

CENTRO UNIVERSITÁRIO GUAIRACÁ
SESG - SOCIEDADE DE EDUCAÇÃO SUPERIOR GUAIRACÁ LTDA BACHARELADO
EM FARMÁCIA

JESSICA MACIEL WINCKIEVICZ

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE *Rosmarinus officinalis* L. SOBRE
Candida albicans

Guarapuava

2020

JESSICA MACIEL WINCKIEVICZ

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE *Rosmarinus officinalis* L. SOBRE
Candida albicans

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao centro universitário Uniguairacá, para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Prof.^a Ms.^a Hanan Sleiman

Guarapuava

2020

CENTRO UNIVERSITÁRIO GUAIRACÁ
SESG - SOCIEDADE DE EDUCAÇÃO SUPERIOR GUAIRACÁ LTDA BACHARELADO
EM FARMÁCIA

A COMISSÃO EXAMINADORA ABAIXO ASSINADA E APROVADA A
MONOGRAFIA DE CONCLUSÃO DE CURSO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA *Rosmarinus officinalis* L. SOBRE
A *Candida albicans***

ELABORADA POR:
‘JESSICA MACIEL WINCKIEVICZ’

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof.^a Ms.^a Hanan Sleiman

Prof.^a Ms.^a Gisele Neumann

Prof.^a Ms. Matheus Felipe Viante

Guarapuava

2020

Ao meu pai (*in memoriam*) que juntamente a Deus me guiou e protegeu, sendo minha força para nunca desistir.
Base para minha formação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu marido pelo incentivo desde o início, por ser meu apoio em todos os momentos, por me cuidar e amar.

Aos meus pets pelo amor incondicional, gestos de carinhos incontáveis, seus olhares sinceros e livres de julgamentos.

A minha mãe por me apoiar e ser meu colo. Obrigada por tudo, pelas noites até tarde me esperando chegar.

A minhas irmãs que muitas vezes foram minha descontração.

A minha amiga e companheira nessa jornada, Ana Paula, sempre sendo apoio uma da outra, amizade que ira seguir pra vida.

A minha grande mestra e orientadora Hanan por toda ajuda, pelo companheirismo, por ser inspiração. Para onde minha carreira me levar sempre vou me recordar de ti.

E grandemente a Deus com Sua proteção estou aqui concluindo minha graduação.

“ENQUANTO VOCÊ SONHA, VOCÊ ESTÁ FAZENDO O RASCUNHO DO SEU
FUTURO.”

(Charles Chaplin)

RESUMO

Desde a antiguidade, as plantas têm suscitado grande interesse pelos benefícios que trazem para a saúde humana. Em particular, algumas espécies de plantas, para além das suas características aromáticas, constituem uma fonte natural de diversos compostos fenólicos, estes que, por sua vez, trazem propriedades benéficas, como, ação antifúngica. Neste trabalho, estudou-se esta ação em amostras de *Rosmarinus officinalis*, popularmente conhecido como alecrim, sobre cepas ATCC de *Candida albicans*. Inicialmente o extrato a 90% foi preparado e depois de diluído em extratos alcoólicos nas concentrações de 80%, 70% e 60%, estas adicionadas em discos de papel filtro e distribuídas em placas de petri. A eficiência do *R. officinalis* foi testada por diâmetro do halo de inibição, sobre a *C. albicans*. O extrato alcoólico apresentou inibição, é possível atribuir à formação dos halos de inibição à presença dos metabólitos secundários presentes planta.

Palavras-chave: *Rosmarinus officinalis*, antifúngica, *Candida albicans*.

ABSTRACT

Since antiquity, plants have aroused great interest in the benefits they bring to human health. In particular, some species of plants, in addition to their aromatic characteristics, combine a natural source of several phenolic compounds, which, in turn, bring beneficial properties, such as antifungal action. In this work, this action was studied in *Rosmarinus officinalis*, popularly known as rosemary, on ATCC strains of *Candida albicans*. Initially, the 90% extract was prepared and after diluted in alcoholic extracts in the options of 80%, 70% and 60%, these were added on filter paper discs and distributed in petri dishes. The efficiency of *R. officinalis* was tested by diameter of the inhibition zone, on *C. albicans*. The alcoholic extract shows inhibition, it is possible to attribute the formation of the inhibition halos to the presence of the secondary metabolites present in the plant.

Key-word: *Rosmarinus officinalis*, antifungal, *Candida albicans*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Diâmetros de inibição dos extratos alcoólicos e aquosos, do antifúngico como controle positivo (CP) e do álcool como controle negativo (CN).....	33
---	----

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Arbustos de <i>Rosmarinus officinalis</i> L.....	14
Figura 2: Ramos de <i>Rosmarinus officinalis</i> L.....	14
Figura 3: Método de decocção.	18
Figura 4: Método de infusão.	19
Figura 5: Representação esquemática do equipamento para extração de óleo essencial por arraste de vapor.....	20
Figura 6: Via de síntese do ergosterol e os sítios de ação de seus principais inibidores.....	22
Figura 7: Micromorfologia de <i>C. albicans</i> ATCC 10231.	24
Figura 8: Culturas de colônias de <i>C. albicans</i> baseadas em diferentes concentrações de um inibidor.	25
Figura 9: Diluição do extrato bruto de alecrim.	30
Figura 10: Diluição do fluconazol.....	30
Figura 11: Placas de Petri, cada uma contendo as concentrações estipuladas.	31
Figura 12: Placas de petri, teste de sensibilidade	32
Quadro 1: Resumo dos compostos predominantes presentes no óleo essencial de <i>Rosmarinus officinalis</i> conforme origem.	15

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO TEÓRICA	13
2.1 Família Lamiaceae	13
2.2 <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	13
2.3 Metabólitos primários e secundários	16
2.4 Extração de metabólitos secundários	17
2.5 Fungos, antifúngicos e resistência a antifúngicos	20
2.6. <i>Candida albicans</i>	23
3. OBJETIVOS	26
3.1 Objetivo geral	26
3.2 Objetivos específicos	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1 Obtenção do extrato de alecrim	27
4.2 Preparo do meio de cultura	27
4.3 Obtenção de cepas de <i>C. albicans</i>	27
4.4 Teste do halo	28
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	30
5.1 Diluição do extrato bruto	30
5.2 Teste do halo	32
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	35
REFERÊNCIAS	36

1. INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais vem desde a antiguidade, sendo empregada para diversos fins como na medicina, cosmética, e rituais religiosos. Há indícios de que na pré-história o homem fazia uso de plantas para curar a dor (MACHÁDO, *et al.*, 2018). Há antigos registros em torno de 2600 a.C., em placas de argila, destacados pelos povos sumérios (SAAD, *et al.*, 2016; SOUZA; MELO; LOPES, 2011). Na China há registros de 3000 a.C., do cultivo de plantas medicinais, seus usos e de óleos aromáticos são relatados em escrituras da época. Muitas vezes essas plantas eram utilizadas em cerimônias religiosas, atribuindo os seus efeitos ao poder divino (MARCHIORI, 2004).

No Brasil foi documentada a primeira obra sobre plantas para tratar doenças em 1587 por Gabriel Soares de Souza em Tratado Descritivo do Brasil, neste que são descritos os preparos dos indígenas, a cultura dos ameríndios era utilizada na época. Após a vinda da família Real Portuguesa para o Rio de Janeiro, em 1808, houve um avanço no cultivo das espécies vegetais utilizadas, nessa época foi inaugurado o Jardim Botânico (FREIRE, *et al.*, 2018).

Devido os avanços na área científica, que permitiram o desenvolvimento de fitoterápicos reconhecidamente seguros e eficazes, e também a tendência de busca por terapias menos agressivas destinadas ao atendimento primário à saúde, se nota um crescimento na utilização de fitoterápicos pela população brasileira (YUNES, *et al.*, 2001).

As plantas produzem compostos que são denominados, metabólitos primários que atuam em funções básicas vitais, como por exemplo, na divisão, crescimento celular, respiração, estocagem e reprodução. Já os metabólitos secundários tem como função auxiliar em atividades biológicas exercidas sobre a planta, e são responsáveis pela atividade farmacológica, devido aos efeitos benéficos a saúde humana (FUMAGALI, 2008).

O alecrim, *Rosmarinus officinalis* L., por exemplo, apresenta os seguintes metabólitos secundários em sobressalência: ácidos fenólicos e flavonóides (FRESCURA, *et al.*, 2013). Na pesquisa de Packer & Luz (2007), ambos observaram que há atividades fungistáticas da droga vegetal em questão.

A *Candida albicans* é o principal agente causador de candidíases, ou candidoses, que é uma micose causada por leveduras do gênero *Candida* spp. (BARBEDO, *et al.*, 2010), esta tem grande facilidade em causar resistência a antifúngicos, como, a produção de biofilmes (TURAN, 2018; EL-AZIZI, *et al.*, 2015). Por sua vez, os azóis são a classe de antifúngico mais utilizado nas infecções por *C. albicans*, contudo, essa medicação pode aumentar as

enzimas hepáticas, quando administradas por longos períodos (ESCOBAR, *et al.*, 2004). Além desse fato, a ação fungicida requer altas concentrações, por esse motivo, se a terapia com doses fungistáticas não forem administradas por um período suficiente, podem ocorrer recidivas (CATALÁN, *et al.*, 2006). Também podem ocorrer modificações na via do ergosterol, que geram resistência ao azol ao qual estão expostos, tanto quanto a outros medicamentos com os quais podem entrar em contato posteriormente (COWEN, *et al.*, 2014).

Diante das limitações dos antifúngicos sintéticos, como reações adversas e resistência torna-se viável o estudo de produtos naturais, com ampla atividade biológica, para diminuir a ocorrência dos problemas destacados acima (CASTRO, *et al.*, 2011), desta forma o presente trabalho teve como objetivo avaliar a ação antifúngica do *Rosmarinus officinalis* L. sobre a *Candida albicans*.

2. REVISÃO TEÓRICA

2.1 Família Lamiaceae

As plantas da família Lamiaceae pertencem à ordem Tubiflorae Lamiales, englobando aproximadamente 200 gêneros e, cerca de, 3.200 espécies, distribuídas pelo mundo. A maioria das espécies é conhecida pelo seu uso na culinária, e muitas delas possuem atividades biológicas, relatadas na literatura (LORENZI; MATOS, 2002).

Alguns exemplos de espécies brasileiras que se destacam incluem: *Marrubium vulgare* L. (hortelã-grande), *Melissa officinalis* L. (cidreira), *Mentha avensis* (hortelã-do-brasil), *Mentha piperita* L. (hortelã), *Mentha pulegium* L. (poejo), *Ocimum basilicum* L. (manjericão), *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim), *Salvia officinalis* L. (sálvia) (LORENZI; MATOS, 2002).

Na medicina popular, a família Lamiaceae ocupa o terceiro lugar em ordem de importância, com muitas espécies apresentando substâncias ativas (HARLEY, *et al.*, 2004).

Por exemplo, *Rosmarinus officinalis* L., apresenta propriedades que trazem benefícios à saúde, possuindo componentes bioativos com atividades antioxidantes, antimicrobianas, antiinflamatórias e quimiopreventivas (AFONSO, *et al.*, 2010).

2.2 *Rosmarinus officinalis* L.

O *Rosmarinus officinalis* L. conhecido popularmente como alecrim sendo originado na Região Mediterrânea (FERRARI, *et al.*, 2011), pertencente à família Lamiaceae, (figuras 1 e 2) espécie arbustiva, ramificada, sempre verde, com hastes lenhosas, folhas pequenas e finas, sésseis, opostas, lanceoladas, podendo alcançar cerca de 1,5 metros de altura (GONSALES, 2002). A planta exala aroma forte e agradável. Utilizada com fins culinários, medicinais e aromáticos, sendo o óleo essencial utilizado em cosméticos e perfumaria (MAY, *et al.*, 2000). Em meio aos constituintes químicos do alecrim se sobressaem os ácidos fenólicos e flavonóides (FRESCURA, *et al.*, 2013). Os componentes químicos do óleo são em sua maioria monoterpenos e sesquiterpenos (JALALI-HERAVI, *et al.*, 2011; OJEDA-SANA, *et al.*, 2013).

Figura 1: Arbustos de *Rosmarinus officinalis* L.



Fonte: HERNÁNDEZ, *et al.*, 2016.

Figura 2: Ramos de *Rosmarinus officinalis* L.



Fonte: GRASSI, 2018.

Destacam-se como constituintes majoritários os monoterpenos, β -pineno, canfeno, cânfora, borneol, acetato de bornilo e verbenona (JIANG, *et al.*, 2011; TAVASSOLI, *et al.*, 2011). O *R. officinalis* contém altas percentagens de diterpenos fenólicos, triterpenos, ácidos fenólicos, e flavonóides (SEDIGHI, *et al.*, 2015). No quadro 1, estão listadas as porcentagens de compostos principais conforme local de coleta da planta.

Quadro 1: Resumo dos compostos predominantes presentes no óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* conforme origem.

Espécie	Origem	Compostos principais	Referências
<i>R. officinalis</i>	Brasil	1,8-cineol (30,87%), cânfora (10,13%), α -pineno (9,79%) e β -pineno (9,24 %).	BARRETO, <i>et al.</i> , 2014.
<i>R. officinalis</i>	China	1,8-cineol (26,54%), α -pineno (20,14%).	JIANG, <i>et al.</i> , 2011.
<i>R. officinalis</i>	Índia	(1,8-cineol (25,10%), cânfora 14,65%), cariofileno (6,08%), β -Limoneno (5,78%) e β -pineno (4,11%).	KIRAN e PRASKASH, 2015.
<i>R. officinalis</i>	Sérvia	1,8-cineol (43,77%), cânfora (12,53%), e α -pineno (11,51%).	RAŠKOVIĆ, <i>et al.</i> , 2014
<i>R. officinalis</i>	Itália	α -pineno (25,96-37,66%), cânfora (5,88-6,79%), acetato de bornilo (5,08-6,05%), 1,8-cineol (1,83-6,41%), β -pineno (3,32-4,77%) e β -mirceno (3,21-3,98%).	BERETTA <i>et al.</i> , 2011

Fonte: Adaptada de ÉVORA, 2015.

Classificação botânica:

- Nome científico: *Rosmarinus officinalis* L.
- Divisão: Angiospermae
- Classe: Dicotyledoneae (Magnóliopsida)
- Subclasse: Asteridae
- Ordem: Solanales (Tubiflorae)
- Subordem: Verbeninae

- Família: Lamiaceae
- Gênero: *Rosmarinus*
- Primeiro a descrever: Carl Von Linné (Lineu)
- Nome popular: Alecrim
- Sinonímia popular: alecrim-comum, alecrim-de-jardim, rosmarinho, flor-de-olimpio, rosa-marinha, rosmarino. (CARPER, 1998; CORRÊA, 1984; JÚNIOR, MING, SCHEFFER, 1994; BLUMENTHAL, 1998; VAZ, *et al.*, 2006).

2.3 Metabólitos primários e secundários

O metabolismo basal ou metabolismo primário abrange todos os compostos e processos que são fundamentais para o crescimento e desenvolvimento de uma planta (SIMÕES, *et al.*, 2017). Estes metabólitos são macromoléculas, carboidratos, lipídios, proteínas, aminoácidos, ácidos graxos, vitaminas, ácidos nucleicos, entre outros, que exercem funções vitais a vida da planta tais como, respiração, fotossíntese, transporte de solutos, por exemplo, e que se encontram presentes de forma universal em grande concentração nas várias espécies vegetais (SIMÕES, *et al.*, 2017.; MONTEIRO, *et al.*, 2018.; FREIRE, *et al.*, 2018). Tem como principal função o fornecimento de energia (ATP) e poder redutor (NADH) e para a biossíntese de substâncias (FREIRE, *et al.*, 2018).

Os metabólitos secundários das plantas são compostos químicos derivados do metabolismo primário, cumprem múltiplas funções não vitais nas plantas, intervindo em interações ecológicas entre a planta e seu ambiente para protegê-las de predadores herbívoros, vírus, fungos e bactérias (SHILPA, *et al.*, 2010; PÉREZ-ALONSO E JIMÉNEZ, 2011).

Além disso, são importantes componentes ativos em medicamentos e outros produtos químicos, como os nutracêuticos (GOOSSENS, *et al.*, 2003; VALENZUELA, *et al.*, 2014). Esses metabólitos, pelas propriedades curativas, têm sido os fundamentos da medicina, aumentando seu arsenal terapêutico todos os dias, utilizados na preparação de medicamentos ou fitofármacos. (LUISA, *et al.*, 2015).

Os principais metabólitos secundários são os alcalóides, taninos, saponinas, glicosídeos cianogênicos, hidrobenzenos e flavonóides (LUISA, *et al.*, 2015). Estando os dois últimos constituintes presentes na espécie *Rosmarinus officinalis* L. (SEDIGHI, *et al.*, 2015).

Os fenóis, nome popular para hidroxibenzenos, compreende aproximadamente 8000 compostos, com um ou mais grupos hidróxido, incluindo derivados funcionais, ésteres,

ésteres metálicos e glicosídeos (TSIMIDOU, 1998). A maneira mais comum de encontrá-lo na natureza está na forma de glicosídeos, sendo solúvel em água e solventes orgânicos. Os açúcares associados à polifenóis podem ser monossacarídeos, dissacarídeos ou até oligossacarídeos. Eles também podem ser encontrados ligados a ácidos carboxílicos, orgânicos, aminas, lipídios e outros compostos fenólicos (BRAVO, 1998)

Os flavonóides são de caráter fenólico e possui dois anéis aromáticos de benzeno, ligados por uma ponte de três átomos de carbono, com a estrutura geral C6-C3-C6 (CARTAYA E REYNALDO, 2001). Os flavonóides geralmente têm pelo menos três hidroxilas fenólicas e geralmente são combinados com açúcares na forma de glicosídeos, embora também ocorram com relativa frequência como agliconas livres (LUISA, *et al.*, 2015)

Muitas são as propriedades atribuídas aos flavonóides, como, antialérgicos, anti-úlceras, antiinflamatórios, antiagregantes plaquetários e diuréticos (VILLAR, 1999; BELLESTER, *et al.*, 2006; BARRÓN, *et al.*, 2011).

Atualmente os óleos essenciais constituem um dos mais abrangentes grupos de matérias primas para as indústrias de alimentos, farmacêutica, perfumaria e demais. Podem ser obtidos a partir de plantas, por métodos de extração físicos. São constituídos por uma mistura complexa de diversas classes de substâncias, dentre elas os mono e sesquiterpenos, pertencentes aos metabolismos secundários das plantas (MORAIS, 2009; Farmacopéia Brasileira, 2019).

Estes óleos podem ser isolados, misturados, retificados, desterpenados ou concentrados. A composição do óleo depende de alguns fatores que influenciam no metabolismo secundário, como, fatores genéticos, edáficos e climáticos (temperatura, intensidade de luz, efeito sazonal, etc.) (MORAIS, 2009; Farmacopéia Brasileira, 2019).

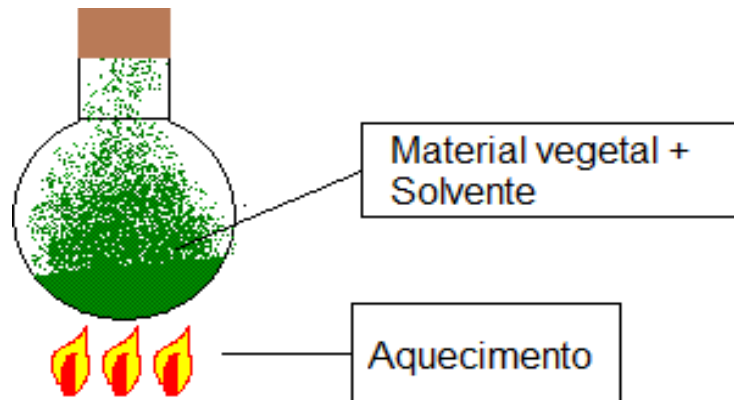
2.4 Extração de metabólitos secundários

São aplicados diferentes métodos de extração para isolar óleos essenciais. O método difere para a finalidade do óleo, por exemplo, de uso cosmético ou medicinal. De modo que a composição do óleo pode variar significativamente dependendo do método a ser utilizado (CASSEL, *et al.*, 2009).

A decocção é um método onde o material vegetal fica em contato com um solvente, em ebulição durante um período de tempo, que pode variar entre 15 a 30 minutos (FREIRE, *et al.*, 2018).

É um método (figura 3) empregado para extração de metabólitos de partes de plantas mais duras, como cascas, raízes, rizomas caules e sementes. Uma desvantagem da decocção é seu caráter restritivo, pois necessita que a substância seja solúvel e resistente ao calor (FREIRE, *et al.*, 2018).

Figura 3: Método de decocção.

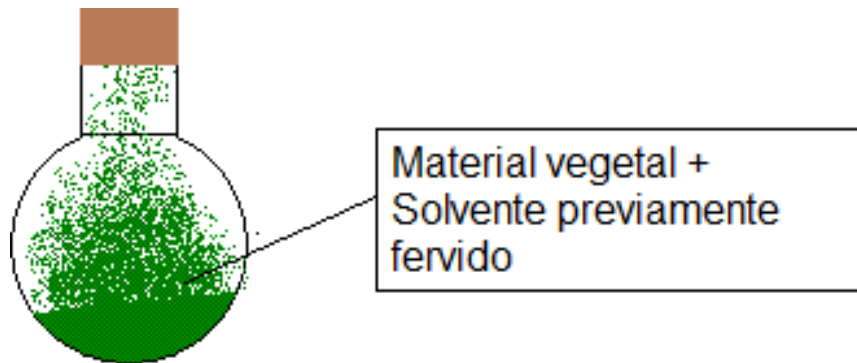


Fonte: elaborado pela autora.

A infusão (figura 4), diferente da decocção, a parte escolhida da planta não é fervida junto com o solvente, normalmente água. O solvente fervido é adicionado em um recipiente tampado ou abafado com o material vegetal, os princípios ativos serão extraídos de forma estática e descontínua, pode durar de 2 a 30 minutos (FREIRE *et al.*, 2018).

É mais indicado para partes moles da planta como folhas, flores e frutos. Para facilitar a extração estes já deverão estar brevemente cortados e pulverizados, para que haja um aumento da área superficial do material com o solvente (FREIRE *et al.*, 2018).

Figura 4: Método de infusão.

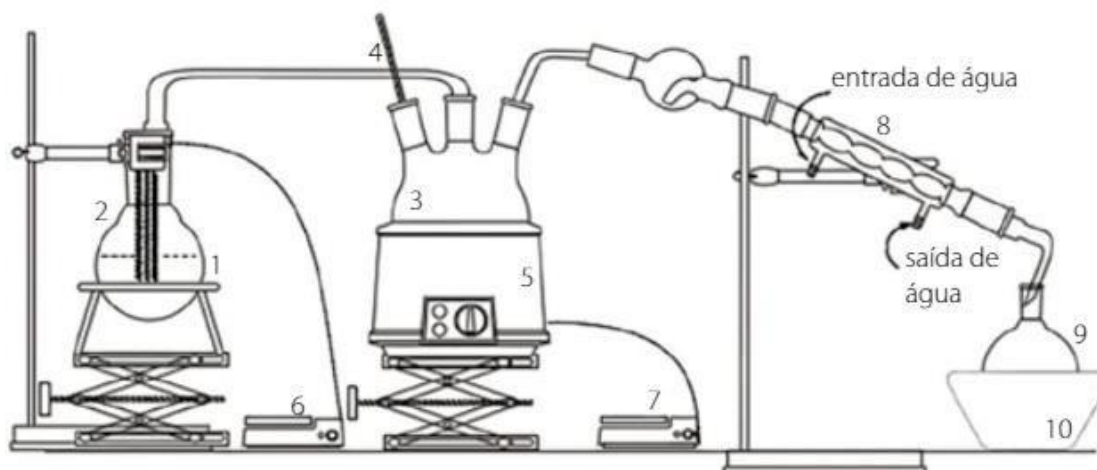


Fonte: elaborado pela autora.

O arraste por vapor de água (figura 5) é um método bastante utilizado para plantas frescas e tem como vantagem o fato de que a planta não entra em contato direto com a água. O método consiste em subjugar o material vegetal ao vapor d'água, que extrai o óleo pelo arraste do vapor. Primeiramente o vapor de água atravessa os tecidos da matéria-prima vegetal levando consigo o óleo contido no interior das suas glândulas. O óleo liberado vaporiza-se com choque térmico sendo arrastado pelo vapor até atingir o condensador, onde a mistura de óleo e hidrolato resfria e volta à fase líquida. Finalmente a mistura atingirá o último estágio do processo, o separador onde será separado o óleo do hidrolato por meio das diferenças de polaridade e densidade de substâncias (FREIRE, *et al.*, 2018). Na figura 5 o equipamento está representado esquematicamente, sendo,

- 1 e 2 - Balão de boca larga com fonte de aquecimento para ferver água e gerar vapor;
- 3-Balão de fundo redondo com três bocas onde foram colocadas as folhas verdes;
- 4-Termômetro;
- 5- Manta aquecedora;
- 6 e 7- Termostatos;
- 8- Condensador;
- 9- Recipiente para receber o hidrolato;
- 10- Cuba com gelo.

Figura 5: Representação esquemática do equipamento para extração de óleo essencial por arraste de vapor.



Fonte: SALGADO, *et al.*, 2003.

2.5 Fungos, antifúngicos e resistência a antifúngicos

Há dois tipos morfológicos de fungos que são de interesse médico, sendo eles leveduras, unicelulares, que se reproduzem por brotamento, único ou múltiplo, de forma arredondada, sendo estas células os blastoconídios, que são esporos de origem assexual, algumas leveduras se reproduzem por fissão. E o bolor ou fungos filamentosos, são multicelulares, ainda, dentro dos filamentosos existe um subgrupo chamado de fungos dimórficos, que se apresentam sob ambas as formas, dependendo de temperatura, e é também, influenciado pelo teor de CO₂ e condições nutricionais (ANVISA, 2004; MORAES, *et al.*, 2009).

Diversas pesquisas demonstram o óleo essencial da família Lamiaceae, de onde pertence o *Rosmarinus officinalis* L., com atividade fungistática. Foi observado na pesquisa de Packer & Luz (2007) com o óleo essencial do *R. officinalis* L. halos de inibição maiores que 60 mm, a partir do teste de difusão em meio sólido. Nascimento, *et al.*, (2000) utilizaram do extrato hidroalcoólico, da mesma planta, onde se observa susceptibilidade da *C. albicans*, com halos de inibição ≥ 7 mm, utilizando placas de Ágar Mueller-Hinton.

Os antifúngicos podem ser fungicidas, causam lise dos fungos, ou fungistáticos, inibindo o crescimento (MARTINEZ, 2006). Durante o desenvolvimento fúngico, um dos processos mais importantes é a biossíntese do ergosterol. O ergosterol é um lipídeo da família

dos esteróis que atua fornecendo fluidez, simetria e integridade; além de contribuir para as funções de muitas enzimas e que faz parte importante da membrana do fungo (LACAZ, 2002; VANDEPUTTE, 2012).

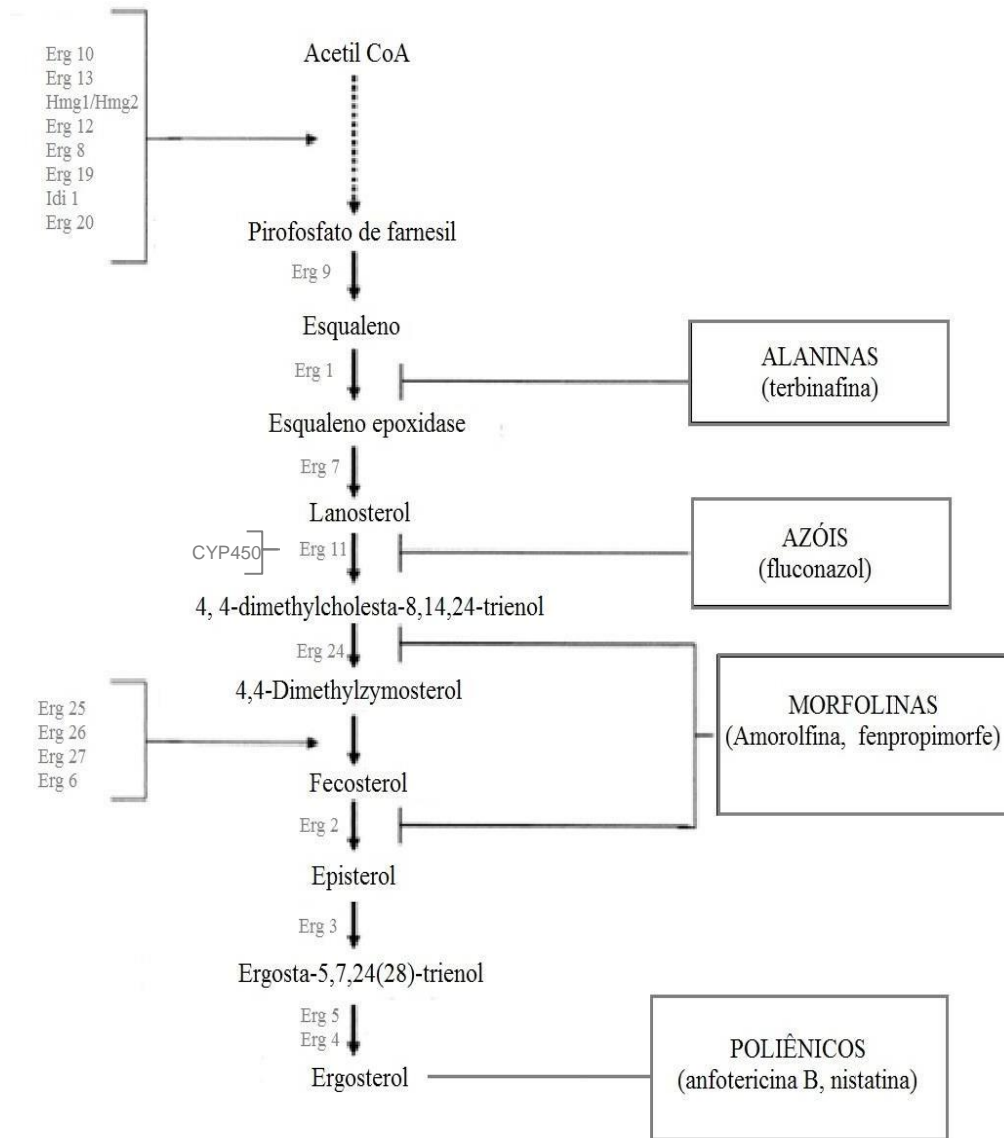
As classes de antifúngicos sintéticos são:

- Derivados poliênicos responsáveis por ligar-se ao ergosterol presente na membrana da célula fúngica, produzindo poros e/ou canais que resultam no aumento da permeabilidade da membrana, consequentemente, a célula fúngica sofre perda grande de pequenas moléculas e eletrólitos e tem sua homeostasia alterada exemplos dessa classe são anfotericina B e a nistatina (LACAZ, 2002; VANDEPUTTE, 2012);
- Alilaminas inibem a enzima esqualeno epoxidase (codificada por ERG1), o efeito antifúngico se dá devido o acúmulo de esqualeno e falta de ergosterol, é representada por terbinafina e butenafina (LACAZ, 2002; VANDEPUTTE, 2012);
- Morfolinas atuam inibindo duas diferentes enzimas da via do ergosterol, a $\Delta 7,8$ -isomerase (codificada por ERG24) e a C14-redutase (codificada por ERG2). Apesar de seu amplo espectro de atividade, esses agentes antifúngicos são usados essencialmente para tratar infecções dermatófitas, como *tinea capitis*, *tinea pedis* e *onicomicose*, porque eles apresentam numerosos efeitos colaterais (VANDEPUTTE, 2012);
- Imidazólicos e triazólicos agem na inibição da esterol-14- α -desmetilase (codificada por ERG11), que é um sistema enzimático microsomal dependente do citocromo P450, impedindo a biossíntese normal do ergosterol e alterando a composição bioquímica desta, com perda de constituintes celulares (proteínas, aminoácidos, nucleotídeos, cátions monovalentes), aliada a falhas na absorção de nutrientes extracelulares importantes, exemplos dessa ampla classe são imidazóis (cetoconazol, miconazol, econazol e clotrimazol) e triazóis (fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol, ravuconazol e albaconazol), de forma que os antifúngicos mais utilizados são os azóis. (LACAZ, 2002; GONZÁLEZ, *et al.*, 2006; CATALÁN, *et al.*, 2006; MARTINEZ, *et al.*, 2008.; CHIOCCIO, *et al.*, 2011; VANDEPUTTE, 2012).

A figura 6 demonstra a via de síntese do ergosterol, e os sítios de ação de seus principais inibidores, as alilaminas e tiocarbamatos estes que inibem esqualeno epoxidase que junto com oxidoesqualeno ciclase transformam o esqualeno em lanosterol, e os azóis inibindo a esterol-14- α -desmetilase, prejudicando a síntese do ergosterol na membrana citoplasmática e levando ao acúmulo de 14- α -metilesteróis. Esses metilesteróis não possuem a mesma forma e propriedades físicas que o ergosterol e levam à formação da membrana com propriedades

alteradas, que não desempenha as funções básicas necessárias ao desenvolvimento do fungo (BERGOLD, *et al.*, 2004).

Figura 6: Via de síntese do ergosterol e os sítios de ação de seus principais inibidores.



Fonte: adaptada de GAMBALE, 2011.

Os azóis são bem tolerados quando usado corretamente, considerando interações e efeitos colaterais. Essa medicação pode aumentar as enzimas hepáticas, quando administradas por longos períodos, sendo nesse caso importante o monitoramento da função hepática (ESCOBAR, *et al.*, 2004). Além desse fato a ação fungicida requer altas concentrações, por

esse motivo, se a terapia com doses fungistáticas não for administrada por um período suficiente, podem ocorrer recidivas (CATALÁN, *et al.*, 2006).

Modificações na via do ergosterol geram resistência ao azol ao qual estão expostos, tanto quanto a outros medicamentos com os quais podem entrar em contato posteriormente. A análise de esteróis em uma célula pode fornecer grandes informações relacionadas às alterações que ocorreram em uma cepa resistente (COWEN, *et al.*, 2014).

2.6. *Candida albicans*

Os fungos do gênero *Candida* spp. podem ser encontrados em variados ecossistemas, como solo, alimentos, água, bem como fazendo parte da microbiota de homens e animais (GIOLO, *et al.*, 2010).

As *Candida* spp. são classificadas taxonomicamente em:

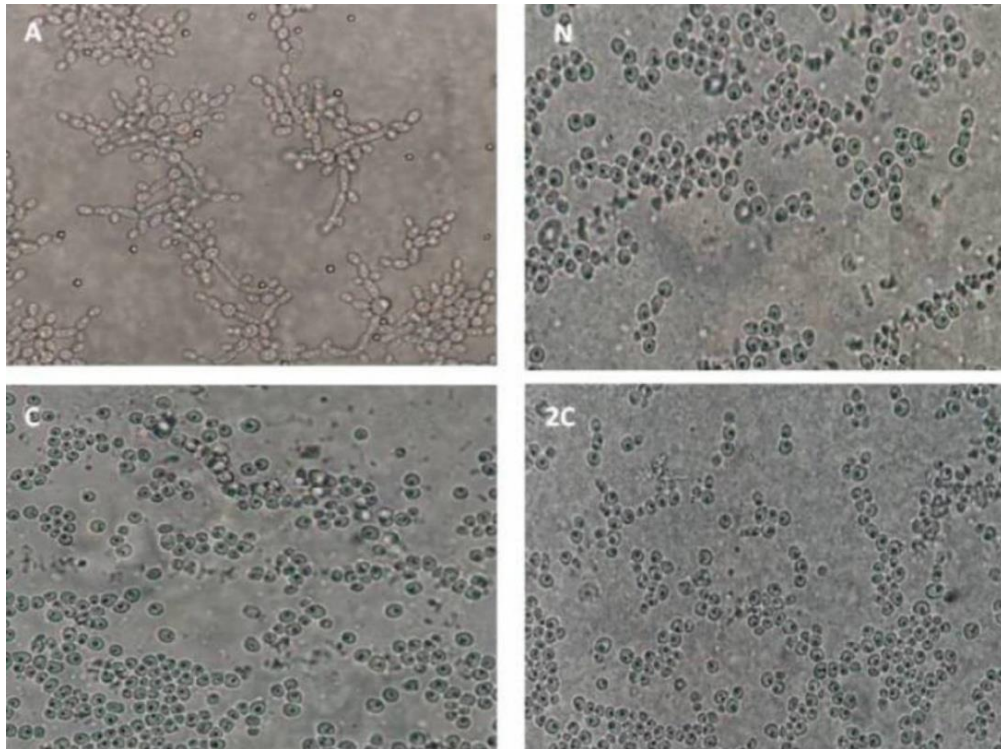
- Reino Fungi;
- Divisão: Eumycota;
- Subdivisão: Deuteromycotina;
- Classe: Blastomycetes;
- Família: Cryptococcacea.

O gênero *Candida* spp. é o principal entre as leveduras patogênicas, compreendendo aproximadamente 200 espécies (GIOLO, *et al.*, 2010; SIDRIM e ROCHÁ, 2004).

Há espécies de *Candida* spp. que residem no organismo humano como parasita, fazendo parte da microbiota normal de indivíduos saudáveis. Porém, quando ocorre uma desordem da microbiota ou o sistema imune do hospedeiro encontra-se comprometido, as espécies, tendem a manifestações agressivas, tornando-se patogênicas (BARBEDO, *et al.*, 2010). Dentre os fungos do gênero *Candida* spp., a *C. albicans* é a espécie mais frequentemente isolada em processos infecciosos humanos (MOTA, *et al.*, 2005). O primeiro registro, como patógeno, de leveduras do gênero *Candida* spp. é atribuído a Langenbeck, que em 1839 observou e isolou, o micro-organismo, que atualmente é a mais importante levedura patogênica do homem, *C. albicans* (SIDRIM e ROCHÁ, 2004). Podendo ser encontrada na mucosa genitourinária, na cavidade oral, no trato gastrointestinal como microbiota da espécie humana, são heterogêneos em suas características morfofuncionais (CARVALHO, 2003).

A *Candida albicans* é uma levedura diplóide (figura 7 e 8) que pode ter diferentes características, dentre elas a de alterar sua morfologia dependendo das condições de temperatura e do pH, denominada dimorfismo ou polimorfismo celular, pode apresentar-se sob a forma arredondada denominada blastoconídio, ou formando pseudo-hifas ou hifas e micélios verdadeiros (BARBEDO, *et al.*, 2010; GIOLO, *et al.*, 2010).

Figura 7: Micromorfologia de *C. albicans* ATCC 10231.



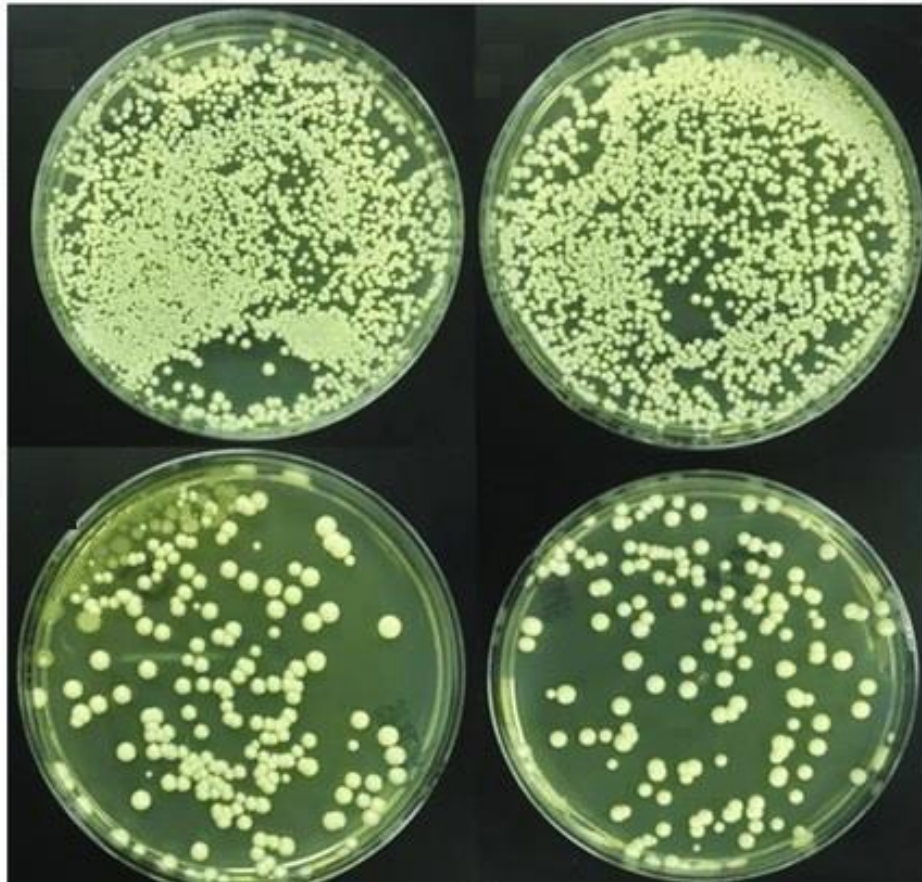
Fonte: OLIVEIRA, 2016.

Alterações na micromorfologia são decorrentes da expressão genética, que se reflete na macromorfologia do desenvolvimento leveduriforme quanto à cor, que pode ser do branco ao creme, e ao aspecto, pastoso, brilhoso ou opaco. Todavia, o estado leveduriforme pode evoluir para filamentoso, ou até mesmo uma mescla de células fúngicas leveduriformes e filamentosas (SUDBERY, 2004. MENEZES, 2005).

C. albicans é o principal agente de candidíases, ou candidoses, que é uma micose causada por leveduras do gênero *Candida* spp., em que a lesão pode ser branda, aguda ou crônica, superficial ou profunda, e de espectro clínico bem variável. (BARBEDO, *et al.*, 2010).

O primeiro mecanismo de resistência de *Candida albicans* a antifúngicos, se dá pelo acúmulo de mutações na 14- α -esterol desmetilase (codificada por ERG11), de onde, ocorre resistência cruzada entre os azóis (MELLADO, *et al.*, 2002; HILAL-DANDAN, *et al.*, 2015).

Figura 8: Culturas de colônias de *C. albicans* baseadas em diferentes concentrações de um inibidor.



Fonte: AHMAD *et al.*, 2017.

Um segundo mecanismo se deve à formação de barreiras de permeabilidade ou sistemas de bombeamento do antifúngico fora da célula, como a alteração nas bombas de expulsão e principais facilitadores (DEBNATH, *et al.*, 2014; ORTIGOZA, *et al.*, 2014; PRASSAD, *et al.*, 2012). Além do mais a *C. albicans* têm a habilidade de produzir biofilme, sendo este um importante mecanismo de resistência, permitindo que o fungo possa se aderir firmemente, causando a invasão e disseminação da infecção (TURAN, 2018; EL-AZIZI, *et al.*, 2015).

O biofilme é um conjunto de microorganismos organizados, estruturados e complexos, onde estão aderidos em uma superfície, trazendo ao microorganismo diversas vantagens como, resistência aos agentes antifúngicos proteção contra o sistema imunológico do hospedeiro, virulência acentuada, cooperação metabólica e troca de material genético (MELLO, *et al.*, 2016; CARDOSO, 2017).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Realizar a avaliação da atividade antifúngica da *Rosmarinus officinalis* L. sobre a *Candida albicans*.

3.2 Objetivos específicos

- Preparar o extrato aquoso da planta a ser testada utilizando a técnica de decocção;
- Preparar o meio de cultura Ágar Sabouraud Dextrose avaliando a esterilidade do mesmo;
- Avaliar a atividade antifúngica do extrato obtido;
- Avaliar em quais concentrações ocorre à formação de halo, sobre a *C. albicans*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os métodos foram realizados no laboratório de microbiologia e química do Centro Universitário UniGuairacá, estando todos os equipamentos e vidrarias disponíveis nestes.

As metodologias descritas abaixo estão de acordo com o manual vigente da Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

4.1 Obtenção do extrato de alecrim

Foram adquiridos 90g de folhas secas de *Rosmarinus officinalis* em uma loja de produtos naturais de Guarapuava – PR e em seguida foi preparado, o extrato de alecrim a 90%, este que foi triturado e em seguida, levado a aquecimento com 100 ml de etanol a 70° GL por 15 minutos. Posteriormente, foram filtradas em papel filtro e a solução filtrada foi diluída em álcool nas concentrações de 80%, 70% e 60%.

4.2 Preparo do meio de cultura

O Ágar Sabouraud Dextrose foi preparado conforme as instruções do fabricante, a partir de uma base desidratada disponível comercialmente, onde foram suspensos 65 g do ágar em 1 litro de água destilada e aquecido até completa dissolução e em seguida foi esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos. Imediatamente após passar pela autoclave, foi resfriado em banho-maria entre 45 e 50°C. Em seguida, foi despejado o meio recém-preparado e resfriado em placas de Petri de fundo chato, em vidro, numa superfície horizontal, para garantir uma profundidade uniforme de aproximadamente 4 mm. Isso corresponde a 25-30 mL, para placas com diâmetro de 100 mm. Foi deixada uma amostra representativa das placas para confirmar sua esterilidade, mediante a sua incubação a aproximadamente 25 °C, durante 24 horas. Antes da sua utilização, as placas foram retiradas da geladeira (20-30 min) para alcançarem a temperatura ambiente antes da execução dos testes (ANVISA, 2003).

4.3 Obtenção de cepas de *C. albicans*

Cepas de *C. albicans* ATCC (American Type Culture Collection) foram reativadas em caldo BHI e posteriormente isoladas em placa de Petri no meio Ágar PCA. A seguir, foi feita

uma suspensão em solução salina estéril a 0,85% de um cultivo recente. Esta suspensão foi submetida à comparação de turbidez com o grau 0,5 da escala de Mac Farland. Um swab estéril foi embebido no tubo preparado e então semeado no meio de cultura, suavemente em todas as direções da placa (técnica de esgotamento). Após 15 minutos de secagem, com o auxílio de uma pinça flambada e resfriada, os discos foram colocados sobre a superfície do meio inoculado, exercendo-se uma leve pressão com a ponta da pinça para melhor adesão.

4.4 Teste do halo

A eficiência antifúngica do extrato aquoso da planta *R. officinalis* foi avaliada mediante teste do halo. As culturas ativas de *C. albicans* plaqueadas em Ágar Sabouraud dextrose foram incubadas a 25 °C por 7 dias juntamente aos extratos (4 placas de Petri, cada uma contendo as concentrações estipuladas). Para realizar o teste foram utilizados discos de papel filtro autoclavados foram embebidos nas diferentes concentrações do extrato testado, sendo estes aplicados com pinça estéril sobre o ágar, previamente inoculada com o micro- organismo testado. Para o teste de difusão em disco foram considerados com atividade inibitória a formação de halos. Os halos de inibição do crescimento fúngico foram medidos em milímetros com auxílio de uma régua milimetrada.

O teste de sensibilidade pode ser definido como a resposta *in vitro* de um organismo a um agente antimicrobiano nas concentrações séricas ou teciduais que este agente pode alcançar quando as doses habitualmente prescritas deste agente são utilizadas.

São categorizados em:

- Interpretação ‘Sensível’ do Teste de Sensibilidade Antimicrobiana/Antifúngica: Categoria que implica que a infecção causada por este isolado pode ser tratada apropriadamente com a dosagem de um agente antimicrobiano/antifúngico recomendado para esse tipo de infecção e patógeno, salvo quando de outra forma indicado;
- Categoria de Interpretação ‘Intermediária’ do Teste de Sensibilidade Antimicrobiana/Antifúngica: Categoria que implica que uma infecção causada por este isolado pode ser tratada apropriadamente em locais do corpo, onde as drogas se concentram fisiologicamente ou quando for possível a prescrição de uma dosagem mais alta da droga que a habitual; também indica uma “zona tampão” (buffer zone) que deveria impedir que pequenos fatores técnicos e fora de controle causem grandes discrepâncias na interpretação dos testes;

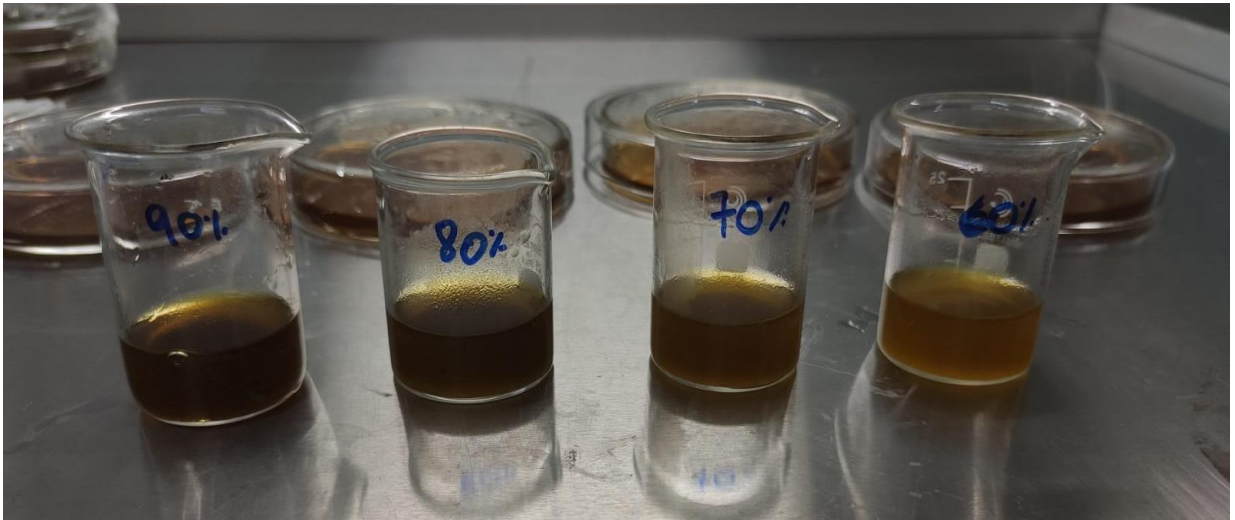
- Categoria de Interpretação ‘Resistente’ do Teste de Sensibilidade Antimicrobiana/Antifúngica: Os isolados considerados resistentes não são inibidos pelas concentrações dos agentes antimicrobianos/antifúngicos normalmente prescritos em tratamentos habituais (frequência e dosagem) e/ou caem na faixa em que a ocorrência de mecanismos de resistência antimicrobiana específicos são mais prováveis (ex., betalactamases), e a eficácia clínica não tem sido confiável em estudos clínicos (Anvisa, 2003).

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Diluição do extrato bruto

O extrato a 90% foi diluído (figura 9) em solução alcoólica, nas concentrações de 60%, 70% e 80%.

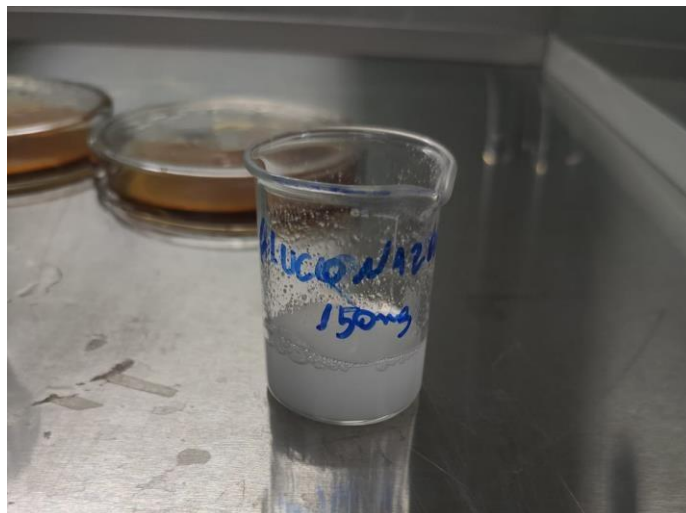
Figura 9: Diluição do extrato bruto de alecrim.



Fonte: Arquivo pessoal.

Foi, também, preparada uma solução alcoólica de fluconazol 150mg, para controle (figura 10).

Figura 10: Diluição do fluconazol.

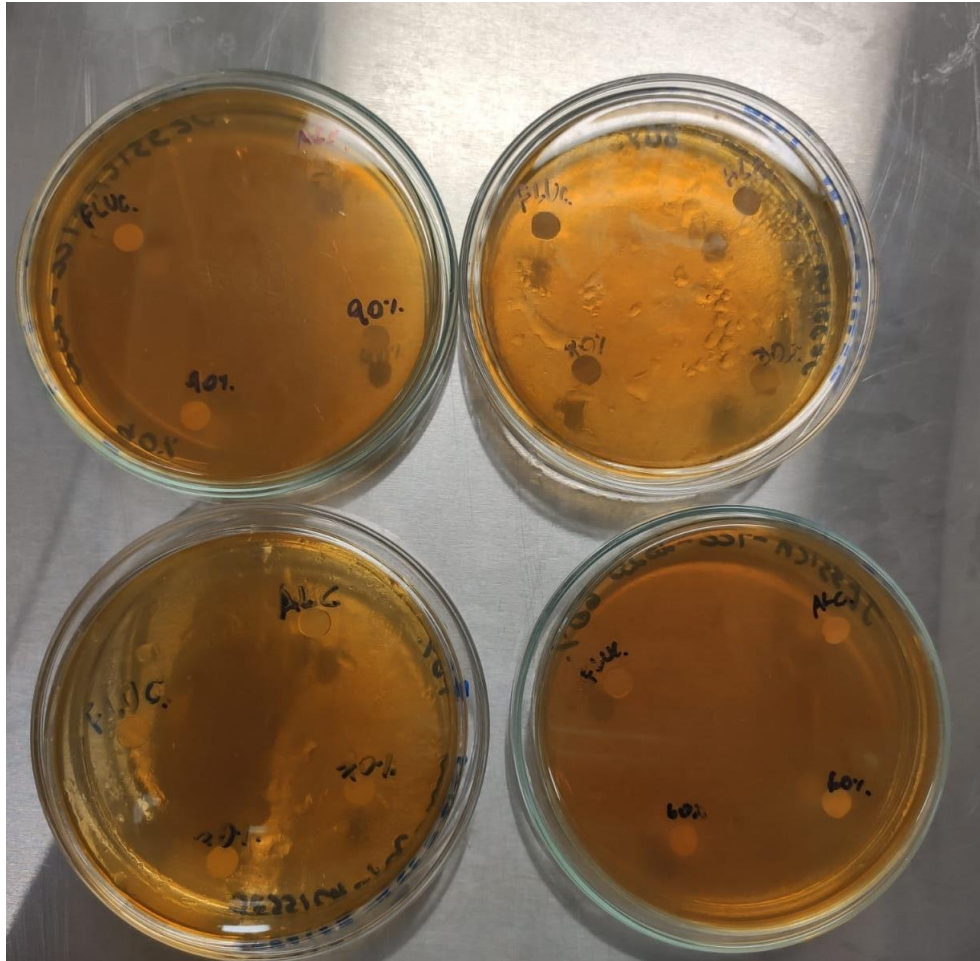


Fonte: Arquivo pessoal

Em placas de petri (figura 11) foram adicionados um disco de fluconazol, um disco de álcool e dois discos de extrato, de cima para baixo respectivamente.

Após os discos de papel filtro autoclavados foram embebidos nas soluções de fluconazol 150 mg, álcool a 70 °GL e cada concentração do extrato, após aplicados nas placas de petri.

Figura 11: Placas de Petri, cada uma contendo as concentrações estipuladas.



Fonte: Arquivo pessoal.

GAUCH, *et al.*, (2014) cultivou as cepas de *C. albicans* em Ágar Sabouraud Dextrose a 37°C por 24h, o óleo essencial foi obtido por destilação a vapor de folhas frescas por 240 minutos pelo sistema Clevenger, os testes foram feitos com óleo essencial puro, gerando grandes halos de inibição que variaram entre 39 a 47 mm, indicando, assim, *R. officinalis* como antifúngico eficaz. Neste mesmo estudo utilizando emulsão de *R. officinalis* na concentração final de 8% com halos de inibição variando de 10 a 13 mm. Este trabalho

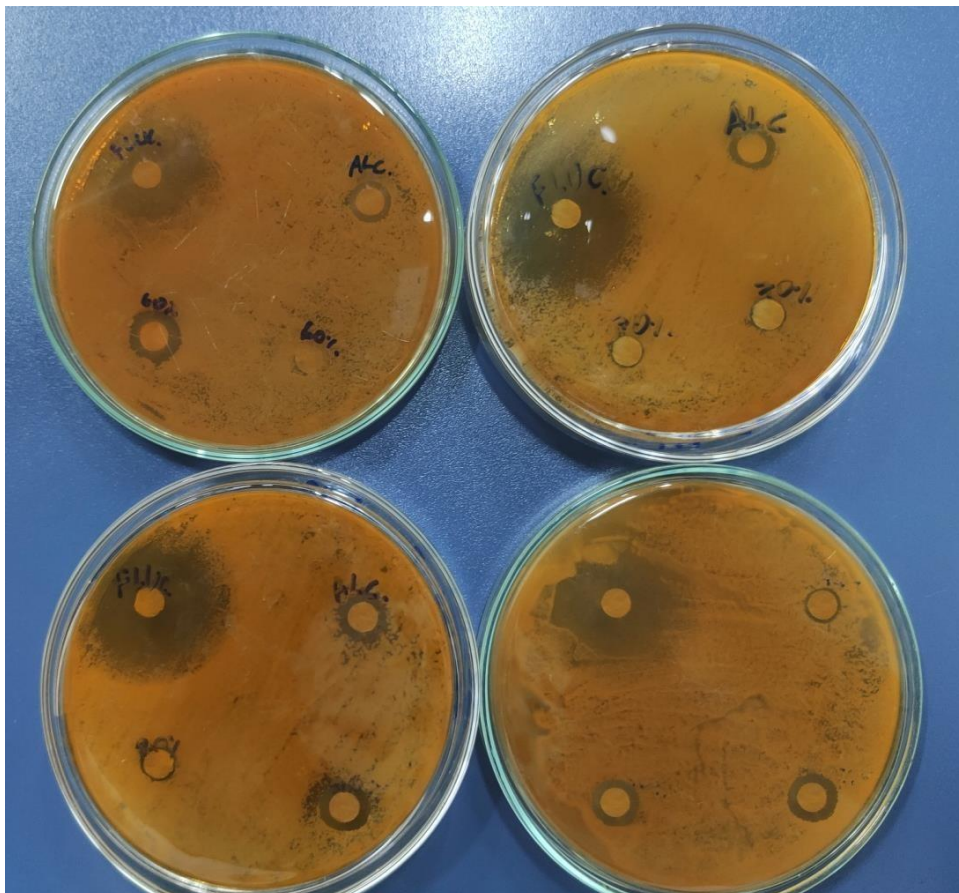
demonstra que o óleo essencial de *R. officinalis* tem potente efeito inibitória e fungicida contra cepas de *C. albicans*.

5.2 Teste do halo

A atividade antibacteriana de *R. officinalis* é comumente estudada (SILVA, *et al.*, 2008; VALONES, 2008; PETERSEN, *et al.*, 2003), mas a atividade antifúngica, não tem técnicas padronizadas para avaliação, com isso são poucos relatos que testaram a atividade de extratos de plantas medicinais contra cepas de *Candida* spp. no entanto, esses estudos muitas vezes apresentam resultados conflitantes, por esta falta de padronização (HOOD, *et al.*, 2003). No presente estudo, o extrato alcoólico demonstrou atividade antifúngica frente à *Candida albicans* formando halos ao redor dos discos como pode ser observado na figura 12.

Os diâmetros das amostras foram medidos e se apresentam na tabela 1.

Figura 12: Placas de petri, teste de sensibilidade.



Fonte: Arquivo pessoal

Halos de inibição foram citados em outros estudos, corroborando com os resultados desta pesquisa. Nascimento, *et al.*, (2000) verificou a susceptibilidade da *C. albicans* frente ao extrato hidroalcoólico de *R. officinalis* L., com halos de inibição ≥ 7 mm, utilizando placas de ágar Mueller-Hinton, com discos de papel filtro saturados (50 μ L) do extrato.

A pesquisa de Packer & Luz (2007) realizada com a metodologia de placa em ágar com orifício - MAPO, obteve efeito fungistático frente a *C. albicans*, com halos de inibição ≥ 60 mm, levando ao entendimento que o óleo de alecrim tem importante papel como antifúngico devido a sua composição química (ANGIONI, *et al.*, 2004).

Tabela 1: Diâmetros de inibição dos extratos alcoólicos medidos em mm, do antifúngico como controle positivo.

Extratos	Placa 60%	Placa 70%	Placa 80%	Placa 90%
Fluconazol 150%	23	26	27	24
Álcool 70GL	9	10	13	9
Disco 1	12	6	7	1
Disco 2	0	7	11	11
Média discos	12	6,5	9	10,5

Fonte: Arquivo pessoal

Lima, *et al.*, (2006) utilizou placas com Ágar Sabouraud Dextrose, neste fez cavidades com cânulas de vidro estéreis (6 mm de diâmetro) onde depositou-se 50 μ L da solução, medindo, após incubação de 24-48h a 35 °C, halo de inibição de 10 mm para a cepa de *C. albicans* ATCC 76615, com uso do óleo essencial do *R. officinalis* L. a 8%

No trabalho de Castro, *et al.*, (2011) foi preparada a diluição do *R. officinalis* L. adicionando 0,4 mL do óleo essencial, 0,04 mL de TWEEN 80 e água destilada estéril q.s.p. 5 mL, a mistura foi mantida sob constante agitação, por cinco minutos, em aparelho Vórtex. As cepas de *C. albicans*, foram semeadas em placas de ágar Sabouraud dextrose incubadas por 24h a 35°C, após observou uma concentração inibitória mínima de 5 mg mL⁻¹.

As condições ambientais, como solo, umidade e temperatura, podem influenciar na atividade antimicrobiana dos óleos essenciais (CELIK TAS, *et al.*, 2007). Porém, como os

óleos avaliados neste estudo foram obtidos em estabelecimento comercial, não se conhece as reais condições de coleta e processamento do material botânico, indicando, assim a necessidade de realização de novos estudos.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados obtidos permitem concluir que o alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) apresenta atividade inibitória *in vitro* sobre as cepas de *C. albicans*. É possível atribuir a formação dos halos de inibição à presença dos metabólitos secundários presentes na espécie

R. officinalis L. Porém, outras pesquisas devem ser realizadas para confirmar a ação da planta no combate a outros tipos de microrganismos, e um número maior e mais representativo de cepas, isolado de diversos pacientes e ambientes, devem ser testados em futuros trabalhos. Além disso, seria interessante realizar a separação dos constituintes da planta por meio de cromatografia, e testar a ação antifúngica de cada constituinte.

REFERÊNCIAS

AFONSO, M. S.; SANT´ANA, L. S.; MANCINI-FILHO, J. **Interação entre antioxidantes naturais e espécies reativas de oxigênio nas doenças cardiovasculares: perspectivas para a contribuição do alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.)**. Nutrire, v. 35, n. 1, p.129-148, 2010. Disponível em: <http://sban.cloudpainel.com.br/files/revistas_publicacoes/277.pdf>

AHMAD M. AL-THOBITY, *et al.*, **In Vitro Evaluation of the Inhibitory Activity of Thymoquinone in Combatting *Candida albicans* in Denture Stomatitis Prevention**. Int. J. Environ. Res. Public Health 2017, 14, 743; doi:10.3390/ijerph14070743. Available from <https://www.researchgate.net/figure/Cultures-of-Candida-albicans-colonies-based-on-different-concentrations-of-thymoquinone_fig1_318336650>. access on 21 Aug. 2020.

ANGIONI A, B. A, CERETI E, BARILE D, COÏSSON JD, ARLORIO M, D, CORONEO V, CABRAS P. **Chemical composition, plant genetic differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L.** *J Agric Food Chem* 52: 3530-3532. 2004.

ANVISA. **AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA**. Detecção e Identificação dos Fungos de Importância Médica. Módulo VII. 2004. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/microbiologia/mod_7_2004.pdf> Acesso em: 21/09/2020.

ANVISA. **AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA**. Norma Aprovada - M2-A8, vol.23, nº1, Janeiro 2003. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/clsi/clsi_opasm2-a8.pdf> Acesso em: 18/09/2020.

AVILA, K. L. *et al.*, . **Mecanismos de resistencia antifúngica de los azoles en *Candida albicans*. Una revisión**. Rev. biomédica, Mérida , v. 27, n. 3, p. 127-136, dic. 2016 . Disponível em: <http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-84472016000300127&lng=es&nrm=iso>. Acesso em: 23 jun. 2020.

BARBEDO, L. SGARBI, D. **Candidiasis**. J Bras Doenças Sex Transm. 2010. 22. 22-38.

BARRETO, H.M. *et al.* **Chemical composition and possible use as adjuvant of the antibiotictherapy of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L.** *Industrial Crops and Products*, 59, 290-294.

BARRÓN R, GARCÍA R, SOTO M, COLINAS T, KITE G. . **Flavonoides y actividad antioxidante de *Calia secundiflora* (Ort.) Yakovlev**. 2011. *Revista Mexicana de Fitogenética*, 34(3):151-157.

BELLESTER I, CAMUESCO D, GÁLVEZ J, SÁNCHEZ DE MEDINA F, ZARSUELO A. **Flavonoides y enfermedad inflamatoria intestinal**. *Ars PHárm*, 2006. 47(1):5-21.

BERGOLD, A. M.; GEORGIADIS, S. **Novidades em fármacos antifúngicos: uma revisão**. *Visão Acadêmica*, Curitiba, v. 5, n. 2, p. 159 -172, Jul.- Dez./2004 - ISSN: 1518-5192

BERETTA, G., ARTALI, R., FACINO, M.R., GELMINI, F. **An analytical and theoretical approach for the profiling of the antioxidant activity of essential oils: The case of *Rosmarinus officinalis L.*** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 55, 1255-1264. 2011.

BRAVO L. **Poliphenol: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance**. *Nutr Ver*. 1998. 56 (11): 317-333.

CARDOSO, B. **Produção de biofilme e perfil de suscetibilidade a antifúngicos de isolados de *Candida spp.* em episódios de candidemia no Hospital das Clínicas da FMRP-USP**. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP. 2017. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60135/tde-25082017-104749/publico/Dissertacao_corrigida.pdf> Acesso em: 01. Jul. 2020

CARPER, J. **Curas Milagrosas: descobertas científicas que revelam o poder de cura das ervas, vitaminas e de outros remédios naturais**. 2 ed. Rio de Janeiro: Campus, 1998.

CARTAYA O, REYNALDO I. **Flavonoides: Características químicas y aplicaciones**. *Cultivos Tropicales*, 2001, 22(2):5-14.

CARVALHO, R, J, V de. *et al.,. IgA, IgE e subclasses de IgG anti-*Candida albicans* no soro e lavado vaginal de pacientes com candidíase vulvovaginal*. *Rev. Assoc. Med. Bras.* São Paulo , v. 49, n. 4, p. 434-438, 2003 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-42302003000400037&lng=en&nrm=iso>. access on 24 Mar. 2020. <https://doi.org/10.1590/S0104-42302003000400037>.

CASSEL, E. *et al.* **Steam distillation modeling for essential oil extraction process**. *Industrial Crops and Products*, Amsterdam, v. 29, p.171-176, 2009

CASTRO, R.D; LIMA, E.O. **Atividade antifúngica dos óleos essenciais de sassafrás (*Ocotea odorifera Vell.*) e alecrim (*Rosmarinus officinalis L.*) sobre o gênero *Candida*** . *Rev. bras. plantas med., Botucatu* , v. 13, n. 2, p. 203-208, 2011 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722011000200012&lng=en&nrm=iso>. access on 09 Mar. 2020.

CATALÁN M, MONTEJO J. **Antifúngicos sistêmicos. Farmacodinâmica e farmacocinética.** Rev Iberoam Micol. Outubro de 2006; 23: 39-49.

CELIK TAS, O.Y. *et al.*. **Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations.** Food Chemistry, v.1, n.100, p.553-9, 2007.

CHIOCCHIO V, MATKOVIĆ L. **Determinação de ergosterol em fungos celulares por HPLC, uma técnica modificada.** J. Argent. Chem. Soc. 2011 jul; 98: 10-15. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/profile/Laura_Matkovic/publication/267422208_Determination_of_ergosterol_in_cellular_fungi_by_HPLC_A_modified_technique/links/54902b000cf2d1800d8646c9/Determination-of-ergosterol-in-cellular-fungi-by-HPLC-A-modified-technique.pdf>> acesso em: 04. Mai. 2020

CORRÊA, M.P. **Dicionário das plantas úteis e exóticas cultivadas.** 6 vol. Rio de Janeiro: Editora Imprensa Nacional e Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1984.

COWEN L, SANGLARD D, HOWARD S, ROGERS D, PERLIN D. **Mechanisms of Antifungal Drug Resistance** Cold Spring Harb Perspect Med. 2014 novembro; 4 (11): 1-22. <<http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/content/5/7/a019752.full.pdf+html>>

DEBNATH S, ADDYA S. **Structural basis for heterogeneous phenotype of ERG 11 dependent Azole resistance in *C. albicans* clinical isolates.** Springerplus. 2014 nov; 6(3): 660. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1186/2193-1801-3-660>> Acesso em: 23. Jun. 2020

EL-AZIZI M, FARAG N, KHARDORI N. **Antifungal activity of amphotericin B and voriconazole against the biofilms and biofilm-dispersed cells of *Candida albicans* employing a newly developed in vitro pharmacokinetic model.** Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2015;4(1):14-21. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4389768/>> Acesso em: 30. Jun. 2020.

ESCOBAR C, ZULUAGA A. **Novos antifúngicos e seu uso em dermatologia.** Med Cutan Iber Lat Am. 2004 dez; 32 (6): 231-242. <<https://www.medigraphic.com/pdfs/cutanea/mc-2004/mc046b.pdf>>

ÉVORA. L. N. P. **Actividades biológicas e citotoxicidade do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L.** Univ. de Coimbra. Set. 2015. Disponível em: <<https://eg.uc.pt/bitstream/10316/30998/1/Tese%20Leisa%20Evora.pdf>> Acesso em: 10. Mar. 2020.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 6ª edição. Volume 1. Brasília. 2019. Disponível em <<http://portal.anvisa.gov.br/farmacopeia-brasileira>> Acesso em 23. Ago. 2020

FERRARI, G.N.; SUGUINO, E.; MARTINS, A.N.; MELLO, S.C.; MINAMI, K. **Alecrim** (*Rosmarinus officinalis L.*). Piracicaba: ESALQ, 2011. 33p. (Série Produtor Rural, 49)

FREIRE; de M. L, SOUTO. A.F.J. ; DRESCH, R. R. **Farmacognosia pura**. SAGAH. Grupo educação A. São Paulo. 2018. Disponível em:

<<https://viewer.bibliotecaa.binpar.com/viewer/9788595027527-1/211>>

FRESCURA. D.V. *et al.*,. **Compostos fenólicos em extratos de *Rosmarinus officinalis L.* sob cultivo fora do solo**. ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.9, n.17; p.760 2013

(<http://www.conhecer.org.br/enciclop/2013b/CIENCIAS%20AGRARIAS/COMPOSTOS%20FENOLICOS.pdf>)

FUMAGALI, E. *et al.*,. **Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: o exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma***. Rev. bras. farmacogn., João Pessoa , v. 18, n. 4, p. 627-641, Dec. 2008 . Available from

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2008000400022&lng=en&nrm=iso>. access on 09 Mar. 2020.

GAMBALE, V. **Antifúngicos**. USP FMJ. São Paulo. 2011. Disponível em:

<<https://pt.slideshare.net/dapab/antifngicos>> Acesso em: 29. Mai. 2020

GAUCH, L. M. R. *et al.* **Antifungal activity of *Rosmarinus officinalis* Linn. essential oil against *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, *Candida parapsilosis* and *Candida krusei***. Rev Pan-Amaz Saude, Ananindeua , v. 5, n. 1, p. 61-66, mar. 2014 . Disponível

em <http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2176-62232014000100007&lng=pt&nrm=iso>. acessos em 08 nov. 2020.

GIOLO, M. P. *et al.* **Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia**. J. Bras. Patol. Med. Lab. Rio de Janeiro, v. 46, n. 3, p. 225-234, junho de 2010. Disponível em

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1676-24442010000300009&lng=en&nrm=iso>. acesso em 21 de abril de 2020. <https://doi.org/10.1590/S1676-24442010000300009> .

GONZÁLEZ N, SALTIGERAL P. **Guia Antimicrobiano, Antiviral, Antiparasitário, Antifúngico e Imunomodulador**. 7ª edição. 2006. México. Editora nieto. 385p.

GOOSSENS A, *et al.*,. **A functional genomics approach toward the understanding of secondary metabolism in plant cells**. Proc Natl Acad Sci USA, 100:8595-8600. 2003.

GRASSI, I. **Saúde verde**. Revista família Cristã. 10. Ago. 2018. Disponível em <https://www.paulinas.org.br/pub/familia_crista/Saude/2018/Fevereiro%202016/Irene%20Grassi.jpg> Acesso em: 02. Nov. 2020

HILAL-DANDAN, RANDA; BRUNTON, LAURENCE. **Manual de Farmacologia e Terapêutica de Goodman & Gilman**. Port. Transl. 2015, AMGH Editora Ltda., a Grupo A Educação S.A. company. 2ª edição. Capítulo 57. Disponível em: <https://viewer.biblioteca.binpar.com/viewer/9788580555066/x57>> Acesso em: 01. Jul. 2020

HOOD JR, WILKINSON JM, CAVANAGH HMA. **Evaluation of common antibacterial screening methods utilized in essential oil research**. J Essent Oil Res. Nov-Dez 2003; 15 (6): 428-33.

JALALI-HERAVI, M., MOAZENI, R.S. SERESHTI H. **Analysis of Iranian rosemary essential oil: application of gas chromatography- mass spectrometry combined with chemometrics**. Journal Chromatography, 12 (18), 2569-2576. 2011.

JIANG, Y., *et al.*,. **Chemicals composition and antimicrobial activity of essencial oil of Rosemary**. Environ. Toxicol. PHárm., 32, 63-68. 2011.

KIRAN, S., PRAKASH, B. **Toxicity and biochemical efficacy of chemically cHáriterized *Rosmarinus officinalis* essencial oil against *Sitophilus oryzae* and *Oryzaephilus surinamensis***. Industrial Crops and Products, 74, 817-823. 2015.

LACAZ CS, PORTO E, MARTINS JEC, HEINS-VACCARI EM, M. NT. **Tratado de Micologia Médica**. Lacaz. 9.ed. Brasil: Sarvier; 2002. 1120 p.

LIMA, I.O. *et al.*,. **Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida***. Revista Brasileira de Farmacognosia, v.16, n.2, p.197-201,2006.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda. Nova Odessa, SP, 2002, 512 p.

LUISA R. A. CARMITA J. J. MAIRIN L. B. **Métodos Analíticos para la Determinación de Metabolitos Secundarios de Plantas**. Universidad Técnica de MacHála. 2015.

MACHÁDO, A.C; VARGAS, R.F.J. **Plantas medicinais do jardim botânico de Porto Alegre**. Porto Alegre – RS, 2018.
(<https://saude.rs.gov.br/upload/arquivos/carga20190154/17115411-e-book-plantas-medicinais.pdf>)

MARCHIORI. F.V. ***Rosmarinus officinalis***. Monografia de Conclusão do Curso. Fundação Herbarium Associação Argentina de Fitomedicina. Julho. 2004.
(http://fitomedicina.org/old/archivos/rosmarinus_officinalis_romero_monografia.pdf)

MARTINEZ M, PERES N, ROSSI A. **Mecanismos de resistência antifúngica em dermatófitos.** *Micopatologia*. 2008; 166: 369-383. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s11046-008-9110-7>> acesso em: 04. Mai. 2020

MARTINEZ, R. **Atualização no uso de agentes antifúngicos.** *J. bras. pneumol.*, São Paulo , v. 32, n. 5, p. 449-460, Oct. 2006 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-37132006000500013&lng=en&nrm=iso>. access on 03 May 2020. <http://dx.doi.org/10.1590/S1806-37132006000500013>.

MAY, A *et al.* **Produção de biomassa e óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) em função da altura e intervalo entre cortes.** *Rev. bras. plantas med., Botucatu* , v. 12, n. 2, p. 195-200, jun. 2010 .

MELLADO E, CUENCA M, RODRÍGUEZ J. **Importância clínica dos mecanismos de resistência dos fungos filamentosos aos antifúngicos.** *Enferm Infecc Microbiol Clin*. Julho de 2002; 20 (10): 523-530

MELLO, T.P. *et al.*. **Assessment of biofilm formation by *Scedosporium apiospermum* , *S. Scedosporium apiospermum* , *S.aurantiacum* , *S. minutisporum* e *Lomentospora prolificans* .** *Biofouling* . v.32, n.7,p.737-749, 2016. doi: 10.1080/08927014.2016.1192610 Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27309801/>> Acesso em 01. Jul. 2020.

MENEZES EA, *et a.*. **Frequência e atividade enzimática de *Candida albicans* isoladas da mucosa bucal de crianças de uma creche da prefeitura de fortaleza.** *J Bras Patol Med Lab* 2005; 41(1): 9-13.

MONTEIRO, S da C.; BRANDELLI, C. L. C. (Org). **Farmacobotanica: aspectos teóricos e aplicação.** Porto Alegre. Artmed, 2018.

MORAES, A, M, L, de., PAES, R, A., HOLANDA, V, L. **Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde.** Editora FIOCRUZ v. 4, p. 399 – 496, 2009.

MORAIS L,A,S de. **Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais.** *Horticultura Brasileira* 27: S4050- S4063. 2009. Disponível em <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/577686/1/2009AA051.pdf>> Acesso em 23. Ago. 2020

MOTA, A. J., NOBREGA F. G. da. **indução do pleomorfismo de *Candida albicans* por soro fetal bovino.** Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento. Universidade do Vale do Paraíba. São José dos Campos-SP. http://www.inicepg.univap.br/cd/INIC_2005/inic/IC2%20anais/IC2-21.pdf

NASCIMENTO, G. G. F. *et al.*, . **Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria.** Braz. J. Microbiol., São Paulo , v. 31, n. 4, p. 247-256, Oct. 2000 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822000000400003&lng=en&nrm=iso>. access on 16 Sept. 2020.

OJEDA-SANA AM, VAN BAREN CM, ELECHOSA MA, JUA´ REZ MA, MORENO S. **New insights into antibacterial and antioxidant activities of rosemary essential oils and their main components.** Food Control, 2013, 31:189-195.

OLIVEIRA, L.B.S. *et al.*, . Atividade antifúngica e possível mecanismo de ação do óleo essencial de folhas de *Ocimum gratissimum* (Linn.) sobre espécies de *Candida*. **Rev. bras. plantas med.**, Botucatu , v. 18, n. 2, p. 511-523, June 2016 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722016000200511&lng=en&nrm=iso>. access on 21 Aug. 2020

ORTIGOZA E, ARROYO D. **Susceptibilidade in vitro de espécies de *Candida* a antifúngicos no Hospital Especializado do Centro Médico Nacional do Oeste.** Med Int Mex. 2014 ago; 30 (40): 373-380.

PACKER, J. F.; LUZ, M. M.S. da. **Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural.** Rev. bras. farmacogn., João Pessoa , v. 17, n. 1, p. 102-107, Mar. 2007 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2007000100019&lng=en&nrm=iso>. access on 16 Sept. 2020.

PÉREZ-ALONSO N, JIMÉNEZ E. **Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo in vitro.** Biotecnología Vegetal, 11(4):195-211. 2011.

PETERSEN M, SIMMONDS M.S.J. **Rosmarinic acid.** *Phytochemistry*. 2003 Jan;62(2):121-5. Doi:10.1016/S0031-9422(02)00513-7

PRASSAD R, GOFFEAU A. **Yeast ATP-Binding Cassette Transporters Conferring Multidrug Resistance.** Annu. Rev. Microbiol. 2012 Jun; 66:39-63. Disponível em: <<https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-micro-092611-150111>> Acesso em: 23. Jun. 2020

RAŠKOVIĆ, A., MILANOVIĆ, I., PAVLOVIĆ, N., ČEBOVIĆ, T., VUKMIROVIĆ, S. AND MIKOV, M. **Antioxidant activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oil and its hepatoprotective potential.** BMC. Complementary & Alternative Medicine, 14, 1-9. 2014.

SAAD, G. A. *et al.*,. **Fitoterapia contemporânea: tradição e ciência na prática clínica.** 2^a Ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2016.

SHILPA, K, VARUN K, LAKSHMI BS. **An alternate method of natural drug production: Eliciting secondary metabolite production using plant cell culture.** J Plant Sci 5:222-247. 2010.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHÁ, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 21, 266.

SILVA M.S.A, SILVA M.A.R, HIGINO J.S, PEREIRA M.S.V, CARVALHO A.A.T. **Atividade antimicrobiana e antiaderente *in vitro* do extrato de *Rosmarinus officinalis* Linn. sobre bactérias orais planctônicas.** Rev Bras Farmacogn. 2008 abr-jun;18(2):236-40.

SIMÕES, C. M. O. *et al.,.* (Org). **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento.** Porto Alegre. Artmed, 2017.

(https://viewer.biblioteca.binpar.com/viewer/9788582713655/Capitulo_11.xhtml)

SOUZA, G. H.B.; MELLO, J. C. P.; LOPES, N.P. (Org.). **Farmacognosia: coletânea científica.** Ouro Preto: UFOP, 2011.

SUDBERY P, GOW N, BERMAN J. **The distinct morphogenic states of *Candida albicans*.** Trends Microbiol 2004; 12(7): 313-324

TAVASSOLI, S.K., MOUSAVI, S.M., EMAM-DJOMEH, Z., RAZAVI, S.H. **Chemical composition and antimicrobial properties of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil.** Afr. J. Biotechnol, 10, 13895-13899. 2011.

TSIMIDOU M. **Polyphenols and quality of virgin olive oil in retrospect.** Ital J. Food Sci, 1998. 2(10): 99-116.

TURAN, H; DEMIRBILEK, M. **Biofilm-forming capacity of blood-borne *Candida albicans* strains and effects of antifungal agents.** Rev. argent. microbiol., Buenos Aires, v. 50, n. 1, p. 62-69. mar. 2018. Disponível em:
<http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S032575412018000100010&lng=es&nrm=iso> Acesso em 23 jun. 2020.

VALENZUELA A, VALENZUELA R, SANHUEZA J, MORALES G. **Alimentos funcionales, nutraceuticos y foshu: ¿Vamos Hacia un nuevo concepto de alimentación?.** Revista chilena de nutrición, 41(2):198-204. 2014.

VALONES M.A.A. **Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* do dentifrício à base de extrato alcoólico de *Rosmarinus officinalis* Linn (Alecrim) sobre cepas padrão de *S. mutans*, *S. aureus* e *L. casei* [dissertação].** Recife (PE): Universidade Federal de Pernambuco; 2008.

VANDEPUTTE P, FERRARI S, COSTE AT. **Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections.** Int J Microbiol. 2012;2012:713687.

VAZ. A.P.A. *et al.*,. **Série plantas medicinais condimentares e aromáticas.** EMBRAPA. Corumbá- MS. 2006.
(<http://www.almanaquedocampo.com.br/imagens/files/Alecrim%20embrapa%20folder.pdf>).

VILLAR, F.. **Farmacognosia general.** 2ª edição. 2009. Madri. Editora síntesis. 293 pp.

YUNES R. A., PEDROSA R. C., CECHINEL. F. V. **Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil.** Quimica Nova 2001; 24(1):147-152.