



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE NA AMAZÔNIA
OCIDENTAL

DAGMAR MERCADO SOARES

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Origanum
majorana* L. (manjerona) SOBRE CEPAS DE *Candida albicans***

RIO BRANCO-ACRE

2018

DAGMAR MERCADO SOARES

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Origanum majorana* L. (manjerona) SOBRE CEPAS DE *Candida albicans*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde na Amazônia Ocidental da Universidade Federal do Acre – UFAC, para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Biotecnologia Aplicada à Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Anselmo Fortunato Ruiz Rodriguez.

Coorientador: Prof. Dr. Fernando Sérgio Escócio Drummond Viana de Faria.

Colaboradora: Prof^a. Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima.

RIO BRANCO-ACRE

2018

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da UFAC

G635c Gonçalves, Maria do Socorro Avelino, 1969-
 Colostroterapia: evolução clínica dos recém-nascidos pré-termos de muito
baixo peso / Maria do Socorro Avelino Avelino. – 2018.
 59 f.: il.; 30 cm.

 Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Acre, Programa de Pós-
graduação em Ciências da Saúde. Rio Branco, 2018.
 Inclui referências bibliográficas, anexo e apêndice.
 Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cristiane de Oliveira Cardoso.

 1. Ciências da saúde – Dissertação. 2. Recém-nascidos. 3. Baixo peso ao
nascido. I. Título.

CDD: 613

Bibliotecária: Alanna Santos Figueiredo CRB-11º/1003

DAGMAR MERCADO SOARES

**Atividade antifúngica do óleo essencial de *Origanum majorana* L. (manjerona)
sobre cepas de *Candida albicans***

Defesa de Dissertação de Mestrado da discente **Dagmar Mercado Soares**, defendida e **APROVADA**, por decisão unânime, em 28 de Março de 2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Anselmo Fortunato Ruiz Rodriguez
(Universidade Federal do Acre-UFAC)
Presidente/Orientador

Prof. Dr. Romeu Paulo Martins Silva
(Universidade Federal do Acre-UFAC)
Examinador Interno

Prof. Dr. Diego Castro Musial
(União Educacional do Norte - UNINORTE)
Examinador Externo

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes da minha vida:

À minha mãe Amalia Peso, ao meu pai Fernando Soares, aos meus irmãos, ao meu esposo Romildo Lima, pelo apoio e compreensão; e em especial, às minhas filhas Fernanda e Gisele, pela superação da minha ausência e pouca dedicação durante o período de pesquisa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus que iluminou o meu caminho durante esta árdua caminhada.

À minha família, à qual sou eternamente grata, por estar presente nos melhores e piores momentos da minha vida.

Ao meu orientador, professor Dr. Anselmo Fortunato Ruiz Rodriguez, da Universidade Federal do Acre-UFAC, pela orientação e ter acreditado em mim, contribuindo desta forma para que este sonho se tornasse realidade.

Ao meu coorientador, professor Dr. Fernando Escócio (UFAC), pelas sugestões oportunas e confiança que sempre transmitiu durante o período de pesquisa.

Ao professor Dr. Carrombert Fernandes (UFAC), pois sempre atendeu às minhas solicitações com presteza e paciência, perante minhas dificuldades.

À professora Me. Sandra Ribeiro (UFAC), por me acolher em seu laboratório e compartilhar o seu conhecimento.

Ao coordenador do mestrado, professor Dr. Romeu Silva (UFAC), pelo compromisso e busca incessante para melhoria da qualidade do curso. Além disso, por ter aceitado compor a minha banca de defesa.

Ao professor Dr. Diego Castro Musial (UNINORTE), pela sua participação e considerações pertinentes na banca de defesa.

Ao professor Me. Guaracy Maia (UFAC), por colocar-se à disposição durante a execução da pesquisa.

Ao meu amigo, professor Dr. Ricardo Rocha (UFAC), pelo conhecimento compartilhado.

Ao meu amigo Izaías Brasil, pela sua disponibilidade e ajuda, sempre que precisei dele.

À minha amiga Maria do Socorro Avelino, pelo apoio, carinho e amizade durante esta jornada.

Aos amigos, Thiago Medeiros e Iuri Ferreira, pela grande ajuda dada durante a minha estada em João Pessoa, Paraíba.

Ao meu parceiro e amigo Nataniel Silva, pelo incentivo, pela troca de ideias, pelas boas risadas, neste caminho que escolhemos juntos.

Ao colega Anderson Ramos do Laboratório de Nanobiotecnologia-Complexo BIONORTE/UFAC, pelos conhecimentos prestados.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde na Amazônia Ocidental pelos ensinamentos transmitidos durante este processo.

À secretária do mestrado, Caroline Vasconcellos pela eficiência com que atendeu às minhas solicitações.

À professora Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima, da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), por ter disponibilizado seu tempo, conhecimento e experiência, que foram essenciais para finalização desta pesquisa.

À doutoranda Daniele de Figuerêdo Silva (UFPB), pela ajuda na execução dos ensaios.

À Universidade Federal do Acre, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde na Amazônia Ocidental, por me dar a oportunidade para obter o título de mestre.

À professora Dra. Carin Hoffmeister, da Faculdade Meta-FAMETA, por ter aceitado participar da banca do exame de qualificação.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.

E a todos que de alguma forma contribuíram para que eu realizasse este trabalho, porque ninguém consegue nada sozinho... MUITO OBRIGADA!

EPÍGRAFE

“Toda conquista começa com a decisão de tentar”

(Gail Devers)

RESUMO

SOARES, D. M. **Atividade antifúngica de óleos essenciais de *Origanum majorana* L. (manjerona) sobre cepas de *Candida albicans***. 2018. 74 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde na Amazônia Ocidental - Área de Concentração: Biotecnologia Aplicada à Saúde) - Universidade Federal do Acre, Rio Branco, 2018.

A candidíase vulvovaginal (CVV) é a infecção da vulva e da vagina, causada por fungos do gênero *Candida*. A espécie *Candida albicans* é o principal agente etiológico, sendo responsável pela maioria dos casos. A resistência dos micro-organismos, tem representado um grande desafio terapêutico no tratamento da CVV, o que torna necessário a busca por novos antifúngicos mais eficazes a partir de produtos naturais. Diante da importância clínica, este estudo teve como objetivo avaliar a atividade antifúngica do óleo essencial de *Origanum majorana* L. sobre cepas de *C. albicans*, isoladas de secreções vulvovaginais. A análise química do óleo essencial foi realizada através da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM). A atividade antifúngica do óleo essencial e da nistatina foi determinada pela concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM), através da técnica de microdiluição em caldo, utilizando um total de 16 cepas, sendo 15 cepas clínicas e uma cepa padrão ATCC. Foram identificados 15 compostos, sendo que os principais foram linalol (27,93%), eucaliptol (23,04%), terpinen-4-ol (11,47%), acetato de trans-crisantenil (10,36%) e *p*-cimeno (6,03%). A CIM e CFM do óleo essencial foram 64 e 128 µg/mL, inibindo 87,5% e 50% das cepas ensaiadas, respectivamente. Para a nistatina, os valores de CIM e CFM foram semelhantes na concentração 512 µg/mL e para as mesmas cepas, resultando na inibição de 75% das cepas. Conclui-se que, o óleo essencial de *O. majorana* apresentou forte atividade antifúngica contra cepas de *C. albicans*, sendo uma alternativa promissora para a produção de um fármaco para o tratamento da candidíase vulvovaginal.

Palavras-chave: *Origanum majorana*, óleo essencial, linalol, candidíase vulvovaginal, *Candida albicans*.

ABSTRACT

SOARES, D. M. **Antifungal activity of essential oils of *Origanum majorana* L. (manjerona) on strains of *Candida albicans***. 2018. 74 f. Dissertation (Master in Health Sciences in Western Amazonia – Concentration area: Biotechnology Applied to Health) - Federal University of Acre, Rio Branco, 2018.

Vulvovaginal candidiasis (VVC) is an infection of the vulva and the vagina, caused by fungi of the genus *Candida*. The species *Candida albicans* is the main etiologic agent, being responsible for most cases. The resistance of microorganisms, has represented a major challenge in the therapeutic treatment of VVC, what makes necessary the search for new more effective antifungal from natural products. Given the importance the clinic, this study aimed to evaluate the antifungal activity of *Origanum majorana* L. essential oil on strains of *C. albicans*, isolated from vulvovaginal secretions. The chemical analysis of the essential oil was performed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS). Antifungal activity of the essential oil and the nystatin was determined by the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC), through the microdilution technique, using a total of 16 strains, being 15 clinical strains and a standard strain ATCC. Fifteen compounds were identified, being that the main were linalool (27.93%), eucalyptol (23.04%), terpinenol-4 (11.47%), trans- chrysanthenyl acetate (10.36%) and *p*-cymene (6.03%). The MIC and MFC of essential oil were 64 and 128 µg/mL, inhibiting 87.5% and 50% of the strains tested, respectively. To nystatin, the values of MIC and MFC were similar in concentration 512 µg/mL and for the same strains, resulting in the inhibition of 75% of the strains. It is concluded that, the essential oil of *O. majorana* presented strong antifungal activity against strains of *C. albicans*, being a promising alternative for the production of a drug for the treatment of vulvovaginal candidiasis.

Keywords: *Origanum majorana*, essential oil, linalool, vulvovaginal candidiasis, *Candida albicans*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASD - Ágar Sabouraud Dextrose

ATCC - American Type Culture Collection

CCS - Centro de Ciências da Saúde

CFM - Concentração Fungicida Mínima

CIM - Concentração Inibitória Mínima

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute

CVV- Candidíase vulvovaginal

CVVR - Candidíase vulvovaginal recorrente

DCF - Departamento de Ciências Farmacêuticas

DMSO - Dimetilsulfóxido

LM - Laboratório de Micologia

NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards

RPMI - Instituto Roswell Park Memorial

UFC - Unidade Formadora de Colônia

UFPB - Universidade Federal da Paraíba

USA - United States of America

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Compostos químicos presentes no óleo essencial de <i>O. majorana</i>	39
Tabela 2: Valores de CIM ₉₀ e CFM ₉₀ do óleo essencial de <i>O. majorana</i> e nistatina sobre cepas de <i>C. albicans</i>	42

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
2.1 Os fungos	14
2.2 Gênero <i>Candida</i>	16
2.3 <i>Candida albicans</i>	20
2.4 Candidíase vulvovaginal	22
2.5 Terapia antifúngica	26
2.6 Produtos naturais	27
2.7 Óleos essenciais	29
2.8 Gênero <i>Origanum</i>	31
2.9 <i>Origanum majorana</i> L.....	32
3. OBJETIVOS.....	34
3.1 Geral.....	34
3.2 Específicos	34
4. MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1 Local da pesquisa	35
4.2 Óleo essencial	35
4.3 Análise química do óleo essencial	35
4.4 Meios de cultura.....	36
4.5 Micro-organismos	36
4.6 Inóculo	36
4.7 Preparação da emulsão do óleo essencial	37
4.8 Antifúngico padrão	37
4.9 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	37
4.10 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM).....	38
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1 Análise dos componentes do óleo essencial	39
5.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM).....	41
6. CONCLUSÃO	47
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	48
REFERÊNCIAS.....	49

1. INTRODUÇÃO

As infecções ginecológicas são as razões mais comuns pelas quais as mulheres procuram tratamento médico (BEHMANESH et al., 2015). Entre as infecções que afetam a vulva e a vagina (FELIX et al., 2017), destacam-se a vaginose bacteriana, a candidíase vulvovaginal e a tricomoníase (VAN SCHALKWYK et al., 2015), que, em conjunto, são responsáveis por 90% dos casos de secreções anormais (CAMARGO et al., 2015).

A candidíase vulvovaginal (CVV) é uma infecção da vulva e da vagina, causada por fungos do gênero *Candida* (HOLANDA et al., 2007). A espécie *C. albicans* é o principal agente etiológico, sendo responsável por 70-90% dos casos (BRANDOLT et al., 2017).

Estudos mostram que 70-75% das mulheres em idade reprodutiva, em algum momento de sua vida vão apresentar pelo menos um caso de CVV. A taxa de recorrência é de 40 a 50% e aproximadamente de 5 a 8% desenvolvem candidíase vulvovaginal recorrente (CVVR), definida por quatro ou mais episódios em doze meses (BRANDOLT et al., 2017), não relacionados à antibioticoterapia (LEMA, 2017).

A resistência dos micro-organismos aos antifúngicos convencionais (ABRANTES et al., 2013), tem representado um grande desafio terapêutico para a clínica, frente às dificuldades observadas no tratamento da CVV (ALVES; CAMARGO; GOULART, 2010), o que torna necessário a busca por novos antifúngicos mais eficazes e menos tóxicos. Para isso, os pesquisadores estão explorando novas alternativas terapêuticas, como o uso de produtos naturais, especialmente óleos essenciais, que nos últimos anos, têm atraído o interesse científico, devido ao seu potencial como fonte de compostos biologicamente ativos (ABRANTES et al., 2013).

Os óleos essenciais são compostos naturais, voláteis e complexos, sintetizados pelas plantas durante o seu metabolismo secundário (BAKKALI et al., 2008). São conhecidos desde a antiguidade por possuir propriedades antifúngicas, cuja utilização pode representar um avanço contra os mecanismos de resistência que inativam antifúngicos padrões (ABRANTES et al., 2013). A atividade antifúngica do óleo essencial é atribuída à sua natureza altamente lipofílica e baixo peso molecular, capazes de romper a membrana celular, causando morte celular ou inibindo a esporulação e brotamento de fungos (NAZZARO et al., 2017).

A espécie *Origanum majorana* L., popularmente conhecida como manjerona, é uma planta herbácea e aromática que pertence à família Lamiaceae, muito comum na Região do Mediterrâneo. Relatos na literatura afirmam que a planta apresenta interessantes efeitos farmacológicos, tais como antioxidante, anticonvulsivante, antimutagênica, antibacteriana, antifúngica, antiprotozoário, inseticida e antioxicida (PRERNA; VASUDEVA, 2015). Nesse contexto, objetivou-se avaliar a atividade antifúngica do óleo essencial de *O. majorana* sobre cepas de *C. albicans*, isoladas de secreções vulvovaginais.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Os fungos

Os fungos são seres eucariontes e heterotróficos, que possuem ampla distribuição na natureza, podendo ser encontrados em vários habitats, como: ar, água, terra, animais e alimentos. Suas espécies sofrem, em sua incidência, variações conforme a localidade, estação do ano, grau higroscópico do ar, entre outras (SILVA et al., 2011).

Durante muitos anos, os fungos foram considerados como vegetais, porém, a partir de 1969, passaram a ser classificados em um reino à parte, por apresentarem características próprias, tais como: não sintetizar clorofila, não possuir celulose na sua parede celular (exceto alguns fungos aquáticos) e não armazenar amido como substância de reserva; sendo assim eles foram diferenciados das plantas (ALMEIDA et al., 2015).

Esses micro-organismos necessitam de matéria orgânica para obtenção de carbono e de energia para seu metabolismo, por isso estarão sempre associados ao material orgânico, como sapróbios ou decompositores, simbioses, comensais e parasitas. São os efeitos decorrentes destas manifestações que, dependendo do sentido, poderão ser considerados úteis ou prejudiciais (SILVA et al., 2011).

Estima-se que existam de 1,5 a 5 milhões de espécies de fungos (CHOI; KIM, 2017). No entanto, aproximadamente 100 mil são conhecidas (WOOD, 2017), das quais em torno 150 a 300 são patogênicas para o ser humano, e destas, entre 10 a 15 são relativamente comuns (CASADEVALL, 2012).

É difícil generalizar características dos fungos devido à diversidade ecológica, fisiológica e morfológica dentro do Reino Fungi, no qual são reconhecidos três grupos distintos: fungos filamentosos, leveduras e cogumelos, sendo os dois primeiros considerados fungos microscópicos e os cogumelos, fungos macroscópicos (ABREU; ROVIDA; PAMPHILE, 2015). Os fungos de interesse médico são as leveduras e os fungos filamentosos (ANVISA, 2004).

Os fungos podem se apresentar sob a forma unicelular, como as leveduras, e a forma multicelular, filamentosa, sendo os bolores ou mofos. A forma filamentosa é constituída de um conjunto de estruturas tubulares, denominadas de hifas, que

quando agrupadas, formam o micélio (SILVA; MALTA, 2016). Ainda existem os dimórficos, ou seja, podem apresentar-se na forma leveduriforme ou filamentosa, dependendo da temperatura a que é exposto; na temperatura ambiente (25 a 28 °C), apresentam-se na forma filamentosa e na temperatura de 37 a 39 °C mostram-se como leveduras (ALMEIDA et al., 2015). A maioria dos fungos são incapazes de crescer a 37 °C, pois essa temperatura pode matar o fungo. Assim, a termotolerância para sobreviver a esta temperatura é essencial para o crescimento de fungos dentro do corpo humano (WANKE; LAZÉRA; NUCCI, 2000).

A classificação e identificação dos fungos são baseadas na morfologia e não nas suas diferenças nutricionais e bioquímicas, que são tão importantes na classificação das bactérias (KAMESWARAN; RAGHUNANDHAN, 2009). Todavia, técnicas moleculares estão sendo utilizadas para auxiliar na identificação das espécies fúngicas (RAJA et al., 2017).

As doenças causadas por fungos são chamadas de micoses e têm amplo espectro de apresentação clínica, variando desde lesão superficial que acomete a camada mais externa da epiderme até infecções graves e disseminadas capazes de determinar a morte do hospedeiro, quando não diagnosticadas e tratadas adequadamente (CAPONE et al., 2010). As micoses são mais comuns nos países tropicais e subtropicais, possivelmente porque o clima dessas áreas é mais adequado para o crescimento desses fungos, embora esses agentes patogênicos possam causar doenças em qualquer parte do mundo (ABDULLA; SAEED, 2015).

As nomenclaturas clínicas utilizadas para as micoses são baseadas no local da infecção, via de aquisição do patógeno e tipo de virulência exibida pelo fungo (WALSH; DIXON, 1996). Com base no local da infecção, as micoses são classificadas como infecções superficiais, cutâneas, subcutâneas ou sistêmicas, dependendo do local e do tipo de fungo (KAMESWARAN; RAGHUNANDHAN, 2009).

Em relação às vias de aquisição do patógeno, os fungos infecciosos podem ser exógenos ou endógenos. As rotas de entrada para fungos exógenos incluem ar, cutânea ou percutânea. A infecção endógena envolve colonização por um membro da “flora normal” ou reativação de uma infecção anterior (WALSH; DIXON, 1996).

No que diz respeito à virulência (KAMESWARAN; RAGHUNANDHAN, 2009), essas infecções são causadas por dois tipos de micro-organismos: patógenos

primários e oportunistas. Os patógenos primários são capazes de estabelecer uma infecção na população saudável. Em contrapartida, os patógenos oportunistas, entre eles micro-organismos comensais da população saudável (VANDEPUTTE; FERRARI; COSTE, 2012) causam doenças, principalmente em indivíduos com mecanismos de defesa comprometidos (WALSH; DIXON, 1996; KAMESWARAN; RAGHUNANDHAN, 2009).

A maioria dos patógenos primários são fungos filamentosos, enquanto a maior parte dos patógenos oportunistas, são leveduras. No entanto, alguns fungos filamentosos estão sendo cada vez mais identificados, como agentes patogênicos oportunistas (VANDEPUTTE; FERRARI; COSTE, 2012). Entre os fungos oportunistas que afetam os seres humanos, três espécies representam ameaças consistentes em todo o mundo: *Aspergillus fumigatus*, *C. albicans* e *Cryptococcus neoformans*, que causam aspergilose, candidíase e criptococose, respectivamente (CHITTY; FRASER, 2017).

2.2 Gênero *Candida*

A primeira documentação de leveduras do gênero *Candida* spp. como patógeno é atribuída a Langenbeck, que em 1839 observou e isolou, da cavidade oral de um paciente com afta bucal, um micro-organismo, que atualmente é a mais importante levedura patogênica do homem, a espécie *C. albicans* (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010). No ano de 1842, David classificou a espécie no gênero *Sporotricum*. Em 1923, Berkhout, transferiu a referida espécie para o gênero *Candida* e criou a espécie *C. albicans*. Mais de 111 denominações, descritas no livro *The yeast* (1984), foram atribuídas a esta levedura ao longo da história (TOZZO; GRAZZIOTIN, 2012).

As espécies do gênero *Candida* são micro-organismos eucarióticos desprovidos de pigmentos fotossintetizantes, que possuem parede celular composta basicamente por quitina e membrana plasmática fosfolipídica que contém vários esteróis, com predomínio do ergosterol. São classificadas taxonomicamente no Reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Saccharomycetes, Ordem Saccharomycetales, Família Saccharomycetacea (SANTANA et al., 2013).

As leveduras do gênero *Candida*, podem ser encontradas em variados ecossistemas, como solo, alimentos, água, fazendo parte da microbiota de homens e animais (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010). Em indivíduos saudáveis, *Candida* coloniza principalmente superfícies mucosas da cavidade oral, trato gastrointestinal e urogenital, sem sintomas de doença (BONDARYK; KURZATKOWSKI; STANISZEWSKA, 2013).

Todavia, quando há uma ruptura no balanço normal da microbiota ou o sistema imune do hospedeiro encontra-se comprometido, as leveduras tendem a manifestações agressivas, tornando-se patogênicas (PEIXOTO et al., 2014). Quanto à origem, pode ser endógena, quando oriunda da microbiota; ou exógena, quando transmitida através do ato sexual, podendo ser considerada como uma Infecção Sexualmente Transmissível - IST (BARBEDO; SGARBI, 2010; PEIXOTO et al., 2014, SOUZA, 2016).

Como podem colonizar uma variedade de nichos (tanto superfícies bióticas quanto abióticas, como dispositivos médicos), o seu potencial patogênico dentro do microbioma está relacionado à sua capacidade de sobreviver, se adaptar e crescer em ambientes que sofrem mudanças constantes (HUFFNAGLE; NOVERR, 2013). Esses micro-organismos degradam proteínas e carboidratos para obterem carbono e nitrogênio, elementos essenciais para seu desenvolvimento (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010).

Devido à sua capacidade adaptativa, essas leveduras podem desenvolver tanto na presença de oxigênio quanto em anaerobiose. Na maioria das vezes se reproduzem de maneira assexuada, por meio de estruturas denominadas conídios, entretanto algumas espécies se multiplicam sexualmente (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010).

O gênero *Candida* constitui o principal grupo de leveduras que causam infecções oportunistas no ser humano (VIEIRA; SANTOS, 2016) e compõe-se de aproximadamente 200 diferentes espécies (COLOMBO et al., 2013), sendo que cerca de 10% são associadas à infecções no homem (FERREIRA; RAGAZZINI; ANDRADE, 2012). As espécies mais importantes do ponto de vista clínico e epidemiológico são: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*. Porém, *C. albicans* permanece como a espécie mais comum nas infecções humanas (VIEIRA; SANTOS,

2016). Embora, *C. albicans* continue a ser a espécie mais frequentemente isolada, o número de infecções causadas por espécies de *Candida* não *albicans* aumentaram significativamente nas últimas duas décadas (ROSSONI et al., 2013).

A identificação das leveduras é obtida através da análise de suas características micromorfológicas e perfil bioquímico. A caracterização morfológica da maioria dos isolados deste gênero, consiste na observação de blastoconídios, pseudo-hifas (às vezes hifas verdadeiras), e eventualmente clamidoconídios (*C. albicans* e *C. dubliniensis*) (COLOMBO et al., 2013). As provas bioquímicas são baseadas na assimilação de nitrogênio e de carboidratos (auxonograma), fermentação de carboidratos (zimograma), prova da ureia e teste do tubo germinativo (BRITO et al., 2009).

O meio de cultura CHROMagar *Candida* possibilita a identificação presuntiva das espécies desse gênero, como também facilita o reconhecimento de culturas mistas. Seu princípio é a produção de cor nas colônias, por reações enzimáticas específicas, com um substrato cromogênico do meio. As espécies *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei* geram, respectivamente, colônias de coloração verde, azul e rosa rugosa, e as demais, coloração branca a rosa (BARBEDO; SGARBI, 2010).

A rápida diferenciação presumida entre *C. albicans* e espécies *C. não albicans*, é geralmente realizada com base na capacidade de *C. albicans* produzir tubo germinativo a 37 °C em soro sanguíneo. No entanto, esses testes apresentam algumas limitações, pois existem outras duas espécies que também compartilham essa característica: *C. dubliniensis* e *C. africana*. Além disso, *C. tropicalis* pode produzir pseudo-hifas que, devido à constrição pode dificultar sua diferenciação (MATTEI et al., 2014), exigindo a realização de outros procedimentos, nomeadamente, métodos moleculares (PEREIRA, 2010).

Mudanças morfológicas estão agregadas à patogenicidade do micro-organismo, e acredita-se que fatores ambientais possam alterar o estado fisiológico das leveduras comensais, induzindo alterações morfogenéticas que resultam na formação de micélio, o qual está associado com a evolução dos estados patológicos (BRITO et al., 2014). As leveduras são responsáveis pela colonização, por infecções fúngicas superficiais em imunocompetentes e por infecções sistêmicas em imunodeprimidos (CROCCO et al., 2004). A hifa é a forma que melhor transpõe barreiras, devido ao seu

desenvolvimento filamentosos, ao passo que a levedura, por sua forma arredondada, é a melhor para a disseminação eficiente (BARBEDO; SGARBI, 2010).

Em geral, a forma de levedura predomina durante a colonização no hospedeiro sadio, enquanto as hifas surgem frente à deficiência do sistema imune. Contudo, ambas as formas são de grande importância na patogênese, uma vez que elas são requeridas em diferentes situações no hospedeiro (BARBEDO; SGARBI, 2010).

O poder patogênico de *Candida* sp. pode ter algumas características, como são espécies potencialmente patogênicas para o homem (capazes de crescer a 37 °C), formação de estruturas filamentosas (hifas e pseudo-hifas) com mais de 200 µm de comprimento, que representam um obstáculo à fagocitose, que é o principal meio de defesa do organismo contra esse tipo de infecção. Produzem alguns metabólitos que podem desencadear manifestações alérgicas (TOZZO; GRAZZIOTIN, 2012).

Apresentam certos fatores de virulência, como a capacidade de evadir-se dos mecanismos de defesas do hospedeiro, a adesão, formação de biofilmes (no tecido hospedeiro e em dispositivos médicos) e a produção de enzimas hidrolíticas prejudiciais aos tecidos, tais como proteases, fosfolipases e hemolisina. As enzimas hidrolíticas extracelulares parecem desempenhar um papel importante na adesão, penetração de tecidos, invasão e a destruição dos tecidos do hospedeiro (SARDI et al., 2013).

As infecções por *Candida* podem ser superficiais ou invasivas. As infecções superficiais geralmente afetam a pele ou as mucosas, e podem ser tratadas com sucesso com drogas antifúngicas tópicas. No entanto, as infecções fúngicas invasivas, geralmente são fatais, provavelmente devido a métodos de diagnóstico ineficientes e terapias antifúngicas iniciais inapropriadas (SPAMPINATO; LEONARDI, 2013). Entre as lesões produzidas em mucosas, destacam-se as infecções orofaríngeas e as vulvovaginites, que são mais frequentes em pacientes com AIDS e em mulheres na idade reprodutiva, respectivamente (MIRANDA et al., 2005).

A variedade de apresentações da doença leva à necessidade de utilização de diferentes métodos diagnósticos e esquemas terapêuticos (CROCCO et al., 2004). Existem várias classes de compostos que compõem o arsenal usado para tratar infecções por *Candida*, dependendo do tipo e local da infecção e da sensibilidade das espécies (WHALEY et al., 2017).

2.3 *Candida albicans*

A espécie *C. albicans* é um organismo polimórfico que sofre transição morfológica entre as formas de levedura (blastocóndio), pseudo-hifa e hifa (VILLAR et al., 2004). Além disso, sob condições de crescimento subótimas, nesse fungo pode ocorrer a formação de clamidoconídios (esporos arredondados que possuem uma espessa parede celular) (ÁLVAREZ; SVIDZINSKI; CONSOLARO, 2007). Por isso, recentemente, vários autores têm proposto a utilização do termo polimorfismo em substituição ao dimorfismo, visto que existem formas celulares intermediárias entre a levedura e a hifa (SANTANA et al., 2013).

Considerando aspectos macroscópicos, *C. albicans* é caracterizada primariamente pela morfologia colonial úmida, cremosa e odor específico, de aspecto liso ou rugoso e coloração branco-amarelada em meio de cultura ágar Sabouraud, formação de tubo germinativo, assimilação de carbono e capacidade fermentativa. Seu crescimento é favorecido em temperaturas variando entre 20 °C a 38 °C. O pH ácido favorece sua proliferação, sendo que a faixa ideal de pH varia de 2,5 até 7,5. Microscopicamente, as leveduras são de formato esférico, ovoide (blastocóndio) ou alongado, medem de 3 a 5 µm de diâmetro e apresentam-se como Gram-positivas em preparações coradas por esta técnica (SANTANA et al., 2013).

Enquanto outros fungos (por exemplo, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis* e *Penicillium marneffe*) se encontram na natureza na fase miceliana (filamentosa) e se convertem em levedura nos tecidos humanos causando doenças (LU; SU; LIU, 2014), a espécie *C. albicans*, comporta-se de modo contrário (BARBEDO; SGARBI, 2010). As hifas têm maior capacidade de aderir e penetrar nas células epiteliais humanas do que os blastocóndios. Na forma de hifa, *C. albicans* é invasiva e patogênica, enquanto que na forma de levedura é comensal e não patogênica (SANTANA et al., 2013). *In vitro*, a mudança na morfologia pode ser induzida por alterações no pH, temperatura, concentração de CO₂, soro sanguíneo, entre outros (CHITTY; FRASER, 2017).

Na maioria dos casos, o primeiro contato dos humanos com a espécie *C. albicans*, ocorre durante o nascimento quando eles encontram a levedura ao passar pelo canal vaginal. Durante esse processo, o fungo coloniza a cavidade oral e as porções do trato gastrointestinal superior e inferior do recém-nascido, onde passa a

residir como comensal (KOBAYASHI, 1996), fazendo parte da microbiota normal dos indivíduos saudáveis (PEIXOTO et al., 2014).

É a espécie mais frequentemente isolada de infecções superficiais e invasivas em diversos sítios anatômicos e como causa de candidíase em todas as partes do mundo (BARBEDO; SGARBI, 2010). Apesar dos altos níveis de morbidade associada, as infecções superficiais causadas por *C. albicans* não são letais. No entanto, a candidíase sistêmica está associada a uma alta taxa de mortalidade, mesmo com terapia antifúngica de primeira linha (MAYER; WILSON; HUBE, 2013).

A patogenicidade de *C. albicans* depende de dois fatores principais: o estado imune do hospedeiro e os fatores de virulência desse patógeno. Nas últimas três décadas foram identificadas uma grande quantidade de fatores de virulência (KABIR; HUSSAIN; AHMAD, 2012). Entre os fatores de virulência estão a capacidade de adesão, desenvolvimento de biofilmes, hidrofobicidade da superfície celular, transição morfológica e produção de enzimas hidrolíticas (ZANNI et al., 2017). Outra característica associada com a patogenicidade em humanos é a propriedade de multiplicação à altas temperaturas, como 39 °C e 42 °C (RÖRIG; COLACITE; ABEGG, 2009).

Os biofilmes são grupos de células, aderidas a uma superfície e entre si, embebidas por uma matriz de substâncias extracelulares poliméricas produzidas pelos próprios micro-organismos, com finalidade de aumentar as chances de sobrevivência em um determinado meio (SILVA; REGINI; NEGRI, 2013). De fato, a maioria das infecções está associada à formação de biofilmes em superfícies bióticas, como em tecidos humanos, ou abióticas, como os dispositivos médicos (TSUI; KONG; JABRA-RIZK, 2016). No entanto, a adesão é considerada o passo inicial e essencial para a colonização e o estabelecimento da infecção (KABIR; HUSSAIN; AHMAD, 2012).

Uma das manifestações mais importantes do biofilme, é a sua resistência aos antifúngicos, o que representa um grande desafio. Por exemplo, *C. albicans* está ficando resistente a muitos medicamentos que são comumente usados no tratamento de infecções fúngicas (KABIR; HUSSAIN; AHMAD, 2012). Desse modo, as infecções por *C. albicans*, representam um problema clínico crescente em todo o mundo (BONDARYK; KURZATKOWSKI; STANISZEWSKA, 2013), principalmente

relacionada à CVV, o que torna esse diagnóstico cada vez mais comum em ginecologia (ÁLVARES; SVIDZINSKI; CONSOLARO, 2007).

2.4 Candidíase vulvovaginal

A candidíase vulvovaginal é uma infecção da vulva e da vagina, causada por fungos do gênero *Candida*, micro-organismos comensais que habitam a mucosa vaginal, mas podem tornar-se patogênicos, sob determinadas condições que alteram o ambiente vaginal (HOLANDA et al., 2007). A espécie *C. albicans* é o principal agente etiológico, sendo responsável por 70-90% dos casos (BRANDOLT et al., 2017). Os demais casos, são atribuídas a outras espécies de *C. não albicans* (*C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*) (FERRAZZA et al., 2005; BEZERRA et al., 2015). Clinicamente ambas são indistinguíveis, causando sintomatologia muito semelhante. Todavia, tem sido relatado que a *C. albicans* está mais associada com os sintomas do que as cepas *C. não albicans* (SIMÕES, 2005).

É considerada a segunda causa mais comum de infecção genital em mulheres em idade reprodutiva, após a vaginose bacteriana (SOBEL, 2007; VAN SCHALKWYK et al., 2015). Estudos mostram que 70-75% das mulheres em idade reprodutiva, em algum momento de sua vida vão apresentar pelo menos um caso de CVV. A taxa de recorrência é de 40 a 50% e aproximadamente de 5 a 8% desenvolvem candidíase vulvovaginal recorrente (CVVR), definida por quatro ou mais episódios em doze meses (BRANDOLT et al., 2017), não relacionados à antibioticoterapia. Os antibióticos eliminam a microbiota bacteriana protetora da vagina, isto é, os *Lactobacillus*, permitindo assim, o crescimento excessivo da levedura (LEMA, 2017).

Na prática diária, em consultórios, podem ser encontrados três tipos de mulheres com CVV: aquela em que a *Candida* sp. foi um achado eventual no exame de rotina (exame de Papanicolau); mulheres que foram ao consultório por apresentarem sintomas, porém sem história de episódios recorrentes de candidíase e as que apresentam um histórico de episódios recorrentes de candidíase (ANDRIOLI et al., 2009). Assim, o simples achado da *Candida* num exame não significa necessariamente que a mulher tenha a doença. Se não houver nenhum sintoma e o

exame ginecológico for normal, a paciente não deve receber nenhum tratamento, a não ser uma boa orientação a respeito dos fatores predisponentes (SIMÕES, 2005).

Os fatores que determinam quais as mulheres que serão submetidas à transição de CVV esporádica para CVVR, ainda estão indefinidos (CASSONE, 2015). Porém, duas hipóteses foram propostas para explicar o estabelecimento da CVVR: reinfecção a partir de outros sistemas de órgãos (por exemplo, trato gastrointestinal ou urinário) ou através da transmissão sexual, e recidiva devido à erradicação incompleta das espécies de *Candida*, com virulência aumentada ou resistentes aos antifúngicos. A diminuição local da imunidade mediada por células também é um fator de risco (CHONG et al., 2003).

A transmissão do agente etiológico pode ocorrer por meio de contato com mucosas e secreções em pele de portadores ou doentes, contato sexual, água contaminada e transmissão vertical durante o parto normal (TOZZO; GRAZZIOTIN, 2012; FELIX et al., 2017). A principal fonte de leveduras vaginais, é o trato gastrointestinal, através de um processo chamado transmissão endógena. Elas são veiculadas para a vagina por autoinoculação, onde se adaptam e se desenvolvem (ÁLVARES; SVIDZINSKI; CONSOLARO, 2007).

A microbiota vaginal normal é rica em *Lactobacillus* produtores de peróxido de hidrogênio, precursores de ácido láctico, que acarreta uma acidez adequada (pH 4,5) do ambiente vaginal, dificultando a proliferação da maioria dos patógenos (SHIOZAWA et al., 2007). A *Candida* é uma exceção, pois se proliferar em ambiente ácido (ÁLVARES; SVIDZINSKI; CONSOLARO, 2007).

A CVV não é considerada uma infecção sexualmente transmissível, tendo em vista que mulheres virgens também podem desenvolver a infecção (CHAVES; SANTOS; CAJUEIRO, 2015), pois *Candida* sp. é uma levedura que faz parte da microbiota normal da vagina (TOZZO; GRAZZIOTIN, 2012). Contudo, a transmissão sexual tem sido citada como fator importante na reincidência da doença (BOATTO et al., 2007), uma vez que a mesma é mais comum em mulheres sexualmente ativas (RYLANDER et al., 2004).

Clinicamente, é caracterizada pela ocorrência de prurido, corrimento vaginal, dispareunia, disúria, edema e eritema vulvovaginal, bem como sinais de inflamação acompanhada de sensação queimação (FELIX et al., 2017). No entanto, o prurido é o

principal sintoma quando comparado a vulvovaginites de outras etiologias (HOLANDA et al., 2007; LEAL et al., 2016). O prurido vulvar é intenso, que o ato constante de coçar, produz escoriações e até fissuras superficiais (ZIMMERMANN et al., 2009; CAMARGO et al., 2015). As lesões podem se estender pelo períneo, região perianal e inguinal (PEIXOTO et al., 2014).

Em algumas mulheres o prurido, o ardor e a secreção constantes podem provocar um importante distúrbio psicológico, em especial naquelas que apresentam candidíase vaginal crônica ou recorrente. Esta sintomatologia pode, ainda, agravar durante a micção, coito, exploração ginecológica ou até mesmo quando a paciente se deita (TOZZO; GRAZZIOTIN, 2012). Ainda que o corrimento seja descrito tipicamente como “leite coalhado”, ele pode ser extremamente variável, ou até muito discreto (SIMÕES, 2005). Eventualmente, podem ser observados pequenos pontos branco-amarelados nas paredes vaginais e no colo uterino (SÁ et al., 2014; LEAL et al., 2016).

Apesar de não haver um consenso, alguns fatores de risco potenciais têm sido descritos (ROSA; RUMEL, 2004), como a presença de ciclos menstruais regulares, gravidez, uso de contraceptivos orais de altas doses, terapia de reposição hormonal, diabetes mellitus, infecção pelo HIV, uso de antibióticos sistêmicos ou tópicos, uso de roupas íntimas justas e/ou sintéticas, determinando pouca aeração nos órgãos genitais, aumentando a umidade (PEIXOTO et al., 2014) e sexo oral receptivo (FERRACIN; OLIVEIRA, 2005). Especula-se, ainda, que hábitos higiênicos inadequados possam ser possíveis fatores predisponentes da contaminação vaginal, entre eles, a higiene anal realizada no sentido do ânus para a vagina, e os resíduos de fezes nas calcinhas poderiam ser a origem das leveduras no desenvolvimento da CVV (ROSA; RUMEL, 2004; HOLANDA et al., 2007).

Devido ao elevado nível de incômodo relatado pela paciente, principalmente decorrente do prurido, muitas vezes o diagnóstico é realizado de forma empírica, levando a prescrição precipitada de medicamentos ou à automedicação. Esses fatores são vistos como os principais responsáveis pelo crescente índice de resistência fúngica medicamentosa, propiciando o crescimento dos casos de recorrência, dificultando o tratamento (LEAL et al., 2016) e os estudos epidemiológicos (GALLE; GIANINNI, 2004).

Embora a CVV represente um problema de importância global na saúde pública, sua incidência exata é desconhecida (BRANDOLT et al., 2017), pois não é uma doença de notificação compulsória às autoridades de saúde. Os estudos epidemiológicos moleculares são relevantes no contexto do estabelecimento da prevalência das espécies, da elucidação dos fatores de virulência e dos mecanismos de resistência aos medicamentos, a fim de oferecer suporte aos protocolos de tratamento (FORNARI et al., 2016).

Para testes de laboratório podem ser utilizadas secreções, que são imediatamente analisadas microscopicamente (FELIX, 2017). No exame a fresco o material é retirado das paredes laterais da vagina, com espátula de Ayre ou swab, que é então depositado em lâmina e misturado com uma ou duas gotas de solução fisiológica e coberta com lamínula. A adição de uma ou duas gotas de KOH a 10% na secreção vaginal destrói os elementos celulares, facilitando a visualização (FEUERSCHUETTE et al., 2010) das leveduras e pseudo-hifas (SIMÕES, 2005). A não identificação do fungo na microscopia não descarta presença de CVV e a ausência de odor de peixe após contato com KOH aumenta a probabilidade de infecção fúngica (FEUERSCHUETTE et al., 2010). A cultura de fungos, é o padrão ouro e contribui principalmente para determinar as espécies que causam a infecção (FELIX, 2017).

As mulheres que realmente apresentarem CVVR, tendo os quatro ou mais casos devidamente documentados, devem se submeter à avaliação clínica e laboratorial, visando confirmar a presença do fungo, bem como a sua espécie, e descartar outras causas (FEUERSCHUETTE et al., 2010). Não é recomendado o tratamento do parceiro assintomático, a menos que ele tenha balanite ou/e outra forma de candidíase cutânea na área genital (DENNERSTEIN, 2001).

O diagnóstico precoce e o tratamento adequado são importantes porque a falta de tratamento oportuno e apropriado dessa infecção, leva à complicações graves, como doenças inflamatórias pélvicas, infertilidade, dor pélvica crônica, parto prematuro, entre outros (BEHMANESH et al., 2015). No caso de aparecer qualquer sintoma, a mulher deve procurar imediatamente seu ginecologista (TOZZO; GRAZZIOTIN, 2012).

2.5 Terapia antifúngica

Dentre os antifúngicos mais utilizados no tratamento da candidíase vulvovaginal, destacam-se a classe dos azóis, que inclui os imidazóis (por exemplo, butoconazol, clotrimazol, miconazol e cetoconazol) e triazóis (por exemplo, fluconazol e terconazol), e a classe dos polienos, a nistatina. Esses agentes estão disponíveis em formulações orais e tópicas (SOONG; EINARSON, 2009).

A terapia com agentes orais apresenta taxa de cura ligeiramente melhor que a terapia com antifúngicos tópicos, sendo que a maioria das mulheres prefere a terapia oral pelo conforto da administração (FERRACIN; OLIVEIRA, 2005; LEAL et al., 2016). No entanto, em pacientes grávidas, os antifúngicos orais não são recomendados. O tratamento deve ser de pelo menos sete dias com antifúngicos tópicos como butoconazol, clotrimazol, terconazol, miconazol (FERRACIN; OLIVEIRA, 2005) ou nistatina (SOONG; EINARSON, 2009).

Nos casos de recidiva, devidamente documentados pela cultura, reinicia-se regime de supressão seguido de manutenção com fluconazol semanal, dessa vez durante um ano (FEUERSCHUETTE et al., 2010). Existe uma tendência para se evitar o uso profilático do fluconazol em doses baixas, a fim de se prevenir o surgimento de isolados resistentes e surgimento de infecções causadas por espécies naturalmente resistentes a este antifúngico (ALVES; CAMARGO; GOULART, 2010).

Embora o fluconazol seja o único antifúngico oral aprovado para o tratamento da CVV pela FDA (Food and Drug Administration), o cetoconazol e o itraconazol mostram-se também efetivos nesta condição (FERRACIN; OLIVEIRA, 2005). 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). Os corticosteroides tópicos podem ser prescritos para aliviar sintomas agudos em mulheres não grávidas (SOONG; EINARSON, 2009).

Apesar dos avanços terapêuticos, a CVV continua a ser um problema comum em todo o mundo. No entanto, a CVVR é uma condição clínica muito mais grave devido às recorrências dos sintomas e pela sua refratariedade para o tratamento bem-sucedido (CASSONE, 2015).

Após a introdução dos azóis, que possuem uma bioviabilidade oral e uma baixa incidência de efeitos colaterais, uma nova era no tratamento de infecções de fungos começou. Depois de muito tempo observou-se que o tratamento com azóis estava fracassando. Um dos motivos para este fracasso ocorreu devido à resistência da *Candida* aos agentes antifúngicos (CASTRO et al., 2006).

O perfil de suscetibilidade de espécies de *Candida* aos antifúngicos não é o mesmo nas diferentes populações ou comunidades, o que torna fundamental a identificação do agente etiológico causador da candidíase antes de iniciar a terapêutica empírica (RODRIGUES; SIMÕES; DINIZ, 2009). O tratamento da candidíase agora pode ser orientado por testes de susceptibilidade *in vitro*, que é mais útil para lidar com infecção devido às espécies *C. não albicans* (REX et al., 2000).

2.6 Produtos naturais

Os produtos naturais ou metabólitos secundários são pequenas moléculas orgânicas que são produzidas pelas plantas, micro-organismos, animais marinhos, insetos e anfíbios (SEIDEL, 2005). A determinação da atividade biológica de plantas e de seus derivados é muito importante na área de produtos naturais (VIZZOTTO; KROLOW; WEBER, 2010).

A utilização de produtos naturais, particularmente da flora, com fins medicinais, nasceu com a humanidade. Índícios do uso de plantas medicinais e tóxicas foram encontrados nas civilizações mais antigas, sendo considerada uma das práticas mais remotas utilizadas pelo homem para cura, prevenção e tratamento de doenças, servindo como importante fonte de compostos biologicamente ativos (FIRMO et al., 2011; LIMA; LIMA, 2013; MOURA et al., 2016).

As plantas medicinais representam fator de grande importância para a manutenção das condições de saúde das pessoas. Além da comprovação da ação terapêutica de várias plantas utilizadas popularmente, a fitoterapia representa parte importante da cultura de um povo, sendo também parte de um saber utilizado e difundido pelas populações ao longo de várias gerações (TOMAZZONI; NEGRELLE; CENTA, 2006).

Grande parte da população mundial tem confiança nos métodos tradicionais relativos aos cuidados diários com a saúde e cerca de 80% dessa população, principalmente dos países em desenvolvimento, confiam nos derivados de plantas medicinais para seus cuidados com a saúde. Aproximadamente 25% de todas as prescrições médicas são formulações baseadas em substâncias derivadas de plantas ou análogos sintéticos derivados destas (FIRMO et al., 2011).

O uso de plantas medicinais pela população tem contribuído não só para a terapia complementar, como também para o direcionamento de estudos fitoquímicos e de atividade biológica, como toxicidade, propriedade anti-inflamatória e atividade antioxidante. Assim, as plantas medicinais podem ter as ações terapêuticas conhecidas para serem posteriormente comprovadas cientificamente (LIMA et al., 2014).

Com o desenvolvimento do campo científico, as propriedades medicinais das plantas receberam um grande interesse por causa de sua baixa toxicidade, atividades farmacológicas e viabilidade econômica (CHOUHAN; SHARM; GULERIA, 2017). A necessidade exige e a ciência busca a unificação do progresso com aquilo que a natureza oferece, respeitando a cultura do povo em torno do uso de produtos ou ervas medicinais para curar os males (FIRMO et al., 2011).

O metabolismo das plantas varia de acordo com sua fisiologia, e pode ser dividido em metabolismo primário e secundário. Os metabólitos primários são frequentemente citados como compostos diretamente ligados à sobrevivência da planta, tais como: proteínas, lipídeos, RNA, DNA, aminoácidos e açúcares (SOUSA; SOUSA, 2017). Os metabólitos secundários, aparentemente não possuem relação com crescimento e desenvolvimento da planta, mas com a defesa das plantas através de citotoxicidade para patógenos microbianos podem ser úteis como medicamentos antimicrobianos em humanos, se não forem demasiado tóxicos (VIZZOTTO; KROLOW; WEBER, 2010).

Teoricamente, todas as plantas são potencialmente capazes de sintetizar metabólitos secundários (VIZZOTTO; KROLOW; WEBER, 2010) como alcaloides, flavonoides, cumarinas, saponinas, taninos, óleos essenciais, entre outras (LIMA; CARDOSO, 2013). No entanto, essa característica é mais comum entre as plantas selvagens, que, ao longo do seu ciclo evolutivo, desenvolveram mecanismos de

adaptação para competir com outras, assegurando sua sobrevivência quer pela formação de estandes puros, quer para se defender de seus inimigos naturais (VIZZOTTO; KROLOW; WEBER, 2010).

Os metabólitos secundários despertam grande interesse, não só pelas atividades biológicas exercidas pelas plantas em resposta aos estímulos do meio ambiente, mas também pela imensa atividade farmacológica que possuem. Muitos são de importância comercial não apenas na área farmacêutica, mas também nas áreas alimentar, agrônoma, perfumaria e outras (PEREIRA; CARDOSO, 2012).

Nos últimos anos, o uso de plantas medicinais tem alcançado grande popularidade nos tratamentos, mesmo que alternativos, de infecções causadas por micro-organismos. Algumas razões para esta popularidade vem da diminuição do arsenal terapêutico para novos patógenos emergentes, bem como da necessidade de novas frentes de tratamento para essas doenças (SOUZA et al., 2013). Vários estudos em diferentes países têm estudado a inibição de *C. albicans* por extratos, óleos essenciais e fitoconstituintes (DUARTE, 2006).

As plantas aromáticas são utilizadas desde o início da história da humanidade para dar sabor a comidas e bebidas, para disfarçar odores desagradáveis, atrair outros indivíduos e controlar problemas sanitários, contribuindo para o bem estar de seres humanos e animais (FRANZ, 2010). São ricas em óleos essenciais, que se caracterizam por uma notável atividade antimicrobiana, e por este motivo, seus produtos derivados podem ser usados para retardar ou inibir o crescimento de microrganismos patogênicos e/ou deteriorantes (FREITAS et al., 2013).

2.7 Óleos essenciais

Os óleos essenciais, também chamados óleos voláteis ou etéreos (porque evaporam quando expostos a calor em contraste com os óleos fixos) (ADUMANYA; UWAKWE; ESSIEN, 2014) são produtos do metabolismo secundário de plantas aromáticas. Eles são chamados de "essenciais" porque representam a própria essência e a parte mais importante da planta (YAP et al., 2014).

Hoje em dia, existem vários métodos para extração de óleos essenciais. Essas extrações podem incluir a utilização de dióxido de carbono líquido ou micro-ondas,

destilação de baixa ou alta pressão, utilizando água fervente ou vapor quente. No entanto, a International Standardization Organization (ISO) define os óleos essenciais como produto obtido a partir de matéria-prima vegetal, seja por destilação com água ou vapor, ou a partir do epicarpo de frutas cítricas por um processo mecânico, ou por destilação seca, isto é, apenas por meio de meios físicos (BILIA et al., 2014).

Tecnicamente, os óleos essenciais não são óleos verdadeiros, pois não contêm conteúdo lipídico. Em vez disso, são compostos voláteis altamente complexos que consistem em cerca de 20 a 60 componentes individuais em diferentes concentrações (YAP et al., 2014) responsáveis por seu odor e aroma (SANTOS et al., 2011), porém, alguns óleos essenciais podem conter mais de 100 componentes (BILIA et al., 2014).

Normalmente, a caracterização química dos óleos essenciais revela a presença de dois a três componentes principais em concentrações bastante elevadas (20-70%), em comparação com outros componentes presentes em pequenas quantidades. Em geral, o constituinte majoritário é responsável pela atividade biológica (BAKKALI et al., 2008; SWAMY; AKHTAR; SINIAH, 2016).

Na natureza, os óleos essenciais desempenham um papel importante na proteção das plantas, atuando como agentes antifúngicos, antibacterianos, antivirais e inseticidas e também contra-ataques de herbívoros, reduzindo o seu apetite por essas plantas (CHOUHAN; SHARM; GULERIA, 2017). Embora, todos os órgãos de uma planta possam acumular óleo essencial, sua composição pode variar segundo a localização na planta (desde as flores, até botões, folhas, ramos, casca, semente, frutas, lenho, raízes e rizomas) (SARTO; ZANUSSO JUNIOR, 2014).

Atualmente, aproximadamente 3.000 óleos essenciais são conhecidos, dos quais 300 são comercialmente importantes, especialmente para a indústria farmacêutica, agronômica, alimentos, produtos sanitários, indústrias de cosméticos e perfumes (BAKKALI et al., 2008; SARTO; ZANUSSO JUNIOR, 2014). Os constituintes podem pertencer às mais diversas classes de compostos, porém os terpenos e os fenilpropenos são as classes de compostos mais comumente encontradas (CASTRO et al., 2004).

Os terpenos são provenientes da rota do ácido mevalônico ou mevalonato (MAIA; DONATO; FRAGA, 2015) e consistem em uma grande classe de

hidrocarbonetos naturais, derivado da unidade de isopreno (C_5H_8), com várias características químicas e propriedades biológicas. Devido à diversidade em suas estruturas químicas, são classificados em vários grupos, como monoterpenos ($C_{10}H_{16}$) e sesquiterpenos ($C_{15}H_{24}$), que geralmente são os principais terpenos, mas existem cadeias mais longas, como diterpenos ($C_{20}H_{32}$), triterpenos ($C_{30}H_{40}$) (NAZZARO et al., 2017).

As propriedades terapêuticas e organolépticas dos óleos essenciais, em geral, se devem à presença de monoterpenos, sesquiterpenos e de fenilpropanoides entre outros compostos voláteis relacionados a propriedades farmacológicas, devido à volatilidade e a outras propriedades biológicas (SARTO; JUNIOR, 2014). No entanto, aproximadamente 90% do óleo essencial é constituído por monoterpenos (SWAMY; AKHTAR; SINNIHAH, 2016).

A volatilidade dos terpenos está associada ao tamanho da cadeia carbônica, sendo assim, os monoterpenos são muito voláteis, os sesquiterpenos apresentam média volatilidade e os diterpenos são, praticamente, não voláteis (ALMEIDA et al., 2015). Os terpenos são indiscutivelmente, os compostos mais ativos contra bactérias, fungos e protozoários, agindo possivelmente na desorganização da estrutura de sua membrana (LIMA; CARDOSO, 2013).

Há evidência que cerca de 60% dos óleos essenciais possuem atividades antifúngicas e 35% exibem propriedades antibacterianas (SANTOS et al., 2010). Por isso, nos últimos anos, os óleos essenciais têm atraído grande interesse científico (ELSHAFIE; CAMELE, 2016), uma vez que podem desempenhar um papel importante na descoberta de novas drogas antimicrobianas (SWAMY; AKHTAR; SINNIHAH, 2016).

2.8 Gênero *Origanum*

Origanum é um dos 200 gêneros pertencentes à família Lamiaceae (PRERNA; VASUDEVA, 2015) e compreende cerca de 38 espécies, seis subespécies e 17 híbridas (ALIGIANNIS et al., 2001). Apresenta ampla distribuição geográfica, abrangendo as Ilhas Canárias e dos Açores, bacia do Mediterrâneo, Norte da Europa até a Ásia Oriental. No entanto, a Região do Mediterrâneo é a mais importante desse gênero (BAKHAY et al., 2014).

Embora a composição química dependa da espécie, do clima, da altitude e do tempo em que a planta é colhida, todas as espécies do gênero *Origanum* são ricas em vários compostos fenólicos, lipídios e ácidos graxos, flavonoides e antocianinas. Seus componentes mais importantes são limoneno, β -cariofileno, *p*-cimeno, linalol e α -pineno (COQUEIRO et al., 2012).

Devido sua ampla variedade de características químicas e de aroma, diferentes espécies e biótipos de *Origanum* são amplamente utilizados como insumo na indústria farmacêutica e cosmética, como erva culinária, como flavorizante de alimentos, em bebidas alcoólicas e em perfumaria na obtenção e fragrâncias picantes (MACHADO; RIBEIRO; DRUZIAN, 2014). Na medicina tradicional as espécies desse gênero são utilizadas como diurético, estimulante, antimicrobiano, anti-inflamatório e anticancerígeno (MOMBEINI; MAZLOUMI; SHAMS, 2015).

Estudos têm mostrado que espécies do gênero *Origanum* possuem propriedades antimicrobianas e antioxidantes, e enfatizam que as suas propriedades biológicas podem variar de acordo com a técnica de cultivo, origem, estágio vegetativo e a estação de coleta do material vegetal (MACHADO; RIBEIRO; DRUZIAN, 2014). Duas das espécies mais conhecidas são a manjerona (*Origanum majorana* L.) e o orégano (*Origanum vulgare* L.) (COQUEIRO et al., 2012; SAKURAI et al., 2016), que mostraram resultados proeminentes na inibição do crescimento microbiano (OLIVEIRA et al., 2009).

2.9 *Origanum majorana* L.

A espécie *O. majorana* L. (sin: *Majorana hortensis* Moench) é uma planta herbácea e aromática que pertence à família Lamiaceae (PRERNA; VASUDEVA, 2015). Originária de lugares áridos da Europa meridional se espalhou por quase todo o mundo; no Brasil é cultivada, sobretudo, em hortas e jardins. Sua denominação dada pelos gregos significa “alegria da montanha” (RODRIGUES et al., 2005).

Possui folhas simples, opostas, ovaladas ou arredondado-elípticas, verde-acinzentadas e pilosas, tendo aroma forte e agradável (BALDONI, 2017). Caule quadrangular atingindo cerca de 35 cm de altura, com delicadas folhas pecioladas, opostas, elípticas, de comprimento de 6 a 24 mm, aveludadas na parte de baixo, que

se desenvolve melhor em locais de clima subtropicais e temperado (RODRIGUES et al., 2005).

Inicialmente a manjerona tinha sua utilização como aromatizante e flavorizante de alimentos, bebidas, medicamentos e mais tarde foram descobertas propriedades aromatizantes empregadas em perfumaria como aroma e fixador de perfumes. Também considerada uma erva culinária usado em vários alimentos como sopas, pizza, carne, molhos (BALDONI, 2017).

O óleo essencial de *O. majorana* é rico em compostos bioativos como terpinen-4-ol, sabineno, acetato de linalol, γ -terpineno e linalol (VALERIANO et al., 2012). Relatos na literatura afirmam que a planta apresenta interessantes efeitos farmacológicos, tais como antioxidante, antiansiedade, antidiabética, anticonvulsivante, antimutagênica, antibacteriana, antifúngica, antiprotozoário, entre outros (PRERNA; VASUDEVA, 2015).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a atividade antifúngica do óleo essencial de *Origanum majorana* sobre cepas de *Candida albicans*, isoladas de secreções vulvovaginais.

3.2 Específicos

- Identificar os constituintes químicos presentes no óleo essencial de *O. majorana*;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) do óleo essencial de *O. majorana* sobre cepas de *C. albicans*;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) da nistatina sobre cepas de *C. albicans*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local da pesquisa

Os ensaios de atividade antifúngica foram realizados no Departamento de Ciências Farmacêuticas (DCF), Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

4.2 Óleo essencial

O óleo essencial de *O. majorana* utilizado, foi adquirido da FERQUIMA Indústria e Comércio Ltda. (São Paulo-Brasil).

4.3 Análise química do óleo essencial

A análise da composição química do óleo essencial de *O. majorana* foi realizada na Central Analítica do Departamento de Química Fundamental do Centro de Ciências Exatas e da Natureza da Universidade Federal da Paraíba. Para isso, foi utilizado um Cromatógrafo Gasoso (CG) da Shimadzu, modelo GC17-A, acoplado espectrofotômetro de Massa (EM).

A coleta de dados e integração foi realizada através do software Class5000. A fase móvel composta de hélio e bombeada na vazão de 1,6 mL/min com Split 1:5. A separação cromatográfica foi realizada por meio da coluna capilar DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm).

A temperatura do forno da coluna foi programada para passar de uma temperatura inicial de 60 °C a 120 °C a 5 °C m/min e de 120 °C a 280 °C a 20 °C/min. A temperatura do injetor e detector foram 260 e 280 °C, respectivamente. O tempo total foi de 20 minutos e o volume de injeção foi 10µL.

A identificação do óleo essencial de *O. majorana* foi executada junto ao sistema de computação e processamento de dados (*Workstation*) interligado ao CG-EM. O sistema é equipado com uma biblioteca Wiley, 6ª edição da classe-5000 1999, com 229,119 espectros (ADAMS, 1995; MCLAFFERTY; STAUFFER, 1989).

4.4 Meios de cultura

Os meios de cultura utilizados no ensaio de avaliação antifúngica foram o meio Ágar Sabouraud Dextrose (ASD), adquirido do Difco Laboratories®, USA para a manutenção dos micro-organismos e o meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640) com L-glutamina sem bicarbonato de sódio, adquirido na INLAB® Diagnóstica para os ensaios *in vitro*. Os meios foram preparados e esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 minutos.

4.5 Micro-organismos

Para a realização dos ensaios foi utilizado um total de 16 cepas de *C. albicans*, sendo 15 cepas clínicas e uma cepa padrão ATCC da “*American Type Culture Collection*”, pertencentes ao Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, sob a responsabilidade da Prof^a. Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima. Todas as cepas foram mantidas em tubo de ensaio contendo ASD inclinado, sob refrigeração (4 °C).

4.6 Inóculo

Para a preparação do inóculo, as leveduras foram semeadas em ASD inclinado e incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24-48 horas. Após o período de incubação, com o auxílio de uma alça microbiológica estéril, cerca de 4-5 colônias de leveduras foram transferidas para tubos de ensaios contendo 3.0 mL de solução fisiológica a 0,9 % estéril. Em seguida, cada suspensão teve sua turbidez ajustada de acordo com o tubo 0,5 da escala padrão de McFarland para a obtenção de 10^6 Unidades Formadoras de Colônias/mL (UFC). Por último, as suspensões microbianas foram preparadas na proporção de 1:9 para se obter um inóculo final de 10^5 UFC/mL (OSTROSKY et al., 2008).

4.7 Preparação da emulsão do óleo essencial

O óleo essencial foi solubilizado em 250 μL (5 %) de dimetil-sulfóxido (DMSO) e adicionados 100 μL (2%) de tween 80 e completou-se o volume final com água destilada esterilizada q.s.p. 5 mL, para alcançar a concentração inicial de 2048 $\mu\text{g/mL}$ (NASCIMENTO et al., 2007; PEREIRA et al., 2014).

4.8 Antifúngico padrão

O antifúngico utilizado na execução do teste de susceptibilidade foi a nistatina, adquirida da SIGMA-ALDRICH®, São Paulo, SP, Brasil. A emulsão da nistatina foi preparada semelhante ao óleo essencial.

4.9 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da CIM sobre as cepas de *C. albicans* foi realizada através da técnica de microdiluição em caldo, conforme (NCCLS/CLSI, 2002), utilizando microplacas contendo 96 poços estéreis com fundo em “U” e com tampa. Primeiramente, com o auxílio de uma pipeta automática foram adicionados 100 μL de caldo RPMI-1640 com L-glutamina nos poços da placa. Em seguida, 100 μL da emulsão do óleo essencial foram dispensados nos poços da primeira linha da placa e a partir da concentração de 1024 $\mu\text{g/mL}$ até 4 $\mu\text{g/mL}$, foi realizada uma diluição seriada de razão 2. Por último, foram adicionados 10 μL da suspensão fúngica nos poços, onde cada coluna da placa, referiu-se a uma diferente cepa de *C. albicans*. O mesmo procedimento foi realizado para o antifúngico padrão nistatina. Foram realizados o controle de viabilidade/crescimento dos micro-organismos (100 μL de caldo RPMI-1640 + 10 μL do inóculo das leveduras) e esterilidade do meio (100 μL de caldo RPMI-1640).

As placas foram fechadas e incubadas 35 ± 2 °C por 24-48 horas. Após o período de incubação, as placas foram submetidas à leitura visual, levando em consideração a formação ou não de aglomerado de células, em forma de “botão”, depositadas no fundo do poço da placa. A CIM foi definida como a menor concentração do óleo essencial capaz de inibir visualmente o crescimento fúngico verificado nos poços, quando comparada ao controle de viabilidade/crescimento. Dessa forma, considerou-

se a CIM₉₀ como a menor concentração capaz de inibir o crescimento de 90% das cepas ensaiadas.

Os ensaios foram realizados em duplicata e os resultados expressos em percentagem, baseado na quantidade de cepas que o óleo essencial foi capaz de inibir completamente. A atividade antifúngica do óleo essencial foi interpretada e considerada como ativa ou inativa, conforme os seguintes critérios: até 600 µg/mL= forte atividade; 600-1500 µg/mL= moderada atividade; >acima de 1500 µg/mL= fraca atividade ou produto inativo (SARTORATTO et al., 2004; HOUGHTON et al., 2007).

4.10 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)

Após a leitura da CIM, alíquotas de 10 µL foram retiradas de cada poço da placa de microdiluição onde não houve crescimento fúngico e transferidas para placas de 96 poços, previamente preparadas com 100 µL de caldo RPMI-1640. Os controles da CIM foram também utilizados neste ensaio. Posteriormente, as placas foram fechadas e incubadas a 35±2 °C por 24-48 horas. O mesmo procedimento foi realizado para o antifúngico padrão nistatina. A CFM foi definida como a menor concentração do óleos essencial, onde não houve crescimento visivelmente, quando cultivadas em microplacas de 96 poços. Assim, considerou-se a CFM₉₀ como a menor concentração capaz de matar 90% das cepas ensaiadas (NCUBE; AFOLAYAN; OKOH, 2008).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise dos componentes do óleo essencial

A análise da composição química resultou na identificação de 15 compostos, perfazendo um total de 99,98% do óleo essencial de *O. majorana*. Os componentes majoritários foram linalol (27,93%), eucaliptol (23,04%), terpinen-4-ol (11,47%), acetato de trans-crisantenil (10,36%) e *p*-cimeno (6,03%), apresentando pequenas variações percentuais entre os constituintes minoritários (Tabela 1).

Tabela 1: Compostos químicos presentes no óleo essencial de *O. majorana*.

Picos	Tempo de retenção (min)	Componentes	Porcentagem (%)
1	5,68	α -pineno	2,67
2	6,05	Canfeno	0,71
3	6,76	Sabineno	4,45
4	6,87	β -pineno	2,31
5	8,32	<i>p</i> -cimeno	6,03
6	8,61	Acetato de trans-crisantenil	10,36
7	8,68	Eucaliptol	23,04
8	9,93	Trans-tujan-4-ol	2,97
9	10,08	Óxido de cis-linalol	0,81
10	10,65	Óxido de trans-linalol	0,95
11	11,53	Linalol	27,93
12	14,59	Terpinen-4-ol	11,47
13	15,10	Propionato de linalila	3,07
14	17,79	Acetato de linalila	2,01
15	31,65	Óxido de cariofileno	1,20
Total			99,98

O resultado da análise química do óleo essencial utilizado neste trabalho foi comparado com os achados de outros estudos encontrados na literatura científica. No Marrocos, Charai e colaboradores (1996), através da cromatografia gasosa identificaram 25 compostos, sendo que os principais constituintes foram o linalol (32,68%) e terpinen-4-ol (22,30%), corroborando com esta pesquisa que também apresentou o linalol como o principal composto químico, no entanto, a identificação e quantificação dos componentes foram realizadas através da CG-EM.

Outros estudos sobre a composição química dos óleos essenciais de *O. majorana*, cultivadas em diferentes países realizadas por meio da CG-EM, mostraram o linalol como o segundo componente principal. Pino et al. (1997) em Cuba, identificaram 41 compostos, sendo que os componentes majoritários foram terpinen-4-ol (17,67%) e linalol (16,41%). Yang et al. (2009) na Coreia do Sul por CG e CG/EM identificaram 16 compostos com quantidades apreciáveis de 1,8-cineol (50,96%) e linalol (24,04%).

Hussain et al. (2011) analisaram as partes aéreas coletadas no período de floração no Paquistão e detectaram 39 componentes, onde os mais abundantes foram terpinen-4-ol (20,9%) e linalol (15,7%). Zabka et al. (2014) ao estudarem várias espécies de plantas utilizadas na medicina popular provenientes de diferentes países, observaram que *O. majorana* originária do Egito apresentou como composto majoritário terpinen-4-ol (26,5%) e linalol (16,2%). Os pesquisadores Erdogan e Ozkan (2017) na Turquia, identificaram cinco componentes que representaram 99,9% total do óleo, onde os principais compostos em quantidades apreciáveis foram carvacrol (52,5%), seguido de linalol (45,4%).

Nas pesquisas de Vera e Chane-Ming (1999), na Ilha de Reunião e Badee et al. (2013) no Egito, através da CG, os pesquisadores evidenciaram apenas vestígios de linalol. No estudo de Waller e colaboradores (2016), a análise do óleo essencial de *O. majorana* vendido comercialmente no Brasil realizada por meio da Cromatografia Gasosa com Detector por Ionização de Chama (GC-FID), mostrou que o linalol (4,4%) estava presente em quantidade razoável. Busatta et al. (2017), ao compararem o perfil químico dos óleos essenciais obtidos por hidrodestilação e CO₂ supercrítico, encontraram linalol em pequena quantidade.

No estudo de Soliman et al. (2009), a análise da composição química dos óleos essenciais de *O. majorana*, coletadas em diferentes estações do ano, não detectou a presença de linalol. Resultados similares foram encontrados por outros autores, como por exemplo El-Akal et al. (2014), que ao analisarem o óleo essencial de *O. majorana* cultivada no Marrocos, perceberam que o linalol não estava presente. Rus et al. (2015) na Romênia, ao determinarem a composição química do óleo da espécie *O. majorana*, coletada no período de floração, não verificaram a presença de linalol. Na pesquisa de Radaelli et al. (2016), no qual os autores analisaram a variabilidade da composição

química dos óleos essenciais de seis especiarias comumente usadas no Brasil, não foi constatada a presença de linalol.

A diferença entre a composição química do óleo essencial deste trabalho e a composição química dos óleos essenciais de alguns estudos, pode ser atribuída ao fato de que os óleos essenciais são um grupo heterogêneo de misturas de substâncias orgânicas, nos quais os constituintes e as concentrações relativas não dependem somente da espécie (VALERIANO et al., 2012), mas também da origem da planta (PINO et al., 1997; VERA; CHANE-MING, 1999). Além disso, fatores ambientais como precipitação, temperatura, vento, fertilidade do solo, latitude, altitude, sazonalidade (PROCHNOW et al., 2017), estágio de desenvolvimento da planta no momento da coleta e a técnica de extração (DANTAS et al., 2016) podem afetar severamente o rendimento do óleo essencial, sua composição e suas propriedades biológicas (ZOUARI et al., 2012).

5.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM)

Os resultados da atividade antifúngica do óleo essencial de *O. majorana* sobre as cepas de *C. albicans*, mostraram que os valores das CIMs variaram entre 64 e 128 µg/mL. O valor de CIM 64 µg/mL inibiu 14 cepas: LM 8, LM 34, LM 97, LM 107, LM 127, LM 131, LM 150, LM 152, LM 165, LM 171, LM 202, LM 228, LM 240 e ATCC 60193. No entanto, as cepas LM 297 e LM 312 foram sensíveis na concentração 128 µg/mL, mas na concentração 64 µg/mL, mostraram-se resistentes ao óleo essencial. Dessa forma, o óleo essencial inibiu 87,5% das cepas ensaiadas. Na CFM, os valores variaram entre às concentrações 128 e 256 µg/mL. A CFM de 128 µg/mL inibiu 50% das cepas ensaiadas: LM 8, LM 34, LM 131, LM 150, LM 152, LM 171, LM 228 e ATCC 60193 (Tabela 2).

No que se refere à CIM e CFM do antifúngico padrão nistatina realizado neste estudo, observou-se que os valores da CFM foram semelhantes aos valores de CIM na concentração 512 µg/mL e para as mesmas cepas: LM 8, LM 34, LM 97, LM 107, LM 127, LM 131, LM 150, LM 152, LM 165, LM 171, LM 202 e ATCC 60193, resultando na inibição do crescimento de 75% das cepas. No entanto, as cepas LM 228, LM 240, LM 297 e LM 312, mostraram-se resistentes à nistatina. Em relação ao controle

positivo, houve crescimento 100% dos micro-organismos e o controle de esterilidade estava isento de qualquer contaminação para todos os ensaios realizados, mostrando concordância com o esperado (Tabela 2).

Tabela 2: Valores de CIM₉₀ e CFM₉₀ do óleo essencial de *O. majorana* e nistatina sobre cepas de *C. albicans*.

Cepas	Óleo essencial		Nistatina		Controles		
	µg/mL		µg/mL		Micro-organismos	Esterilidade	
LM 8	64	128	512	512	+	-	
LM 34	64	128	512	512	+	-	
LM 97	64	256	512	512	+	-	
LM 107	64	256	512	512	+	-	
LM 127	64	256	512	512	+	-	
LM 131	64	128	512	512	+	-	
LM 150	64	128	512	512	+	-	
LM 152	64	128	512	512	+	-	
LM 165	64	256	512	512	+	-	
LM 171	64	128	512	512	+	-	
LM 202	64	256	512	512	+	-	
LM 228	64	128	1024	1024	+	-	
LM 240	64	256	1024	1024	+	-	
LM 297	128	256	1024	1024	+	-	
LM 312	128	256	1024	1024	+	-	
ATCC 60193	64	128	512	512	+	-	
Porcentagem de inibição:	87,5%	50%	75%	75%			
(+)		Crescimento de micro-organismos		(-)		Não houve crescimento de micro-organismos	

Ao comparar os valores de CIM e CFM do óleo essencial de *O. majorana* com a nistatina, foi observado que o óleo essencial apresentou valores inferiores à nistatina. Em relação ao total de porcentagem de inibição, o óleo essencial apresentou valor de CIM muito próximo a 90%, indicando que o óleo é capaz de inibir o crescimento de cepas de *C. albicans* resistentes à nistatina.

Visto que ainda não existe um procedimento padrão, mundialmente aceito, para execução de antibiogramas para fungos, pode-se considerar que, métodos padronizados, reprodutíveis e exaustivamente avaliados em laboratórios de referência, devem ser empregados para estudo de antifúngicos (BATISTA; BIRMAN; CURY, 1999; CASTRO et al., 2006). Para a investigação da atividade antimicrobiana de produtos naturais são adotadas diferentes metodologias, como difusão em ágar

(difusão em disco, cilindros de aço inoxidável ou vidro, e perfuração em ágar) e diluição em caldo (macrodiluição e microdiluição) (OSTROSKY et al., 2008). Os resultados obtidos por cada um desses métodos podem diferir devido a fatores como as variações entre os testes, a exemplo do crescimento microbiano, exposição de micro-organismos ao óleo, a solubilidade do óleo ou de seus componentes e o uso e quantidade de emulsificador (NASCIMENTO et al., 2007).

De acordo com Ostrosky et al. (2008), a técnica de microdiluição em caldo, apesar de apresentar alguns inconvenientes, como a adesão de micro-organismos à base do poço ou permanecerem suspensos, ainda assim é mais confiável por fornecer resultados quantitativos e não ser influenciado pela velocidade de crescimento dos micro-organismos. Além disso, é barato, tem reprodutibilidade, é 30 vezes mais sensível que outros métodos usados na literatura, requerem uma menor quantidade de amostra e pode ser usado para grande número de amostras. Segundo, Bona et al. (2014), o método também possibilita a visualização da atividade inibitória, gera uma economia de espaço, meios de cultura e reagentes devido à miniaturização do teste, sendo possível realizar várias repetições e diversas diluições uniformes em apenas uma placa por micro-organismo, aumentando a confiabilidade dos testes, além de informações sobre a CFM.

Neste estudo, o óleo essencial de *O. majorana* apresentou forte atividade antifúngica contra cepas de *C. albicans*. Os achados desta pesquisa, são concordantes indiretamente com os resultados encontrados em outros estudos, nos quais o óleo essencial apresentou atividade antimicrobiana frente à micro-organismos patogênicos, embora tenham sido utilizadas diferentes metodologias para avaliação.

O estudo de Deans e Svoboda (1990) investigou a atividade antimicrobiana do óleo de *O. majorana* sobre 25 espécies bacterianas e cinco fúngicas, que incluiu patógenos de animais e plantas, bactérias causadoras de intoxicação alimentar e fungos micotoxigênicos. Os resultados mostraram que o óleo apresentou efeito inibitório contra variadas espécies de bactérias, sendo que as mais sensíveis foram *Beneckea natriegens*, *Erwinia carotovora* e *Moraxella* sp., porém *Staphylococcus aureus* foi a espécie mais resistente. Entre os fungos, *Aspergillus niger* foi o mais sensível à ação do óleo essencial.

Busatta et al. (2008), ao avaliarem a atividade antibacteriana do óleo essencial de *O. majorana* sobre bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, observaram que

todos os micro-organismos ensaiados (*Aeromonas* sp., *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella choleraesuis*, *Serratia* sp., *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*) foram susceptíveis à ação do óleo essencial e os valores de CIM variaram entre 0,069 a 2,3 µg/mL.

Oliveira et al. (2009) demonstraram que o óleo essencial de *O. majorana* apresentou atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* BH01, *S. aureus* BH02, *S. aureus* BH03, *S. coagulase negativo* BH08, *S. coagulase negativo* BH09, *Enterobacter* BH15, *Proteus* spp. BH16, *Acinetobacter* spp. BH17 e *Klebsiella* spp. isoladas de pacientes com conjuntivite, sendo que a CIM variou de 2,5 a 10 µL/mL.

Trajano et al. (2009) analisaram a atividade antibacteriana do óleo essencial de *O. majorana*, frente a dez cepas de bactérias deteriorantes de alimentos e observaram que o óleo apresentou efetividade sobre cinco cepas: *B. subtilis* (ATCC 6633), *Serratia marcescens* (ATCC 13880), *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7664) e *S. aureus* (ATCC 6538), com halos de inibição que variaram de 25 a 11 mm de diâmetro. Para os autores, o óleo essencial é uma boa opção para a substituição de aditivos químicos em alimentos, pois tais produtos possuem um potente e amplo espectro de ação antibacteriana.

Em estudo realizado por Souza et al. (2010) contra cepas clínicas e padronizadas de fungos patogênicos, o óleo essencial apresentou a CIM de 160 µL/mL para as espécies *A. flavus* LM-02, *C. albicans* ATCC 7645, *Candida tropicalis* LM-14, *Cryptococcus neoformans* FGF-5, *Microsporium gypseum* ATCC 184 e *Trichophyton mentagrophytes* LM-64. No entanto, as cepas *Aspergillus fumigatus* IPP-21, *Candida krusei* LM-09, *Microsporium canis* LM-36, *Trichophyton rubrum* ATCC 28184 e *Cladosporium herbarium* ATCC 26362, foram resistentes ao óleo essencial.

Badee et al. (2013) realizaram a investigação antimicrobiana do óleo essencial de *O. majorana*, por difusão em ágar sobre seis espécies bacterianas (*B. subtilis*, *Escherichia coli*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus*, *Streptococcus faecalis*) e duas fúngicas (*Aspergillus flavus* e *C. albicans*). Entre os patógenos ensaiados, *C. albicans* foi a cepa mais sensível e *A. flavus* o mais resistente, apresentando halos de inibição de 34 a 13 mm de diâmetro, respectivamente. Nesse mesmo estudo, através da técnica de microdiluição em caldo,

a espécie *C. albicans*, também foi mais susceptível ao óleo essencial de *O. majorana* com CIM de 34 μ L /mL, quando comparado ao antifúngico padrão testado que apresentou a CIM de 98 μ L /mL.

Omara et al. (2014) estudaram o efeito antibacteriano do óleo essencial contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas de origem alimentar, isoladas de carne. Neste estudo, todas as cepas ensaiadas foram sensíveis ao óleo essencial e os valores dos halos de inibição variaram de 19,20 a 13,00 mm de diâmetro, sendo que a cepa mais sensível foi *Salmonella* (19,20 mm), seguida de *Escherichia coli* (19,00 mm), *Shigella* (16,75 mm), *Citrobacter* (16,00 mm), *Proteus* (15,00 mm), *Pseudomonas* (14,00 mm) e *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 (13,00 mm). Dessa forma, os pesquisadores concluíram que o óleo essencial pode ser utilizado como conservante natural para controlar a contaminação microbiana, com aplicação na indústria alimentícia.

Rus et al. (2015), ao verificarem a atividade antifúngica do óleo essencial de *O. majorana* sobre fungos que parasitam plantas, encontraram valores de CIM de 5 mg/L para *Verticillium dahliae* e 1 mg/L para *Penicillium aurantiogriseum*, que demonstrou ser mais sensível ao óleo que a espécie *V. dahliae*, no entanto, ambas as espécies apresentaram CFM de 20 mg/L. Assim, os autores concluíram que os óleos essenciais podem ser utilizados para o desenvolvimento de um defensivo natural contra esses patógenos.

No trabalho de Marques e colaboradores (2015), o óleo essencial de *O. majorana* apresentou atividade antibacteriana contra nove cepas de *Staphylococcus aureus*, isoladas de carne de frango, das quais seis codificavam enterotoxina A e três enterotoxina B. Os valores dos halos de inibição variaram de 41 a 9 mm de diâmetro.

Radaelli e colaboradores (2016) determinaram a atividade antibacteriana do óleo essencial de *O. majorana* contra a cepa padrão *Clostridium perfringens* ATCC 13124. Neste trabalho, os autores observaram que o valor de CIM e da concentração bactericida mínima (CBM) foi de 5,0 mg/mL para ambas concentrações, indicando que o óleo possui propriedade bactericida.

Ibrahim et al. (2017) investigaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *O. majorana* contra 12 bactérias, sendo seis Gram-negativas (*Alcaligenes faecalis* ATCC 35655, *Aeromonas hydrophila* ATCC 35654, *Pseudomonas fluorescens* ATCC

49838, *Shigella sonni* ATCC 25931, *E. coli* e *Salmonella typhimurium*) e seis Gram-positivas (*B. subtilis* ATCC 6633, *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, *B. cereus* ATCC 10876, *Enterobacter feacalis* ATCC 19433, *Micrococcus luteus* ATCC 7468 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923). Neste estudo, o óleo essencial apresentou efeito bactericida contra a maioria das cepas ensaiadas e ação bacteriostática sobre as cepas de *E. coli* e *S. aureus* ATCC 25923.

A atividade antifúngica dos óleos essenciais, não pode ser facilmente correlacionada com qualquer componente individual, mas com uma mistura de compostos presentes nesses óleos (RANASINGHE; JAYAWARDENA; ABEYWICKRAMA, 2002), o que possivelmente, se deve ao sinergismo entre os componentes do óleo essencial, mesmos que presentes em pequenas concentrações (FRANCO et al., 2007).

6. CONCLUSÃO

- O linalol foi o principal composto identificado no óleo essencial de *O. majorana*.
- O óleo essencial de *O. majorana* apresentou valores de CIM de 64 µg/mL e CFM de 128 µg/mL, indicando forte atividade antifúngica, frente às cepas de *C. albicans*, provenientes de secreções vulvovaginais.
- A nistatina apresentou valores de CIM e CFM de 512 µg/mL, frente às cepas de *C. albicans*, atuando como fungistática.
- O óleo essencial de *O. majorana* é uma alternativa promissora para a produção de um fármaco para o tratamento da candidíase vulvovaginal.
- Os resultados desta pesquisa confirmam que os óleos essenciais são fontes naturais que podem inibir o crescimento de micro-organismos patogênicos.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ressalta-se ainda que, este estudo incentiva a busca por novos fármacos mais eficazes que os antifúngicos atuais, utilizados no tratamento da candidíase vulvovaginal. Embora o resultado seja satisfatório, é necessário a continuação de estudos acerca da toxicidade e do mecanismo de ação *in vitro* e *in vivo* do óleo essencial de *O. majorana*.

REFERÊNCIAS

- ABDULLA, K. A.; SAEED, R. R. What is deep tropical mycosis? An underestimated entity with serious problems. **International Journal of Advances in Medicine**, v. 2, n. 2, p. 76-82, 2015.
- ABRANTES, M. R.; LIMA, E. O.; ARAÚJO, M.; MEDEIROS, P.; MENEZES, C. P.; SARMENTO, F. Q. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre leveduras *Candida* não *albicans*. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 94, n. 3, p. 227-233, 2013.
- ABREU, J. A. S.; ROVIDA, F. S. S.; PAMPHILE, J. A. Fungos de interesse: aplicações biotecnológicas. **Revista Uningá Review**, v. 21, n.1, p.55-59, 2015.
- ADAMS, N. R. Detection of the effects of phytoestrogens on sheep and cattle. **Journal of Animal Science**, v. 73, n. 5, p. 1509-1515, 1995.
- ADUMANYA, O. C. U.; UWAKWE, A. A.; ESSIEN, E. B. Essential oil composition (terpenes) of *Salacia senegalensis* Lam (DC) leaf. **British Journal of Research**, v. 1, n. 2, p. 026-034, 2014.
- AKTHAR, M. S.; DEGAGA, B.; AZAM, T. Antimicrobial activity of essential oils extracted from medicinal against the pathogenic microorganisms: a review. **Issues in Biological Sciences and Pharmaceutical Research**, v. 2, n. 1, p. 1-7, 2014.
- AL DHAHERI, Y.; EID, A.; ABUQAMAR, S.; ATTOUB, S.; KHASAWNEH, M.; AICHE, G.; HISAINDEE, S.; IRATNI, R. Mitotic arrest and apoptosis in breast cancer cells induced by *Origanum majorana* extract: upregulation of TNF- α and downregulation of survivin and mutant p53. **PLoS One**, v. 8, n. 2, p. e56649, 2013.
- ALIGIANNIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINO, I. B. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 9, p. 4168-4170, 2001.
- ALMEIDA, M. P.; ROMERO, R. B.; ROMERO, A. L.; CRESPIAN, E. R. Explorando a química e a atividade antifúngica de óleos essenciais: Uma proposta de projeto para a Educação Básica. **Latin American Journal of Science Education**, v. 1, p. 12126-1 - 12126-13, 2015.
- ÁLVARES, C. A.; SVIDZINSKI, T. I. E.; CONSOLARO, M. E. L. Vulvovaginal candidiasis: susceptibility factors of the host and virulence of the yeasts. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 5, p. 319-327, 2007.
- ALVES, I. A.; CAMARGO, F. P.; GOULART, L. S. Identification by PCR and antifungal susceptibility of vaginal clinical *Candida* sp isolates. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 5, p. 575-579, 2010.
- ANDRIOLI, J. L.; OLIVEIRA, G. S. A.; BARRETO, C. S.; SOUSA, Z. L.; OLIVEIRA, M. C. H.; CAZORLA, I. M.; FONTANA, R. Frequency of yeasts in vaginal fluid of women with and without clinical suspicion of vulvovaginal candidiasis. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 31, n. 6, p. 300-304, 2009.

BADEE, A. Z. M.; MOAWAD, R. K.; ELNOKETI, M. M.; GOUDA, M. M. Antioxidant and antimicrobial activities of marjoram (*Origanum majorana* L.) essential oil. **Journal of Applied Sciences Research**, v. 9, n. 2, p. 1193-1201, 2013.

BAKHY, K.; BENLHABIB, O.; BIGHELLI, A.; CASANOVA, J.; TOMI, F.; AL FAIZ, C. Yield and chemical variability of the essential oil isolated from aerial parts of wild *Origanum compactum* Benth. From Moroccan Western Rif. **American Journal of Essential Oils and Natural Products**, v. 1, n. 4, p. 9-17, 2014.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils—a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.

BALDONI, M. B. **Genotoxicidade, atividade proliferativa e análise fitoquímica dos extratos aquosos e do óleo de *Origanum majorana* L.** 2017. 49 p. Dissertação (Mestrado em Agrobiologia) – Universidade de Santa Maria. Santa Maria, RS, 2017.

BARBEDO, L. S.; SGARBI, D. B. G. Candidíase. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 22, n. 1, p. 22-38, 2010.

BATISTA, J. M.; BIRMAN, E. G.; CURY, A. E. Susceptibility to antifungal drugs of *Candida albicans* strains isolated from patients with denture stomatitis. **Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo**, v. 13, n. 4, p. 343-348, 1999.

BEHMANESH, F.; PASHA, H.; SEFIDGAR, A. A.; TAGHIZADEH, M.; MOGHADAMNIA, A. A.; ADIB RAD, H.; SHIRKHANI, L. Antifungal effect of lavender essential oil (*Lavandula angustifolia*) and clotrimazole on *Candida albicans*: An *in vitro* study. **Scientifica**, v. 2015, 2015.

BILIA, A. R.; GUCCIONE, C.; ISACCHI, B.; RIGHESCHI, C.; FIRENZUOLI, F.; BERGONZI, M. C. Essential oils loaded in nanosystems: a developing strategy for a successful therapeutic approach. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, 2014.

BOATTO, H. F.; MORAES, M. S.; MACHADO, A. P.; GIRÃO, M. J. B. C.; FISCHMAN, O. Relationship of laboratory results with clinical signs and symptoms of patients with vulvovaginal candidiasis and the significance of the sexual partners for the maintenance of the infection. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 29, n. 2, p. 80-84, 2007.

BONA, E. A. M.; PINTO, F. G. S.; FRUET, T. K.; JORGE, T. C. M.; MOURA, A. C. Comparison of methods for evaluation of antimicrobial activity and determination of minimum inhibitory concentration (mic) of aqueous and ethanol plant extracts. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, n. 3, p. 218-225, 2014.

BONDARYK, M.; KURZATKOWSKI, W.; STANISZEWSKA, M. Antifungal agents commonly used in the superficial and mucosal candidiasis treatment: mode of action and resistance development. **Advances in Dermatology and Allergology/Postępy Dermatologii i Alergologii**, v. 30, n. 5, p. 293, 2013.

BRANDOLT, T. M.; KLAFKE, G. B.; GONÇALVES, C. V.; BITENCOURT, L. R.; MARTINEZ, A. M. B.; MENDES, J. F.; XAVIER, M. O. Prevalence of *Candida* spp. in cervical-vaginal samples and the in vitro susceptibility of isolates. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 145-150, 2017.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Detecção e identificação dos fungos de importância médica**. Módulo VII, 2004. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/microbiologia/mod_7_2004.pdf. Acesso em: 20 nov. 2017.

BRITO, D.; MORAIS-BRAGA, M. F. B.; CUNHA, F.; ALBUQUERQUE, R.; CARNEIRO, J.; LIMA, M. S. F.; LEITE, N. F.; SOUZA, C. E. S.; ANDRADE, J. C.; ALENCAR, L. B. B.; LAVOR, A. K. L. S.; FIGUEREDO, F. G.; LIMA, L. F.; COUTINHO, H. D. M. Phytochemical analysis and antifungal activity of the essential oil of *Lippia sidoides* Cham. and of the thymol against *Candida* strains. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 4, p. 836-844, 2015.

BRITO, E. H. S.; FONTENELLE, R. O. S.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Candidose na medicina veterinária: um enfoque micológico, clínico e terapêutico. **Ciência Rural**, v. 39 n. 9, p. 2655-2664, 2009.

BUSATTA, C.; BARBOSA, J.; CARDOSO, R. I.; PAROUL, N. RODRIGUES, M.; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V.; CANSIAN, R. L. Chemical profiles of essential oils of marjoram (*Origanum majorana*) and oregano (*Origanum vulgare*) obtained by hydrodistillation and supercritical CO₂. **Journal of Essential Oil Research**, v. 29, n.5, p. 367-374, 2017.

BUSATTA, C.; VIDAL, R. S.; POPIOLSKI, A. S.; MOSSI, A. J.; DARIVA, C.; RODRIGUES, M. R. A.; CANSIAN, R. L. Application of *Origanum majorana* L. essential oil as an antimicrobial agent in sausage. **Food Microbiology**, v. 25, n. 1, p. 207-211, 2008.

CAMARGO, K. C.; ALVES, R. R. F.; BAYLÃO, L. A.; RIBEIRO, A. A.; ARAUJO, N. L. A. S.; TAVARES, S. B. N.; SANTOS, S. H. R. Abnormal vaginal secretion: sensitivity, specificity and concordance between clinical and cytological diagnosis. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 37, n. 5, p. 222-228, 2015.

CAPONE, D.; JANSEN, J. M. LOPES, A. J.; SIQUEIRA, H. R.; ALESSANDRA A. COSTA, A. A.; CAPONE, R. B. Micoses pulmonares. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**, v. 9, n. 2, p. 72-81, 2010.

CARVALHO, R. J. V.; CUNHA, C. M.; SILVA, D. A. O.; SOPELETE, M. C.; URZEDO, J. E.; MOREIRA, T. A.; MORAES, P. S. A.; TAKETOMI, E. A. IgA, IgE and IgG subclasses to *Candida albicans* in serum and vaginal fluid from patients with vulvovaginal candidiasis. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 49, n. 4, p. 434-438, 2003.

CASADEVALL, A. Amoeba provide insight into the origin of virulence in pathogenic fungi. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 710, p. 1-10, 2012.

CASSONE, A. Vulvovaginal *Candida albicans* infections: pathogenesis, immunity and vaccine prospects. **An International Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 122, n. 6, p. 785–794, 2015.

CASTRO, H. G.; OLIVEIRA, L. O.; BARBOSA, L. C. A.; FERREIRA, F. A.; SILVA, D. J. H.; MOSQUIM, P. R.; NASCIMENTO, E. A. Content and composition of the essential oil of five accesses of mentrasto. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 55-57, 2004.

CASTRO, T. L.; COUTINHO, H. D. M.; GEDEON, C. C.; SANTOS, J. M.; SANTANA, W. J.; SOUZA, L. B. S. Mecanismos de resistência da *Candida* sp. Wwa antifúngicos. **Infarma**, v. 18, n. 9, p. 10, 2006.

CHARAI, M.; MOSADDAK, M.; FAID, M. Chemical composition and antimicrobial activities of two aromatic plants: *Origanum majorana* L. and *O. compactum* Benth. **Journal of Essential Oil Research**, v. 8, n. 6, p. 657-664, 1996.

CHAVES, G. B.; SANTOS, M. S.; CAJUEIRO, S. D. Avaliação do nível de conhecimento de discentes dos cursos superiores de saúde a respeito da candidíase vaginal. **Revista Saúde e Ciência**, v. 4, n. 1, p. 90-104, 2015.

CHITTY, J. L.; FRASER, J. A. Purine acquisition and synthesis by human fungal pathogens. **Microorganisms**, v. 5, n. 2, p. 33, 2017.

CHOI, J.; KIM, S. H. A genome tree of life for the Fungi kingdom. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 35, p. 9391-9396, 2017.

CHONG, P. P.; LEE, Y. L.; TAN, B. C.; NG, K. P. Genetic relatedness of *Candida* strains isolated from women with vaginal candidiasis in Malaysia. **Journal of Medical Microbiology**, v. 52, n. 8, p. 657-666, 2003.

CHOUHAN, S.; SHARMA, S.; GULERIA, S. Antimicrobial activity of some essential oils-present status and future perspectives. **Medicines**, v. 4, n. 3, p. 1-21, 2017.

Cirúrgicos. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v. 4, n.1, p.43-48, 2013.

CLEELAND, R.; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials in vitro and in experimental animal infections. In: **Antibiotics in Laboratory Medicine**, v.3, p. 739-787, 1991.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T.; CAMARGO, L. F. A.; RICHTMANN, R.; QUEIROZ-TELLES, F.; SALLES, M. J. C.; CUNHA, C. A.; YASUDA, M. A. S.; MORETTI, M. L.; NUCCI, M. Brazilian guidelines for the management of candidiasis - a joint meeting report of three medical societies: Sociedade Brasileira de Infectologia, Sociedade Paulista de Infectologia and Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 3, p. 283-312, 2013.

COQUEIRO, D. P.; BUENO, P. C. S.; GUIGUER, E. L.; BARBALHO, S. M.; SOUZA, M. S. S.; ARAÚJO, A. C.; TORRES, C. S.; SCACCO, G.; TIVERON, A. M.; COSTA, J. M.; VANZO, L. A.; SILVA, L. O.; GIL, M. S.; ABIB, M. D.; ROSSI, P. B. R.; OZI, R. F.;

ABIB, T. D.; GONÇALVES, U. M. Efeitos do chá de orégano (*Origanum vulgare*) no perfil bioquímico de ratos Wistar. **Scientia Medica**, v. 22, n. 4, p. 191-196, 2012.

CROCCO, E. I.; MIMICA, L. M.; MURAMATU, L. H.; GARCIA, C.; SOUZA, V. M.; RUIZ, L. R.; ZAITZ, C. Identificação de espécies de *Candida* e susceptibilidade antifúngica *in vitro*: estudo de 100 pacientes com candidíases superficiais*. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 79, n. 6, p. 689-697, 2004.

DANTAS, A. S.; KLEIN-JÚNIOR, L. C.; MACHADO, M. S.; GUECHEVA, T. N.; SANTOS, L. D.; ZANETTE, R. A.; MELLO, F. B.; HENRIQUES, J. A. P.; MELLO, J. R. B. *Origanum majorana* essential oil lacks mutagenic activity in the *Salmonella*/microsome and micronucleus assays. **The Scientific World Journal**, v. 2016, p. 1-21, 2016.

DEANS, S. G.; SVOBODA, K. P. The antimicrobial properties of marjoram (*Origanum majorana* L.) volatile oil. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 5, n. 3, p. 187-190, 1990.

DENNERSTEIN, G. The treatment of *Candida* vaginitis and vulvitis. **Australian Prescriber**, v. 24, n. 3, p. 62-4, 2001.

DOVNIK, A.; GOLLE, A.; NOVAK, D.; ARKO, D.; TAKAC, I. Treatment of vulvovaginal candidiasis: a review of the literature. **Acta Dermatovenerologica Alpina, Pannonica, et Adriatica**, v. 24, n. 1, p. 5-7, 2015.

DUARTE, M. C. T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **Revista Multiciência**, v. 7, n. 1, 2006.

EL-AKHAL, F.; LALAMI, A. E. O.; ZOUBI, Y. E.; GRECHE, H.; GUEMMOUH, R. Chemical composition and larvicidal activity of essential oil of *Origanum majorana* (Lamiaceae) cultivated in Morocco against *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 4, n. 9, p. 746-750, 2014.

ELSHAFIE, H. S.; CAMELE, I. Investigating the effects of plant essential oils on post-harvest fruit decay. In: **Fungal Pathogenicity**. InTech, 2016.

ERDOGAN, A.; OZKAN, A. Investigation of antioxidative, cytotoxic, membrane-damaging and membrane-protective effects of the essential oil of *Origanum majorana* and its oxygenated monoterpene component linalool in human-derived Hep G2 Cell Line. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 16, p. 24-34, 2017.

FAN, S.; LIU, X.; WU, C.; XU, L.; LI, J. Vaginal nystatin versus oral fluconazole for the treatment for recurrent vulvovaginal candidiasis. **Mycopathologia**, v. 179, n. 1-2, p. 95-101, 2015.

FELIX, T. C.; MENEZES, R. P.; BERARDI, M. C.; RÖDER, D. V. D. B.; PEDROSO, R. S. *Candida* species in the genital tract of women attending a university hospital for gynecological interventions. **Brazilian Journal of Medicine and Human Health**, v. 5, n. 1, p. 13-18, 2017.

FERNANDES, A. W. C.; AQUINO, S. A. M. C.; GOUVEIA, G. V.; ALMEIDA, J. R. G. S.; COSTA, M. M. Atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos de plantas do bioma caatinga em isolados de *Escherichia coli* de suínos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.17, n.4, p.1097-1102, 2015.

FERRACIN, I.; OLIVERIA, R. M. W. Corrimento vaginal: causa, diagnóstico e tratamento farmacológico. **Infarma**, v. 17, n. 5/6, p. 82-6, 2005.

FERRAZZA, M. H. S.; MALUF, M. L. F.; CONSOLARO, M. E. L.; SHINOBU, C. S.; SVIDZINSKI, T. I. E.; BATISTA, M. R. Characterization of yeasts isolated from the vagina and their association with vulvovaginal candidíasis in two cities of the South of Brazil. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 27, n. 2, p. 58-63, 2005.

FERREIRA, B. F. F.; RAGAZZINI, L. J.; ANDRADE, M. C. Investigação da sensibilidade ao fluconazol e produção de enzimas hidrolíticas por *Candida* sp. isoladas do trato respiratório de pacientes internados em um hospital no sul de Minas Gerais. **Revista Ciências em Saúde**, v. 2, n. 1, p. 48-56, 2012.

FERREIRA, T. M.; SILVA, F. S.; TEODORO, G. R.; COSTA, A. C. B. P.; MARIA, A.; BELTRAME JÚNIOR, M.; KHOURI, S. Atividade antifúngica do citral em leveduras do gênero *Candida* isoladas de pacientes hospitalizados. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 68, n. 1, p. 118-125, 2009.

FEUERSCHUETTE, O. H. M.; SILVEIRA, S. K.; FEUERSCHUETTE, I.; CORRÊA, T.; GRANDO, L.; TREPANI, A. Candidíase vaginal recorrente: manejo clínico. **Feminina**, v. 38, n. 2, p. 32-36, 2010.

FIRMO, W. C. A.; MENEZES, V. J. M.; PASSOS, C. E. C.; DIAS, C. N.; ALVES, L. P. L.; DIAS, I.; NETO, M. S.; OLEA, R. S. G. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Cadernos de Pesquisa**, v. 18, n. especial, p. 90-95, 2011.

FORNARI, G.; VICENTE, V. A.; GOMES, R. R.; MURO, M. D.; PINHEIRO, R. L.; FERRARI, C.; HERKERT, P. F.; TAKIMURA, M.; CARVALHO, N. S.; QUEIROZ-TELLES, F. Susceptibility and molecular characterization of *Candida* species from patients with vulvovaginitis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 373-380, 2016.

FRANCO, A. L. P.; OLIVEIRA, T. B.; FERRI, P. H.; BARA, M. T. F.; PAULA, J. R. Avaliação da composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook) Tronc. (Alfazema), *Ocimum gratissimum* L.(Alfavaca-cravo) e *Curcuma longa* L.(Açafrão). **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 4, n. 2, p. 208-220, 2007.

FREITAS, M. A.; ANDRADE, J. C.; GUEDES, G. M. M.; TINTINO, S. R.; SOUZA, C. E. S.; LEITE, N. F.; GONDIM, C. N. F. L.; MORAIS-BRAGA, M. F. B.; MATIAS, E. F. F.; COUTINHO, H. D. M. Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana do carvacrol através dos métodos de contato direto e gasoso. **Bioscience Journal**, v. 29, n. 3, 2013.

GALLE, L. C.; GIANINNI, M. J. S. M. Prevalence and susceptibility of vaginal yeast. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 40, n. 4, p. 229-236, 2004.

GANDHI, S. G.; MAHAJAN, V.; BEDI, Y. S. Changing trends in biotechnology of secondary metabolism in medicinal and aromatic plants. **Planta**, v. 241, n. 2, p. 303-317, 2015.

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

GUNTHER, L. S. A.; MARTINS, H. P. R.; GIMENES, F.; ABREU, A. L. P.; CONSOLARO, M. E. L.; SVIDZINSKI, T. I. E. Prevalence of *Candida albicans* and non-*albicans* isolates from vaginal secretions: comparative evaluation of colonization, vaginal candidiasis and recurrent vaginal candidiasis in diabetic and non-diabetic women. **São Paulo Medical Journal**, v. 132, n. 2, p. 116-120, 2014.

HERMAN, A.; TAMBOR, K.; HERMAN, A. Linalool affects the antimicrobial efficacy of essential oils. **Current Microbiology**, v. 72, n. 2, p. 165-172, 2016.

HOLANDA, A. A. R.; FERNANDES, A. C. S.; BEZERRA, C. M.; FERREIRA, M. F. F.; HOLANDA, M. R. R.; HOLANDA, J. C. P.; MILAN, E. P. Vulvovaginal candidiasis: symptomatology, risk factors and concomitant anal colonization. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 29, n. 1, p. 3-9, 2007.

HOUGHTON, P. J.; HOWES, M. J.; LEE, C. C.; STEVENTON, G. Uses and abuses of in vitro tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, n. 3, p. 391-400, 2007.

HUFFNAGLE, G. B.; NOVERR, M. C. The emerging world of the fungal microbiome. **Trends in Microbiology**, v. 21, n. 7, p. 334-341, 2013.

HUSSAIN, A. I.; ANWAR, F.; RASHEED, S.; NIGAM, P. S.; JANNEH, O.; SARKER, S. D. Composition, antioxidant and chemotherapeutic properties of the essential oils from two *Origanum* species growing in Pakistan. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 6, p. 943-952, 2011.

IBRAHIM, F. A.; BELLAIL, A. A.; HAMAD, A. M.; MECHERARA-IDJERI, S. Antimicrobial activities and chemical composition of the essential oil of *Origanum majorana* L. growing in Libya. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Research**, v. 8, n. 3, p. 1-11, 2017.

KABIR, M. A.; HUSSAIN, M. A.; AHMAD, Z. *Candida albicans*: a model organism for studying fungal pathogens. **International Scholarly Research Network**, v. 2012, p. 1-15, 2012.

KAMESWARAN, M.; RAGHUNANDHAN, S. Saprophytic mycotic infections of the nose and paranasal sinuses. **Otorhinolaryngology Clinics**, v. 1, p. 25-31, 2009.

KOBAYASHI, G. S. **Chapter 74: Disease Mechanisms of Fungi.** In BARON, S. Medical Microbiology. 4^a ed. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston. 1996.

LEAL, M. R. D.; LIMA, M. C. N. P. C.; KLEIN, S. O. T.; LORDELO, P. Tratamento da candidíase vulvovaginal e novas perspectivas terapêuticas: uma revisão narrativa. **Revista Pesquisa em Fisioterapia**, v. 6, n. 4, p. 462-469, 2016.

LEMA, V. M. Recurrent vulvo-vaginal candidiasis: diagnostic and management challenges in a developing country context. **Obstetrics and Gynecology International Journal**, v. 7, n. 5, p.1-12, 2017.

LIMA, C. R. Identificação de metabólitos secundários presentes no extrato etanólico dos frutos verdes e maduros de *Morinda citrifolia* L. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 6, n. 3, p. 439-446, 2013.

LIMA, D. F.; PEREIRA, D. L.; FRANCISCON, F. F.; REIS, C. LIMA, V. S.; CAVALCANTI, P. P. Conhecimento e uso de plantas medicinais por usuários de duas unidades básicas de saúde. **Revista Rene**, v. 15, n. 03, p. 383-390, 2014.

LIMA, R. K.; CARDOSO, M. G. Família Lamiaceae: Importantes óleos essenciais com ação biológica e antioxidante. **Revista Fitos**, v. 3, n. 03, p.14-24, 2013.

LU, Y.; SU, C.; LIU, H. *Candida albicans* hyphal initiation and elongation. **Trends in Microbiology**, v. 22, n. 12, p. 707-714, 2014.

MACHADO, B. A. S.; RIBEIRO, D. S.; DRUZIAN, J. I. Estudo prospectivo relativo à atividade antimicrobiana de algumas plantas aromáticas. **Cadernos de Prospecção**, v. 6, n. 1, p. 97-105, 2014.

MAIA, T. F.; DONATO, A.; FRAGA, M. E. Atividade antifúngica de óleos essenciais de plantas. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.17, n.1, p.105-116, 2015.

MANDRAS, N.; NOSTRO, A.; ROANA, J.; SCALAS, D.; BANCHE, G.; GHISSETTI, V.; DEL RE, S.; FUCALE, G.; CUFFINI, A. M.; TULLIO, V. Liquid and vapour-phase antifungal activities of essential oils against *Candida albicans* and non-*albicans* *Candida*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, n. 1, p. 330, 2016.

MARQUES, J. L.; VOLCÃO, L. M.; FUNCK, G. D.; KRONING, I. S.; SILVA, W. P.; FIORENTINI, Â. M.; RIBEIRO, G. A. Antimicrobial activity of essential oils of *Origanum vulgare* L. and *Origanum majorana* L. against *Staphylococcus aureus* isolated from poultry meat. **Industrial Crops and Products**, v. 77, p. 444-450, 2015.

MATTEI, A. S.; ALVES, S. H.; SEVERO, C. B.; GUAZZELLI, L. S.; OLIVEIRA, F. M.; SEVERO, L. C. Use of Mueller-Hinton broth and agar in the germ tube test. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, n. 6, p. 483-485, 2014.

MAYER, F. L.; WILSON, D.; HUBE, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 119-128, 2013.

MCLAFFERTY, F. W.; STAUFFER, D. B. **Registry of mass spectral data**. v.1. New York: Willey-Interscience Pub., 1989. 1038 p.

MIRANDA, K. C.; ARAÚJO, C. R.; KRAIS, C. H. A.; LEMOS, J. A.; COSTA, C. R.; SOUZA, L. K. H.; PASSOS, X. S.; FERNANDES, O. S. L.; SILVA, M. R. R. Identificação de leveduras do gênero *Candida* nas unhas e em descamação de pele em Goiânia (GO), durante o ano de 2003. **Revista de Patologia Tropical**, v. 34, n. 2, p.123-128, 2005.

MOMBEINI, T.; MAZLOUMI, S.; SHAMS, J. Pharmacological effects of *Origanum vulgare* L. in the elevated plus-maze and open field tests in the rat. **Journal of Basic and Clinical Pathophysiology**, v. 3, n. 2, p. 29-36, 2015.

MOTA, A. C. L. G.; LIMA, E. O.; CASTRO, R. D.; BATISTA, A. U. D. Antifungal activity of maleic acid against *Candida* spp associated with oral infections. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, v. 12, n. 3, p. 357-361, 2012.

MOURA, A. S. C.; ARAÚJO, L. G.; BRANCO, A. C. S. C.; CARVALHO, L. M. F. Conhecimento sobre plantas medicinais e fitoterápicos: um estudo com acadêmicos de nutrição. **Revista Interdisciplinar**, v. 9, n. 3, p. 18-25, 2016.

MOUSSAID, M.; ELAMRANI, A.; BERHAL, C.; MOUSSAID, H.; BOURHIM, N.; BENAÏSSA, M. Comparative evaluation of phytochemical and antimicrobial activity between two plants from the Lamiaceae family: *Marrubium vulgare* (L.) and *Origanum majorana* (L.). **International Journal of Natural Products Research**, v. 1, n. 1, p. 11-13, 2012.

NASCIMENTO, P. F. C.; NASCIMENTO, A. C.; ANTONIOLLI, A. R.; SANTOS, M. P. O.; JUNIOR, A. M. B.; TRINDADE, R. C. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 108-113, 2007.

NAZZARO, F.; FRATIANNI, F.; COPPOLA, R.; FEO, V. Essential oils and antifungal activity. **Pharmaceuticals**, v. 10, n. 4, p. 1-20, 2017.

NCCLS/CLSI. **Método de referência para testes de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade a terapia antifúngica das leveduras: norma aprovada** – 2^a ed. NCCLS document M27-A2 (ISBN 1- 56238-469- 4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 U.S.A., 2002.

NCUBE, N. S.; AFOLAYAN, A. J.; OKOH A. I. Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 12, p. 1797-1806, 2008.

NEGRI, M.; SALCI, T. P.; SHINOBU-MESQUITA, C. S.; CAPOCI, I. R.; SVIDZINSKI, T. I.; KIOSHIMA, E. S. Early state research on antifungal natural products. **Molecules**, v. 19, n. 3, p. 2925-2956, 2014.

NICO, A. F.; GOUVÊA, T. V. D.; COSTA, R. O. Candidíase vulvovaginal recorrente - Uma contribuição ao diagnóstico. **DST- Journal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 6, n. 3, p. 33-41, 1994.

OLIVEIRA, J. L. T. M.; DINIZ, M. F. M.; LIMA, E. O.; SOUZA, E. L.; TRAJANO, V. N.; SANTOS, B. H. C. Effectiveness of *Origanum vulgare* L. and *Origanum majorana* L. essential oils in inhibiting the growth of bacterial strains isolated from the patients with conjunctivitis. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 1, p. 45-50, 2009.

OMARA, S. T.; ABD EL-MOEZ, S. I.; MOHAMED, A. M. Antibacterial effect of *Origanum majorana* L. (Marjoram) and *Rosmarinus officinalis* L. (Rosemary) essential oils on food borne pathogens isolated from Raw Minced Meat in Egypt. **Global Veterinaria**, v.13, n. 6, p. 1056-1064, 2014.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Methods for evaluation of the antimicrobial activity and determination of minimum inhibitory concentration (MIC) of plant extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

PEIXOTO, J. V.; ROCHA, M. G.; NASCIMENTO, R. T. L.; MOREIRA, V. V.; KASHIWABARA, T. G. B. Candidíase - uma revisão de literatura. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v. 8, n. 2, p.75-82, 2014.

PEREIRA, F. O.; MENDES, J. M.; LIMA, I. O.; MOTA, K. S. L.; OLIVEIRA, W. A.; LIMA, E. O. Antifungal activity of geraniol and citronellol, two monoterpenes alcohols, against *LTrichophyton rubrum* involves inhibition of ergosterol biosynthesis. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, n. 2, p. 1-7, 2014.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n. 3, p. 146-152, 2012.

PINO, J. A.; ROSADO, A.; ESTARRÓN, M.; FUENTES, V. Essential oil of majoram (*Origanum majorana* L.) grown in Cuba. **Journal of Essential Oil Research**, v. 9, n. 4, p. 479-480, 1997.

PRERNA, P.; VASUDEVA, N. *Origanum majorana* L.-Phyto-pharmacological review. **Indian Journal of Natural Products and Resources**, v. 6, n 4, p. 261-267, 2015.

PROCHNOW, D.; ALTISSIMO, B. S.; SILVA, J. C.; MEIRA, D.; CARON, B. O.; HEINZMANN, B. M.; SCHMIDT, D. Chemical composition of the essential oil of *Aloysia triphylla*(L'Hér) Britton due to water deficit and seasonality. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 16, n. 2, p. 121-128, 2017.

RADAELLI, M.; SILVA, B. P.; WEIDLICH, L.; HOEHNE, L.; FLACH, A.; COSTA, L. A.; ETHUR, E. M. Antimicrobial activities of six essential oils commonly used as condiments in Brazil against *Clostridium perfringens*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 424-430, 2016.

RAJA, H. A.; MILLER, A. N.; PEARCE, C. J.; OBERLIES, N. H. Fungal identification using molecular tools: a primer for the natural products research community. **Journal of Natural Products**, v. 80, n. 3, p. 756-770, 2017.

RANASINGHE, L.; JAYAWARDENA, B.; ABEYWICKRAMA, K. Fungicidal activity of essential oils of *Cinnamomum zeylanicum* (L.) and *Syzygium aromaticum* (L.) Merr et L.M. Perry against crown rot and anthracnose pathogens isolated from banana. **Letters in Applied Microbiology**, v. 35, n. 3, p. 208-211, 2002.

REX, J. H.; WALSH, T. J.; SOBEL, J. D. Practice Guidelines for the treatment of candidiasis. **Clinical Infectious Disease**, v.30, n.4, p. 662-678, 2000.

RODRIGUES, M. T.; SIMÕES, L. Z.; DINIZ, C. G. Clinical, microbiological and therapeutic aspects of vulvovaginal candidiasis and recurrent vulvovaginal candidiasis: importance of regional surveys. **HU Revista**, v. 35, n. 3, P. 175-181, 2009.

RODRIGUES, R. M. M. S.; MARTINI, M. H.; CHIARINI, P. F.; PRADO, S. P. T. Matérias estranhas e identificação histológica em manjerona (*Origanum majorana* L.), orégano (*Origanum vulgare* L.) e salsa (*Petroselinum sativum* Hoffim.), em flocos, comercializados no estado de São Paulo. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 64, n. 1, p. 25-30, 2005.

RÖRIG, K. C. O.; COLACITE, J.; ABEGG, M. A. Production of virulence factors in vitro by pathogenic species of the genus *Candida*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 2, p. 225-227, 2009.

ROSA, M. I.; RUMEL, D. Risk factors for vulvovaginal candidiasis: an exploratory study. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 26, n. 1, p. 65-70, 2004.

ROSSONI, R. R.; BARBOSA, J. O.; VILELA, S. F. G.; JORGE, A. O. C.; JUNQUEIRA, J. C. Comparison of the hemolytic activity between *C. albicans* and non-*albicans* *Candida* species. **Brazilian Oral Research**, v. 27, n. 6, p. 484-489, 2013.

RUS, C. F.; POP, G.; ALEXA, E.; SUMĂLAN, R. M.; COPOLOVICI, D. M. Antifungal activity and chemical composition of *Origanum majorana* L. essential oil. **Research Journal of Agricultural Science**, v. 47, n. 2, p. 179-185, 2015.

RYLANDER, E.; BERGLUND, A. L.; KRASSNY, C.; PETRINI, B. Vulvovaginal *candida* in a young sexually active population: prevalence and association with oro-genital sex and frequent pain at intercourse. **Sexually Transmitted Infections**, v. 80, n. 1, p. 54-57, 2004.

SÁ, M. C. N.; SOUSA, H. R.; AMARO, C. S. O.; PINHEIRO, D. N.; OLIVEIRA, M. M. M.; PINHEIRO, M. C. N. Isolamento de *Candida* no esfregaço cérvico-vaginal de mulheres não gestantes residentes em área ribeirinha do Estado do Maranhão, Brasil, 2012. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 5, n. 1, p. 25-34, 2014.

SAKURAI, F. N.; ESTRELA, K. C. A.; TAMAYO, M. S.; CASSEB, M. O.; NAKASATO, M. Caracterização das propriedades funcionais das ervas aromáticas utilizadas em

um hospital especializado em cardiopneumologia. **Demetra**, v. 11, n. 4, p. 1097-1113, 2016.

SANTANA, D. P.; RIBEIRO, E. L.; MENEZES, A. C. S.; NAVES, P. L. F. Novas abordagens sobre os fatores de virulência de *Candida albicans*. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 12, n. 2, p. 229-233, 2013.

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**, v. 20, p. 154-159, 2010.

SANTOS, J. C.; CARVALHO FILHO, C. D.; BARROS, T. F.; GUIMARÃES, A. G. Atividade antimicrobiana *in vitro* dos óleos essenciais de orégano, alho, cravo e limão sobre bactérias patogênicas isoladas de vôngole. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 4, p. 1557-1564, 2011.

SARDI, J. C. O.; SCORZONI, L.; BERNARDI, T.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; GIANNINI, M. M. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 10-24, 2013.

SARTO, M. P. M.; ZANUSSO JUNIOR, G. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais. **Revista Uningá Review**, v. 20, n. 1, p. 98-102, 2014.

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**, v. 35, n. 4, p. 275-280, 2004.

SEIDEL, V. Initial and bulk extraction. **Natural Products Isolation**, v. 20, ed. 2, p. 27-46, 2005.

SHIOZAWA, P.; CECHI, D.; FIGUEIREDO, M. A. P.; SEKIGUCHI, L. T.; BAGNOLI, F.; LIMA, S. M. R. R. Tratamento da candidíase vaginal recorrente: revisão atualizada. **Arquivos médicos dos Hospitais e da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo**, v. 52, n. 2, p. 48-50, 2007.

SILVA, A. S. V.; PEREIRA, L. C.; FARIAS, T. S.; SILVA, W. L. S.; CARVALHO, M. F. F. P. Isolamento e identificação de fungos anemófilos em um hospital de rede pública do sertão da Paraíba. **Revista de Biologia e Farmácia**, v. 6, n. 1, p. 114-120, 2011.

SILVA, C. J. A.; MALTA, D. J. N. A importância dos fungos na biotecnologia. **Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 2, n. 3, p. 49-66, 2016.

SILVA, H. R.; REGINI, J. R. R.; NEGRI, M. Biofilme: ameaça invisível em ambientes cirúrgicos. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v. 4, n. 1, p. 43-48, 2013.

SILVA, W. L. S.; SILVA, A. S. V.; PEREIRA L. C.; FARIAS, T. S.; CARVALHO, M. F. F. P. Isolamento e identificação de fungos anemófilos em laboratórios de rede privada na cidade de salgueiro-PE. **Revista de Biologia e Farmácia**, v. 6, n.1, p. 129-135, 2011.

SIMÕES, J. A. The diagnosis of vaginal candidiasis. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 27, n. 5, p. 233-234, 2005.

SOBEL, J. D. Vulvovaginal candidosis. **The Lancet**, v. 369, n. 9577, p. 1961-1971, 2007.

SOLIMAN, F. M.; YOUSIF, M. F.; ZAGHLOUL, S. S.; OKBA, M. M. Seasonal variation in the essential oil composition of *Origanum majorana* L. cultivated in Egypt. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 64, n. 9-10, p. 611-614, 2009.

SOONG, D.; EINARSON, A. Vaginal yeast infections during pregnancy. **Canadian Family Physician**, v. 55, n. 3, p. 255-256, 2009.

SOUSA, R. F.; SOUSA, J. A. Metabólicos secundários associados a estresse hídrico e suas funções nos tecidos vegetais. **Revista Brasileira de Gestão Ambiental**, v. 11, n.01, p.01-08, 2017.

SOUZA, A. C. **Caracterização e relação de levedura do gênero Candida isolada das mucosas oral e vaginal de mulheres com lesões causadas por HPV de alto risco para câncer do colo de útero**. 2016. 95 p. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2016.

SOUZA, J. N. P.; CANDOTTI, J. G.; AMPARO, T. R.; COELHO, F. F.; RODRIGUES, I.V.; SANTOS, O. D. H. MEDEIROS, L. F. T.; FURTADO, N. A. J. C.; SOUSA, H. C.; SOUZA, G. H. B. Bioprospecção das atividades antioxidante e antimicrobiana de espécies vegetais medicinais coletadas em ouro Preto-MG. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v, 10, n. 01, p. 1-15, 2013.

SOUZA, N. A. B.; LIMA, E. O.; GUEDES, D. N.; PEREIRA, F. O.; SOUZA, E. L.; SOUZA, F. B. Efficacy of *Origanum* essential oils for inhibition of potentially pathogenic fungi. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 3, p. 499-508, 2010.

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

SWAMY, M. K.; AKHTAR, M. S.; SINNIH, U. R. Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: An updated review. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, 2016.

TOMAZZONI, M. I.; NEGRELLE, R. R. B.; CENTA, M. L. Popular phytotherapy: the instrumental search as therapy. **Texto & Contexto-Enfermagem**, v. 15, n. 1, p. 115-121, 2006.

TOZZO, A. B.; GRAZZIOTIN, N. A. Candidíase vulvovaginal. **Perspectiva, Erechim**. v.36, n.133, p.53-62, 2012.

TRAJANO, V. N.; LIMA, E. O.; SOUZA, E. L.; TRAVASSOS, A. E. R. Antibacterial property of spice essential oils on food contaminating bacteria. **Food Science and Technology**, v. 29, n. 3, p. 542-545, 2009.

TSUI, C.; KONG, E. F.; JABRA-RIZK, M. A. Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. **Pathogens and Disease**, v. 74, n. 4, p.1-13, 2016.

VALERIANO, C.; PICCOLI, R. H.; CARDOSO, M. G.; ALVES, E. Antimicrobial activity of essential oils against sessile and planktonic pathogens of food source. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 1, p. 57-67, 2012.

VAN SCHALKWYK, J.; YUDIN, M. H.; ALLEN, V.; BOUCHARD, C.; BOUCHER, M.; BOUCOIRAN, I.; CADDY, S.; CASTILHO, E.; KENNEDY, V. L.; MONEY, D. M.; MURPHY, K.; OGILVIE, G.; PAQUET, C. Vulvovaginitis: screening for and management of trichomoniasis, vulvovaginal candidiasis, and bacterial vaginosis. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada**, v. 37, n. 3, p. 266-274, 2015.

VANDEPUTTE, P.; FERRARI, S.; COSTE, A. T. Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. **International Journal of Microbiology**, v. 2012, 2011.

VERA, R. R.; CHANE-MING, J. Chemical composition of the essential oil of marjoram (*Origanum majorana* L.) from Reunion Island. **Food Chemistry**, v. 66, n. 2, p. 143-145, 1999.

VERMA, R. S.; PADALIA, R. C.; AMIT CHAUHAN, A.; VERMA, R. K.; RAHMAN, L.; SINGH, A. Changes in the essential oil composition of *Origanum majorana* L. during post harvest drying. **Taylor & Francis Group**, v. 19, n. 6, p. 1547 – 1552, 2016.

VIEIRA, A. J. H.; SANTOS, J. I. Mecanismos de resistência de *Candida albicans* aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e caspofungina. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 49, n. 3, p. 235-239, 2017.

VILLAR, C. C.; KASHLEVA, H.; DONGARI-BAGTZOGLOU, A. Role of *Candida albicans* polymorphism in interactions with oral epithelial cells. **Molecular Oral Microbiology**, v. 19, n. 4, p. 262-269, 2004.

VIZZOTTO, M.; KROLOW, A. C. R.; WEBER, G. E. B. Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância. **Embrapa Clima Temperado-Documentos (INFOTECA-E)**, 2010.

WALLER, S. B.; MADRID, I. M.; FERRAZ, V.; PICOLI, T.; CLEFF, M. B.; FARIA, R. O.; MEIRELES, M. C. A.; MELLO, J. R. B. Cytotoxicity and anti-*Sporothrix brasiliensis* activity of the *Origanum majorana* Linn. oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 896-901, 2016.

WALSH, T. J.; DIXON, D. M. **Chapter 75: Spectrum of mycoses.** In BARON, S. Medical Microbiology. 4^a ed. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston. 1996.

WANKE, B.; LAZÉRA, M. S.; NUCCI, M. Fungal infections in the immunocompromised host. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, p. 153-158, 2000.

WHALEY, S. G.; BERKOW, E. L.; RYBAK, J. M.; NISHIMOTO, A. T.; BARKER, K. S.; ROGERS, P. D. Azole antifungal resistance in *Candida albicans* and emerging non-*albicans Candida* species. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 2173, 2017.

WOOD, A. R. Fungi and invasions in South Africa. **Bothalia - African Biodiversity and Conservation**, v. 47, n. 2, p. 1-16, 2017.

YANG, Y. C.; LEE, S. H.; CLARK, J. M.; AHN, Y. J. Ovicidal and adulticidal activities of *Origanum majorana* essential oil constituents against insecticide-susceptible and pyrethroid/ malathion-resistant *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 6, p. 2282-2287, 2009.

YAP, P. S. X.; YIAP, B. C.; PING, H. C.; LIM, S. H. E. Essential oils, a new horizon in combating bacterial antibiotic resistance. **The Open Microbiology Journal**, v. 8, p. 6, 2014.

ZABKA, M.; PAVELA, R.; PROKINOVA, E. Antifungal activity and chemical composition of twenty essential oils against significant indoor and outdoor toxigenic and aeroallergenic fungi. **Chemosphere**, v. 112, p. 443-448, 2014.

ZANNI, P. C. M. D.; BONFIM-MENDONÇA, P. S. B.; NEGRI, M.; NAKAMURA, S. S.; DONATTI, L.; SVIDZINSKI, T. I. E.; CONSOLARO, M. E. L. Virulence factors and genetic variability of vaginal *Candida albicans* isolates from HIV-infected women in the post-highly active antiretroviral era. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 59, n. 44, p. 1-10, 2017.

ZIMMERMANN, J. B.; PAIVA, O. A.; COSTA, A. C. S. S.; SOUSA, A. M. G. V.; CHAGAS, A. R.; LIMA, A. A. C. Validade do diagnóstico clínico de candidíase vulvovaginal. **Hu Revista**, v. 35, n. 1, p. 11-18, 2009.

ZOUARI, N.; AYADI, I.; FAKHFAKH, N.; REBAI, A.; ZOUARI, S. Variation of chemical composition of essential oils in wild populations of *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut., a North African endemic species. **Lipids in Health and Disease**, v. 11, n. 1, p. 28, 2012.