica. Esta invenção refere-se a um método e a uma composição farmacêutica útil no tratamento de uma condição responsiva à terapia de reposição hormonal, onde está relacionada ao tratamento de longa duração dos sintomas associados com a vaginite atrófica.

A **PI0620908-4** consiste na composição farmacêutica, sistema de distribuição antibacteriana e antifúngica vaginal e uso da composição farmacêutica. Esta composição farmacêutica compreende (a) metronidazol em uma quantidade antibactericamente efetiva; e (b) um agente antifúngico em uma quantidade antifungicamente efetiva, compreendendo ilustrativamente butoconazol ou um sal ou éster farmacêuticamente aceitável do mesmo. A composição é adaptada para aplicação em uma quantidade de dose unitária a

uma superfície vulvovaginal e tem pelo menos uma fase interna não lipólde e pelo menos uma fase externa lipólde que é bioadesiva à superfície vulvovaginal. Já na patente de invenção **PI0620907-6**, o objetivo principal foi elaborar uma composição farmacêutica compreende um primeiro agente ativo (por exemplo, agente antibacteriano) e um segundo agente ativo (por exemplo, agente anti-fúngico), e compreende um componente que é adaptado para bioaderência a uma superfície vulvovaginal. A composição proporciona liberação diferencial dos agentes ativos nesta superfície, em que o segundo agente ativo exibe um perfil de liberação que é substancialmente retardado, prolongado e/ou invertido em relação ao perfil de liberação do primeiro agente ativo.

Esta patente tem a vantagem de inventar um creme vaginal contendo em sua composição o óleo essencial de *Ocimum basilicum* L. de uma variedade conhecida como Maria Bonita ou podendo utilizar outras variedades em sua composição, assim como outros compostos. A composição desta nova forma farmacêutica apresenta-se inovadora por conter um componente químico (Linalol) sendo o composto majoritário em maior quantidade nessa variedade. O creme vaginal desenvolvido apresentou excelente atividade antifúngica frente a cepas do gênero *Candida*.

Deve ser entendido que menção a *candida*, na presente invenção, refere-se às leveduras do Gênero *Candida*, da família Saccharomycetaceae, e em suas diferentes morfologias, podendo ser leveduras, pseudo-hifas, hifas. A determinação da ação anti*Candida* de *Ocimum basilicum*L. e do linalol para a preparação de tal formulação, foi determinada anteriormente através de testes com o óleo essencial obtido por hidrodestilação, e, posteriormente, testadas suas concentrações inibitória mínima (CIM) e fungicida mínima (CFM) frente aos isolados de *Candida*, bem como, as análises das cinéticas de morte das leveduras.

A formulação da invenção se apresenta de forma adequada, na forma de creme vaginal, de aplicação tópica, com propriedades terapêuticas, destinada ao tratamento da candidíase vaginal. Na preparação de tal formulação, adjuvantes e excipientes conhecidos podem ser utilizados, por exemplo, antioxidantes e conservantes, além da base cera para dar forma e consistência ao creme vaginal, favorecendo uma maior permanência do óleo

essencial e maior duração do efeito anti-*Candida*. As bases em cremes não iônicos, utilizadas neste estudo, foram escolhidas em função da boa espalhabilidade, boa permeação de ativos e baixa oleosidade.

Dentro de concretizações específicas a formulação anti-*Candida* da invenção pode conter entre 0,25% a 5,00% do óleo essencial bruto de *Ocimum basilicum L.* cujo composto majoritário é o Linalol. O creme vaginal com óleo essencial de *Ocimum basilicum L.* em diversas concentrações mostraram-se eficientes como anti-*Candida*, particularmente quanto às *Candidas* que causam vaginites.

A formulação utilizada nesta patente de invenção foi de um creme vaginal que tem por base óleo essencial de *Ocimum basilicum L.* em concentrações de 0,25% a 5,00%. Essas formulações foram submetidas a testes em triplicatas com as seguintes espécies de *Candida*: *Candida albicans* (ATCC 18804), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019), *Candida glabrata* (ATCC 2001), e os isolados clínicos *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* e *Candida glabrata*, tendo apresentado resultados satisfatórios.

A determinação da atividade antimicrobiana do fármaco (creme vaginal) é uma análise microbiológica *in vitro* essencial na avaliação da qualidade de medicamentos antimicrobianos. A Farmacopéia Brasileira IV (1988) recomenda os ensaios microbiológicos por difusão em ágar e turbidimetria como adequados para a avaliação da atividade antimicrobiana quantitativa de antibióticos.

Entretanto, a técnica de difusão em Agar (Bauer, A.W; Perry, M.B; Kirby, W.M.M. Antibiotic Susceptibility testing by a Standardized single disk method. American Journal Clinical Pathology. v.45, p. 493-496,1966) é um dos métodos mais utilizados em laboratórios de controle de qualidade microbiológico. Dentre vários parâmetros considerados, o meio de cultura, o inóculo do microrganismo, a difusão do fármaco, as condições de incubação e os critérios de leitura são fundamentais para a confiabilidade do método (Vital, T.M; Reis, C.; Garcia-Zapata, M.T.A; Cunha, L.C. estudo comparativo de duas técnicas farmacopéicas de avaliação da atividade antimicrobiana dos fármacos: nistatina, eritromicina, neomicina e gentamicina. Revista **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. vol. 40, n. 2, 2004).

A Farmacopéia Brasileira, 4^a edição (1988) também normatiza os principais parâmetros de análise aos diversos antimicrobianos, descritos em monografias. Para a difusão dos fármacos em ágar, indica a perfuração de poços, cilindros de aço inoxidável ou porcelana e discos de papel (Pinto, T.J.A; Kaneko, T.M; Ohara, M.T. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. São Paulo: Atheneu, p. 245-271, 2000). Neste caso, a metodologia de escolha foi à impregnação do creme, já diluído, em discos de papel.

Para o preparo do inóculo microbiano foi feita uma suspensão com 3 mL de solução fisiológica (salina) juntamente com os respectivos microrganismos em crescimento. Utilizou-se a escala MacFarland 0,5, empregada para antibiogramas, para a padronização.

Para cada suspensão feita com o creme vaginal contendo o *Ocimum* em suas diversas concentrações, foram utilizadas seis placas de Petri (100 x 20 mm) estéreis - três placas para o controle positivo (CP) e três para as amostras (A) (Farmacopéia Brasileira, 4 ed. São Paulo: Ind. Gráfica Siqueira, 1988. p.1-17). Após o preparo e autoclavação, os meios de cultura foram armazenados em geladeira (4 °C) por no máximo dois dias e fundidos em banho-maria a 60 °C. As placas para a análise do creme contendo óleo essencial de *O. basilicum* possuíam uma camada única com 20mL de Agar sabouraud hidratado e autoclavado, contendo o inóculo.

Os discos de papel de filtro com 13 mm de diâmetros, esterilizados foram embebidos nas preparações das suspensões feitas com o creme vaginal contendo o *Ocimum* em suas diversas concentrações e aplicados nas placas com o inóculo, opondo-se o disco da amostra de maior para a de menor concentração, equidistantemente distribuídos. Para cada concentração escolhida nesta patente de invenção, foram dispensados 30µL da suspensão do creme diluído com DMSO em cada disco. As placas com o antifúngico foram incubadas a 35 °C por 48 horas. Para cada amostra fez-se uma placa semeada com o inóculo, destinada ao controle positivo.

Estudos de estabilidade das formulações foram feitas, onde as amostras foram armazenadas em três condições distintas: condições ambientais (20° C - 25° C), geladeira (5° C) com temperatura controlada e estufa (45° C) com temperatura controlada.

Os testes para análise foram realizados nos períodos de 0, 15, 30 e 60 dias, onde foram obtidos resultados desejáveis.

Também foram realizadas avaliações das características organolépticas das amostras, levando-se em consideração as propriedades organolépticas, através da visualização, considerando qualquer alteração de coloração, odor ou sinal de separação de fases. Para análise dos resultados, foram utilizados critérios apresentados no anexo 1 (Tabela), adaptado por Buhler, F.V, Ferreira J.R.N. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de formulações contendo extratos de *Ilex paraguariensis* St. Hil. a 5 e 10%. **Revista Perspectiva**, v.32, p.47-55, 2008.

EXEMPLO 1

Como referência demonstrativa e não restritiva, foi utilizado óleo essencial de *Ocimum basilicum* L. de uma variedade de manjeriço conhecida como Maria Bonita. Essa cultivar foi desenvolvida por Blank et al (2007), visando, principalmente aumentar o rendimento do Linalol e está registrada no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Brasil, sob o número 22019.

EXEMPLO 2

Como referência demonstrativa e não restritiva, os exemplares de *O. basilicum* L. (cultivar – Maria Bonita) foram obtidos na estação experimental do campus rural da Universidade Federal de Sergipe localizada no município de São Cristóvão-SE, Brasil. As folhas e inflorescências foram coletadas e colocadas em estufa para secagem com circulação de ar á temperatura de 40 °C por 5 dias até desidratação completa.

EXEMPLO 3

Como referência demonstrativa e não restritiva, após o tempo de secagem em estufa, as folhas foram extraídas em aparelho cleveger. O óleo essencial foi separado da solução aquosa (hidrolato) e transferido para frasco âmbar e congelado a temperatura de -20°C até o momento do uso.

EXEMPLO 4

Como referência demonstrativa e não restritiva, após o processo extração do óleo essencial como apresentado no EXEMPLO 3, a forma farmacêutica foi preparada contendo concentrações de 0,25 a 5% deste óleo.

6. Referências Bibliográficas

ADAMS, R.P. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy. Allured Publ. Corp., Carol Stream, Chicago, 2007.

AFFONSO, C.R.G. Avaliação toxicológica do óleo essencial dos frutos da aroeira-vermelha (*Schinus terebinthifolius raddi*) e do impacto sobre a performance reprodutiva e desenvolvimento da prole em ratos. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Universidade Federal do Piauí, 2009.

AFFONSO, C.R.G.; FERNANDES, R.M.; OLIVEIRA, J.M.G.; CARVALHO E MARTINS, M.C.; LIMA, S.G.; JÚNIOR, G.R.; FERNANDES, M.Z.L.C.M.; ZANINI, S.F. Effects of the Essential Oil from Fruits of *Schinus terebinthifolius Raddi* (Anacardiaceae) on Reproductive Functions in Male Rats. **J Braz Chem Soc**, Vol. 23, No. 1, 180-185, 2012.

AGRA M.F.; FRANÇA P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Rev Bras Farmacogn** 17: 114-140, 2007.

AGRA M.F.; SILVA K.N.; BASÍLIO I.J.L.D.; FRANÇA P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Rev Bras Farmacogn** 18: 472-508, 2008.

AL-MASK A.Y.; KHAN, M.M.; KHAN, S.H. Genetic diversity among omani basil (*ocimum basilicum* L.) landraces using RAPD markers. **E3 Journal of Agricultural Research and Development**. Vol. 3(6). pp. 094-097, August, 2013

ÁLVARES, C.A.; SVIDZINSKI, T.I.E.; CONSOLARO, M.E.L. Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. **J Bras Patol Med Lab** • v. 43 • n. 5 • p. 319-327 • outubro 2007.

ALVES, M.F. Secagem, armazenamento e controle genético de caracteres agronômicos e químicos de manjerição (*Ocimum basilicum* L.). Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas). Universidade Federal de Sergipe, 2012.

ALVES, P.M.; QUEIROZ, L.M.G.; PEREIRA, J.V.; PEREIRA, M.S.V. Atividade antimicrobiana, antiaderente e antifúngica *in vitro* de plantas medicinais brasileiras sobre microrganismos do biofilme dental e cepas do gênero *Candida*. **Ver Soc Bras Med Trop**. 2009;42(2):222-4.

ALVES, I A., DE CAMARGO, F. P., GOULART, L. S., Identificação por PCR e sensibilidade a antifúngicos de isolados clínicos vaginais de *Candida* sp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 43(5): 575-579, set-out, 2010.

AMARAL, J. F. DO. Atividade antiinflamatória, antinociceptiva e gastroprotetora do óleo essencial de *Croton sonderianus* Muell. Arg. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Universidade Federal do Ceará, 2004.

ANGIONI, A; BARRA, A, CORONEO, V; DESSI, S; CABRAS, P. Chemical composition, seasonal variability and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *Stoechas* essential oils from stem/ leaves and flowers. **J Agric Food Chem**. 54: 4364-4370.2006.

AQUINO, L.C.L.; SANTOS, G.G.; TRINDADE, R.C.; ALVES, J.A.B.; SANTOS, P.O.; ALVES, P.B.; BLANK, A.F.; CARVALHO, L.M. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de erva-cidreira e manjerição frente a bactérias de carnes bovinas. **Alim Nutr Araraquara**, v. 21, n. 4, p. 529-535, Out/Dez, 2010.

ARAÚJO, J.C.L.V.; LIMA, E.O.; CEBALLOS, B.S.O.; FREIRE, K.R.L.; SOUZA, E.L.; SANTOS FILHO, L. Ação antimicrobiana de óleos essenciais sobre microrganismos potencialmente causadores de infecções oportunistas. **Rev Patol Trop** 33: 55-64.2004.

ARGENTA, S.C.; ARGENTA, L.C.; GIACOMELLI, S.R.; CEZAROTTO, V.S. Plantas medicinais: cultura popular versus ciência. **Vivências**. Vol.7, N.12: p.51-60, Maio/2011.

BAKKALI, F. AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, volume 46, issue 2, p. 446-475. February 2008.

BALBINO, F. Avaliação da estabilidade físico-química de emulsões contendo associação de ácido glicólico e hidroquinona. Monografia (Bacharel no curso de Farmácia). Universidade do Extremo Sul Catarinense, UNESC, 2012.

BANDONI, A. L.; CZEPACK, M. P. Os recursos vegetais aromáticos no Brasil. Vitória: Edufes. 624p. 2008,

BARBEDO, L.S. & SGARBI, D.B.G. Candidíase. DST - J bras Doenças Sex Transm: 22(1): 22-38 - ISSN: 0103-4065 - ISSN on-line: 2177-8264.2010.

BASSO, R.; SILVA, N.L.; PEREIRA, K.B.; MEZZARI, A.; FUENTEFRIA, A.M. Etiologia da candidíase vulvovaginal recorrente na Atenção Primária à Saúde em Santa Catarina, Brasil. **Acta Bioquím Clín Latinoam**. 46 (3): 399-404.2012.

BERTINI, L. M. PEREIRA, A. F.; OLIVEIRA, C. L. L.; MENEZES, E. A.; MORAIS, S. M.; CUNHA, F. A.; CAVALCANTI, E. S. B. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. *Infarma*. v. 17, n. 3/4, p. 80-83, 2005.

BIAVATTI, M.; MARENSI, V.; LEITE, S.N.; REIS, A. Ethnopharmacognostic survey on botanical compendia for potential cosmeceutic species from Atlantic Forest. **Rev Bras Farmacogn**17: 640-653. 2007.

BIZZO, H.R.; HOVELL, A.M.C.; REZENDE, C.M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Quim. Nova**, Vol. 32, No. 3, 588-594, 2009.

BLANK, A.F.; ALVES, P.B.; EHLERT, P.A.D.; ARRIGONI-BLANK, M.F. Uma nova cultivar de manjeriço (*Ocimum basilicum* L.): "Maria-Bonita". Simpósio Brasileiro de Óleos Essenciais, 3., Campinas: Instituto Agrônomo.175p. (Documentos IAC; n.77). 2005.

BLANK, A.F.; SOUZA, E.M.; ARRIGONI-BLANK, M.F.; PAULA, J.W.A.; ALVES, P.B. Maria Bonita: cultivar de manjeriço tipo linalol. **Pesq. agropec. bras.** Brasília, v. 42, n. 12, p. 1811-1813, dez. 2007.

BOATTO, H.F.; MORAES, M.S.; MACHADO, A.P.; GIRÃO M.J.B.C.; FISCHMAN, O. Correlação entre os resultados laboratoriais e os sinais e sintomas clínicos das pacientes com candidíase vulvovaginal e relevância dos parceiros sexuais na manutenção da infecção em São Paulo, Brasil. **Rev Bras Ginecol Obstet.** 29(2): 80-4. 2007.

BORNHAUSEN, R. **Ervas do sítio.** Disponível em: <<http://www.ervasdositio.com.br/enciclopedia/enciclopedia.asp>>. Acesso em: 12 Dez. 2011.

BOZIN, B. et al. Characterization of the volatile composition of essential oils of some *Lamiaceae* species and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.54, n.5, p.1822-1828, 2006. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jf051922u>>. Acesso em: 30 Set. 2011. doi: 10.1021/jf051922u.

BRUN, G.R.; MOSSI, A.J. Chemical characterization and antimicrobial activity of the volatile oil of pitanga “Brazilian Cherry” (*Eugenia uniflora* L.) **PERSPECTIVA**, Erechim. v.34, n.127, p. 135-142, Setembro/2010.

BUHLER F.V.; FERREIRA J.R.N. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de formulações contendo extratos de *Ilex paraguariensis* St. Hil. a 5 e 10%. **Rev Perspect.** 32:47-55.2008.

CARVALHO FILHO, J. L. S.; ALVES, P.B. ; EHLERT, P. A. D.; MELO, A.S.; CAVALCANTI, S.C.H.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; SILVA-MANN, R.; BLANK, A. F. Influence of the harvesting time, temperature and drying period on basil (*Ocimum basilicum* L.) essential oil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 16, p. 24-30, 2006.

CATÃO, M.H.C.V.; SILVA, M.S.P.; SILVA, A.D.L.; COSTA, R.O. Clinical Study using Medicinal Plants for the Treatment of Oral Diseases. UNOPAR **Cient Ciênc Biol Saúde** 2012;14(4):279-85.

CAVALCANTE, A.L.F.A. Plantas Medicinais e Saúde bucal: estudo etnobotânico, atividade antimicrobiana e potencial para interação medicamentosa. Universidade Federal da Paraíba, 2010.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; Approved standard, 2nd ed, CLSI document M38-A2, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA 2008.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Zone diameter interpretive standards, corresponding minimal inhibitory concentration (MIC) interpretive breakpoints, and quality control limits for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts; Informational supplement, 2nd ed, CLSI document M44-S2, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA 2008.

COLOMBO, A.L.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Rev Soc Bras Med Trop.** 36(5): 599-607.2003.

CORREIA, S.J.; DAVID, J.P; DAVID, J.M. Metabólitos secundários de espécies de Anacardiaceae. **Quim Nova**, v. 29, n. 6, p. 1287-1300, 2006.

CRISSEY, J. T., LANG, H., PARIS, L. C. **Manual of medical mycology.** Cambridge: Balckwell Science, 1995. p. 106-110.

Degáspari, C.H.; Waszczyński, N.; Prado, M.R.M. Atividade antimicrobiana de *Schinus terebenthifolius* Raddi. **Ciênc. agrotec.** vol. 29 no.3 Lavras May/June 2005.

DUARTE, M.C.T. Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais e Aromáticas Utilizadas no Brasil. MultiCiência: Construindo a História dos Produtos Naturais #7, Outubro 2006.

EHLERT, P.A.D.; BLANK, A.F.; ARRIGONI-BLANK, M.F.; PAULA, J.W.A.; CAMPOS, D.A.; ALVIANO, C.S. Tempo de hidrodestilação na extração de óleo essencial de sete espécies de plantas medicinais. **Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu**, v.8, n.2, p.79-80, 2006.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4 ed. São Paulo: Ind. Gráfica Siqueira. p.1-17. 1988.

FERRAZA, M.H.; MALUF, M.L.F.; CONSOLARO, M.E.L.; SHINOBU, C.S.; SVIDZINSKI TIE, BATISTA, M.R. Caracterização de leveduras isoladas da vagina e sua associação com candidíase vulvovaginal em duas cidades do sul do Brasil. **Rev Brasi Gynec Obst.** 27:58-63.Fortaleza: EdUECE, 2007.

FEUERSCHUETTE, O.H.M., SILVEIRA, S.K., FEUERSCHUETTE, I., CORRÊA, T.,GRANDO, L.,TREPANI, A. Candidíase vaginal recorrente: manejo clínico. FEMINA | | vol 38 | nº 2. Fevereiro 2010.

FIGUEIREDO, L. Aroeira vermelha. **Terra da Gente**, São Paulo: n. 57, p. 45-46, jan. 2009.

FORMULÁRIO NACIONAL DA FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 2ª edição, 2011.

FREIRES, I.A., ALVES, L.A., JOVITO, V.C., CASTRO, R.D. Antifungal activity of *Schinus terebinthifolius* (Aroeira) on *Candida* strains. **Rev Odontol Bras Central.** 20(52). 2011.

FRIEDRICH M., PRIMO F.T., FUNCK J.A.B., LAPORTA L.V., ALVES M.P., BITTENCOURT C.F., ESCARRONE A.L.V. Avaliação da Estabilidade Físico-Química de Creme Não Iônico Inscrito no Formulário Nacional. Lat. Am. **J. Pharm.** 26 (4): 558-62. 2007.

GALLE L.C.; GIANINNI M.J.S.M. Prevalência e suscetibilidade de leveduras vaginais. **Jornal Brasileiro de Patologia Médica Laboratorial**, 40:229-236, 2004.

GEHRKE, I.T.S.; STOLZ, E.D. & MOREL, A.F. Identificação dos principais constituintes do óleo essencial dos frutos de *Schinus terebinthifolius* da região noroeste do RS. In: 30a **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**. 2008.

GLEHN, E.A.V.; RODRIGUES, G.P.S. Antifungigrama para comprovar o potencial de ação dos extratos vegetais hidroglicólicos sobre *candida* sp. (berkhout). **Rev. bras. plantas med.** vol.14 nº.3 Botucatu 2012.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GUERRA, M.J.M.; BARREIRO, M.L., RODRIGUEZ, Z.M., RUBAICABA, Y. Actividad antimicrobiana de um extracto fluido al 80% de *Schinus terebinthifolius* Raddi (copal). **Rev Cub Plantas Med**5: 23-25. 2000.

GUERRA, M.U.M.; BARREIRO, M.L.; RODRIGUEZ, Z.M.; RUBALCA, Y. Actividad Antimicrobiana de um Extracto Fluido Al 80 % de *Schinus Terebinthifolius* Raddi (COPAL). **Rev Ubana Plant Med**. 5(1): 23-5. 2000.

Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos / **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. 2ª edição, revista – Brasília: Anvisa, 2008.

HEINZMANN, B.M.; BARROS, F.M.C. Potencial das Plantas Nativas Brasileiras para o Desenvolvimento de Fitomedicamentos tendo como exemplo *Lippia alba* (MILL.) N. E. Brown (VERBENACEAE). **Saúde, Santa Maria**, vol 33, n 1: p 43-48, 2007.

JEFERSON S. SANTANA, J.S.; SARTORELLI, P.; LAGO, J.H.G.; MATSUO, A.L. Isolamento e avaliação do potencial citotóxico de derivados fenólicos de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). **Quim. Nova**, Vol. 35, No. 11, 2245-2248, 2012.

JUNIOR, V.F.V.; PINTO, A.C. Plantas medicinais: cura segura? **Quim. Nova**, Vol. 28, No. 3, 519-528, 2005.

LAM, K.S. New aspects of natural products in drug Discovery. **Trends microbial**. 15:279-289. 2007.

LARENTES, I.A. Avaliação preliminar da estabilidade de cremes fotoprotetores de farmácias magistrais. (Monografia apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Licenciado em Química no Programa Especial de Formações de Docentes da Faculdade Integrada da Grande Fortaleza – FGF). Maringá – PR, 2009.

LENZ, M. e ORTH, A.I. Fenologia reprodutiva, morfologia e biologia floral de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae), em restinga da ilha de Santa Catarina, Brasil. CCA/Universidade Federal de Santa Catarina, Curitiba – SC. 70-72 p.2004.

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

LUCENA, P.L.H., FILHOS, J.M.R., CZECZKO, M.M.N.G., DIETZ, U.A., NETO, M.A. C., HENRIQUES, G.S., SANTOS, O.J., CESCHIN, A.P., THIELE, E.S. Evaluation of the aroeira (*Schinus terebinthifolius Raddi*) in the healing process of surgical incision in the bladder of rats.46 - **Acta Cirúrgica Brasileira** - Vol 21 (Suplemento 2) 2006.

MACHADO, B.F.M.T.; JUNIOR, A.F. Óleos essenciais: aspectos gerais e usos em terapias naturais. Cad. acad., Tubarão, v. 3, n. 2, p. 105-127, 2011.

MARTINS, A.G.L.A.; NASCIMENTO, A.R.; FILHO, J.E.M.; FILHO, N.E.; SOUZA, A.G.; ARAGÃO, N.E.; SILVA, D.S.V.S. Antibacterial activity of essential basil oil against serogroups of enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from lettuce. **Ciência Rural**, v.40, n.8, ago, 2010.

MARTORELLI, S.B.F; PINHEIRO, A.L.B.; SOUZA, I.A.; HIGINO, J.S.; BRAVO, F. Efeito antiinflamatório e cicatrizante do extrato hidroalcoólico de *Schinus terebinthifolius Raddi* (aroeira) a 30% em orabase – estudo “*in vivo*”. **Int. J. Dent** – Recife, 10(2): 80-90, abr./Jun., 2011.

MIRALHAS, N. ABCVerde. Disponível em: <<http://www.abcrede.com.br/abcverde/aroeira.html>>. Acesso em: 10 Janeiro. 2013.

MONTANARI, R.M.; Composição química e atividades biológicas dos óleos essenciais de espécies de Anacardiaceae, Siparunaceae e Verbenaceae. Tese (Doutorado em Agroquímica) Universidade federal de Viçosa, 2010.

MORAIS LAS. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira** 27: S4050-S4063. 2009.

MORAIS, S. M.; BRAZ-FILHO, R., orgs.; Produtos Naturais: Estudos Químicos e Biológicos, Ed. da Universidade Estadual do Ceará: Fortaleza, 2007.

MUKHERJEE, P.K.; VENKATESH, M.; GANTAIT, A. Ayurveda in modern medicine: development and modification of bioactivity. In: MANDER, L.; LIU, HUNG-WEN. Comprehensive natural products II. Hardbound: Elsevier. Chap. 3.14, p. 479-507. 2010.

NICOLINI, J.V. PUGET, F.P. MAZZA, M.G.G. Avaliação da Eficiência de Extração de Óleo Essencial de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira vermelha) pelos Métodos de Hidrodestilação e Arraste a vapor. VIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica. Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. 27 a 30 de julho de 2009.

ODDS, F.C. Antifungal therapy. In: Kibbler, C. C. Principles and practice of clinical mycology. Chichester: Wiley. Cap. 5, p. 35-48.1996.

PÁDUA, R.A.F. DE, GUILHERMETTI, E.; SVIDZINSKI, T.I.E. In vitro activity of antifungal agents on yeasts isolated from vaginal secretion. **Acta Scientiarum. Health Sciences**. V. 25, n. 1, p. 51-24, 21 Set. 2003.

PAPPALARDO, M.C.S.M.; SZESZS, M.W.; MARTINS, M.A.; BACETI, L.B.; BONFIETTI, L.X., PURISCO, S.U.; BAEZ, A.A.; MELHEM, M.S.C. Susceptibility of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* to amphotericin B using time–kill methodology. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, V.64. n. 2. Pag. 146-151, 2009.

PAULO. P.T.C., DINIZ, M.F.F.M, MEDEIROS, I.A., MORAIS, L.C.S. DE, ANDRADE, F.B., SANTOS, H.B. Ensaios clínicos toxicológicos, fase I, de um fitoterápico composto (*Schinus terebinthifolius* Raddi, *Plectranthus amboinicus* Lour e *Eucalyptus globulus* Labill).Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian **Journal of Pharmacognosy** 19(1A): 68-76, Jan./Mar. 2009

PEREIRA, R.C.A.; MOREIRA, A.L.M. Manjerição: cultivo e utilização – Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2011.

PESSINI, G.L. et al. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de extratos de plantas utilizados na medicina popular.**Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.13, supl., p.21-24,2003.

PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; OHARA, M.T. Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos. São Paulo: Atheneu, p. 245-271.2000.

PIO CORRÊA, M.; **Dicionário de Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional. v. 1. 1984.

POLITEO, O.; JUKIC, M.; MILOS, M. Chemical composition and antioxidant capacity of free volatile aglycones from basil (*Ocimum basilicum* L.) compared with its essential oil. **Food Chemistry**, Oxford, v.101, n.1, p.379-385, 2007.

POLITEO, O.; JUKIC, M.; MILOS, M. Chemical composition and antioxidant capacity of free volatile aglycones from basil (*Ocimum basilicum* L.) compared with its essential oil. **Food Chemistry**, Oxford, v.101, n.1, p. 379-385, 2007.

PONZI, E.A.C., OLIVEIRA, T.L., MORAIS, I.A.F., JUNIOR, J.J.S., GERBI, M.M., SOUZA, I.A., PSIOTTANO, M.N.C., XAVIER, H.S. Atividade antimicrobiana do extrato de *Momordica charantia* L. **Rev. Cir. Traumatol. Buco-Maxilo-fac.**, Camaragibe v.10, n.1, p. 89-94, jan./mar. 2010.

RAUHA, J.P. et al. Antimicrobial effects of finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 56, n. 1, p. 3-12, 2000.

REIS, R.C.; DEVILLA, I.A.; DIEGO P. R. ASCHERI; D.P.R.; SERVULO, A.C.O.; SOUZA, A.B.M. Cinética de secagem de folhas de manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) via infravermelho. **R. Bras. Eng. Agríc. Ambiental**, v.16, n.12, p.1346–1352, 2012.

RIBAS, M.O. et al. Efeito da *Schinus terebinthifolius* Raddi sobre o processo de reparo tecidual das lesões ulceradas induzidas na mucosa bucal do rato. **Rev. Odontol. Cienc.** – Fac. Odontol/PUCRS, v.21, nº 53, pág. 245-252, 2006.

RICHTER, R.; VON REUß, S. H.; KÖNIG, W. A.; Spirocyclopropane-type sesquiterpene hydrocarbons from *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Phytochemistry**, 71, 1371. 2010.

ROSADO, L.D.S.; PINTO, J.E.B.P.; BOTREL, P.P.; BERTOLUCCI, S.K.V.; NICULAU, E.S.; ALVES, P.B. Influence of leaf processing and type of drying on the content and chemical composition of the essential oil of basil cv. Maria Bonita. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 35, n. 2, p. 291-296, mar./abr., 2011.

SAAD, A.; FADLI, M.; BOUAZIZ, M.; BENHARREF, A.; MEZRIOUI, N. E.; HASSANI, L., 2010. Anticandidal activity of the essential oils of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* and their synergism with amphotericin B and fluconazol. **Phytomedicine**, volume 17, Issue 13. p. 1057-1060. November 2010.

SAHA, S.; MUKHOPADHYAY, M.K.; GHOSH, P.D.; NATH, D. Effect of methanolic leaf extract of *Ocimum basilicum* L. on benzene-induced hematotoxicity in mice. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. Vol. 2012.

SAJJADI, S.E. Analysis of the essential oil of two cultivated basil (*Ocimum basilicum*) from Iran. Daru, Iran, v. 14, n.3, p.128-130, 2006.

SALVI JÚNIOR, A. *Schinus terebinthifolius* Raddi: estudo anatômico e histoquímico das folhas e investigação do potencial farmacêutico do extrato etanólico e suas frações. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP Araraquara, 2009.

SANTOS, E.B.; DANTAS, G.S.; SANTOS, H.B.; DINIZ, M.F.F.M.; SAMPAIO, F.C. Estudo etnobotânico de plantas medicinais para problemas bucais no município de João Pessoa, Brasil. **Rev. bras. farmacogn.** 19(1B):321-4. 2009.

SANTOS, A.C.A., ROSSATO, M., SERAFINI, L.A., BUENO, M., CRIPPA, L.B., SARTORI, V.C., DELLACASSA, E., MOYNA, P. Efeito fungicida dos óleos essenciais de *Schinus molle* L. e *Schinus terebinthifolius* Raddi, Anacardiaceae, do Rio Grande do Sul. Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian **Journal of Pharmacognosy** 20(2): 154-159, Abr./Mai. 2010.

SANTOS, P.O. Caracterização fisiológica e molecular de *Candida albicans* envolvidas em casos de candidíase vaginal e prospecção de óleos essenciais anti-*Candida*. Tese (Doutorado em Biotecnologia) Universidade federal de Sergipe, 2011.

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

SARTORI, M.R K. Atividade antimicrobiana de frações de extratos e compostos puros obtidos das flores da *Acmela brasiliensis* Spreng (*Wedelia paludosa*) (Asteraceae). Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade do Vale do Itajaí, 2005.

SIANI, A.C., SAMPAIO, A.L.F.; SOUSA, M.C.; HENRIQUES, M.G.M.O.; HENRIQUES RAMOS, M. F. S. Óleos essenciais – Potencial antiinflamatório. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, 2000.

SIDDIQUI, R.R.; AHMAD, H.; SHAKOOR, C.S.; EHTESHAMUDDIN, A.F.M.; SHIREEN, S. Antimicrobial activity of essential oils. Part II. **Pak J Scient Ind Res** 39: 43-47. 1996.

SIDRIM, J.J.C; ROCHA, M. F. G. **Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos**, 1:ed, Rio de Janeiro; Guanabara Koogan, 2004.

SILVA, A.B.; SOUZA, M.F.; SILVA, A.H.B.; SILVA, A.B.; MAFFEI, E.M.D.; AMARA, C. L.F. Descrição morfológica e fenologia floral em alfavaca do campo (*Ocimum campechianum* Mill.). In: Congresso Brasileiro de Olericultura, 46º, 2006, Goiás. Diversificação e industrialização na horticultura, 2006.

SILVA, K.E.R.; ALVES, L.D.S.; SOARES, M.F.R.; PASSOS, R.C.S.; FARIA, A.R.; ROLIM NETO, P.J. Modelos de Avaliação da Estabilidade de Fármacos e Medicamentos para a Indústria Farmacêutica. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.** 30(2): 129-135. 2009.

SIQUI, A.C.; Sampaio, A.L.F.; Sousa, M.C.; Henriques, M.G.M.O.; Ramos, M.F.S. Óleos essenciais – potencial antiinflamatório. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento** 16: 38-43. 2000.

SOUZA, D.C.L. Diversidade genética, produção de frutos e composição química em *Schinus terebinthifolius* Raddi. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas) – Universidade Federal de Sergipe, 2012.

SOUZA, V.B.; FERREIRA, J.R.N. Desenvolvimento e estudos de estabilidade de cremes e géis contendo sementes e extratos do bagaço da uva Isabel (*Vitis labrusca* L.). **Rev Ciênc Farm Básica Apl.** 31(3):217-222. 2010.

TONIAL, F. Atividade antimicrobiana de endófitos e de extratos foliares de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira). Dissertação (mestrado em Microbiologia). Universidade Federal do Paraná, 2010.

TYRREL, M. H. Evolution of natural flavor development with the assistance of modern technologies. *Fd Tech.* January, 68-72. 1990.

UNITED States Pharmacopoeia – U. S. P. 24,1 CDRoom. 2004.

VANI, S. R.; CHENG, S.F.; CHUAH, C.H. Comparative Study of Volatile Compounds from Genus *Ocimum*. **American Journal of Applied Sciences**, v. 6, n. 3, p. 523-528, 2009.

VEIGA JÚNIOR, V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VELÁZQUEZ, E.; TOURNIER, H.A.; MORDUJOVICH DE BUSCHIAZZO, P.; SAAVEDRA, G.; SCHINELLA, G.R. Antioxidant activity of Paraguayan plant extracts. **Fitoterapia** 74: 91-97. 2003.

VIEIRA, P.R.N. Atividade antifúngica dos óleos essenciais de espécies de *Ocimum* frente a cepas de *Candida* Spp. e *Microsporium canis*. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, 2009.

VIEIRA, P.R.N. Atividade antifúngica dos óleos essenciais de espécies de *ocimum* frente a cepas de *candida* spp. e *microsporium canis*. Dissertação (mestrado em Ciências Veterinárias). Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, 2009.

VIEIRA, P.R.N. Atividade antifúngica dos óleos essenciais de espécies de *ocimum* frente a cepas de *Candida* spp. E *Microsporium canis*. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, 2009.

VITAL, T. M.; REIS, C.; GARCÍA-ZAPATA, M.T.A.; CUNHA, L.C. Estudo comparativo de duas técnicas farmacopéicas de avaliação da atividade antimicrobiana dos fármacos: nistatina, eritromicina, neomicina e gentamicina. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences** vol. 40, n. 2, abr./jun., 2004

WHITEWAY M, BACHEWICH C. Morphogenesis in *Candida albicans*. **AnnuRev Microbiol** .61: 529-553. 2007.

YBARRA, F. et al. Influencia de la época de recolección de *Minthostachy verticillata* (Argentina) sobre la actividad antimicrobiana de su aceite esencial.v. 10 edição especial; pôster, 2005.