

**LUIZ FRANCISLEY DE PAIVA**

***Cymbopogon citratus* (DC) STAPF  
COMBINADO COM NISTATINA  
FRENTE À LEVEDURAS DE CAVIDADE  
ORAL**

Trabalho Final do Mestrado Profissional,  
apresentado à Universidade do Vale do  
Sapucaí, para obtenção do título de Mestre  
em Ciências Aplicadas à Saúde.

**POUSO ALEGRE  
2019**

**LUIZ FRANCISLEY DE PAIVA**

***Cymbopogon citratus* (DC) STAPF  
COMBINADO COM NISTATINA  
FRENTE À LEVEDURAS DE CAVIDADE  
ORAL**

Trabalho Final do Mestrado Profissional,  
apresentado à Universidade do Vale do  
Sapucaí, para obtenção do título de Mestre  
em Ciências Aplicadas à Saúde.

ORIENTADORA: Profa. Dra. Ana Beatriz Alkmim Teixeira Loyola  
COORIENTADORA: Profa. Dra. Angélica Cristina de Souza  
COORIENTADOR: Prof. Dr. Taylor Brandão Schnaider

**POUSO ALEGRE  
2019**

Paiva, Luiz Francisley de

*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf combinado com nistatina frente à leveduras de cavidade oral / Luiz Francisley de Paiva – Pouso Alegre: Univás, 2019. x, 88f. : il.

Trabalho Final do Mestrado Profissional em Ciência Aplicada à Saúde, Universidade do Vale do Sapucaí, 2019.

Título em inglês: *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf combined with nystatin against oral cavity yeasts.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Beatriz Teixeira Loyola  
Coorientadora: Profa. Dra. Angélica Cristina de Souza  
Coorientador: Prof. Dr. Taylor Brandão Schnaider

1. Candidíase bucal. 2. Fatores de Virulência. 3. Nistatina. 4. Sinergismo Farmacológico. 5. Plantas medicinais.

CDD: 615.321

**UNIVERSIDADE DO VALE DO SAPUCAÍ**

**MESTRADO PROFISSIONAL EM  
CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE**

**COORDENADORA:** Profa. Dra. Adriana Rodrigues dos Anjos Mendonça

**Linha de Atuação Científico-Tecnológica:** Fitoterapia e Plantas Medicinais em Lesões Teciduais.

## DEDICATÓRIA

Dedico a minha família, minha mãe **LUZIA LÚCIA VILAS BOAS**, pela educação que me foi conferida desde pequeno e que até hoje ainda é ensinada. Por sempre rezar por mim pedindo a Deus que me ajudasse e iluminasse meu caminho. Ao meu pai **LUIZ GONZAGA DE PAIVA** (*in memoriam*) pelos ensinamentos de vida. Por me ensinar muitas coisas dentre elas o bom caráter que um homem deve ter. Por ser alegre, descontraído e por me mostrar dessa forma que não só existem problemas. Aos meus irmãos, **DANILO FLAVIANO DE PAIVA** e **FERNANDA DANIELE DE PAIVA** pelo incentivo, pelo carinho e por tudo que fizeram por mim. Aos meus adoráveis sobrinhos **JADE DE PAIVA CARDOSO**, **PÉTTRIUS VILAS BOAS DE PAIVA CARDOSO** e **THÉO LIMA PAIVA**, obrigado por existirem.

À minha cúmplice e amada esposa **FRANCISLENE BORGES DE PAIVA**, que no pior momento da minha vida, me deu forças e motivos pra aguentar e continuar firme. Por ter me apoiado sempre e por cuidar de mim com muito zelo, amor e carinho. E por ter me dado a jóia mais rara deste mundo, minha filhinha **MANUELA BORGES DE PAIVA**, a flor mais bela do meu jardim. Não conseguiria sem vocês!

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **DEUS**, pela força nas horas difíceis, por sempre me mostrar soluções inteligentes diante dos problemas e principalmente por colocar pessoas boas no meu caminho que muito me ajudaram.

À minha orientadora Professora Dra. **ANA BEATRIZ ALKMIN TEIXEIRA LOYOLA** por acreditar em mim e por todos esses anos de confiança e amizade. Obrigado por toda ajuda, e eu sei que são muitas. Ao professor Dr. **TAYLOR BRANDÃO SCHNAIDER**, coorientador, obrigado por todo o auxílio. Ao professor Dr. **MARCOS MESQUITA FILHO**, pelas análises estatísticas.

Agradeço também minha nova amiga que muito me ajudou com coorientações nesta pesquisa, a professora Dra. **ANGÉLICA CRISTINA DE SOUZA** do Laboratório de Biologia Molecular do departamento de Ciências dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Obrigado pela receptividade, pela paciência, por toda a ajuda e pela orientação que você me deu no processo de identificação das leveduras. Ao professor Dr. **DISNEY RIBEIRO DIAS** do departamento de Microbiologia de Alimentos (UFLA) que atendeu meu pedido para utilização do aparelho MALDI-TOF de forma conciliadora e prestativa, e também a Dra. **LIDIANY MENDONÇA ZACARONI LIMA** do Laboratório de Química Orgânica – Óleos Essenciais do departamento de Química (UFLA), pela ajuda na identificação e quantificação dos compostos fitoquímicos.

Ao técnico de laboratório **JOSÉ DONIZETI DOS REIS**, funcionário do Laboratório de Botânica da UNIVÁS por sua indispensável ajuda na extração do óleo de *Cymbopogon citratus*. A **JUSCÉLIA DIAS ROSA**, dentista e ex-aluna do mestrado, pela doação de fotos de candidíase oral que ilustra este estudo. Aos alunos de iniciação científica, **BRUNA DE GODOY SIGALA**, **DANILO FLAVIANO DE PAIVA** e **MARIANA GAZZINELLI MAIOLINI**. Obrigado por me ajudar a realizar partes da pesquisa.

À minha chefe **SOLANGE RIBEIRO MORAES** pela confiança e amizade ao longo desses anos, por me ajudar a conciliar os horários de trabalho das aulas do mestrado, por sempre me ajudar, acreditar e torcer por mim.

Aos docentes do **MESTRADO PROFISSIONAL EM CIÊNCIAS APLICADAS A SAÚDE**, por compartilharem conhecimentos, pelo apoio e incentivo nesses anos, pela amizade e carinho que levarei comigo para sempre. E em especial, a professora Dra. **DANIELA FRANCESCATO VEIGA**, uma pessoa incrível que tive o prazer de conhecer. Gentil, muito inteligente e que me ajudou muito e eu nunca vou esquecer-me disso. Muito obrigado!

*“Os benefícios da ciência não são para os cientistas, e sim para humanidade!”.*

Louis Pasteur

(1822 – 1895)

## SUMÁRIO

<b>1 CONTEXTO</b> .....	1
1.1 Candidíase oral.....	1
1.2 Terapia antifúngica.....	5
1.3 <i>Cymbopogon citratus</i> (DC) Stapf.....	8
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	11
2.1 Objetivo geral.....	11
2.2 Objetivos específicos.....	11
<b>3 MÉTODOS</b> .....	12
3.1 Delineamento do estudo.....	12
3.2 Aspectos éticos.....	12
3.3 Local de estudo.....	12
3.4 Casuística.....	12
3.5 Critérios de inclusão.....	12
3.6 Critérios de não Inclusão.....	13
3.7 Critérios de exclusão.....	13
3.8 Extração do óleo essencial de <i>Cymbopogon citratus</i> (DC) Stapf.....	13
3.8.1 Obtenção do material botânico.....	13
3.8.2 Determinação do teor de umidade.....	13
3.8.3 Extração do óleo essencial.....	14
3.8.4 Determinação do rendimento do óleo essencial.....	14
3.8.5 Caracterização físico-química do óleo essencial.....	15
3.8.5.1 Determinação da densidade relativa $d_{20}^{20}$ .....	15
3.8.5.2 Determinação do índice de refração $n_d^{20}$ .....	15
3.8.5.3 Solubilidade em etanol.....	15
3.8.5.4 Cor e aparência.....	16
3.8.5.5 Identificação e quantificação dos constituintes químicos do óleo essencial.....	16
3.9 Reativação e estocagem das linhagens fúngicas.....	16
3.10 Identificação das leveduras.....	17
3.10.1 Método cromogênico.....	17
3.10.2 Métodos fenotípicos.....	17
3.10.2.1 Prova do tubo germinativo.....	17
3.10.2.2 Prova da filamentação em Agar Fubá.....	18
3.10.2.3 Auxanograma e zimograma.....	18

3.10.2.3.1	Assimilação de fontes de carbono e nitrogênio (Auxanograma).....	18
3.10.2.3.2	Fermentação de fontes de carbono (Zimograma).....	19
3.10.2.4	<i>Hidrólise da ureia</i> .....	19
3.10.2.5	<i>Diferenciação de Candida dubliniensis de Candida albicans</i> .....	20
3.10.2.5.1	<i>Preparo das amostras</i> .....	20
3.10.2.5.2	<i>Cultivo termotolerante à 42°C e 45°C</i> .....	20
3.10.2.5.3	<i>Cultivo em meio hipertônico</i> .....	21
3.10.3	Espectrometria de massa (MALDI-TOF MS).....	21
3.11	Pesquisa de exoenzimas.....	22
3.11.1	Padronização do inóculo.....	22
3.11.2	Preparo das placas com meio indutor.....	22
3.11.3	Pesquisa de protease.....	23
3.11.4	Pesquisa de fosfolipase.....	23
3.11.5	Pesquisa de hemolisina.....	23
3.11.6	Cálculo da zona da atividade enzimática.....	24
3.12	Perfil de sensibilidade aos antifúngicos.....	24
3.12.1	Solução-padrão de antifúngico.....	24
3.12.2	Meio de cultura.....	24
3.12.3	Padronização do inóculo.....	25
3.12.4	Preparação da placa de diluição.....	25
3.12.5	Execução do teste e leitura da concentração inibitória mínima – CIM.....	25
3.13	Susceptibilidade antifúngica ao óleo essencial de <i>Cymbopogon citratus</i> (DC) Stapf.....	26
3.13.1	Solução estoque de óleos essenciais.....	26
3.13.2	Execução do teste e leitura da CIM.....	26
3.14	Concentração fungicida mínima – CFM .....	26
3.15	Ensaio de sinergismo do óleo essencial de <i>Cymbopogon citratus</i> (DC) Stapf associado com nistatina – Método de <i>Checkerboard</i> .....	27
3.16	Análises estatísticas.....	27
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>28</b>
4.1	Caracterização físico-químico e rendimento da extração do óleo essencial.....	28
4.2	Identificação e quantificação dos constituintes químicos do óleo essencial.....	28
4.3	Identificação das leveduras.....	30
4.4	Atividade enzimática.....	31

4.4.1	Atividade proteolítica.....	31
4.4.2	Atividade fosfolipídica.....	32
4.4.3	Atividade hemolítica.....	33
4.5	Susceptibilidade aos antifúngicos.....	34
4.5.1	Fluconazol.....	34
4.5.2	Itraconazol.....	35
4.5.3	Nistatina.....	36
4.5.4	Correlação da susceptibilidade antifúngica entre os fármacos.....	37
4.5.4.1	Fluconazol x itraconazol.....	37
4.5.4.2	Fluconazol x nistatina.....	37
4.5.4.3	Itraconazol x nistatina.....	38
4.6	Susceptibilidade antifúngica de leveduras frente ao óleo essencial.....	39
4.7	Concentração fungicida mínima do óleo essencial.....	41
4.8	Avaliação da associação do óleo essencial junto com nistatina frente às leveduras - Método de <i>Checkerboard</i> .....	43
4.9	Produto.....	44
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	45
5.1	Aplicabilidade.....	55
5.2	Impacto social.....	56
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	57
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	58
	<b>ANEXOS</b> .....	78
	Anexo 1 – Parecer consubstanciado do CEP.....	78
	Anexo 2 – Meios de cultura.....	81
	Anexo 3 – Tabela com as características de leveduras mais comumente encontradas em laboratório clínico.....	88

## RESUMO

**Contexto:** A candidíase bucal é a doença infecciosa micótica mais comum e prevalente na maioria dos pacientes com algum grau de imunossupressão. É causada principalmente por espécies do gênero *Candida* spp. **Objetivo:** Avaliar a atividade antifúngica de *Cymbopogon citratus* e sua combinação com nistatina frente a leveduras de cavidade oral. **Métodos:** O óleo essencial foi extraído pelo método do arraste a vapor e seus constituintes foram quantificados. As leveduras foram identificadas e o potencial patogênico assim como o perfil de resistência aos antifúngicos foram verificados. A sensibilidade ao óleo essencial e sua associação com nistatina foi verificada pelos métodos de concentração inibitória mínima e pelo método de *Checkerboard*. **Resultados:** Foram encontrados 84,53% de citral presente no óleo essencial. Um total de 64,77% das cepas foram identificadas como *Candida albicans*. 89,26% dos isolados produziram hemolisina. Também foram encontradas atividade de fosfolipase e protease. Apenas 1% dos isolados foram resistentes ao fluconazol enquanto que 9,73% foram resistentes a itraconazol. Para nistatina, 83,55% dos isolados tiveram sua inibição em concentrações  $\geq 16 \mu\text{g/mL}$ . O óleo de *C. citratus* foi capaz de inibir e matar todos os isolados testados com concentrações que variaram de 0,137 a 2,2 mg/mL. A associação do óleo e nistatina teve um efeito de aditividade em mais de 78% das cepas. **Conclusão:** O óleo essencial da planta *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf apresenta ação fungistática e fungicida contra leveduras de cavidade oral. A associação deste fitoterápico à nistatina potencializou o efeito antifúngico em amostras isoladas de pacientes oncológicos.

**Palavras-chave:** Candidíase Bucal; Fatores de Virulência; Nistatina; Sinergismo Farmacológico; Plantas Medicinais.

## ABSTRACT

**Context:** Oral candidiasis is the most common mycotic infectious disease prevalent in most patients with some degree of immunosuppression. It is mainly caused by species of the genus *Candida* spp. **Objective:** To evaluate the antifungal activity of *Cymbopogon citratus* and its combination with nystatin against oral cavity yeast. **Methods:** The essential oil was extracted by the steam drag method and its constituents were quantified. The yeasts were identified and the pathogenic potential as well as the antifungal resistance profile were verified. Sensitivity to essential oil and its association with nystatin was verified by the minimum inhibitory concentration methods and the Checkerboard method. **Results:** We found 84.53% of citral present in the essential oil. A total of 64.77% of the strains were identified as *Candida albicans*. 89.26% of the isolates produced hemolysin. Phospholipase and protease activity were also found. Only 1% of the isolates were resistant to fluconazole while 9.73% were resistant to itraconazole. For nystatin, 83.55% of isolates were inhibited at concentrations  $\geq 16 \mu\text{g/mL}$ . *C. citratus* oil was able to inhibit and kill all isolates tested with concentrations ranging from 0.137 to 2.2 mg/mL. The combination of oil and nystatin had an additive effect on more than 78% of strains. **Conclusion:** The essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf plant has fungistatic and fungicidal action against oral cavity yeasts. The association of this herbal medicine with nystatin potentiated the antifungal effect in samples isolated from cancer patients.

**Keywords:** Oral Candidiasis; Virulence Factors; Nystatin; Drug Synergism; Medicinal Plants.

## 1 CONTEXTO

### 1.1 Candidíase oral.

A candidíase ou candidose bucal é uma doença infecciosa fúngica orofaríngea mais comum (SHOLAPURKAR; PAI; RAO, 2009). É causada principalmente pela espécie *Candida albicans*, porém outras espécies como *Candida tropicalis*, *Candida Krusei*, *Candida parapsilosis* e *Candida guilliermondii* podem ser raramente encontradas nas lesões (WILLE *et al.*, 2013).

As características clínicas das lesões causadas por essas leveduras são bem variadas: Podem provocar lesões cutâneas, mucocutâneas e até mesmo afecções septicêmicas e viscerais (SOYSA; SAMARANAYAKE; ELLEPOLA, 2004).

A forma oral da candidíase é a mais prevalente e a maioria dos pacientes com esse problema tem algum grau de imunossupressão (Figura 1). Pacientes com o vírus da imunodeficiência humana (HIV), pacientes que estão sendo submetidos à quimioterapia ou pacientes que estão fazendo uso de agentes imunossupressores, têm maiores chances de desenvolver candidíase oral (SAHAND *et al.*, 2009). Em pacientes portadores de HIV, o desenvolvimento da candidíase orofaríngea ocorre em mais de 90% em algum momento da evolução da doença (LI *et al.*, 2012).

**Figura 1** – Candidíase oral em paciente oncológico.



(Fonte: Juscélia Dias Rosa, 2019).

Há outros fatores de risco para o desenvolvimento de candidíase oral como imaturidade imunológica da infância, os distúrbios endócrinos, como diabetes, hipoparatiroidismo, gravidez, câncer avançado, desnutrição, antibioticoterapia sistêmica e uso de corticoide em terapia sistêmica (ALBUQUERQUE MARANHÃO *et al.*, 2019). Por fim um complexo conjunto de fatores de virulência dos fungos também pode favorecer o aparecimento da candidíase (SAHAND *et al.*, 2009; ABÍLIO *et al.*, 2014; GAVANJI; LARKI, 2015).

A candidíase oral em indivíduos que fazem uso de próteses total removível ou parcial removível acometem mais mulheres do que homens devido à diminuição da produção de hormônios após os 40 anos, o que pode estar associado a uma maior predisposição para o desenvolvimento de lesões na mucosa oral. Dentre outras espécies, *Candida albicans* é a principal espécie relacionada à candidíase ao uso de prótese dentária (MELO *et al.*, 2013).

Nos pacientes em tratamento quimioterápico, um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de candidíase oral é a mucosite oral (BUNETEL *et al.*, 2019). A mucosite é uma inflamação da mucosa provocada pelo efeito colateral tóxico de tratamentos quimioterápicos e/ou radioterápicos sendo comum frequentemente diagnosticado após ou durante o tratamento oncológico podendo ocorrer em qualquer parte do trato gastrointestinal (PARK; LEE, 2019).

A administração da maioria dos fármacos quimioterápicos envolve mucosite oral como efeito primário. Além disso, tais agentes químicos levam à perda da microbiota bucal essencial, e com isso o surgimento de uma espécie bacteriana dominante associada à colonização por espécies de *Candida spp.* à mucosite (PARK; LEE, 2019). Em pacientes em tratamento quimioterápico, a incidência de candidíase oral é de 20 a 40% dependendo da dose, duração e tipo de tratamento podendo ser maior e as consequências dessa infecção mais graves em pacientes que recebem regimes quimioterápicos em altas doses (DIAZ *et al.*, 2019).

O gênero *Candida spp.* é o agente causador de diferentes tipos de infecções na cavidade bucal dentre as quais, a candidíase é a infecção fúngica mais comum e apresenta-se como: candidíase oral atrófica, candidíase oral hiper-plástica e candidíase oral pseudomembranosa (HERNÁNDEZ-SOLÍS; REUDA-GORDILLO; ROJAS-HERRERA, 2014; PEIXOTO *et al.*, 2014; SIMÕES; FONSECA; FIGUEIRA, 2013).

As infecções fúngicas, especialmente aquelas causadas por leveduras, aumentaram significativamente nos últimos. A maioria delas é saprófita, mas pode se tornar patogênica quando o hospedeiro apresenta fatores de predisposição (SOYSA; SAMARANAYAKE; ELLEPOLA, 2004). A ocorrência de *C. albicans* em candidíase

oral representa 20% a 60% de todos os isolados e é considerada como uma das mais patogênicas, bem como a espécie mais importante na odontologia (HERNÁNDEZ-SOLÍS; REUDA-GORDILLO; ROJAS-HERRERA, 2014).

As leveduras do gênero *Candida* são classificadas no reino Fungi como filo Ascomycota, ordem Saccharomycetales, família Candidaceae. O gênero *Candida* se reproduz por brotamento, de forma assexuada e são classificados quanto à temperatura como mesófilos crescendo preferencialmente entre 18°C e 45°C (KIDD *et al.*, 2016).

*Candida* é um gênero de levedura que faz parte da microbiota do corpo humano e animais. Existem cerca de duzentas espécies incluídas neste gênero, sendo pouco mais de vinte responsáveis por infecções ao homem. É considerado o principal grupo de fungos patógenos oportunistas (NEGRI *et al.*, 2010).

Sendo um microrganismo comensal presente na cavidade bucal da maioria das pessoas saudáveis, quando há um desequilíbrio da microbiota local ou o comprometimento imunológico do hospedeiro, espécies de *Candida* spp. podem invadir os tecidos e mudar sua condição de comensal para patogênica e desencadear desde simples infecções até processos infecciosos profundos (SOYSA; SAMARANAYAKE; ELLEPOLA, 2004).

A transição, de patógeno comensal para o oportunista, ocorre principalmente em pacientes com contagens de linfócitos T-CD4 abaixo de 200 células/mm<sup>3</sup> (PETRUZZI *et al.*, 2013). Desta forma, na maioria das vezes, inicia-se uma candidíase em pessoas saudáveis como consequência de um distúrbio imunológico e dos fatores de virulência destas leveduras que possuem habilidades de colonizar, penetrar e invadir o tecido (HOLLENBACH, 2008).

Dentre as espécies de *Candida* spp., *C. albicans* é a que mais tem sido relatada em casos clínicos seguida de *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. krusei* sendo consideradas as principais espécies de interesse clínico juntamente com *C. guilliermondii* e *C. lusitaniae* embora com pouca ocorrência. Há ainda espécies emergentes que têm sido frequentemente descritas, como *C. dubliniensis*, *C. kefyr*, *C. rugosa*, *C. famata*, *C. utilis*, *C. lipolytica*, *C. norvegensis*, *C. inconspicua* e *C. auris* (LOPEZ *et al.*, 2005; PANIZO *et al.*, 2009; MEIS; CHOWDHARY, 2018).

*Candida albicans* (Figura 2) é uma espécie encontrada na cavidade oral, no trato gastrointestinal, no trato respiratório, na vagina e na uretra de pessoas saudáveis ou não. É a espécie mais frequente em infecções fúngica superficiais e invasivas (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003). Esta espécie pode apresentar-se de duas formas: leveduras ou pseudo-hifa. Acredita-se que a forma de levedura seja inócua, porém a forma de pseudo-hifa está associada com a invasão dos tecidos do hospedeiro (ALLERT *et al.*, 2018). A maioria dos espécimes de *C. albicans* é sensível a todos os antifúngicos de uso sistêmico, entretanto já

foram descritos casos de resistência adquirida a alguns azólicos (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003).

**Figura 02** – Laminocultivo da espécie *Candida albicans*.



Em **A**, presença de clamidoconídios terminal; em **B**, blastoconídios em cachos. Aumento de 400x. Isolado nº 001. (Fonte: autor).

O desenvolvimento de candidíase oral depende dos fatores associados à virulência das espécies de *Candida* spp. e das condições clínicas do paciente (QUINDOS *et al.*, 2019). Vários fatores atuam em determinada fase da infecção fúngica sendo esses um conjunto de fatores em que nenhum deles é o responsável individual e sim uma combinação de diferentes fatores (BIASOLI; TOSELLO; MAGARÓ, 2002).

Fatores importantes facilitam a multiplicação de *Candida* spp. no hospedeiro possibilitando o surgimento de infecções. Estes fatores estão relacionados principalmente com a adesão ao tecido do hospedeiro, alterações fenotípicas e morfológicas, produção de enzimas hidrolíticas e hemolisinas (NEGRI *et al.*, 2010; CALDERONE; FONZI, 2001; HERNÁNDEZ-SOLÍS; REUDA-GORDILLO; ROJAS-HERRERA, 2014).

A adesão da levedura à superfície celular é decorrente das adesinas de superfície do agente infectante. Essas adesinas reconhecem a matriz extracelular de proteínas como laminina, colágeno, fibronectina e fibrina presente nas superfícies celulares do hospedeiro (CALDERONE; FONZI, 2001).

As espécies de *Candida* podem aderir a superfícies bióticas ou abióticas como o cateter, formando biofilmes que podem facilitar infecções na corrente sanguínea, além disso, é conhecido que biofilmes provavelmente mudam a suscetibilidade dos fungos aos diferentes antifúngicos tornando-os resistentes (CHANDRA *et al.*, 2001).

Outro mecanismo de virulência de *Candida* spp. é a formação de pseudo-hifa que além de promover a invasão da levedura para dentro da mucosa, também diminuem a possibilidade das células de *Candida* spp. serem englobadas por macrófagos e neutrófilos (VAN BURIK; MAGEE, 2001).

Outro atributo de virulência que merece destaque é a produção de enzimas extracelulares como as proteinases e fosfolipase (KADIR; GUMRU; UYGUN-CAN, 2007). Estudos sugerem uma correlação entre adesão e produção da enzima protease, em que a inibição desta enzima reduzia a capacidade de adesão de *Candida* em células epiteliais (BORG; RÜCHEL, 1998).

O potencial patogênico de *Candida* spp. ainda pode estar ligado a outra enzima, a hemolisina. Muitos microrganismos patogênicos utilizam a hemoglobina como fonte de ferro que é essencial para a sobrevivência dentro do hospedeiro, entre eles estão as espécies de *Candida* spp. (LUO; SAMARANAYAKE; YAU, 2001; NEGRI *et al.*, 2010).

## **1.2 Terapia antifúngica.**

O tratamento da candidíase oral é realizado através da prescrição de antifúngicos entre os quais a nistatina e o miconazol aparecem como os mais utilizados topicamente. Em relação ao tratamento sistêmico, o fluconazol e o itraconazol são os fármacos de primeira escolha (QUINDOS *et al.*, 2019).

Os agentes antifúngicos disponíveis podem ser classificados com base no seu alvo de atuação. São eles: Polienos, inibidores da biossíntese do ergosterol (azólicos e alilaminas), antimetabólicos e equinocandinas (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Os polienos são utilizados desde a década de 1950 e pertencem a mais antiga classe de antifúngicos que são utilizados até hoje. Os fármacos mais conhecidos são a anfotericina B e a nistatina que apresentam o mesmo mecanismo de ação (SIDRIM; ROCHA, 2012).

A atividade antifúngica dos polienos ocorre na membrana celular. As ligações das moléculas de polienos com o ergosterol resultam em canais aquosos e não aquosos que aumentam a permeabilidade das membranas fazendo com que componentes celulares atravessam esses poros, levando a célula fúngica à perda de potencial de membrana

ocasionando assim a sua morte (MOHR *et al.*, 2008; MATHEW; NATH, 2009; QUINDOS *et al.*, 2019).

A incidência de resistência de fungos aos macrolídeos poliênicos são baixas, porém, a utilização deste fármaco na prática é problemática devido a sua baixa solubilidade e considerável toxicidade em humanos (BORGOS *et al.*, 2006). O uso de nistatina é limitado principalmente ao tratamento de infecções de pele, das membranas mucosas e do trato gastrointestinal causada por *Candida* spp. (SIDRIM; ROCHA, 2012).

A resistência do gênero *Candida* aos polienos não é comum, embora ocorra na maioria das vezes por via secundária (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). Devido à exposição irregular aos agentes polienos, as leveduras desenvolvem mutações no gene *ERG3*, que resulta na diminuição ou substituição por outros esteróis com menos afinidade ao fármaco, sendo este o principal mecanismo de resistência (PEMAN; CATON; ESPINEL-INGROFF, 2009).

Os fármacos azólicos são constituídas por duas famílias: os Imidazólicos como o miconazol, cetoconazol, clotrimazol e econazol e os Triazólicos como o fluconazol, itraconazol (Triazólicos de 1ª geração), voriconazol, posaconazol e ravuconazol (Triazólicos de 2ª geração) (MATHEW; NATH, 2009).

Geralmente, os azólicos exercem ação fungistática contra leveduras, tais como as espécies de *Candida* spp. (SHAPIRO; ROBBINS; COWEN, 2011). A ação antifúngica dos azóis se dá pelo impedimento da célula fúngica em biossintetizar o ergosterol, presente em sua membrana. Este comprometimento resulta no aumento da permeabilidade e interferência na ação de enzimas associadas às membranas, inibindo assim o crescimento e a replicação dos fungos (MOHR *et al.*, 2008).

Os azóis desenvolvem seu efeito mais lentamente que os polienos, mas têm menos toxicidade porque sua ação contra as membranas fúngicas é mais seletiva que a dos polienos. Em relação ao fluconazol, a incidência de efeitos adversos é baixa, entre os quais os mais frequentes são náuseas, vômitos, dores de cabeça, erupção cutânea, dor abdominal e diarreia (QUINDOS *et al.*, 2019).

O uso indiscriminado de azóis, principalmente o fluconazol, tem feito emergir cepas de *Candida* spp. resistentes a esta classe. Entre outros mecanismos, há a mutação do gene *ERG3* que também promove resistência aos azóis, uma vez que ocorre a substituição do ergosterol pelo fecosterol. Existem outros mecanismos que também promovem a resistência a este grupo de fármaco como: a indução de bombas de efluxo pelos genes *CDR* e *MDR* e mutações nos genes *ERG11* (SANGUINETTI; POSTERARO; LASS-FLORL, 2015).

As alilaminas também agem inibindo a biossíntese de ergosterol. Esta classe é representada pelos fármacos terbinafina e a naftifina. Ao bloquear a biossíntese de ergosterol via esqualeno, há acúmulo de esqualeno e redução na formação de ergosterol (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

O antifúngico flucitosina é um fármaco conhecido e utilizado desde os anos de 1971, porém, pouco utilizado pela população. A sua toxicidade, o seu limitado espectro de ação antifúngico e a capacidade de desenvolvimento de resistência fizeram com que este fármaco fosse utilizado em combinação com anfotericina B, formando uma combinação sinérgica para tratar infecções sistêmicas graves (PERFECT, 2017).

Em relação à flucitosina, os mecanismos de resistência a este fármaco estão relacionados com a mutação dos genes: *FCY1*, responsável pela conversão de flucitosina a 5-fluorouracilo; *FCY2*, que modifica a enzima citosina permease cuja função é absorver o fármaco dentro da célula; e *FURI*, cuja modificação da enzima uracila fosforibosil transferase impede o comprometimento do RNA, DNA e síntese proteica (ESPINEL-INGROFF, 2008).

As equinocandinas são as mais novas classes antifúngicas quando comparadas às outras. São representadas pelos fármacos micafungina, anidulafungina e caspofungina. Agem impedindo a síntese da parede celular fúngica por meio da inibição da enzima  $\beta$ -(1,3)-D-glucano-sintase, impedindo então a síntese de  $\beta$ -(1,3)-D-glucano que é componente integrante da parede celular fúngica, resultando então no comprometimento da estabilidade dessa estrutura e, por conseguinte a morte do fungo (CORTÉS; RUSSI, 2011).

Com pouca frequência, tem sido relatado casos de resistência a equinocandinas por espécies do gênero *Candida*, entre elas *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. albicans* (PFALLER, 2012). O principal mecanismo de resistência às equinocandinas ocorre através de mutações no gene *FKSI*, responsável pela codificação da enzima alvo  $\beta$ -(1,3)-D-glucano sintase (ARENDRUP *et al.*, 2010; PFALLER, 2012).

O uso indiscriminado dos antifúngicos disponíveis hoje no mercado vem contribuindo para o aumento da quantidade de patógenos resistentes ocasionando quadros de recidiva. Além disso, há muitos relatos de efeitos indesejados pelos pacientes (SIMÕES; FONSECA; FIGUEIRA, 2013).

A expressão resistência microbiana pode ser definida como intrínseca ou adquirida e é utilizada quando referimos que um microrganismo não foi susceptível a um agente antifúngico nos testes de susceptibilidade *in vitro*, em que os valores da concentração mínima inibitória ultrapassam os limites de “*breakpoint*” (KANAFANI; PERFECT, 2008). Parte desse fenômeno deve-se ao uso indiscriminado dos antifúngicos disponíveis hoje no mercado conhecido como “resistência adquirida” (SIMÕES; FONSECA; FIGUEIRA, 2013).

A resistência adquirida surge quando há uma alteração nos genes microbianos devido à exposição a um agente antifúngico. Por outro lado, a resistência intrínseca pode ocorrer em microrganismos que nunca foram expostos aos fármacos. É determinada resistência intrínseca a um determinado fármaco todos os isolados de uma mesma espécie, como por exemplo, a *C. krusei* ao fluconazol (KANAFANI; PERFECT, 2008).

Atualmente, além da toxicidade promovida pelos antifúngicos, um número cada vez maior de cepas de várias espécies de *Candida* spp. estão se tornando resistentes aos fármacos disponíveis (HAZEN *et al.*, 2003). No que diz respeito à resistência antifúngica, as espécies de *Candida* não-*albicans* mostram maior importância etiológica das infecções aumentando assim a preocupação com o surgimento de cepas multirresistentes aos medicamentos convencionais (ABRANTES *et al.*, 2013).

Estudos epidemiológicos apontam que a resistência antifúngica entre as espécies de *C. albicans* permanecem baixas, entretanto outras espécies como *C. krusei* com resistência intrínseca ao fluconazol, e *C. glabrata* e *C. tropicalis* com resistência adquirida estão se tornando cada vez mais resistentes e emergindo como importantes causadores de candidemias (ALCAZAR-FUOLI; MELLADO, 2014; ABRANTES *et al.*, 2013). Dessa forma tornou-se mais frequente a realização de estudo de vigilância de resistência aos agentes antifúngicos (ABRANTES *et al.*, 2013).

O grande desafio clínico e terapêutico é adotar estratégias para evitar o desenvolvimento de resistência aos agentes antifúngicos convencionais por *Candida* spp. e evitar a disseminação da resistência fúngica. A identificação das espécies fúngicas, o diagnóstico precoce da infecção e os testes de sensibilidade aos antifúngicos são as estratégias mais utilizadas neste controle, além da disponibilidade de terapias mais eficazes e o desenvolvimento de novos antifúngicos (ANDERSON, 2005; SIDRIM; ROCHA, 2012).

### **1.3 *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf.**

A planta *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf pertence à família Poaceae e é originária da Índia. É uma erva perene, ereta, de 0,60 a 2 m de altura com folhas esverdeadas, aromáticas, estreitas, longas, paralelinérveas partindo da base (Figura 3). Suas folhas há muito tempo são consumidas pela população na forma de chá ou infusão. Popularmente conhecida no Brasil, entre outras denominações, por capim-cheiroso, capim-cidreira, capim-santo, capim-limão, capim-cidrô, capim-cidrão (LORENZI; MATOS, 2002).

A planta é conhecida por possuir efeito antimicrobiano, anti-inflamatório, antiproliferativo de células tumorais e também na cura de feridas. Essas propriedades tornam

*Cymbopogon citratus* uma espécie potencialmente benéfica para uso na área de cuidados de saúde (ALMEIDA *et al.*, 2013; BOUKHATEM *et al.*, 2014). É utilizada na medicina caseira tradicional brasileira e o seu principal emprego está relacionado no alívio de pequenas cólicas uterinas e intestinais, má digestão, no tratamento de insônia, nervosismo, além de produzir efeito antitérmico, antiespasmódico e diurético (CORTEZ; JACOMOSI; CORTEZ, 1999).

**Figura 3** – *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf cultivada no viveiro de plantas do curso de Ciências Biológicas da Univás.



(Fonte: autor).

Dentre outras atividades farmacológicas destaca-se a atividade antifúngica relacionada ao óleo essencial, princípio odorífero da planta contido em suas folhas a qual é atribuída ao citral, molécula responsável pela atividade antimicrobiana (LORENZI; MATOS, 2002). Os componentes dos óleos essenciais podem interferir na biossíntese da parede celular de células fúngicas (PIERCE *et al.*, 2013; SOOKTO *et al.*, 2013). Estudos sugerem que os terpenos sejam os constituintes responsáveis por essa atividade, que na espécie de *Cymbopogon citratus* se destaca o citral, que é o principal componente com mais de 80% em volume (LUCENA *et al.*, 2015; LEITE *et al.*, 2014).

Os óleos essenciais apresentam substâncias voláteis, lipofílicas, odoríferas e líquidas. São compostos por cerca de 20-60 componentes em diferentes concentrações, entretanto, apenas dois ou três componentes se apresentam em concentrações elevadas.

Geralmente, esses componentes determinam as propriedades biológicas dos óleos essenciais (PAVELA, 2015). A demanda dos óleos essenciais tem aumentado nos últimos anos, devido ao aumento da utilização de seus compostos na agricultura, saúde humana e animal e também nas indústrias de alimentos, cosméticos e de fármacos (PANDEY; SINGH; TRIPATHI, 2014; RAUT; KARUPPAYIL, 2014; CRUZ *et al.*, 2015).

A fitoterapia representa a possibilidade de ampliação de opções terapêuticas. Constitui importante fonte de inovação em saúde e pode fortalecer ainda mais a inovação, a produção e exploração da rica biodiversidade brasileira (HASENCLEVER *et al.*, 2017).

O estudo da fitoterapia vem sendo realizado nos mais diversos biomas brasileiros (BETTEGA *et al.*, 2011). O uso de plantas medicinais é empregado cada vez mais nas diversas áreas. Sendo economicamente viável, a fitoterapia diminui as reações adversas, apresenta eficácia e está se tornando um meio terapêutico promissor (ABÍLIO *et al.*, 2014).

A indústria de fitoterápicos, além de ser mais acessível, pode representar uma excelente alternativa para assegurar o acesso a medicamentos seguros, eficazes e de qualidade. Constitui importante fonte de inovação na perspectiva de melhoria da atenção à saúde e de inclusão social e é ofertada aos usuários do Sistema Único de Saúde (SUS) (HASENCLEVER *et al.*, 2017). Com a inserção da fitoterapia no SUS, ficou evidenciado a necessidade de estudos com o objetivo de enriquecer o conhecimento dos profissionais da saúde, além de assegurar a eficácia (BETTEGA *et al.*, 2011).

## 2 OBJETIVO

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antifúngica do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf e sua combinação com nistatina frente às leveduras de cavidade oral.

### 2.2 Objetivos específicos

- Extrair, caracterizar as propriedades físico-químicas e identificar os compostos fitoquímicos do óleo essencial da planta *Cymbopogon citratus*.
- Caracterizar as cepas de leveduras quanto à identificação, virulência e sensibilidade antifúngica.

## 3 MÉTODOS

### 3.1 Delineamento do estudo.

Trata-se de um estudo *in vitro*, observacional, analítico, transversal, com abordagem quali-quantitativa.

### 3.2 Aspectos éticos.

Os dados éticos foram avaliados pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) que emitiu a liberação para a utilização dos microrganismos por meio do parecer nº 2.400.440 (Anexo 1). Os testes foram realizados após o parecer favorável.

### 3.3 Local de estudo.

O estudo foi realizado no Laboratório de Pesquisas Básicas e no Laboratório de Fitoterapia da Universidade do Vale do Sapucaí e também no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Ciências dos Alimentos e no Laboratório de Química Orgânica - Óleos Essenciais do Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras.

### 3.4 Casuística.

Foram estudadas 292 cepas de leveduras pré-identificadas como pertencentes ao gênero *Candida* depositadas na coleção de microrganismos do Laboratório de Pesquisas Básicas. Estas cepas são provenientes de estudos anteriores sob os pareceres de nº 302.120 e nº 1.634.939 que foram isoladas da cavidade oral de pacientes oncológicos em tratamento quimioterápico no Hospital das Clínicas Samuel Libânio em Pouso Alegre – MG. Também foram utilizadas as cepas padrão: *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida dubliniensis* CBS 7987, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida glabrata* MYA 2950, *Pichia kudriavzevii* ATCC 6258 e *Candida utilis* ATCC 9950.

### 3.5 Critérios de inclusão.

Neste estudo foram incluídas cepas de leveduras depositadas na coleção microbiológica do Laboratório de Pesquisas Básicas que cresceram após repique para reativação das colônias.

### 3.6 Critérios de não Inclusão.

Não foram incluídas cepas de leveduras que não cresceram após três tentativas de repique para a reativação das colônias.

### 3.7 Critérios de exclusão.

Foram excluídas do estudo, cepas de leveduras que foram contaminadas por outros microrganismos.

### 3.8 Extração do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf.

#### 3.8.1 Obtenção do material botânico.

As folhas de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf foram coletadas de plantas adultas localizadas no viveiro de plantas do curso de Biologia da Univás (-22.219737, -45.914720) no período matutino do mês de setembro de 2018. O material botânico foi pré-identificado segundo critérios macroscópicos e organolépticos (como odor característico de citral e sabor cítrico) de acordo com a Farmacopéia Brasileira V (BRASIL, 2010).

#### 3.8.2 Determinação do teor de umidade.

Imediatamente após a coleta do material vegetal, foram utilizados 25 g da amostra fresca em três repetições para determinar o teor de umidade pelo método gravimétrico de acordo com a metodologia proposta por Rocha *et al.* (2012). As amostras foram pesadas antes e durante a incubação em estufa a temperatura de  $103 \pm 2^\circ\text{C}$ . O tempo de incubação foi interrompido após o peso da amostra não sofrer variação de até 0,0001 g em balança analítica. O teor de umidade (U) foi calculado segundo a fórmula:

$$U = \frac{B_{mf} - B_{ms}}{B_{mf}} \times 100$$

Onde:

U = Teor de umidade (%)

B<sub>mf</sub> = Biomassa fresca

B<sub>ms</sub> = Biomassa seca

### 3.8.3 Extração do óleo essencial.

O óleo essencial foi obtido por hidrodestilação das folhas pelo método do arraste a vapor em aparelho do tipo Clevenger modificado, conforme a Farmacopéia Brasileira V (BRASIL, 2010), no Laboratório de Fitoterapia da Univás.

Dois quilogramas das folhas foram secas em temperatura ambiente por um período de sete dias e em seguida, trituradas em um processador de alimento PH900 Turbo Philco. De acordo com Martins *et al.* (2002), o menor conteúdo de água nas folhas permite que a corrente de vapor gerada no extrator possa arrastar com mais eficiência as substâncias voláteis armazenadas nas células quando comparada com material verde.

Após o processo de desidratação, foram adicionados 600 g do material vegetal seco em uma aparelho tipo Clevenger modificado, com água na proporção de 1:10. O tempo de extração foi de 4 horas.

### 3.8.4 Determinação do rendimento do óleo essencial.

A leitura do volume do óleo essencial extraído foi realizada diretamente na escala volumétrica do tubo separador. Em seguida, o óleo foi coletado e seco com pequenas quantidades de sulfato de sódio anidro. O óleo foi armazenado em tubo estéril de cor âmbar, a temperatura de 4 a 8°C, em lugar sem a incidência direta de luz.

O rendimento do óleo essencial foi calculado com base na matéria seca de acordo com Santos *et al.* (2004), pela seguinte fórmula:

$$RO (\%) = \frac{VO}{Bm - (Bm \times U)} \times 100$$

Onde:

RO = Rendimento do óleo (%)

VO = Volume do óleo

Bm = Biomassa vegetal

U = Teor de umidade (%)

### 3.8.5 Caracterização físico-química do óleo essencial.

As análises físico-químicas do óleo essencial foram realizadas de acordo com a Farmacopéia Brasileira V (Brasil, 2010). Foi calculada a densidade relativa, o índice de refração, a solubilidade em etanol, cor e aparência.

#### 3.8.5.1 Determinação da densidade relativa $d_{20}^{20}$

A densidade relativa do óleo essencial foi determinada pelo método do picnômetro, por comparação de sua massa pela massa de igual volume de água, ambas a 20°C.

Utilizando um picnômetro de 1 mL, foi verificado o peso da água obtido pela diferença entre a massa do picnômetro contendo água destilada e a massa do picnômetro vazio e seco. O picnômetro então foi esvaziado e seco. A massa da amostra foi determinada da mesma forma, obtido entre a diferença da massa do picnômetro contendo o óleo essencial e a massa do picnômetro vazio. O quociente entre a massa da amostra do óleo e a massa da água, ambos a 20°C, forneceu o valor da densidade relativa (Brasil, 2010).

#### 3.8.5.2 Determinação do índice de refração $n_d^{20}$

O índice de refração do óleo essencial foi obtido em refratômetro de Abbé, em função da luz de sódio no comprimento de onda de 589,3 nm (raia D) e a temperatura de 20°C. A calibração do aparelho foi realizada com água destilada estéril a 20°C, e o índice de refração foi de 1,3330 (Brasil, 2010).

#### 3.8.5.3 Solubilidade em etanol.

Para a determinação de solubilidade do óleo essencial em etanol, utilizou-se uma mistura de etanol/água a 80% (v/v) e etanol absoluto (100%). O teste foi realizado adicionando-se volumes crescentes do óleo em volume fixo de solvente até a solubilização total do óleo. O procedimento consiste na adição de porções crescentes de amostra a volumes constantes de solvente no qual a substância analisada mostra apenas ligeira solubilidade, visando à obtenção de solução saturada dessa substância (Brasil, 2010).

#### *3.8.5.4 Cor e aparência.*

A cor foi determinada visualmente, feita por comparação da cor do óleo com as cores conhecidas. A aparência foi determinada por comparação no que diz respeito a sua transparência ou limpidez (Brasil, 2010).

#### *3.8.5.5 Identificação e quantificação dos constituintes químicos do óleo essencial.*

A identificação dos compostos foi realizada utilizando-se a técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), em equipamento Shiimadzu GCMSQP2010 Plus equipado com autoamostrador AOC 5000. A coluna cromatográfica utilizada foi do tipo SBLTM-5MS de 0,25 µm de espessura, 30 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno (fase ligada; 5% diphenyl, 95% dimethyl polysiloxane). Utilizou-se hélio como gás carreador a um fluxo de 1,18 mL/min. A temperatura inicial do forno foi mantida a 60°C por dois minutos, sendo programada para ter acréscimos de 3°C a cada minuto, até atingir a temperatura máxima de 240°C, e de 240°C até 300°C à 10°C/min mantendo-se por 7 min.

Os demais parâmetros foram: Temperatura de injeção: 220°C; Modo de injeção: SPLIT 1:100; Temperatura da fonte de íons: 200°C; Temperatura da interface: 240°C; Corte do solvente: 2,4min; Faixa de m/z analisada: 45-500Da.

Os espectros de massas obtidos foram comparados à biblioteca do equipamento Wiley 8.0. Os índices de retenção dos compostos foram calculados após análise prévia de uma série homóloga de alcanos e comparadas a dados da literatura (ADAMS, 2007).

### **3.9 Reativação e estocagem das linhagens fúngicas.**

As cepas foram reativadas semeando-as em meio Agar Sabouraud Dextrose (Himedia, Índia – Anexo 2) suplementado com Cloranfenicol. As placas foram incubadas à temperatura de 37°C e após o crescimento das colônias, foi realizada uma nova estocagem das linhagens a fim de renovar e manter os exemplares da coleção. Com auxílio de uma alça em anel, foi semeado em tubos tipo penicilina contendo o meio inclinado de Corn Meal Agar (Himedia, Índia – Anexo 2) conhecido como Agar Fubá, suplementado com 1% de Tween-80 (Difco, EUA). Os tubos foram lacrados e acondicionados em caixa isotérmica em temperatura ambiente e devolvidos para coleção.

### 3.10 Identificação das leveduras.

A identificação das leveduras foi realizada utilizando três técnicas: identificação cromogênica empregando o meio de cultura CHROMagar™Candida (Difco, EUA – Anexo 2); identificação pelos métodos convencionais fenotípicos de acordo com Sidrim e Rocha (2012), como a formação de tubo germinativo em soro humano, produção de clamidoconídios em Ágar Fubá suplementado com 1% de Tween-80, prova da urease, assimilação de diferentes fontes de carbono e de nitrogênio (Auxanograma) e fermentação de carboidratos (Zimograma); e identificação por espectrometria de massa (MALDI-TOF MS).

Os isolados identificados como *Candida albicans* foram reavaliados com testes para a diferenciação de *Candida dubliniensis*.

#### 3.10.1 Método cromogênico.

Para a identificação em meio cromógeno, cada isolado foi semeado pela técnica de esgotamento em placas contendo o meio CHROMagar™Candida. O meio foi preparado de acordo com as instruções do fabricante. As placas foram incubadas a 37°C por 48-72 horas. A leitura das placas e a interpretação dos resultados foram realizadas pela observação da morfologia e da pigmentação das colônias semeadas, sendo colônias azuis sugestiva para *Candida tropicalis*, verdes para *Candida albicans*, rosas com entorno esbranquiçado para *Candida krusei* e outros tipos de cores consideradas outras espécies de *Candida* spp.

#### 3.10.2 Métodos fenotípicos.

##### 3.10.2.1 Prova do tubo germinativo.

A partir da cultura de 24 horas em meio Ágar Sabouraud Dextrose a 37°C, foram feitas suspensões em tubos contendo 500 µL de soro estéril humano, disponibilizado pelo laboratório de Análises Clínicas do HCSL. Em seguida as suspensões foram incubadas em banho-maria a 37°C por 2 - 3 horas. Posteriormente, 10 µL de cada inóculo foram colocados entre lâmina e lamínula e observadas em microscopia de luz (aumento de 400x). Os tubos germinativos positivos aparecem como uma extensão não septada e sem constrição dos blastoconídios. Esta prova é positiva para *Candida albicans* e *Candida dubliniensis* e negativa para as demais espécies (SIDRIM; ROCHA, 2012; SCHORLING *et al.*, 2000).

### *3.10.2.2 Prova da filamentação em Agar Fubá.*

Foi utilizado o meio Corn Meal Agar, acrescido de 1% de tween-80. O meio foi fundido e resfriado à aproximadamente 50°C e 1 mL do meio foi depositado sobre uma lâmina estéril contida em uma placa de microcultivo também esterilizada, até obtenção de uma camada espessa. Após a solidificação, foram feitas duas estrias retas e horizontais na superfície do meio, com auxílio de uma alça em anel contendo pequena quantidade da amostra de levedura, obtidas de cultura de 24 horas em meio Agar Sabouraud Dextrose acrescido de Cloranfenicol. O inóculo foi coberto com lamínula esterilizada e em seguida foram adicionados um mL de água destilada estéril no fundo da placa a fim de construir um ambiente úmido.

As placas foram vedadas com papel filme e incubadas durante cinco dias em temperatura ambiente para estimular a produção de blastoconídios e filamentação da pseudo-hifa. Após esse período a lâmina foi examinada ao microscópio óptico com aumento de 100x e 400x, com o intuito de se observar o arranjo dos clamidoconídios de cada isolado (SIDRIM; ROCHA, 2012; LARONE, 1995).

### *3.10.2.3 Auxanograma e zimograma.*

#### ***3.10.2.3.1 Assimilação de fontes de carbono e nitrogênio (Auxanograma).***

A partir de uma cultura de 24 horas a 37°C, em meio Extrato de Levedura e Peptona (Meio YP – Anexo 2), isento de fonte de açúcar, foram preparados 5 mL de uma suspensão de leveduras em tubos de ensaio com água destilada estéril. A turvação foi ajustada ao tubo dois da escala de McFarland com auxílio de um espectrofotômetro (CELM E-225 D) com absorvância de 625nm de forma a obter de  $1 \times 10^8$  à  $5 \times 10^8$  CFC/mL.

A seguir 2 mL da suspensão foram transferidos para cada tubo de ensaio contendo 18 mL de meio isento de fonte de carbono (Meio C – Anexo 2), previamente fundido e mantido a aproximadamente 50°C. Em seguida, após homogeneização, o meio foi vertido em placas de Petri esterilizada e após solidificação, alíquotas com 15 mg de diferentes carboidratos foram depositados em pontos equidistantes da referência previamente marcada na parte externa da base das placas. Foram utilizados os seguintes carboidratos: Celobiose, Galactose, Glicose, Inositol, Lactose, Maltose, Rafnose, Sacarose e Trealose.

Para assimilação de fonte de nitrogênio, dois mL da suspensão foram transferidos para tubo de ensaio contendo 18 mL do meio isento de fontes de nitrogênio (Meio N – Anexo

2), previamente fundido e esfriado a aproximadamente 50°C. Após distribuição e solidificação, alíquotas de 15 mg das substâncias nitrogenadas (Peptona e KNO<sub>3</sub>) foram depositadas em pontos equidistantes previamente marcada na parte externa da base da placa.

A prova de assimilação de fontes de carbono e nitrogênio é considerada positiva quando houver formação de um halo de crescimento ao redor do ponto de aplicação do carboidrato ou da fonte de nitrogênio, e negativa na ausência desse crescimento após 48-72 horas de incubação a 30°C (LARONE, 1995; KIDD *et al.*, 2016).

#### **3.10.2.3.2 Fermentação de fontes de carbono (Zimograma).**

Foram avaliadas a fermentação da Celobiose, Galactose, Glicose, Lactose, Maltose, Sacarose e Trealose. Uma alíquota de 100 µl da suspensão de leveduras ajustadas a escala dois de McFarland foram semeadas em tubos de ensaio contendo três mL do Caldo Basal para Fermentação (Anexo 2) com 1,5 mL do respectivo carboidrato e tubo de Durhan em posição invertida para a captação de gás. Os tubos foram incubados a 37°C durante 15 dias, com agitação e observações diárias.

O resultado foi considerado positivo quando ocorreu mudança da cor verde garrafa para amarelo (indicando assimilação do carboidrato) juntamente com a formação de bolhas de gás retidas no tubo de Durhan. A produção de gás é a única evidência confiável de fermentação de carboidratos. Produção de ácido pode simplesmente indicar que o carboidrato foi assimilado. Todos os carboidratos fermentados também vão ser assimilados, mas muitos compostos que são assimilados não são necessariamente fermentados (LARONE, 1995; KIDD *et al.*, 2016).

#### **3.10.2.4 Hidrólise da ureia**

O teste de urease foi realizado utilizando-se a prova de hidrólise da ureia de Christensen (CHRISTENSEN, 1946). O meio Ágar Ureia de Christensen (Anexo 2) foi preparado em tubos com tampa de rosca 100 x 13 mm inclinados, onde os isolados foram estriados sobre a superfície a partir de uma cultura de 24 horas em Ágar Sabouraud Dextrose. Os tubos foram incubados a 37°C por até 15 dias. Foi observado o crescimento fúngico e a mudança de coloração do meio basal a cada 24 horas.

Foram considerados resultados positivos para urease quando se observou mudança da coloração do meio de laranja para róseo intenso, indicado pelo vermelho de

fenol, devido à alcalinização do meio de cultura (SIDRIM; ROCHA, 2012). Como controle positivo, foi utilizada uma cepa de *Cryptococcus neoformans* ATCC 90112.

Com base nas literaturas de Kidd e colaboradores (2016), e Larone (1995), foi construído uma tabela (Anexo 3) com as características para interpretação das análises de assimilação e fermentação de fontes de carbono e hidrólise da uréia.

#### 3.10.2.5 Diferenciação de *Candida dubliniensis* de *Candida albicans*.

*Candida dubliniensis* possui características fenotípicas comuns a *Candida albicans*, portanto além dos métodos convencionais já realizados, os isolados identificados como *C. albicans* passaram pelos testes de diferenciação como: crescimento a 42°C e 45°C (SULLIVAM; COLEMAN, 1998) e crescimento em meio hipertônico (CHOWDHARY *et al.*, 2011; ALVES *et al.*, 2002).

Foi considerada a identificação presuntiva de *C. dubliniensis* isolados que não cresceram em nenhuma das provas.

##### 3.10.2.5.1 Preparo das amostras.

A partir de uma cultura de 24 horas a 37°C em meio Ágar Sabouraud Dextrose, foram preparados 5 mL de uma suspensão de leveduras em tubos de ensaio com água destilada estéril. A turvação foi ajustada ao tubo dois da escala de McFarland com auxílio de um espectrofotômetro (CELM E-225 D), com absorvância de 625nm, de forma a obter de  $1 \times 10^8$  a  $5 \times 10^8$  CFC/mL.

##### 3.10.2.5.2 Cultivo termotolerante à 42°C e 45°C.

Para o teste de termotolerância foi empregado a técnica preconizada por Sullivan e Coleman (1998). Alíquotas de 5 µL de suspensão de levedura foram depositadas em placas de Ágar Sabouraud Dextrose em pontos equidistantes e incubadas à 37°C, 42°C e 45°C por 72 horas. Após esse período, foi classificado o crescimento da colônia como positivo ou negativo comparando o crescimento nas temperaturas de 42°C e 45°C com o crescimento em 37°C, sendo esta última, a temperatura ótima de crescimento das espécies de *Candidas* spp. O crescimento a 42°C e 45°C é sugestivo de *C. albicans*, e o não crescimento a estas temperaturas são característica da espécie *C. dubliniensis*. Todas as cepas que apresentaram crescimento negativo foram novamente testadas para confirmação dos resultados.

### 3.10.2.5.3 Cultivo em meio hipertônico.

Para a avaliação do crescimento das cepas em meio hipertônico, foram preparadas duas técnicas: uma utilizando meio sólido de acordo com Chowdhary *et al.* (2011), e outra por meio líquido, Alves *et al.* (2002).

Uma alíquota de 5 µL do inóculo foi depositada sobre a superfície do meio Agar Sabouraud Hipertônico (Anexo 2) em pontos equidistantes. Para o cultivo em caldo, 100 µL da mesma suspensão foram adicionados aos tubos contendo três mL do meio Caldo Sabouraud Hipertônico (Anexo 2).

Após 72 horas de incubação em temperatura de 37°C, o crescimento no ágar foi avaliado como positivo ou negativo. No caldo, foi observado se há presença ou não de turvação do meio, para verificar se houve ocorrência ou não de crescimento. Resultados negativos seriam características de *C. dubliniensis*. Todas as cepas que apresentaram crescimento negativo foram novamente semeadas e incubadas para confirmação dos resultados.

### 3.10.3 Espectrometria de massa (MALDI-TOF MS).

A realização dos testes de identificação por Espectrometria de Massa por Tempo de Voo - Ionização/Dessorção a Laser Assistida por Matriz (MALDI-TOF MS) foi realizada na Universidade Federal de Lavras (UFLA), no departamento de Ciências dos Alimentos, sob a orientação da professora doutora Angélica Cristina de Souza.

Para realização do teste, as amostras foram semeadas e cultivadas em Ágar Sabouraud Dextrose por 24 horas a 37°C. Após esse período, foi realizado um processo de extração de proteínas com ácido fórmico e acetonitrila.

Com auxílio de uma alça calibrada e descartável de 10 µL, porções de células foram transferidas para tubos eppendorfs e suspendidas com 300 µL de água estéril padrão HPLC. Os tubos foram homogeneizados em agitador tipo vórtex por 30 segundos e em seguida foram adicionados 900 µL de álcool etílico anidro e novamente homogeneizado. Após esse processo, as amostras foram centrifugadas por 2 minutos a 13.000 rpm. O sobrenadante foi removido e o precipitado foi ressuspenso com 50 µL de ácido fórmico 70% e o tubo homogeneizado. Alíquota de 50 µL de acetonitrila 100% foram adicionados e novamente o tubo foi homogeneizado. A seguir, os tubos foram centrifugados a 13.000 rpm e o sobrenadante transferido para outro tubo, identificados e armazenados por até 2 meses em temperatura de -20°C.

Os testes foram realizados dispensando 1 µL do sobrenadante das extrações sobre a microplaca Bruker de 96 testes. As amostras foram secas parcialmente e em seguida foram cobertas com 1 µL de matriz ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA) solubilizada em 33,3% etanol, 33,3% de acetonitrila e 33,3% de ácido trifluoroacético 10%. As microplacas foram secas em temperatura ambiente e os testes realizados em triplicatas.

As análises foram realizadas em aparelho espectrômetro de massa MALDI-TOF Microflex LT Bruker e lidas utilizando o sistema MALDI Biotyper (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). As identificações em nível de espécie foram confirmadas se os resultados obtivessem *score* maior que dois. A identificação das cepas que tiveram o *score* menor que 2 foram repetidas.

### **3.11 Pesquisa de exoenzimas.**

#### 3.11.1 Padronização do inóculo.

A partir de uma cultura de 24 horas a 37°C em meio Ágar Sabouraud Dextrose, foram preparados cinco mL de uma suspensão de leveduras em tubos de ensaio com água destilada estéril. A turvação foi ajustada ao tubo 2 da escala de McFarland com auxílio de um espectrofotômetro (CELM E-225 D) com absorvância de 625nm de forma a obter de  $1 \times 10^8$  à  $5 \times 10^8$  CFC/mL.

#### 3.11.2 Preparo das placas com meio indutor.

A profundidade do ágar afeta o diâmetro do halo e este foi controlado. A profundidade dos meios indutores foi padronizado para 4 mm de espessura que corresponde a 25 mL de meio em placas de 90 mm.

O meio protease continha como substrato, albumina bovina sérica fração V, e o pH final foi de 4,2. Para os testes de fosfolipase, o meio foi enriquecido com emulsão de gema de ovo e o pH final foi de 3,9. Já para os testes de hemolisina, o meio foi enriquecido com 7% de sangue de carneiro e o pH final foi de 5,6.

### 3.11.3 Pesquisa de protease.

Alíquotas de 5 µL de suspensão de leveduras foram depositadas em meio indutor de protease como descrito por D'Eça Junior *et al.* (2011), (Anexo 2). O teste foi realizado em triplicata e as placas foram incubadas por 4 dias à 37°C.

Após esse período, o diâmetro das colônias foi mensurado e em seguida as placas foram coradas com o reativo de Bradford (0,5% de azul brilhante de Coomassie, 10% [v/v] de ácido acético e 45% [v/v] de etanol) por 20 minutos à temperatura ambiente, descoradas três vezes com solução descorante (10% [v/v] de ácido acético e 45% [v/v] de etanol) por 20 minutos à 37°C e uma vez com água por 20 minutos à 37°C (PEREIRA NETO; SILVA; LEMES, 2013). Após esse processo, o diâmetro dos halos de hidrólises quando presentes foram mensurados para o cálculo da atividade enzimática.

### 3.11.4 Pesquisa de fosfolipase.

Alíquotas de 5 µL de suspensão de leveduras foram depositadas em pontos equidistantes no meio Agar Fosfolipase (Anexo 2) em triplicatas. As placas foram incubadas durante 4 dias à 37°C. Após esse período, o diâmetro das colônias e o diâmetro dos halos quando presentes foram mensurados. As amostras produtoras de fosfolipase formam uma zona opaca ao redor do inóculo (D'EÇA JUNIOR *et al.*, 2011).

### 3.11.5 Pesquisa de hemolisina.

A presença de hemolisina foi verificada segundo a técnica descrita por Luo, Samaranayake e Yau (2001). Uma alíquota de 5 µL de uma suspensão de leveduras foi depositada sobre a superfície do meio Ágar Sabouraud Dextrose, suplementado com 3% de glicose e 7% de sangue de carneiro desfibrinado (Anexo 2). Os testes foram realizados em triplicata e as placas incubadas à temperatura de 37°C por 48 horas.

Após esse período, as colônias e os halos quando presentes foram mensurados para o cálculo da atividade enzimática pela razão entre o diâmetro da colônia mais o diâmetro do halo da hemólise, dividido pelo diâmetro da colônia. Como controle positivo, foi utilizada uma cepa padrão de *Candida albicans* ATCC 90028 e com controle negativo *Candida parapsilosis* ATCC 22019 que não promove a formação de halo de hemólise.

### 3.11.5 Cálculo da zona da atividade enzimática.

O cálculo da zona da atividade enzimática foi determinada de acordo com a metodologia proposta por Price, Wilkson e Gentry (1982). O Ez (zona enzimática) foi calculado como a razão entre o diâmetro da colônia (dc) pelo diâmetro da colônia mais a zona de precipitação (dcp), ou seja,  $Ez = dc/dcp$ . De acordo com esse sistema, a atividade enzimática é considerada alta quando  $Ez < 0,64$  sendo considerado fortemente positivo;  $0,64 \leq Ez \leq 0,99$  considerado positivo e  $Ez = 1$  considerado negativo.

### 3.12 Perfil de sensibilidade aos antifúngicos.

O perfil de susceptibilidade aos antifúngicos fluconazol, itraconazol e nistatina, foram determinadas pela técnica de concentração inibitória mínima (CIM) de acordo com o método de microdiluição em caldo descrito na norma “M27-A2 — Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica”, publicada pelo *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2002). Esta norma descreve a metodologia de um teste de sensibilidade aos agentes antimicrobianos das leveduras que causam infecções fúngicas invasivas, incluindo espécies de *Candida* spp.

#### 3.12.1 Solução-padrão de antifúngicos.

As soluções-padrão de antifúngicos foram preparadas na concentração de 6400 µg/mL para o fluconazol, diluído em água ultrapura e 1600 µg/mL para itraconazol e nistatina diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO). As diferentes diluições foram adquiridas em concentrações 100 vezes a concentração utilizada. Para isso, os fármacos foram diluídas 10 vezes e novamente diluídas à 1:5 com o meio RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute*) para se conseguir concentração 2 vezes necessária para o teste de microdiluição. A faixa de concentração para fluconazol foi de 0,125 a 64 µg/mL e de 0,0313 a 16µg/mL para nistatina e itraconazol.

#### 3.12.2 Meio de cultura.

Foi utilizado o meio RPMI-1640 com L-glutamina e glicose sem bicarbonato de sódio tamponado com 0,165 M do ácido 4-Morfolinopropanosulfônico (MOPS) (Anexo 2). O pH foi ajustado para 7.0 com NaOH 1 N. A esterilização da solução foi realizada por

filtragem a vácuo utilizando filtro de membrana milipore de 0,22 micras. O meio pronto foi mantido refrigerado por até 15 dias.

### 3.12.3 Padronização do inóculo.

A partir de uma cultura de 24 horas a 37°C em meio Ágar Sabouraud Dextrose foram preparados 5 mL de uma suspensão de leveduras em tubos de ensaio com água destilada estéril. Após a homogeneização em agitador tipo vórtex, a turvação da suspensão foi ajustada ao tubo 0,5 da escala de McFarland com auxílio de um espectrofotômetro (CELM E-225 D) com absorvância de 625nm de forma a obter uma suspensão padrão com  $1 \times 10^6$  à  $5 \times 10^6$  CFC/mL. A suspensão padrão de levedura foi novamente homogeneizada durante 15 segundos em vórtex, diluída 1:50 e depois 1:20 com o meio de cultura RPMI-1640, para se obter o inóculo 2 vezes concentrado usado no teste (de  $1 \times 10^3$  a  $5 \times 10^3$  CFU/mL). Finalmente, o inóculo então foi diluído a 1:1 quando os poços foram inoculados, chegando-se à concentração final desejada de inóculo de  $0,5 \times 10^3$  a  $2,5 \times 10^3$  CFU/mL).

### 3.12.4 Preparação da placa de diluição.

O teste de microdiluição foi realizado em placas de microdiluição estéreis de 96 poços com fundo chato. As concentrações 2 vezes do fármaco foram dispensadas nos poços das fileiras 1 a 10 das placas de microdiluição, em volumes de 100µL. A primeira fileira continha a maior concentração do fármaco (64 ou 16µg/mL) e a fileiras 10 a menor concentração da (0,12 ou 0,03µg/mL). Na fileira 11 foi adicionado o meio sem o fármaco sendo este o controle positivo de crescimento. A fileira 12 da placa foi usada para ser o controle de esterilidade e também o “Branco”, preenchida com 200µL do meio isenta do fármaco.

### 3.12.5 Execução do teste e leitura da concentração inibitória mínima – CIM.

Em cada poço da placa de microdiluição foi inoculado 100µL da suspensão fúngica 2 vezes concentrada, o que leva às diluições dos fármacos e à concentração do inóculo antes mencionados. As placas foram vedadas com papel adesivo Contact<sup>®</sup> e incubadas por 48 horas à 35°C. Após esse período, as placas de fluconazol e itraconazol foram lidas em leitora de microplacas (Polaris<sup>®</sup> - Celer Biotecnologia S/A) na absorvância de 405 nm. Os valores de absorvância obtidos em cada poço foram então subtraídos dos valores

dos poços 12 (Branco). O valor de CIM foi definido como a menor concentração em que se observa uma diminuição de 50% da turbidez dos poços em relação ao poço 11 (controle de crescimento). Para nistatina, a leitura foi realizada visualmente e o valor de CIM foi definido como a menor concentração em que se observa o poço opticamente claro, ou seja, sem crescimento visível.

### **3.13 Susceptibilidade antifúngica ao óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf.**

#### **3.13.1 Solução estoque de óleos essenciais.**

O preparo da diluição do óleo essencial seguiu modelo adotado por Lima e colaboradores (2006). Em um tubo de vidro estéril foram adicionados 0,8 mL (704 mg) do óleo essencial; 0,05 mL de Tween-80 e 4,2 mL de Meio RPMI-1640 sendo esta concentração correspondente a 140,8 mg/mL. O tubo foi agitado durante 5 minutos em agitador tipo vórtex e em seguida, utilizando o procedimento de diluição seriada (1:1) em meio de cultura, obtiveram-se as demais concentrações que variaram de 0,06875 à 35,2 mg/mL sendo estas concentrações 2 vezes a concentração necessária para o teste de microdiluição.

#### **3.13.2 Execução do teste e leitura da CIM.**

O teste de microdiluição do óleo essencial foi realizado em placas de microdiluição estéreis de 96 poços com fundo “U”. A metodologia de inoculação e incubação seguiu o mesmo protocolo utilizado no teste de sensibilidade aos antifúngicos descritos anteriormente (3.12.5). A leitura foi realizada visualmente e o valor de CIM foi definido como a menor concentração em que se observa o poço opticamente claro, ou seja, sem crescimento visível.

### **3.14 Concentração fungicida mínima – CFM.**

Após a leitura da CIM, de forma a determinar a concentração fungicida mínima (CFM), 10µL de inóculo de cada poço foram inoculados em meio Ágar Sabouraud Dextrose e incubados à 35°C durante 48 horas. A CFM é a concentração de um antimicrobiano que leva à morte de um microrganismo e será definida como a concentração mais baixa de óleo capaz de matar a totalidade das células (CANTÓN *et al.*, 2003).

### **3.15 Ensaio de sinergismo do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf associado com nistatina – Método de *Checkerboard*.**

O efeito combinado das duas substâncias (óleo essencial + nistatina) foi determinado pela técnica de microdiluição *Checkerboard* de acordo com Fernandez-Cuenca *et al.* (2003), para derivação do índice de concentração inibitória fracionada (índice CIF).

O teste foi realizado utilizando placas de microdiluição estéreis de 96 poços com fundo chato. Foram testadas quatro associações de concentrações de óleo essencial (0,137 - 0,275 - 0,55 e 1,1 mg/mL) junto com dez concentrações de nistatina (de 0,0313 a 16µg/mL). Cada placa recebeu uma concentração do óleo essencial mais as dez concentrações de nistatina. As fileiras 11 e 12 das placas foram utilizadas como controle positivo de crescimento (meio sem óleo e fármaco) e negativo/branco (meio com óleo e sem inóculo).

A metodologia de inoculação e incubação seguiu o mesmo protocolo utilizado no teste de susceptibilidade a antifúngicos descritos anteriormente (3.12). A leitura foi realizada em leitora de microplacas (Polaris® - Celer Biotecnologia S/A) na absorvância de 405 nm. Os valores de absorvância obtidos para os poços foram então subtraídos dos valores dos poços 12 (Branco).

O valor da concentração inibitória mínima combinada (CIMC) foi definido como a menor concentração em que se observa uma diminuição de 100% da turbidez dos poços em relação ao poço 11 (controle de crescimento).

O índice CIF foi calculado através da soma do  $CIF^A + CIF^B$ , onde “A” representa o óleo essencial e o “B” a nistatina. O  $CIF^A$ , por sua vez, é calculado através da relação  $CIMC^A/CIM^A$  sozinho enquanto que o  $CIF^B$  é igual à  $CIMC^B /CIM^B$  sozinho. O índice CIF é então interpretado como sinergismo (< 0,5), aditividade (de 0,5 à 1,0), indiferente (> 1 e < 4) ou antagonismo (> 4) (FERNANDEZ-CUENCA *et al.*, 2003).

### **3.16 Análises estatísticas.**

Os dados foram tabulados e as análises estatísticas foram realizadas no software SPSS® *Statistic* versão 17. Foram realizados testes descritivos de frequência e correlações do Qui-quadrado de Pearson com  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Caracterização físico-químico e rendimento da extração do óleo essencial.

Os parâmetros físico-químicos encontrados na avaliação do óleo essencial e a porcentagem de rendimento da extração estão demonstrados na tabela 1.

**Tabela 1 – Parâmetros físico-químicos e teor de rendimento da extração do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf.**

Parâmetros	Óleo essencial
Índice de refração	1,4872
Densidade (g/mL) (20°C)	0,881
Solubilidade em etanol 100%	1:1
Solubilidade em etanol 80% (v/v)	1:5
Cor	Amarelo
Transparência	Límpido
Rendimento (%)	0,94%

### 4.2 Identificação e quantificação dos constituintes químicos do óleo essencial.

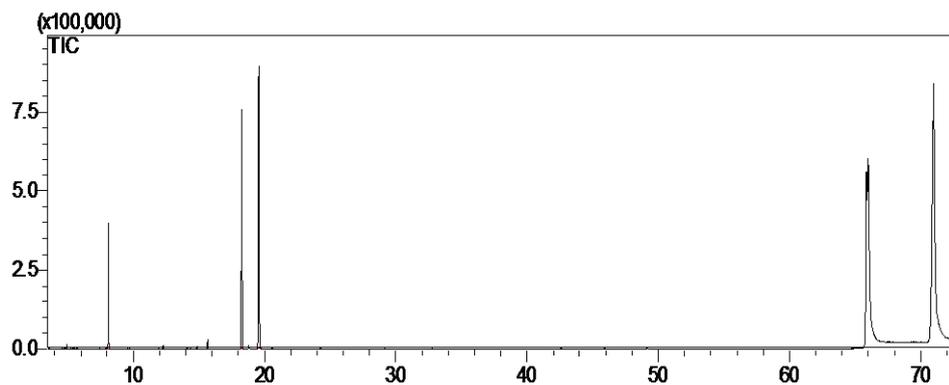
Após as análises por cromatografia gasosa realizadas com o óleo essencial e posteriores comparações dos resultados com os dados da biblioteca, foram identificados os compostos voláteis predominantes no óleo, como mostra a tabela 2 e figuras 4, 5, 6 e 7.

**Tabela 2 – Constituintes do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf.**

<sup>1</sup> Nome do Composto	<sup>2</sup> TR (min)	<sup>3</sup> IR <sub>C</sub>	<sup>4</sup> A (%)
6,7-Diazabicyclo[3.2.2]nona-3,6-diene, 2-methylene-	4.905	868	0.64
Mirceno	8.090	988	13.76
Cyclohexaneacetaldehyde, 2-methylene-	15.664	1179	1.07
Neral	18.257	1239	37.18
Geranial	19.565	1268	47.35
<b>Total</b>			<b>100</b>

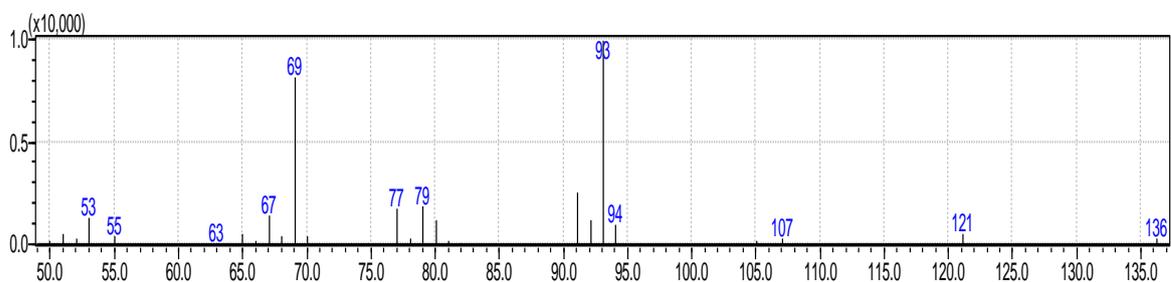
**1:** Compostos identificados pela comparação de seus espectros de massa e índices de retenção com a biblioteca Adams (2007); compostos com área  $\geq 0,1\%$ ; **2:** Tempo de retenção do composto na coluna cromatográfica em minutos; **3:** Índice de retenção calculado em relação a uma série de alcanos; **4:** Área percentual de cada pico em relação à área total do cromatograma.

**Figura 4** – Cromatograma do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf.



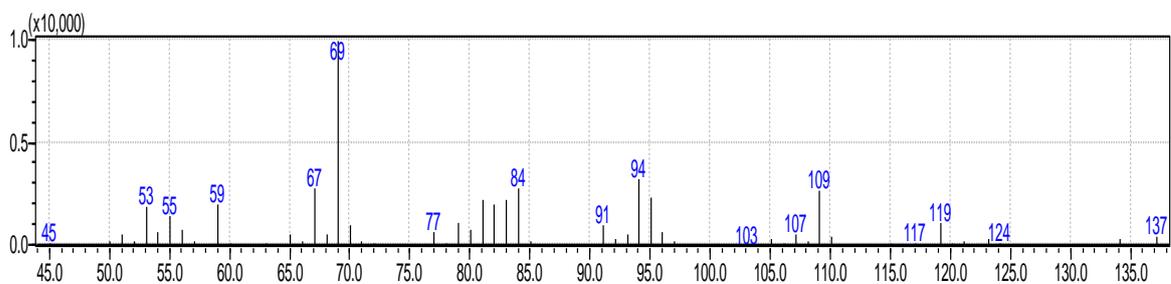
(Fonte: autor).

**Figura 5** – Espectrograma de massa específico da molécula Mirceno



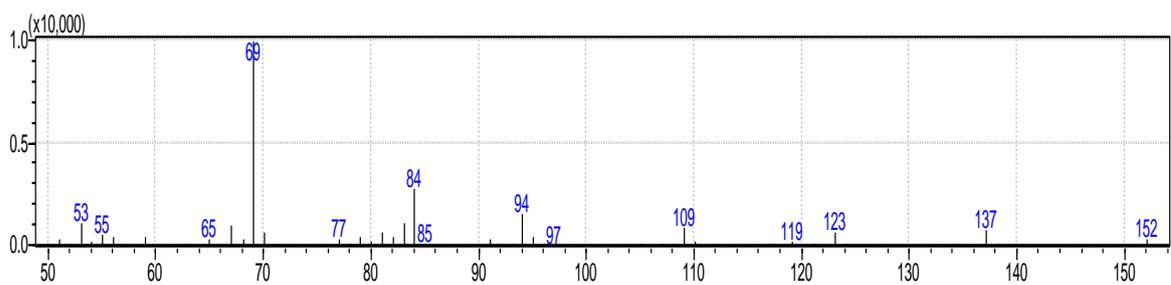
(Fonte: autor).

**Figura 6** – Espectrograma de massa específico da molécula Neral



(Fonte: autor).

**Figura 7** – Espectrograma de massa específico da molécula Geranial



(Fonte: autor).

### 4.3 Identificação das leveduras.

Neste estudo, 298 cepas de leveduras de cavidade oral que estão depositados na coleção microbiológica do Laboratório de Pesquisas Básicas da Univás foram identificadas pelas análises cromogênica, fenotípicas e proteômica. A diversidade das espécies encontradas está demonstrada na tabela 3.

**Tabela 3 - Diversidade de leveduras da coleção microbiológica do laboratório de Pesquisas Básicas provenientes de cavidade oral de pacientes oncológicos.**

<b>Espécies</b>	<b>Frequência</b>	<b>%</b>	<b>% acumulada</b>
<i>Candida albicans</i>	193	64,77	64,77
<i>Candida glabrata</i>	49	16,44	81,21
<i>Candida tropicalis</i>	27	9,06	90,27
<i>Candida parapsilosis</i>	8	2,68	92,95
<i>Candida dubliniensis</i>	5	1,68	94,63
<i>Clavispora lusitaniae</i>	3	1,01	95,64
<i>Issatchenkia orientalis</i>	3	1,01	96,65
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	2	0,67	97,32
<i>Pichia norvegensis</i>	2	0,67	97,99
<i>Candida inconspicua</i>	1	0,34	98,33
<i>Candida metapsilosis</i>	1	0,34	98,67
<i>Candida pararugosa</i>	1	0,34	99,01
<i>Cyberlindnera jadinii</i>	1	0,34	99,35
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	1	0,34	99,69
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1	0,34	100
<b>Total</b>	<b>298</b>	<b>100</b>	

Um total de 64,76% das cepas foram identificadas como *Candida albicans* sendo este o microrganismo mais frequente. Também foram encontradas 1,68% de *Candida dubliniensis*, microrganismo muito semelhante à *Candida albicans*.

Neste estudo, estavam presentes espécies dos complexos: *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* e *Candida rugosa*. Também foi verificada a presença das espécies: *Candida tropicalis*, *Issatchenkia orientalis*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Clavispora lusitaniae*, *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia norvegensis*, *Candida inconspicua*, *Cyberlindnera jadinii* e *Saccharomyces cerevisiae*.

#### 4.4 Atividade enzimática.

##### 4.4.1 Atividade proteolítica.

No presente estudo, a atividade proteolítica foi encontrada em 74,49% das cepas. *Candida albicans* foi a espécie que apresentou maior atividade proteolítica seguida de *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis*, como demonstrado na tabela 4. Espécies de *Candida* não-*albicans* produtoras desta enzima somaram 30,47%. Quanto a classificação da atividade enzimática, os dados estão dispostos na tabela 5.

**Tabela 4 – Atividade proteolítica das espécies de leveduras de cavidade oral de pacientes oncológicos.**

<b>Espécies</b>	<b>Fortemente positivo</b>	<b>Positivo</b>	<b>Negativo</b>
<i>Candida albicans</i>	179	11	3
<i>Candida tropicalis</i>	7	13	7
<i>Candida parapsilosis</i>	7	0	1
<i>Candida dubliniensis</i>	3	1	1
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	1	0	1
<i>Candida glabrata</i>	0	0	49
<i>Clavispora lusitaniae</i>	0	0	3
<i>Issatchenkia orientalis</i>	0	0	3
<i>Pichia norvegensis</i>	0	0	2
<i>Candida inconspicua</i>	0	0	1
<i>Candida metapsilosis</i>	0	0	1
<i>Candida pararugosa</i>	0	0	1
<i>Cyberlindnera jadinii</i>	0	0	1
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	0	0	1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0	0	1
<b>Total</b>	<b>197</b>	<b>25</b>	<b>76</b>

**Tabela 5 – Atividade proteolítica de espécies de *Candida albicans* e de *Candida* não-*albicans*.**

	<b>Protease</b>			<b>Total</b>
	<b>Fortemente Positivo</b>	<b>Positivo</b>	<b>Negativo</b>	
<i>Candida albicans</i>	92,7%	5,7%	1,6%	100,0%
<i>Candida</i> não- <i>albicans</i>	17,1%	13,3%	69,5%	100,0%
<b>Total</b>	<b>66,1%</b>	<b>8,4%</b>	<b>25,5%</b>	<b>100,0%</b>

Teste do Qui-quadrado.  $p < 0,000$ .

#### 4.4.2 Atividade fosfolipídica.

Neste estudo, a atividade fosfolipídica foi encontrada em 63,75% das cepas. *Candida albicans* foi a espécie que apresentou maior atividade fosfolipídica, como demonstrado na tabela 6. Espécies de *Candida* não-*albicans* negativa para esta enzima somaram 94,28%. Quanto à classificação da atividade enzimática, os dados estão dispostos na tabela 7.

**Tabela 6 – Atividade fosfolipídica de leveduras de cavidade oral de pacientes oncológicos.**

<b>Espécies</b>	<b>Fortemente Positivo</b>	<b>Positivo</b>	<b>Negativo</b>
<i>Candida albicans</i>	64	120	9
<i>Candida tropicalis</i>	1	1	25
<i>Pichia norvegensis</i>	1	1	0
<i>Cyberlindnera jadinii</i>	1	0	0
<i>Issatchenkia orientalis</i>	0	1	2
<i>Candida glabrata</i>	0	0	49
<i>Candida parapsilosis</i>	0	0	8
<i>Candida dubliniensis</i>	0	0	5
<i>Clavispora lusitaniae</i>	0	0	3
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0	0	2
<i>Candida inconspicua</i>	0	0	1
<i>Candida metapsilosis</i>	0	0	1
<i>Candida pararugosa</i>	0	0	1
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	0	0	1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0	0	1
<b>Total</b>	<b>67</b>	<b>123</b>	<b>108</b>

**Tabela 7 – Atividade fosfolipídica de espécies de *Candida albicans* e de *Candida* não-*albicans*.**

	<b>Fosfolipase</b>			<b>Total</b>
	<b>Fortemente Positivo</b>	<b>Positivo</b>	<b>Negativo</b>	
<i>Candida albicans</i>	33,2%	62,2%	4,7%	100,0%
<i>Candida</i> não- <i>albicans</i>	2,9%	2,9%	94,3%	100,0%
<b>Total</b>	<b>22,5%</b>	<b>41,3%</b>	<b>36,2%</b>	<b>100,0%</b>

Teste do Qui-quadrado.  $p < 0,000$ .

#### 4.4.3 Atividade hemolítica.

A atividade hemolítica deste estudo esteve presente na maioria dos isolados (89,26%). Todos os espécimes de *Candida albicans* foram positivos para esta enzima, porém algumas espécies não a produziram como demonstrado na tabela 8. Espécies de *Candida* não-*albicans* positiva para esta enzima somaram 69,52%. Quanto à classificação da atividade enzimática, os dados estão dispostos na tabela 9.

**Tabela 8 – Atividade hemolítica de leveduras de cavidade oral de pacientes oncológicos.**

<b>Espécies</b>	<b>Fortemente Positivo</b>	<b>Positivo</b>	<b>Negativo</b>
<i>Candida albicans</i>	173	20	0
<i>Candida glabrata</i>	33	1	15
<i>Candida tropicalis</i>	18	7	2
<i>Candida dubliniensis</i>	4	0	1
<i>Issatchenkia orientalis</i>	3	0	0
<i>Pichia norvegensis</i>	2	0	0
<i>Cyberlindnera jadinii</i>	1	0	0
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	1	0	0
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	1	0	1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0	1	0
<i>Clavispora lusitaniae</i>	0	1	2
<i>Candida parapsilosis</i>	0	0	8
<i>Candida inconspicua</i>	0	0	1
<i>Candida metapsilosis</i>	0	0	1
<i>Candida pararugosa</i>	0	0	1
<b>Total</b>	<b>236</b>	<b>30</b>	<b>32</b>

**Tabela 9 – Atividade hemolítica de espécies de *Candida albicans* e de *Candida* não-*albicans*.**

	<b>Hemolisina</b>			<b>Total</b>
	<b>Fortemente Positivo</b>	<b>Positivo</b>	<b>Negativo</b>	
<i>Candida albicans</i>	89,6%	10,4%	0,0%	100,0%
<i>Candida</i> não- <i>albicans</i>	60,0%	9,5%	30,5%	100,0%
<b>Total</b>	<b>79,2%</b>	<b>10,1%</b>	<b>10,7%</b>	<b>100,0%</b>

Teste do Qui-quadrado.  $p < 0,000$ .

## 4.5 Perfil de sensibilidade aos antifúngicos.

### 4.5.1 Fluconazol.

Neste estudo 97,3% dos isolados fúngicos foram sensíveis para o fluconazol, enquanto que 1% foi resistente, como demonstra a tabela 10. Para a CIM de *Candida albicans*, o intervalo foi de 0,125 a 8,0 µg e de 0,125 a 16,0 µg para isolados de *Candida* não-*albicans*. Conhecido por apresentar resistência intrínseca ao fluconazol, *Issatchenkia orientalis* apresentou neste estudo, CIM de 64µg. Quando comparado o perfil de sensibilidade entre as espécies, houve uma diferença estatística com  $p < 0,000$ .

**Tabela 10 – Perfil de susceptibilidade antifúngica das leveduras de cavidade oral de pacientes oncológicos frente ao fluconazol.**

Espécies	CIM		Sensibilidade		
	CIM <sub>50</sub>	CIM <sub>90</sub>	R	S	S-DD
<i>Issatchenkia orientalis</i>	64	64	3	0	0
<i>Pichia norvegensis</i>	32	32	0	0	2
<i>Candida inconspicua</i>	16	16	0	0	1
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	4	16	0	1	1
<i>Candida metapsilosis</i>	4	4	0	1	0
<i>Candida parapsilosis</i>	2	8	0	8	0
<i>Candida albicans</i>	1	4	0	193	0
<i>Candida glabrata</i>	1	4	0	49	0
<i>Cyberlindnera jadinii</i>	1	1	0	1	0
<i>Candida tropicalis</i>	0,5	4	0	27	0
<i>Candida dubliniensis</i>	0,5	2	0	5	0
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	0,5	0,5	0	1	0
<i>Clavispora lusitaniae</i>	< 0,125	0,25	0	3	0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	< 0,125	< 0,125	0	1	0
<b>Total</b>			<b>3</b>	<b>290</b>	<b>5</b>

Teste do Qui-quadrado  $p < 0,000$ .

**CIM<sub>50</sub>**: Concentração inibitória mínima que inibe 50% dos isolados; **CIM<sub>90</sub>**: Concentração inibitória mínima que inibe 90% dos isolados; **R**: Resistente; **S**: Sensível; **S-DD**: Dose intermediária ou dose dependente.

#### 4.5.2 Itraconazol.

Nesta pesquisa 48,3% dos isolados fúngicos foram sensíveis para o itraconazol, enquanto que 9,7% foram resistentes como demonstra a tabela 11. Para a CIM de *Candida albicans* o intervalo foi de 0,3125 a 1,0 µg, enquanto que isolados de *Candida* não-*albicans* o intervalo foi de 0,3125 a 2,0 µg. Quando comparada o perfil de sensibilidade entre as espécies, houve uma diferença estatística com  $p < 0,000$ .

**Tabela 11 – Perfil de susceptibilidade antifúngica das leveduras de cavidade oral de pacientes oncológicos frente ao itraconazol.**

Espécies	CIM		Sensibilidade		
	CIM <sub>50</sub>	CIM <sub>90</sub>	R	S	S-DD
<i>Issatchenkia orientalis</i>	2	2	3	0	0
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	1	2	2	0	0
<i>Candida pararugosa</i>	1	1	1	0	0
<i>Pichia norvegensis</i>	1	1	2	0	0
<i>Cyberlindnera jadinii</i>	0,5	0,5	0	0	1
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	0,5	0,5	0	0	1
<i>Candida glabrata</i>	0,25	1	8	18	23
<i>Candida parapsilosis</i>	0,25	1	1	2	5
<i>Candida albicans</i>	0,25	0,5	10	94	89
<i>Candida metapsilosis</i>	0,125	0,125	0	1	0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0,125	0,125	0	1	0
<i>Candida tropicalis</i>	0,0625	0,5	2	19	6
<i>Candida dubliniensis</i>	< 0,03	0,125	0	5	0
<i>Candida inconspicua</i>	< 0,03	< 0,03	0	1	0
<i>Clavispora lusitaniae</i>	< 0,03	< 0,03	0	3	0
<b>Total</b>			<b>29</b>	<b>144</b>	<b>125</b>

Teste do Qui-quadrado  $p < 0,000$ .

**CIM<sub>50</sub>**: Concentração inibitória mínima que inibe 50% dos isolados; **CIM<sub>90</sub>**: Concentração inibitória mínima que inibe 90% dos isolados; **R**: Resistente; **S**: Sensível; **S-DD**: Dose intermediária ou dose dependente.

### 4.5.3 Nistatina.

Neste estudo 33,2% dos isolados fúngicos tiveram a CIM > 16 µg e 50,3% com CIM 16 µg. Nos isolados de *Candida albicans* o intervalo foi de 2,0 a >16,0 µg, enquanto que espécies de *Candida* não-*albicans* tiveram intervalo de 4 a >16 µg. Os demais dados estão dispostos na tabela 12. Quando comparado o perfil de sensibilidade entre as espécies não houve uma diferença estatística com  $p = 0,074$ .

**Tabela 12 – Perfil de susceptibilidade antifúngica das leveduras de cavidade oral de pacientes oncológicos frente à nistatina.**

Espécies	Concentração de nistatina em					CIM		
	µg/ml					CIM <sub>50</sub>	CIM <sub>90</sub>	Intervalo
	2	4	8	16	>16			
<i>Issatchenkia orientalis</i>	0	0	0	0	3	>16	>16	>16
<i>Candida tropicalis</i>	0	1	4	4	18	>16	>16	4 - >16
<i>Candida albicans</i>	3	7	20	100	63	16	>16	2 - >16
<i>Candida inconspicua</i>	0	0	0	0	1	16	16	>16
<i>Candida metapsilosis</i>	0	0	0	0	1	16	16	>16
<i>Candida parapsilosis</i>	0	0	0	2	6	16	16	16 - >16
<i>Candida glabrata</i>	0	1	9	32	7	16	16	4 - >16
<i>Clavispora lusitaniae</i>	0	0	0	3	0	16	16	16
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0	0	0	2	0	16	16	16
<i>Pichia norvegensis</i>	0	0	0	2	0	16	16	16
<i>Candida pararugosa</i>	0	0	0	1	0	16	16	16
<i>Cyberlindnera jadinii</i>	0	0	0	1	0	16	16	16
<i>Candida dubliniensis</i>	0	0	2	3	0	16	16	8 - 16
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	0	0	1	0	0	8	8	8
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0	0	1	0	0	8	8	8
<b>Total</b>	<b>3</b>	<b>9</b>	<b>37</b>	<b>150</b>	<b>99</b>	<b>16</b>	<b>&gt;16</b>	<b>2 - &gt;16</b>

Teste do Qui-quadrado  $p = 0,074$ .

**CIM<sub>50</sub>**: Concentração inibitória mínima que inibe 50% dos isolados; **CIM<sub>90</sub>**: Concentração inibitória mínima que inibe 90% dos isolados.

#### 4.5.4 Correlação da sensibilidade antifúngica entre os fármacos.

##### 4.5.4.1 Fluconazol x itraconazol.

Nesta pesquisa, após o cruzamento de dados pelo teste do Qui-quadrado, verificou-se que alguns dados estão diretamente correlacionados. Na tabela 13 constata-se que 100% das espécies de *Candida não-albicans* que foram resistentes ao fluconazol também foram resistentes ao itraconazol, além de 80% das cepas classificadas como dose dependente ao fluconazol serem resistentes ao itraconazol. Quando comparado o cruzamento do perfil de susceptibilidade entre as espécies de *Candida albicans* e *Candida não-albicans* houve uma diferença estatística com  $p < 0,000$ .

**Tabela 13 – Correlação entre os resultados da sensibilidade entre os fármacos fluconazol x itraconazol entre isolados de *Candida albicans* e *Candida não-albicans***

		Fluconazol x Itraconazol		
Grupo		Itraconazol		
		R	S	S-DD
<i>Candida albicans</i>	R	-	-	-
	S	5,2%	48,7%	46,1%
	S-DD	-	-	-
<b>Fluconazol</b> <i>Candida não-albicans</i> ( $p < 0,000$ )	R	100,0%	-	-
	S	12,4%	50,5%	37,1%
	S-DD	80,0%	20,0%	-

Teste do Qui-quadrado  $p < 0,000$ .

**R:** Resistente; **S:** Sensível; **S-DD:** Dose intermediária ou dose dependente.

##### 4.5.4.2 Fluconazol x nistatina.

Ao cruzar os dados de susceptibilidade entre fluconazol x nistatina, pode-se observar que 100% das espécies de *Candida não-albicans* resistentes ao fluconazol tiveram a CIM para nistatina  $> 16 \mu\text{g/mL}$ , ou seja, o valor mais alto neste estudo para nistatina como demonstra a tabela 14. Observou-se ainda que, 80% das leveduras de *Candida não-albicans* dose dependente ao fluconazol tiveram CIM de  $16 \mu\text{g/mL}$  para nistatina. Quando comparado o cruzamento do perfil de susceptibilidade entre as espécies de *Candida albicans* e *Candida não-albicans* não houve diferença estatística com  $p = 0,429$ .

**Tabela 14 – Correlação entre os resultados da sensibilidade entre os fármacos fluconazol x nistatina entre isolados de *Candida albicans* e *Candida* não-*albicans***

		<b>Fluconazol x Nistatina</b>				
Grupo		<b>Nistatina (µg/mL)</b>				
		> 16	16	8	4	2
<i>Candida albicans</i>	R	-	-	-	-	-
	S	32,6%	51,8%	10,4%	3,6%	1,6%
	S-DD	-	-	-	-	-
<b>Fluconazol</b>						
<i>Candida</i> não- <i>albicans</i> (p = 0,222)	R	100,0%	-	-	-	-
	S	33,0%	47,4%	17,5%	2,1%	-
	S-DD	20,0%	80,0%	-	-	-

Teste do Qui-quadrado p = 0,429.

**R:** Resistente; **S:** Sensível; **S-DD:** Dose intermediária ou dose dependente.

#### 4.5.4.3 Itraconazol x nistatina.

Ao correlacionar os resultados da susceptibilidade antifúngica de itraconazol frente à nistatina, observou-se que 30% e 70% das espécies de *Candida albicans* resistentes ao itraconazol tiveram a CIM para nistatina de >16 e 16 µg/mL, respectivamente, como demonstra a tabela 15. Verificou-se ainda que 60,7% de *C. albicans* dose dependente para o itraconazol tiveram a CIM de 16 µg/mL para nistatina. Quando comparado o cruzamento do perfil de susceptibilidade entre as espécies de *Candida albicans* e *Candida* não-*albicans*, houve diferença estatística com p = 0,001.

**Tabela 15 – Correlação entre os resultados da sensibilidade entre os fármacos itraconazol x nistatina entre isolados de *Candida albicans* e *Candida* não-*albicans*.**

		<b>Itraconazol x Nistatina</b>				
Grupo		<b>Nistatina (µg/mL)</b>				
		> 16	16	8	4	2
<i>Candida albicans</i> (p= 0,004)	R	30,0%	70,0%	-	-	-
	S	30,9%	41,5%	17,0%	7,4%	3,2%
	S-DD	34,8%	60,7%	4,5%	-	-
<b>Itraconazol</b>						
<i>Candida</i> não- <i>albicans</i> (p = 0,158)	R	42,1%	52,6%	5,3%	-	-
	S	40,0%	36,0%	20,0%	4,0%	-
	S-DD	22,2%	61,1%	16,7%	-	-

Teste do Qui-quadrado p = 0,001.

**R:** Resistente; **S:** Sensível; **S-DD:** Dose intermediária ou dose dependente.

#### 4.6 Susceptibilidade antifúngica de leveduras frente ao óleo essencial.

Neste estudo, a ação inibitória do óleo essencial ocorreu em todas as cepas de leveduras testadas, como demonstrado na tabela 16. Ao correlacionar espécies pela CIM pelo teste do Qui-quadrado, houve uma diferença significativa com  $p < 0,000$ .

**Tabela 16 – Concentração inibitória mínima do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf sobre espécies de leveduras de cavidade oral de pacientes oncológicos.**

Espécies	Concentração do óleo essencial em mg/ml					CIM		
	0,137	0,275	0,55	1,1	2,2	CIM <sub>50</sub>	CIM <sub>90</sub>	Intervalo
	<i>Candida glabrata</i>	0	0	16	32	1	1,1	1,1
<i>Cyberlindnera jadinii</i>	0	0	0	1	0	1,1	1,1	1,1
<i>Candida parapsilosis</i>	0	0	2	6	0	1,1	1,1	0,55-1,1
<i>Issatchenkia orientalis</i>	0	1	0	2	0	1,1	1,1	0,275-1,1
<i>Candida tropicalis</i>	3	0	6	18	0	1,1	1,1	0,137-1,1
<i>Candida albicans</i>	0	20	138	28	7	0,55	1,1	0,275-2,2
<i>M. guilliermondii</i>	0	0	1	1	0	0,55	1,1	0,55-1,1
<i>Candida dubliniensis</i>	0	1	3	1	0	0,55	1,1	0,275-1,1
<i>Pichia norvegensis</i>	0	0	2	0	0	0,55	0,55	0,55
<i>Candida inconspicua</i>	0	0	1	0	0	0,55	0,55	0,55
<i>Candida metapsilosis</i>	0	0	1	0	0	0,55	0,55	0,55
<i>Clavispora lusitaniae</i>	0	2	1	0	0	0,275	0,55	0,275-0,55
<i>Candida pararugosa</i>	0	1	0	0	0	0,275	0,275	0,275
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	0	1	0	0	0	0,275	0,275	0,275
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0	1	0	0	0	0,275	0,275	0,275
<b>Total</b>	<b>3</b>	<b>27</b>	<b>171</b>	<b>89</b>	<b>8</b>	<b>0,55</b>	<b>1,1</b>	<b>0,137-2,2</b>

Teste do Qui-quadrado  $p < 0,000$ .

**CIM<sub>50</sub>**: Concentração inibitória mínima que inibe 50% dos isolados; **CIM<sub>90</sub>**: Concentração inibitória mínima que inibe 90% dos isolados.

Ao correlacionar a susceptibilidade do óleo essencial entre as espécies de *Candida albicans* e *Candida não-albicans* verificou-se uma resistência maior de isolados de *Candida não-albicans* com diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,000$ ) como demonstra a tabela 17, porém nos isolados de *Candida albicans* o intervalo foi de 0,275 a 2,2 mg/mL enquanto que espécies de *Candida não-albicans* tiveram intervalo de 0,137 a 2,2 mg/mL.

**Tabela 17 – Correlação entre os resultados da concentração inibitória mínima do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf entre isolados de *Candida albicans* e *Candida não-albicans*.**

Espécies	Concentração do óleo essencial em mg/ml				
	0,137	0,275	0,55	1,1	2,2
<i>Candida albicans</i>	0,0%	10,4%	81,9%	96,4%	100%
<i>Candida não-albicans</i>	2,9%	9,6%	41%	99,1%	100%
<b>Total</b>	<b>1,0%</b>	<b>10,1%</b>	<b>67,5%</b>	<b>97,4%</b>	<b>100%</b>

Teste do Qui-quadrado  $p < 0,000$ .

#### 4.7 Concentração fungicida mínima do óleo essencial.

Neste estudo, a ação fungicida do óleo essencial ocorreu em todas as cepas de leveduras testadas, como demonstrado na tabela 18. Ao correlacionar as espécies pela CFM pelo teste do Qui-quadrado, houve diferença significativa.

**Tabela 18 – Concentração fungicida mínima do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf sobre espécies de leveduras de cavidade oral de pacientes oncológicos.**

Espécies	Concentração do óleo essencial em mg/ml					CFM		
	0,137	0,275	0,55	1,1	2,2	CFM <sub>50</sub>	CFM <sub>90</sub>	Intervalo
	<i>Candida parapsilosis</i>	0	0	1	5	2	1,1	2,2
<i>Candida glabrata</i>	0	0	7	39	3	1,1	1,1	0,55-2,2
<i>Candida metapsilosis</i>	0	0	0	1	0	1,1	1,1	1,1
<i>Cyberlindnera jadinii</i>	0	0	0	1	0	1,1	1,1	1,1
<i>Candida dubliniensis</i>	0	0	2	3	0	1,1	1,1	0,55-1,1
<i>Issatchenkia orientalis</i>	0	0	1	2	0	1,1	1,1	0,55-1,1
<i>Candida tropicalis</i>	2	1	4	20	0	1,1	1,1	0,137-1,1
<i>Candida albicans</i>	0	8	129	42	14	0,55	1,1	0,275-2,2
<i>M. guilliermondii</i>	0	0	1	1	0	0,55	1,1	0,55-1,1
<i>Clavispora lusitaniae</i>	0	0	3	0	0	0,55	0,55	0,55
<i>Candida inconspicua</i>	0	0	1	0	0	0,55	0,55	0,55
<i>Pichia norvegensis</i>	0	0	2	0	0	0,55	0,55	0,55
<i>Candida pararugosa</i>	0	1	0	0	0	0,275	0,275	0,275
<i>K. marxianus</i>	0	1	0	0	0	0,275	0,275	0,275
<i>S. cerevisiae</i>	0	1	0	0	0	0,275	0,275	0,275
<b>Total</b>	<b>2</b>	<b>12</b>	<b>151</b>	<b>114</b>	<b>19</b>	<b>0,55</b>	<b>1,1</b>	<b>0,137-2,2</b>

Teste do Qui-quadrado  $p < 0,000$ .

**CFM<sub>50</sub>**: Concentração fungicida mínima que inibe 50% dos isolados; **CFM<sub>90</sub>**: Concentração fungicida mínima que inibe 90% dos isolados.

Ao correlacionar os dados da CFM do óleo essencial entre as espécies de *Candida albicans* e *Candida não-albicans*, verificou-se resistência maior dos isolados de *Candida não-albicans* com diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,000$ ), como demonstra a tabela 19. Nos isolados de *Candida albicans* o intervalo foi de 0,275 a 2,2 mg/mL, enquanto que espécies de *Candida não-albicans* tiveram intervalo de 0,137 a 2,2 mg/mL.

**Tabela 19 – Correlação entre os resultados da concentração fungicida mínima do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf entre isolados de *Candida albicans* e *Candida não-albicans*.**

Espécies	Concentração do óleo essencial em mg/ml				
	0,137	0,275	0,55	1,1	2,2
<i>Candida albicans</i>	0,0%	4,1%	70,9%	92,7%	100%
<i>Candida não-albicans</i>	1,9%	5,7%	26,7%	95,3%	100%
<b>Total</b>	<b>0,7%</b>	<b>4,7%</b>	<b>55,4%</b>	<b>93,7%</b>	<b>100%</b>

Teste do Qui-quadrado  $p < 0,000$ .

#### 4.8 Avaliação da associação do óleo essencial junto com nistatina frente às leveduras – Método de *Checkerboard*.

Através do teste *Checkerboard*, observou-se uma interação positiva quanto comparada a CIM da nistatina sozinha, com a CIM da nistatina associada ao óleo essencial, como demonstra a tabela 20. A correlação é estatisticamente significativa com  $p < 0,000$ .

**Tabela 20 – Concentração inibitória fracionada do antifúngico nistatina frente às leveduras.**

Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	CIM Sozinho		CIM Combinado	
	Frequência	%	Frequência	%
0,03	0,0	0,0	212	71,14
0,06	0,0	0,0	10	3,36
0,125	0,0	0,0	6	2,01
0,25	0,0	0,0	7	2,35
2	4	1,3	1	0,34
4	9	3,0	3	1,01
8	40	13,4	9	3,02
16	143	48,0	50	16,78
> 16	102	34,2	0	0
<b>Total</b>	<b>298,0</b>	<b>100,0</b>	<b>298</b>	<b>100,0</b>

Teste do Qui-quadrado  $p < 0,000$ .

Em relação ao óleo essencial, também houve uma interação positiva quanto comparada a CIM do óleo sozinha com a CIM do óleo associado a nistatina como demonstra a tabela 21. A correlação é estatisticamente significativa com  $p < 0,000$ .

**Tabela 21 – Concentração inibitória fracionada do óleo essencial frente às leveduras.**

Concentração (mg/mL)	CIM Sozinho		CIM Combinado	
	Frequência	%	Frequência	%
0,137	3	1,0	14	4,7
0,275	29	9,7	58	19,5
0,55	171	57,4	196	65,8
1,1	87	29,2	30	10,1
2,2	8	2,7	0,0	0,0
<b>Total</b>	<b>298,0</b>	<b>100,0</b>	<b>298,0</b>	<b>100,0</b>

Teste do Qui-quadrado  $p < 0,000$ .

O efeito da combinação do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf junto com nistatina, estão dispostos na tabela 22. Neste estudo observou-se que 82,3% dos isolados fúngicos foram mais susceptíveis à combinação dos agentes do que contra os agentes sozinhos. Verificou-se ainda neste experimento, que não há efeito antagonista entre os agentes associados.

**Tabela 22 – Índice de concentração inibitória fracionada do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf associado à nistatina.**

<b>Índice CIF</b>	<b>Frequência</b>	<b>%</b>
Antagonista	0	0
Indiferente	53	17,8
Aditividade	235	78,9
Sinergismo	10	3,4
<b>Total</b>	<b>298</b>	<b>100,0</b>

#### **4.9 Produto.**

O produto é um medicamento a base de nistatina com óleo de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf para o tratamento de Candidíase oral. O status do produto encontra-se em processo de registro de propriedade intelectual.

## 5 DISCUSSÃO

No presente estudo, o rendimento da extração do óleo essencial está dentro dos valores encontrados por Santos e colaboradores (2009), que encontraram uma faixa de rendimento que variou de 0,465% a 1,18%. Em dois estudos, a média para o rendimento foi menor, como no caso de Figueiredo e colaboradores (2006), que ao analisar a influência de diversos reguladores vegetais no rendimento dos óleos essenciais extraídos num período de 1 ano, observou uma variação de 0,21% a 0,40% e no estudo de Costa *et al.* (2011), que foram observados valores de 0,46%. Diversos fatores influenciam a extração e o teor de rendimento e essa diferença ressalta Gomes e Negrelle (2015), pode ser explicada devido a fatores tais como: temperatura, condições da colheita, método de extração, solo e material utilizado como folhas secas ou frescas. Sobre este assunto, Santos *et al.* (2004), chamam a atenção para o método que utiliza biomassa livre de umidade (BLU); trata-se de um método que utiliza material vegetal seco, desidratado, que pode ser repetido a qualquer momento, sem que haja desvios significativos. O método de biomassa úmida (BU) com folhas frescas é impreciso, não apresenta reprodutibilidade e induz a grandes desvios em virtude de não ser levada em conta a verdadeira quantidade de biomassa seca utilizada.

A densidade relativa e o índice de refração do óleo essencial encontrados no presente trabalho estão de acordo com o estudo de Santos *et al.* (2009), que encontraram valores para a densidade e índice de refração de 0,957 g/mL e 1,4815, respectivamente.

Os componentes majoritários encontrados no óleo essencial deste estudo foram citral (84,53%) e mirceno (13,76%). Segundo Boukhatem *et al.* (2014), o citral é constituído pelos cis-isômero geranial e trans-isômero neral. Wilson e colaboradores (2002), observaram que o citral pode estar presente em concentrações que variam de 65 a 85%. Os resultados desta pesquisa foram superiores aos encontrados em vários estudos, no qual a faixa de citral variou de 72% a 77%. Aquino e colaboradores (2014), encontraram teores de 43,69% de neral, 34,05% de geranial e 15,11% de mirceno. Ahmad e Viljoen (2015), encontraram 42,1% de geranial e 30,5% de neral. No estudo de Gonçalves *et al.* (2015), foi encontrado 46,32% de geranial, 31,28% de neral e 12,9% de mirceno. Boukhatem e colaboradores (2014), encontraram 42,16% de geranial, 31,52% de neral e 7,45% de mirceno.

Ao estudar a ação de citral sobre *Candida albicans*, Leite e colaboradores (2014), concluíram que o mesmo tem atividade antifúngica significativa contra esta espécie e revelou ainda que as concentrações que inibem o crescimento são as mesmas que causam a sua morte. Ao estudar os efeitos de seis terpenóides sobre espécies de *Candida* spp., Zore e

colaboradores (2011), concluíram que todos mostraram excelente atividade antifúngica, sendo o linalol e o citral os mais eficazes.

Neste estudo, foi evidenciada uma frequência maior de *C. albicans* em relação aos outros isolados e condizem com a literatura. De um total de 535 pacientes com potencial de candidíase orofaríngea refratária, Yu e colaboradores (2019), identificaram 558 espécimes de *Candida* spp. dentre eles 89,6% eram *C. albicans*, seguida por *C. glabrata* (5,2%), *C. tropicalis* (2,9%) e *C. parapsilosis* (0,7%). Estudo desenvolvido com crianças e adolescentes em tratamento oncológicos, portadores de candidíase oral, González-Gravina e colaboradores (2007), observaram que a espécie *C. albicans* era a mais frequente com 42,55% dos isolados, seguida de *C. parapsilosis* (14,89%), *C. tropicalis* (12,77%), *C. krusei* (4,26%), *C. glabrata* (2,13%) e *C. lusitaniae* (2,13%). Em uma pesquisa realizada com pacientes com câncer orogástrico, Sousa *et al.* (2016), observaram que 85% dos indivíduos apresentaram leveduras na cavidade oral, dentre outras espécies, *C. albicans* foi a espécie mais prevalente representando 51,6% dos isolados, seguido por *C. glabrata* com 14,5%, *C. parapsilosis* 12,9%, *C. lusitaniae* 8% e *C. tropicalis* e *C. krusei*, ambos apresentando um percentual de 6,5% dos isolados. Sousa *et al.* (2016), também incluíram em seu trabalho um grupo de pessoas saudáveis e 59% desses indivíduos apresentaram a levedura na cavidade oral, sendo que 66,7% foram identificadas como *C. albicans*, 23,8% como *C. parapsilosis*, 4,8% como *C. krusei* e 4,8% como *C. glabrata*.

Várias espécies podem ser agentes etiológicos de candidíase oral, sendo o mais comumente *Candida albicans*, seguido por *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *Pichia kudriavzevii*. Essas cinco espécies representam mais de 95% das infecções fúngicas. No entanto, várias outras espécies também podem ser isoladas, sendo onipresentes e ocorrendo naturalmente em humanos (KIDD *et al.*, 2016).

A identificação laboratorial de leveduras baseia-se nas análises microscópicas, nas características morfológicas da colônia, em provas imunológicas de reação antígeno-anticorpo e provas bioquímicas como as assimilações de açúcares (OLIVEIRA, 2014). Essas análises convencionais são utilizadas para o diagnóstico desses microrganismos, porém as identificações levam tempo e necessitam de um alto nível de experiência do micologista, devido à variabilidade morfológica de cepas até mesmo da mesma espécie (SANTOS *et al.*, 2010).

Neste estudo, a identificação pelo sistema MALDI-TOF MS foi tão satisfatória quanto pelos métodos fenotípicos, e ele é uma boa alternativa para a identificação de isolados normalmente encontrados na rotina, assim como para a diferenciação de espécies fenotipicamente iguais. Em um estudo realizado por Chao e colaboradores (2014), 200

isolados de leveduras foram identificadas pelo MALDI Biotyper e VITEK MS e por dois sistemas comerciais de identificação fenotípica de leveduras. De um modo geral, a taxa de identificação correta para o MALDI Biotyper foi de 92,5% e para o VITEK MS foi de 79,5%. Ainda nesse estudo, somente o MALDI Biotyper foi capaz de diferenciar espécies do complexo *Candida parapsilosis*. Bertini e colaboradores (2013), chamam a atenção para a importância clínica desde feito, devido às diferenças em virulência e susceptibilidade a antifúngicos entre as três espécies desse complexo.

A espectrometria de massa MALDI-TOF MS representa uma tecnologia inovadora aplicada com sucesso para a identificação rápida e precisa de isolados bacterianos e fúngicos em ambientes clínicos. O MALDI-TOF MS encurta o tempo necessário para a identificação de microrganismos patogênicos, permitindo que em alguns casos se conheça o agente causador em um curto espaço de tempo (ANGELETTI, 2017).

Os microrganismos do gênero *Candida* podem mudar sua forma comensal para patogênica se houver um desequilíbrio da microbiota local ou alteração imunológica do hospedeiro (SOYSA *et al.*, 2004). Dentre outros atributos, a produção de enzimas extracelulares protease, fosfolipase e hemolisina são alguns dos principais atributos virulentos da espécie de *Candida* spp.

Nos testes para a verificação da produção de protease, 98,44% das espécies de *C. albicans* tiveram a atividade enzimática presente. Portela e colaboradores (2017), ao estudar os fatores associados à virulências de leveduras isoladas de pacientes sadios e portadores de HIV, encontraram em seu estudo uma maior quantidade de *C. albicans* produtora de protease. Em um estudo somente com espécies de *C. albicans*, Sardi e colaboradores (2013), observaram 100% de atividade proteolítica.

A produção da enzima protease foi encontrada em 30,47% dos isolados de *Candida* não-*albicans* sendo as espécies: *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *Meyerozyma guilliermondii*. Essas espécies já foram descritas como produtoras de protease e condizem com a literatura. Hannula e colaboradores (2000), afirmam que a produção de exoenzimas protease e fosfolipase por *C. dubliniensis* parece não apresentar diferenças estatisticamente significantes com a espécie *C. albicans*. Portela e colaboradores (2017), verificaram a presença de atividade proteolítica de *Meyerozyma guilliermondii*. Junqueira e colaboradores (2012), observaram atividade proteinase em isolados de cavidade oral de *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. dubliniensis*, e não observaram a produção de proteinase por espécies de *C. glabrata*, concordando com os achados deste estudo. O mesmo achado de Branco *et al.* (2012), que em um estudo com leveduras provenientes da cavidade oral, não verificaram a atividade proteolítica por isolados de *C. glabrata* e *C. krusei*, porém nos estudos

de Figueiredo-Carvalho *et al.* (2017), foram encontradas 87 cepas (95,6%) de *C. glabrata* produtoras de protease.

Enzimas proteolíticas degradam vários substratos fisiologicamente importantes, como a albumina, a imunoglobulina e as proteínas da pele, contribuindo para a penetração tecidual por *Candida* spp. e subsequente invasão do hospedeiro durante o processo de infecção (MANE *et al.*, 2011; SAMARANAYAKE *et al.*, 2013). Segundo Samaranayake *et al.* (2013), as proteinases contribuem para a patogenicidade da *C. albicans*. Estas enzimas promovem o crescimento das pseudo-hifas para a invasão e degradação dos tecidos, aumentam a aderência, degradam os anticorpos e outras proteínas de defesa do hospedeiro. De acordo com Noumi *et al.* (2010), as enzimas proteolíticas podem levar à infecções extensas e contribuir para a colonização por fungos por meio da formação de biofilme em biomateriais utilizados na prótese dentária. Samaranayake e colaboradores (2013), sugerem que a expressão de aspartato proteinase tem uma parte central em diferentes aspectos da virulência de espécies de *Candida* spp., incluindo a formação de biofilme.

Em relação a produção da enzima fosfolipase, nesta pesquisa foi encontrado 95,34% dos isolados de *C. albicans* com atividade enzimática presente e superior aos encontrados por Ying e Chunyang (2011), que observaram a produção de fosfolipase em 80% dos isolados de *C. albicans*. Nos estudos de Junqueira *et al.* (2012), todos os isolados de *C. albicans* foram positivos para a produção da enzima em questão.

Neste estudo foi observada a produção de fosfolipase por outras espécies de *Candida* não-*albicans* como: *C. tropicalis*, *Issatchenkia orientalis*, *Pichia norvegensis* e *Cyberlindnera jadinii*. Segundo Niewrth e Korting (2001), a produção de fosfolipase por isolados não-*albicans* contraria a hipótese de que essa enzima estaria localizada na extremidade do tubo germinativo, sendo sua produção restrita a *C. albicans*. A produção de fosfolipase por espécies de *Candida* não-*albicans*, já foi observada na literatura. D' Eça Junior *et al.* (2011), que também observaram a atividade de fosfolipase por espécies não-*albicans*, verificaram que *C. tropicalis* foi a espécie com o maior número de isolados positivos. Junqueira *et al.* (2012), num estudo com isolados provenientes da cavidade oral de portadores do HIV, também observaram a produção de fosfolipase por *C. dubliniensis*, *C. tropicalis* e *C. krusei*. Mushi e colaboradores (2018), encontraram uma diferença significantes quando comparadas a forte atividade fosfolipídica de *C. albicans* em relação a *C. tropicalis*. Portela *et al.* (2017), encontrou além de *C. albicans*, outras espécies como: *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. dubliniensis* como produtoras desta enzima. A espécie *Cyberlindnera jadinii* também já foi descrita como produtora de fosfolipase e teve sua enzima extraída e purificada nos estudos de Fujino e colaboradores (2006). A espécie *Pichia norvegensis* apresentou neste

estudo a atividade fosfolipídica positiva e fortemente positiva, sendo que este resultado difere dos resultados achados por Sugita *et al.* (2004), que ao estudarem 16 cepas não encontraram em nenhuma a produção desta enzima. Assim como na atividade proteolítica deste estudo, as espécies de *C. glabrata* também não apresentaram a produção de fosfolipase, resultado que também difere dos encontrados por Campos-Garcia e colaboradores (2019), que ao estudarem 30 espécimes de *C. glabrata*, encontraram 29 cepas produtoras de fosfolipase. Contrariando os resultados do presente trabalho, Candido, Azevedo e Komesu (2000), não observaram em seus estudos, a produção da enzima em questão por isolados de *Candida* não-*albicans*.

Segundo Niewrth e Korting (2001), as espécies produtoras de fosfolipase possuem fatores agressivos e defensivos na interação com o tecido do hospedeiro. Como fator agressivo, as fosfolipases estão relacionadas à infecção e invasão de tecidos, gerando lesões típicas de candidíase. O controle de crescimento fúngico e o remodelamento da membrana celular são os fatores defensivos.

A produção da enzima hemolítica esteve presente em 100% dos isolados de *C. albicans*. Nos estudos de Branco *et al.* (2012), a espécie *C. tropicalis* foi quem produziu os maiores índices de atividade hemolítica. Resultados semelhantes foram encontrados no estudo de França *et al.* (2010), e de Rocha *et al.* (2017), que encontrou todas as espécies de *C. tropicalis* produtoras de hemolisina, porém Mushi e colaboradores (2018), verificaram a presença desta enzima em 31,9% de *C. glabrata*, 21,5% de *C. albicans* e 9,8% de *C. tropicalis*.

Neste estudo, em 69,52% das espécies de *Candida* não-*albicans* foram verificadas a presença da atividade hemolítica, com exceção das espécies *C. inconspícua*, *C. metapsilosis*, *C. parapsilosis* e *C. pararugosa*. Branco e colaboradores (2012), observaram a atividade hemolítica positiva para todas as espécies testadas, ou seja, *C. tropicalis*, *C. sake*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. inconspícua*, *M. guilliermondii*, *C. glabrata*, *C. famata* e *C. albicans*. No trabalho de Vieira de Melo *et al.* (2019), todas as cepas do estudo foram capazes de produzir a enzima hemolítica, sendo a espécie de *C. glabrata* a maior produtora até mesmo em relação as espécies de *C. albicans* e cepas do complexo de espécies de *C. parapsilosis*. A produção de hemolisina por isolados de *C. albicans* também foi estatisticamente menor que os resultados encontrados para as cepas pertencentes ao complexo de espécies de *C. parapsilosis* (*C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*). Diferentemente dos resultados de Vieira de Melo *et al.* (2019), Mane *et al.* (2011), ao analisarem 65 cepas de *Candida* spp. isoladas da cavidade bucal de pacientes HIV positivos, observaram que todas as espécies (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*) foram positivas para esta enzima, resultado semelhante aos encontrados por Seneviratne *et al.* (2016).

A hemolisina facilita a invasão das pseudo-hifas na mucosa de pacientes com candidíase e ainda tem a capacidade de lisar os eritrócitos em busca do ferro, podendo causar ainda anemia e déficit de transporte de oxigênio (ROCHA *et al.*, 2017). Para Seneviratne e colaboradores (2016), a produção desta enzima está relacionada a maior virulência dos isolados.

Espécies de *Candida* não-*albicans* também são capazes de expressar fortes fatores de virulência *in vitro*, porém *C. albicans* ainda é considerada a espécie mais virulenta do gênero *Candida* (VIEIRA de MELO *et al.*, 2019). Mushi e colaboradores (2018), chamam a atenção para o potencial enzimático das leveduras. Para estes autores, a presença das atividades de fosfolipase, protease e coagulação em mais de um terço de espécies de *Candida* spp isoladas de candidíase não invasiva é de importância clínica, pois indica o potencial desta em progredir rapidamente para infecções invasivas graves em pacientes imunocomprometidos.

Em relação ao fluconazol houve uma resistência à esse fármaco em apenas 1% dos isolados testados, sendo estes pertencentes à espécie *Issatchenkia orientalis*. Resultado inferior aos encontrados na literatura onde a taxa de resistência variou de 1,5% à 31,9%. Nos estudos de Badiee *et al.* (2010), 31,9% dos isolados de *Candida* spp. provenientes da mucosa oral e vaginal de pacientes com HIV foram resistentes ao fluconazol, e a espécie *C. albicans* foi responsável por 10%. Crocco e colaboradores (2004), avaliaram a sensibilidade de cepas de *C. albicans* isoladas de pacientes com candidíase superficial, tendo observado para o fluconazol 11,8% de resistência. Wingeter e colaboradores (2007), num estudo na região sul do Brasil, observaram que 14% dos isolados de *Candida* spp. isolados de cavidade oral de pacientes com HIV foram resistentes ao fluconazol. Sanchez-Vargas *et al.* (2005), encontraram 3,2% de *Candida* spp. isoladas de adultos e crianças infectados e não infectados pelo HIV resistentes ao antifúngico em questão.

Utilizando a técnica de disco-difusão, Azevedo *et al.* (2011), observaram que em 3.546 cepas de *Candida* spp. o perfil de resistência foi menor que 5%. Trabalho realizado com 1000 espécimes de *Candida* isoladas de sangue, da Mata *et al.* (2007), encontraram apenas 2 cepas de *C. glabrata* resistentes. Yan e colaboradores (2019), ao estudarem 207 leveduras vulvovaginal da espécie *C. albicans*, notou que 8,2% das cepas eram resistentes ao fluconazol. Durante oito anos de trabalho, Pfaller e colaboradores (2010), avaliaram a sensibilidade de 89.750 cepas de *C. albicans* frente ao fluconazol e constataram que 1,5% das cepas apresentaram resistência. No presente estudo, todos os isolados de *C. albicans* foram sensíveis a este fármaco.

Segundo Bodey e colaboradores (2002), *Issatchenkia orientalis* (*C. krusei*) é intrinsicamente resistente ao fluconazol e os valores de CIM para os isolados de *C. glabrata* são frequentemente mais altos do que para *C. albicans*, sendo o prognóstico na candidemias por *C. albicans* melhor do que por *C. glabrata* em pacientes neutrôpenicos.

Estudos mostram uma significativa parcela de *Candida* não-*albicans* em infecções fúngicas, em que merecem destaques as espécies de *C. krusei* resistentes ao fluconazol, devido a uma resistência intrínseca e *C. glabrata* resistentes ao fluconazol devido a um mecanismo de resistência adquirida (DOTIS *et al.*, 2012; SIDRIM; ROCHA, 2012).

Por ser de fácil administração e baixa toxicidade, o fluconazol é o fármaco de primeira escolha no tratamento de candidíase (BADIEE *et al.*, 2010). A resistência ao fluconazol por espécies de *Candida* spp. em portadores de HIV, tem sido relatada na literatura, sendo o uso profilático uma provável causa (WINGETER *et al.*, 2007). Estudos tem mostrado que a resistência ao fluconazol ocorre com as mesmas cepas que anteriormente eram susceptíveis (DALAZEN *et al.*, 2011).

Em relação ao itraconazol, 9,73% das leveduras foram resistentes, dessas 3,35% eram *C. albicans* seguido de 2,68% de *C. glabrata* e 1,0% de *Issatchenkia orientalis*. Além disso, 41,94% eram sensíveis à dose-dependente. Este resultado é inferior aos encontrados na literatura. Em um estudo com 114 cepas de *Candida* spp. depositadas em uma micoteca, Martins *et al.* (2016), encontraram 47% dos isolados resistentes ao itraconazol, em que 16,6% eram *C. tropicalis*, 14% *C. glabrata* e 7,9% *C. albicans*. Ao analisar amostras clínicas provenientes de pacientes com HIV, Favalessa, Martins e Hahn (2010), encontraram 82 (30,8%) cepas de *C. albicans* resistentes. Nunes e colaboradores (2011), ao analisar o banco de dados da Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH), do Hospital Universitário João de Barros Barreto, em Belém do Pará, encontraram 16% de *Candida* spp. resistentes ao itraconazol, onde *C. glabrata* (50%) e *C. tropicalis* (42,9%) foram as mais resistentes. Yan e colaboradores (2019), ao estudarem 207 leveduras vulvovaginal da espécie *C. albicans*, notou que 55,1% das cepas eram susceptíveis ao itraconazol. Além disso, 34,8% dos isolados eram sensíveis à dose-dependente e 10,1% eram resistentes.

No presente estudo, verificou-se que *C. glabrata* teve um índice de resistência de 16,32%. Num estudo realizado com cepas isoladas de indivíduos com estomatite protética, Sanitá *et al.* (2013), encontraram 28 cepas de *C. glabrata* (93,3%), 5 isolados de *C. albicans* (3,4%) e 1 de *C. tropicalis* (5%) resistentes ao itraconazol. Resultado semelhante foi encontrado no estudo de Marcos-Arias *et al.* (2011), que também estudou cepas provenientes de estomatite proteica e encontraram 33,3% de *C. glabrata*, 11,1% de *C. tropicalis* e 5,9% dos isolados de *C. albicans*. Segundo este último, a frequência de resistência contra este azol

parece estar aumentando, ocorrendo muitos relatos de infecções orais causadas por cepas resistentes de espécies de *Candida não-albicans*.

Em relação à nistatina, a faixa testada no presente estudo foi de 0,031 – 16 µg/mL, porém os valores de CIM encontrados foram 2 – >16 µg/mL. Estes achados são superiores aos encontrados na literatura. Em um estudo com 558 espécimes de *Candida spp.* isoladas de pacientes com potencial candidíase orofaríngea, Yu e colaboradores (2019), encontraram uma faixa que variou de 1 – 4 µg/mL. Godoy e colaboradores (2012), ao estudarem candidíase oral em pacientes em tratamento de hemodiálise com insuficiência renal crônica, encontraram faixas de CIM que variaram de 0,125 – 8 µg/mL para *C. albicans* e de 0,125 – 4 µg/mL para espécies de *Candida não-albicans*. Choukri, Benderdouche e Sednaoui (2014), encontraram CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> de 2 e 4 µg/mL respectivamente em 200 isolados de candidíase vulvovaginal. No estudo com isolados de cavidade oral, Kuriyama *et al.* (2005), encontraram uma faixa de CIM de 0,5 – 2 µg/mL. Ao analisar 234 leveduras de mucosa oral e vaginal de pacientes com HIV, Badiie *et al.* (2010), encontraram faixas de CIM que variaram de 0,14 – 18,5 µg/mL. Hamza *et al.* (2008), com 293 isolados também de mucosa oral e vaginal de pacientes com HIV, encontraram faixas de CIM de 2 - >16µg/mL, porém a CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> encontrada foi de 2 e 4 µg/mL respectivamente. Estudando a susceptibilidade de leveduras isoladas de candidíase vulvovaginal, Pádua, Guilhermetti e Svidzinski (2003), encontraram CIM que variaram de 0,5 – 8 µg/mL e CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> de 4 – 8 µg/mL respectivamente.

Embora não existam diretrizes que determinam os valores de *backpoint* para nistatina, Kuriyama e colaboradores (2005), utilizaram em seu estudo um valor de corte para resistência antifúngica de CIM ≥ 16 µg/mL. Este autor utilizou como referência achados de outros estudos. Se for comparado o presente estudo com esses dados, seriam encontrados 83,56% de leveduras resistentes à nistatina. Nos estudos de Pádua, Guilhermetti e Svidzinski (2003), e Wingeter *et al.* (2007), que também utilizaram como base de dados a literatura, determinaram valores de *backpoint* de resistência de CIM ≥ 64 µg/mL, susceptíveis se CIM for ≤ 4 µg/mL e susceptíveis dose dependentes se CIM for de 8 – 32 µg/mL. Se for comparado o presente estudo com esses dados, seriam encontrados 4,02% susceptíveis, 62,75% susceptibilidade dose dependente e 33,22% de leveduras que possivelmente poderiam ser resistentes, já que a faixa limite do teste desta pesquisa foi de 16 µg/mL. Esses valores também são superiores se comparados com Pádua, Guilhermetti e Svidzinski (2003), e Wingeter *et al.* (2007).

Apesar de quase não haver relatos de resistência na literatura, Moreira e colaboradores (2017), encontraram 55,56% das amostras de *Candidas spp.* isoladas de candidúrias, resistentes à nistatina.

Ao correlacionar os resultados da susceptibilidade antifúngica das leveduras frente ao fluconazol com itraconazol, verificou-se uma significância segundo o teste do Qui-quadrado de Pearson, onde o valor de p foi 0,000008437. Neste resultado pode-se observar que 100% das espécies de *Candida não-albicans* resistentes ao fluconazol, também foram resistentes ao itraconazol. Além disso, foi possível visualizar também que 80% das leveduras com sensibilidade dose dependente ao fluconazol foram resistentes ao itraconazol. Ao estudar os mecanismos de disseminação clonal e resistência a azóis de isolados de *Candida spp.*, Wu e colaboradores (2017), encontraram 53,5% de cepas com uma resistência cruzada ao fluconazol, itraconazol e voriconazol. Nos trabalhos de Mane *et al.* (2015), o percentual encontrado foi maior, 74,1% dos isolados tiveram resistência cruzada para fluconazol, cetoconazol e itraconazol.

Quando cruzou-se os resultados referentes à susceptibilidade antifúngica do fluconazol com nistatina, não houve diferença estatística, porém ao correlacionar nistatina com itraconazol o valor de “p” foi igual à 0,04.

Para Magill *et al.* (2006), resistência cruzada entre azóis pode acontecer rapidamente e uma das causas é pelo uso prévio dos mesmos. Hube (2009), propôs a existência de "escolas de virulência comensais", nas quais o microrganismo desenvolve certas características para se adaptar ou infectar com sucesso o hospedeiro. Neste sentido, Rocha e colaboradores (2016), reafirmam a existência de uma "escola de resistência ambiental", onde é promovido o desenvolvimento de características importantes em microrganismos para aumentar sua sobrevivência no meio ambiente.

Além da toxicidade promovida pelos antifúngicos, um número cada vez maior de cepas de várias espécies de *Candida spp.* estão se tornando resistentes a estes fármacos (HAZEN *et al.*, 2003). Considerando a necessidade de novas alternativas terapêuticas para as infecções fúngicas, devido aos efeitos colaterais adversos dos medicamentos existentes, o uso de fitoterápicos representa uma ampliação de opções terapêuticas.

No presente trabalho foi observada a atividade antifúngica do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* sobre todas as leveduras testadas. O óleo essencial demonstrou atividade inibitória e fungicida sobre o crescimento fúngico de espécies de *Candida spp.* A avaliação da CIM demonstrou valores iguais e menores que 2,2 mg/mL para os isolados avaliados, CIM<sub>50</sub> de 0,55 mg/mL e CIM<sub>90</sub> de 1,1 mg/mL. Quanto à atividade fungicida, os resultados foram parecidos, CFM<sub>50</sub> e CFM<sub>90</sub> de 0,55 e 1,1 mg/mL respectivamente. O óleo essencial de *C. citratus* já foi utilizado em outros trabalhos como potencial antifúngico. Tyagi e Malik (2010), ao analisarem os óleos de *Eucalyptus globulus*, *Mentha piperita* e *Cymbopogon citratus* frente à *Candida albicans*, concluíram que o óleo essencial de capim-

limão é melhor e altamente eficaz na fase volátil contra *C. albicans*, levando à alterações morfológicas deletérias em suas estruturas celulares. A CIM e CFM encontrada por estes autores foram 0,288 mg/mL e 0,567 mg/mL, respectivamente.

Khan e Ahmad (2012), estudaram a atividade antibiofilme de *Candida albicans* com concentrações sub inibitórias de óleo essencial de *Cymbopogon citratus* e concluíram que há uma promissora atividade antibiofilme. Estes autores ainda sugerem a exploração desses óleos como novo produto antibiofilme para lidar com problemas de resistência aos fármacos e infecções recorrentes. Boukhatem e colaboradores (2014), avaliaram os efeitos antifúngicos e anti-inflamatórios do óleo e concluíram que há um potencial valioso para prevenção e tratamento de condições inflamatórias, além de um poderoso antifúngico.

A atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* também já foi estudada contra outros microrganismos. Prakash e colaboradores (2016), avaliaram a ação antimicrobiana do óleo frente a 24 isolados de diferentes espécies de bactérias e fungos e verificaram susceptibilidade em 20 cepas. Oliveira e colaboradores (2017), estudaram os efeitos do óleo essencial de *C. citratus* sobre biofilmes polimicrobianos envolvidos na iniciação e progressão da cárie dentária, concluindo que o óleo essencial tem promissora atividade antimicrobiana contra colonizadores odontológicos primários e espécies cariogênicas. Carmo *et al.* (2013), indicam boas perspectivas para aplicação clínica de óleo essencial de *C. citratus* para tratamento de *Tinea versicolor*, devido à segurança e efeitos biológicos observados *in vivo* e pela cura micológica no grupo tratado com o óleo essencial de *C. citratus*.

A principal molécula encontrada no óleo de *C. citratus* é o citral e a este tem sido relatada uma poderosa atividade antifúngica. Leite *et al.* (2014), concluíram em sua pesquisa que o citral possui atividade antifúngica significativa contra *C. albicans*. Outro aspecto importante relatado pelos autores citados foi que o citral é capaz de alterar a morfologia de espécie de *Candida albicans* e o mecanismo probabilístico da ação não envolve a parede celular ou o ergosterol. Nos estudos de Oliveira *et al.* (2017), foi demonstrado a ação do citral em romper o biofilme de estreptococos pré formado em 48 horas. Os resultados mostraram que o citral foi significativamente efetivo em romper este biofilme maduro. Estes dados apontam para o potencial deste óleo essencial para a prevenção da cárie dentária.

Devido às complicações toxicológicas de tratamento para infecções fúngicas, uma das estratégias para superar a falta de alternativas terapêuticas é a avaliação do uso combinado de antifúngicos com produtos naturais. No presente estudo, ao associar concentrações sub inibitórias do óleo essencial de *C. citratus* com nistatina (nas mesmas concentrações utilizadas para os testes de susceptibilidade), encontrou-se um efeito sinérgico em 3,4% e um efeito

parcialmente sinérgico de 78,9% das amostras desta pesquisa. O sinergismo é uma interação positiva, no qual o efeito combinado dos antimicrobianos é significativamente maior que seus efeitos quando utilizados de forma separada.

No presente estudo, não foram encontrados casos de antagonismo e este resultado reforça a ideia de uma interação positiva entre o óleo de *C. citratus* e a nistatina, uma vez que antagonismo é uma interação negativa, no qual o efeito dos compostos combinados é significativamente menor que seus efeitos quando utilizados de forma separada. O percentual de indiferença foi de 17,8%, ou seja, não houve uma interação significativa entre os antimicrobianos associados.

Os resultados das combinações observadas no presente estudo sugerem que existe uma interação positiva entre estes compostos. Para Sookto *et al.* (2013), os componentes dos óleos essenciais interferem na biossíntese da parede celular de células fúngicas e que os compostos terpênicos interagem com os componentes lipídicos na estrutura celular, aumentando assim a permeabilidade da membrana e o desequilíbrio eletrolítico, porém, Leite *et al.* (2014), afirmam que o mecanismo de ação do composto citral isolado não envolve a parede celular ou o ergosterol. Em relação à nistatina, Santos e colaboradores (2017), ressaltam que o ergosterol é um dos fatores-chave para explicar a atividade antifúngica da nistatina, porém, outras propriedades da membrana precisam ser consideradas ao abordar o modo de ação molecular e a citotoxicidade dos fármacos. Segundo Jhonson *et al.* (2004), é possível aumentar a penetração de um agente antifúngico como resultado da atividade antifúngica da parede celular ou da membrana celular de outro agente. Dessa forma, a interação dos compostos deste estudo é provavelmente causada pela penetração do óleo quando favorecida pela ação da nistatina na membrana citoplasmática do microrganismo, ou pela interação de transporte entre os compostos, facilitando o acesso de ambas à membrana citoplasmática. No entanto, essas hipóteses exigem mais estudos para serem confirmadas.

## **5.1 Aplicabilidade.**

Os resultados do presente estudo reforçam a ideia do uso de formulações à base do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf, utilizado sozinho ou em associação com o antifúngico nistatina, para tratamento preventivo ou após manifestações clínicas de candidíase.

Neste estudo foi demonstrado uma ação inibitória e fungicida em mais de 90% das leveduras na presença de 1,1mg/mL do óleo essencial.

O uso dessa formulação fitoterápica por pacientes que já estão em tratamento com nistatina pode beneficiar a terapêutica, potencializando o poder antimicrobiano do fármaco.

Atualmente, há muita esperança para os produtos naturais serem usados em combinação com antifúngicos como agentes anti-infecciosas. Assim, os efeitos colaterais indesejáveis dos antifúngicos na saúde humana, poderiam ser possivelmente reduzidos pela substituição, pelo menos em parte das substâncias sintéticas por compostos antimicrobianos de origem natural.

## **5.2 Impacto social.**

Atualmente existem vários agentes antifúngicos para o tratamento de candidíase, porém, há uma crescente resistência dos fungos oportunistas aos medicamentos convencionais, além dos vários efeitos colaterais. Desta forma, torna-se evidente a necessidade da inserção de antimicrobianos alternativos no mercado, o que motiva os pesquisadores na busca de novas opções de tratamento, sendo a fitoterapia uma delas.

Devido aos efeitos adversos dos fármacos existentes e o aumento constante de resistência antifúngica, o uso de fitoterápicos passa a ser uma alternativa viável por ter um custo significativamente menor, o que proporcionará uma opção de tratamento acessível a população carente portador desta enfermidade. De acordo com Hasenclever e colaboradores (2017), a indústria de fitoterápicos, além de ser acessível para a maioria, pode representar uma excelente alternativa para assegurar o acesso a medicamentos seguros, eficazes e de qualidade. Constitui importante fonte de inovação na perspectiva de melhoria da atenção à saúde e de inclusão social e é ofertada aos usuários do Sistema Único de Saúde.

Dessa forma, a utilização do fitoterápico *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf, associado ou não a nistatina, no tratamento de candidíase oral na rotina terapêutica dos pacientes, trará vantagens não só pelo custo consideravelmente menor, mas pela eficácia comprovada em laboratório, além de oferecer barreiras contra o aumento da resistência microbiana aos fármacos.

## 6 CONCLUSÃO

O óleo essencial da planta *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf apresenta ação fungistática e fungicida contra leveduras de cavidade oral. A associação deste fitoterápico à nistatina potencializou o efeito antifúngico em amostras isoladas de pacientes oncológicos.

## 7 REFERÊNCIAS

Abílio F, Maria V, Silva BM, Silva ED, Carvalho FVQ, Macêdo A, Dias RD. Actividad antifúngica de productos naturales indicados por vendedores de hierbas (raizeiros) para el tratamiento de la candidiasis oral. *Rev Cubana de Estomatol.* 2014; 51(3):259-269.

Abrantes MR, Lima EO, Medeiros MAP, Menezes CP, Guerra FQS, Milan EP. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre leveduras *Candida não albicans*. *Revista Brasileira de Farmacologia.* 2013; 94(3):227-233.

Adams RP. Identification of essential oil componentes by gas chromatography/ mass spectrometry. 4<sup>o</sup> Ed. USA, 2007.

Ahmad A, Viljoen A. The *in vitro* antimicrobial activity of *Cymbopogon essential oil* (lemongrass) and its interaction with silver ions. *Phytomedicine.* 2015; 22:657-665.  
doi.org/ 10.1016/j.phymed.2015.04.002

Albuquerque Maranhão FC, Oliveira-Júnior JB, Santos Araújo MA, Silva DMW. Mycoses in northeastern Brazil: epidemiology and prevalence of fungal species in 8 years of retrospective analysis in Alagoas. *Brazilian Journal of Microbiology.* 2019;  
doi.org/10.1007/s42770-019-00096-0.

Alcazar-Fuoli L, Mellado E. Current status of antifungal resistance and its impact on clinical practice. *British Journal of Haematology.* 2014; 166(4):471-484. doi.org/10.1111/bjh.12896.

Allert S, Förster TM, Svensson C-M, Richardson JP, Pawlik T, Hebecker B, Rudolphi S, Juraschitz M, Schaller M, Blagojevic M, Morschhäuser J, Thilo Figge MT, Jacobsen ID, Naglik JR, Kasper L, Mogavero S, Hube B. *Candida albicans* -Induced Epithelial Damage Mediates Translocation through Intestinal Barriers . *mBio.* 2018; 9(3).  
doi.org/10.1128/mbio.00915-18.

Almeida R, Akisue G, Cardoso L, Junqueira J, Jorge AC. Antimicrobial activity of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. on *Staphylococcus* spp., *Streptococcus mutans* and *Candida* spp. *Revista Brasileira de Plantas Medicinaiis.* 2013; 15(4):474-482.  
doi.org/10.1590/s1516-05722013000400002.

Alves SH, Milan EP, Sant'Ana PL, Oliveira LO, Santurio J M, Colombo AL. Hypertonic Sabouraud broth as a simple and powerful test for *Candida dubliniensis* screening. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2002; 43(1):85-86.  
doi:10.1016/s0732-8893(02)00368-1

Anderson JB. Evolution of antifungal-drug resistance: mechanisms and pathogen fitness. *Nature Reviews Microbiology*. 2005; 3(7):547-556. doi.org/10.1038/nrmicro1179.

Angeletti S. Matrix assisted laser desorption time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical microbiology. *Journal of Microbiological Methods*. 2017; 138:20-29.  
doi.org/10.1016/j.mimet.2016.09.003.

Aoki S, Ito-Kuwa S, Nakamura Y, Masuhara T. Comparative Pathogenicity of a Wild-Type Strain and Respiratory Mutants of *Candida albicans* in Mice. *Zentralblatt Für Bakteriologie*. 1990; 273(3):332-343. doi.org/10.1016/s0934-8840(11)80437-8.

Aquino CF, Sales NLP, Soares EPS, Martins ER, Costa CA. Composição química e atividade *in vitro* de três óleos essenciais sobre *Colletotrichum gloeosporioides* do maracujazeiro. *Rev. Bras. Pl. Med*. 2014; 16(2, supl. I):329-336. doi.org/10.1590/1983-084X/12\_115.

Arendrup MC, Garcia-Effron G, Lass-Flörl C, Lopez AG, Rodriguez-Tudela J-L, Cuenca-Estrella M, Perlin DS. Echinocandin Susceptibility Testing of *Candida* Species: Comparison of EUCAST EDef 7.1, CLSI M27-A3, Etest, Disk Diffusion, and Agar Dilution Methods with RPMI and IsoSensitest Media. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2010; 54(1):426-439. doi.org/10.1128/aac.01256-09.

Azevedo AC, Bizerra FC, da Matta DA, de Almeida LP, Rosas R, Colombo AL. In vitro susceptibility of a large collection of *Candida* Strains against fluconazole and voriconazole by using the CLSI disk diffusion assay. *Mycopathologia*. 2011; 171(6):411-16.  
doi.org/10.1007/s11046-010-9387-1.

Badiee P, Alborzi A, Davarpanah MA, Shakiba E. Distributions and antifungal susceptibility of *Candida* species from mucosal sites in HIV positive patients. *Archives of Iranian Medicine*. 2010; 13(4): 282-7. doi.org/010134/AIM.006.

Bertini A, De Bernardis F, Hensgens LA, Sandini S, Senesi S, Tavanti A. Comparison of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* adhesive properties and pathogenicity. *International journal of medical microbiology*. 2013; 303(2):98-103. doi.org/10.1016/j.ijmm.2012.12.006.

Bettega PVC, Czulniak GR, Piva R, Namba EL, Ribas CR, Grégio AMT, Rosa EAR. Fitoterapia: dos canteiros ao balcão da farmácia. *Arch. Oral Research*. 2011; 7(1):89-97. doi.org/10.7213/aor.v7i1.23149.

Biasoli MS, Tosello ME, Magaró HM. Adherence of *Candida* strains isolated from the human gastrointestinal tract. *Mycoses*. 2002; 45(11-12):465-469. doi.org/10.1046/j.1439-0507.2002.00793.x.

Bodey GP, Mardani M, Hanna HA, Boktour M, Abbas J, Girgawy E, Hachem RY, Kontoyiannis DP, Raad II. The epidemiology of *Candida glabrata* and *Candida albicans* fungemia in immunocompromised patients with cancer. *The American journal of medicine*. 2002; 112:380-5. doi.org/10.1016/S0002-9343(01)01130-5.

Borg M, Rüchel R. Expression of extracellular acid proteinase by proteolytic *Candida* spp during experimental infection of oral mucosae. *Infection and Immunity* 1998; 56(3):626-631.

Borgos SEF, Tsan P, Sletta H, Ellingsen TE, Lancelin J-M, Zotchev SB. Probing the Structure–Function Relationship of Polyene Macrolides: Engineered Biosynthesis of Soluble Nystatin Analogues. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2006; 49(8):2431-2439. doi.org/10.1021/jm050895w.

Boukhatem MN, Ferhat MA, Kameli A, Saidi F, Kebir HT. Lemon grass (*Cymbopogon citratus*) essential oil as a potent anti-inflammatory and antifungal drug. *Libyan Journal of Medicine*. 2014; 9(1):25431. doi.org/10.3402/ljm.v9.25431.

Branco PVGC, Vaz Dos Anjos DC, Nascimento FB, Vale INF, Azevedo CMPS, Monteiro SG, Figueiredo PMS, Monteiro CA. Prevalência e produção de exoenzimas por espécies de *Candida* provenientes da mucosa bucal de pacientes com AIDS e indivíduos hígidos. *Revista de Patologia Tropical*. 2012; 41(4):427-441. doi.org/10.5216/rpt.v41i4.21703.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopéia Brasileira V. 5ªed. Brasília (DF); 2010.

Bunetel L, Tamanai-Shacoori Z, Martin B, Autier B, Guiller A, Bonnaure-Mallet M.

Interactions between oral commensal *Candida* and oral bacterial communities in immunocompromised and healthy children. *Journal de Mycologie Médicale*. 2019;11(9):14-17. doi.org/10.1016/j.mycmed.2019.06.004.

Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends in Microbiology*. 2001; 9(7):327-335. doi.or/10.1016/s0966-842x(01)02094-7.

Campos-Garcia L, Jimenez-Valdes RJ, Hernandez-Bello R, Palma-Nicolas J, Gonzalez GM, Sanchez-Gonzalez A. *Candida albicans* and non-*albicans* Isolates from Bloodstream Have Different Capacities to Induce Neutrophil Extracellular Traps. *J. Fungi*. 2019; 5(28):1-16. doi.org/10.3390/jof5020028.

Cantón E, Pemán J, Viudes A, Quindós G, Gobernado M, Espinel-Ingroff A. Minimum fungicidal concentrations of amphotericin B for bloodstream *Candida* species. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2003; 45(3):203-206. doi.org/10.1016/s0732-8893(02)00525-4.

Candido RC, Azevedo RVP, Komesu MC. Enzimotipagem de espécies do gênero *Candida* isoladas da cavidade bucal. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2000; 33(5):437-442. doi.org/10.1590/S0037-86822000000500005.

Carmo ES, Pereira FO, Cavalcante NM, Gayoso CW, Lima EO. Treatment of pityriasis versicolor with topical application of essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf - therapeutic pilot study. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 2013; 88(3):381-385. doi.org/10.1590/abd1806-4841.20131800.

Chandra J, Mukherjee PK, Leidich SD, Faddoul FF, Hoyer LL, Douglas LJ, Ghannoum MA. Antifungal Resistance of *Candidal* Biofilms Formed on Denture Acrylic in vitro. *Journal of Dental Research*. 2001; 80(3): 903-908. doi.org/10.1177/00220345010800031101.

Chao QT, Lee TF, Teng SH, Peng LY, Chen PH, Teng LJ, Hsueh PR. Comparison of the accuracy of two conventional phenotypic methods and two MALDI-TOF MS systems with that of DNA sequencing analysis for correctly identifying clinically encountered yeasts. PLoSOne. 2014; 9(10):e109376. doi.org/10.1371/journal.pone.0109376.

Choukri F, Benderdouche M, Sednaoui P. *In vitro* susceptibility profile of 200 recent clinical isolates of *Candida* spp. to topical antifungal treatments of vulvovaginal candidiasis, the imidazoles and nystatin agents. Journal de Mycologie Médicale. 2014; 24(4):303-307. doi:10.1016/j.mycmed.2014.05.001.

Chowdhary A, Randhawa H, Kowshik T, Kathuria S, Roy P, Brandt M. Application of hypertonic Sabouraud glucose agar for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 2011; 69:440-442. doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.10.012

Christensen WB. Urea decomposition as a mean of differentiating *Proteus* and Paracolon cultures from each other and from *Salmonella* and *Shigella* types. Journal of Bacteriology, v. 52, p.461-466, 1946.

Clinical Laboratory Standards Institute. CLSI. M27-A2. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica: Norma Aprovada – Segunda Edição. Pennsylvania; 2002.

Colombo AL, Guimarães T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2003; 36(5):599-607.

Cortés JAL, Russi JNA. Echinocandins. Revista Chilena de Infectologia. 2011; 28(6):529-536. doi.org/10.4067/S0716-10182011000700004.

Cortez LER, Jacomossi E, Cortez DAG. Levantamento das plantas medicinais utilizadas na medicina popular de Umuarama, PR. Arquivo Ciências Saúde Unipar. 1999; 3(2):97-104. doi.org/10.25110/arqsaude.v3i2.1999.938.

Costa CARA, Bidinotto LT, Takahira RK, Salvadori MFD, Barbisan LF, Costa M. Cholesterol reduction and lack of genotoxic or toxic effects in mice after repeated 21-day oral

intake of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oil. Food and Chemical Toxicology. 2011; 49:2268-2272. doi.org/10.1016/j.fct.2011.06.025.

Crocco EI, Mimica LMJ, Muramatu LH, Garcia C, Souza VM, Ruiz LRB, Zaitz C. Identificação de espécies de *Candida* e susceptibilidade antifúngica in vitro: estudo de 100 pacientes com candidíases superficiais. Anais Brasileiro de Dermatologia. 2004; 79(6):689-97. doi.org/10.1590/S0365-05962004000600005.

Cruz BC, Buzzulini C, Lopes WDZ, Maciel WG, Bichuette MA, Felippelli G, Teixeira, WFP, Soares VE, Gomes LVC, Prando L, Campos GP, Costa AJ. Effects of different spray formulations on the reproductive parameters of engorged *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* females detached from experimentally infested cattle. Preventive Veterinary Medicine. 2015; 122(1-2):70-75. doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.09.010.

D'Eça Júnior A, Silva AF, Rosa FC, Monteiro SG, Figueiredo PMS, Monteiro CA. *In vitro* differential activity of phospholipases and acid proteinases of clinical isolates of *Candida*. Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2011; 44(3):334-338. doi.org/10.1590/s0037-86822011005000036.

Dalazen D, Zanrosso D, Wanderley L, Silva NL, Fuentefria AM. Comparação do perfil de suscetibilidade entre isolados clínicos de *Candida* spp. orais e vulvovaginais no Sul do Brasil. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial. 2011; 47(1):33-38. doi.org/10.1590/s1676-24442011000100004.

da Matta DA, de Almeida LP, Machado AM, Azevedo AC, Kusano EJ, Travassos NF, Salomão R, Colombo AL. Antifungal susceptibility of 1000 *Candida* bloodstream isolates to 5 antifungal drugs: results of a multicenter study conducted in São Paulo, Brazil, 1995-2003. Diagnostic microbiology and infectious disease. 2007; 57(4):399-404. doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2006.10.011.

Diaz PI, Hong B-Y, Dupuy AK, Choquette L, Thompson A, Salner AL, Schauer PK, Hegde U, Burleson JA, Strausbaugh LD, Peterson DE, Dongari-Bagtzoglou A. Integrated Analysis of Clinical and Microbiome Risk Factors Associated with the Development of Oral Candidiasis during Cancer Chemotherapy. Journal of Fungi. 2019;5(2):49. doi.org/10.3390/jof5020049.

Dotis J, Prasad PA, Zaoutis T, Roilides E. Epidemiology, risk factor and outcome of *Candida parapsilosis* bloodstream infection in children. *Pediatric Infectious Disease Journal*. 2012; 31:557-60. doi.org/10.1097/INF.0b013e31824da7fe.

Espinel-Ingroff A. Mecanismos de resistencia a los antifúngicos: levaduras y hongos filamentosos. *Revista Iberoamericana de Micología*. 2008; 25(2):101-106. doi.org/10.1016/s1130-1406(08)70027-5.

Favalessa OC, Martins MA, Hahn RC. Aspectos micológicos e suscetibilidade in vitro de leveduras do gênero *Candida* em pacientes HIV-positivos provenientes do Estado de Mato Grosso. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2010; 43(6):673-77. doi.org/10.1590/S0037-86822010000600014.

Fernández-Cuenca F, Martínez-Martínez L, Pascual A, Perea EJ. *In vitro* Activity of Azithromycin in Combination with Amikacin, Ceftazidime, Ciprofloxacin or Imipenem against Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Chemotherapy*. 2003; 49(1-2):24–26. doi.org/10.1159/000069774

Figueiredo RO, Delachiave MEA, Ming LC. Reguladores vegetais na produção de biomassa e teor de óleos essenciais em *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf em diferentes épocas do ano. *Rev. Bras. Pl. Med.* 2006; 8(3):31-35.

Figueiredo-Carvalho MHG, Ramos LS, Barbedo LS, Oliveira JCA, Santos ALS, Almeida-Paes R, Zancopé-Oliveira RM. Relationship between the Antifungal Susceptibility Profile and the Production of Virulence-Related Hydrolytic Enzymes in Brazilian Clinical Strains of *Candida glabrata*. *Mediators of Inflammation*. 2017; 2017:1-10. doi.org/10.1155/2017/8952878.

França EJG, Fávero D, Cremin H, Oliveira MT, Furlaneto-Maia L, Quesada RMB, Furlaneto MC. Hemolysis produced by *Candida tropicalis* isolates from clinical samples. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2010; 43(3):318-321. doi.org/10.1590/S0037-86822010000300021.

Fujino S, Akiyama D, Akaboshi S, Fujita T, Watanabe Y, Tamai Y. Purification and characterization of fosfolipase B from *Candida utilis*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 2006; 70(2):377-386. doi.org/10.1271/bbb.70.377.

Gavanji S, Larki B. Comparative effect of propolis of honey bee and some herbal extracts on *Candida albicans*. Chinese Journal of Integrative Medicine. 2015; 23(3):201-207. doi.org/10.1007/s11655-015-2074-9.

Godoy JSR, Bonfim-Mendonça PS, Nakamura SS, Yamada SS, Shinobu-Mesquita C, Perialisi N, Fiorini A, Svidzinski TIE. Colonization of the oral cavity by yeasts in patients with chronic renal failure undergoing hemodialysis. Journal of Oral Pathology & Medicine. 2012; 42(3):229-234. doi:10.1111/jop.12003

Gomes EC, Negrelle RRB. Análise da cadeia produtiva do capim limão: estudo de caso. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais. 2015; 17(2):201-209. doi.org/10.1590/1983-084X/10\_077.

Gonçalves AH, Pereira AS, Santos GRS, Guimarães LGL. Atividade fungitóxica *in vitro* dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* Cham., *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf. e de seus constituintes majoritários no controle de *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii*. Rev. Bras. Pl. Med. 2015; 17(4, supl. III):1007-1015. doi.org/10.1590/1983-084x/14\_166.

González-Gravina H, Morán EG, Zambrano O, Chourio ML, Valero SR, Robertis S, Mesa L. Oral Candidiasis in children and adolescents with cancer. Identification of *Candida* spp. Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal. 2007; 1;12(6):E419-23.

Hamza OJ, Matee MI, Moshi MJ, Simon EN, Mugusi F, Mikx FH, Helderman, WHVP, Rijs AJMM, van der Vem AJAM, Verweij PE. Species distribution and *in vitro* antifungal susceptibility of oral yeast isolates from Tanzanian HIV-infected patients with primary and recurrent oropharyngeal candidiasis. BMC Microbiology. 2008; 8(1):135. doi:10.1186/1471-2180-8-135.

Hannula J, Saarela M, Dogan B, Paatsama J, Koukila-Kähkölä P, Pirinen S, Alakomi HL, Perheentupa J, Asikainen S. Comparison of virulence factors of oral *Candida dubliniensis* and

*Candida albicans* isolates in healthy people and patients with chronic candidosis. *Oral Microbiol Immunol*. 2000; 15:238-244. doi.org/10.1034/j.1399-302x.2000.150405.x.

Hasenclever L, Paranhos J, Costa CR, Cunha G, Vieira D. A indústria de fitoterápicos brasileira: desafios e oportunidades. *Ciência & Saúde Coletiva*, 2017; 22(8):2559-2569. doi.org/10.1590/1413-81232017228.29422016.

Hazen KC, Baron EJ, Colombo AL, Girmenia C, Sanchez-Sousa A, del Palacio A, Bedout C, Gibbs DL, The Global Antifungal Surveillance Group. Comparison of the Susceptibilities of *Candida* spp. to Fluconazole and Voriconazole in a 4-Year Global Evaluation Using Disk Diffusion. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003; 41(12):5623-5632. doi.org/10.1128/jcm.41.12.5623-5632.2003.

Hernández-Solís SE, Rueda-Gordillo F, Rojas-Herrera RA. Actividad de la proteinasa en cepas de *Candida albicans* aisladas de la cavidad oral de pacientes inmunodeprimidos, con candidiasis oral y sujetos sanos. *Revista Iberoamericana de Micología*. 2014; 31(2):137-140. doi.org/10.1016/j.riam.2013.09.003.

Hollenbach E. Invasive candidiasis in the ICU: evidence based and on the edge of evidence. *Mycoses*. 2008; 51:25-45. doi.org/10.1111/j.1439-0507.2008.01571.x.

Hube B. Fungal adaptation to the host environment. *Current Opinion in Microbiology*. 2009; 12(4):347-349. doi.org/10.1016/j.mib.2009.06.009.

Inoue H, Hashimoto S, Matsushika A, Watanabe S, Sawayama S. Breeding of a xylose-fermenting hybrid strain by mating genetically engineered haploid strains derived from industrial *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2014; 41(12):1773-1781. doi.org/10.1007/s10295-014-1531-3.

Johnson MD, MacDougall C, Ostrosky-Zeichner L, Perfect JR, Rex JH. Combination Antifungal Therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2004; 48(3):693-715. doi.org/10.1128/aac.48.3.693-715.2004.

Junqueira JC, Vilela SFG, Rossoni RD, Barbosa JO, Costa ACBP, Rasteiro VMC, Suleiman JMAH, Jorge AOC. Oral colonization by yeasts in HIV-positive patients in Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 2012; 54(1):17-24.  
doi.org/10.1590/S0036-46652012000100004.

Kadir T, Gümrü B, Uygun-Can B. Phospholipase activity of *Candida albicans* isolates from patients with denture stomatitis: The influence of chlorhexidine gluconate on phospholipase production. *Archives of Oral Biology*. 2007; 52(7):691-696.  
doi.org/10.1016/j.archoralbio.2006.12.008.

Kanafani ZA, Perfect JR. Resistance to Antifungal Agents: Mechanisms and Clinical Impact. *Clinical Infectious Diseases*. 2008; 46(1):120-128. doi.org/10.1086/524071.

Khan MSA, Ahmad I. Biofilm inhibition by *Cymbopogon citratus* and *Syzygium aromaticum* essential oils in the strains of *Candida albicans*. *Journal of Ethnopharmacology*. 2012; 140(2):416-423. doi.org/10.1016/j.jep.2012.01.045.

Kidd S, Halliday C, Alexiou H, Ellis D. *Descriptions of Medical Fungi*. 3rd ed. (revised), Underdale: The National Library of Australia; 2016.

Kuriyama T, Williams DW, Bagg J, Coulter WA, Ready D, Lewis MAO. *In vitro* susceptibility of oral *Candida* to seven antifungal agents. *Oral Microbiology and Immunology*. 2005; 20(6):349-353. doi:10.1111/j.1399-302x.2005.00236.x.

Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vacari EM, Melo NT. *Tratado de Micologia Médica*. São Paulo: Savier, 2002.

Larone HL, coordenador. *Medically Important Fungi: A Guide to Identification*. 3rd ed. Washington: American Society for Microbiology; 1995.

Leite MCA, Bezerra APB, Sousa JP, Guerra FQS, Lima EO. Evaluation of Antifungal Activity and Mechanism of Action of Citral against *Candida albicans*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2014; 11:1-9. doi.org/10.1155/2014/378280.

Li X, Lei L, Tan D, Jiang L, Zeng X, Dan H, Liao GA, Chen Q. Oropharyngeal *Candida* colonization in human immunodeficiency virus infected patients. *APMIS*. 2012; 121(5):375-402. doi.org/10.1111/apm.12006.

Lima IO, Oliveira RAG, Lima EO, Farias NMP, Souza EL. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. *Rev Bras Farmacogn*. 2006; 16(2):197-201. doi.org/10.1590/S0102-695X2006000200011.

Lopez C, Giro L, Ramos L, Ramadán S, Bulacio L. Comparación de diferentes métodos para la identificación de especies del género *Candida*. *Revista Argentina de Microbiología*. 2005; 37(1):16-21.

Lorenzi H, Matos FJA. *Plantas Medicinais do Brasil: nativas e exóticas cultivadas*. Instituto Plantarum, Nova Odessa, 2002, 544 pp.

Lucena BFF, Tintino SR, Figueredo FG, Oliveira CDM, Aguiar JJS, Cardoso EM, Aquino PEA, Andrade JC, Coutinho HDM, Matias EFF. Avaliação da atividade antibacteriana e moduladora de aminoglicosídeos do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. *Acta biol Colomb*. 2015; 20(1):39-45. doi.org/10.15446/abc.v20n1.41673.

Luo G, Samaranayake LP, Yau JYY. *Candida* Species Exhibit Differential *In Vitro* Hemolytic Activities. *Journal of Clinical Microbiology*. 2001; 39(8):2971-2974. doi.org/10.1128/jcm.39.8.2971-2974.2001.

Magill SS, Shields C, Sears CL, Choti M, Merz WG. Triazole Cross-Resistance among *Candida* spp.: Case Report, Occurrence among Bloodstream Isolates, and Implications for Antifungal Therapy. *Journal of Clinical Microbiology*. 2006; 44(2):529-535. doi.org/10.1128/JCM.44.2.529-535.2006.

Mane A, Pawale C, Gaikwad S, Bembalkar S, Risbud A. Adherence to buccal epithelial cells, enzymatic and hemolytic activities of *Candida* isolates from HIV-infected individuals. *Medical Mycology*. 2011; 49:548-551. doi.org/10.3109/13693786.2010.540044.

Mane A, Vidhate P, Kusro C, Waman V, Saxena V, Kulkarni-Kale U, Risbud A. Molecular mechanisms associated with Fluconazole resistance in clinical *Candida albicans* isolates from India. *Mycoses*. 2015; 59(2):93-100. doi.org/10.1111/myc.12439.

Marcos-Arias C, Eraso E, Madariaga L, Carrillo-Munõz AJ, Quindós G. In Vitro Activities of New Triazole Antifungal Agents, Posaconazole and Voriconazole, Against Oral *Candida* Isolates from Patients Suffering from Denture Stomatitis. *Mycopathologia*. 2012; 173:35-46. doi.org/10.1007/s11046-011-9460-4.

Martins A, Fuentefria A, Andrade S, Silveira G, Kulkamp I, Pippi B, Machado M, Oliveira L, Cruz L, Frizzo C. Caracterização do perfil de susceptibilidade a antifúngicos azólicos de uma micoteca como embasamento para estratégias de combate à candidemias. *Journal of Infection Control*. 2016; 5(4):1-11.

Martins PM, Melo EC, Barbosa LCAB, Santos RHS, Machado MC. Influência da temperatura e velocidade do ar de secagem no teor e composição química do óleo essencial de capim-limão. *Acta Horticulturae*, 2002;(569)155-160. doi.org/10.17660/actahortic.2002.569.25.

Mathew BP, Nath M. Recent Approaches to Antifungal Therapy for Invasive Mycoses. *ChemMedChem*. 2009; 4(3):310-323. doi.org/10.1002/cmdc.200800353.

Meis JF, Chowdhary A. *Candida auris*: a global fungal public health threat. *The Lancet Infectious Diseases*. 2018; 18(12):1298-1299. doi.org/10.1016/s1473-3099(18)30609-1

Melo IA, Lenardon L, Alves LRRA, Guerra RC, Menezes-Filho JF. Evaluation of the incidence of *Candida* spp. associated with the use of partial dentures or complete and profile of patients seen by the dental clinic of a Faculty in Araguaina - TO. *Revista Científica do ITPAC*. 2013; 6(2):1-6.

Mohr J, Johnson M, Cooper T, Lewis JS, Ostrosky-Zeichner L. Current Options in Antifungal Pharmacotherapy. *Pharmacotherapy*. 2008; 28(5):614-645. doi.org/10.1592/phco.28.5.614.

- Moreira LS, Doria ACOC, Santos TB, Figueira FR, Sorge CPC, Silva AMS, Khouri S. Estudo da resistência aos antifúngicos de leveduras isoladas de Candidúrias de um hospital de médio porte. revista univap. 2017; 23(43):44-52. doi.org/10.18066/revistaunivap.v23i43.365.
- Mushi MF, Bader O, Bii C, Grob U, Mshana SE. Virulence and susceptibility patterns of clinical *Candida* spp. Isolates from a tertiary hospital, Tanzania. Medical Mycology. 2018; 0(0):1-7. doi.org/10.1093/mmy/myy107.
- Negri M, Martins M, Henriques M, Svidzinski TIE, Azeredo J, Oliveira R. Examination of Potential Virulence Factors of *Candida tropicalis* Clinical Isolates From Hospitalized Patients. Mycopathologia. 2010; 169(3):175-182. doi.org/10.1007/s11046-009-9246-0.
- Niewerth M, Korting HC. Phospholipases of *Candida albicans*. Mycoses. 2001; 44(9-10):361-367. doi.org/10.1046/j.1439-0507.2001.00685.x.
- Noumi E, Snoussi M, Hentati H, Mahdouani K, del Castillo L, Valentin E, Sentandreu R, Bakhrouf A. Adhesive Properties and Hydrolytic Enzymes of Oral *Candida albicans* Strains. Mycopathologia. 2010; 169(4):269-278. doi.org/10.1007/s11046-009-9259-8.
- Nunes EB, Nunes NB, Monteiro JCMS, Paes ALV. Perfil de sensibilidade do gênero *Candida* a antifúngicos em um hospital de referência da Região Norte do Brasil. Rev Pan-Amaz Saude. 2011; 2(4):23-30. doi.org/10.5123/S2176-62232011000400004.
- Oliveira JC. Tópicos em Micologia Médica. 4 ed. Rio de Janeiro; 2014.
- Oliveira MAC, Borges AC, Brighenti FL, Salvador MJ, Gontijo AVL, Koga-Ito CY. *Cymbopogon citratus* essential oil: effect on polymicrobial caries-related biofilm with low cytotoxicity. Brazilian Oral Research. 2017; 31:e89. doi.org/10.1590/1807-3107bor-2017.vol31.0089.
- Pádua RAF, Guilhermetti E, Svidzinski TIE. In vitro activity of antifungal agents on yeasts isolated from vaginal secretion. Acta Scientiarum. 2003; 25(1):51-54.

Pandey AK, Singh P, Tripathi NN. Chemistry and bioactivities of essential oils of some *Ocimum* species: an overview. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2014; 4(9):682-694. doi.org/10.12980/apjtb.4.2014c77.

Panizo MM, Reviákina V, Dolande M, Selgrad S. *Candida* spp. *in vitro* susceptibility profile to four antifungal agents. Resistance surveillance study in Venezuelan strains. *Medical Mycology*. 2009; 47(2):137-143. doi.org/10.1080/13693780802144339.

Park S, Lee HS. Meta-analysis of oral cryotherapy in preventing oral mucositis associated with cancer therapy. *International Journal of Nursing Practice*. 2019;e12759. doi.org/10.1111/ijn.12759.

Pavela R. Essential oils for the development of eco-friendly mosquito larvicides: A review. *Industrial Crops and Products*. 2015; 76:174-187. doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.06.050.

Peixoto JV, Rocha, Nascimento RTL, Moreira VV, Kashiwabara TGB. Candidíase - Uma revisão de literatura. *BJSCR*. 2014; 8(2):75-82.

Pemán J, Cantón E, Espinel-Ingroff A. Antifungal drug resistance mechanisms. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. 2009; 7(4):453-460. doi.org/10.1586/eri.09.18.

Pereira Neto TA, Silva MS, Lemes RML. Caracterização fenotípica e perfil de virulência de leveduras do gênero *Candida* obtidas em aulas práticas. *Revista da Universidade Vale do Rio Verde*. 2013; 11(2):333-343. doi.org/10.5892/ruvrd.v11i2.333343.

Perfect JR. The antifungal pipeline: a reality check. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2017; 16(9):603-616. doi.org/10.1038/nrd.2017.46.

Petruzzi MN, Cherubini K, Salum FG, Figueiredo MA. Risk factors of HIV-related oral lesions in adults. *Rev Saude Publ*. 2013; 47(1):52-59.

Pfaller MA. Antifungal Drug Resistance: Mechanisms, Epidemiology, and Consequences for Treatment. *The American Journal of Medicine*. 2012; 125(1):S3-S13. doi.org/10.1016/j.amjmed.2011.11.001.

Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Ellis D, Tullio V, Rodloff A, Fu W, Ling TA, and Global Antifungal Surveillance Group. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5-Year Analysis of Susceptibilities of *Candida* Species to Fluconazole and Voriconazole as Determined by CLSI Standardized Disk Diffusion. *Journal of Clinical Microbiology*. 2010; 48(4):1366-1377. doi.org/10.1128/jcm.02117-09.

Pierce CG, Srinivasan A, Uppuluri P, Ramasubramanian AK, López-Ribot JL. Antifungal therapy with an emphasis on biofilms. *Current Opinion in Pharmacology*. 2013; 13(5):726-730. doi.org/10.1016/j.coph.2013.08.008.

Pinto DA, Mantovani EC, Melo EC, Sedyama GC, Vieira GHS. Produtividade e qualidade do óleo essencial de capim-limão, *Cymbopogon citratus*, DC. submetido a diferentes lâminas de irrigação. *Rev. Bras. Pl. Med.* 2014; 16(1):54-61. doi.org/10.1590/S1516-05722014000100008.

Portela MB, Amorim EL, Santos AM, Curvelo JAR, Martins KO, Capillé CL, Soares RMA, Castro GFBA. *Candida* species from oral cavity of HIV-infected children exhibit reduced virulence factors in the HAART era. *Microbial Pathogenesis*. 2017; 102:74-81. doi.org/10.1016/j.micpath.2016.11.020.

Prakash S, Ramasubburayan R, Ramkumar VS, Kannapiran E, Palavesam A, Immanuel G. *In vitro* - Scientific evaluation on antimicrobial, antioxidant, cytotoxic properties and phytochemical constituents of traditional coastal medicinal plants. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2016; 83:648-657. doi.org/10.1016/j.biopha.2016.07.019.

Price MF, Wilkinson ID, Gentry LO. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Medical Mycology*. 1982; 20(1):7-14. doi.org/10.1080/00362178285380031.

Quindos G, Gil-Alonso S, Marcos-Arias C, Sevillano E, Mateo E, Jauregizar N, Eraso E. Therapeutic tools for oral candidiasis: Current and new antifungal drugs. *Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal*. 2019; 1;24(2):e172-180. doi.org/10.4317/medoral.22978.

Raut JS, Karuppaiyl SM. A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial Crops and Products*. 2014; 62:250-264. doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.05.055.

Rocha CHL, Rocha FMG, Mendonça AMS, Pereira EWA, Silva FMC, Silva ARS, Monteiro SG, Monteiro CA. Virulência de isolados clínicos de *Candida tropicalis*. *Rev. Investig, Bioméd.* 2017; 9(2):118-128. doi.org/10.24863/rib.v9i2.146.

Rocha MFG, Alencar LP, Paiva MAN, Melo LM, Bandeira SP, Ponte YB, Sales, JA, Guedes GMM, Castelo-Branco DSCM, Bandeira TJPG, Cordeiro RA, Pereira-Neto WA, Brandine GS, Moreira JLB, Sidrim JJC, Brilhante RSN. Cross-resistance to fluconazole induced by exposure to the agricultural azole tetraconazole: an environmental resistance school? *Mycoses*. 2016; 59(5): 281-290. doi.org/10.1111/myc.12457.

Rocha RP, Melo EC, Demuner AJ, Radünz LL, Braun H. Effect of drying air velocity on the quality of essential oil From Lemon grass. *Gl. Sci. Technol.* 2012; 5(1):23-31.

Sahand IH, Maza JL, Eraso E, Montejo M, Moragues MD, Aguirre JM, Quindós G, Ponton J. Evaluation of CHROM-Pal medium for the isolation and direct identification of *Candida dubliniensis* in primary cultures from the oral cavity. *Journal of Medical Microbiology*. 2009; 58(11):1437-1442. doi.org/10.1099/jmm.0.011320-0.

Samaranayake YH, Cheung BPK, Yau JYY, Yeung SKW, Samaranayake LP. Human Serum Promotes *Candida albicans* Biofilm Growth and Virulence Gene Expression on Silicone Biomaterial. *PLoS ONE*. 2013; 8(5):e62902. doi.org/10.1371/journal.pone.0062902.

Sánchez-Vargas LO, Ortiz-López NG, Villar M, Moragues MD, Aguirre JM, Cashat-Cruz M, Lopez-Ribot JL, Gaitán-Cepeda LA, Quindós G. Point prevalence, microbiology and antifungal susceptibility patterns of oral *Candida* isolates colonizing or infecting Mexican HIV/AIDS patients and healthy person. *Revista Iberoamericana de Micología, Barcelona*. 2005; 22(2):83-92. doi.org/10.1016/S1130-1406(05)70014-0.

Sanguinetti M, Posteraro B, Lass-Flörl C. Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact. *Mycoses*. 2015; 58:2-13. doi.org/10.1111/myc.12330.

Sanitá PV, Mima EGO, Pavarina AC, Jorge JH, Machado AL, Vergani CE. Susceptibility profile of a Brazilian yeast stock collection of *Candida* species isolated from subjects with *Candida*-associated denture stomatitis with or without diabetes. *Oral Medicine*. 2013; 116(5):562-9. doi.org/10.1016/j.oooo.2013.07.002.

Santos A, Paduan RH, Gazin ZC, Jacomassi ED, Oliveira PS, Cortez DAG, Cortez LER. Determinação do rendimento e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.19, n.2<sup>a</sup>, p. 436-441, 2009. doi.org/10.1590/S0102-695X2009000300017.

Santos AG, Marquês JT, Carreira AC, Castro IR, Viana AS, Mingeot-Leclercq M-P, Almeida RFM, Silva LC. The molecular mechanism of Nystatin action is dependent on the membrane biophysical properties and lipid composition. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2017; 19(44):30078-30088. doi.org/10.1039/c7cp05353c.

Santos AS, Alves SM, Figueiredo FJC, Rocha Neto OG. Descrição de sistema e métodos de extração de óleos essenciais e determinação de umidade de biomassa em laboratório. *Comunicado Técnico*, 99. Embrapa. 2004; 1-6.

Santos C, Paterson RR, Venâncio A, Lima N. Filamentous fungal characterizations by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Appl Microbiol*, England. 2010; 108(2):375-385. doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04448.x.

Sardi JCO, Vilas-Boas P, Aguiar N, Fonseca M, Theobaldo J, Höfling JF, Saito D. *In vitro* Evaluation of Phospholipase and Proteinase of *Candida albicans* Isolated From Oral Cavity of Diabetic Patients. *UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde*. 2013; 15(1):9-12. doi.org/10.17921/2447-8938.2013v15n1p%25p.

Schorling SR, Kortinga HC, Froschb M, Mühlshlegel FA. The role of *Candida dubliniensis* in oral candidiasis in human immunodeficiency virus-infected individuals. *Critical Reviews in Microbiology*. 2000; 26(1):59-68. doi.org/10.1080/10408410091154183.

Seneviratne CJ, Rajan S, Wong SSW, Tsang DNC, Lai CKC, Samaranayake LP, Jin L. Antifungal Susceptibility in Serum and Virulence Determinants of *Candida* Bloodstream

Isolates from Hong Kong. *Frontiers in Microbiology*. 2016; 7:1-8.  
doi.org/10.3389/fmicb.2016.00216.

Shapiro RS, Robbins N, Cowen LE. Regulatory Circuitry Governing Fungal Development, Drug Resistance, and Disease. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2011; 75(2): 213-267. doi.org/10.1128/membr.00045-10.

Sholapurkar A, Pai K, Rao S. Comparison of efficacy of fluconazole mouthrinse and clotrimazole mouthpaint in the treatment of oral candidiasis. *Australian Dental Journal*. 2009; 54(4):341-346. doi.org/10.1111/j.1834-7819.2009.01160.x.

Sidrim JJC, Rocha MFG, Coordenadores. *Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2012.

Simões RJ, Fonseca P, Figueira MH. Infecções por *Candida* spp. na cavidade oral. *Odontologia Clínico-Científica*. 2013; 12(1):19-22.

Sookto T, Srithavaj T, Thaweboon S, Thaweboon B, Shrestha B. In vitro effects of *Salvia officinalis* L. essential oil on *Candida albicans*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2013; 3(5):376-380. doi.org/10.1016/s2221-1691(13)60080-5.

Sousa LVNF, Santos VL, Monteiro AS, Dias-Souza MV, Marques SG, Faria ES, Assunção EAO, Santos SG, Zonis JM, Alvarenga DG, Holanda RA, Sousa JG, Santos KV, Stoianoff MAR. Isolation and identification of *Candida* species in patients with orogastric cancer: susceptibility to antifungal drugs, attributes of virulence in vitro and immune response phenotype. *BMC Infectious Diseases*. 2016; 16(86):1-12.  
doi.org/10.1186/s12879-016-1431-4.

Soysa NS, Samaranayake LP, Ellepola ANB. Cytotoxic drugs, radiotherapy and oral candidiasis. *Oral Oncology*. 2004; 40(10):971-978.  
doi.org/10.1016/j.oraloncology.2003.12.013.

Sugita T, Takeo K, Ohkusu M, Virtudazo E, Takashima M, Asako E, Ohshima F, Harada S, Yanaka C, Nishikawa A, Majoros L, Sipiczki M. Fluconazole-Resistant Pathogens *Candida inconspicua* and *C. norvegensis*: DNA Sequence Diversity of the rRNA Intergenic Spacer

Region, Antifungal Drug Susceptibility, and Extracellular Enzyme Production. *Microbiol. Immunol.* 2004; 48(10):761-766. doi.org/10.1111/j.1348-0421.2004.tb03602.x.

Sullivan D, Coleman D. *Candida dubliniensis*: Characteristics and identification. *Journal of Clinical Microbiology.* 1998; 36(2):329-334.

Tortora GJ, Funke BR, Case CL. *Microbiologia.* 10 ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

Tyagi AK, Malik A. Liquid and vapour-phase antifungal activities of selected essential oils against *candida albicans*: microscopic observations and chemical characterization of *Cymbopogon citratus*. *BMC Complementary and Alternative Medicine.* 2010; 10(1):1-11. doi.org/10.1186/1472-6882-10-65.

Van Burik J-AH, Magee PT. Aspects of Fungal Pathogenesis in Humans. *Annual Review of Microbiology.* 2001; 55(1):743-772. doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.743.

Vieira de Melo AP, Zuza-Alves DL, da Silva-Rocha W, Souza, LBFC, Francisco EC, Melo SA, Chaves GM. Virulence factors of *Candida* spp. obtained from blood cultures of patients with candidemia attended at tertiary hospitals in Northeast Brazil. *Journal de Mycologie Médicale.* 2019; doi.org/10.1016/j.mycmed.2019.02.002.

Wille MP, Guimaraes T, Furtado GHC, Colombo AL. Historical trends in the epidemiology of candidaemia: analysis of an 11-year period in a tertiary care hospital in Brazil. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz.* 2013; 108(3):288-292. doi.org/10.1590/s0074-02762013000300005.

Wilson ND, Ivanova MS, Watt RA, Moffat AC. The quantification of citral in lemongrass and lemon oils by near-infrared spectroscopy. *Journal of Pharmacy and Pharmacology.* 2002; 54(9):1257-1263. doi.org/10.1211/002235702320402107.

Wingeter MA, Guilhermetti E, Shinobu CS, Takaki I, Svidzinski TIE. Identificação microbiológica e sensibilidade in vitro de *Candida* isoladas da cavidade oral de indivíduos HIV positivos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 2007; 40(3):272-6. doi.org/10.1590/S0037-86822007000300004.

Wu Y, Li C, Wang Z, Gao J, Tang Z, Chen H, Ying C. Clonal spread and azole-resistant mechanisms of non-susceptible *Candida albicans* isolates from vulvovaginal candidiasis patients in three Shanghai maternity hospitals. *Medical Mycology*. 2017; 56(6):687-694. doi.org/10.1093/mmy/myx099.

Yan L, Wang X, Seyedmousavi S, Yuan J, Abulize P, Pan W, Yu N, Yang Y, Hu H, Liao W, Deng S. Antifungal Susceptibility Profile of *Candida Albicans* Isolated from Vulvovaginal Candidiasis in Xinjiang Province of China. *Mycopathologia*. 2019; 1-10. doi.org/10.1007/s11046-018-0305-2.

Ying S, Chunyang L. Correlation between phospholipase of *C. albicans* and resistance to fluconazole. *Mycoses*. 2011; 55:50-55. doi.org/10.1111/j.1439-0507.2011.02024.x.

Yu S-Y, Zhang L, Chen S, Kong F, Xiao M, Wang H, Hou X, Zhou M-L, Zhang G, Zhang J-J, Duan S-M, Kang W, Xu Y-C. *Candida* isolates causing refractory or recurrent oropharyngeal candidiasis in 11 hospitals in China. *Infection and Drug Resistance*. 2019; 12:865-875. doi.org/10.2147/idr.s199359.

Zore GB, Thakre AD, Jadhav S, Karuppayil SM. Terpenoids inhibit *Candida albicans* growth by affecting membrane integrity and arrest of cell cycle. *Phytomedicine*. 2011; 18:1181-1190. doi.org/10.1016/j.phymed.2011.03.008.

## ANEXOS

### Anexo 1 - Parecer Consubstanciado do CEP.

FACULDADE DE CIÊNCIAS  
MÉDICAS DR. JOSÉ ANTÔNIO  
GARCIA COUTINHO -



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E ANTIBIOFILME DE FITOTERÁPICO SOBRE LEVEDURAS DO GÊNERO *Candida* ISOLADAS DA CAVIDADE BUCAL DE PACIENTES ONCOLÓGICOS

**Pesquisador:** Ana Beatriz Alkmim Teixeira Loyola

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 79755917.3.0000.5102

**Instituição Proponente:** FUNDACAO DE ENSINO SUPERIOR DO VALE DO SAPUCAI

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.400.440

##### Apresentação do Projeto:

O presente estudo busca avaliar a prevenção e terapia da candidíase oral através de testes in vitro com o uso de *Cymbopogon citratus* frente à leveduras do gênero *Candida* sp. que foram isolados da cavidade bucal de pacientes oncológicos em outros estudos e que estão depositados na coleção microbiológica do Laboratório de Pesquisas Básicas da Univás. 292 microrganismos serão identificados e o perfil de suscetibilidade a antifúngicos bem como o potencial de virulência será avaliada. Após essa análise, será feita a avaliação in vitro do potencial antimicrobiano do fitoterápico *Cymbopogon citratus* sobre a formação de biofilme e o crescimento fúngico. As médias obtidas nas avaliações de cada tratamento serão comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade ( $P < 0,05$ ). O estudo visa à busca de um fitoterápico eficaz, aumentando a opção terapêutica dos profissionais de saúde e a qualidade de vida dos pacientes oncológicos e com menor custo. Projeto com descrição muito objetiva.

##### Objetivo da Pesquisa:

**Objetivo Primário:** Avaliar a ação antibiofilme e a atividade antifúngica do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* frente à leveduras do gênero *Candida* sp. depositadas na coleção microbiológica do Laboratório de Pesquisas Básicas da Univás e provenientes da cavidade bucal de pacientes oncológicos.

**Objetivo Secundário:** Identificar as cepas de leveduras utilizando métodos fenotípicos; • Verificar o

**Endereço:** Avenida Prefeito Tuany Toledo, 470

**Bairro:** Campus Fátima I

**CEP:** 37.550-000

**UF:** MG

**Município:** POUSO ALEGRE

**Telefone:** (35)3449-9270

**E-mail:** pesquisa@univas.edu.br

Continuação do Parecer: 2.400.440

potencial patogênico através dos testes de produção de enzimas: Protease, Fosfolipase, Hemolisina;• Determinar o perfil de sensibilidade aos antifúngicos;• Avaliar o perfil de suscetibilidade das cepas frente ao óleo essenciais de *Cymbopogon citratus* pelo método de Concentração Inibitória Mínima;• Determinar a ação antibiofilme das cepas frente ao óleo essenciais de *Cymbopogon citratus*.• Estabelecer o potencial de prevenção da candidose in vitro do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*.

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos:** Este estudo não utiliza seres humanos na pesquisa, portanto os riscos são inerentes a pesquisa. O pesquisador irá manter a segurança ao manipular microrganismos viáveis porém podendo contaminar-se.  
**Benefícios:** Este estudo oferece a possibilidade de conhecer os efeitos fitoterápicos in vitro da planta *Cymbopogon citratus* frente à leveduras patogênicas do gênero *Candida*, com a finalidade de entender melhor e fornecer subsídios científicos para possível tratamento alternativo e natural frente à patologias associadas com esses patógenos.

#### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Pacientes em tratamento quimioterápico e/ou radioterápico apresentam complicações orais decorrentes da estômato-toxicidade. A mucosite oral, que é uma manifestação ocasionada por essa toxicidade, pode ser grave e interferir nos resultados da terapêutica médica. *Candida sp.* é um gênero de levedura que faz parte da microbiota do corpo humano e de animais. É considerado o principal grupo de fungos patógenos oportunistas. Sendo um microrganismo comensal presente na cavidade bucal da maioria das pessoas saudáveis, quando há um comprometimento imunológico do hospedeiro, espécies de *Candida sp.* podem invadir os tecidos e mudar sua condição de comensal para patogênica e desencadear desde simples infecções até processos infecciosos profundos. Estudo relevante para a comunidade de pacientes oncológicos.

#### **Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Todos os termos foram apresentados.

#### **Recomendações:**

Que todos os pacientes após o estudo possa ser beneficiado com a aplicação do óleo.

#### **Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Não há inadequações.

**Endereço:** Avenida Prefeito Tuany Toledo, 470

**Bairro:** Campus Fátima I

**CEP:** 37.550-000

**UF:** MG

**Município:** POUSO ALEGRE

**Telefone:** (35)3449-9270

**E-mail:** pesquisa@univas.edu.br

FACULDADE DE CIÊNCIAS  
MÉDICAS DR. JOSÉ ANTÔNIO  
GARCIA COUTINHO -



Continuação do Parecer: 2.400.440

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Os autores deverão apresentar ao CEP um relatório parcial e um final do projeto conforme cronograma apresentado.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1012387.pdf	25/10/2017 20:20:35		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Brochura.doc	23/10/2017 20:46:23	Ana Beatriz Alkmim Teixeira Loyola	Aceito
Folha de Rosto	folhaderostoLuiz.docx	23/10/2017 20:45:23	Ana Beatriz Alkmim Teixeira Loyola	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

POUSO ALEGRE, 27 de Novembro de 2017

---

**Assinado por:**  
**Ronaldo Júlio Baganha**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Avenida Prefeito Tuany Toledo, 470

**Bairro:** Campus Fátima I

**CEP:** 37.550-000

**UF:** MG

**Município:** POUSO ALEGRE

**Telefone:** (35)3449-9270

**E-mail:** pesquisa@univas.edu.br

## **Anexo 2 – Meios de cultura.**

### **Agar Sabouraud Dextrose (HIMEDIA)**

Peptona micológica	10,0 g
Dextrose	40,0 g
Ágar	15,0 g

Suspender 65 gramas em 1000 mL de água destilada. Aquecer até o ponto de ebulição para dissolver completamente o meio. Esterilizar por autoclavagem a 121°C (1 atm; pressão relativa) por 15 minutos.

### **Corn Meal Agar (HIMEDIA)**

Infusão de farinha de milho	50,0 g
Ágar	15,0 g
Tween-80 (DIFCO)	10 mL

Suspender 17 gramas em 1000 mL de água destilada. Adicionar o Tween-80. Aquecer até o ponto de ebulição para dissolver completamente o meio. Esterilizar por autoclavagem a 121°C (1 atm; pressão relativa) por 15 minutos.

### **CHROMagar™ Candida (DIFCO)**

Chromopeptone	10,2 g
Dextrose	20,0 g
Mistura cromogênica	2,0 g
Cloranfenicol	0,5 g
Ágar	15,0 g

Suspender 47,7 gramas em 1000 mL de água destilada. Aquecer sob agitação frequente e ferver por 1 minuto para dissolver completamente o meio. Esfriar a 50°C e dispensar em placas de Petri estéreis. Não autoclavar.

**Meio YP Medium (INOUE *et al.*, 2014).**

Extrato de levedura (SYNTH)	10,0 g
Peptona (HIMEDIA)	20,0 g
Ágar bacteriológico (HIMEDIA)	15,0 g
Água destilada	1000 mL

Suspender 50 gramas em 1000 mL de água destilada. Aquecer até o ponto de ebulição para dissolver completamente o meio. Esterilizar por autoclavagem a 121°C (1 atm; pressão relativa) por 15 minutos.

**Meio C - para assimilação de fontes de carboidratos (LARONE, 1995).**

Sulfato de amônio (ECIBRA)	5,0 g
Fosfato de potássio monobásico (REAGEN)	1,0 g
Sulfato de magnésio heptaidratado (MERK)	0,5 g
Ágar bacteriológico (HIMEDIA)	20,0 g

Suspender os componentes em 1000 mL de água destilada. Aquecer até o ponto de ebulição para dissolver completamente o meio. Distribui 18 mL do meio em tubos 25 x 200 mm, em seguida esterilizar por autoclavagem a 121°C (1 atm; pressão relativa) por 15 minutos. Conservar em banho-maria à 50°C até o momento do experimento.

**Meio N - para assimilação de fontes de nitrogênio (LARONE, 1995).**

Dextrose (OXOID)	20,0 g
Fosfato de potássio monobásico (REAGEN)	1,0 g
Sulfato de magnésio heptaidratado (MERK)	0,5 g
Ágar bacteriológico (HIMEDIA)	20,0 g

Suspender os componentes em 1000 mL de água destilada exceto a dextrose. Aquecer até o ponto de ebulição para dissolver completamente o meio e fundir o ágar. Adicionar a dextrose. Distribui 18 mL do meio em tubos 25 x 200 mm, em seguida esterilizar por autoclavagem a 121°C (1 atm; pressão relativa) por 15 minutos. Conservar em banho-maria à 50°C até o momento do experimento.

**Caldo Basal para Fermentação de Açúcares (LARONE, 1995).**

Peptona (MERCK)	7,5 g
Extrato de levedura (OXOID)	4,5 g
Azul de Bromotimol	0,04 g
Etanol 95%	3 mL
Água destilada	1000 mL

**Solução estoque de carboidrato**

Carboidrato	6,0 g
Água destilada estéril	100 mL

Esterilizar a solução de estoque de carboidrato por filtração com membrana de 0,22 micras. Dissolver o azul de Bromotimol em 3 ml de álcool 95%. Adicionar os outros ingredientes. Dispensar alíquotas de 3 ml em tubos com tampa de rosca de 13 x 100 mm, contendo tubos de Durham em posição invertida. A seguir, esterilizar em autoclave a 121°C (1 atm; pressão relativa) por 15 minutos. Deixe esfriar e adicione 1,5 ml da solução de carboidratos.

**Meio Ureia de Christensen (1946) (LACAZ *et al.*, 2002).**

**Solução A**

Peptona (HIMEDIA)	1,0 g
Dextrose (OXOID)	1,0 g
Cloreto de Sódio (CHEMCO)	5,0 g
Fosfato de Potássio Monobásico (REAGEN)	2,0 g
Vermelho Fenol (SYNTH)	12,0 mg
Ágar bacteriológico (HIMEDIA)	20,0 g
Água destilada	900 mL
pH	6,8 ± 0,2

**Solução B**

Uréia (DINÂMICA)	20,0 g
Água destilada	100 mL

Esterilizar a solução **B** por filtração a vácuo usando membrana de filtro Millipore 0,22 micras. Dissolva a peptona, o cloreto de sódio, fosfato de potássio e o fenol vermelho em 900 mL de água. Ajustar o pH para 6,8. Adicionar o ágar e dissolver completamente. Ferver até fundir o ágar. Acrescentar a dextrose. Distribuir 4,5 mL em cada tubo e autoclavar a 121°C (1 atm; pressão relativa) por 15 minutos. A seguir, resfriar o a solução **A** à aproximadamente 50°C e adicionar 0,5 mL da solução **B** assepticamente. Homogeneizar os tubos e colocar para esfriar em posição inclinada.

**Meio Ágar Sabouraud Hipertônico (CHOWDHARY *et al.*, 2011)**

Dextrose (OXOID)	20,0 g
Peptona (HIMEDIA)	10,0 g
Cloreto de Sódio (CHEMCO)	65,0 g
Ágar bacteriológico (HIMEDIA)	20,0 g
Água destilada	1000 mL

Suspender os componentes em 1000 mL de água destilada. Aquecer até o ponto de ebulição para dissolver completamente o meio e fundir o ágar. Esterilizar por autoclavagem a 121°C (1 atm; pressão relativa) por 15 minutos.

### **Caldo Sabouraud Hipertônico (ALVES *et al.*, 2002)**

Dextrose (OXOID)	20,0 g
Peptona (HIMEDIA)	10,0 g
Cloreto de Sódio (CHEMCO)	65,0 g
Água destilada	1000 mL

Suspender os componentes em 1000 mL de água destilada. Aquecer até o ponto de ebulição para dissolver completamente o meio. Distribuir 3mL do meio em tubos com tampa de rosca de 13 x 100 mm. Esterilizar por autoclavagem a 121°C (1 atm; pressão relativa) por 15 minutos.

### **Meio indutor para Protease (AOKI *et al.*, 1990)**

#### **Solução A**

BSA Albumina Bovina Sérica Fração V (SIGMA)	2,5 g
Sulfato de magnésio heptaidratado (MERK)	0,2 g
Fosfato de potássio dibásico (REAGEN)	2,5 g
Cloreto de Sódio (CHEMCO)	5,0 g
Extrato de levedura (OXOID)	1,0 g
Dextrose (OXOID)	20,0 g
Água destilada	300 mL

O pH deve ser ajustado para 3,5 com HCl 1N. A solução **A** deve ser esterilizada por filtração a vácuo utilizando filtro de membrana Millipore 0,22. O pH final do meio indutor de protease deve estar na faixa de 4,0 a 4,2 a 25°C.

#### **Solução B**

Ágar bacteriológico (HIMEDIA)	20,0 g
Água destilada	700 mL

Prepara-se a solução **B** em um frasco. Autoclavar a 121°C (1 atm; pressão relativa) por 15 minutos. Esperar esfriar a 50°C em Banho-maria e adicionar a solução **A**. Distribuir 25 mL em placas de Petri de 90 mm de diâmetro a fim de ter uma profundidade de aproximadamente 4 mm de meio.

### **Ágar Fosfolipase (PRICE; WILKINSON; GENTRY, 1982)**

#### **Solução A**

Peptona (HIMEDIA)	10,0 g
Dextrose (OXOID)	20,0 g
Cloreto de Sódio (CHEMCO)	57,3 g
Cloreto de cálcio (SYNTH)	0,55 g
Água destilada	300 mL

#### **Solução B**

Ágar bacteriológico (HIMEDIA)	20,0 g
Água destilada	540 mL

#### **Solução C**

Emulsão de gema de ovo a 50% (Egg Yolk NEWPROV)	160 mL
---	--------

Dissolver todos os componentes da solução **A** em 300 mL e corrigir o valor de pH para 2,0 a 25°C com HCl 1N. Ferver a solução **B** até fundir o ágar. Esterilizar as soluções **A** e **B** em autoclave a 121°C (1 atm; pressão relativa) por 20 minutos. Resfriar a 50°C, adicionar a solução **A** na solução **B** e em seguida adicionar a solução **C**. Distribuir 25 mL em placas de Petri de 90 mm de diâmetro a fim de ter uma profundidade de aproximadamente 4 mm de meio. O pH final do meio indutor de fosfolipase deve estar na faixa de 3,8 a 4,0 a 25°C.

### **Ágar Sabouraud Sangue (LUO *et al.*, 2001)**

Peptona (HIMEDIA)	10,0 g
Dextrose (OXOID)	30,0 g
Ágar bacteriológico (HIMEDIA)	15,0 g
Sangue de carneiro (NEW PROV)	70 mL
Água destilada	930 mL

Preparar o meio sem a adição do sangue, ajustar o pH para 5,6 e autoclavar a 121°C (1 atm; pressão relativa) por 20 minutos. Esfriar o meio em banho-maria até 50°C e adicionar assepticamente o sangue sempre homogeneizando. Distribuir 25 mL em placas de Petri de 90 mm de diâmetro a fim de ter uma profundidade de aproximadamente 4 mm de meio.

**Meio RPMI-1640 tamponado com MOPS (CLSI, 2002) M27-A2.**

RPMI-1640 (com glutamina e vermelho fenol, sem bicarbonato)	10,4 g
MOPS (ácido 3-[N-morfolino] propanosulfônico)	34,53 g

Dissolver o meio em pó em 900 mL de água destilada. Acrescentar MOPS (concentração final de 0,165 mol/L), agitando até dissolver. Enquanto mexer, ajuste o pH para 7,0 a 25°C usando hidróxido de sódio 1 mol/L. Acrescentar água adicional para levar o meio a um volume final de 1 L. Esterilizar por filtração e armazenar a 4° C até usar.

**Anexo 3** – Tabela com as características de leveduras mais comumente encontradas em laboratório clínico.

Espécie	Auxanograma											Zimograma						
	U	De	Ma	Sa	Ra	In	La	Ga	Tr	Ce	KNO <sub>3</sub>	De	Ma	Sa	La	Ga	Tr	Ce
<i>Candida albicans</i>	-	+	+	v	-	-	-	+	v	-	-	+	+	v	-	v	v	-
<i>Candida bracarensis</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	fr	-
<i>Candida catenulata</i>	-	+	v	-	-	-	-	+	v	-	-	v	fr,-	-	-	fr,-	-	-
<i>Candida dubliniensis</i>	-	+	+	+	-	-	-	+	fr,+	-	-	+	+	-	-	fr,+	v	-
<i>Candida glabrata</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	v	-	-	+	-	-	-	-	v	-
<i>Candida haemulonii</i>	-	+	+	+	+	-	-	fr,+	+	-	-	+	-	+	-	-	fr,+	-
<i>Candida inconspicua</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida metapsilosis</i>	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>Candida nivariensis</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	v	-
<i>Candida orthopsilosis</i>	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>Candida parapsilosis</i>	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	fr,-	+	-	+	fr,-	-
<i>Candida rugosa complex</i>	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida tropicalis</i>	-	+	+	v	-	-	-	+	+	v	-	+	+	v	-	+	fr,+	-
<i>Torulopsis sp.</i>	-	+	v	v	v	-	v	v	v	v	v	v	-	v	-	v	-	v
<i>Clavispora lusitaniae</i>	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	v	v	-	v	v	+
<i>Cyberindnera frabianii</i>	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	fr,+	+	-	-	-	-
<i>Debaryomyces hansenii</i>	-	+	+	+	+	-	v	+	+	+	-	fr,-	fr,-	fr,-	-	fr,-	fr,-	-
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	-	+	-	+	+	-	v	fr	fr,-	v	-	+	-	+	v	fr,+	-	-
<i>Lodderomyces elongisporus</i>	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	-	+	+	+	+	-	-	+	+	v	-	+	-	+	-	v	+	-
<i>Pichia kudriavzevii</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>Pichia norvegensis</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	fr	-	-	-	-	-	-
<i>Saccharomyces cerevisie</i>	-	+	+	+	+	-	-	v	+	-	-	+	+	+	-	v	+	-
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	-	+	v	v	v	-	-	v	fr,-	-	-	+	v	v	-	v	v	-
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	-	+	+	+	+	-	-	v	+	+	-	+	v	+	-	v	-	-
<i>Yarrowia lipolytica</i>	-	+	-	-	-	-	-	v	-	fr,-	-	-	-	-	-	-	-	-

**Fonte:** Adaptado de Kidd e colaboradores (2016) e Larone (1995).

**U** = Urease; **De** = Dextrose; **Ma** = Maltose; **Sa** = Sacarose; **Ra** = Rafinose; **La** = Lactose; **Ga** = Galactose; **Tr** = Trealose; **Ce** = Celobiose; **KNO<sub>3</sub>** = Nitrato de potássio, (+) = Positivo; (-) = Negativo; **fr** = Fraco; **v** = Variável.