

CENTRO UNIVERSITÁRIO UNIVATES
CURSO DE FARMÁCIA

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Psidium
salutare* (MYRTACEAE) CONTRA *Candida albicans***

Cassiana Maria Bona

Lajeado, junho de 2016

Cassiana Maria Bona

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Psidium salutare* (MYRTACEAE) CONTRA *Candida albicans*

Artigo apresentado como Trabalho de Conclusão de Curso, do curso de Farmácia, do Centro Universitário UNIVATES, como parte da exigência para a obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Eduardo de Miranda Ethur

Lajeado, junho de 2016.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer, primeiramente a Deus, por me dar força e fé, para vencer mais uma etapa da minha vida.

Aos meus pais Odair e Teresinha, por todo o apoio, incentivos e dedicação de seguir a cada dia em busca do meu objetivo. Em especial, minha mãe uma pessoa maravilhosa, que sempre esteve presente para me ajudar no que fosse preciso.

Aos meus irmãos, especialmente minhas duas irmãs Paula e Silvia por todo o apoio carinho e paciência, necessárias em diversas vezes. Obrigada por fazerem parte da minha vida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Eduardo Miranda Ethur, pelo auxílio, dedicação e confiança. Muito obrigado por tudo.

As funcionárias e colegas do laboratório de química, Bárbara Buhl, Talita Scheibel e Ana Paula Venter Soares por todo o auxílio, o meu muito obrigado.

APRESENTAÇÃO DO TRABALHO

O presente trabalho descreve um estudo realizado com óleos vegetais extraídos a partir de folhas da espécie *Psidium salutare var. sericeum* e de *Psidium salutare var. mucronatum*, família Myrtaceae, nativas do Rio Grande do Sul, Brasil, contra *Candida albicans* (ATCC 10231).

O trabalho será apresentado sob forma de artigo original, que após avaliação da banca, e feitas as devidas correções, será traduzido para o idioma inglês e submetido à publicação na Letters in Applied Microbiology - ISSN 1472-765X.

[http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1472-765X](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1472-765X)

Fator de impacto: 1.659

Em relação ao projeto apresentado na disciplina de Trabalho de Conclusão I, intitulado “Atividade antimicrobiana de extratos de *Eugenias* spp. contra *Candida albicans*”, houve a necessidade de alterar para o presente trabalho devido aos testes iniciais com *Eugenia anomala*, *Eugenia arenosa* e *Eugenia pitanga*, que demonstraram uma atividade antimicrobiana muito fraca (acima de 20 mg.ml⁻¹). Desta forma, sugeriu-se a alteração do tema visando o desenvolvimento de um artigo publicável em revista científica.

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Psidium salutare* (MYRTACEAE) CONTRA *Candida albicans*

Cassiana Maria Bona ¹; Bárbara Buhl ¹, Talita Scheibel ¹, Eduardo Miranda Ethur ^{2,*}

¹ Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Centro Universitário UNIVATES, Avelino Tallini 171, Bairro Universitário, 95900-000, Lajeado, RS, Brasil.

² Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, Centro Universitário UNIVATES, Avelino Tallini 171, Bairro Universitário, 95900-000, Lajeado, RS, Brasil

Titulo resumido: *P. salutare* OE contra *C. albicans*.

Please direct correspondence to: Eduardo Miranda Ethur, Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, Centro Universitário UNIVATES, Avelino Tallini 171, Bairro Universitário, 95900-000, Lajeado - RS, Brasil

Phone: +55 51 3714 7000

email: eduardome@univates.br

Significado e impacto do estudo

A prevalência crescente de patógenos humanos resistentes a antibióticos tem intensificado esforços para descobrir e desenvolver terapias alternativas de tratamento. Óleos essenciais podem ser utilizados como agentes antifúngicos alternativos ou complementares contra leveduras patogênicas. Neste trabalho foi avaliada a ação de óleos essenciais de *Psidium salutare* var. *sericeum* e de *Psidium salutare* var. *mucronatum*, contra *Candida albicans* (ATCC 10231). Os óleos essenciais das duas espécies foram capazes de inibir o crescimento de *C. albicans*, fornecendo parâmetros potencialmente úteis para o futuro trabalho de isolar e identificar novos agentes antimicrobianos a partir de óleos essenciais derivados de plantas.

Abstract

Candida albicans é um fungo patogênico oportunista que pode causar infecções superficiais ou sistêmicas. A prevalência crescente de patógenos humanos resistentes a antibióticos tem estimulado estudos para a descoberta e desenvolvimento de novas terapias. Os óleos essenciais representam uma das alternativas que vêm sendo estudada na busca de compostos ativos com amplo espectro de ação, baixa toxicidade e custo reduzido. Com isso, este trabalho teve como objetivo identificar a composição do óleo essencial de *Psidium salutare* var. *sericeum* e *mucronatum* e avaliar a sua atividade antimicrobiana contra *C. albicans* (ATCC 10231). Os óleos essenciais foram extraídos utilizando um aparelho de Clevenger modificado e os constituintes foram identificados por CG-EM. A atividade antifúngica do óleo essencial foi avaliada pelo método de microdiluição em caldo. Nas duas espécies, os principais constituintes encontrados foram o 1,8-cineol, linalol, terpinoleno, α -terpineol e limoneno. Ambas as espécies apresentaram ação fungistática de 2,5 mg.ml⁻¹ e ação fungicida de 10 mg.ml⁻¹. Os resultados mostram que ambos os óleos essenciais apresentam ação antifúngica nas mesmas concentrações, mesmo com diferenças quali- e quantitativas entre os constituintes.

Palavras-chave: Candidíase, atividade antifúngica, bioma Pampa, *Psidium salutare*, óleo essencial, *Candida albicans*, MIC.

Introdução

Leveduras do gênero *Candida* são patógenos oportunistas frequentemente isolados nas superfícies das mucosas de indivíduos normais, podendo levar ao desenvolvimento de infecções denominadas candidíases, que variam desde lesões superficiais até infecções disseminadas, acometendo principalmente pacientes imunocomprometidos, devido à sua alta vulnerabilidade (Álvares et al. 2007; Mayer et al. 2013; Rodrigues et al. 2016).

As infecções fúngicas ocasionadas por espécies de *Candida* são comuns em países tropicais, e representam uma importante causa de morbidade e mortalidade hospitalar, sendo a *Candida albicans* o organismo mais frequentemente isolado em pacientes com candidíase sistêmica (Cuéllar-Cruz et al. 2012).

Fármacos comumente prescritos para o tratamento da candidíase incluem drogas que interrompam a biossíntese do ergosterol como o imidazol e o triazol, além de fármacos de polieno, ou seja anfotericina B e nistatina (Faria et al. 2011).

O uso prolongado aos antimicrobianos existentes é amplamente reconhecido por desenvolver resistência fúngica, o que exige o desenvolvimento contínuo de novos agentes antifúngicos (Colombo and Guimarães 2003; Faria et al. 2011; Lim et al. 2012). Diante das limitações de uso desses antifúngicos sintéticos, evidenciadas pelo aumento da resistência pelos microrganismos, bem como pelas reações indesejadas apresentadas pelos usuários, como toxicidade sistêmica e elevação das enzimas hepáticas, a busca por alternativas que visam minimizar ou eliminar o risco da ocorrência de infecção por *Candida spp*, através do uso de produtos antifúngicos derivados de plantas são recursos de grande relevância no meio científico (Salvat et al. 2001; Glehn and Rodrigues 2012; Simonetti 2015; Sharifzadeh and Shokri 2016).

O interesse em óleos essenciais reacendeu nas últimas décadas, com a popularidade da aromaterapia, um ramo da medicina alternativa que afirma que os aromas específicos provenientes dos óleos essenciais têm efeitos curativos (Sharifzadeh and Shokri 2016).

Os óleos essenciais formados por plantas aromáticas, como metabolitos secundários, são compostos voláteis, naturais, complexos e caracterizados por um odor forte. Atualmente, são conhecidos mais de 3000 óleos essenciais, 300 dos quais são comercialmente importantes, especialmente para o uso na indústria farmacêutica, agrônômica, alimentícia, sanitária e na cosmetologia (Nasir et al. 2015; Mekonnen et al. 2016).

A família das Myrtaceae representa uma das maiores famílias botânicas com milhares de espécies reunidas em aproximadamente 140 gêneros. As folhas da maioria das espécies contêm consideráveis quantidades de substâncias voláteis, que as tornam fontes atrativas de óleos essenciais de valor industrial e medicinal, devido principalmente ao potencial antioxidante e à presença de vitaminas que as constituem (Ramos et al. 2006; Simonetti 2015). Destaca-se neste trabalho a espécie *Psidium salutare* variedade *sericeum* (Cambess) Landrum e *Psidium salutare* variedade *mucronatum* (Cambess) Landrum, nativas do Rio Grande do Sul/RS - Brasil e conhecidas popularmente por “araçá-do-campo” (Saraiva 2012; Bordignon 2014; Bailão et al. 2015; Simonetti et al. 2016).

Entre as atividades biológicas das Myrtaceae, destacam-se as propriedades antifúngicas, antibacterianas, antiinflamatórias, antioxidantes, sendo utilizadas pela população como agentes anti-infecciosos no tratamento de hemorragias, diabetes e vermes intestinais (Ramos et al. 2006; Stefanello et al. 2011; Amancio et al. 2015).

Em bactérias e fungos, o mecanismo de ação dos óleos essenciais, envolve a perda da integridade da membrana e alterações na morfologia celular, levando a liberação do material intracelular e inibição da respiração celular, com a consequente impossibilidade de manter a homeostase associado a alterações na morfologia celular (Terzi et al. 2007).

Estes resultados evidenciam o grande potencial das Myrtaceae para a descoberta de novos medicamentos, com isso este trabalho tem como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *P. salutare* var. *sericeum* e de *P. salutare* var. *mucronatum*, contra *C. albicans* (ATCC 10231).

Resultados e discussão

O rendimento do óleo essencial extraído, utilizando um aparelho de Clevenger modificado, das folhas de *P. salutare* var. *sericeum* foi de 1,78% e o rendimento para *P. salutare* var. *mucronatum* foi de 1,83%.

Estes óleos essenciais foram analisados por cromatografia gasosa e espectrometria de massa e a identificação dos componentes (Tabela 1), foi baseada na comparação dos índices de retenção de Kovats obtidos experimentalmente, com padrões da literatura (Vandendool and Kratz 1963; Adams 2007).

Os principais componentes encontrados no óleo essencial da *P. salutare* var. *sericeum* foram monoterpenos oxigenados (42,29%), como o 1,8-cineol (22,65%), α -terpineol (9,67%) e linalol (7,84%). Monoterpenos hidrocarbonetos (31,61%) foi a segunda classe mais encontrada, representada pelo limoneno (9,39%) e terpinoleno

(8,02%). A terceira classe foi constituída por sesquiterpenos oxigenados (15,4%), seguida pelos sesquiterpenos hidrocarbonetos (3,43%).

Comportamento semelhante, mas com porcentagem menor, foi encontrado para a *P. salutare* var. *mucronatum* onde os principais constituintes também pertencem a classe dos monoterpenos oxigenados (40,88%), formada por 1,8-cineol (19,66%), linalol (10,68%) e α -terpineol (7,11%). Os monoterpenos hidrocarbonetos compõem 25,22% do total de componentes, com o terpinoleno (9,18%) e limoneno (3,69%), como componentes majoritários. A maior mudança verificada foi em relação à composição dos sesquiterpenos, onde os sesquiterpenos oxigenados apresentaram 14,00% do total e os sesquiterpenos hidrocarbonetos, com 16,55%. Esse último grupo constituiu apenas 3,43% da variedade *sericeum* (Tabela 1).

Misturas complexas de compostos, principalmente contendo monoterpenos e sesquiterpenos têm sido investigados por seu amplo espectro de atividades como antifúngica e antibacteriana, além de propriedades antissépticas, analgésicas, antitumorais e antioxidantes (Terzi et al. 2007; Cavalcanti et al. 2011; Marcos-Arias et al. 2011; Cleff et al. 2012). Onde cada componente pode contribuir para a atividade do conjunto (Ruiz-Pérez et al. 2016).

Tabela 1 - Composição química dos óleos essenciais de folhas de *Psidium salutare* var. *sericeum* e var. *mucronatum*

Composto	IK exp. ^a	IK lit. ^b	<i>P. salutare</i> (Área %)	
			<i>sericeum</i>	<i>mucronatum</i>
β -Pineno	984	979	2,18	1,60
Mirceno	994	990	1,53	1,10

α -Felandeno	1006	1002	0,78	0,81
δ -3-Careno	1012	1011	0,64	1,58
α -Terpinoleno	1018	1017	0,83	0,63
n.i. ^c	1023	—	0,47	—
<i>p</i> -Cimeno	1025	1024	0,55	1,92
Limoneno	1030	1029	9,39	3,69
1,8-Cineol	1033	1031	22,65	19,66
(<i>Z</i>)- β -Ocimeno	1037	1037	2,12	—
(<i>E</i>)- β -Ocimeno	1047	1050	2,78	1,57
γ -Terpineno	1059	1059	2,79	3,14
Terpinoleno	1090	1088	8,02	9,18
Linalol	1102	1096	7,84	10,68
Terpinen-4-ol	1179	1177	2,13	3,43
α-Terpineol	1194	1188	9,67	7,11
Metil eugenol	1409	1403	3,29	3,37
(<i>E</i>)-Cariofileno	1422	1419	—	3,97
Aromadendreno	1442	1441	0,87	1,40
α -Humuleno	1456	1454	—	0,44
<i>allo</i> -Aromadendreno	1464	1460	—	0,91
γ -Himacaleno	1489	1482	—	0,62
Viridiflorene	1498	1496	—	1,22
(<i>Z</i>)- α -Bisaboleno	1505	1507	2,56	1,99
β -Bisaboleno	1511	1505	—	0,51
γ -Cadineno	1517	1513	—	0,69

δ-Cadineno	1527	1523	—	1,10
Espatuleno	1583	1578	1,32	3,70
Óxido de cariofileno	1588	1583	—	2,40
n.i.	1589	—	—	2,75
Globulol	1590	1589	4,03	—
Viridiflorol	1597	1592	0,98	0,80
Cubeban-11-ol	1600	1595	0,66	—
Rosifoliol	1608	1600	0,89	0,72
<i>trans</i> -Isolongifolanona	1628	1626	1,30	0,65
1-epi-Cubenol	1634	1628	—	0,74
<i>epi</i> -α-Cadinol	1647	1640	3,43	—
α-Muurolo	1647	1546	1,40	3,83
α-Cadinol	1660	1654	1,40	2,11
Baeckeol	1873	1862	3,50	—
Total identificado			99,53	97,25
Total de monoterpenos hidrocarbonetos			31,61	25,22
Total de monoterpenos oxigenados			42,29	40,88
Total de sesquiterpenos hidrocarbonetos			3,43	16,55
Total de sesquiterpenos oxigenados			15,41	14,00
Outros compostos oxigenados			6,79	3,37

^a IK exp.: Índice de retenção de Kovats experimental.

^b IK lit.: Índice de retenção de Kovats teórico (Adams, 2007).

^c n.i.: composto não identificado.

Corroborando com nossos achados, o 1,8 cineol, também foi o composto majoritário encontrado nos óleos essenciais de *Callistemon viminalis* (Pires et al.

2013) e de *Eucalyptus cinerea* (Silva et al. 2011), duas espécies de Myrtaceae. Pires e colaboradores encontraram uma CIM igual ou superior a 2000 µg.ml, obtida com a utilização dos óleos essenciais de *C. viriminalis*, demonstrando atividade antibacteriana (Pires et al. 2013). A comparação realizada por Silva e colaboradores (2011), demonstrou que o óleo essencial extraído de *Eucalyptus cinerea* possui maior potencial antimicrobiano com menor valor de CIM, contra bactérias gram-positivas, gram-negativas e leveduras de *C. albicans* em relação ao composto 1,8-cineol puro, reforçando a hipótese que a eficácia dos óleos essenciais seja um somatório de efeitos em conjunto com seus constituintes (Silva et al. 2011).

O linalol, um álcool monoterpeno, descrito por suas propriedades antibacterianas e antifúngicas, bem como antioxidante, antiinflamatório e anti-câncer, é utilizado na produção de uma variedade de produtos domésticos, cosméticos e fragrâncias químicas. Em cosméticos foi demonstrada sua utilidade como conservante, sendo assim a adição de linalol em óleos essenciais poderia aumentar sua ação antimicrobiana (Jorge 2014; Herman and Tambor 2016). Estudos demonstraram que a utilização de linalol purificado possui atividade antimicrobiana, inibindo o crescimento de *C. albicans*, sendo mais eficaz que outros compostos puros utilizados, indicando que a presença deste componente possa ser responsável pelo efeito antifúngico de óleos essenciais (Alviano et al. 2005; Hsu et al. 2013).

Terpinoleno é um monoterpeno hidrocarboneto, embora relatos sobre sua atividade isolada seja escassa na literatura, plantas ricas em terpinoleno têm demonstrado atividade antifúngica e antibacteriana (Eftekhar et al. 2005).

A presença de α -terpineol em óleos essenciais tem sido relatada como sendo responsável pelo efeito antifúngico e analgésico (Ramage et al. 2012; Sadraei et al. 2015).

Neste trabalho a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *P. salutare* var. *sericeum* e *P. salutare* var. *mucronatum* foi determinada pelo método de microdiluição em caldo, possibilitando a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Fungicida Mínima (CFM) promovida pelos mesmos

Com a realização da CIM, pode-se verificar que a concentração dos óleos essenciais de $2,50 \text{ mg.ml}^{-1}$ em ambas as variedades em estudo, foram suficientes para inibir o crescimento fungico de *C. albicans* (ATCC 10231).

Os critérios para aceitação da atividade antifúngica com CIM abaixo de 100 mg.ml^{-1} é considerado uma boa atividade fungicida, resultados de CIM de 101 a 500 mg.ml^{-1} é considerado uma moderada atividade fungicida. Resultados de CIM entre 501 e 1000 mg.ml^{-1} fraca atividade fungicida, e resultados de CIM acima de 1001 mg.ml^{-1} é considerado inativo (Menezes et al. 2009; Leite et al. 2014; Simonetti et al. 2016). A CIM ($2,25 \text{ mg.ml}^{-1}$) para o óleo essencial das duas variedades utilizadas neste estudo é considerada uma boa atividade fungicida.

Em contrapartida, estudo realizado com óleo essencial de *Eucalyptus citriodora* e *Eugenia uniflora* (Myrtaceae), relatou um baixo poder de inibição sobre diferentes cepas de *Candida*, detectando atividade inibitória apenas sobre a *Candida krusei* (Lima et al. 2006).

A CFM, definida como a concentração mais baixa de óleo essencial capaz de levar a morte de 99,9% do inóculo (Tyagi and Malik 2010). Neste trabalho, os óleos

essenciais de ambas as espécies na concentração de 10 mg.ml^{-1} , apresentaram atividade fungicida.

A utilização de uma mistura de dois isômeros geométricos, o citral, que apresenta composição semelhante a que ocorre naturalmente em muitos óleos essenciais de citrinos e em outras ervas ou especiarias, apresentaram atividade antifúngica significativa contra a *C. albicans* e revelou que as concentrações que inibem o crescimento são as mesmas que aquelas que causam a morte fungica (Leite et al. 2014).

Resultados promissores sobre a capacidade inibitória de extratos vegetais e ou de óleos essenciais extraídos de plantas, inibindo o crescimento de *Candida* spp e levando a alterações morfológicas, danos em estruturas celulares e alterações da superfície celular, foi reportado em outros estudos, inclusive em espécie de *Candida* resistentes ao fluconazol (Schwartz et al. 2006; Tyagi and Malik 2010; Sharifzadeh and Shokri 2016).

Um estudo que avaliou a eficácia de cinco óleos essenciais extraídos de diferentes espécies vegetais contra *C. albicans* isolada da cavidade oral de indivíduos HIV positivos com candidíase orofaríngea, demonstrou a existência de efeitos inibitórios sobre *C. albicans*, com valores de CIM variando de 300 a 3200 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, mesmo para amostras resistentes ao fluconazol. Sugerindo que o mecanismo de ação antifúngica de óleos essenciais é independente de alterações associadas com resistência aos azoles (Sharifzadeh and Shokri 2016).

Análises da morfologia celular demonstraram que culturas fúngicas apresentaram colapso e desnaturação celular após exposição a produtos naturais. Dessa forma, os relatos da literatura apontam que o mecanismo de ação dos óleos

essenciais e de seus constituintes esteja centrado na presença de terpenos e em sua natureza lipossolúvel, o que permite a interação com estruturas celulares que possuem constituição lipídica, resultando no aumento da permeabilidade das membranas, o que pode provocar desequilíbrio eletrolítico e morte celular (Terzi et al. 2007; Tyagi and Malik 2010; Cavalcanti et al. 2011; Marcos-Arias et al. 2011). Alterações na permeabilidade e na fluidez da membrana causam degradação da parede da célula, uma diminuição da aderência à superfície do hospedeiro e efeitos variáveis tais como a alterações na membrana citoplasmática, extravasamento do conteúdo celular, coagulação do citoplasma e lise celular (Marcos-Arias et al. 2011).

Sendo assim, o dano a membrana é proposto para ser o principal mecanismo de ação dos óleos essenciais (Sebei et al. 2015).

Além disto, neste estudo o óleo essencial das duas espécies de *P. salutare* apresentou concentração expressiva de monoterpenos hidrocarbonetos, tais como o limoneno. Os monoterpenos são descritos por apresentarem ação antimicrobiana pela facilidade de difundirem-se nas estruturas da membrana celular (Tyagi and Malik 2010).

Estudos que utilizaram como tratamento o óleo de cravo e terpenóides observaram diminuição da quantidade de ergosterol, constituinte específico da membrana celular fúngica e alterações nas reações enzimáticas (Sebei et al. 2015).

Quanto ao fluconazol utilizado como controle positivo não foi possível fazer uma comparação, no entanto, é importante destacar que esses resultados não devem ser simplesmente comparados, pois deve ser levado em consideração que os padrões são compostos sintéticos e o óleo essencial um produto natural, sendo assim não é possível comparar os resultados obtidos (Santos 2015).

Os óleos essenciais de *P. salutare* var. *sericium* e *P. salutare* var. *mucronatum* tiveram ação inibitória frente a *C. albicans*. Os dados do presente estudo se mostraram promissores e colaborou para a ampliação dos conhecimentos a respeito da atividade fungicida in vitro dos óleos essenciais de duas espécies de *P. salutare*, espécies vegetais ainda não referenciadas em publicações científicas, mas que demonstraram ter potencial promissor para novos estudos e possível aplicação como fungicida de origem natural.

Materiais e métodos

Material vegetal

As amostras de *P. salutare* var. *sericeum* e *P. salutare* var. *mucronatum* foram coletadas no município de Alegrete/RS (29°39'25,639"S 55°24'11,772"O), sendo que a parte da planta utilizada para a extração do óleo essencial foram as folhas. O material foi identificado e uma amostra de cada espécie foi depositada no herbário do Museu de Ciências Naturais, do Centro Universitário UNIVATES com os seguintes números de exsicata: HVAT 4051 (var. *sericeum*) e HVAT 4685 (var. *mucronatum*).

Extração do óleo essencial

Os óleos essenciais foram extraídos das folhas utilizando o equipamento Clevenger modificado, por um período de 3,5 horas. Após os óleos foram removidos por gravidade e secos com sulfato de sódio anidro. Cada óleo foi armazenado em frasco âmbar sob refrigeração até o momento dos ensaios.

Índice de retenção de Kovats e cromatografia gasosa

A identificação dos constituintes presentes em *P. salutare* var. *sericeum* e *P. salutare* var. *mucronatum* foi realizada na central Instrumental do Centro Tecnológico de Pesquisa e Produção de Alimentos – CTPPA – da UNIVATES. Utilizando um cromatógrafo a gás acoplado a detector de massas (GCMS-QP2010 Plus, Shimadzu). Como gás de arraste foi empregado o hélio. Para a análise foram empregadas as seguintes condições: temperatura do injetor: 240 °C; modo de injeção: razão de split 1:20 com purga de 3 ml.min⁻¹; controle de fluxo de gás: velocidade linear; fluxo de gás de arraste: 1,00 ml.min⁻¹; programa: 50 °C-290 °C (4 °C.min⁻¹); temperatura da interface do espectrômetro de massas: 280 °C, temperatura da fonte de íons: 260 °C. A maioria dos constituintes foram identificados utilizando o índice de Kovats em comparação com uma mistura de n-alcanos, espectros de massas de padrões puros (NIST11¹, 2011) e comparação com dados da literatura (Adams 2007).

Microrganismo

Para a avaliação antifúngica, foram utilizadas linhagens padrão ATCC (*American Type Culture Collection*) de *Candida albicans* (ATCC 10231), cedidas pelo Laboratório de Microbiologia do UNIANALISES. A linhagem fúngica foi reativada em ágar Sabouraud a 28 °C por 48 horas. Para condução do estudo, suspensões fúngicas dos microrganismos foram preparadas em solução salina, para

¹ NIST - National Institute of Standards of Technology

obter uma turvação de 0,5 da escala nefelométrica de McFarland contendo uma população de $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias (UFC.ml⁻¹).

Concentração inibitória mínima e concentração fungicida mínima

Para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos óleos essenciais, foi utilizado o método de microdiluição em caldo, conforme as normas descritas pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI 2012). Os ensaios foram realizados em placas estéreis de 96 micropoços (Costar, código 3596), onde foram inoculadas inicialmente 100 µl de uma solução de 80 mg.ml⁻¹ de amostra em meio caldo Sabouraud, contendo 2% do surfactante Tween-80. Após foram feitas diluições seriadas de cada óleo onde a concentração variou de 40 mg.ml⁻¹ até 1,25 mg.ml⁻¹. Os poços foram inoculados com 100 µl da suspensão microbiana, e as placas incubadas por 48 horas a 28 °C. Para a realização da leitura do CIM, utilizou-se como revelador a solução aquosa estéril de cloreto de resazurina 0,02%.

Após a determinação do CIM, repicou-se das concentrações correspondentes a inibição, para placas de Petri contendo Agar Sabouraud dextrose que foram incubadas a 28 °C por 48 horas. Após o período de incubação, a determinação da concentração fungicida mínima (CFM) foi verificada através do crescimento ou não nas placas.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Agradecimentos

Os autores agradecem a FAPERGS e CNPq pelo financiamento parcial da pesquisa através do edital PRONEX/2008 (processo nº 10/0029-0).

Conflito de interesse

Os autores deste trabalho declaram não haver nenhum conflito de interesse na publicação deste estudo.

Referências bibliográficas

Adams, R.P. (2007) *Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography/ Mass Spectroscopy*. Carol Stream Illinois: Allured Publishing Corporation.

Álvares, C.A., Svidzinski, T.I.E. and Consolaro, M.E.L. (2007) Vulvovaginal candidiasis: susceptibility factors of the host and virulence of the yeasts. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* **43**, 8.

Alviano, W.S., Mendonça-Filho, R.R., Alviano, D.S., Bizzo, H.R., Souto-Padrón, T., Rodrigues, M.L., Bolognese, A.M., Alviano, C.S. and Souza, M.M. (2005) Antimicrobial activity of Croton cajucara Benth linalool-rich essential oil on artificial biofilms and planktonic microorganisms. *Oral Microbiol Immunol* **20**, 101-105.

Amancio, A.M., Reis, L.d.O., Pereira, J.B.B., Lucia, M., Malaquias, L.C.C. and Chavasco, J.K. (2015) Estudo da ação antimicrobiana de extratos de plantas do gênero *Psidium*. *Revista da Universidade Vale do Rio Verde* **13**, 8.

Bailão, E.F., Devilla, I.A., da Conceição, E.C. and Borges, L.L. (2015) Bioactive Compounds Found in Brazilian Cerrado Fruits. *Int J Mol Sci* **16**, 23760-23783.

Bordignon, S.A.d.L. (2014) *Psidium salutare* var. *sericeum* (Cambess.) Landrum. In *Flora Digital do Rio Grande do Sul* ed. UFRGS. Porto Alegre.

Cavalcanti, Y.W., Almeida, L.F.D. and Padilha, W.W.N. (2011) Atividade Antifúngica de Três Óleos Essenciais Sobre Cepas de *Candida*. *Rev Odontol Bras Central* **20**.

Cleff, M.B., Meinerz, A.R.M., Madrid, I., Fonseca, A.O., Alves, G.H., Meireles, M.C.A. and Rodrigues, M.R.A. (2012) Perfil de suscetibilidade de leveduras do gênero *Candida* isoladas de animais ao óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. *Rev Bras Plantas Med* **14**, 6.

Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI (2012) *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard*. Wayne, PA: CLSI.

Colombo, A.L. and Guimarães, T. (2003) [Epidemiology of hematogenous infections due to *Candida* spp]. *Rev Soc Bras Med Trop* **36**, 599-607.

Cuéllar-Cruz, M., López-Romero, E., Villagómez-Castro, J.C. and Ruiz-Baca, E. (2012) *Candida* species: new insights into biofilm formation. *Future Microbiol* **7**, 755-771.

Eftekhari, F., Yousefzadi, M., Azizian, D., Sonboli, A. and Salehi, P. (2005) Essential oil composition and antimicrobial activity of *Diplomaena damavandica*. *Z Naturforsch C* **60**, 821-825.

Faria, N.C., Kim, J.H., Gonçalves, L.A., Martins, M.e.L., Chan, K.L. and Campbell, B.C. (2011) Enhanced activity of antifungal drugs using natural phenolics against yeast strains of *Candida* and *Cryptococcus*. *Lett Appl Microbiol* **52**, 506-513.

Glehn, E.A.V. and Rodrigues, G.P.S. (2012) Antifungigrama para comprovar o potencial de ação dos extratos vegetais hidroglicólicos sobre *Candida* sp. (Berkhout). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* **14**, 3.

Herman, A. and Tambor, K. (2016) Linalool Affects the Antimicrobial Efficacy of Essential Oils. *Curr Microbiol* **72**, 165-172.

Hsu, C.C., Lai, W.L., Chuang, K.C., Lee, M.H. and Tsai, Y.C. (2013) The inhibitory activity of linalool against the filamentous growth and biofilm formation in *Candida albicans*. *Med Mycol* **51**, 473-482.

Jorge, R.E. (2014) Avaliação de óleos essenciais e extratos de *Lavandula* SPP. no controlo de microrganismos. In *Engenharia Agronómica - Proteção de Plantas - Instituto Superior de Agronomia*. p.61. Lisboa: Universidade de Lisboa.

Leite, M.C., Bezerra, A.P., de Sousa, J.P., Guerra, F.Q. and Lima, E.e.O. (2014) Evaluation of Antifungal Activity and Mechanism of Action of Citral against *Candida albicans*. *Evid Based Complement Alternat Med* **2014**, 378280.

Lim, C.S., Rosli, R., Seow, H.F. and Chong, P.P. (2012) *Candida* and invasive candidiasis: back to basics. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **31**, 21-31.

Lima, I.d.O., Oliveira, R.d.A.G., Lima, E.d.O., Farias, N.M.P. and Souza, E.L.d. (2006) Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. *Rev Bras Farmacogn* **16**, 197-201.

Marcos-Arias, C., Eraso, E., Madariaga, L. and Quindós, G. (2011) In vitro activities of natural products against oral *Candida* isolates from denture wearers. *BMC Complement Altern Med* **11**, 119.

Mayer, F.L., Wilson, D. and Hube, B. (2013) *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence* **15**, 9.

Mekonnen, A., Yitayew, B., Tesema, A. and Taddese, S. (2016) In Vitro Antimicrobial Activity of Essential Oil of *Thymus schimperi*, *Matricaria chamomilla*, *Eucalyptus globulus*, and *Rosmarinus officinalis*. *Int J Microbiol* **2016**, 9545693.

Menezes, T.O.d.A., Alves, A.C.B.A., Vieira, J.M.d.S., Menezes, S.A.F.d., Alves, B.P. and Mendonça, L.C.d.V. (2009) Avaliação in vitro da atividade antifúngica de óleos essenciais e extratos de plantas da região amazônica sobre cepa de *Candida albicans*. *Revista de Odontologia da UNESP* **38**, 184-191.

Nasir, M., Tafess, K. and Abate, D. (2015) Antimicrobial potential of the Ethiopian *Thymus schimperi* essential oil in comparison with others against certain fungal and bacterial species. *BMC Complement Altern Med* **15**, 260.

Pires, C.H., Paula, J.A.M., Tresvenzol, L.M.F., Ferri, P.H.F., Fiuza, J.R.d.P., Fiuza, T.d.S. and Bara, M.T.F. (2013) Composição química e atividade antimicrobiana dos óleos essenciais das folhas e flores de *Callistemon viminalis* (sol. ex Gaertn.) G. Don ex. Loudon (Myrtaceae). *Rev Ciênc Farm Básica Apl* **34**, 6.

Ramage, G., Milligan, S., Lappin, D.F., Sherry, L., Sweeney, P., Williams, C., Bagg, J. and Culshaw, S. (2012) Antifungal, cytotoxic, and immunomodulatory properties of tea tree oil and its derivative components: potential role in management of oral candidosis in cancer patients. *Front Microbiol* **3**, 220.

Ramos, M.F.S., Siani, A.C., Souza, M.C., Rosas, E.C. and Henriques, M.G.M.O. (2006) Evaluation of the Anti-inflammatory Activity of Evaluation of the Anti-inflammatory Activity of Essential Essential Oils from Five Myrtaceae Species. *Revista Fitos* **2**, 9.

Rodrigues, C.F., Silva, S., Azeredo, J. and Henriques, M. (2016) *Candida glabrata*'s recurrent infections: biofilms formation during Amphotericin B treatment. *Lett Appl Microbiol*.

Ruiz-Pérez, N.J., González-Ávila, M., Sánchez-Navarrete, J., Toscano-Garibay, J.D., Moreno-Eutimio, M.A., Sandoval-Hernández, T. and Arriaga-Alba, M. (2016) Antimycotic Activity and Genotoxic Evaluation of *Citrus sinensis* and *Citrus latifolia* Essential Oils. *Sci Rep* **6**, 25371.

Sadraei, H., Asghari, G. and Kasiri, F. (2015) Comparison of antispasmodic effects of *Dracocephalum kotschyi* essential oil, limonene and α -terpineol. *Res Pharm Sci* **10**, 109-116.

Salvat, A., Antonnacci, L., Fortunato, R.H., Suarez, E.Y. and Godoy, H.M. (2001) Screening of some plants from Northern Argentina for their antimicrobial activity. *Lett Appl Microbiol* **32**, 293-297.

Santos, R.F.d. (2015) Padronização Farmacognóstica e Atividade Antifúngica do Óleo Essencial de *Ageratum conyzoides* L. In *Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas*. p.118. Recife: Universidade Federal de Pernambuco.

Saraiva, D.D. (2012) *Psidium salutare* var. *mucronatum* (Cambess.) Landrum. In *Flora Digital do Rio Grande do Sul* ed. UFRGS. Porto Alegre.

Schwartz, A., Duttke, C., Hild, J. and Müller, H.J. (2006) In vitro activity of essential oils on microorganisms isolated from vaginal infections. *International Journal of Aromatherapy* **16**, 169–174.

Sebei, K., Sakouhi, F., Herchi, W., Khouja, M.L. and Boukhchina, S. (2015) Chemical composition and antibacterial activities of seven *Eucalyptus* species essential oils leaves. *Biol Res* **48**, 7.

Sharifzadeh, A. and Shokri, H. (2016) Antifungal activity of essential oils from Iranian plants against fluconazole-resistant and fluconazole-susceptible *Candida albicans*. *Avicenna J Phytomed* **6**, 215-222.

Silva, S.M., Abe, S.Y., Murakami, F.S., Frensch, G., Marques, F.A. and Nakashima, T. (2011) Essential Oils from Different Plant Parts of *Eucalyptus cinerea* F. Muell. ex Benth. (Myrtaceae) as a Source of 1,8-Cineole and Their Bioactivities. *Pharmaceuticals (Basel)* **4**, 1535-1550.

Simonetti, E. (2015) Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de *Eugenia anomala* e *Psidium salutare* (Myrtaceae) frente à *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*. In *Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia*. Lajeado, RS: Univates.

Simonetti, E., Castro, L.C., Kauffmann, C., Giacomini, A.C., Ledur, A., Arossi, K., Pacheco, L.A., Goettert, M.I., Faleiro, D., Freitas, E.M. and Ethur, M.E. (2016) Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de *Eugenia anomala* e *Psidium salutare* (Myrtaceae) frente à *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais* **18**, 9.

Stefanello, M., Pascoal, A.C. and Salvador, M.J. (2011) Essential oils from neotropical Myrtaceae: chemical diversity and biological properties. *Chem Biodivers* **8**, 73-94.

Terzi, V., Morcia, C., Faccioli, P., Valè, G., Tacconi, G. and Malnati, M. (2007) In vitro antifungal activity of the tea tree (*Melaleuca alternifolia*) essential oil and its major components against plant pathogens. *Lett Appl Microbiol* **44**, 613-618.

Tyagi, A.K. and Malik, A. (2010) Liquid and vapour-phase antifungal activities of selected essential oils against *Candida albicans*: microscopic observations and chemical characterization of *Cymbopogon citratus*. *BMC Complement Altern Med* **10**, 65.

Vandendool, H. and Kratz, P.D. (1963) A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *J Chromatogr* **11**, 463-471.