



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA/RENORBIO**

**MAYARA NUNES VITOR ANJOS**

**METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *Ocotea glomerata* (Nees) E  
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE EXTRATOS SOBRE  
ESPÉCIES DO GÊNERO *Candida***

**Recife  
2018**

**MAYARA NUNES VITOR ANJOS**

**METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *Ocotea glomerata* (Nees) E  
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE EXTRATOS SOBRE  
ESPÉCIES DO GÊNERO *Candida***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

**Área de Concentração:** Biotecnologia de Recursos Naturais

**Orientador:** Dra. Maria Tereza dos Santos Correia

**Recife**

**2018**

Catálogo na fonte:  
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Anjos, Mayara Nunes Vitor Anjos

Metabólitos secundários de *Ocotea glomerata* (Nees) e avaliação da atividade antifúngica de extratos sobre espécies do gênero *Candida* / Mayara Nunes Vitor Anjos - 2018.

94 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Maria Tereza dos Santos Correia

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Recife, 2018.

Inclui referências.

1. Candidíase 2. *Ocotea glomerata* 3. Atividade antifúngica  
I. Correia, Maria Tereza dos Santos (orient.) II. Título

615.321

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2019-201

**MAYARA NUNES VITOR ANJOS**

**METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *Ocotea glomerata* (Nees) E  
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE EXTRATOS SOBRE  
ESPÉCIES DO GÊNERO *Candida***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Biotecnologia da Universidade Federal de  
Pernambuco, como requisito parcial para a  
obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Aprovada em: 20/04/2018

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dra. Maria Tereza dos Santos Correia (Orientadora)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Dra. Maria das Graças Carneiro da Cunha (Examinadora Interna)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Dr. Ranilson de Souza Bezerra (Examinador Interno)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Dr. Alexandre Gomes da Silva (Examinador Externo)  
Instituto Nacional do Semiárido

---

Dra. Rejane Pereira Neves (Examinadora Externa)  
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico aos meus avós paternos  
Virgílio Vitor Anjos e Maria das  
Dores Anjos (*In memorian*).

## AGRADECIMENTOS

Aos deuses que me concederam o dom da vida e da sabedoria.

Aos meus pais, Adalberto Vitor e Severina Nunes pelo apoio incondicional e por ser a base de mais uma conquista. Sem eles, eu nada conseguiria; dedico- os o meu amor e gratidão eterna.

A minha pequena Maísa, filha amada, minha maior inspiração diária.

Aos meus familiares em especial, Mãe Luzinete por sempre acreditar que eu seria a cientista da família.

Ao meu companheiro Sávio Moraes, pois quando me perdi de quem eu era me devolveu a mim mesma.

A Aurélia Lima, por ser um anjo sem asas em minha vida e de Maísa. Obrigada por acreditar em mim.

As minhas amigas da escola e de toda vida: Auriely, Camila, Carina, Emilaine, Ingreti, Joseane, Lais, Leila e Tamiris, por estarem presente desde o princípio, gratidão por tudo que somos.

Aos meus amigos da faculdade: Mariana Lucena, Rodolfo Burgos e Priscilla Moura, por todos os momentos de ciência, descontração, estudos, dedicação, parceria e especialmente por acreditarem no meu potencial. Agradecimento especial a Luiz Neto, meu Louis, amigo e parceiro de praticamente todos os experimentos desta tese. Obrigada por ser minha melhor dupla ao longo dos anos.

Aos amigos do Laboratório de Produtos Naturais, Alexandre Gomes e Daniel Cavalcanti. Obrigada por toda a colaboração para execução deste trabalho.

Aos amigos que a vida trouxe durante essa jornada: Allana Gouveia, Edson Rubhens, Íris Trindade, Júlio César, Karla Elvira e Luiz Felipe.

Aos meus alunos, professores, gestoras e funcionários da Escola Arquiteto Alexandre Muniz de Oliveira, que sempre me apoiaram e me ajudaram nos momentos em que precisei me ausentar, reconhecendo a importância e o significado desse trabalho.

A minha professora da Iniciação Científica e mãe científica: Kaoru Okada, por ter me dado a oportunidade durante a graduação, por todos os ensinamentos e por acreditar em meu potencial. Serei eternamente grata.

A minha orientadora Maria Tereza dos Santos Correia por me acolher tão bem durante essa jornada, por todos os ensinamentos e atenção sempre que precisei.

A minha co-orientadora Márcia Vanusa por estar sempre presente em todos os momentos da realização desse trabalho, gratidão por todos os seus ensinamentos.

Ao técnico do Laboratório de Produtos Naturais Sr. João pela ajuda durante toda minha permanência no laboratório e durante minhas coletas.

Aos parceiros do Departamento de Micologia - UFPE, Daniela Buonafina e a Professora Rejane Neves.

Aos parceiros do Departamento de Química Fundamental – UFPE, Marcelo Felipe e Professora Daniela Navarro.

A Usina São José, em especial Sr. Lenilson José, por sua disponibilidade e atenção em todas as coletas realizadas.

À CAPES pelo financiamento da minha bolsa de doutorado, à FACEPE e ao CNPQ pelo apoio financeiro, ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, ao Laboratório de Produtos Naturais pelas instalações e a Universidade Federal de Pernambuco.

A todos que direta ou indiretamente me ajudaram a concluir essa jornada.

## RESUMO

Candidiase é uma infecção causada por espécies do gênero *Candida* que pode variar desde manifestações frequentes, como colonização na mucosa vaginal e oral, até o desenvolvimento de maneira sistêmica por via hematogênica ou linfática. Seu agente etiológico mais frequente é *C. albicans*. O uso indiscriminado e generalizado de drogas antifúngicas levou a um rápido desenvolvimento de cepas resistentes aos medicamentos empregados na terapêutica clínica. Os produtos naturais vêm ganhando destaque nos últimos anos por fornecer uma nova abordagem medicamentosa para o tratamento de processos patológicos, dentre esses, os infecciosos. Frente ao atual cenário, este trabalho teve o objetivo de avaliar o potencial antifúngico dos extratos e frações de *Ocotea glomerata* frente espécies de *Candida spp.* através da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), tempo de morte e o efeito sinérgico. Os possíveis mecanismos de ação foram investigados através dos testes de ergosterol, sorbitol, viabilidade celular, geração de espécies reativas de oxigênio (EROS) e externalização de fosfatidilserina. As principais classes de metabólitos secundários foram determinadas pelas técnicas de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). O óleo essencial foi extraído através da técnica de arraste a vapor, quantificado e identificado por Cromatografia Gasosa acoplada com Espectometria de Massa (GC- MS). Foi observada atividade antifúngica de todos os extratos testados, no entanto o extrato metanólico apresentou melhor atividade com CIM de 3,12 µg/mL para *C. krusei*. A combinação do extrato metanólico com cetoconazol e do extrato metanólico com fluconazol apresentaram efeito sinérgico para *C. krusei* (IFC 0.26) e *C. albicans* (IFC 0.02), respectivamente. As frações 1 e 5 obtidas do extrato metanólico apresentaram atividade fungicida principalmente para a cepa de *C. krusei*. O extrato metanólico não apresentou mecanismo de complexação com o ergosterol e sorbitol, porém aumentou os níveis intracelulares de EROS, diminuiu a viabilidade celular de forma dose-dependente e consequentemente, conduziu morte celular por apoptose. A extração e identificação do óleo essencial de *O. glomerata* resultou na identificação de 23 compostos com predominância de sesquiterpenos (92,28%), destacando o Germacrene-D (21,32%) como o componente majoritário do óleo essencial. O extrato metanólico e suas frações apresentam maior atividade antifúngica frente a diversas cepas de *Candida spp.* e modulam positivamente a ação dos antifúngicos em combinação com efeitos sinérgicos.

Palavras-Chave: *Ocotea glomerata*. Candidiase. *Candida sp.* Efeito antifúngico. Sinergismo.

## ABSTRACT

Candidiasis is an infection caused by species of the genus *Candida* that can range from frequent manifestations, such as colonization of the vaginal and oral mucosa, to development in a systemic way hematogenous or lymphatic. Its most frequent etiological agent is *C. albicans*, however, in recent decades, episodes of candidiasis caused by other species of *Candida* non-*albicans* have emerged. The widespread and widespread use of antifungal drugs has led to the rapid development of drug-resistant strains used in clinical therapy. Natural products have been gaining prominence in recent years for providing a novel approach to treatment for pathological processes, among them, infectious. In view of the current scenario, this work aimed to evaluate the antifungal potential of extracts and fractions of *Ocotea glomerata* against *Candida spp.* Through the determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC), time kill and synergistic effect. The possible mechanisms of action were investigated through the tests of ergosterol, sorbitol, cell viability, generation of reactive oxygen species (EROS) and phosphatidylserine externalization. The main classes of secondary metabolites were determined by the techniques of thin layer chromatography (CCD) and high performance liquid chromatography (HPLC). The essential oil was extracted by the steam entrainment technique, quantified and identified by Gas Chromatography coupled with Mass Spectrometry (GC-MS). Antifungal activity of all the extracts tested was observed, however the methanolic extract presented better activity with CIM of 3,12 µg/mL for *C. krusei*. The combination of the methanolic extract with ketoconazole and the methanolic extract with fluconazole showed a synergistic effect for *C. krusei* (FIC 0.26) and *C. albicans* (FIC 0.02), respectively. Fractions 1 and 5 obtained from the methanolic extract presented fungicidal activity mainly for the strain of *C. krusei*. The methanolic extract did not present a mechanism of complexation with ergosterol and sorbitol, but it increased the intracellular levels of EROS, decreased the cellular viability in a dose-dependent manner and consequently led to cell death by apoptosis. The extraction and identification of the essential oil of *O. glomerata* resulted in the identification of 23 compounds with a predominance of sesquiterpenes (92.28%), with Germacrene-D (21.32%) as the major component of the essential oil. The methanolic extract and its fractions present higher antifungal activity against several strains of *Candida spp.* And positively modulate the action of antifungals in combination with synergistic effects.

Keywords: *Ocotea glomerata*. Candidiasis. *Candida sp.* Antifungal effect. Synergism.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Imagens de células de <i>Candida albicans</i> visualizada por microscopia de contraste de fase. Principais morfologias A – (leveduras), B – (pseudo-hifas) e C – (hifas verdadeiras).....	19
Figura 2 –	Fotomicrografia: aspectos macroscópicos de <i>Candida albicans</i> .....	19
Figura 3 –	Mecanismos de virulência de <i>Candida</i> .....	20
Figura 4 –	Agentes antifúngicos e seus alvos celulares.....	27
Figura 5 –	Mapa da distribuição geográfica da família Lauraceae.....	34
Figura 6 –	Fragmento da Mata Piedade localizada na Usina São José.....	38
Figura 7 –	Árvore (A) e Inflorescência (B) de <i>Ocotea glomerata</i> da Mata Piedade (Usina São José).....	39
Figura 8 –	Esquema do teste do CIM frente as cepas de <i>Candida</i> .....	42
Figura 9 –	Frações do extrato metanólico de <i>O. Glomerata</i> .....	56
Figura 10 –	Cromatogramas do extrato metanólico de <i>Ocotea glomerata</i> a 280 nm. (A) Picos obtidos em todo extrato metanólico; (B) Pico 2 – Derivados Cinâmicos; (C) Pico 9 – Flavonóides; (D) Pico 15 – Flavonóides.....	60
Figura 11–	Cromatogramas da fração 1 obtida por cromatografia em flash do extrato metanólico de <i>Ocotea glomerata</i> a 280 nm (A) Picos obtidos em toda a fração 1; (B) Pico 1; (C) Pico 2; (D) Pico 4.....	61
Figura 12–	Cromatogramas da fração 2 obtida por cromatografia em flash do extrato metanólico de <i>Ocotea glomerata</i> a 280 nm (A) Picos obtidos em toda fração 2; (B) Pico 1; (C) Pico 2; (D) Pico 3; (E) Pico 4; (F) Pico 5; (G) Pico 7.....	62
Figura 13–	Cromatogramas da fração 3 obtida por cromatografia em flash do extrato metanólico de <i>Ocotea glomerata</i> a 350 nm (A) Picos obtidos em toda fração 3; (B) Pico 1; (C) Pico 4.....	63
Figura 14–	Cromatogramas da fração 4 obtida por cromatografia em flash do extrato metanólico de <i>Ocotea glomerata</i> a 350 nm. (A) Picos obtidos em toda fração 4;	

	(B) Pico 1 – Flavonóides; (C) Pico 2 – Flavonóides; (D) Pico 3 – Flavonóides; (E) Pico 4 – Flavonóides.....	64
Figura 15–	Cromatogramas da fração 5 obtida por cromatografia em flash do extrato metanólico de <i>Ocotea glomerata</i> a 350 nm. (A) Picos obtidos em toda fração 5; (B) Pico 1 – Flavonóides; (C) Pico .....	65
Figura 16–	Curva de morte microbiana da cepa de <i>C. krusei</i> ATTC 6258, sob ação da anfotericina B e de diferentes concentrações do extrato metanólico de <i>Ocotea glomerata</i> .....	70
Figura 18 –	Avaliação da formação de EROS em células de <i>C. krusei</i> .....	71
Figura 19 –	Efeito do extrato metanólico em diferentes concentrações sobre a externalização da fosfatidilserina em células de <i>C. krusei</i> .....	72
Figura 20 -	Comparação das proporções dos compostos encontrados em <i>O. glomerata</i> em relação a outras espécies do gênero <i>Ocotea</i> .....	77

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1–	Perfil fitoquímico dos extratos e frações do extrato metanólico de <i>O. glomerata</i> .....	50
Tabela 2 –	Concentração Inibitória Mínima ( $\mu\text{g/mL}$ ) dos antifúngicos sintéticos, extratos e frações ativas do extrato metanólico de <i>O. glomerata</i> .....	52
Tabela 3–	Sensibilidade antifúngica ( $\text{MIC}_{50}$ ) sobre espécies de <i>Candida</i> . Valores são representados em $\mu\text{g/mL}$ .....	53
Tabela 4–	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) e FIC index de drogas antifúngicas e efeito de combinação com extrato metanólico.....	58
Tabela 5–	Efeito do extrato metanólico e frações ativas sobre a cepa de <i>C. krusei</i> ATCC 6258 na ausência e na presença de sorbitol (0.8 M).....	68
Tabela 6–	Efeito do extrato metanólico e frações ativas sobre a cepa de <i>C.krusei</i> ATCC 6258 na ausência e na presença de ergosterol $400\mu\text{g/mL}$ .....	69
Tabela 7–	Composição do óleo essencial de <i>O. glomerata</i> .....	74

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	American Type Culture Collection
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLSI	<i>Clinical Laboratory Standart Institute</i>
DCF	2'7' Diclorofluoresceína
DFCH	Diclorodiidrofluoresceína não fluorescente
DMSO	Dimetilsulfóxido
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
FITC	Fluoresceína
GC/FID	Cromatografia gasosa com detector de ionização de chamas
GC/MS	Cromatografia gasosa acoplada com espectrômetro de massa
H2DCDFA	Diacetato de 2', 7' – diclorodiidrofluoresceína
IFC	Índices fracionárias de concentração inibidora
IV	Infravermelho
UFC	Unidade formadora de colônia
UV	Luz ultravioleta
MEOH	Metanol
MOPS	Ácido 3-[N-morfino] propanossulfônico
MFS	Major Facilitator Superfamily
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development
OE'S	Óleos essenciais
OMS	Organização Mundial de Saúde
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
SAB	Sabouraud
SIDA	Síndrome de Imunodeficiência Adquirida
USJ	Usina São José
UFC/mL	Unidades formadoras de colônia por mL
UTI	Unidade de Terapia Intensiva

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>18</b>
2.1	O GÊNERO <i>Candida</i> .....	18
2.2	PRINCIPAIS ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Candida</i> .....	21
<b>2.2.1</b>	<b><i>Candida albicans</i> .....</b>	<b>21</b>
<b>2.2.2</b>	<b><i>Candida krusei</i>.....</b>	<b>22</b>
<b>2.2.3</b>	<b><i>Candida parapsilosis</i> .....</b>	<b>22</b>
<b>2.2.4</b>	<b><i>Candida tropicalis</i> .....</b>	<b>23</b>
2.3	CANDIDÍASE.....	24
2.4	TERAPIA ANTIFÚNGICA.....	26
2.5	RESISTÊNCIA AOS ANTIFÚNGICOS .....	28
2.6	PRODUTOS NATURAIS COMO AGENTES ANTIMICROBIANOS .....	31
2.7	A FAMÍLIA LAURACEAE .....	34
2.8	O GÊNERO <i>Ocotea</i> .....	36
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>38</b>
3.1	ÁREA DE ESTUDO E COLETA .....	38
3.2	OBTENÇÃO DOS EXTRATOS.....	39
3.3	OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL .....	40
3.4	PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA DAS PRINCIPAIS CLASSES DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	40
3.5	MICROORGANISMOS TESTES.....	40
3.6	CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM) .....	40
3.7	TESTE DO SINERGISMO PELA TÉCNICA DE MICRODILUIÇÃO EM	

	CALDO: <i>CHECKBOARD</i> .....	42
3.8	FRACIONAMENTO DO EXTRATO METANÓLICO.....	43
3.9	IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS DO EXTRATO METANÓLICO E DAS FRAÇÕES POR CLAE .....	43
3.10	TEMPO DE MORTE.....	44
3.11	TESTE DO ERGOSTEROL.....	45
3.12	TESTE DO SORBITOL .....	45
3.13	DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR .....	45
3.14	DETECÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO EM CÉLULAS DE <i>CANDIDA SPP</i> .....	46
3.15	DETERMINAÇÃO DA EXTERNALIZAÇÃO DE FOSFATIDILSERINA..	46
3.16	ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DO ÓLEO ESSENCIAL.....	47
3.17	IDENTIFICAÇÃO DOS COMPONENTES DO ÓLEO ESSENCIAL.....	47
3.18	ANÁLISE DOS DADOS.....	48
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>49</b>
4.1	PERFIL FITOQUÍMICO.....	49
4.2	ATIVIDADE ANTI – <i>Candida</i> .....	51
4.3	ANÁLISE “CHECKBOARD” .....	56
4.4	IDENTIFICAÇÃO DOS COMPONENTES DOS EXTRATOS E DAS FRAÇÕES.....	59
4.5	EFEITOS SOBRE A CINÉTICA DE CRESCIMENTO (TEMPO DE MORTE).....	66
4.6	ENSAIO DO SORBITOL.....	67
4.7	ENSAIO DO ERGOSTEROL.....	69
4.8	EFEITO DO EXTRATO METANÓLICO NA VIABILIDADE CELULAR EM CÉLULAS DE <i>Candida krusei</i> .....	70

4.9	EFEITO DA B-LAPACHONA SOBRE A GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS) EM CÉLULAS DE <i>Candida</i> spp.....	70
4.10	DETECÇÃO DA EXTERNALIZAÇÃO DE FOSFATIDILSERINA (PS) INDUZIDA POR B-LAPACHONA EM CÉLULAS DE <i>Candida</i> spp.....	71
4.11	IDENTIFICAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>O. glomerata</i> .....	73
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>78</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>79</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Um crescente aumento do número de infecções fúngicas invasivas é observado, um fato preocupante, uma vez que estas infecções possuem uma considerável taxa de mortalidade (Castelli et al., 2014). Tais infecções atingem, sobretudo, pacientes imunodeprimidos e/ou em unidades de terapia intensiva (UTI) com doenças múltiplas (Seabra, 2011). Nesse contexto, a candidíase adquire relevância por ser uma infecção que pode variar desde manifestações frequentes, como colonização na mucosa vaginal e oral, até o desenvolvimento de maneira sistêmica por via hematogênica ou linfática (Develou, Bretagne, 2005, Williams et al., 2011). Seu agente etiológico mais frequente é *Candida albicans* (60% dos casos).

Diante deste cenário tem-se observado um expressivo aumento de infecções fúngicas causadas por espécies não-albicans, como *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*,

*C. parapsilosis*, *C. lusitaniae*, o que se classifica como um problema, visto que espécies pertencentes às estas classes apresentam-se, em sua maioria, resistentes aos principais fármacos empregados na terapêutica clínica (Barbedo, Sgarbi, 2010). Assim, em razão do aumento do número de indivíduos imunocomprometidos, do aparecimento de isolados resistentes e multirresistentes, juntamente com a elevada incidência de candidíase localizada e sistêmica e a toxicidade dos antifúngicos existentes, torna-se indispensável à busca por novas terapias (Sheikh et al., 2013; Xie et al., 2014).

A terapia medicamentosa em casos de infecções fúngicas apresenta limitações, como o alto custo dos fármacos disponíveis na clínica, toxicidade elevada, interações medicamentosas, biodisponibilidade insuficiente do princípio ativo e emergência de cepas resistentes (Endo et al., 2010; Tyagi, Malik, 2010). Diversos antifúngicos têm sido indicados no tratamento destas infecções, como os pertencentes às classes de poliênicos, azólicos, equinocandinas, entre outros, todavia, com o uso indiscriminado destes antimicrobianos associado às características genéticas e fisiológicas do fungo, nota-se um expressivo aumento do perfil de resistência aos fármacos integrantes destas classes (Calabrese et al., 2013; Wei et al., 2011).

Nesse contexto, o controle alternativo de bactérias e fungos patogênicos tem sido amplamente discutido. Muitos produtos naturais, entre os quais os extratos e os óleos essenciais (OE's) de plantas medicinais, condimentares e aromáticas, apresentam potencial para o tratamento de diversas doenças. As substâncias bioativas presentes nessas plantas são os metabólitos secundários (Silva et al., 2010).

Os principais grupos de compostos (metabólitos primários ou secundários) com propriedades antimicrobianas, extraídos de plantas incluem: terpenóides, alcalóides, lectinas, polipeptídeos, substâncias fenólicas e polifenóis (fenóis simples, ácidos fenólicos, quinonas, flavonas, flavonóis e flavonóides), taninos e cumarinas (Reschke, Marques, Mayworm, 2007). Estes compostos isolados de plantas são substâncias com estruturas químicas bem diferenciadas dos antimicrobianos obtidos a partir de bactérias, leveduras e de fungos. Tais produtos podem atuar no metabolismo intermediário dos microrganismos ativando enzimas, alterando a ação de inibidores que influenciam os nutrientes do meio, interferindo nos processos enzimáticos em nível nuclear ou ribossomal, provocando alterações nas membranas ou interferindo no metabolismo secundário (Lima, 2001).

Lauraceae é uma família botânica conhecida por possuir espécies com interesse comercial pelos seus OE's, com aproximadamente 50 gêneros e 2500 espécies. Destas, 400 espécies distribuídas em 25 gêneros são encontradas no Brasil, possuindo grande incidência na região Amazônica (Chanderbali, 2004). Os estudos já publicados descrevem a composição dos OE's de Lauraceae com predominância de terpenos. Este é o caso de *Aniba rosaeodora*, *A. duckei* e *Cinnamomum camphora* e outras espécies cujos constituintes majoritários são monoterpenos e hidrocarbonetos sesquiterpênicos, encontrados em espécies de diversos gêneros (Alcântara et al., 2010). Fenilpropanóides, como safrol, metileugenol, derivados de cinamaldeído e benzenóides são encontrados em espécies de *Ocotea*, como *O. odorifera*, *O. pretiosa* e *O. sassafrás* (Giang et al., 2006).

O objetivo deste trabalho foi avaliar os metabólitos secundários de *Ocotea glomerata* e investigar a atividade antifúngica dos extratos sobre cepas de *Candida*. Tendo como objetivos específicos: avaliar a eficiência de extratos com solventes de diferentes polaridades (hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol) das folhas de *O. glomerata* como agente anti-*Candida*; Extrair o óleo essencial da folha de *O. glomerata*; Quantificar e identificar os compostos químicos do óleo essencial de *Ocotea glomerata* usando cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG/MS); Efetuar fracionamento cromatográfico em cromatografia flash, visando conhecer a composição química do extrato mais ativo; Identificar compostos isolados do extrato mais ativo pelas técnicas de cromatografia líquida de alto desempenho acoplada a espectrometria de massa (CLAE-EM); Avaliar a atividade antifúngica *in vitro* dos extratos e frações da espécie de *O. glomerata*; Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos e frações obtidos da *O. glomerata*; Avaliar o efeito sinérgico do extrato mais ativo de *O. glomerata* com antifúngicos padrões; Avaliar os possíveis mecanismos de ação do extrato e frações bioativas frente as cepas de *Candida*.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 O GÊNERO *Candida*

De acordo com a classificação taxonômica, *Candida* pertence ao filo dos Ascomycetes, classe Blastomycetes, ordem Cryptococcales, família Cryptococcaceae e gênero *Candida*, que apresenta cerca de 200 espécies, das quais apenas 12 são agentes principais de doenças. As principais espécies de interesse clínico são: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *C. kefyr*, *C. dubliniensis*, *C. famata*, *C. lipolytica*, *C. norvegensis* e *C. lusitaniae* (López-Martínez, 2010).

O gênero *Candida* contém centenas de espécies que apresentam divergências genômicas entre si e variações fenotípicas. As diferenças fenotípicas entre espécies de *Candida* existem com relação à morfologia, tamanho celular, requisitos de crescimento, composição da parede celular e distribuição de fatores de virulência. Quanto à morfologia, *Candida* spp. são predominantemente leveduriformes. Muitas espécies deste gênero são dimórficas, ou seja, crescem na forma de leveduras e pseudo-hifas, e

*C. albicans*, *C. dubliniensis* e *C. tropicalis* são consideradas polimórficas, pois possuem a capacidade de formar leveduras, pseudo-hifas e hifas verdadeiras (Whibley, Gaffen, 2015).

As formas leveduriformes de *Candida* spp. (Figura 1) possuem tamanhos variáveis, entre 2 a 11µm de diâmetro e consistem em células simples, ovais, que se reproduzem por brotamento (Thompson, Carlisle, Kadosh, 2011; Whibley, Gaffen, 2015). As pseudo-hifas crescem a partir do brotamento das leveduras, onde os brotos formados permanecem ligados uns aos outros, com constrições na junção e sem a formação de septos. As hifas verdadeiras crescem a partir de pequenos filamentos denominados tubos germinativos, originados de células de leveduras, que se desenvolvem em direção polarizada, sob orientação de uma organela especializada, o *Spitzenkörper* (corpo apical), formando estruturas alongadas, interligadas, com lados paralelos, larguras uniformes e septos (Thompson, Carlisle, Kadosh, 2011).

Em suas estruturas celulares, as espécies de *Candida* possuem parede celular bem definida, com basicamente, a mesma composição: quitina, polissacarídeos (glucanas e mananas) e proteínas (Whibley, Gaffen, 2015). No entanto, variações nas proporções destes compostos são evidentes entre as diferentes espécies de *Candida* (Huang, 2012). A parede celular de *C. albicans* é constituída de 60% de β-glucana e cerca de 40% de mananoproteínas e quitina (Huang, 2012). Já a parede de *C. glabrata*

apresenta 50% a mais de proteínas, mais mananas e menos glucanas do que *C. albicans*, e quantidades maiores de quitina são observadas nas paredes de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, quando comparadas com *C. glabrata* e *C. krusei* (De Groot et al., 2008; Costa-De-Oliveira et al., 2013). Além disso, variações proporcionais dos constituintes da parede celular, também são vistas em leveduras e hifas verdadeiras, de uma mesma espécie, como ocorre com as espécies de *C. albicans* (Gow et al., 2012).

Figura 1 - Imagens de células de *Candida albicans* visualizada por microscopia de contraste de fase. Principais morfologias A – (leveduras), B – (pseudo-hifas) e C – (hifas verdadeiras).



Fonte: Thompson, Carlisle, Kadosh, 2011

Macroscopicamente as espécies do gênero *Candida* apresentam colônias de coloração branca a creme (Figura 2) com texturas cremosas ou membranosas exibindo superfície variável de lisa a sulcada, brilhante ou opaca, que crescem bem dentro de 48 horas, entre temperaturas de 25 e 37 °C (Barbedo, Sgarbi, 2010).

Figura 2 –Fotomacrografia: aspectos macroscópicos de *Candida albicans*



Fonte: A autora.

Apesar de causarem infecções oportunistas, as leveduras do gênero *Candida* possuem uma ampla gama de fatores de virulência (Figura 3), os quais são determinados geneticamente (Tamura et al., 2007).

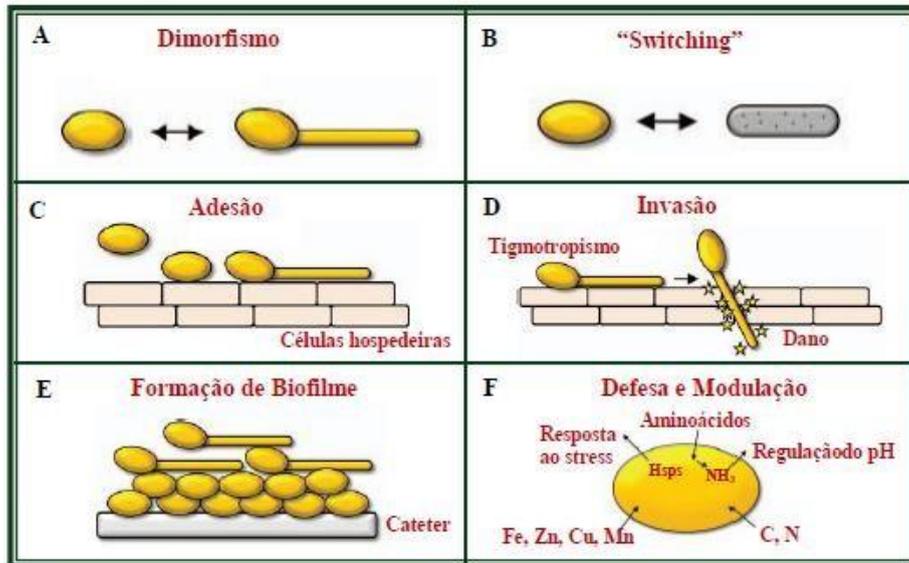


Figura 3 – Mecanismos de virulência de *Candida*.

Fonte: Adaptado de Mayer, Rube e Wilson (2013).

A capacidade de *Candida* spp. de produzir mais de um fenótipo, ou seja, mais de uma morfologia quando exposta a um determinado estímulo, é conhecida como plasticidade fenotípica e representa importante fator de virulência (Soll, 2002).

Um dos fatores de virulência proposto, embora não tão comum e com poucas evidências é o fenômeno de “switching” que corresponde à transição celular do crescimento de leveduras a células alongadas e opacas. Esta variação fenotípica pode influenciar a formação de biofilme e a antigenicidade da levedura (Mayer, Huber, Wilson, 2013).

Leveduras do gênero *Candida* também utilizam mecanismos que permitem identificar e penetrar locais infectáveis no hospedeiro, facilitando assim o processo de patogênese, esse mecanismo é denominado de tigmotropismo de hifas (Brand et al., 2008).

Enzimas extracelulares como fosfolipases e proteases têm sido indicadas em aumentar a eficiência na aquisição de nutrientes extracelulares, mas, sobretudo em facilitar a disseminação da doença ao promover danos celulares (Silva, 2016).

Outros fatores de virulência também relatados são a produção de biofilme (complexa estrutura multicelular de leveduras, pseudo-hifas e hifas envolvidas por uma matriz

extracelular) que possui elevada resistência antifúngica e a capacidade da levedura de modular o meio em que está por meio de alteração de pH, captação de

aminoácidos e traços de metais, e ainda o sequestro de componentes de carbono e nitrogênio, favorecendo a sobrevivência fúngica (Mayer, Huber, Wilson, 2013).

## 2.2 PRINCIPAIS ESPÉCIES DO GÊNERO *Candida*

### 2.2.1 *Candida albicans*

*C. albicans* é a espécie mais abundante e significativa que coloniza de forma comensal todos os seres humanos. Eventualmente, podem causar infecções potencialmente letais, especialmente em pacientes imunocomprometidos ou criticamente doentes. Quanto à sua colonização, esta pode acontecer em qualquer fase da vida do indivíduo, a qual varia desde o momento do nascimento, ocorrência de transmissão relacionada com a contaminação dentro do ambiente familiar, até ao contato direto com determinado sítio contaminado, como exemplo ressalta-se o ato sexual como o principal fator de desencadeamento de infecções. Por sua vez, reporta-se a expressiva capacidade de infestação que esta levedura possui, no sentido de que um número limitado de estirpes de *C. albicans* pode colonizar ao mesmo tempo, uma, ou várias membranas e mucosas de um mesmo indivíduo (Kim et al., 2011)

Essa espécie é descrita como a mais frequente nas infecções por esse gênero (Lim et al., 2012), podendo ser isolada de infecções superficiais dos mais variados sítios anatômicos. Exibe diversos fatores de virulência (Colombo et al., 2013) e é capaz de sofrer extremas alterações genômicas com o objetivo de sobreviver no hospedeiro humano (Selmecki, Forche, Berman, 2010). Os mecanismos envolvidos com estas alterações podem ter evoluído tanto para tolerar situações de estresse no hospedeiro, como para gerar grandes variações genéticas como forma de adaptação a cada microambiente (Selmecki, Forche, Berman, 2010).

Outro fator agravante e que leva a falhas no tratamento medicamentoso, dá-se principalmente à característica de *C. albicans* ser a espécie frequentemente associada com a formação de biofilme, especialmente em implantes médicos, e isso tem um impacto significativo sobre a morbidade e mortalidade dos pacientes. A formação do biofilme fúngico é importante para a patogenia da levedura, sendo considerada como uma característica de virulência e de resistência do microrganismo (Herwald, Kumamoto, 2014). Por apresentar tal característica, *C. albicans* tornou-se o principal modelo para o estudo dos mecanismos que fundamentam a formação de biofilmes de

fungos morfológicamente complexos, e compostos de formas de leveduriformes, pseudo-hifas e hifas verdadeiras (Bonhomme, Enfert, 2013).

A *C. albicans* é naturalmente sensível aos antifúngicos sistêmicos, mas em alguns casos, quando a exposição ao antifúngico (principalmente fluconazol) é prolongada, pode haver a seleção de isolados resistentes (Colombo et al., 2013).

### 2.2.2 *Candida krusei*

*C. krusei* emerge nos últimos anos como um fungo oportunista de alto grau de complexidade na terapêutica antifúngica frente aos pacientes infectados, principalmente em imunocomprometidos. É um patógeno hospitalar ocasional, particularmente isolado de pacientes com doenças hematológicas e pacientes transplantados (Pfaller et al., 2010; Colombo et al., 2013). Isto se justifica pelo fato de apresentar perfil de resistência intrínseca aos fármacos derivados de azóis, como o fluconazol, principal medicamento utilizado em casos de infecções fúngicas (Silva et al., 2012; Colombo et al., 2013) Neste sentido, a terapêutica nos casos de infecções por esta levedura muitas vezes é insatisfatória e de pouca adesão do paciente ao tratamento, gerando custos elevados à terapia e expondo os hospedeiros a drogas que apresentam efeitos colaterais superiores, como os fármacos anfotericina B, voriconazol, posaconazol e ravuconazol, utilizados em terapias onde o agente infeccioso possui resistência ao fluconazol (Kathiravan et al., 2012).

Estudos têm demonstrado infecções desencadeadas por *C. krusei* em pacientes que receberam fluconazol e anfotericina B em terapias contra infecções causadas por outras espécies de *Candida* (Pfaller et al., 2008). Schuster et al. (2013) confirmaram esta ocorrência ao investigarem os fatores de risco ao desenvolvimento de candidemias ocasionadas por *C. krusei*, reportando a provável contribuição do fluconazol de forma sinérgica no desencadeamento do estado patológico em hospedeiros vulneráveis, que na maioria das vezes são portadores de algum tipo de câncer, de neutropenia, pós- cirúrgicos ou tratados com hemodiálise.

### 2.2.3 *Candida parapsilosis*

Descrita inicialmente em 1928 (Ashford, 1928), *C. parapsilosis* é considerada um organismo comensal que, no entanto, torna-se patogênico quando há um comprometimento do balanço fisiológico da microbiota ou do sistema imune do

indivíduo (Naglick et al., 2003, Horn et al., 2012).

Tornou-se um importante patógeno causador de infecções hospitalares. Na Europa e Ásia, os casos de candidíase provocados por *C. parapsilosis* superam o número de casos ocasionados por *C. albicans*. No Brasil, é responsável por 25,8% dos casos de candidiases. Por conseguinte, é considerada a segunda espécie mais comum de *Candida* (Barbedo, Sgarbi, 2010). Esse fenômeno tem sido atribuído a uma variedade de fatores de risco, incluindo capacidade de crescimento tanto em meios de hiperalimentação com altas concentrações de glicose até mesmo em dispositivos médicos intravasculares (cateteresvenosos, central e periférico, cateteres de hemodiálise e diálise peritoneal), dispositivos protéticos (prótese intracardíaca e de articulações), além de que a doença invasiva pode ocorrer sem colonização prévia, sendo transmitida horizontalmente através de contaminação de fontes externas ou pelas mãos dos profissionais de saúde antes ou durante o manuseio do paciente (Ribas, 2012). Na maioria dos casos, esse agente etiológico é sensível aos derivados azólicos, equinocandinas e macrolídeos poliênicos. Foram descritos poucos casos de resistência *in vitro* à anfotericina B (2-3%) e aos azólicos (<5%).

#### 2.2.4 *Candida tropicalis*

Desde 1960 *C. tropicalis* tem sido reconhecida como responsável por causar infecções fúngicas graves (Ho, 1960). É a segunda ou terceira na causa de candidemias em adultos. Diferentemente de *C. albicans*, que está associada à microbiota, a detecção de *C. tropicalis* é associada à infecção. Sendo um fungo oportunista, as infecções causadas por essa espécie estão relacionadas com pacientes neutropênicos, com danos na mucosa gastrointestinal, com malignidades hematológicas (principalmente leucemias agudas), em quimioterapia antineoplásica e com desequilíbrio da microbiota pelo intenso uso de antimicrobianos (Gómez et al., 2010).

A patogenicidade de espécies de *C. tropicalis* é mediada por um número de fatores de virulência, incluindo adesão e formação de biofilme no tecido do hospedeiro bem como em dispositivos médicos, a capacidade de evadir as defesas do hospedeiro, a produção de hifas e as enzimas hidrolíticas (proteases, fosfolipases e hemolisinas) (Kothavade et al., 2010).

Embora apresente a capacidade de disseminações invasivas, *C. tropicalis* é geralmente suscetível a todos os antifúngicos, todavia, vários casos de resistência cruzada entre fluconazol e outros derivados de azóis em isolados clínicos foram

relatados, especialmente na região da Ásia-Pacífico (Forastiero et al., 2013). Por outro lado, a resistência à anfotericina B exercida por esta espécie é considerada rara.

### 2.3 CANDIDÍASE

A candidíase é caracterizada como uma síndrome micótica ocasionada por espécies fúngicas do gênero *Candida*, constituído de 81 espécies, pertencentes à família Cryptococcaceae. Em hospedeiros humanos saudáveis, *Candida* spp. são consideradas constituintes saprófitas da pele, das mucosas oral, vaginal e intestinal, e do trato respiratório (Drell et al., 2013; Findley et al., 2013; Hoffmann et al., 2013; Nguyen; Viscogliosi, Delhaes, 2015). Entretanto, quando ocorrem alterações no mecanismo de defesa do hospedeiro ou comprometimento de barreiras anatômicas, *Candida* spp. tornam-se patogênicas e causam infecções denominadas candidíase (Gow et al., 2012; Iliev, Underhill, 2013).

Dentre os fatores que geram este estado de predisposição ao desencadeamento de infecções oportunistas por este gênero, destacam-se aqueles que levam ao imunocomprometimento dos pacientes, como o provocado pela quimioterapia de combate ao câncer, doenças como síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), terapias imunossupressoras devido a transplantes de órgãos, uso de antibióticos de amplo espectro de ação, diabetes mellitus, nutrição parenteral, entre outros (Kothavade et al., 2010).

A candidíase pode ser subdividida em três principais grupos: candidíase superficial, com ocorrência na pele, pelo e unhas; candidíase de mucosas, envolvendo a orofaringe, esôfago e região vulvovaginal, e candidíase sistêmica, que incluem a candidemia e outras formas de candidíase invasiva (Papon et al., 2013).

A candidíase sistêmica é a de maior gravidade pois compromete os órgãos como fator resultante da disseminação pela corrente sanguínea, e este tipo de infecção ocorre em pacientes debilitados por algum ou associação de fatores predisponentes já citados anteriormente (Kothavade et al., 2010).

As principais espécies de *Candida* associadas à candidíase sistêmica são: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei*. Estas espécies são responsáveis por 90% dos casos em todo mundo, embora muitas espécies também estejam associadas a esta infecção, como *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii*, *C. kefyr*, *C. norvegensis*, *C. dubiniensis*, *C. lipolytica*, *C. pelliculosa*, *C. dublinensis*, entre outras. O

agente etiológico mais frequente ainda é *C. albicans*, representando cerca de 40 a 50% dos casos, entretanto, *Candida* não *albicans* têm demonstrado percentual maior que 50% no

contexto atual (Pfaller et al., 2015).

As infecções causadas por *Candida* spp. têm emergido mundialmente e resultam do aumento do tempo de internação e juntamente com as despesas médicas constituem um importante problema de saúde pública, principalmente em centros médicos terciários (Chou et al., 2007; Schmalreck et al., 2012). Estas infecções destacam-se não apenas por sua prevalência em diferentes centros médicos, como também por suas complicações, difícil diagnóstico, além de estarem associadas à mortalidade atribuída da ordem de 50% (Nucci, Colombo, 2007).

Nas últimas décadas, vários estudos têm relatado uma progressiva mudança na etiologia das candidemias invasivas em diferentes grupos de pacientes e serviços hospitalares distintos. O padrão etiológico de candidemias sofre variações geográficas relevantes documentadas em diferentes países. Entretanto, *C. albicans* permanece sendo a espécie mais frequente em vários estudos (Quindós et al., 2014). Apesar disso, a incidência de infecções causadas por espécies de *Candida* não-*albicans* tem crescido em todo o mundo. Esta mudança epidemiológica pode estar associada à imunossupressão severa, uso de antibióticos de amplo espectro e em pacientes de idade avançada (Sardi et al., 2013).

A prevalência de espécies de *Candida* varia consideravelmente de acordo com sua distribuição geográfica, centro a centro e unidade a unidade e esta distribuição é importante em todas as formas de candidíase. Na verdade, candidíase não é uma, mas várias doenças, com cada espécie de *Candida* apresentando suas próprias características com relação ao tropismo aos tecidos, propensão de causar doenças invasivas, virulência e susceptibilidade a antifúngicos (McCarty, Pappas, 2015).

No Brasil, são de grande importância as espécies *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, cujas frequências de isolamento no geral são bem próximas, apesar de relatos de variações entre os estudos realizados em diferentes regiões do país. Ambas as espécies disputam a colocação de 2ª espécie mais comumente isolada, sendo que em alguns casos, mesmo individualmente, se equiparam e até ultrapassam a frequência de isolamento de *C. albicans* (Quindós et al., 2014).

Doi et al., (2016) estudaram 2.563 episódios de infecções nosocomiais no período de 2007 a 2010 e concluíram que *Candida* spp. foi o sétimo agente mais

prevalente dos casos em pacientes com malignidades e *C. albicans* foi a espécie mais frequente.

Em Taiwan, Tang et al., (2014) estudaram 41.440 pacientes com câncer e diagnosticaram 242 episódios de candidemia. Dentre as espécies de *Candida* encontradas nas neoplasias hematológicas, *C. albicans* foi a mais comum (63,0%) seguida pela *C. tropicalis*

(22,2%), *C. parapsilosis* (7,4%) e *C. glabrata* (7,4%). A elevada taxa de mortalidade (50,8%) foi associada à ausência de tratamento com antifúngicos.

Singaravelu et al., (2014) mostraram *C. parapsilosis* como o principal agente causador de infecção na Europa, Ásia e América do Sul. Nos isolados analisados, encontraram incidência de *C. parapsilosis* de 15,5% na América do Norte, 16,3% na Europa e 23,4% na América Latina. Nos Estados Unidos é a terceira espécie mais comum como causa de sepse em neonatos. Os autores estudaram os fatores que influenciam na virulência da *C. parapsilosis* como aderência, metabolismo de lipídeos e secreção de enzimas hidrolíticas.

Devrim et al., (2015) estudaram, na Turquia, 135 episódios de candidemia em 114 pacientes pediátricos com câncer no período de 2007 a 2013 e encontraram *C. parapsilosis* (61,4%) como principal agente da candidemia e, em seguida, *C. albicans* (18,5%), e *C. tropicalis* (14,8%). A taxa de mortalidade no estudo foi de 4,44%. Diante deste contexto, a análise das diferenças geográficas das espécies de *Candida* spp. e perfil de sensibilidade in vitro a agentes antifúngicos são importantes para avaliar mudanças na distribuição destas espécies e comportamento frente às novas drogas (Taj- Aldeen et al., 2013).

## 2.4 TERAPIA ANTIFÚNGICA

As substâncias com potencial antifúngico surgiram na década de 1950 com o aparecimento dos polienos (nistatina e anfotericina B). A partir dos anos 70, os azóis (cetoconazol, itraconazol e fluconazol) surgiram no mercado com extensa aplicação devido a seu amplo espectro e menor toxicidade. Em 1990, foi lançada a nova formulação da anfotericina B, chamada formulação lipídica, que apresentava menor toxicidade renal. A introdução destes fármacos no mercado representou um grande avanço no controle das infecções fúngicas (Llamas et al., 2012)

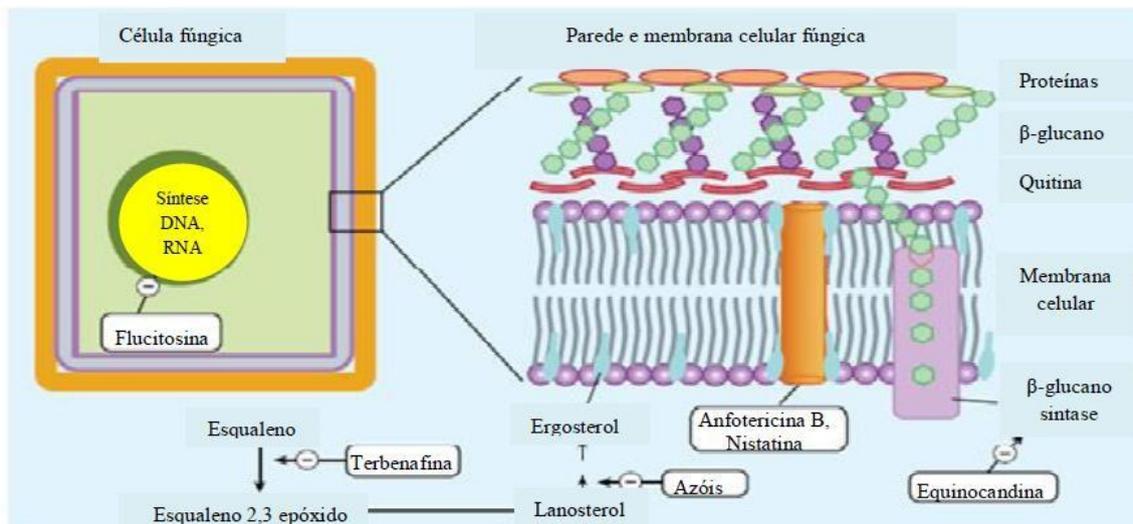
Os agentes antifúngicos, disponíveis para o tratamento de candidíase sistêmica podem ser agrupados de acordo com o seu mecanismo de ação (Figura 4), onde pertencem à classe dos poliênicos (anfotericina B); dos azólicos, em particular os triazólicos (fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol e isavuconazol); das equinocandinas (caspofungina, micafungina e anidulafungina) e dos análogos de pirimidina (5-fluorocitosina) (McCarty, Pappas, 2015).

Os alvos terapêuticos para estes agentes incluem o ergosterol, esterol presente na membrana citoplasmática fúngica, que sofre ação direta ou indireta de poliênicos e azólicos.

A glucana, principal composto da parede celular fúngica, constitui alvo metabólico explorado pelas equinocandinas e ácidos nucleicos, cuja síntese é inibida por 5-fluorocitosina (Morace, Perdoni, Borghi, 2014).

Entre os poliênicos, anfotericina B é a droga de escolha para as formas severas e invasivas de candidíase e apresenta atividade fungicida contra várias espécies de *Candida* (Colombo et al., 2013). Este agente demonstra propriedades anfipáticas, as quais permitem sua intercalação entre a membrana contendo ergosterol, induzindo a formação de poros. Os poros formados danificam as funções de barreira da membrana e alteram a permeabilidade da célula, ocorrendo o extravasamento de constituintes citoplasmáticos e consequente morte celular (Baginski, Czub, 2009).

Figura 4 – Agentes antifúngicos e seus alvos celulares



Fonte: Adaptado de Katzung (2009).

No entanto, ela apresenta baixa seletividade, sendo potencialmente tóxica às células humanas, particularmente, ocasionando nefrotoxicidade a qual pode ser observada nos primeiros dias de uso clínico, e efeitos colaterais relacionado a infusão aguda (Ha et al., 2011).

Os azólicos, maior classe terapêutica, dividem-se em imidazólicos e triazólicos. Os triazólicos apresentam atividades fungicida ou fungistática contra muitas espécies de *Candida* e se subdividem em: triazólicos de primeira geração, itraconazol e fluconazol, e triazólicos de segunda geração, voriconazol, posaconazol e isavuconazol (Colombo et al., 2013).

O mecanismo de ação dos azólicos consiste na inibição da enzima lanosterol 14-  $\alpha$ -

demetilase codificada pelo gene *ERG11*, que impossibilita a conversão do lanosterol em ergosterol, provocando a redução do ergosterol e a acumulação de 14- $\alpha$ -metil-3,6- diol, produto tóxico sintetizado pela enzima  $\delta$ -5,6-desaturase, codificada pelo gene *ERG3*. Como consequência, ocorrem alterações na função e estrutura da membrana e, por fim, a inibição do crescimento fúngico (Sanguinetti, Posteraro, Lass-Florl, 2015).

As equinocandinas (caspofungina, micafungina e anidulafungina), a mais recente classe do arsenal antifúngico, são fungicidas rápidos contra *Candida* spp. e exercem seus efeitos através da inibição de  $\beta$ -(1,3)-D-glucana sintase, enzima responsável pela biossíntese de glucana (Colombo et al., 2013). O polissacarídeo glucana, componente essencial à parede celular, consiste em monômeros de D-glicose ligados em si por  $\beta$ -(1,3)-glucana ou  $\beta$ -(1,6)-glucana. O bloqueio não competitivo da síntese da  $\beta$ -(1,3)-D-glucana sintase provoca a diminuição da incorporação de glicose no polímero glucano e, por conseguinte, causa a lise da célula fúngica (Kathiravan et al., 2012).

A 5-fluorocitosina (5FC), análogo de pirimidina fluorada, é um antimetabólico que também desempenha atividade antifúngica contra *Candida* spp. O uso deste fármaco como monoterapia, é limitado pela presença de resistência intrínseca e pela facilidade de desenvolver resistência durante o tratamento (Morace, Perdoni; Borghi, 2014). Desta forma, este agente é utilizado, frequentemente como adjuvante terapêutico, em combinação com anfotericina B, para pacientes com candidíase sistêmica (Flevari et al., 2013).

As principais causas das falhas da terapêutica antifúngica sistêmica incluem: doses inadequadas absorção, distribuição ou metabolismo deficiente; interações medicamentosas; neutropenia grave; presença de corpo estranho; emergência do fenômeno da resistência aos antifúngicos.

## 2.5 RESISTÊNCIA AOS ANTIFÚNGICOS

O aparecimento de resistência aos medicamentos é um processo evolutivo que se baseia na seleção de microrganismos que têm uma maior capacidade de sobreviver e reproduzir na presença de um fármaco (Cowen, 2008). A competição natural para a sobrevivência manifesta-se por meio da capacidade dos microrganismos em produzir e processar metabólitos tóxicos para outros microrganismos, e ao mesmo tempo, implementar uma série de estratégias para resistir a ação dessas substâncias (Morace; Perdoni; Borghi, 2014).

Por mais de cinco décadas, o problema de como conter a resistência antimicrobiana

ainda persiste e atualmente, isso tem se tornado um problema de preocupação global com consequências graves. Esse fenômeno é uma ameaça crescente para a saúde humana e tem um significativo impacto sócio econômico nos sistemas nacionais de saúde (Kok et al., 2015; Delarze; Sanglard, 2015).

A resistência pode ser classificada como microbiológica ou clínica. A microbiológica é definida pela presença de um mecanismo de resistência mutacional ou adquirido e é dividido em: (i) primária ou inata, quando os fungos se apresentam resistentes antes mesmo da exposição ao fármaco e (ii) resistência secundária ou adquirida, que aparece em resposta à exposição ao fármaco. Já a resistência clínica é denominada como falha do tratamento (Alcazar-Fuoli; Mellado, 2014).

A capacidade das espécies de *Candida* ocasionar doenças está relacionada com mecanismos que envolvem diversos fatores de virulência, que incluem a transição morfológica entre levedura e hifa, capacidade de se defender contra o sistema imunológico do hospedeiro, aderência, formação de biofilme no tecido do hospedeiro ou em dispositivos médicos, e produção de enzimas hidrolíticas prejudiciais como proteases, fosfolipases e hemolisina (Sardi et al., 2013; Holland et al., 2014). Em relação aos mecanismos moleculares envolvidos na resistência aos antifúngicos podem incluir alterações do alvo molecular do fármaco, “sobre expressão” da molécula alvo, diminuição da concentração intracelular do fármaco (efluxo), perda de porinas, alterações na biossíntese de esteróis e produção de enzimas fúngicas que degradam as drogas (Odds, 2002).

A formação de hifa desempenha função importante na invasão de tecidos. As formas filamentosas (hifa e pseudo-hifa) das espécies de *Candida* têm demonstrado aumento da resistência à fagocitose quando comparado com a levedura. A virulência de

*C. albicans* está estritamente relacionada com a capacidade de formação de hifas, sendo esta transição levedura-hifa crucial para o desenvolvimento da infecção (Tsang, Bandare, Fong, 2012). A morfologia hifal de *C. tropicalis* é similar a de *C. albicans* e está relacionada com a invasão de epitélio oral. Entretanto, a capacidade de *C. parapsilosis* invadir o epitélio oral não está relacionado com produção de pseudo-hifa (Silva et al, 2012). As hifas promovem ao fungo a capacidade de sobrepor da defesa do hospedeiro e também constituem um fator essencial para a patogenicidade por formar biofilmes (Vylkova, Lorenz, 2014).

A formação de biofilmes por espécies de *Candida* também apresentam importante papel no desenvolvimento de resistência aos principais agentes antifúngicos utilizados no tratamento de candidíase sistêmica. Com relação aos azólicos, as células presentes no biofilme são 1000 vezes mais resistentes do que as células planctônicas ou livres, tornando

esses agentes antifúngicos, opções terapêuticas ineficazes na presença de biofilmes (Taff et al., 2013).

A resistência adquirida a anfotericina B, entre as espécies de *Candida*, é rara e a resistência intrínseca é observada em *C. lusitanae*; as causas de resistência à anfotericina B está relacionada à ausência total de ergosterol na membrana fúngica; estruturas diferentes do ergosterol, que impedem a ligação com os poliênicos ou a alteração na via biossintética do ergosterol, que conduz à substituição do ergosterol por outros esteróis, com menor afinidade pelos poliênicos (Morace, Perdoni, Borghi, 2014).

A resistência adquirida por espécies de *Candida* a azólicos é pouco comum e geralmente está associada a tratamentos prolongados. Existem vários mecanismos através dos quais *Candida* spp. podem adquirir resistência aos azólicos e é importante lembrar que mais de um mecanismo de resistência pode ocorrer em uma dada espécie. As alterações resultantes podem ter efeitos aditivos ou levar ao desenvolvimento de resistência cruzada (Pfaller, 2012).

Em *Candida* spp., a resistência aos agentes azólicos envolve a indução de bombas de efluxo, que levam à diminuição da concentração do agente antifúngico no alvo terapêutico. As bombas de efluxo em *Candida* spp. são codificadas pelo gene *CDR* pertencente aos transportadores *ATP - Binding Cassette (ABC) Superfamily*, que afeta quase todos os fármacos azólicos e, pelo gene *MDR* pertencente aos transportadores

*Major Facilitator superfamily (MFS)*, que são geralmente seletivos para fluconazol (Sanguinetti, Posteraro, Lass-Florl, 2015).

Também envolve inibição ou superexpressão do gene *ERG11*, ou mesmo ambos. A mutação no gene *ERG11*, resultante de substituições de aminoácidos da proteína Erg11p, promove a redução da afinidade entre azólicos e sítio enzimático. Este mecanismo está atribuído à resistência intrínseca de *C. krusei* ao fluconazol e à superexpressão do gene *ERG11* o que resulta em taxas não ideais de droga/enzima (Morace, Perdoni, Borghi, 2014; Sanguinetti, Posteraro, Lass-Florl, 2015). Outro mecanismo de resistência compreende a mutação no gene *ERG3*, que impede a conversão do 14- $\alpha$ -metil-3,6- diol para 14- $\alpha$ -metilfecosterol e, com isso a substituição do ergosterol por fecosterol, conduzindo à funcionalidade da membrana fúngica e, portanto, bloqueia o rompimento da membrana pelos azólicos (Sanguinetti, Posteraro, Lass-Florl, 2015).

O principal mecanismo de resistência encontrado em isolados de *Candida* spp. envolve a ocorrência de mutações pontuais no gene *Fks1* e/ou *Fks2*, resultando em alterações conformacionais na enzima glucana sintase, diminuindo assim a afinidade do fármaco pela enzima, e gerando a resistência (Gonçalves et al., 2016). O aumento da síntese de quitina também

tem sido descrito como um importante mecanismo de resistência. Isolados de diversas espécies de *Candida* quando expostos a baixas concentrações de equinocandinas induzem a expressão de genes que codificam quitina sintases que, por sua vez, aumentam a concentração de quitina na parede celular provocando uma diminuição na atividade do antifúngico (Walker et al., 2008).

O desenvolvimento de resistência aos agentes antifúngicos convencionais, por *Candida* spp. representa grande desafio clínico e terapêutico, e requer estratégias que evitem a disseminação da resistência fúngica, como já ocorreu com as bactérias, que se encontram disseminadas e fora de controle. Entre essas estratégias, as mais utilizadas consistem na identificação de espécies fúngicas, diagnóstico precoce da infecção, testes de sensibilidade aos antifúngicos, disponibilidade de terapias mais eficazes e desenvolvimento de nova geração de potentes antifúngicos (Anderson, 2005; Zaitz et al., 2010).

Muitos dos medicamentos utilizados no tratamento de doenças infecciosas são desenvolvidos a partir de produtos naturais, de forma direta ou indireta, especialmente de plantas medicinais, que apresentam grande variedade de compostos com propriedades terapêuticas e são consideradas importante fonte na obtenção de novos

medicamentos. O uso de plantas como matéria prima para fármacos é comum em muitos países e está bem estabelecido nos aspectos culturais e tradicionais de algumas nações (Assob et al., 2011).

## 2.6 PRODUTOS NATURAIS COMO AGENTES ANTIMICROBIANOS

O desenvolvimento de novos antifúngicos é um desafio particularmente interessante, pois os fungos são organismos eucariontes, tais como mamíferos. Com exceção da parede celular, as células fúngicas partilham diversas semelhanças com o hospedeiro levando a uma escassez de alvos específicos de fungos que podem ser explorados para o desenvolvimento de novos agentes. Como consequência é que existe um número limitado de classes de antifúngicos além do que a utilidade da maioria desses agentes é comprometida devido à toxicidade para o hospedeiro (Srinivasan; Lopez-ribo; Ramasubramanian, 2014; Scorzoni et al., 2016).

Com isso, novas estratégias farmacológicas estão sendo adotadas, tais como: (i) desenvolvimento de novas formulações de antifúngicos, como as formulações lipídicas da anfotericina B, (ii) as terapias de combinação de um ou mais compostos antifúngicos,

(iii) sinergismo entre agentes antifúngicos e compostos não antimicrobianos e (iv) utilização de novos princípios ativos obtidos a partir de diferentes fontes, como os produtos

naturais (Spampinato; Leonardi, 2013).

Apesar da descoberta de novas moléculas e da disponibilidade de novas formulações para reduzir a toxicidade e aumentar a biodisponibilidade, a pesquisa de novos agentes antifúngicos e a caracterização de novos alvos são uma necessidade continuada (Scorzoni et al., 2016), já que é bastante claro que o ritmo de desenvolvimento de medicamentos antifúngicos não acompanha o ritmo das necessidades clínicas, especialmente no que tange ao desenvolvimento da resistência (Roemer; Krysan, 2014).

Das 252 drogas consideradas básicas e essenciais pela Organização Mundial de Saúde (OMS), 11% são exclusivamente de origem vegetal e um significativo número de drogas é obtido de precursores naturais. Assim, as plantas são fontes importantes de moléculas biologicamente ativas que podem ser utilizadas não apenas como modelo para a síntese e obtenção de novos fármacos, mas também como uma nova possibilidade de intervenção terapêutica (Brasil, 2016; Gonçalves et al., 2013)

Algumas famílias botânicas possuem naturalmente constituintes químicos importantes que podem ser utilizados na investigação de novos compostos com

atividade antimicrobiana. Neste sentido, o conhecimento prévio adquirido, desde conceitos etnofarmacológicos e até mesmo de dados apresentados à comunidade científica são de extrema importância para o desenvolvimento de investigações científicas que busquem a inovação na área quimioterápica com foco nas doenças infecciosas (Vieira et al., 2014).

A maioria dos agentes antifúngicos utilizados hoje foram descobertas a partir de fontes naturais (Scorzoni et al., 2016). Um levantamento realizado até 2011 mostrou que o perfil dos fármacos utilizados obtidas a partir de fontes naturais (plantas, microrganismos marinhos e terrestres, animais terrestres e outros) não alterou significativamente (61,5% para 61,7%), confirmando que as plantas continuam sendo a principal fonte de novas moléculas representando 61% de todas as moléculas descobertas e promissoras de todo o mundo (Kinghorn et al., 2011). Por isso, as plantas têm recebido um grande destaque pelos pesquisadores que têm estudado e utilizado uma ampla variedade de plantas para a identificação de moléculas bioativas, bem como suas propriedades e mecanismo de ação (Scorzoni et al., 2016; Martins et al., 2015).

Os metabolitos secundários compreendem compostos orgânicos que não estão diretamente envolvidos nos processos de crescimento, desenvolvimento e reprodução dos organismos vegetais, mas desempenham um papel importante nas defesas vegetais contra a herbivoria e outras defesas relacionadas ao meio de desenvolvimento e sobrevivência (Simões et al., 2007; Garcia; Carril, 2009).

A atividade antimicrobiana dos metabólitos oriundos de compostos naturais pode ser

influenciada por vários fatores incluindo a fonte botânica, tempo de colheita, o estágio de desenvolvimento da planta, método de extração, composição química, estrutura, e os grupos funcionais. Além disso, os componentes de alimentos e aditivos, que podem interagir com os compostos antimicrobianos desempenham um papel importante na utilização de compostos naturais como conservantes de alimentos, por exemplo, a ligação não específica do peptídeo antimicrobiano catiônico de partículas de alimentos carregados negativamente pode reduzir o efeito do peptídeo antimicrobiano em sistemas alimentares (Juneja et al., 2012).

Centenas de compostos químicos com atividade biológica estão presente em cada planta, trabalhando em sinergismo e conferindo ampla variedade de bioatividades. Entre estas bioatividades, a propriedade antifúngica de muitas plantas medicinais tem sido descrita contra espécies de *Candida* clinicamente importante tanto *in vitro* como *in vivo* (Martins et al., 2015). Estudos *in vitro* com extratos e óleos essenciais de *Allium*

*tuberosum*, *Coriandrum sativum*, *Cymbopogon martini*, *Cymbopogon winterianus* e *Santolina chamaecyparissus* indicam atividade antifúngica destes extratos para isolados de *Candida* spp. da cavidade oral de pacientes com doenças periodontais (Furletti et al., 2011). Da mesma forma, o óleo essencial de *Mentha suaveolens* mostrou atividade *in vitro* candidacida e candiostática contra *C. albicans* isoladas de candidíase vulvo-vaginal de pacientes com SIDA e, em estudo *in vivo*, usando este óleo contra infecção vulvo-vaginal de ratas, foi observada a eliminação da *C. albicans* nesta infecção (Pietrella et al., 2011).

Os mecanismos de ação dos produtos naturais são diversos e distintos. A membrana citoplasmática classifica-se como o sítio de ação mais comum dos metabólitos secundários, eles atuam tanto na lise da estrutura desencadeando o extravasamento do conteúdo celular e consequentemente a morte, quanto na formação da mesma. A interação com o material genético e síntese de proteínas também é um fator predisponente na promoção da ação terapêutica, neste caso, quando em contato com o material genético é capaz de promover alterações na codificação do DNA microbiano, resultado em ineficazes transcrições promovendo a desorganização de funções vitais para a célula (Hayek et al., 2013; Gyawali, Ibrahim, 2014).

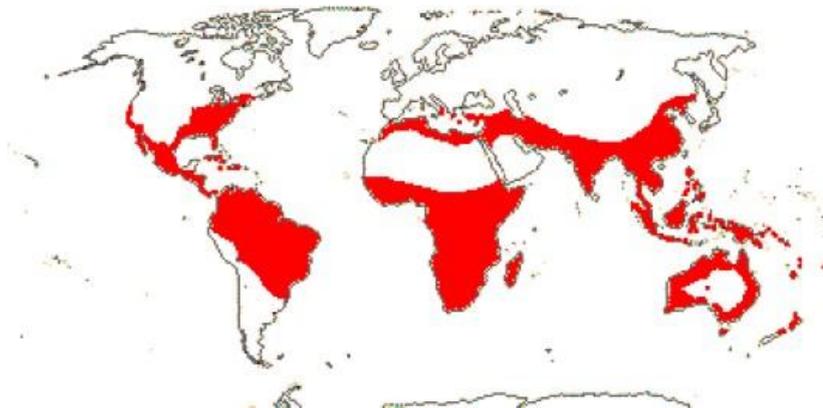
É importante salientar que variações na estrutura química e composição dos compostos naturais empregados como fármacos resultam em diferenças na ação antimicrobiana e na diversidade estrutural de compostos derivados de plantas. O impacto da ação antimicrobiana exercida contra diversos tipos de microrganismos depende da sua configuração estrutural. Como exemplo, os compostos fenólicos possuem grandes variações estruturais e são um dos mais diversos grupos de metabólitos secundários. Os grupos hidroxílicos (OH) presentes

nestes compostos podem ser a causa de ação inibidora uma vez que estes podem interagir com a membrana celular dos microrganismos, para desestabilizar as estruturas de membranas e como consequência promovem a lise celular (Xue et al., 2013).

## 2.7 A FAMÍLIA LAURACEAE

A família *Lauraceae* apresenta uma distribuição denominada pantropical (Figura 5) estando bem representada na América, Ásia Tropical, Austrália, Madagascar e África (Quinet, 2005). O número mais aproximado de espécies da família no Brasil foi extraído da Lista de Espécies da Flora do Brasil (Quinet et al., 2015), que reconhecem 441 espécies, em 24 gêneros. Segundo os mesmos autores, o gênero *Ocotea* Aubl. está entre os mais representativos da família, com 172 espécies no Brasil.

Figura 5 - Mapa da distribuição geográfica da família Lauraceae.



Fonte: Missouri Botanical Garden.

Na região neotropical ocorre do México à Argentina, desde as planícies até as florestas montanas. Nessa região, a maior diversidade de espécies encontra-se no Brasil (Moraes, 2007; Moraes, Van Der Werff, 2011), onde, segundo Quinet et al., (2015), as principais ocorrências estão na Floresta Ombrófila Densa, na Floresta Atlântica *sensu stricto*, na Floresta Ombrófila Mista, na Restinga, no Cerrado, na Caatinga e na Floresta Estacional Semidecidual (Montana, Submontana e Aluvial).

A expressividade na composição florística da Floresta Atlântica está relacionada ao grande número de indivíduos coletados e a sua complexidade morfológica e taxonômica (Quinet, 2005), caracterizando uma ampla riqueza de táxons nesta família, e que vem contribuindo para corroborar a hipótese de que a Floresta Atlântica seja um dos principais

centros de diversidade deste grupo (Kropf et al., 2006). Entretanto, é uma família pouco conhecida em termos de número de espécies e distribuição, pois não se distribuem de forma homogênea, o que demanda estudos mais complexos de levantamento de ocorrência que permitam identificar variações na diversidade das espécies do grupo, e caracterizar diferentes graus de endemismo e abundância ao longo do bioma (Baitello, 2013).

Economicamente, é um grupo muito importante e bastante explorado, visto que algumas espécies são produtoras de madeira de alta qualidade, óleos aromáticos e alcaloides utilizados em diversos segmentos industriais e da construção civil além de ser

bastante empregado nas comunidades tradicionais, que detêm o conhecimento empírico da utilização dessas plantas. Espécies como a canela-preta (*Ocotea catharinensis* Mez), canela-sassafrás (*Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer) e canela-imbuia (*Ocotea porosa* (Nees & Mart.) Barroso), por exemplo, apresentam alto valor econômico e ecológico, e juntamente com *Nectandra*, concentram o maior número de espécies da família no bioma Mata Atlântica (Baitello, 2013).

O potencial econômico das espécies dessa família é conhecido desde os tempos remotos, através de documentos da China de 2800 a.C., onde já era empregado o óleo de *Cinnamomum camphora* (L.) J.Presl e de outras espécies deste gênero na medicina (Sangirardi Jr., 1984). Segundo Quinet (2002), as folhas de *Laurus nobilis* L., o loureiro, eram utilizadas pelos antigos gregos e romanos para confeccionar coroas, com as quais se homenageavam guerreiros e atletas vitoriosos, e estão entre os condimentos mais conhecidos da culinária de todo o mundo. Os primeiros registros relativos à utilização das espécies desta família influenciaram o nome de muitos gêneros que fazem uma alusão àquela época como o gênero *Phoebe* que tem seu nome relacionado ao deus Apolo e *Laurus* L. que vem do celta “laus” e significa louvor em grego (Barroso et al., 2002).

A casca ou o fruto de algumas espécies são usadas como condimentos (*Dicypellium caryophyllaceum*) ou para fazer chá (*Licaria puchury-major* e *Aniba canelilla*). Espécies utilizadas em grande escala são o abacate (*Persea americana*), a canela (*Cinnamomum verum*) e o louro (*Laurus nobilis*). A madeira de Lauraceae é amplamente explorada em diversas regiões. Na Amazônia, a itaúba (*Mezilururs* spp.) é a madeira preferida para construção de embarcações devido a sua alta durabilidade e resistência. Diversas outras espécies constituem o principal produto madeireiro comercializados em Manaus sob o nome de “louro” (Ribeiro et al, 1999).

A família Lauraceae caracteriza-se quimicamente por apresentar, em sua composição alcaloides isoquinolínicos, indólicos e triptofânicos. Dentre os alcaloides isoquinolínicos, os

aporfínoides representam um grupo grande e ainda em expansão comumente encontrado nas mais diversas espécies de Lauraceae.

Várias espécies de Lauraceae são relatadas como potenciais agentes antimicrobianos. Almeida et al., (2016) avaliaram a atividade anti-*Candida* de *Cinnamomum cassia* (canela), com Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 250 mg/L. Para uma eficácia antibiofilme, o óleo reduziu significativamente o número de

microrganismos e acumulação de biofilmes viáveis em  $T_0$ . No entanto, a  $T_{48}$  não houve diferença entre os biofilmes tratados e não tratados.

Singh et al., (2013) avaliaram a atividade anti-*Candida* de diferentes extratos de *Cinnamomum tamala*; o extrato metanólico apresentou inibição de 97, 26%, 98, 57% e 98,66% frente as espécies de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. heamolonii*, respectivamente. Castro, Lima (2011) observaram a atividade anti-*Candida* do óleo essencial de *Ocotea odorífera* (Sassafrás). Todas as cepas ensaiadas, com exceção da *C. tropicalis* LM 708, apresentaram-se sensíveis ao óleo essencial de *O. odorífera*, sendo observado uma CIM de 2,5 mg mL<sup>-1</sup> sobre 68% das cepas utilizadas nos ensaios microbiológicos.

## 2.8 O GÊNERO OCOTEA

*Ocotea* é um dos gêneros mais representativos da família Lauraceae, com aproximadamente 400 espécies de plantas distribuídas ao longo da Continentes americanos e africanos (van der Werff 1991). Estima-se que entre 120 e 160 das espécies para este gênero ocorrem no Brasil (Baitello 2001), com 52 espécies registradas no Nordeste (Quinet et al., 2017) e 11 espécies para o estado de Pernambuco (Barreto 1990).

Essas espécies produzem uma grande quantidade de óleos essenciais e essas plantas são amplamente utilizadas em construção civil, fabricação de móveis e práticas de culinária. Devido à potencial econômico, o extrativismo descontrolado levou ao declínio das populações naturais, colocando algumas espécies em risco de extinção, como *Ocotea catharinensis* Mez, *Ocotea langsdorffii* (Meisn.) Mez e *Ocotea porosa* (Nees & C. Mart. (Moraes 2005). As plantas do gênero *Ocotea* também são usadas em medicina popular para o tratamento de infecções, dores de cabeça, úlceras, cólicas menstruais, mordidas de cobras, diarreia, neuralgia, indigestão e dor em geral (Coutinho et al., 2006, Moraes 2005)

Existem vários relatórios na literatura sobre a composição química dos óleos de espécies de *Ocotea* que ocorre em várias regiões do mundo. Esses óleos são extraídos de diferentes partes da planta e as principais classes químicas encontradas são monoterpenos

(Olivero-Verbel et al., 2010), sesquiterpenos, diterpenos (Yamaguchi et al., 2013) e fenilpropanoides (Oltramari et al., 2004). Estudos sobre as propriedades biológicas desses óleos essenciais revelaram um amplo espectro de atividades, incluindo antimicrobiano (Leporatti et al., 2014), anti-inflamatório, citotóxico, antioxidante

(Destryana et al., 2014, Chaverri et al., 2011) e propriedades moluscicidas (Coutinho et al., 2007) incluindo a ação inseticida contra artrópodes de interesse medicinal, como *Aedes aegypti* (Menut et al. 2002) e interesse agrícola, como *Sitophilus zeamais* (Mossi et al. 2013).

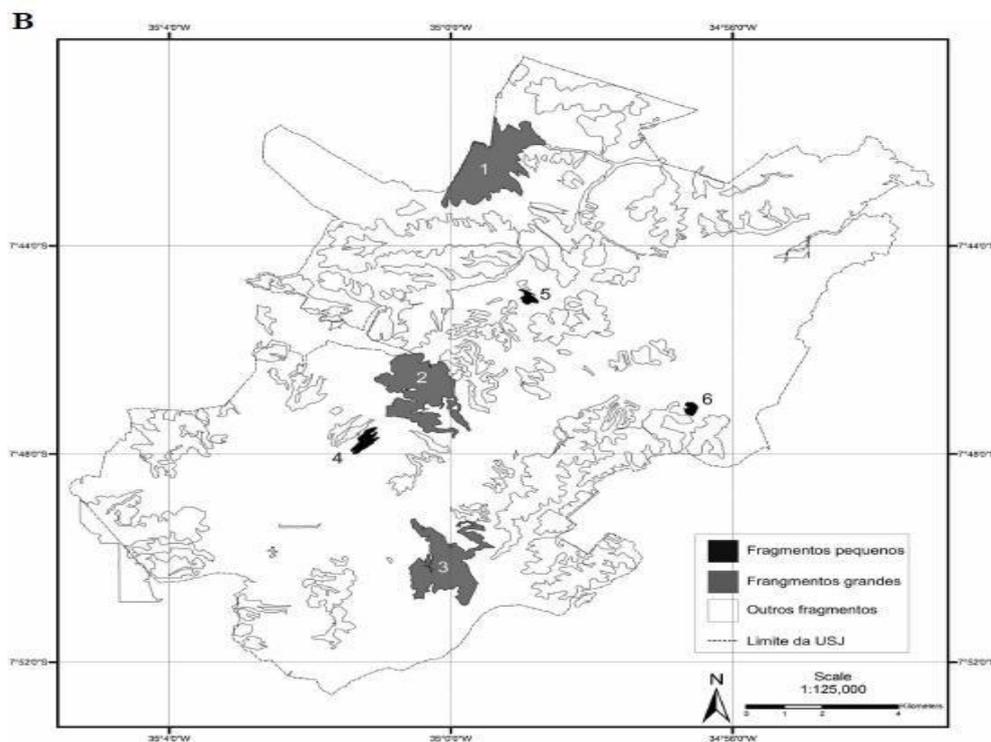
*Ocotea duckei* Vattimo-Gil e *Ocotea glomerata* (Nees) Mez estão entre as espécies que ocorrem nos fragmentos remanescentes da Mata Atlântica no estado de Pernambuco (nordeste do Brasil). Essas espécies são conhecidas localmente como louro pimenta e caneleira, respectivamente.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 ÁREA DE ESTUDO E COLETA

A Usina São José (USJ) localiza-se no município de Igarassu, a 28 km de Recife, na mesorregião da Zona da Mata de Pernambuco, litoral norte do estado, entre as coordenadas 07°41'04,9" e 07°54'41,6" S; 34°54'17,6" e 35°05'07,2" W (Trindade *et al.* 2008). Com uma área total de 248 km<sup>2</sup> e cerca de 100 fragmentos florestais, está entre as usinas que possuem os maiores remanescentes e a maior área absoluta de Floresta Atlântica ao norte do São Francisco (Uchôa Neto, Tabarelli 2002). No entanto, na USJ apenas um fragmento florestal denominado de Reserva Ecológica da Mata da Usina São José, ou Mata de Piedade (Figura 6), é protegido pela Lei Estadual nº 9.989 de 1987 (Santos *et al.*, 2001).

Figura 6 – Fragmento da Mata Piedade localizada na Usina São José.



Fonte: Alves, Araújo (2010).

As coletas foram realizadas durante o período de setembro de 2014 e outubro 2015 e concentrou-se em um fragmento identificado como Piedade com coordenadas geográficas de 7°49'12", 7°50'55" S 35°0'35", 34°59'21" compreendendo uma área 305,787 ha. Foram coletados indivíduos de *Ocotea glomerata* (Figura 7 A e B) e a identificação botânica foi realizada no Herbário do Instituto de Pesquisa Agronômica de Pernambuco (IPA), Brasil, e o voucher (IPA 90.944) da espécie foi depositado no herbário (IPA).

Figura 7 – Árvore (A) e Inflorescência (B) de *Ocotea glomerata* da Mata Piedade (Usina São José).



Fonte: A autora.

### 3.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

O pó das folhas de *O. glomerata* (10 g) foi misturado com 100 mL de uma série eluotrópica de hexano, clorofórmio, acetato de etilo e metanol. Todas as amostras foram submetidas a agitação até à saturação (24 h). Após 24 horas, os solventes foram removidos separadamente e concentradas até à secura num evaporador. O extrato foi

filtrado através de filtro de 0,22  $\mu$ m (tipo GV Millipore) e guardadas a 4 °C para posterior estudo.

### 3.3 OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

Folhas frescas (40 g) previamente trituradas foram submetidas a arraste à vapor por 3 h em aparelho do tipo Clevenger. O óleo essencial foi separado da fase aquosa e, utilizando-se 1 mL de hexano destilado como solvente. O óleo foi, então, seco em sulfato de sódio anidro, filtrado e armazenado a -5°C para posterior análise. Este procedimento foi repetido 3 vezes.

### 3.4 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA DAS PRINCIPAIS CLASSES DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

O método empregado na identificação das principais classes de metabólitos secundários (fenóis, taninos, flavonoides, alcaloides, saponinas, esteroides e triterpenoides) foi o estabelecido por Matos (2009). As frações dos extratos foram aplicadas com auxílio de tubos capilares de vidro em placas cromatográficas de sílica- gel (Macherey-Nagel) de dimensões 5 x 10 cm, formando manchas semelhantes e regulares. Três placas foram eluídas com uma solução de 10% de metanol em clorofórmio (v/v) e as demais placas foram eluídas com 10% de metanol em acetato de etila (v/v) para devida separação dos compostos de cada uma das frações. Após a eluição e secagem, as mesmas foram expostas a luz ultravioleta (UV), sendo registrado os resultados. Cada placa foi borrifada com um dos reagentes de detecção, cuja presença ou ausência do aleloquímico foi identificada pelo aparecimento de coloração específica nas reações.

### 3.5 MICRORGANISMOS TESTES

A atividade antimicrobiana dos extratos de *O. glomerata* foi realizada frente aos seguintes microrganismos obtidos a partir de American Type Culture Collection (ATCC): *C. albicans* (14053), *C. parapsilosis* (22019), *C. krusei* (6258), e isolados clínicos *C. albicans* URM 5901, *C. parapsilosis* 4970 e 7048 e *C. tropicalis* 6551. Todos os isolados foram provenientes da Micoteca URM do Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco.

### 3.6 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM)

As leveduras foram crescidas em meio de cultura Agar Dextrose Sabouraud a 35 °C durante 24 h para as espécies de *Candida*. Foi retirado um inóculo das culturas, suspensos em 5,0 mL de solução salina estéril a 0,085% e colocadas em Vortex por 15 segundos. A densidade celular foi ajustada por espectrofotômetro acrescentando-se solução salina suficiente para obter a transmitância (90) equivalente de uma solução-padrão da escala de McFarland 0,5 em comprimento de onda de 530 nm. Esse procedimento fornece uma suspensão-padrão de levedura contendo  $1 \times 10^6$  a  $5 \times 10^2$  células por mL. A suspensão para os testes foi obtida fazendo-se uma diluição 1/100 em salina seguida de uma diluição de 1/20 em meio de cultura Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI) 1640 tamponado com Ácido 3 – [N-morfino] propanossulfônico (MOPS)

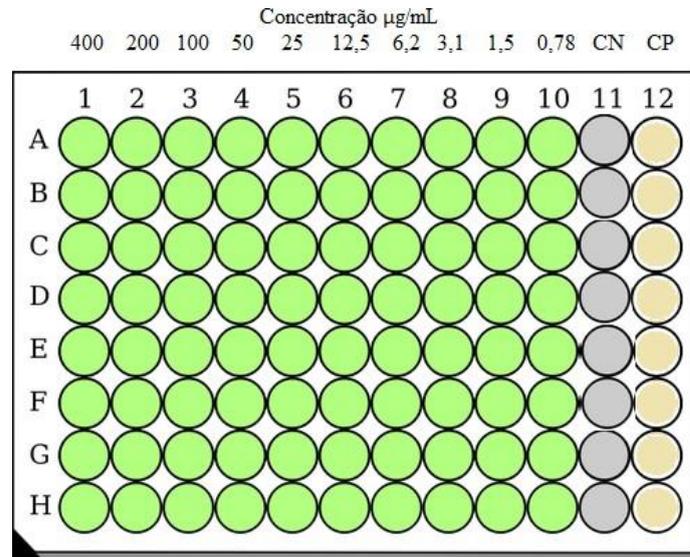
Os testes foram realizados segundo a Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008) de acordo com a norma M27-A3, método de referência a determinação da sensibilidade de leveduras à terapia antifúngica. Foram pesados 80 mg dos extratos de

*O. glomerata* e solubilizados em 0,5 ml de (DMSO). Em seguida, as soluções foram filtradas em filtros de 22 µm de diâmetro para que 10 µl fossem retirados e diluídos em

0,99 ml do meio RPMI 1640 com MOPS obtendo-se ao final uma diluição de 1/100 a uma concentração de 800 µg/mL e DMSO a 1%.

Placas de 96 poços de fundo chato foram previamente preenchidas com 100 µl de meio RPMI 1640 com MOPS. Após isso, 100 µl dos extratos foram adicionados no 1° poço e então homogeneizado e retirado 100 µl para ser colocado no 2° poço de forma que uma diluição seriada de 1/2 fosse feita até o 10° poço. Assim as concentrações dos extratos do 1° ao 10° poço foram: 400; 200; 100; 50, 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,5625; 0,78125 µg/mL. Depois das diluições seriadas, 100 µl da suspensão de células de leveduras foi adicionado a todos os poços. O 12° poço foi usado como controle positivo do teste (Figura 8). Ao final as concentrações dos extratos foram reduzidas novamente pela metade de modo que o 1° poço contivesse uma concentração de 400 µg/ml. As placas foram incubadas a 35 °C.

Figura 8 – Esquema do teste do CIM frente as cepas de *Candida*



Fonte. A autora

A leitura visual dos resultados foi realizada em 24 h para as espécies de *Candida*. Os testes foram realizados em duplicata com três repetições independentes. Após incubação das microplacas, foi realizada a determinação da CFM com o objetivo de avaliar a capacidade do restabelecimento do crescimento fúngico após 48 h de contato com a substância teste. Com o auxílio de alças estéreis, a mistura de cada poço foi repicada em Agar Sabourand Dextrose. As placas foram incubadas à 37 °C por 48 h e após a incubação, foi observado o crescimento ou não das colônias leveduriformes.

### 3.7 TESTE DO SINERGISMO PELA TÉCNICA DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO: *CHECKBOARD*

O teste de “tabuleiro de xadrez” foi baseado no procedimento estabelecido pelo CLSI para microdiluição em caldo para teste de sensibilidade antifúngica (CLSI, 2002). Foram pesados 1,6 mg de antifúngicos (fluconazol, cetoconazol e anfotericina B) para obtenção de uma concentração inicial de 64  $\mu\text{g/mL}$  em meio RPMI 1640 tamponado com MOPS 0,165 M, pH 7,0. Após feitas as diluições dos agentes antifúngicos foi adicionado 100  $\mu\text{g/mL}$  da concentração de 64  $\mu\text{g/mL}$  no poço A1 da placa de 96 poços de fundo chato. Em seguida, foi adicionado 100  $\mu\text{g/mL}$  da concentração de 32  $\mu\text{g/mL}$  no poço B1, depois mais 100  $\mu\text{g/mL}$  da concentração de 16  $\mu\text{g/mL}$  no poço C1 e assim sucessivamente até o poço H1. Preenchidas toda a coluna 1 com suas respectivas concentrações, o método foi repetido até a coluna 10. As colunas 11 e 12 foram utilizadas como controle negativo e positivo, respectivamente. Para o

extrato foi pesado

80 mg para obtenção de uma concentração inicial de 800 µg/mL. As diluições seriadas do extrato foram realizadas diretamente na placa de 96 poços contendo as concentrações dos antifúngicos adicionadas anteriormente. Após a diluição da solução estoque, 100 µL foram retirados e adicionados no poço A1, A2, A3 até o poço A10. Esse procedimento foi realizado de A a H. Em seguida foi adicionado o inóculo ( $1,5 \times 10^5$  UFC ml<sup>-1</sup>) dos fungos testados (*C. albicans* ATCC 14053, *C. krusei* ATCC 6258 e *C. parapsilosis* ATCC 22019) e as placas foram incubadas a 30 °C durante 3 dias.

A fim de avaliar a atividade das combinações de fármacos, índices fracionários de concentração inibidora (IFC) foram calculados como  $IFC^A + IFC^B$ , onde  $IFC^A$  e  $IFC^B$  representam as concentrações mínimas que inibem o crescimento de fungos para fármacos A e B, respectivamente:  $IFC^A = \text{combinação MIC}^A / \text{MIC}^A \text{ sozinho}$  e  $IFC^B = \text{combinação MIC}^B / \text{MIC}^B \text{ sozinho}$ . Um índice de média IFC foi calculado com base na seguinte equação: índice  $IFC = IFC^A + IFC^B$ . Além disso, a interpretação foi feita como se segue: sinérgica (<0,5), aditividade (0,5-1,0), indiferente (> 1) ou antagonista (> 4) (Guerra et al., 2012).

### 3.8 FRACIONAMENTO DO EXTRATO METANÓLICO

O extrato seco (150 mg) foi submetido a fracionamento em cromatografia “flash”, utilizando o equipamento da Biotage Isolera One® com uma coluna Biotage® SNAP KP-SIL C18 33 g com fase móvel H<sub>2</sub>O: MeOH com um gradiente de fase móvel 5%-20% MeOH (3CV), 20%-30% MeOH (1CV), 30%-30% MeOH (1,5CV) 30%-40% MeOH (1CV), 40%-40% MeOH (1,5CV), 40%-50% MeOH (1CV), 50%-50% MeOH

(1,5CV), 50%-100% MeOH (3CV), 100%-100% MeOH (3CV). O fluxo foi constante de 50 mL/min, volume máximo por fração 18 mL e tipo de rack 16x150 mm.

### 3.9 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS DO EXTRATO METANÓLICO E DAS FRAÇÕES POR CLAE

As amostras do extrato metanólico foram pesadas (aproximadamente 2 mg) e diluídas em aproximadamente 2 mL de água. As amostras foram levadas ao banho de ultrassom por 15 min para completa solubilização. A solução obtida foi filtrada em membrana de PVDF com abertura de poro igual a 0,45 µm. A análise foi conduzida em cromatógrafo provido de detector de arranjo fotodiodos (comprimento de onda de 280 nm); pré-coluna de 3,9 µm,

coluna de 250 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro

interno, empacotada com sílica quimicamente ligada a grupo octadecilsilano (5  $\mu\text{m}$ ), mantida à temperatura ambiente (24 °C); fluxo da fase móvel foi de 0,8 mL/minuto. A fase móvel foi constituída por água (ácido trifluoracético 0,05%) como solvente A e metanol (ácido trifluoracético 0,05%) como solvente B, ambos foram desgaseificados em banho de ultrassom e filtrados através de membrana com poro de 0,45  $\mu\text{m}$ . O volume de injeção utilizado foi de 20  $\mu\text{L}$ . A separação foi efetivada utilizando o seguinte gradiente linear: 0-10 min, 10-25% B; 10-20 min, 25-40% B; 20-25 min, 40-

75% B; 25-28 min, 75-10% B; 28-30 min, 75-10% B.

### 3.10 TEMPO DE MORTE

A análise da interferência do extrato metanólico sobre a viabilidade de estirpes fúngicas foi conduzida de acordo com Klepser et al., 1998 com algumas modificações, envolvendo o uso de células viáveis. Para determinar a cinética de morte fúngica, foi selecionada uma estirpe padrão de *C. krusei* ATCC 6258 de acordo com os resultados da CIM. Neste teste, observou-se o comportamento desta cepa de levedura selecionada por 32 h. Preparou-se uma série de tubos de cultura estéril, e adicionou-se 1,5 ml de meio RPMI 1640 contendo o valor da concentração da CIM. Subsequentemente, foram adicionados 0,5 ml da suspensão de levedura ao sistema e seguido de agitação utilizando um Vortex durante 30 s. Os tubos foram incubados a 35 °C por 24 h, o que permitiu coletar alíquotas em diferentes intervalos de tempo (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 28 e 32 h) de exposição. Uma alíquota de 10  $\mu\text{l}$  dos tubos foi retirada e uniformemente estriada na superfície do meio de cultura Sabouraud (SAB). As placas de Petri foram incubadas a 35 °C durante 24-48 h, e durante o tempo de incubação decorrido, a contagem foi realizada por Unidades Formadoras de Colônia (UFC/mL). Os controles para o crescimento de levedura e o padrão antifúngico também foram testados. Todos os testes foram realizados em duplicata.

O limite mínimo de detecção deste método é de 100 UFC/mL. Após o período de incubação, o número de células viáveis foi contado e expresso em Log de UFC/mL. Os resultados foram analisados e representados graficamente, isto é, antimicrobiano por tempo de morte. Análise de dados para o produto de teste foi considerado como mostrando atividade fungicida quando houve uma diminuição maior ou igual a 3  $\log_{10}$  padronizar UFC/mL do inoculo inicial, resultando numa redução de 99,9% ou mais de UFC/mL em 24 h em

comparação com o inoculo inicial. A atividade fungistática foi

considerada como em crescimento inferior a 99,9% ou  $< 3 \log_{10}$  em UFC/mL do inoculo inicial.

### 3.11 TESTE DO ERGOSTEROL

O ergosterol foi preparado no momento da execução do teste de acordo Leite et al. (2015) com modificações, sendo primeiramente triturado, com gral e pistilo de porcelana estéreis. Em seguida, foi dissolvido em DMSO e Tween 80 a 1%, de acordo com a concentração e volume desejado. Para verificar se houve ligação entre os compostos e o esterol da membrana, o experimento foi realizado de acordo com o método descrito por Escalante et al., (2008). Os compostos e os inoculos fúngicos usados foram preparados de acordo com a CLSI assim como os procedimentos para a obtenção das CIMs. O mesmo procedimento foi realizado para a Anfotericina B, cuja interação com o ergosterol de membrana já é conhecida, servindo assim como controle. As placas foram incubadas a 35 °C por 48 h.

### 3.12 TESTE DO SORBITOL

O ensaio foi realizado utilizando um meio com e sem sorbitol (controle) pelo método de microdiluição em caldo segundo a CLSI. Foram pesados 3,2 mg dos extratos e das frações a serem testadas e solubilizados em 250  $\mu$ L de DMSO e pesado 2,9147 g do sorbitol e solubilizado em 20 mL de meio RPMI 1640 tamponado com MOPS obtendo-se uma solução a 0,8 M. O meio RPMI contendo sorbitol foi filtrado e então utilizado para fazer as diluições de 1/100 dos extratos e frações e 1/20 do inoculo fúngico como descrito na norma M27-A2 da CLSI/2002. As placas de 96 poços foram encubadas a 35 °C por 48 h e a leitura dos resultados foram feitas em 2-7 dias.

### 3.13 DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

Para a determinação da viabilidade celular, o isolado de *C. krusei* foi exposto ao extrato metanólico (CIM, 2x CIM e 4x CIM), ao meio de cultura RPMI (controle negativo) e à 4  $\mu$ g/mL anfotericina B (controle positivo). As células tratadas foram incubadas a 35 °C durante 24 h. Posteriormente, alíquotas das células das espécies de *Candida spp.* foram

coletadas nos intervalos de tempo de 3, 6, 12 e 24 h após exposição aos compostos. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, em três experimentos independentes. As células de *Candida* spp. após exposição ao extrato foram marcadas com iodeto de propídeo (PI) e analisadas por citometria de fluxo

(Guava EasyCyte™ Mini System). Para cada experimento, 10.000 eventos foram avaliados. Os detritos celulares foram omitidos da análise (Da silva et al., 2013).

### 3.14 DETECÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO EM CÉLULAS DE *Candida* spp.

Para avaliar as espécies reativas de oxigênio (EROS) geradas intracelularmente foi utilizada a sonda diacetato 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H2DCFDA). Esta sonda reage com diferentes espécies reativas de oxigênio, sendo, no entanto, mais específica para os radicais hidroxila e peróxido de hidrogênio. H2DCFDA se difunde prontamente através da membrana celular e é hidrolisado por esterases intracelulares no composto não fluorescente diclorofluoresceína (DCFH), que, por sua vez, é rapidamente oxidado a um composto altamente fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) (Hempel et al., 1999). A intensidade de fluorescência do DCF é proporcional à quantidade de EROS formado intracelularmente (Lebel, Ischiopoulos, Bondy, 1992).

As células de *Candida* spp. após exposição ao extrato metanólico foram incubadas com H2DCFDA (20 µM) (Sigma, USA) por 30 min no escuro a 37 °C. Em seguida, as células foram lavadas e ressuspensas em PBS e analisadas por citometria de fluxo (Da silva et al., 2013; Neto et al., 2014).

### 3.15 DETERMINAÇÃO DA EXTERNALIZAÇÃO DE FOSFATIDILSERINA

A externalização da fosfatidilserina (OS) é um marcador de estágios iniciais de apoptose, que pode ser detectado por marcação com Anexina V, que se liga à fosfatidilserina com alta afinidade na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  (Parolin; Reason, 2001; Martin et al., 1995). Ao conjugar a Anexina V ao FITC (Isotiocianato de fluoresceína) é possível identificar e quantificar as células apoptóticas diferenciando-as das células necróticas (PI). Assim, a detecção da externalização da fosfatidilserina foi realizada utilizando-se anexina V fluorescente e PI.

As células de *Candida* spp., após exposição ao extrato metanólico foram coletadas por

centrifugação e digeridas com Zymolyase 20T (2 mg/mL) (Seikagaku Corporation, Japão) em tampão fosfato de potássio (PPB) (1 M, pH 6,0) durante 2 horas a 30 °C. Os protoplastos de *Candida* spp. foram ressuspensos em uma solução contendo anexina V-FITC (Guava Nexin Kit, Guava Technologies, Inc., Hayward, CA, USA) e PI (Sigma, USA) na ausência de luz e a 37 °C. Após 20 min. as suspensões foram analisadas por citometria de fluxo. Para cada 48 experimento, 10.000 eventos foram

avaliados, e os restos celulares foram omitidos da análise (Da Silva et al., 2013; Neto et al., 2014).

### 3. 16 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DO ÓLEO ESSENCIAL

A análise cromatográfica foi realizada num cromatógrafo gasoso Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) equipado com detector de ionização em chama (FID), injetor *split/splitless* e coluna capilar HB-5 (30 m x 0.25 mm; 0.25 µm). A rampa de temperatura do forno foi ajustada para 40 °C por 2 min, 4 °C/min até 230 °C e nitrogênio foi utilizado como gás de arraste. Ambos injetor e detector foram mantidos a 250 °C e as amostras de óleo essencial foram injetadas em modo *splitless*. Amostras do óleo essencial foram submetidas a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) num Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA) series 5975C equipado com um analisador quadrupolo numa coluna capilar de sílica fundida Agilent J & W non-polar DB-5 (60 m x 0.25 mm i.d. 0.25 µm). A rampa de temperatura utilizada foi ajustada para 40 °C por 2 min, 4 °C/min até 230 °C. Hélio foi utilizado como gás de arraste e a pressão do sistema foi mantida em 100 kPa. O injetor foi mantido a 250 °C no modo *split* (1:20) e o detector foi mantido a 280 °C. O potencial de ionização foi ajustado para 70 eV com espectro de massas na faixa de 20-350 m/z com 0.5 scans/s (Austran et al., 2009).

### 3.17 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPONENTES DO ÓLEO ESSENCIAL

Os componentes foram identificados utilizando seus índices de retenção, obtidos por co-injeção do óleo essencial com uma série homóloga de hidrocarbonetos (C8-C30), calculados na equação de van Den Dool and Kratz (1963) e comparados com a literatura e outros dados publicados. A composição foi quantificada por Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização de Chamas (GC-FID) e expressa em porcentagem segundo sua área relativa em quadruplicata, calculando-se também o respectivo desvio padrão.

### 3.18 ANÁLISE DOS DADOS

Os dados obtidos foram analisados a partir da média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M) de 3 experimentos independentes. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre as concentrações usadas, os dados foram comparados por meio de

análise de variância (ANOVA) seguidos pelo Student Newman Keuls ( $p < 0,05$ ), utilizando o programa Prism versão 5.01 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 PERFIL FITOQUÍMICO

O resultado do perfil fitoquímico (Tabela 1) dos extratos bem como das frações do extrato metanólico (FEM) das folhas de *O. glomerata* demonstrou a presença de flavonoides, triterpenos e esteroides, alcaloides, saponinas e açúcares. As plantas e os seus derivados são importantes materiais em investigações farmacológicas devido ao seu grande potencial como fontes para uma variedade de substâncias biologicamente ativas utilizadas no desenvolvimento de medicamentos. Entre estes produtos, encontram-se os flavonoides, que são considerados como antimicrobianos constitutivos, especialmente aqueles pertencentes a flavonoides prenilados, flavonas e isoflavonas (Leite et al., 2014). A atividade antibacteriana dos flavonoides tem sido documentada em estudos anteriores (Liu et al., 2010) Os flavonoides têm múltiplos alvos celulares e podem atuar na síntese de ácido nucleico, membrana citoplasmática, ou inibidor do metabolismo energético. Além disso, os flavonoides são compostos bacteriostáticos, que induzem a formação de agregados bacterianos, reduzindo assim o número de colônias viáveis (Cushnie; Lamb, 2005).

Atividade antimicrobiana de saponinas, também, é relatada e geralmente está relacionada com a aglicona (Hassan et al., 2010,). Terpenóides são as maiores e mais diversificadas classe de compostos de plantas e têm diversos papéis funcionais no metabolismo e nas interações ecológicas (Trapp; Croteau, 2001). Estes produtos são solúveis em solvente não polar e têm mostrado muitas atividades biotecnológicas, entre estas atividades contra bactérias e fungos (Popova et al., 2009).

Tabela 1 – Perfil fitoquímico dos extratos e frações do extrato metanólico (FEM) de *O. glomerata*.

<b>Metabolitos</b>	<b>Hexânico</b>	<b>Cloroformico</b>	<b>AcOEt</b>	<b>Metanólico</b>	<b>F1</b>	<b>F2</b>	<b>F3</b>	<b>F4</b>	<b>F5</b>
Taninos hidrolisáveis	-	-	-	-	-	-	-	-	-
inos condensáveis	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Flavonoides	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Triterpernos e esteroides	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Saponinas	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Alcaloides	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Açúcares	+	+	+	+	+	+	+	+	+

AcOEt – Acetato de etila; FEM1 – Fração 1; FEM2 – Fração 2; FEM3 – Fração 3; FEM4 – Fração 4; FEM5- Fração 5.

#### 4.2 ATIVIDADE ANTI-*Candida*

Ao longo dos últimos anos, extratos de origem vegetal e fitoquímicos relacionados ganharam uma atenção especial por pesquisadores científicos, devido aos seus efeitos de cura contra diversas doenças (Romero et al., 2013); estudos envolvendo a elucidação dos seus mecanismos de ação, incluindo farmacocinética e farmacodinâmica, foram também realizados (LOPES et al., 2013). Nas últimas duas décadas, entre as suas propriedades fitoterápicas, o potencial antimicrobiano, entre estes, efeitos anti-*Candida*, tem merecido uma atenção particular.

Os extratos de *O. glomerata* mostraram atividade anti-*Candida* (Tabela 2 e Tabela 3), com inibições do crescimento fúngico variadas de acordo com a estirpe de *Candida*, destacando-se o extrato de metanólico, o qual apresentou inibição contra a estirpe de *C. albicans* 5901 na concentração de 6,25 µg/mL, indicando o potencial promissor deste extrato como antifúngico.

Tabela 2 – Concentração Inibitória Mínima ( $\mu\text{g/mL}$ ) dos antifúngicos sintéticos, extratos e frações ativas do extrato metanólico de *O. glomerata*.

	<i>C. albicans</i>		<i>C. parapsilosis</i>		<i>C. tropicalis</i>	<i>C. krusei</i>	
	ATCC 14053	URM 5901	ATCC 22019	URM 4970	URM 7048	URM 6551	ATCC 6258
Hexânico	*	*	*	*	400	100	*
Cloroformico	*	400	200	100	100	*	100
AcOEt	*	200	*	400	100	*	100
Metanólico	400	6,25	6,25	12,5	6,25	*	3,12
F1	*	*	400	400	400	200	200
F2	*	*	*	*	*	*	*
F3	*	*	*	*	*	*	*
F4	*	*	*	*	*	*	*
F5	400	400	400	400	50	200	25
FLC	C	16	1	8	4	1	NA
CET	0,06	*	0,06	0,06	8	0,06	2
ANF	0,06	0,25	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06

\* Não inibição; NA – Não analisada; AcOEt – acetato de etila; FEM1 – Fração 1; FEM2 – Fração 2; FEM3 – Fração 3; FEM4 – Fração 4; FEM5- Fração 5; FLC – Fluconazol; CET – Cetoconazol; ANF – Anfotericina B.

Tabela 3 – Sensibilidade antifúngica (MIC<sub>50</sub>) sobre espécies de *Candida*. Valores são representados em µg/mL.

	<i>C. albicans</i>		<i>C. parapsilosis</i>			<i>C. tropicalis</i>	<i>C. krusei</i>
	ATCC 14053	URM 5901	ATCC 22019	URM 4970	URM 7048	URM 6551	ATCC 6258
Hexânico	*	*	400	400	-	-	200
Cloroformico	*	-	-	-	-	400	-
AcOEt	100	-	50	-	-	100	-
Metanólico	-	-	-	-	-	3,12	-
F1	*	*	200	200	200	200	100
F2	*	*	*	*	*	*	*
F3	*	*	*	*	*	*	*
F4	*	*	*	*	*	*	*
F5	25	100	100	100	6,25	200	6,25
FLC	0,06	*	0,06	0,06	8	0,06	2
CET	0,06	*	0,06	0,06	8	0,06	2
ANF	0,06	0,25	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06

\* Não MIC<sub>50</sub>; Não analisada; AcOEt – acetato de etila; FEM1 – Fração 1; FEM2 – Fração 2; FEM3 – Fração 3; FEM4 – Fração 4; FEM5- Fração 5; FLC – Fluconazol; CET – Cetoconazol; ANF – Anfotericina B.

Diante da linhagem de *C. albicans* ATCC 14053 apenas o extrato metanólico apresentou atividade fungicida na concentração de 400 µg/mL. Em relação à *C. tropicalis* o extrato hexânico apresentou atividade fungicida com CIM de 100 µg/mL, enquanto os demais extratos testados apresentaram apenas atividade fungistática. Segundo Forastieiro et al., (2013) embora apresente a capacidade de disseminações invasivas, *C. tropicalis* é geralmente suscetível a todos os antifúngicos, todavia, vários casos de resistência cruzada entre fluconazol e outros derivados de azóis em isolados clínicos foram relatados, especialmente na região da Ásia-Pacífico. Por outro lado, a resistência à anfotericina B exercida por esta espécie é considerado rara.

Em relação a linhagem de *C. krusei* o extrato hexânico apresentou atividade fungistática na concentração de 200 µg/mL, o extrato clorofórmico e acetato de etila apresentaram atividade fungicida na concentração de 200 µg/mL e o metanólico na concentração de 3,12 µg/mL. Esta espécie emerge nos últimos anos como um fungo oportunista de alto grau de complexidade na terapêutica antifúngica frente aos pacientes infectados, principalmente em imunocomprometidos. A resistência intrínseca ao fluconazol e o aumento do índice de ineficiência da anfotericina B apresentada em casos de infecções por *C. krusei* é um fator preocupante, neste sentido a busca por novas abordagens medicamentosas que promovam a inibição do fungo em questão é de extrema relevância (Li et al., 2014).

Ao investigar as atividades dos extratos frente as cepas de *C. parapsilosis*, o extrato hexânico apresentou atividade fungistática para duas linhagens e o extrato clorofórmico atividade fungicida com concentrações de 100 µg/mL, 200 µg/mL e 100

µg/mL para *C. parapsilosis* 4970, *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. parapsilosis* 7048, respectivamente. O extrato de acetato de etila apresentou atividade fungicida para *C. parapsilosis* 7048 (100 µg/mL). Destaca-se mais uma vez o extrato metanólico que apresentou atividade fungicida para as três linhagens com CIM de 12, 5 µg/mL para *C. parapsilosis* 4970, CIM de 6,25 µg/mL para *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. parapsilosis* 7048.

A literatura não apresenta uma classificação consensual em relação aos valores de CIM obtida por produtos naturais. Aligiannis et al. (2001) consideram CIMs com valores iguais ou menores que 500 µg/mL como inibidores potentes; CIMs entre 600 e 1500 µg/mL como inibidores moderados e CIMs acima de 1600 µg/mL como inibidores fracos. Webster et al., (2008) estabeleceram como satisfatório o valor de CIM igual ou

menor que 1000 µg/mL. Neste sentido, os resultados reportados nesta investigação mostram-se promissores, uma vez que estão abaixo do estabelecido por estes autores.

Os fármacos utilizados na terapêutica antifúngica apresentam importantes efeitos colaterais. O fluconazol, um dos controles positivos utilizados na determinação da CIM deste estudo, é um antifúngico triazólico de amplo espectro com atividade fungistática tempo-dependente. O tratamento utilizando esse fármaco requer que a concentração sérica do mesmo se mantenha em níveis mais elevados no organismo, acima da CIM, na maior parte do intervalo de dosagem. Clinicamente falando, o uso indiscriminado deste fármaco pode levar a reações adversas significativas, sendo que a mais importante destas é hepatotoxicidade, onde o espectro de toxicidade pode variar de leve elevações transitórias dos níveis de transaminases à hepatite, colestase e insuficiência hepática fulminante (Ben-Ami et al., 2012). Neste estudo, tais cepas empregadas mostraram-se sensíveis a esse fármaco em CIM elevado, o que mostra a importância de todos os resultados de CIM obtidos com o extrato vegetal.

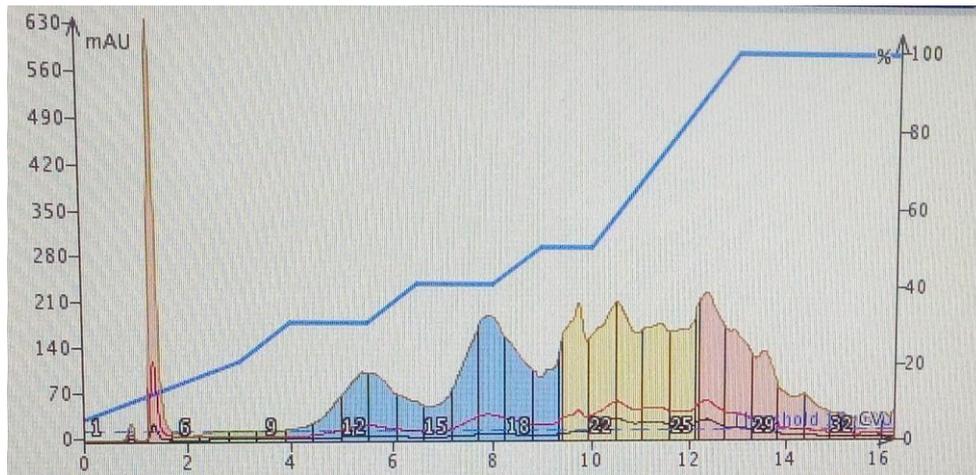
O fármaco anfotericina B, também utilizado como controle positivo nesta investigação, apresentou atividade contra todas as cepas testadas em baixas concentrações. Todavia, embora os resultados tenham sido promissores, o uso deste fármaco na terapêutica clínica de doenças oportunistas está associado a efeitos adversos como a nefrotoxicidade e febre com calafrios, reação aguda à infusão intravenosa, já que os parâmetros farmacocinéticos deste fármaco não permitem a administração oral (Klepser, 2011).

A investigação de novas moléculas com perfil antifúngico frente a cepas leveduriformes não-albicans classifica-se como uma abordagem de extrema importância para a pesquisa farmacêutica que busca a manutenção e bem estar da saúde do homem moderno, visto que a incidência de infecções por espécies deste perfil encontram-se em expansão nos últimos anos, o que se classifica como um fator de risco devido ao índice de resistência intrínseca aos fármacos empregados na prática clínica, principalmente ao fluconazol (Deorukhkar; Saini, 2013). Portanto, na triagem antifúngica deste estudo os resultados encontrados na determinação da CIM mostraram-se inovadores, visto que o extrato metanólico apresentou capacidade inibitória frente a todas as cepas empregadas. Diante dos valores da CIM, o extrato metanólico apresentou um elevado potencial de atividade anti-*Candida*. O extrato foi fracionado com uma fase móvel de H<sub>2</sub>O: MeOH (90%-20%) em cromatografia flash onde foram obtidas cinco frações separadas por seus espectros (faixa de absorção do pico) representados por uma

coloração específica (Figura 9). A eficiência da separação está relacionada com o tamanho da partícula e o tamanho da coluna.

A fração 1 (FME1) compreende dos pontos 1 ao 4, a fração 2 (FME2) os pontos 5 ao 11, a fração 3 (FME3) os pontos 12 ao 20, a fração 4 (FME4) os pontos 21 ao 26 e a fração 5 (FME5) que compreende dos pontos 27 ao 33.

Figura 9 – Frações do extrato metanólico de *O. glomerata*



Fonte. A autora

As 5 frações obtidas a partir do extrato metanólico por cromatografia flash foram utilizadas para um novo teste de CIM frente as cepas de *Candida* testadas anteriormente. Os dados descritos nas tabelas 2 e 3 demonstram que apenas as frações FME1 e FME5 apresentaram atividade fungicida e fungistática. Destacando a atividade frente a *C. krusei* com CIMs de 200  $\mu\text{g/mL}$  e 25  $\mu\text{g/mL}$  para FME1 e FME5, respectivamente. Esses dados sugerem que ao fracionar o extrato metanólico há separação dos compostos que possuem atividade antifúngica resultando num aumento da CIM ou ausência de atividade.

#### 4.3 ANÁLISE “CHECKBOARD”

Para além das suas propriedades antimicrobianas inerentes, produtos naturais e seus derivados podem alterar o efeito de agentes antifúngicos padrão (aqueles utilizados na prática clínica). A utilização de combinações de dois ou mais antifúngicos pode levar a uma redução nas dosagens necessárias de drogas e diminuir o perfil de eventos adversos normalmente produzido (Castro, 2010).

Uma das formas de se avaliar *in vitro* a possibilidade de interações sinérgicas, aditivas ou antagonicas entre antifúngicos frente a cepas microbianas é por meio do ensaio “*checkboard*”. (Lewis et al., 2002).

Diante dos valores da CIM avaliados, o extrato metanólico apresentou um elevado potencial de atividade fungicida em relação a outros extratos obtidos. Nesse sentido, esse extrato foi utilizado para avaliação do efeito sinérgico com os antifúngicos estudados.

Na tabela 4 observa-se o efeito para combinação do extrato metanólico de *O. glomerata* com os agentes antifúngicos. Efeitos aditivos foram observados para as combinações do extrato com cetoconazol e fluconazol para *C. parapsilosis* e do extrato com cetoconazol para *C. albicans*; enquanto, a combinação do extrato com cetoconazol e do extrato com fluconazol apresentaram efeito sinérgico para *C. krusei* e *C. albicans*. As combinações de extrato com anfotericina B apresentaram efeito indiferente contra as linhagens testadas, ou seja, o extrato metanólico nem potencializa e nem antagoniza o efeito da anfotericina B. O fato do extrato metanólico não ter apresentado nenhum tipo de associação com a anfotericina B tende a reforçar a possibilidade de que este monoterpene apresenta um mecanismo de ação distinto ao deste antifúngico frente às leveduras do gênero *Candida*.

De acordo com os resultados da tabela 4 a adição do extrato metanólico de *O. glomerata* com os antifúngicos resultou em uma redução dos CIM de cetoconazol em todas as linhagens de *Candida*. A CIM para anfotericina B diminuiu para *C. krusei* de 0,06 a 0,03 µg/mL. Além disso, a CIM de fluconazol diminuiu de 1 a 0,06 µg/mL e de 16 a 0,12 µg/mL para *C. parapsilosis* e *C. albicans*, respectivamente. Uma vez que houve um aumento da morte fúngica em menores concentrações dos antifúngicos, o extrato metanólico de *O. glomerata* modula positivamente a ação *in vitro* dos antifúngicos e as combinações com efeitos sinérgicos, sugerindo o uso futuro como agente adjuvante para esses medicamentos.

Vários trabalhos foram feitos em diferentes combinações de antifúngicos com extratos de plantas, mas combinações de um extrato metanólico de *O. glomerata* com drogas sintéticas contra linhagens de *Candida*, são relatados aqui pela primeira vez.

Tabela 4 – CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) e FIC index de drogas antifúngicas e efeito de combinação com o extrato metanólico de *Ocotea glomerata*.

Antifúngicos	<i>C. albicans</i> (ATCC 14053)		<i>C. krusei</i> (ATCC 6258)		<i>C. parapsilosis</i> (ATCC 22019)	
	CIM	FIC index	CIM	FIC index	CIM	FIC index
EM	400		3.12		6.25	
Anfotericina B	0.06		0.06		0.06	
Cetoconazol	0.06		2		0.06	
Fluconazol	16		NA	NA	1	
EM/Anfotericina B	12.5/0.06	1.03 (I)	1.56/0.03	1 (I)	3.12/0.06	1.5 (I)
EM/Cetoconazol	6.25/0.03	0.51 (A)	0.78/0.03	0.26 (S)	0.78/0.03	0.62 (A)
EM/Fluconazol	6.25/0.12	0.02 (S)	NA	NA	3.12/0.06	0.56 (A)

Extrato metanólico – EM; NA – Não Analisada; FIC index - Tipo de interação (I = indiferente; A = aditivo e S = sinérgico).

#### 4.4 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPONENTES DO EXTRATO METANÓLICO E DAS FRAÇÕES DE *Ocotea glomerata*

Os cromatogramas obtidos para o extrato metanólico e frações de *O. glomerata*, com os espectros de varredura correspondentes aos picos principais/majoritários a 280 nm e 350 nm. Estão apresentados nas Figuras 10 a 15. Para o extrato metanólico foi observado a presença de derivados cinâmicos no pico 1 e flavonoides nos picos 9 e 15 (Figura 10). Na fração 1 (Figura 11) observou-se a presença de ácido gálico no pico 2 e de flavonoides no pico 4 correspondendo ao pico 9 do extrato metanólico indicando que houve fracionamento do extrato. Na fração 2 (Figura 12) há presença de derivados cinâmicos nos picos 1, 2 e 5 e presença de flavonoides nos picos 3 e 7.

Na fração 3 (Figura 13) há presença de derivados cinâmicos no pico 1 e flavonoides no pico 4. Na fração 4 (Figura 14) todos os picos são flavonoides, bem como, na fração 5 (Figura 15) os picos 1 e 2 também são flavonoides. Os picos 1 e 2 correspondem aos picos 9 e 15 do extrato metanólico, respectivamente. Esses dados podem justificar a CIM das frações 1 e 5 a qual foram bioativas para as espécies de *Candida* avaliadas pois apresentam compostos que estão presentes no extrato metanólico.

Figura 10 – Cromatogramas do extrato metanólico de *Ocotea glomerata* a 280 nm. (A) Picos obtidos em todo extrato metanólico; (B) Pico 2 – Derivados Cinâmicos; (C) Pico 9 – Flavonóides; (D) Pico 15 – Flavonóides.

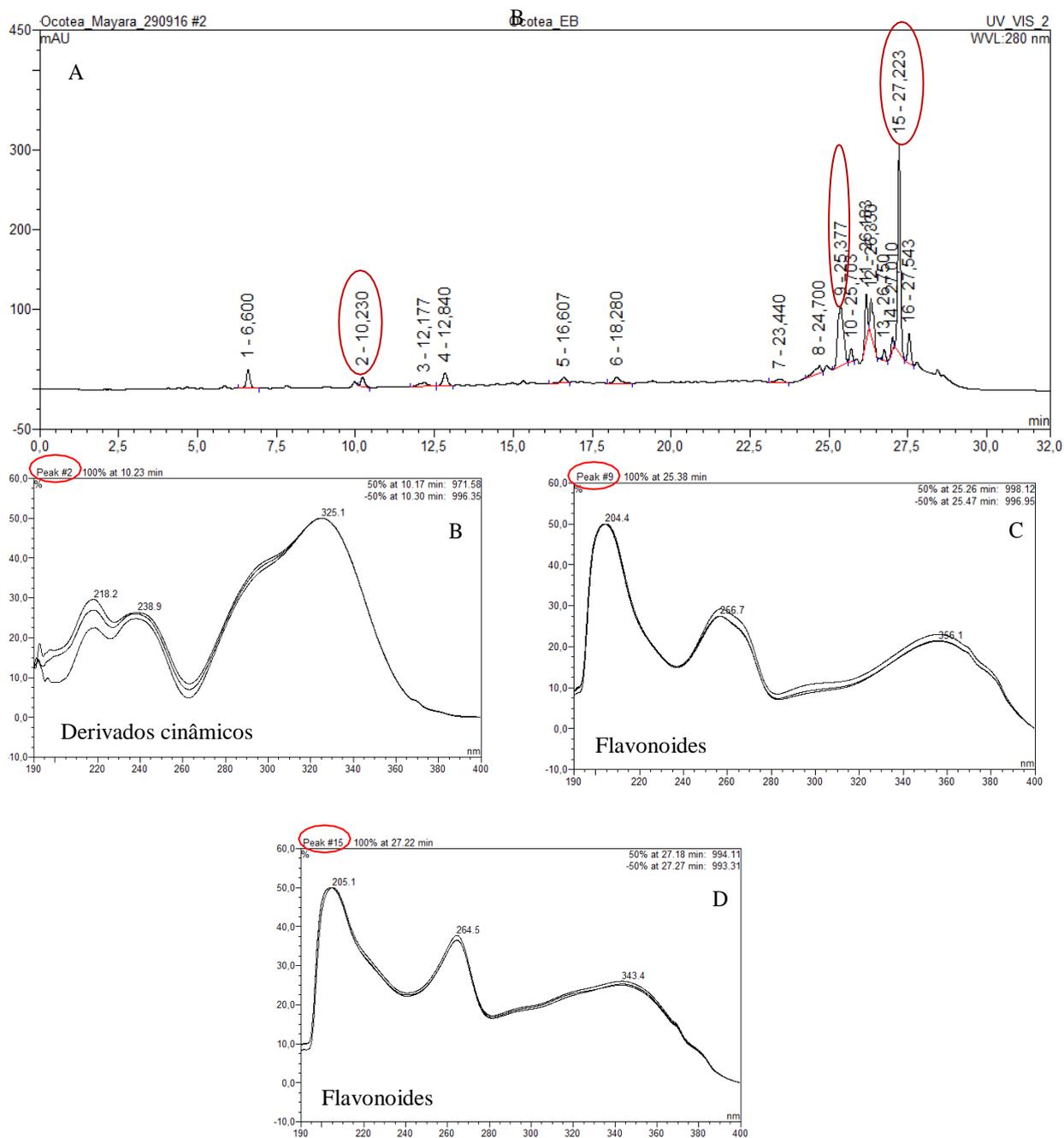


Figura 11 – Cromatogramas da fração 1 obtida por cromatografia em flash do extrato metanólico de *Ocotea glomerata* a 280 nm (A) Picos obtidos em toda a fração 1; (B) Pico 1; (C) Pico 2; (D) Pico 4.

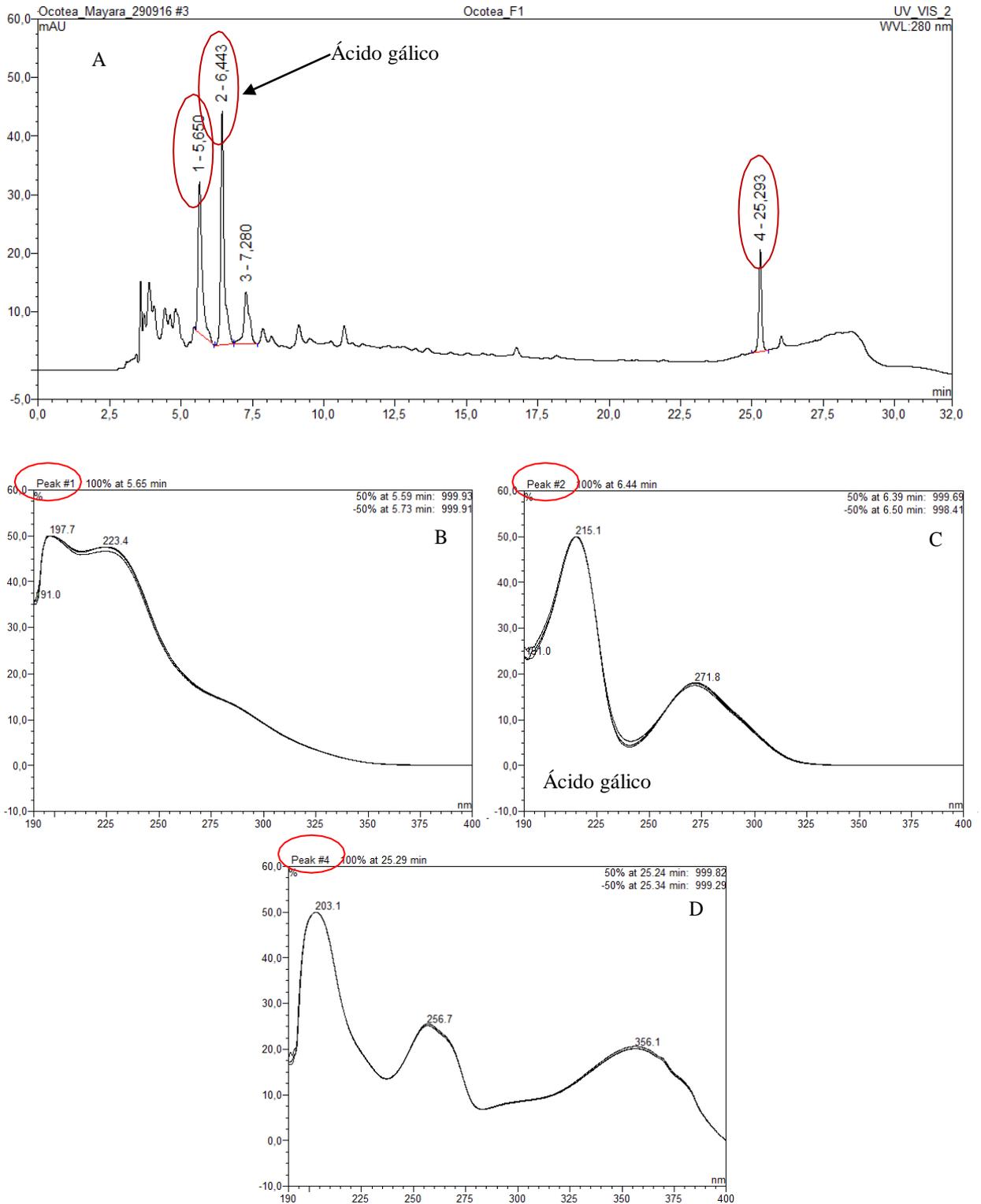


Figura 12 – Cromatogramas da fração 2 obtida por cromatografia em flash do extrato metanólico de *Ocotea glomerata* a 280 nm (A) Picos obtidos em toda fração 2; (B) Pico 1; (C) Pico 2; (D) Pico 3; (E) Pico 4; (F) Pico 5; (G) Pico 7.

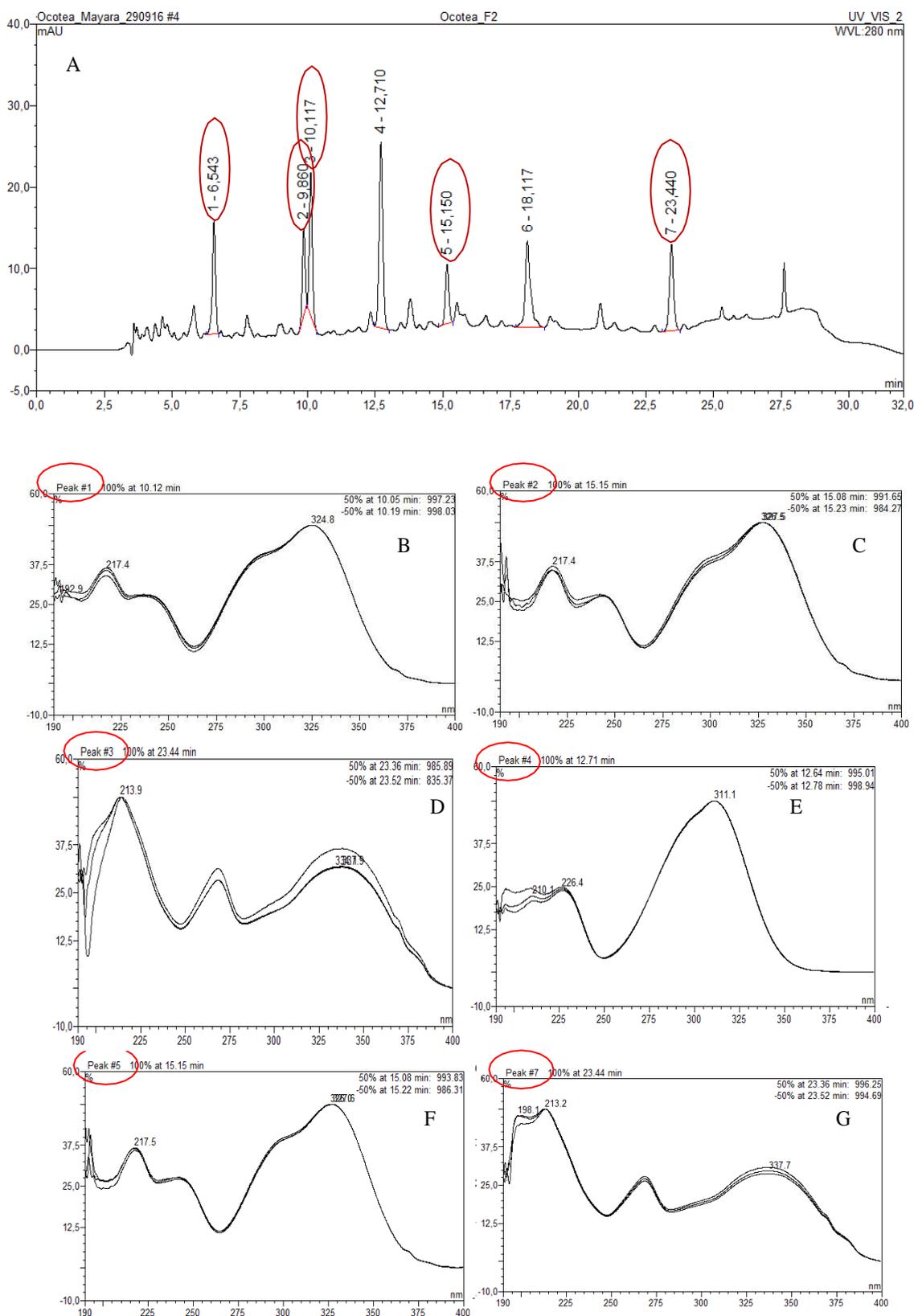


Figura 13 – Cromatogramas da fração 3 obtida por cromatografia em flash do extrato metanólico de *Ocotea glomerata* a 350 nm (A) Picos obtidos em toda fração 3; (B) Pico 1; (C) Pico 4.

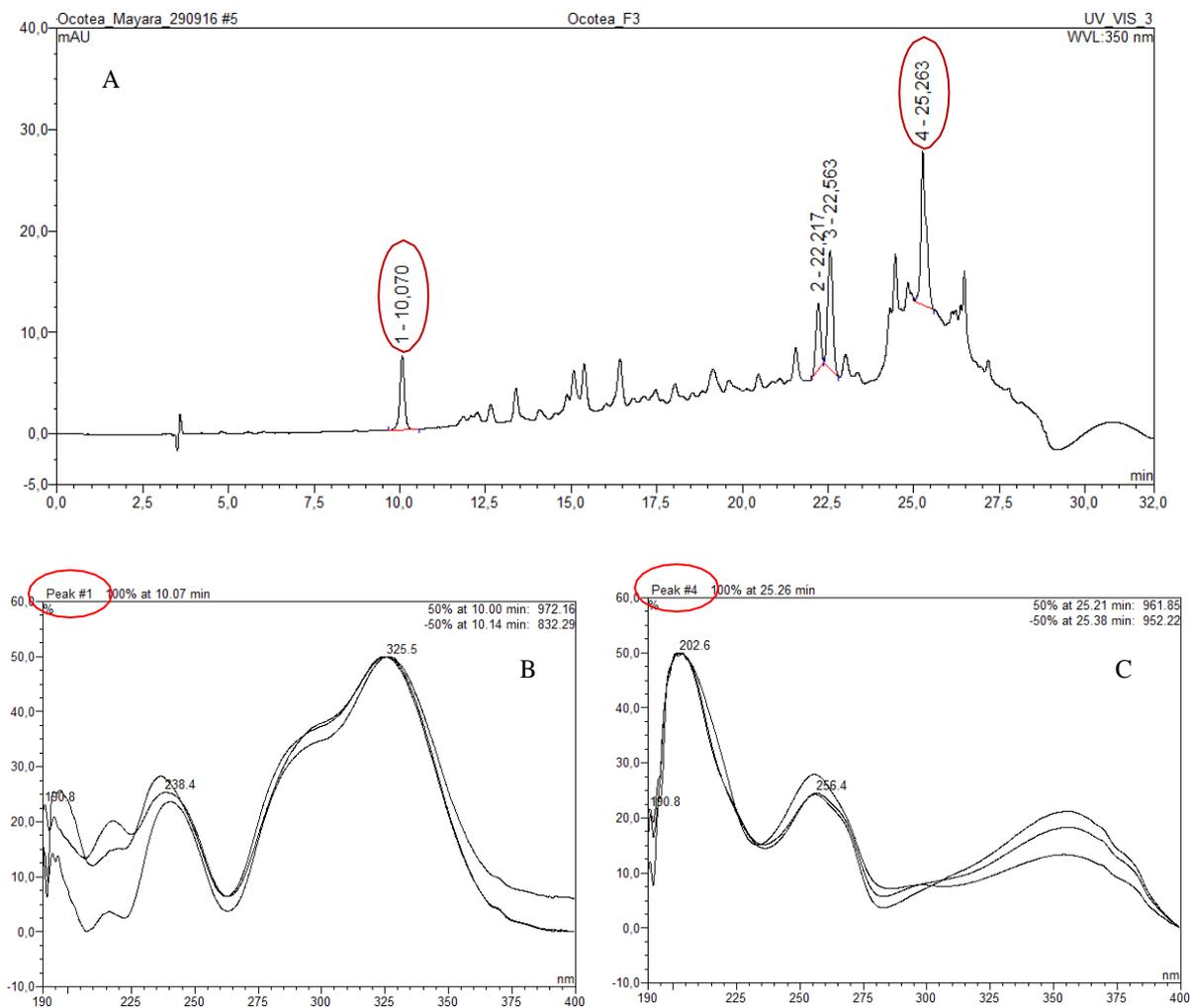


Figura 14 – Cromatogramas da fração 4 obtida por cromatografia em flash do extrato metanólico de *Ocotea glomerata* a 350 nm. (A) Picos obtidos em toda fração 4; (B) Pico 1 – Flavonóides; (C) Pico 2 – Flavonóides; (D) Pico 3 – Flavonóides; (E) Pico 4 – Flavonóides.

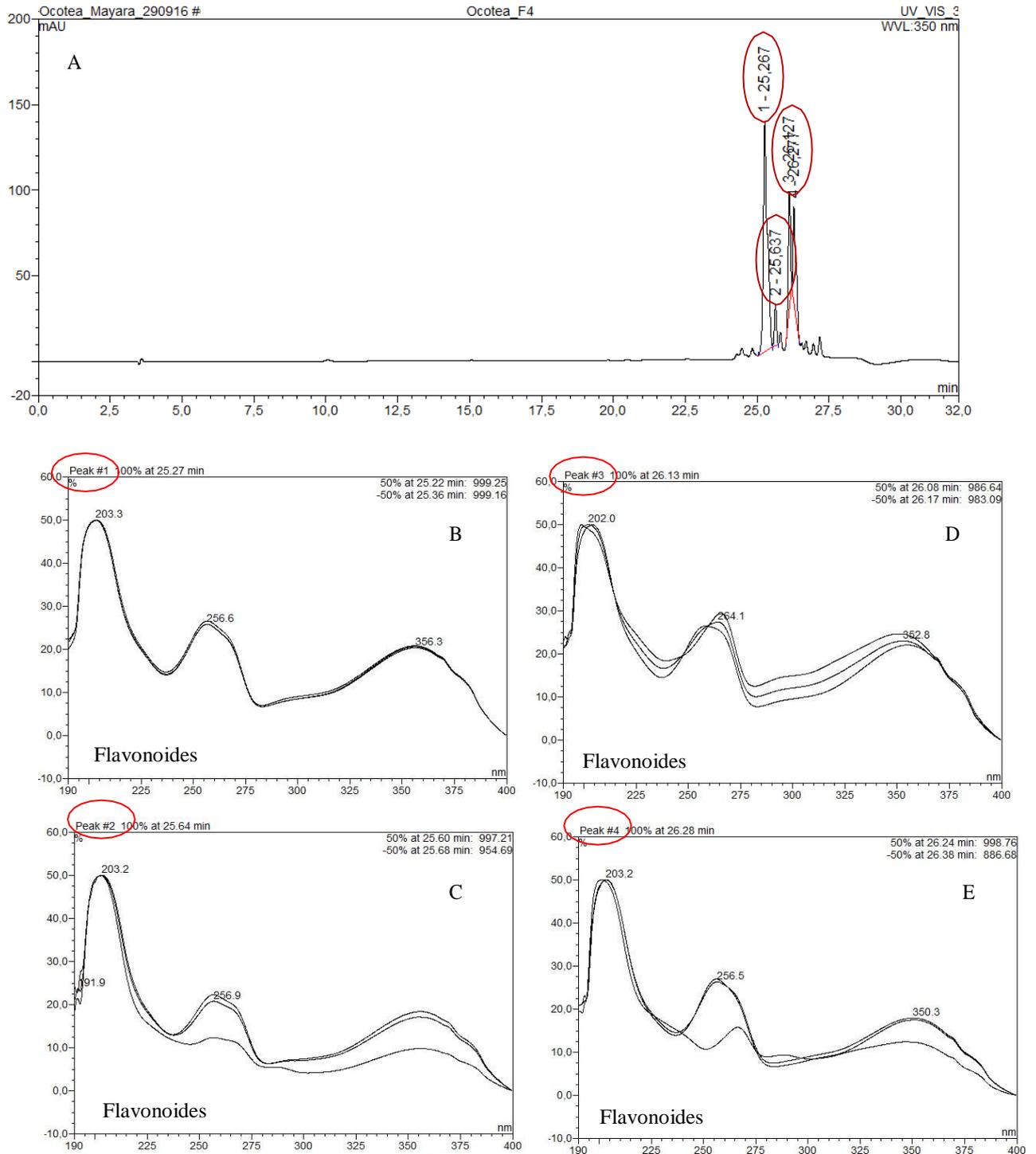
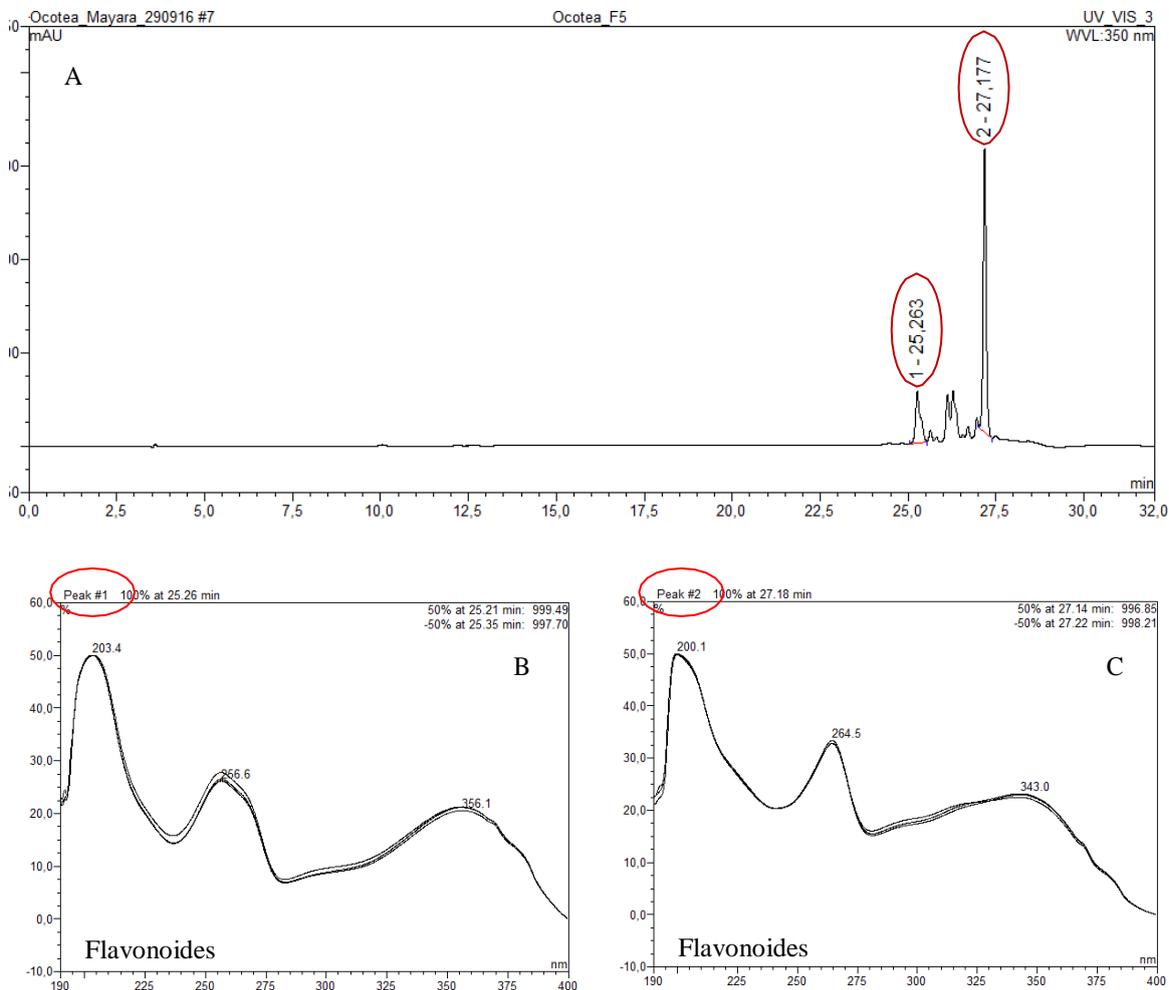


Figura 15 – Cromatogramas da fração 5 obtida por cromatografia em flash do extrato metanólico de *Ocotea glomerata* a 350 nm. (A) Picos obtidos em toda fração 5; (B) Pico 1 – Flavonóides; (C) Pico 2 – Flavonóides.



Na pesquisa de novos medicamentos fitoterápicos, os flavonoides presentes nas plantas medicinais são considerados como fortes agentes terapêuticos em casos de doenças de origem microbiana, além disso, atividades antivirais, antiproliferativas, antimutagênicas, antitrombótica e antioxidante também são atribuídas a estes compostos (Orhan et al., 2010). Neste sentido, a presença de compostos fenólicos em espécies da família Lauraceae se caracteriza como um modelo promissor na avaliação de mecanismos envolvidos na atividade antimicrobiana. Em relação aos efeitos antimicrobianos exercidos pelos flavonoides, as ações resultam de uma interação destes compostos com a membrana celular dos micro-organismos alvo, provavelmente devido à sua capacidade de complexar com proteínas extracelulares e com a parede celular (Savoia, 2012).

#### 4.5 EFEITOS SOBRE A CINÉTICA DE CRESCIMENTO (TEMPO DE MORTE)

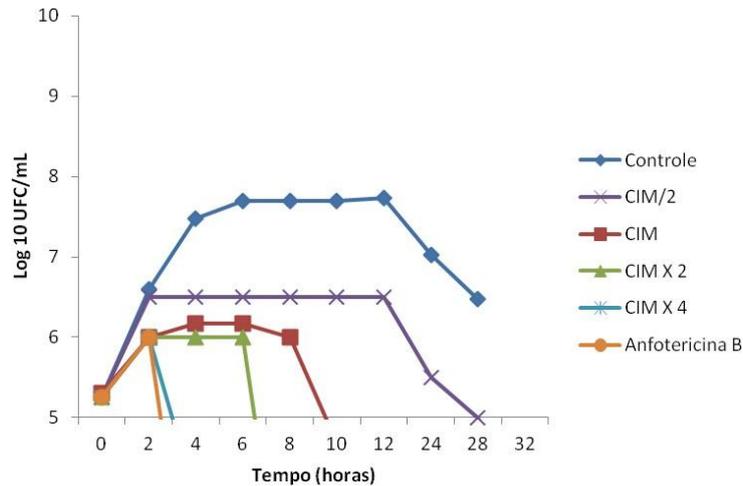
A capacidade de um composto inibir o crescimento de um microrganismo é uma etapa fundamental na elucidação do potencial antimicrobiano do mesmo. O ensaio *Time-Kill* (tempo de morte) é um método empregado para se determinar o tempo em que a substância-teste impede o desenvolvimento do microrganismo a ser testado. Ele fornece a dinâmica de ação desta substância e sua interação com o tempo, sendo assim, fornece a informação necessária de quanto tempo é preciso para realizar-se a administração do antibiótico novamente. Normalmente, as investigações de novos compostos antimicrobianos utilizam este método de análise para complementar os resultados obtidos na determinação da CIM do composto avaliado (Nóbrega et al., 2013).

Várias espécies de *Candida* foram testadas frente ao extrato metanólico sendo este mais bioativo para a cepa de *C. krusei* ATCC 6258 a qual foi submetida ao experimento de tempo de morte (Figura 16).

A figura mostra o  $\text{Log}_{10}$  de UFC/mL ( $\text{Log}_{10}\text{UFC/mL}$ ) em função do tempo de exposição na ausência do extrato (controle), na presença do extrato metanólico (CIM/2, CIM, CIM x 2, CIM x 4) e na presença de anfotericina B (antifúngico padrão). Observa-se que tanto na CIMx2 quanto na CIMx4, após quatro horas, reduziram o inóculo microbiano em mais de 3 escalas logarítmicas. Confirmando as análises de CFM, o extrato metanólico possui a capacidade de promover a morte dos microrganismos. A CIM por sua vez reduziu estes inóculos em de 3  $\text{Log}_{10}\text{UFC/mL}$  a partir de aproximadamente 10 horas de contato. Uma

redução maior ou igual a 3 Log<sub>10</sub>UFC/mL a partir do inoculo inicial indica uma ação fungicida do agente, caso a redução seja menor o agente antifúngico tem uma ação fungistática.

Figura 16 - Curva de morte microbiana da cepa de *C. krusei* ATTC 6258, sob ação da anfotericina B e de diferentes concentrações do extrato metanólico de *Ocotea glomerata*.



Com base nestes dados pode-se verificar que o extrato metanólico foi fungistático na CIM/2 e fungicida a partir da CIM, o que indica um padrão de ação concentração dependente. Os resultados obtidos na cinética de morte são corroborados pelos da concentração fungicida mínima – CFM, que indicava uma ação fungicida do extrato metanólico.

Ramos (2015), avaliou a capacidade de extratos metanólicos de *Syngonanthus nitens* frente a cepa de *C. krusei* e observou que o extrato vegetal não possui capacidade de promover a morte do microrganismo, ele apenas promove a diminuição do crescimento e proliferação.

Um entendimento claro das propriedades farmacodinâmicas de agentes antifúngicos é importante para o tratamento adequado de infecções fúngicas como a candidíase. Cantón et al., (2004) postularam que o uso de curvas de tempo de morte para fornecer avaliação da atividade fungicida é melhor do que a CFM. Estudos de tempo de morte fornecem uma avaliação mais dinâmica da interação entre um agente antimicrobiano e um dado organismo, e pode ter maior utilidade clínica do que determinações da CFM estática (Pfaller; Sheehan, Rex, 2004).

#### 4.6 ENSAIO DO SORBITOL

Nos fungos a parede celular e a membrana celular são importantes alvos farmacológicos dos fármacos antifúngicos. Fármacos antifúngicos capazes de provocar perturbações ou alterações na organização da parede celular tendem a induzir a morte do fungo (Sartoratto et al., 2004).

Uma das formas de avaliar se uma nova droga atua na parede celular é por meio do ensaio com o sorbitol. Teste que compara a CIM da droga antifúngica na presença e na ausência do sorbitol (protetor osmótico usado para estabilizar os protoplastos dos fungos). Caso atue de alguma forma sob a parede celular do fungo, ele provocará lise da parede quando na ausência de um estabilizador osmótico, mas permitirá seu crescimento na presença desse suporte osmótico.

Os ensaios de sorbitol realizados demonstraram que o extrato metanólico não exerce seu efeito antifúngico por meio da parede celular, pois os valores da CIM na presença e na ausência do sorbitol foram os mesmos sugerindo a atuação do extrato em outro alvo celular. O controle com sorbitol assegurou a viabilidade celular que foram capazes de crescer na presença de sorbitol e ausência de qualquer dos fármacos (Tabela 5).

Tabela 5 – Efeito do extrato metanólico e frações 1 e 5 obtidas por cromatografia em flash do extrato metanólico de *Ocotea glomerata* sobre a cepa de *C. krusei* ATCC 6258 na ausência e na presença de sorbitol (0.8 M)

<b>Antifúngicos</b>	<b>Sorbitol</b>		
	<b>Ausência</b>	<b>Presença</b>	<b>Controle positivo</b>
Extrato metanólico	3,12	3,12	+
Fração 1 (F1)	200	200	+
Fração 5 (F5)	25	25	+
Anfotericina B <sup>a</sup>	-	-	+

(-), Anfotericina B. (+), presença de crescimento fúngico em meio líquido na presença e ausência dos compostos; <sup>a</sup>Controle positivo

A variabilidade na composição da parede celular fúngica pode ser facilmente exemplificada quando comparamos a parede das hifas com as das formas leveduriformes, as hifas geralmente têm menos unidades de mananos (polímeros de unidades de manose unidas) do que das formas leveduriformes (Walker, White, 2005).

Sabendo-se desta variabilidade na composição da parede celular fúngica se faz necessário confirmar que o extrato metanólico não atua sobre a parede celular em outras

espécies de *Candida* além da *C. krusei*. Este foi o primeiro trabalho a avaliar a possível ação de um extrato metanólico de *O. glomerata* em parede celular de *C. krusei*.

#### 4.7 ENSAIO DO ERGOSTEROL

Ergosterol é o principal esterol presente em leveduras e fungos filamentosos, sendo necessário para o crescimento e função normal da membrana das células fúngicas. Além de servir como um regulador da fluidez, assimetria e integridade da membrana, o ergosterol contribui para o bom funcionamento de enzimas ligadas á membrana (Luppetti et al., 2002).

Neste sentido, foi realizado o ensaio com o ergosterol, presente apenas em membranas fúngicas. Este método baseia-se na oferta exógena de esteróis a um composto, que possuindo afinidade por esteróis irá formar rapidamente um complexo, impedindo assim a complexação com os esteróis da membrana. Isso resulta em aumento da CIM (Escalante et al., 2008). Desta maneira, este ensaio compara os valores da CIM do extrato metanólico e das suas frações ativas FME1 e FME5 obtidas por cromatografia em flash do extrato metanólico frente a cepa de *C. krusei* na ausência e presença de sorbitol e ergosterol.

Nos testes realizados com o extrato metanólico e suas frações mais ativas (F1 e F5) foi observado que não houve nenhuma alteração nos valores de CIM em meios com e sem adição de ergosterol, indicando que estes não apresentam mecanismo de complexação com o ergosterol. No entanto, a CIM de anfotericina B teve seu valor aumentado na presença de ergosterol exógeno, comprovando o controle positivo. (Tabela 6).

Tabela 6 - Efeito do extrato metanólico e frações 1 e 5 obtidas por cromatografia em flash do extrato metanólico de *Ocotea glomerata* sobre a cepa de *krusei* ATCC 6258 na ausência e na presença de ergosterol 400µg/ mL

Antifúngicos	Ergosterol	
	Ausência	Presença
Extrato metanólico	3,12	3,12
Fração 1 (F1)	200	200
Fração 5 (F5)	25	25
Anfotericina B <sup>a</sup>	16	64

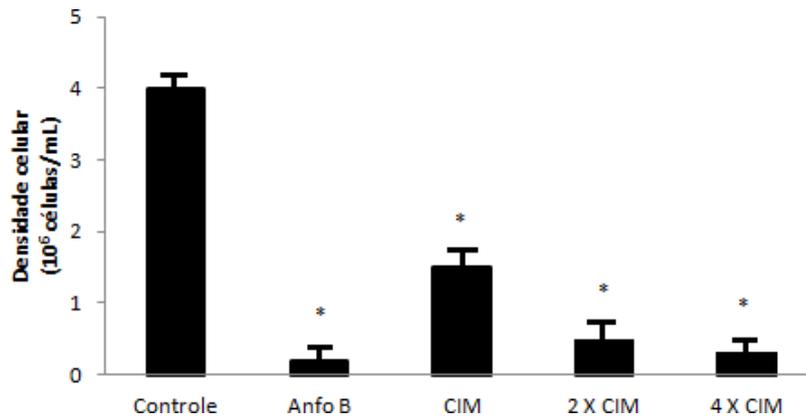
<sup>a</sup>Controle positivo.

Este foi o primeiro trabalho a avaliar a possível ação de um extrato metanólico de *O. glomerata* em membrana celular de *C. krusei*.

#### 4.8 EFEITO DO EXTRATO METANÓLICO NA VIABILIDADE CELULAR EM CÉLULAS DE *Candida Krusei*

De acordo com a Figura 18, quando tratadas com o extrato metanólico nas diferentes concentrações (CIM, 2x CIM, 4x CIM), as células de *C. krusei* ( $1,35 \times 10^6$  células  $\pm 0,04$ ;  $0,64 \times 10^6$  células  $\pm 0,04$ ;  $0,30 \times 10^6$  células  $\pm 0,01$ , respectivamente), mostraram uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) na viabilidade celular demonstrando haver uma relação de efeito concentração dependente. Anfotericina B utilizada como controle positivo, após 3 horas de exposição, diminuiu o número de células viáveis ( $0,28 \times 10^6$  células  $\pm 0,02$ ) quando comparadas com o controle. Esses dados corroboram os de Neto et al., (2014) que também verificaram uma diminuição no número de células dose dependente quando testaram 3 compostos naftoquinônicos em células de *C. tropicalis* resistentes ao fluconazol.

Figura 17 - Efeito do extrato metanólico em diferentes concentrações sobre viabilidade de células de *C. krusei* avaliados por citometria de fluxo.

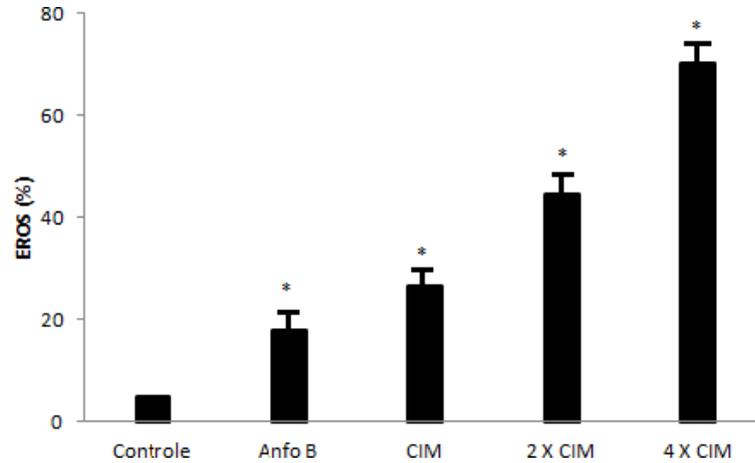


#### 4.9 EFEITO DO EXTRATO METANÓLICO SOBRE A GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS) EM CÉLULAS DE *Candida SPP.*

Conforme Figura 18, as células foram tratadas com o extrato metanólico nas diferentes concentrações (CIM, 2x CIM, 4x CIM), *C.krusei* ( $26,50 \pm 0,59\%$ ;  $44,53 \pm 1,05\%$ ;  $70,13 \pm 1,39\%$ ) apresentaram um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na produção intracelular de EROS de maneira concentração dependente quando comparado ao controle ( $1,48 \pm 0,03\%$ ). É possível observar que o extrato metanólico em todas as concentrações testadas induziu a produção de EROS nas células de *C. krusei*, com valores superiores a anfotericina B, a qual

foi utilizada como controle positivo.

Figura 18 - Avaliação da formação de EROS em células de *C. krusei*



As células de *C. krusei* expostas ao extrato metanólico apresentaram um aumento nos níveis intracelulares totais de EROS proporcional ao aumento da concentração do composto. Esses dados corroboram com os de Miao et al., (2012) que demonstraram que os níveis de EROS aumentam de maneira dependente da concentração e do tempo de exposição em isolados de *C. krusei* após o tratamento com um composto derivado de quinona, shikonina.

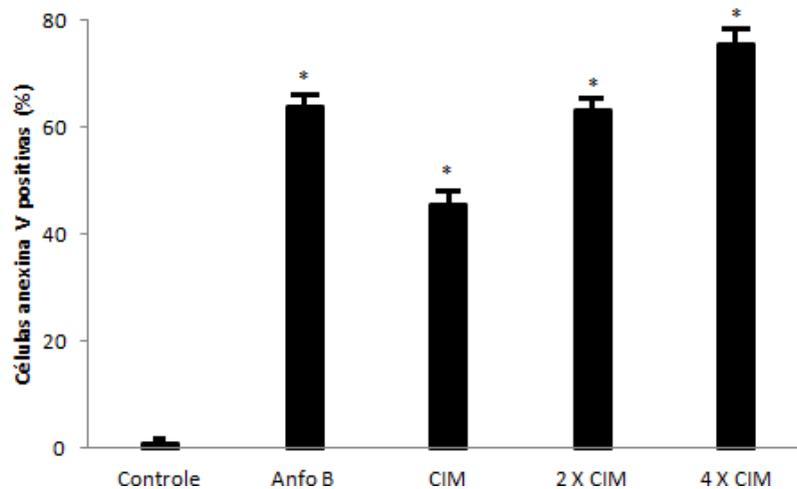
Recentemente, vários estudos relataram que as EROS são necessárias e suficientes para induzir a apoptose em leveduras sendo uma das primeiras alterações implicadas nesse tipo de morte celular (Hwang et al., 2014; Choi; Lee, 2015), fato este que foi observado nas três horas iniciais de exposição ao extrato metanólico. Altos níveis de EROS podem causar o estresse oxidativo em células de leveduras através da formação de macromoléculas celulares oxidadas, incluindo lipídios, proteínas e DNA desencadeando assim o início da apoptose (Xu et al., 2010).

#### 4. 10 DETECÇÃO DA EXTERNALIZAÇÃO DE FOSFATIDILSERINA (PS) INDUZIDA PELO EXTRATO METANÓLICO EM CÉLULAS DE *CANDIDA* SPP.

Após 24 horas de exposição, como mostrado na Figura 19, o extrato metanólico nas diferentes concentrações testadas (CIM, 2x CIM, 4x CIM) foi capaz de induzir aumentos significativos ( $p < 0,05$ ) na frequência de células com PS externalizada nos

isolados de *C. krusei* ( $45,73 \pm 2,33\%$ ;  $63,29 \pm 1,72\%$ ;  $75,57 \pm 1,30\%$ , respectivamente) quando comparadas com o grupo controle ( $1,25 \pm 0,03\%$ ). Anfotericina B que foi utilizada como controle positivo provocou um percentual de células detectadas com PS externalizado de  $64,02 \pm 1,62\%$ .

Figura 19 – Efeito do extrato metanólico em diferentes concentrações sobre a externalização da fosfatidilserina em células de *C. krusei*.



A externalização de fosfatidilserina (PS) é um evento precoce de células que entram em apoptose. Em leveduras, a PS está predominantemente localizada no folheto interno da bicamada lipídica da membrana citoplasmática e é translocada para a monocamada externa durante a apoptose (Xu et al., 2010). Para a detecção de PS, foi utilizada a anexina V, uma proteína de ligação fosfolipídica com elevada afinidade devido à perda de polaridade, capaz de se ligar ao PS externalizado (Hwang et al., 2014). Após exposição ao extrato metanólico nas diferentes concentrações foi observado células de *C. krusei* com PS externalizadas conjugadas com anexina V, nas primeiras três horas de exposição ao composto, confirmando ser um dos eventos iniciais na célula. Esse achado adicional corrobora com as vias de ativação sugestivas de apoptose. Devido à perda da polaridade da membrana, a PS é exposta para o ambiente externo, estimulando assim o reconhecimento e fagocitose das mesmas pelos macrófagos ou por outras células apresentadoras de antígeno (Ferreira et al., 2013).

#### 4.11 IDENTIFICAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *O. GLOMERATA*

O óleo essencial de *O. glomerata* foi obtido, contudo o rendimento da extração não pode ser calculado, uma vez que a quantidade de óleo foi diminuta e apresentava-se presa às paredes do aparelho tipo-Clevenger. Por esta razão hexano (1 mL) foi utilizado para o arraste do óleo. Um fato a ser mencionado foi a formação de uma emulsão viscosa com o aquecimento da planta em água. Tal emulsão inviabilizou a utilização da técnica de hidrodestilação, obstruindo a passagem do vapor no aparelho tipo-Clevenger. A técnica de arraste a vapor foi então utilizada, uma vez que somente o fluxo de vapor não levou a formação excessiva de emulsão, o que viabilizou o experimento. A identificação da composição volátil do óleo essencial de *O. glomerata* está listada na Tabela 7.

Após análise da composição volátil do óleo essencial de *O. glomerata* foi possível identificar 23 dos 26 componentes o que corresponde a 94,76% da composição. Constatou-se que o mesmo é rico em sesquiterpenos (92,28%) abrangendo todos os compostos majoritários do óleo. O sesquiterpeno germacrene-D foi o componente dominante da composição volátil, correspondendo a 21,32%, seguido dos outros sesquiterpenos bicyclogermacrene (12,77%),  $\alpha$ -copaene (11,16%),  $\gamma$ -elemene (11,08%),

viridiflorol (9,34%), *E*-caryophyllene (6,78%) e (*E*)- $\alpha$ -bergamotene (4,40%), que juntos correspondem a 76,84% do óleo essencial. Germacrene-D também foi observado como componente majoritário dos óleos essenciais de *O. meiziana* (50,6%), *O. valeriana* (69,7%) e de uma nova espécie segundo Takaku et al., (2007), *Ocotea* “small leaf” (60,4%), todas encontradas na Costa Rica (Takaku et al., 2007)

Tabela 7 – Composição do óleo essencial de *O. glomerata*.

Nome do composto	Área %	±SD %	Referências
$\beta$ -phellandrene	0,28	0,04	[Takaku et al., 2007] <sup>g</sup> , [Mossi et al., 2014] <sup>m</sup>
$\beta$ -( <i>E</i> )-ocimene	0,20	0,03	[Takaku et al., 2007] <sup>b,i</sup> , [Coutinho et al., 2007] <sup>l</sup> , [Mossi et al., 2014] <sup>m</sup>
Bicycloelemene	0,88	<0,01	
<b><math>\alpha</math>-copaene</b>	<b>11,16</b>	<b>0,01</b>	[Takaku et al., 2007] <sup>a-c, e-j</sup> , [Coutinho et al., 2007] <sup>k,l</sup> , [Mossi et al., 2014] <sup>m</sup> , [Chaverri et al., 2011] <sup>n</sup> , [Guerrini et al., 2006] <sup>o</sup>
$\beta$ -elemene	1,53	0,03	[Takaku et al., 2007] <sup>k,l</sup> , [Chaverri et al., 2011] <sup>n</sup>
$\alpha$ -gurjunene	0,49	<0,01	
<b><i>E</i>-caryophyllene</b>	<b>6,78</b>	<b>0,02</b>	[Takaku et al., 2007] <sup>a,j</sup> , [Coutinho et al., 2007] <sup>k,l</sup> , [Chaverri et al., 2011] <sup>n</sup> , [Guerrini et al., 2006] <sup>o</sup>
$\beta$ -copaene	0,19	0,02	[Coutinho et al., 2011] <sup>k,l</sup> , [Chaverri et al., 2011] <sup>n</sup> , [Mossi et al., 2014] <sup>m</sup>
<b><math>\gamma</math>-elemene</b>	<b>11,08</b>	<b>0,06</b>	[Takaku et al., 2007] <sup>c,h, j</sup> , [Chaverri et al., 2011] <sup>n</sup>
<b>(<i>E</i>)-<math>\alpha</math>-bergamotene</b>	<b>4,40</b>	<b>0,01</b>	[Takaku et al., 2007] <sup>h</sup> , [Coutinho et al., 2007] <sup>k</sup>

$\alpha$ -humulene	1,63	0,01	[Takaku et al., 2007] <sup>a-j</sup> , [Coutinho et al., 2007] <sup>k, l</sup>
<i>Allo</i> -aromadendrene	3,43	0,01	[Takaku et al., 2007] <sup>b, g</sup> , [Coutinho et al., 2007] <sup>k, l</sup>
Amorpha-4,7(11)-diene	0,94	<0,01	
<b>Germacrene-D</b>	<b>21,32</b>	<b>0,35</b>	[Takaku et al., 2007] <sup>a-j</sup> , [Chaverri et al., 2011] <sup>n</sup> , [Mossi et al., 2014] <sup>m</sup> , [Guerrini et al., 2006] <sup>o</sup>
$\beta$ -Selinene	2,11	0,06	[Takaku et al., 2007] <sup>d, e, g, i</sup> , [Coutinho et al., 2007] <sup>k, l</sup> , [Mossi et al., 2014] <sup>m</sup>
<b>Bicyclogermacrene</b>	<b>12,77</b>	<b>0,13</b>	[Takaku et al., 2007] <sup>b-f, h, i</sup> , [Coutinho et al., 2007] <sup>l</sup> , [Mossi et al., 2014] <sup>m</sup>
Germacrene-A	0,36	0,03	[Takaku et al., 2007] <sup>b, d, f-h</sup>
$\delta$ -cadinene	1,96	0,02	[Takaku et al., 2007] <sup>a-j</sup> , [Coutinho et al., 2007] <sup>k, l</sup> , [Chaverri et al., 2011] <sup>n</sup> , [Guerrini et al., 2006] <sup>o</sup>
Nerolidol	1,28	0,01	[Takaku et al., 2007] <sup>e-h</sup> , [Coutinho et al., 2007] <sup>k, l</sup> , [Chaverri et al., 2011] <sup>n</sup>
Palustrol	0,65	0,02	[Coutinho et al., 2007] <sup>l</sup>
Spathulenol	0,80	0,01	[Takaku et al., 2007] <sup>a, b, e, f-j</sup> , [Coutinho et al., 2007] <sup>k, l</sup> , [Chaverri et al., 2011] <sup>n</sup>

NI#	0,70	0,01	---
<b>Viridiflorol</b>	<b>9,34</b>	<b>0,08</b>	[Coutinho et al., 2007] <sup>k, l</sup>
NI#	3,81	0,04	---
NI#	0,66	0,11	---
$\alpha$ -cadinol	1,21	0,02	[Takaku et al., 2007] <sup>a-j</sup> , [Coutinho et al., 2007] <sup>k, l</sup> , [Chaverri et al., 2011] <sup>n</sup> , [Guerrini et al., 2006] <sup>o</sup>
<b>Total de identificados</b>	<b>94,76</b>		
Monoterpenos	0,48		
Sesquiterpenos	92,28		
Sesquiterpenos oxigenados	2,0		

NI# = não identificado; <sup>a</sup> = *Ocotea floribunda*; <sup>b</sup> = *O. holdridgeana*; <sup>c</sup> = *O. meziana*; <sup>d</sup> = *O. sinuata*; <sup>e</sup> = *O. tonduzii*; <sup>f</sup> = *O. valeriana*; <sup>g</sup> = *O. veraguensis*; <sup>h</sup> = *O. whitei*; <sup>i</sup> = *Ocotea* “los llanos”; <sup>j</sup> = *Ocotea* “small leaf”; <sup>k</sup> = *O. gomezii*; <sup>l</sup> = *O. morae*; <sup>m</sup> = *O. bofo*; <sup>n</sup> = *O. brenesii*; <sup>o</sup> = *O. comoriensis*;

Comparando-se a composição do óleo essencial de *O. glomerata* com a literatura observa-se uma similaridade com várias espécies do gênero *Ocotea* da Costa Rica. No entanto as proporções entre os componentes são notavelmente distintas. São poucos os dados sobre óleos essenciais do gênero *Ocotea* no Brasil, os disponíveis apresentam composição discrepantes (Takaku et al., 2007).

Na figura 20 é possível observar as diferentes proporções dos componentes encontrados em *O. glomerata* em relação a outras espécies de do gênero *Ocotea*. O sesquiterpeno  $\alpha$ -copaene foi observado em várias das espécies comparadas e também como majoritário de *O. glomerata* (11,16%) e *O. brenesii* (21,1%). *E*-caryophyllene foi presente em na maioria das espécies e em muitas delas como um dos componentes majoritários, sendo observado em maiores quantidades em *O. meziana* (24,8%), *O. whitei* (15,2%) e *O. duckei* (60%). *O. glomerata* destaca-se novamente com o sesquiterpeno  $\gamma$ -elemene (11,8%), maior

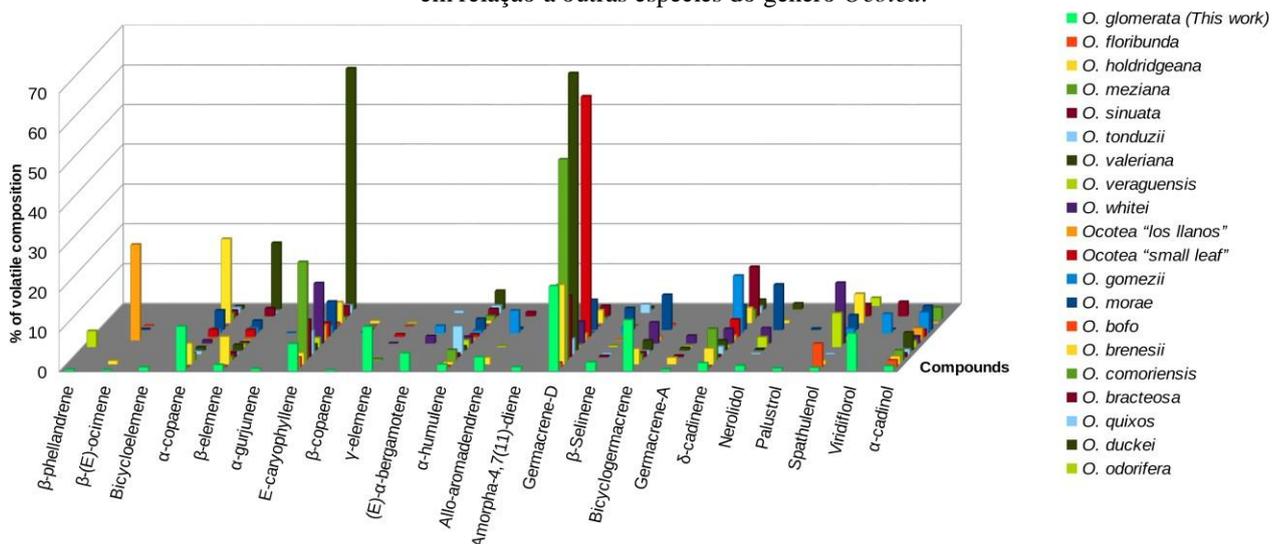
proporção dentre todas as espécies comparadas. Das poucas espécies em que (*E*)- $\alpha$ -bergamotene foi observado (*O. whitei* e

*O. gomezii*, ambas com 1,9%), *O. glomerata* apresentou mais que o dobro 4,4%) desse componente. O sesquiterpenoide Amorpha-4,7(11)-diene foi observado somente da espécie de *Ocotea* do presente estudo, mesmo que em pequena quantidade (0,94%), assim como bicycloelemene (0,88%).

Nota-se claramente que o sesquiterpeno germacrene-D é o componente majoritário de várias espécies de *Ocotea* analisadas, assim como a espécie em estudo no presente trabalho, assim como foi encontrado em todas das espécies que foram comparadas aqui, exceto *O. odorifera*. Dentre elas podemos destacar *O. valeriana* (69,7%), *O. "small leaf"* (60,4%), *O. meziana* (50,6%), *O. glomerata* (21,32%, neste trabalho), *O. holdridgeana* (19,9%), *O. sinuata* (15,4%), *O. morae* (7,5%) e *O. whitei* (5,5%). Presente em várias das espécies, bicyclgermacrene foi observado em maior quantidade em *O. glomerata* (12,77%, neste trabalho). Também presente na maioria das espécies comparadas neste trabalho,  $\delta$ -cadinene foi observado em maior quantidade em

*O. gomezii* (14,5%) e *O. bracteosa* (12,4%), todavia somente uma pequena quantidade desse componente foi observado em *O. glomerata* (1,96%). O sesquiterpenoide palustrol foi constatado somente em *O. morae* (0,3%) e em quantidade um pouco maior em *O. glomerata* (0,65%, neste trabalho). O sesquiterpeno viridiflorol foi observado em maior quantidade em *O. glomerata* (9,34%, this work) e *O. gomezii* (4,9%), sendo também observado em outras duas espécies: *O. bracteosa* (3,6%) e *O. morae* (0,2%). *O. morae*, *O. gomezii* e *O. valeriana* apresentaram respectivamente 6,0%, 5,3% e 4,5% de  $\alpha$ -cadinol, sendo as mais representativas em quantidade desse sesquiterpenoide, já que *O. glomerata* apresentou baixa quantidade do mesmo (1,21%).

Figura 20 - Comparação das proporções dos compostos encontrados em *O. glomerata* em relação a outras espécies do gênero *Ocotea*.



## 5 CONCLUSÕES

A partir de todas as análises realizadas neste estudo foi possível evidenciar a prospecção biológica dos extratos de *O. glomerata* chegando-se as seguintes conclusões:

- Todos os extratos de *O. glomerata* apresentaram atividade anti-*Candida* no entanto, o extrato metanólico foi ativo contra todas as cepas de *Candida* empregadas no estudo exceto *C. tropicalis*;
- O fracionamento do extrato metanólico possibilitou a separação dos compostos com atividade antifúngica resultando num aumento da CIM ou ausência de atividade;
- A combinação do extrato metanólico modula positivamente a ação in vitro dos antifúngicos, sugerindo o uso futuro com agente adjuvante para esses medicamentos;
- O extrato metanólico e suas frações bioativas não apresentam mecanismos de complexação com ergosterol e sorbitol, atuando provavelmente em outros alvos;
- O extrato metanólico possivelmente exerce seus efeitos antifúngicos através da produção de espécies reativas de oxigênio, culminando na morte celular por apoptose;
- A identificação da composição volátil do óleo essencial de *O. glomerata* foi realizada, obtendo-se 94,76% de componentes identificados. Constatou-se que este óleo é rico em sesquiterpenos (92,28%), o que engloba todos os componentes majoritários do óleo essencial;
- Alguns compostos como amorpha-4,7(11)-diene e bicycloelemene foram observados somente na espécie de *Ocotea* do presente estudo. É importante frisar que a composição de volátil do óleo essencial de *O. glomerata* foi bastante similar a composição de espécies de *Ocotea* encontradas na Costa Rica.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, J.; BODEY, G. P.; HANNA, H. A.; MARDANI, M.; GIRGAWY, E.; ABI SAID, D.; WHIMBEY, E.; HACHEM, R.; RAAD, I.. *Candida krusei* fungemia. An escalating serious infection in immunocompromised patients. **Archives of Internal Medicine**, v. 160, n. 17, p. 2659-2664, 2000.
- ADAMS, R.P. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy, 4th ed. Allured Publishing, Carol Stream, 2007.
- ALCÂNTARA, J. M.; YAMAGUCHI, K. K. L.; VEIGA JUNIOR, V. F.; LIMA, E. S.; Atividades biológicas dos óleos essenciais de *Endlicheria citriodora*, uma lauraceae rica em geranato de metila. **Química Nova** v. 36, n. 6, p. 826-830, 2010.
- ALCÂNTARA, J.M; YAMAGUCHI, K.K.L; DA VEIGA JUNIOR, V.F; LIMA, E.S.Composição química de óleos essenciais de espécies de *Aniba* e *Licaria* e suas atividades antioxidante e antiagregante plaquetária. **Química Nova** v.33, p. 141– 145, 2010.
- ALCAZAR-FUOLI, L.; MELLADO, E. Current status of antifungal resistance and its impact on clinical practice. **British Journal of Haematology**, v.166, n. 4, p. 471- 484, 2014.
- ALVES, M; ARAÚJO, D. Climbing plants of a fragmented area of lowland Atlantic Forest, Igarassu, Pernambuco (northeastern Brazil). **Phytotaxa** v. 8, p. 1-24, 2010.
- ANDERSON, J.B. Evolution of antifungal drug resistance: Mechanisms and pathogen fitness. **Nature**, v. 3, n. 7, p. 545-556, 2005.
- ANTUNES, M. D. C.; CAVACOB, A.; The use of essential oils for postharvest decay control. A review. **Flavour Fragrance Journal**, v. 25, p. 351-366, 2010.
- ASHFORD B. Certain conditions of the gastrointestinal tract in Puerto Rico and their relation to tropical sprue. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** v. 8, p. 507-538, 1928.
- ASSOB, J. N; KAMGA, H.L.F; NSAGHA, D.S; NJUNDA, A.L; NDE, PETER F.Antimicrobial and toxicological activities of five medicinal plant species from Cameroon traditional medicine. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 11, n. 70, p. 1-27, 2011.
- AUTRAN, E.S; NEVES, I.A; SILVA, C.S.B; SANTOS, G.K.N; CÂMARA C.A.G; NAVARRO, D.M.A.F. Chemical composition, oviposition deterrent and larvicidal activities against *Aedes aegypti* of essential oils from *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae). **Bioresource Technology**, n.100, p. 2284–2288, 2009.
- BAGINSKI, M.; CZUB, J. Amphotericin B and Its New Derivatives – Mode of Action. **Current Drug Metabolism**, v.10, n. 5, p. 459-469, 2009.
- BAITELLO JB. Novas espécies de Lauraceae para a flora brasileira. **Acta Botânica Brasileira**, v. 15, p. 445-450, 2001.

BAITELLO, J.B. **A importância das Lauraceae na Mata Atlântica brasileira.** Secretaria do Meio Ambiente, Governo do Estado de São Paulo. Disponível em: <http://www.ambiente.sp.gov.br/pesquisaambiental/pesquisas/a-importancia-das-lauraceae-na-mata-atlantica-brasileira/>. Acesso em 15 jun 2016.

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

BARBEDO, LS; SGARBI, DBG. Candidíase. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis** v. 22, p 22-38, 2010.

BLANK AF, COSTA AG, ARRIGONI-BLANK MF, CAVALCANTI SCH, ALVESn PB, INNECCO R, EHLERT PAD, SOUSA IF. Influence of season, harvest time and drying on Java citronella (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) volatile oil. **Revista Brasileira de Farmacognosia** v.17, p 557-564, 2007.

BARROSO, G. M.; GUIMARÃES, E. F.; ICHASO, C. L. F.; COSTA, C. G.; PEIXOTO, A. L.; Sistemática de Angiosperma do Brasil. Vol. 01, 2º Edição, EDUSP, Pp. 255, São Paulo, 2002.

BEN-AMI, R.; OLSHTAIN-POPS, K.; KRIEGER, M.; OREN, I.; BISHARA, J.; WIENER-WELL, D. Y.; WEINBERGER, M.; ZIMHONY, O.; CHOWERS, M.; WEBER, G.; POTASMAN, I.; CHAZAN, B.; KASSIS, I.; SHALIT, I.; BLOCK, C.; KELLER, N.; KONTOYIANNIS, D. P.; GILADI, M. Antibiotic exposure as a risk factor for fluconazole-resistant *Candida* bloodstream infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 5, p. 2518-2523, 2012.

BRAND, A., VACHARAKSA, A.; BENDEL, C.; NORTON, J.; HAYNES, P.; HENRY-STANLEY, M.; WELLS, C.; ROSS, K.; GOW, N.R.; GALE, C. An Internal polarity Landmark is important for externally induced hyphal behaviors in *Candida albicans*. **Eukaryot Cell**, v. 7, n. 4, p. 12-20, 2008.

BONHOMME, J.; D'ENFERT, C. *Candida albicans* biofilms: building a heterogeneous, drug-tolerant environment. **Current Opinion Microbiology**, v. 16, n. 4, p.398-403, 2013.

CALABRESE, E. C.; CASTELLANO, S.; SANTORIELLO, M.; SGHERRI, C.; QUARTACCI, M. F.; CALUCCI, L.; WARRILOW, A. G.; LAMB, D. C.; KELLY, S. L.; MILITE, C.; GRANATA, I.; SBARDELLA, G.; STEFANCICH, G.; MARESCA, B.; PORTA, A. Antifungal activity of azole compounds CPA18 and CPA109 against azole-susceptible and -resistant strains of *Candida albicans*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** v. 68, p. 1111-1119, 2013.

CASTRO, R.D. Atividade antifúngica do óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Canela) e de sua associação com antifúngicos sintéticos sobre espécies de *Candida* [M.S. thesis], University of Paraíba, João Pessoa, Brazil, 2010.

CASTRO, H. G.; FERREIRA, F. A.; SILVA, D. J. H.; MOSQUIM, P. R.. 2004. Contribuição ao estudo das plantas medicinais: Metabólitos secundários. 2ª Ed. Viçosa, MG: Visconde do Rio Branco. 113 p.

CASTRO, H. G.; PERINI, V. B. M.; SANTOS, G. R.; LEAL, T. C. A. B. Avaliação do teor e composição do óleo essencial de *Cymbopogon nardus* (L.) em diferentes épocas de colheita. *Revista Ciência Agronômica*, v. 41, n. 2, p. 308-314, 2010.

CHANDERBALI, A.S; VAN DER WERFF, H; RENNER, S.S Phylogeny and Historical Biogeography of Lauraceae: Evidence from the Chloroplast and Nuclear Genomes. *Annals of the Missouri Botanical Garden.*, v.88 p. 104, 2001

CHANDERBALI, A. S. Endlicheria (Lauraceae). *Flora Neotropica*. Monograph, v. 91, p.1-144 2004.

CHAVERRI, C; CICCIO, J.F. Essential oil of trees of the genus *Ocotea* (Lauraceae) in Costa Rica. I. *Ocotea brenesii*. *Revista de Biologia Tropical* v.53 p. 431–436, 2005.

CHAVERRI, C; DÍAZ, C; CICCIO, J.F. Chemical Analysis of Essential Oils from *Ocotea gomezii* W.C. Burger and *Ocotea morae* Gómez-Laur. (Lauraceae) Collected at “Reserva Biológica Alberto M. Brenes” in Costa Rica and their Cytotoxic Activity on Tumor Cell Lines. *Journal of the Brazilian Chemical Society* v.22, p. 741–745, 2011.

CHOI, H.; LEE, D.G. Lycopene induces apoptosis in *Candida albicans* through reactive oxygen species production and mitochondrial dysfunction. *Biochimie*, v. 115, p. 108- 115, 2015.

CHOU, H.H, LO, H.J; CHEN, K.W; LIAO, M.H; LI, S.Y. Multilocus sequence typing of *Candida tropicalis* shows clonal cluster enriched in isolates with resistance or trailing growth of fluconazole. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v.58, p.427–433, 2007.

CLSI (2008) Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard-third edition; CLSI document M27-A3 . Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta.*, v. 1830, p. 3670–3695, 2013.

COLOMBO, A. L; NUCCI, M; PARQUE, B.J; NOUER, S.A; ARTHINGTON-SKAGGS, B; MATTA, D.A; WARNOCK, D. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 44, n. 8, p. 2816-2823, 2006.

COLOMBO, A. L; GUIMARÃES, T; CAMARGO, L.F.A; RICHTMANN, R; QUEIROZ-TELLES, F.S. 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.

COSTA, A. R. T.; AMARAL, M. F. Z. J.; MARTINS, P. M.; PAULA, J. A. M.; FIUZA, T. S.; RESVENZOL, L. M. F.; PAULA, J. R.; BARA, M. T. F. Ação do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L. M. Perry sobre as hifas de alguns fungos fitopatogênicos. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 13, n.2, p.240-245, 2011.

- COSTA-DE-OLIVEIRA, S; SILVA, A.P; MIRANDA, I.M; SALVADOR, A; AZEVEDO, M.M, MUNRO, C.A; RODRIGUES, A.G; PINA-VAZ.C. Determination of chitin content in fungal cell wall: an alternative flow cytometric method. **Cytometry Part A**, v. 83, n. 3, p. 324-328, 2013.
- COUTINHO, D.F.; AGRA, MF.; BARBOSA-FILHO JM., BASÍLIO, I.J.L.D. 2006. Morfo-anatomia foliar de *Ocotea gardneri* (Meisn.) Mez (Lauraceae-Lauroideae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 178-184, 2006.
- COUTINHO, D.F; DIAS, C.S; BARBOSA-FILHO, J.M; AGRA, M.F; MARTINS, T.M.S. Composition and Molluscicidal Activity of the Essential Oil from the Stem Bark of *Ocotea bracteosa* (Meisn.) Mez. **Journal of Essential Oil Reseach** v.19 p. 482–484, 2007.
- CUESTA, I.; ZARAGOZA, O.; MELLADO, E. *Candida tropicalis* antifungal crossresistance is related to different azole target (Erg11p) modifications. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 57, n. 10, p. 4769-4781, 2013.
- DA SILVA, C.R.; NETO, J.B.A; SIDRIM, J.J.C.; ANGELO, M. R. F.; MAGALHÃES, H. I. F.; CAVALCANTI, B.C. Synergistic effects of amiodarone and fluconazole on *Candida tropicalis* resistant to fluconazole. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 57, n. 4, p. 1691-1700, 2013.
- DE GROOT, P. W; KRANEVELD, E.A; YIN, Q.Y; GROSS, U; CRIELAARD, W; DE KOSTER, C.G; BADER, O; KLIS, F.M; WEIG, M. The cell wall of the human pathogen *Candida glabrata*: differential incorporation of novel adhesin-like wall proteins. **Eukaryotic Cell**, v. 7, n. 11, p. 1951-64, 2008.
- DELARZE, E.; SANGLARD, D. Defining the frontiers between antifungal resistance, tolerance and the concept of persistence. **Drug Resistance Updates**, v. 23, p. 9- 12, 2015.
- DESTRYANA, R.A.; YOUNG, D.G.; WOOLLEY, C.L.; HUANG, T.C.; WU, H.Y.; SHIH, W.L. Antioxidant and anti-inflammation activities of *Ocotea*, *Copaiba* and blue cypress essential oils *in vitro* and *in vivo*. **Journal of the American Oil Chemit's Society**, v.91, p. 1531-1542, 2014.
- DEVELOUX M, BRETAGNE S. Candidiasis and yeast infections. **EMC-Maladies Infectieuses**, v. 2, p. 119- 139, 2005.
- DEVIRIM, İ; DEMIRAG, B; YAMAN, Y; BAYRAM, N; OZDEMIR, F; KARA, A; OZEK, G; AYHAN, Y; GULFIDAN, G; OYMAK, Y; VERGIN, C. A 7-year study of the distribution of nosocomial candidemia in children with cancer. **The Turkish Journal of Pediatrics**, v 57, n. 3 p. 225–229, 2015
- DEORUKHKAR, S.; SAINI, S. Non albicans *Candida* species: its isolation pattern, species distribution, virulence factors and antifungal susceptibility profile. **International Journal of Public Health**, v. 2, p. 533-538, 2013.
- DRELL, T; LILLSAAR, TRIIN; TUMMELEHT, L; SIMM, J; AASPÖLLU, A; VÃO, E; SAARMA, I; SALUMETS, A; DONDEERS, G.G.G; METSIS, M. Characterization of the

vaginal micro- and mycobiome in asymptomatic reproductive-age Estonian women. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. 1-11, 2013.

DOI, A. M.; PIGNATARI, A.C.C; EDMOND, M.B; MARRA, A.R; CAMARGO, L.F.A; SIQUEIRA, R.A; MOTA, V.P; COLOMBO, A.L. Epidemiology and Microbiologic Characterization of Nosocomial Candidemia from a Brazilian National Surveillance Program. **Plos one**, v. 11, n. 1, p. 1-9, 2016.

EBRAHIM S.S; MEHREGAN, I. Volatile constituents of flowers and leaves of *Anthemis hyaline*. **Chemistry Natural Compunds**, v 42 p. 531–533, 2006.

EGGIMANN, P. Preventing invasive *Candida* infections. Where could we do better? **Journal of Hospital Infection**, v. 89, n. 4, p. 302-308, 2015.

ENDO, E. H.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, T. U.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. Potent antifungal activity of extracts and pure compound isolated from pomegranate peels and synergism with fluconazole against *Candida albicans*. **Research in Microbiology**, v. 161, p. 534-540, 2010.

ESCALANTE, M. GATTUSO, P. P'EREZ, S. ZACCHINO. Evidence for the mechanism of action of the antifungal phytolaccoside B isolated from *Phytolacca tetramera* Hauman, **Journal of Natural Products**, vol. 71, n.10, p. 1720–1725, 2008.

FERREIRA, J.R.; CAVALCANTI, B. C.; DA COSTA, P.M.; DE ARANTES, F.F.P.; ALVARENGA, E.S. Induction of G<sub>2</sub> /M arrest, caspase activation and apoptosis by  $\alpha$ -santonin derivatives in HL-60 cells. **Toxicology In vitro**, v. 27, n. 5, p. 1458-1466, 2013.

FIGUEIREDO, A.C., J.G. BARROSO, L.G. PEDRO, J.J. C. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**, v.23, p. 213-26, 2008.

FINDLEY, K; OH, J; YANG, JOY; CONLAN, S; DEMING, C; MEYER, J.F; SCHOENFELD, D; NOMICOS, E; PAR, M. Topographic diversity of fungal and bacterial communities in human skin. **Nature**, v. 498, n. 7454, p. 367-370, 2013.

FLEVARI, A; THRODORAPOULOU, M; VELEGRAKI, A; ARMAGANIDIS, A; DIMOPOULOS, G. Treatment of invasive candidiasis in the elderly: a review. **Journal of Clinical Interventions in Aging**, v. 8, p. 1199-1208, 2013.

FORASTIERO, A.; ARANGO, A. C. M.; IZQUIERDO, A. A.; FUOLI, L. A.; MARTINEZ, L. B.; PALAEZ, T.; LOPEZ, J. F.; GRIMALT, J. O.; LOPEZ, A. G.; CUESTA, I.; ZARAGOZA, O.; MELLADO, E. *Candida tropicalis* antifungal crossresistance is related to different azole target (Erg11p) modifications. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 57, n. 10, p. 4769-4781, 2013.

FURLETTI, V. F; TEIXEIRA, I.P; OBANDO-PEREDA, G; MARDEGAN, R.C; SARTORATTO, A; FIGUEIRA, G.M; DUARTE, R.M; REHDER, V.L; DUARTE, M.C; HOFLING, J.F. Action of *Coriandrum sativum* L. Essential Oil upon Oral *Candida albicans* Biofilm Formation. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, p. 1-9, 2011.

GARCIA, A. A.; CARRIL, E. P. Metabolismo secundário de plantas. **E-PRINTS**, v. 2, n. 3, p.119-145, 2009.

GIANG, P. M.; KOENIG, W. A.; SON, P. T. Chemical constituents of the essential oil from the bark of *Cinnamomum illicioides* A. Chev. from Vietnam. **Journal of Natural Medicine**, v.60, p. 248, 2006.

GOA, K.L.; BARRADELL, L.B. Fluconazole an update of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic use in major superficial and systemic mycoses in immunocompromised patients. **Drugs**, v. 50, p.658-690, 1995.

GONÇALVES, N. M. T; VILA, M.M.D.C; GERENUTTI, M; CHAVES, D.S.A. Políticas de Saúde para a Fitoterapia no Brasil. **Revista Cubana de Plantas Medicinales.**, La Habana, v. 18, n. 4, p. 632-637, 2013.

GONÇALVES, S.S.; SOUZA, A.C.R.; CHOWDHARY, A.; COLOMBO, A.L. Epidemiology and molecular mechanisms of antifungal resistance in *Candida* and *Aspergillus*. **Mycoses**, n. 59, p. 198-219, 2016.

GOW, N. A; VAN DE VEERDONK, F.L; BROWN, A.J; NETEA, M.G. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 2, p. 112-122, 2012.

GUERRA, F. Q. S; MENDES, J. M., SOUSA, J. P. D. Increasing antibiotic activity against a multidrug-resistant *Acinetobacter* spp by essential oils of *Citrus limon* and *Cinnamomum zeylanicum*. **Natural Product Research**, vol. 26, no. 23, pp. 2235–2238, 2012.

GUERRINI, A; SACCHETTI, G; MUZZOLI, M; MORENO RUEDA, G; MEDICI, A; BESCO, E. Composition of the Volatile Fraction of *Ocotea bofo* Kunth (Lauraceae) Calyces by GC-MS and NMR Fingerprinting and Its Antimicrobial and Antioxidant Activity. **Journal of Agricultural Food Chemistry** v.54, p. 7778– 7788, 2006.

GYAWALI, R.; IBRAHIM, S. A. Natural products as antimicrobial agentes. **Food Control**, v. 46, p. 412-429, 2014.

HA, J. F.; ITALIANO, C. M.; HEALTH, C. H.; SHIH, S.; REA, S.; WOOD, F. M. Candidemia and invasive candidiasis: a review of the literature for the burns surgeon. **Burns**, v. 37, p.181-195, 2011.

HAJJEH, R.A.; SOFAIR, A.N.; HARRISON, L.H.; LYON, G.M.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.A.; MIRZA, S.A.; PHELAN, M.; MORGAN, J.; LEE-YANG, W.; CIBLAK, M.A.; BENJAMIN, L.E.; SANZA, L.T.; HUIE, S.; YEO, S.F.; BRANDT, M.E.; WARNOCK, D.W. Incidence of bloodstream infections due to *Candida* species and in vitro susceptibilities of isolates collected from 1998 to 2000 in a population-based active surveillance program. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p.1519–1527, 2004.

HAYEK, S. A.; GYAWALI, R.; IBRAHIM, S. A. Antimicrobial Natural Products. **Formatex**, v. 1, p. 910-921, 2013.

- HEMPEL, S.L.; BUETTNER.; O' MALLEY, Y. Q.; WESSELS, M. Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5 (and 6)-carboxy- 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 27, p.146-159, 1999.
- HERWALD, S. E.; KUMAMOTO, C. A. *Candida albicans* niche specialization: features that distinguish biofilm cells from commensal cells. **Current Fungal Infection Reports**, v. 8, n. 2, p. 179-184, 2014.
- HO, D. The pathogenicity of *Candida tropicalis*. **Canadian Medical Association Journal**, v.83, n.27, p.1439-1440, 1960.
- HOFFMANN, C; DOLLIVE, S; GRUNBERG, S; CHEN, J; LI, H; WU, G.D; LEWIS, J.D; BUSHMAN, F.D. Archaea and fungi of the human gut microbiome: correlations with diet and bacterial residents. **PLoS One**, v. 8, n. 6, p. 1-12, 2013.
- HOLLAND, L. M.; SCHRODER, M. S.; TURNER, S. A.; TAFF, H.; ANDES, D.; GRÓZER, Z.; GÁCSEK, A.; AMES, L., HAYNES, HIGGINS, D. G.; BUTLER. Comparative phenotypic analysis of the major fungal pathogens *Candida parapsilosis* and *Candida albicans*. **PLoS Pathog.**, v. 10, n. 9, p. 1-18, 2014.
- HORN F, HEINEKAMP T, POLLMACHER J, VALIANTE V, BRRAKHAGE A. Systems Biology of Fungal Infection. **Frontiers in Microbiology**, v.3, p. 1-20, 2012.
- HUANG, G. Regulation of phenotypic transitions in the fungal pathogen *Candida albicans*. **Virulence**, v. 3, n. 3, p. 251-261, 2012.
- HWANG, J.H.; CHOI, H.; KIM.; A.R.; YUN, J.W.; WO, E.R.; LEE, D.G. Hibicuslide C-induced cell death in *Candida albicans* involves apoptosis mechanism. **Journal of Applied Microbiology**, v. 117, n. 5, p. 1400-1411, 2014.
- ILIEV, I. D.; UNDERHILL, D. M. Striking a balance: fungal commensalism versus pathogenesis. **Current Opinion in Microbiology**, v. 16, n. 3, p. 366-373, 2013.
- JUNEJA, V. K.; DWIVEDI, H. P.; YAN, X. Novel natural food antimicrobials. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 3, p. 381-403, 2012.
- KATHIRAVAN, M. K; SALAKE, A.B; CHOTHE, A.S; DUDHE, P.B, WATIDE, R.P; MUTA, M.S; GADHWE, S. The biology and chemistry of antifungal agents: a review. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 19, p. 5678-5698, 2012.
- KATZUNG, B. G.; MASTERS, S. B.; TREVOR, A. J. 2009. **Basic and Clinical Pharmacology**. 11ed, New York (NY): Lange Medical Books/McGraw-Hill.
- KIM, J.; SUDBERY, P. *Candida albicans*, a major human fungal pathogen. **Journal of Microbiology**, v. 49, n. 2, p. 171-177, 2011.
- KLEPSER, M. The value of amphotericin B in the treatment of invasive fungal infections. **Journal of Critical Care**, v. 26, n. 2, p. 225-235, 2011.

KOK, E.T.; JONG, M.C.; GRAVENDEEL, B.; VAN LEEUWEN, W.B.; BAARS, E.W. Resistance to Antibiotics and Antifungal Medicinal Products: Can Complementary and Alternative Medicine Help Solve the Problem in Common Infection Diseases? The Introduction of a Dutch Research Consortium. **Evidence- Based Complementary and Alternative Medicine**, p. 1-6, 2015.

KOTHAVADE, M.M.; RAJENDRA, J.; PANTHAKI, M. H. *Candida tropicalis*: its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole. **Journal of Medical Microbiology**, v.59, p.873–880, 2010.

KROPF, M. S.; QUINET, A.; ANDREATA, R. H. P. Lista anotada, distribuição e conservação das espécies de *Lauraceae* das restingas fluminenses, Brasil. **Pesquisas, Botânica** n. 57: 161-180. São Leopoldo, Instituto Anchieta de Pesquisas, 2006.

LAGO JHG, JÚNIOR PA, MORENO PRH, LIMBERGER RP, APEL MA, HENRIQUES AT. Analysis, comparison and variation on the chemical composition from the leaf volatile oil of *Xylopiya aromatica* (Annonaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* v.31, p. 669-762, 2003.

LEBEL, C.P.; ISCHIOPOULOS, H.; BONDY, S.C. Evaluation of the probe 2, 7-dichlorofluorescein as indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. **Chemical Research in Toxicology**, v.5, p. 227-31, 1992.

LEITE, M.C.A; BEZERRA, A.O.B; SOUSA, J.A; GUERRA, F.Q.S; LIMA, E. O. Evaluation of Antifungal Activity and Mechanism of Action of Citral against *Candida albicans*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. [v. 53](#), p. 275-284, 2014.

LEPORATTI, M.L.; PINTORE, G.; FODDAI, M.; CHESSA, M.; PIANA, A.; PATRETTO, G.L.; MASIA, M.D.; NICOLETTI, M. Chemical, biological, morphoanatomical and antimicrobial study of *Ocotea puchury-major* Mart. **Natural Product Research**, v. 28, p. 294-300, 2014.

LEWIS, R.E.; DIEKEMA, D.J.; MESSER, S.A .; PFALLER, M.A.; KLEPSE M.E. Comparasion of E-teste, chequerboard dilution and time-kill studies for the detection or synergy or antagonism between antifungal agents tested against *Candida* species. **Journal of Antimicrobial Chamotherapy**, v, 49, p. 345-351, 2002.

LOPES, G; PINTO, E; ANDRADE, P. B; VALENTÃO, P. Antifungal activity of phlorotannins against dermatophytes and yeasts: approaches to the mechanism of action and influence on *Candida albicans* virulence factor. **PLoS ONE**, v 8, n. 8, 72203, 2013.

LÓPEZ-MARTÍNEZ, R. Candidosis, a new challenge. **Clinics in Dermatology**, v. 28, n.2, p. 178–184, 2010.

LI, H.; ZHANG, C.; CHEN, Z.; SHI, W.; SUN, S. A promising approach of overcoming the intrinsic resistance of *Candida krusei* to fluconazole (FLC)-- combining tacrolimus with FLC. **FEMS Yeast Research**, v. 14, n. 5, p. 808-811, 2014.

LIM, C.S; ROSLI, R; SEOW, H.F; CHONG, P.P. Candida and invasive candidiasis: back to basics. **European Journal of Clinical Microbiology & Infections Diseases**, v.31, n.1, p. 21-

31, 2012.

LIMA, E.O. Plantas e suas propriedades antimicrobianas: uma breve análise histórica. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal. Chapecó: Argos. p. 481501. 2001.

LUPETTI, A; DANESEI, R; CAMPA, M; DEL TACCA, M; KELLY, S. Molecular basis of resistance to azole antifungals. **Trends in Molecular Medicine**, v.8, n.2, p.76-81, 2002.

LIMA E.O; CASTRO, R.D. Atividade antifúngica dos óleos essenciais de sassafrás (*Ocotea odorifera* Vell.) e alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) sobre o gênero *Candida*, **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**. v.13, n.2, p.203-208, 2011.

MALONE, R.A. Pharmacological Approach To Natural Products Screening and Evaluation. In: Warner. H; Wolf, P. New Natural Products and Plant Drugs with Pharmacological. **Biological for Therapeutically Activity**. Springer – Verlag: Berlim, 1977, 21-33p.

MARTINS N.; FERREIRA, I. C. F. R; BARROS, L; SILVA, S; HENRIQUES, M. Candidiasis: predisposing factors, prevention, diagnosis and alternative treatment. **Mycopathologia**, v. 177, n. 5-6, p. 223–240, 2014.

MARTINS N, B. L.; HENRIQUES M, SILVA S. Activity of phenolic compounds from plant origin against *Candida*. **Industrial Crops and Products**, v. 74, p. 648-670, 2015.

MARQUES, C.A. Importância econômica da família Lauraceae Lindl., **Floresta e ambiente**, v.8, p. 195–206, 2001.

MATOS, F. J. A. Introdução à fitoquímica experimental. 3. ed. Fortaleza: Editora da Universidade Federal do Ceará, 2009.

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

MCCARTY, T. P.; PAPPAS, P. G. Invasive Candidiasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v.30, p.103-124, 2015.

MEDRANO, D.J.; BRILHANTE, R.S.; CORDEIRO RDE, A.; ROCHA, M.F.;RABENHORST, S.H.; SIDRIM, J.J. Candidemia in a Brazilian hospital: the importance of *Candida parapsilosis*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 48, p. 17-20, 2006.

MENUT, C; BESSIÈRE, J.M; SAID HASSANI, M; BUCHBAUER, G; SCHOPPER, B. Chemical and biological studies of *Ocotea comoriensis* Bark Essential Oil: Bark essential oil of *Ocotea comoriensis*, **Flavour Fragrance Journal** v. 17 p. 459–461, 2002,

MEZ, C. Lauraceae Americanae monographice descripsit. **Jarbusch des Königlichen botanischen Gartens und botanischen Museums zu Berlin**, v. 5, p.1-556, 1989.

MORACE, G.; PERDONI, F.; BORGHI, E. Antifungal drug resistance in *Candida* species. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 2, n. 4, p. 254-259, 2014.

- MORAES, P.L.R. 2007. Taxonomy of *Cryptocarya* species of Brazil. Bélgica: **Abc Taxa**. 191p.
- MORAES, P.L.R.; VAN DER WERFF, H. Five new species of *Ocotea* (Lauraceae) from Bahia, Brazil. **Harvard Papers in Botany** v. 16, n.1, p.143-155, 2011
- MOSSI, A.J; ZANELLA, C.A; KUBIAK, G; LERIN, L.A; CANSIAN, R.L; FRANDOLOSO F.S. Essential oil of *Ocotea odorifera*: An alternative against *Sitophilus zeamais*. **Renewable Agriculture Food Systems** v. 29 p. 161–166, 2014.
- MURRAY, P.R. Micoses Oportunistas. In: MURRAY, P.R.; ROSERTHAL, K.S.; PFALLER, M.A. **Microbiologia médica**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. cap 74, p. 728-751.
- NAGLICK J, CHAKKACOMBE S, HUBE B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. **American Society of Microbiology**, v.67, n. 400-428, 2003.
- NARANJO, P; KIJOA, A; GIESBRECHT, A.M; GOTTLIEB, O.R. *Ocotea quixos*, *American cinnamon*, Journal Ethnopharmacology, v.4, p. 233–236, 1981.
- NETO, J.B.; DA SILVA, C.R.; NETA, M.A.S.; CAMPOS, R.S.; SIEBRA, J.T. Antifungal activity of naphthoquinoidal compounds *in vitro* against fluconazole-resistant strains of different *Candida* species: a special emphasis on mechanisms of action on *Candida tropicalis*. **PloS One**, v. 9, n. 5, 2014.
- NGUYEN, L. D.; VISCOGLIOSI, E.; DELHAES, L. The lung mycobiome: an emerging field of the human respiratory microbiome. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 89, 2015.
- NÓBREGA, H. N.; FERREIRA, J. A. B.; ROMÃO, C. M. C. P. A.; CAPASSO, I. R. V.F. Atividade antimicrobiana *in vitro* de produtos antissépticos por meio de técnica *time kill*. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 72, n. 3, p. 226-233, 2013
- NUCCI, M.; COLOMBO, A.L. Candidemia due to *Candida tropicalis*: clinical, pidemiologic, and microbiologic characteristics of 188 episodes occurring in tertiary care hospitals. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.58, p.77–82, 2007.
- ODDS, F. C.; BROWN, A. J.; GOW, N. A. Antifungal agents: Mechanism of action. **Trends in microbiology**, v. 11, p. 272-279. 2003.
- OLIVERO-VERBEL, J.; CERVERA, GT.; FERNANDEZ, GJ.; COLORADO, J.B.; STASHENKO, E. Chemical composition and antioxidant activity of essential oils isolated from Colombian plants. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, p. 568-574, 2010.
- OLTRAMARI, A.C.; WOOD KV, BONHAM C, VERPOORTE R, CARO MSB, VIANA AM, PEDROTTI EL, MARASCHIN RP AND MARASCHIN M. 2004. Safrole analysis by GC-MS of prototrophic (*Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer) cell cultures. PCTOC 78: 231-235.
- ORHAN, D. D.; OZEÇELIK, B.; OZGEN, S.; ERGUN, F. Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of some flavonoids. **Microbiological Research**, v. 165, n. 6, p. 496-504, 2010.

- PAPON, N; COURDAVAULT, V; CLASTRE, M; BENNETT, R.J. Emerging and emerged pathogenic *Candida* species: beyond the *Candida albicans* paradigm. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 9, p. 1-4, 2013.
- PASQUALOTTO, A. C.; NEDEL, W. L.; MACHADO, T. S.; SEVERO, L. C. A 9-year study comparing risk factors and the outcome of paediatrics and adults with nosocomial candidaemia. **Mycopathologia**, v. 160, p. 111-116, 2005.
- PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; GIBBIS, D. L.; NEWELL, V. A.; NAGY, E.; DOBIASOVA, S.; RINALDI, M.; BARTON, R.; VESELOV, A. *Candida krusei*, a multidrug-resistant opportunistic fungal pathogen: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005. **J. Clin. Microbiol.**, v. 46, n. 2, p. 515-521, 2008.
- PFALLER, M. A; ANDES, D; DIEKEMA, D.J; ESPINEL-INGROFF, A; SHEEHAN, D. Wild-type MIC distributions, epidemiological cutoff values and species- specific clinical breakpoints for fluconazole and *Candida*: Time for harmonization of CLSI and EUCAST broth microdilution methods. **Drug Research Updates**, v.13, n.180, p.180-195, 2010.
- PFALLER, M. A. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. **American Journal of Medicine**, v. 125, n. 1 Suppl, p. S3-13, Jan 2012.
- PFALLER, M. A; RHOMBERG, P.R; MESSER, S.A; JONES, R.N; CASTANHEIRA, M. Isavuconazole, micafungin, and 8 comparator antifungal agent' susceptibility profiles for common and uncommon opportunistic fungi collected in 2013: temporal analysis of antifungal drug resistance using CLSI species-specific clinical breakpoints and proposed epidemiological cutoff values. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 82, n. 4, p. 303-13, 2015.
- PFALLER, M.A.; SHEEMAN, D.J.; REX, J.H. Determination of fungicidal activities against yeasts and molds: lessons learned from bactericidal testing and the need for standardization. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n.2, p. 268-280, 2004.
- PIETRELLA, D; ANGIOLELLA, L; VAVALA, E; RACHINI, A; MONDELLO, F; RAGNO, R; BISTONI, F; VECCHIARELLI, A. Beneficial effect of *Mentha suaveolens* essential oil in the treatment of vaginal candidiasis assessed by real- time monitoring of infection. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 11, p.11-18, 2011.
- QUINDÓS, G. Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 31, n. 1, p. 42-48, 2014.
- QUINET, A.; BAITELLO, J.B.; MORAES, P.L.R. DE; ASSIS, L.; ALVES, F.M. Lauraceae in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB8440>>. Acesso em: 01 Ago. 2016.
- QUINET, A.; BAITELLO, J.B.; MORAES, P.L.R. DE; ASSIS, L.; ALVES, F.M. Lauraceae in **Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB8440>>. Acesso em: 05 Jan. 2017

RAMOS, M.A.S. *Syngonanthus nitens* (Bong.) Ruhland: Caracterização biológica e prospecção terapêutica do extrato metanólico incorporado ou não em sistema nanoestruturado para aplicação no tratamento da candidíase vulvovaginal. 2015. 170 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2015.

RAMSEY, D.T; PAPA, E.R; WAGNER-MANN, C; BERG, J.N; SWAIM, S.F Effects of three occlusive dressing materials on healing of fullthickness skin wounds in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v.56, n.7, p.941-9, 1995.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603–613, 2001.

RIBEIRO, J. E. L. S.; HOPKINS, M. J. G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C. A.; COSTA, M. A. DA S.; BRITO, J. M.; MARTINS, L. H., P.; LOHMANN, L.G.; ASSUNÇÃO, P. A. C. L.; PEREIRA, E. C.; SILVA, C. F.; MESQUITA, M. R.; PRÓSCÓPIO, L. C. Flora da Reserva Ducke: Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central. Pp. 151, Manaus, INPA, 1999.

RICHARDSON M, LASS-FLÖRL C. Changing epidemiology of systemic fungal infections. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, n.4, p. 5-24, 2008.

RIBAS, R. K. C. Produção e caracterização de uma lipase alcalina secretada por um isolado de *Candida parapsilosis*. 2012. 93 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

RESCHKE, A.; MARQUES, L.M.; MAYWORM, M.A.S. Atividade antibacteriana de *Ficus benjamina* L. (Moraceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 9, n. 2, p. 67-70, 2007.

ROEMER, T.; KRYSAN, D. J. Antifungal drug development: challenges, unmet clinical needs, and new approaches. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 4, n. 5, 2014.

ROHWER, J.G. Prodromus einer Monographie der Gattung *Ocotea* Aubl. (Lauraceae), *sensu lato*. **Mitteilungen aus dem Institut für Allgemeine Botanik**. Hamburg: v. 2, p. 1-278, 1986.

ROHWER, J.G. *Lauraceae*, in *Flowering Plants · Dicotyledons*, K. Kubitzki, J.G. Rohwer and V. Bittrich, eds., Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, p. 366–391, 1993.

ROHWER, J.G. Lauraceae. In: K. Kubitzki, J.G.; Rohwer & V. Bittrich (eds.). **The Families and Genera of Vascular Plants**. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, GmbH. v. 2, p.366-391, 2013.

RUBIÓ, L; MOTIVA, M.-J.; ROMERO, M.-P. Recent advances in biologically active compounds in herbs and spices: a review of the most effective antioxidant and anti-inflammatory active principles. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 53, n. 9, p. 943–953, 2013.

SALEEM, M.; NAZIR, M.; ALI, M. S.; HUSSAIN, H.; LEE, Y. S.; RIAZ, N., JABBAR, A. Antimicrobial natural products: an update on future antibiotic drug candidates. **Natural**

**Products Reports.**,v. 27, p. 238–254, 2010.

SANGUINETTI, M.; POSTERARO, B.; LASS-FLÖRL, *Candida* Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact. **Mycoses**, v. 58 Suppl 2, p. 2-13, 2015.

SANTOS, J.C.; UCHÔA NETO, C.A.M.; CARNEIRO, R.S; ALBUQUERQUE, T.C.A. Diagnóstico das reservas ecológicas da região metropolitana do Recife. Secretaria de Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco, Recife. 79p, 2001.

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

SARTORATTO, A.; MACHADO, A.L.M.; DELARMELINA, C. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 75, n. 2, p. 213-267, 2011.

SAVOIA, D. Plant-derived antimicrobial compounds: alternatives to antibiotics. **Future Microbiology.**, v. 7, n. 8, p. 979-990, 2012.

SCORZONI, L.; BENADUCCI, T.; ALMEIDA, A.M.F.; SILVA, D.H.S.S.; BOLZANI, V .S.; GIANINNI, M. J. S. M. The use of standard methodology for determination of antifungal activity of natural products against medical yeasts *Candida* sp and *Cryptococcus* sp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 391-397, 2007.

SILVA, S.; NEGRI, M.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D. W.; AZEREDO, J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*:biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS Microbiology Review.**, v. 36, p. 288–305, 2012.

SIMÕES, C. M; SPITZER V. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ª. ed.; UFRGS: Porto Alegre, 2007.

SINGARAVELU, K.; GÁCSEER, A.; NOSANCHUK, J. D. Genetic determinants of virulence - *Candida parapsilosis*. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 31, n. 1, p. 16–21, 2014. SCIENCE PHOTO LIBRARY. *Candida albicans*. Disponível em:<<http://www.sciencephoto.com/media/13711/view>>. Acesso em: 24. junho. 2016a.

SCIENCE PHOTO LIBRARY. *Candida parapsilosis*. Disponível em: < <http://www.sciencephoto.com/media/13695/view> >. Acesso em: 24. junho. 2016b.

SCHMALRECK, A.F; WILLINGER, B; HAASE, G; BLUM, G; LASS-FLORL C; FEGELER, W; BECKER, K. Species and susceptibility distribution of 1062 clinical yeast isolates to azoles, echinocandins, flucytosine and amphotericin B from a multi-centre study for the Antifungal Susceptibility Testing (AFST) Study Group. **Mycoses**, v.55, p.124–137. 2012.

SCHUSTER, M. G.; MEIBOHM, A.; LLOYD, L. STROM, B. Risk factors and

outcomes of *Candida krusei* bloodstream infection: a matched, case-control study. **Journal of Infection**. v. 66, n. 3, p. 278-284, 2013.

SEABRA, C. L. Estudo de fatores de virulência de culturas mistas de *Candida albicans* e *Candida parapsilosis* após adesão a uma superfície abiótica. Bragal [Dissertação de Mestrado em Engenharia Biomédica – Universidade do Minho, Portugal], 2011.

SELMECKI, A.; FORCHE, A.; BERMAN, J. Genomic plasticity of the human fungal pathogen *Candida albicans*. **Eukaryotic Cell**, v.9, n.7, p.991-1008, 2010.

SHEIKH N, JAHAGIRDAR V, KOTHADIA S, NAGOBA B. Antifungal Drug Resistance in *Candida* Species. **European Journal General Medicine** v.10, p. 254-258, 2013.

SILVA, D. F. **Avaliação da atividade biológica de  $\beta$ - citronelol sobre *Candida albicans***. 2016. 62f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais Sintéticos e Bioativos – Farmacologia) Universidade Federal da Paraíba, 2016.

SILVA, M. B.; MORANDI, M. A. B.; PAULA JÚNIOR, T. J.; VENZON, M.; FONSECA, M. C. M. Uso de princípios bioativos de plantas no controle de fitopatógenos e pragas. **Informe Agropecuário**, v. 31, n. 255, p. 70-77, 2010.

SPAMPINATO, C.; LEONARDI, D. *Candida* infections, causes, targets, and resistance mechanisms: traditional and alternative antifungal agents. **BioMed Research International**, p. 1-13, 2013.

SRINIVASAN, A.; LOPEZ-RIBOT, J.L.; RAMASUBRAMANIAN, A.K. Overcoming antifungal resistance. **Drug Discovery Today: Technologies**, v.11, p. 65-71, 2014.

TAFF, H. T; MITCHELL, K.F EDWARD, J.A; ANDES, D.R. Mechanisms of *Candida* biofilm drug resistance. **Future Microbiology**, v. 8, n. 10, p. 1325-1337, 2013.

TAKAKU, S; HABER, W.A; SETZER, W.N. Leaf essential oil composition of 10 species of *Ocotea* (Lauraceae) from Monteverde, Costa Rica. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, p. 525–532, 2007.

TAJ-ALDEEN, S. J; KOLECKA, A; BOESTEN, R; ALOLAGI, A; ALMASLAMANI, M; CHANDRA, P; MEIS, J,F; BOEKHOUT, T. Epidemiology of candidemia in Qatar, the Middle East: Performance of MALDI-TOF MS for the identification of *Candida* species, species distribution, outcome, and susceptibility pattern. **Infection**, v. 42, n. 2, p. 393–404, 2014.

TAMURA, N.K.; NEGRI, M.F.N.; BONASSOLI, L.A.; SVIDZINSKI, T.I.E. Fatores de virulência de *Candida spp.* isoladas de cateteres venosos e mãos de servidores hospitalares. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n.1, p. 91-93, 2007.  
THE PLANT LIST. 2016.

THOMPSON, D. S.; CARLISLE, P. L.; KADOSH, D. Coevolution of morphology and virulence in *Candida* species. **Eukaryotic Cell**, v. 10, n. 9, p. 1173-1182, 2011.  
TRINDADE, M.B.; LINS-E-SILVA, A.C.B.; SILVA, H.P.; FIGUEIRA, S.B. &

SCHESSEL, M. Fragmentation of the Atlantic rainforest in the northern coastal region in Pernambuco, Brazil: recent changes and implications for conservation. **Bioremediation, Biodiversity and Bioavailability** v.2, p.5-13, 2008.

TROFA D, GACSER A, NOSANCHUK J. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. **American Society Microbiology** v. 21, p. 606-625, 2008.

TSANG, P. W.; BANDARA, H. M.; FONG, W. P. Purpurin suppresses *Candida albicans* biofilm formation and hyphal development. **PLoS One**, v. 7, n. 11, p. 1- 8, 2012.

TYAGI, A. K.; MALIK, A. Liquid and vapour-phase antifungal activities of selected essential oils against *Candida albicans*: microscopic observations and chemical characterization of *Cymbopogon citratus*. **BMC Complement. Alternative Medicine**. v. 10, p. 1-11, 2010.

TYAGI, A. K.; MALIK, A. Antimicrobial potential and chemical composition of Eucalyptus globulus oil in liquid and vapour phase against food spoilage microorganisms. **Food Chemistry**, v. 126, p. 228-235, 2011.

UCHÔA NETO, C.A.M; TABARELLI, M. Diagnóstico e estratégia de conservação do centro de endemismo Pernambuco. CEPAN, Recife. 69p, 2002.

VAN DER WERFF, H. A key to the genera of Lauraceae in the new world. **Annals of the Missouri Botanical Garden** v.78, p. 377-387, 1991.

VAZQUEZ, J.A Combination antifungal therapy for mold infections: much ado about nothing? **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, n. 12, p. 1889–1901, 2008.

VIEIRA, D. R. P.; AMARAL, F. M. M.; MACIEL, M. C. G.; NASCIMENTO, F. F. R.F.; LIBÉRIO, A. S. Plantas e constituintes químicos empregados em Odontologia: revisão de estudos etnofarmacológicos e de avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* em patógenos orais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai.**, v.16, n.1, p.135-167, 2014.

VAN DEN Dool, H; DEC KRATZ, P. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography A** v.11, p. 463–471, 1963.

VYLKOVA, S.; LORENZ, M. C. Modulation of phagosomal pH by *Candida albicans* promotes hyphal morphogenesis and requires Stp2p, a regulator of amino acid transport. **PLoS Pathog.**, v. 10, n. 3, p. 1-13, 2014.

WALKER, L.A.; MUNRO, C.A.; DE BRUIJIN, I.; LENARDON, M. D.; MCKINNON, A.; GOW, N. Stimulation of chitin synthesis rescues *Candida albicans* from echinocandins. **PLoS Pathogens**, v.4, 2008.

WALKER, G.; WHITE, N.A. **Introduction to fungal physiology**. Fungi: biology and applications. England: John Wiley & Sons Ltd., 2005, p.1-10.

WHIBLEY, N.; GAFFEN, S. L. Beyond *Candida albicans*: Mechanisms of immunity to non-*Candida albicans* species. **Cytokine**, v. 76, n. 1, p. 42-52, 2015.

WEBSTER, D.; TASCHEREAU, P.; BELLAND, R.J.; SAND, C.; RENNIE, R.P. Antifungal activity of medicinal plant extracts; preliminary screening studies. **J. Ethnopharmacology**, v. 115, n. 1, p. 140-146, 2008.

WEI, G. X.; XU, X.; WU, C. D. In vitro synergism between berberine and miconazole against planktonic and biofilm *Candida* cultures. **Archives Oral Biology**. v. 56, p. 565-572, 2011.

WILLIAM D.W; SILVA T.S; LEWIS, MAO. *Candida* Biofilms and Oral Candidosis: Treatment and Prevention. **Periodontology** v.55, p. 250-265, 2011.

XIE J.L; POLVI E.J; GUTURJA T.S. Elucidating Drug Resistance in Human Fungal Pathogens. **Future microbiology** v.9, p. 523-542, 2014.

XU, C.; WANG, JIAGENG, W.; GAO, Y.; LIN, H.; YANG, S. The anthracenedione compound bostrycin induces mitochondria-mediate apoptosis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, v. 10, n. 3, p. 297-308, 2010.

XUE, J., DAVIDSON, P. M; ZHONG, Q. Thymol nanoemulsified by whey protein-maltodextrin conjugates: the enhanced emulsifying capacity and antilisterial properties in milk by propylene glycol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 61, p. 12720-12726, 2013.

YAPAR, N. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. **Journal of Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 10, p. 95-105, 2014.

YAMAGUCHI, K.K.L.; ALCANTARA, J.M.; LIMA, E.S.; VEIGA-JUNIOR, V.F. Chemical composition and platelet aggregation activity of essential oils of two species of the genus *Ocotea* (Lauraceae). **Journal of Essential Oil Bearing Plants** v. 16, p. 518-523, 2013.

ZAITZ, C. et al. **Compêndio de Micologia Médica**. 2. Rio de Janeiro: GUANABARA KOOGAN, 2010. 432p.

ZSCHOCKE, S; DREWES, S; PAULUS, K; BAUER, R; VAN STADEN, J. Analytical and pharmacological investigation of *Ocotea bullata* (black stinkwood) bark and leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, n.71, p. 219–230, 2000.