



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE EDUCAÇÃO E SAÚDE
UNIDADE ACADÊMICA DE SAÚDE
CURSO DE BACHARELADO EM FARMÁCIA

JEFFERSON RODRIGUES NÓBREGA

ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE O CARVACROL E ANTIFÚNGICOS CONTRA
ESPÉCIES DE *Candida não-albicans*

CUITÉ - PB

2016

JEFFERSON RODRIGUES NÓBREGA

**ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE O CARVACROL E ANTIFÚNGICOS CONTRA
ESPÉCIES DE *Candida não-albicans***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Farmácia da Universidade Federal de Campina Grande - Campus Cuité, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel.

Orientador: Prof. Dr. Wylly Araújo de Oliveira

CUITÉ - PB

2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA NA FONTE
Responsabilidade Msc. Jesiel Ferreira Gomes – CRB 15 – 256

N754e Nóbrega, Jefferson Rodrigues.

Estudo da associação entre o carvacrol e antifúngicos contra espécies de *Candida não-albicans*. / Jefferson Rodrigues Nóbrega. – Cuité: CES, 2016.

50 fl.

Monografia (Curso de Graduação em Farmácia) – Centro de Educação e Saúde / UFCG, 2016.

Orientador: Wylly Araújo de Oliveira.

1. *Candida* spp. 2. Carvacrol. 3. Microdiluição. I. Título.

Biblioteca do CES - UFCG

CDU 615.281.9

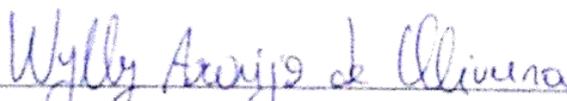
JEFFERSON RODRIGUES NÓBREGA

ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE O CARVACROL E ANTIFÚNGICOS CONTRA
ESPÉCIES DE *Candida não-albicans*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Curso de Bacharelado em Farmácia da
Universidade Federal de Campina Grande -
Campus Cuité, como requisito parcial para
obtenção do título de Bacharel.

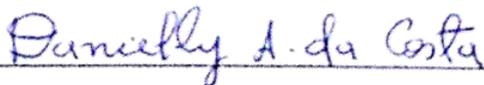
APROVADO EM: 19 / 07 / 2016

BANCA EXAMINADORA



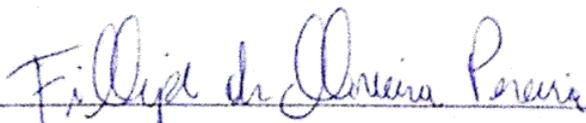
Prof. Dr. Wylly Araújo de Oliveira

Orientador/UAS/CES/UFCG



Prof.ª Dr.ª Danielly Albuquerque da Costa

Membro/UAS/CES/UFCG



Prof. Dr. Fillipe de Oliveira Pereira

Membro/UAS/CES/UFCG

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à minha família por tornar este trabalho possível. Principalmente, aos meus amáveis pais, João Josias da Nóbrega Filho e Giovana de Oliveira Rodrigues, que são alicerces e fundamental fonte de luta em minha vida, por toda força e ajuda durante todas as fases do meu crescimento.

Ao meu grande irmão e à minha sobrinha, Jackson e Heloisa, que apesar da distância sempre me ajudaram a conquistar os melhores momentos que vivi na faculdade. Agradeço pelo companheirismo e afeto constantes.

Ao meu orientador, Wylly Araújo de Oliveira, que me inspira e tenho o maior respeito, por ter concedido o prazer da sua ajuda, de sua amizade, dos seus conselhos indispensáveis como também por sua calma e paciência durante toda orientação e vida acadêmica.

À minha namorada e companheira de todas as horas, Paula Mariane, pelo constante incentivo e pela ajuda nas horas difíceis. Agradeço por ser a responsável pelas maiores mudanças na minha vida e por ser a pessoa mais presente ao meu lado. Minha fonte de esperança, prosperidade e conquistas.

Aos meus colegas de classe, em especial aos meus amigos Edileuza, Glaucianne, Ana Laura e Kayo que sempre estiveram ao meu lado tornando as aulas menos cansativas e as noites em claro mais animadas.

Também aos meus melhores amigos Jéssica, João Antônio, Roberto e Sarah Rebeca que sempre se preocuparam e ajudaram na medida do possível. Em especial a minha amiga Luana, que não se encontra mais presente neste mundo, mas que tenho certeza que de onde estiver ela me abençoa e ilumina em todas minhas ações.

A todos os professores do curso, que foram tão importantes na minha vida acadêmica e que deram as melhores oportunidades de aprendizado, conhecimento e conselhos. Assim como os técnicos e funcionários do Centro de Educação e Saúde pela grande ajuda, esforço e desenvolvimento profissional para com os alunos.

A todos que de alguma forma contribuíram com este trabalho, o meu muito obrigado!

“Se, na verdade, não estou no mundo para simplesmente a ele me adaptar, mas para transformá-lo; se não é possível muda-lo sem um certo sonho ou projeto de mundo, devo usar toda possibilidade que tenha para não apenas falar de minha utopia, mas participar de práticas com ela coerentes.”

(Paulo Freire)

RESUMO

O aumento na incidência de infecções fúngicas por *Candida spp.*, o surgimento de cepas resistentes aos antifúngicos como também o pequeno número de fármacos disponíveis, torna crescente a necessidade da busca de novas substâncias bioativas. Óleos essenciais e seus fitoconstituintes têm sido testados contra fungos e mostraram possuir potencial atividade antifúngica. A combinação de substâncias antimicrobianas pode traçar estratégias benéficas de combate a infecções, buscando promover uma maior efetividade no tratamento, além de permitir a utilização de concentrações menores de cada fármaco, ou ainda aumentando os espectros de ação e prevenindo organismos resistentes. O objetivo deste trabalho foi avaliar a associação entre o carvacrol e o fluconazol, cetoconazol e anfotericina B contra cepas de *C. não albicans*. Para tal, a concentração inibitória mínima (CIM) do carvacrol, fluconazol, cetoconazol e anfotericina B frente a *C. não-albicans* também foi investigada. A CIM foi determinada pelo método de microdiluição e o estudo da associação foi realizado por *Checkerboard*. O carvacrol mostrou atividade antifúngica significativa e as CIM's variaram entre 512 e 128 µg/mL contra as cepas ensaiadas. Os antifúngicos mostraram um padrão de atividade interessante, onde a maior atividade apresentada foi a do cetoconazol, diferentemente, o fluconazol apresentou menor atividade antifúngica contra as cepas testadas. Já a anfotericina B apresentou CIM's que variaram entre 0,5 e 2 µg/mL. As melhores combinações foram observadas contra *C. guilliermondii* LM-103 e *C. parapsilosis* ATCC 22019, que apresentaram efeitos sinérgicos. Efeito aditivo foi observado em três associações, enquanto que interação indiferente foi mostrada em seis associações. O carvacrol mostrou atividade antifúngica e a associação entre o fitoconstituente e os antifúngicos apresentaram resultados sinérgicos, aditivos e indiferentes. No entanto, efeito antagônico não foi evidenciado neste trabalho.

Palavras-chave: *Candida spp.*. Carvacrol. Microdiluição. *Checkerboard*.

ABSTRACT

The increase in the incidence of fungal infections caused by *Candida spp.*, emergence of resistant strains to antifungal agents as well as the small number of available drugs, makes growing the need for new bioactive drugs. Essential oils and phytochemicals have been tested against fungi and shown to have potential antifungal activity. The association of antimicrobial substances can trace beneficial strategies to combat infections, seeking to promote greater effectiveness in the treatment, besides allowing the use of lower concentrations of each drug, or increasing the spectra of action and prevent resistant organisms. The objective of this study was to evaluate the association between carvacrol and fluconazole, ketoconazole and amphotericin B against *C. non-albicans* strains. For this purpose, the minimum inhibitory concentration (MIC) of carvacrol, fluconazole, ketoconazole and amphotericin B against *C. non-albicans* was also investigated. The MIC it was determined by microdilution method and the study of association it was conducted by the Checkerboard. The carvacrol showed significant antifungal activity and the MIC varied between 512 and 128 $\mu\text{g/mL}$ against the strains of tested. The antifungals showed interesting activity pattern, where the greatest activity was shown to ketoconazole, otherwise, the fluconazole showed lower antifungal activity against strains tested. Already the amphotericin B showed MIC's ranging from 0.5 to 2 $\mu\text{g/mL}$. The best interactions were observed against *C. guilliermondii* LM-103 and *C. parapsilosis* ATCC 22019, what presented synergistic effects. Additive effect was observed in three associations, while indifereente interaction was shown in six associations. The carvacrol showed antifungal activity and the association between fitoconstituente and antifungal agents showed synergistic results, additives and indifferent. However, antagonistic effect was not observed in this study.

Keywords: *Candida spp.*. Carvacrol. Microdilution. Checkerboard.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Alvos moleculares das diferentes classes/fármacos antifúngicos	16
Figura 2 - Diferenças estruturais entre o ergosterol (A) e o colesterol (B)	17
Figura 3 - Derivados terpênicos presentes em diversos óleos essenciais	19
Figura 4 - Esquema ilustrativo da preparação do inóculo	24
Figura 5 - Esquema ilustrativo da determinação da CIM	25
Figura 6 - Diluições das substâncias a serem testadas em diversas concentrações	26
Figura 7 - Método <i>Checkerboard</i>	27

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Concentração inibitória mínima (CIM) do carvacrol contra espécies de *C. não-albicans* 29
- Tabela 2** - Concentração inibitória mínima (CIM) dos antifúngicos contra espécies de *C. não-albicans* 31
- Tabela 3** - Índice da concentração inibitória fracionada (ICIF) da associação entre o carvacrol e os antifúngicos contra espécies de *C. não-albicans* 33

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ASD	Ágar Sabouraud Dextrose
ATCC	American Type Culture Collection
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
RNA	Ácido Ribonucleico
CIF	Concentração Inibitória Fracionada
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CSD	Caldo Sabouraud Dextrose
CTT	Cloreto de 2,3,5-Trifeniltetrazólio
DMSO	Dimetilsulfóxido
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
°C	Graus Celsius
h	Horas
ICIF	Índice da Concentração Inibitória Fracionada
LM	Laboratório de Micologia
µg	Micrograma
µg/mL	Micrograma por Mililitro
µL	Microlitro
OMS	Organização Mundial de Saúde
%	Percentual
UFCG	Universidade Federal de Campina Grande
UFC/mL	Unidades Formadoras de Colônias por Mililitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REFERENCIAL TEÓRICO	13
3 OBJETIVOS	22
3.1 Objetivo geral	22
3.2 Objetivos específicos	22
4 METODOLOGIA	23
4.1 Local do estudo	23
4.2 Meios de cultura	23
4.3 Cepas fúngicas	23
4.4 Preparação da emulsão do carvacrol	23
4.5 Antifúngicos	23
4.6 Preparação do inóculo	24
4.7 Determinação da concentração inibitória mínima	24
4.8 Método <i>Checkerboard</i>	26
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do carvacrol	28
5.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos antifúngicos	30
5.3 Determinação do índice da concentração inibitória fracionada (ICIF) da associação entre os antifúngicos e o carvacrol pelo método de <i>Checkerboard</i>	33
6 CONCLUSÕES	37
REFERÊNCIAS	38

1 INTRODUÇÃO

A incidência e prevalência de infecções fúngicas têm aumentado desde a década de 1980, especialmente na grande população de pacientes imunocomprometidos e/ou aqueles hospitalizados com doenças subjacentes graves (ARENDRUP et al., 2005; MICELI; D'IAZ; LEE, 2011). Leveduras do gênero *Candida* são consideradas microrganismos oportunistas presentes na microbiota normal da cavidade oral, nos tratos gastrointestinal e urogenital de seres humanos, que podem torna-se patogênicas quando ocorre comprometimento do sistema de defesa do hospedeiro (ENDO et al., 2010).

Os efeitos antifúngicos causados pelos fármacos polienos e azólicos se dão em razão da atividade sobre a membrana celular fúngica, enquanto que as equinocandinas atuam por perturbar a formação da parede celular dos fungos, já a flucitosina e a griseofulvina atuam como um antimitótico, interferindo na síntese de ácido desoxirribonucleico (DNA) e ácido ribonucleico (RNA) (PEMAN; CANTON; ESPINEL-INGROFF, 2009). O aumento da resistência dos microrganismos e a toxicidade existente dos antifúngicos, como também o pequeno número de fármacos disponíveis para o tratamento de infecções fúngicas, têm chamado a atenção para a busca de compostos com atividades antimicrobianas oriundos principalmente de produtos naturais, que sejam mais efetivos no tratamento desses tipos de infecções (SILVA et al., 2012; SARDI et al., 2013).

Os estudos de produtos naturais como uma alternativa a descoberta de medicamentos têm atraído grande atenção, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) as plantas têm sido utilizadas na medicina por um longo período de tempo, representando uma ótima alternativa econômica, por estarem acessíveis e por poderem ser aplicadas a diversas patologias, sendo possivelmente as melhores fontes para a obtenção de uma grande variedade de fármacos (CRUZ et al., 2007; SARDI; ALMEIDA; MENDES-GIANNINI, 2011).

A combinação racional de substâncias antimicrobianas pode traçar estratégias benéficas de combate a infecções causadas por organismos pouco sensíveis às terapias convencionais. A combinação de antimicrobianos busca promover uma maior efetividade no tratamento, além de permitir a utilização de concentrações menores de cada fármaco, ou ainda aumentando os espectros de ação e prevenindo organismos resistentes. A associação de antibióticos é realizada com base na susceptibilidade microbiana, pois a potencialização do efeito antimicrobiano é usualmente obtida tanto em amostras sensíveis quanto em amostras resistentes aos agentes testados (DRAGO et al., 2007; MITSUGUI et al., 2008).

Com isso, busca-se através desse trabalho avaliar a atividade antifúngica da combinação do carvacrol com o fluconazol, cetoconazol ou anfotericina B contra cepas de *C. não-albicans* através da técnica de *Checkerboard*, uma técnica de diluição em caldo que visa determinar o índice da concentração inibitória fracionada (ICIF) correspondente da combinação de uma substância com a outra, proporcionando a interpretação dos benefícios entre as interações dessas substâncias.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Os fungos são considerados organismos heterotróficos, eucarióticos e mais complexos quando comparados às bactérias e aos vírus. Apresentam parede celular espessa fundamentalmente composta por quitina e polissacarídeos, e ainda uma membrana celular cujo principal constituinte é o ergosterol (FARIAS; LIMA, 2000). Morfologicamente os fungos podem ser classificados em leveduriformes e filamentosos. As leveduras são organismos unicelulares, apresentam células esféricas ou ovais formando colônias pastosas e sua reprodução se dá por brotamento, já os fungos filamentosos são multicelulares, possuem como elemento básico a hifa, que são longos filamentos de células conectadas (SIDRIM; ROCHA, 2012; ZAITZ et al., 2010).

De acordo com sua classificação taxonômica o gênero *Candida* pertence ao Reino *Fungi*, divisão *Eumycota*, subdivisão *Deuteromycotina*, filo *Ascomycetes*, classe *Blastomycetes*, ordem *Cryptococcales* e família *Cryptococcaceae*. A maioria dos organismos deste gênero é capaz de exibir polimorfismo, formando simultaneamente blastoconídios e estruturas filamentosas, em condições ambientais adequadas, independente da temperatura (SIDRIM; ROCHA, 2012). Este gênero é composto por um grupo heterogêneo de organismos e compreende mais de 200 espécies leveduriformes (BRITO, 2005). Entretanto, segundo Pfaller e Diekema (2007) apenas cerca de 20 espécies de *Candida* são conhecidas como sendo agentes etiológicos de infecções, no entanto mais de 90% das infecções são causadas por *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei*.

As leveduras do gênero *Candida* possuem a versatilidade de se adaptarem em diferentes ambientes, podendo ser encontradas em variados ecossistemas, como solo, alimentos, água e fazendo parte da microbiota de homens e animais. Esses microrganismos degradam proteínas e carboidratos para obterem carbono e nitrogênio, elementos essenciais para seu desenvolvimento. Devido a sua capacidade adaptativa, as leveduras podem se desenvolver tanto na presença quanto na ausência de oxigênio (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010).

O gênero *Candida* existe normalmente como comensal em indivíduos saudáveis, todavia espécies deste gênero são consideradas patogênicas caso ocorram alterações nos mecanismos de defesa do hospedeiro ou o comprometimento de barreiras anatômicas. Tais espécies são responsáveis por várias manifestações clínicas, de supercrescimento mucocutâneo até infecções na corrente sanguínea devido à sua grande capacidade de adaptação a diferentes nichos do hospedeiro, esta lesão é bem variada, podendo ser branda, aguda ou crônica, superficial ou profunda (EGGIMANN; GARBINO; PITTET, 2003; MICELI; D'IAZ; LEE, 2011).

Embora *C. albicans* seja a espécie mais prevalente envolvida em infecções fúngicas invasivas, a incidência de infecções causadas por espécies não-*albicans* está aumentando significativamente nas últimas duas décadas. O aumento destas espécies envolvidas em casos de candidíase pode, em parte, estar relacionado a melhorias nos métodos de diagnóstico, tais como o uso de meios de cultura cromogênicos com a capacidade de diferenciar as espécies de *Candida*, bem como a introdução de técnicas moleculares para rotina no diagnóstico de fungemia (LIGUORI et al., 2009; LOCKHART, 2014). No entanto, essa alta prevalência de espécies de *C. não-albicans* pode ser um reflexo do seu nível de resistência inerentemente mais elevado a certos antifúngicos em comparação com *C. albicans* (GONZALEZ; ELIZONDO; AYALA, 2008; RUKAYADI et al., 2011). Mudanças na epidemiologia também foram observadas em países da América Latina. No Chile, a prevalência de *C. albicans* mudou, e tem sido observado um aumento progressivo de infecções não-*albicans*, onde a *C. parapsilosis* é a espécie mais frequente, seguida de *C. tropicalis* e *C. glabrata* (AJENJO et al., 2011). De acordo com a Rede de Estudos de Candidemias Brasileira a *C. albicans* foi responsável por cerca de 40% dos casos no Brasil, seguida de *C. tropicalis* (20,9%), *C. parapsilosis* (20,5%) e *C. glabrata* (4,9%) (COLOMBO et al., 2006; NUCCI et al., 2010).

Uma semelhança encontrada entre as espécies de *Candida* é a expressão de fatores de virulência que contribuem para sua patogenicidade como a formação do tubo germinativo, produção de adesinas, variabilidade fenotípica (*switching*), tigmotropismo, formação de biofilme e a produção de enzimas hidrolíticas, tais como proteases, fosfolipases e hemolisina (SARDI et al., 2013).

C. parapsilosis, anteriormente, foi considerada essencialmente saprófita e não patogênica, até o ano de 1940, quando foi identificada como causadora de um caso fatal de endocardite. Desde então, esta levedura tem sido considerada agente etiológico de candidíases em homens e animais, causando infecções de origem exógena. As infecções causadas por esta espécie aumentaram significativamente em importância e prevalência ao longo da última década (TROFA; GACSER; NOSANCHUK, 2008; VAN ASBECK; CLEMONS; STEVENS, 2009). De fato, os estudos indicam que a *C. parapsilosis* é muitas vezes a segunda espécie mais isolada de hemoculturas (ALMIRANTE et al., 2006; COLOMBO et al., 2007; COSTA-DE-OLIVEIRA et al., 2008).

Entre as espécies desse gênero encontra-se a *C. tropicalis* que é uma das mais comuns de *C. não-albicans* isolada a partir de vários tipos clínicos de candidíase, especialmente em climas tropicais, sendo responsável por cerca de 3 a 66% dos casos, com base em diferentes regiões geográficas (ARENDRUP et al., 2008; ARENDRUP et al., 2011; PAHWA et al., 2014).

Na Índia a *C. tropicalis* é a causa mais comum de candidemias associadas a cuidados de saúde (GIRI; KINDO, 2012). A resistência antifúngica é um problema sério para o tratamento de infecções causadas por esta espécie, pois é intrinsecamente resistente a flucitosina e tem um nível moderado de resistência ao fluconazol (SILVA et al., 2012).

A espécie *C. guilliermondii* encontra-se amplamente distribuída na natureza, incluindo a microbiota humana da superfície da pele e das mucosas. Embora esta espécie apresente uma virulência reduzida em comparação com outras espécies de *Candida*, ela é atualmente considerada um patógeno emergente, com uma maior incidência na América Latina. A *C. guilliermondii* tem sido reconhecida como o agente etiológico de uma grande variedade de infecções clínicas (ARENDRUP; HORN; FRIMODT-MOLLER, 2002; MASALA et al., 2003; PFALLER et al., 2010; SAVINI et al., 2011). Globalmente, esta espécie ocorre em 2% dos casos de candidemia, todavia em determinadas regiões geográficas como Itália, Índia e Brasil este índice pode chegar a 10% dos casos (MEDEIROS et al., 2007).

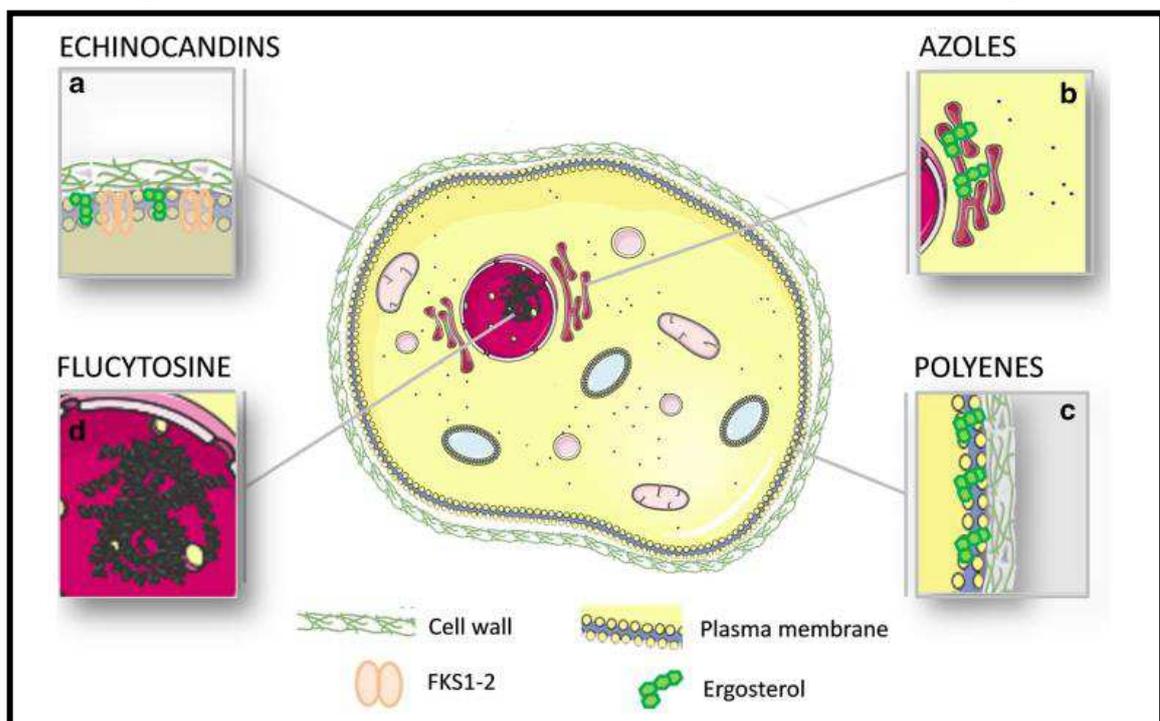
Dentre as infecções causadas pelo gênero *Candida*, a *C. krusei* é responsável por cerca de 1 a 5% dos casos e é intrinsecamente resistente ao fluconazol, principalmente em pacientes com câncer e em particular em pacientes que receberam terapia antifúngica profilática (HOPE; MORTON; EISEN, 2002; HACHEM et al., 2008; PFALLER et al., 2011). Apesar de ser uma espécie rara em infecções da corrente sanguínea (DUGGAL et al., 2015), a *C. krusei* é uma das causas mais comuns de candidíase vulvovaginal refratária (SINGH et al., 2002).

As infecções fúngicas causadas pelo gênero *Candida* podem ser subdivididas em três grupos principais de candidíase: cutânea (pele e seus apêndices), das mucosas (orofaríngea, esofágica e vulvovaginal) e infecções sistêmicas da corrente sanguínea (PFALLER; DIEKEMA, 2007). Tais infecções envolvem um espectro amplo de doenças superficiais e invasivas oportunistas que acometem pacientes expostos aos vários fatores de risco, como a imunossupressão por várias causas, uso de antibióticos de largo espectro, queimaduras, tempo de internamento prolongado, má nutrição, insuficiência renal, cirurgias extensas e tratamento com corticosteroides, como também a utilização prolongada de cateteres venosos juntamente com a antibioticoterapia também pode facilitar a multiplicação de leveduras, facilitando a disseminação do fungo (SYDNOR; PERL, 2011; SPAMPINATO; LEONARDI, 2013; TRAGIANNIDIS; TSOULAS; GROLL, 2015). Este gênero representa atualmente a quarta principal causa de infecções nosocomiais, de 8% a 10%, enquanto que a mortalidade atribuída direta ou indiretamente a candidemia é de 40% a 60% (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010; PAPON et al., 2013).

Em indivíduos imunocomprometidos, a maioria das infecções por *Candida*, cerca de 95% dos casos, são causadas por apenas 5 espécies: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*. Apenas uma pequena percentagem está associada a outras espécies de *Candida*, tais como: *C. lusitanae*, *C. guilliermondii* e *C. rugosa* (BEDOUT; GOMEZ, 2010; SARDI et al., 2013; YAPAR, 2014).

A farmacoterapia das micoses causadas por espécies fúngicas tem sido baseada na utilização de classes químicas diferentes de antifúngicos. Tal como os derivados poliênicos (anfotericina B e nistatina) que alteram a permeabilidade da membrana celular pela ligação ao ergosterol presente na membrana da célula. Os derivados azólicos (fluconazol, cetoconazol, itraconazol etc.) inibem a síntese do ergosterol, interferindo a nível enzimático, o que causa danos a função da membrana celular. Outra classe de fármacos que também atua inibindo a síntese do ergosterol, são as alilaminas (terbinafina e naftifina), inibindo a esqualeno epoxidase, enzima presente na síntese do ergosterol. As equinocandinas (caspofungina) inibem a síntese de 1,3- β -glicano, um polímero de glicose que é necessário para manter a integridade da parede celular fúngica. Por último, os análogos de pirimidinas (flucitosina) produzem na célula fúngica a 5-fluorouracil, que inibe a enzima timidilato sintase e consequentemente a síntese de DNA (Figura 1, p. 16) (ODDS; BROWN; GOW, 2003; SANGLARD, 2003; MAUBON et al., 2014).

Figura 1 - Alvos moleculares das diferentes classes/fármacos antifúngicos

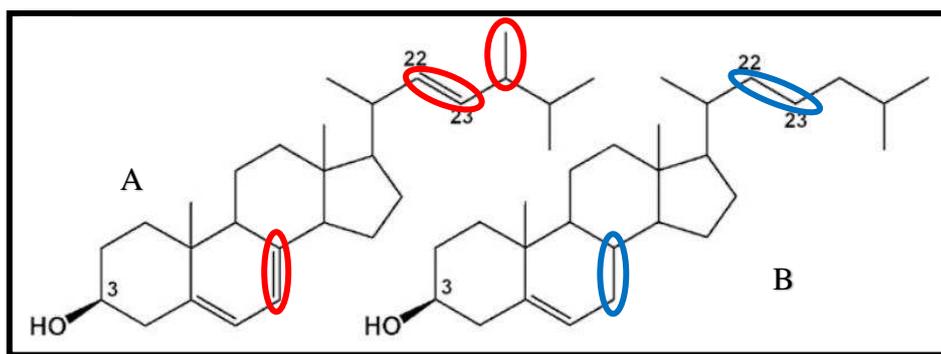


Fonte: MAUBON et al., 2014.

Já é bastante observada a necessidade da associação de dois ou mais antifúngicos convencionais para se obter o sucesso terapêutico. Um exemplo é a utilização da flucitosina principalmente em associação com a anfotericina B contra infecções ocasionadas por *Candida spp.* (SANGLARD, 2003).

A anfotericina B apresenta atividade contra vários gêneros fúngicos. Em relação à *Candida spp.*, quase todas as espécies exibem sensibilidade a este fármaco, com exceção de *C. guilliermondii* e de *C. lusitaniae*. A resistência fúngica adquirida é pouco observada, salvo no caso de *C. glabrata* e de *C. krusei* em que, por estas apresentarem uma baixa susceptibilidade, as CIM's são bastante elevadas (GROSSMAN; CHILLER; LOCKHART, 2014; PARAMYTHIOTOU et al., 2014; AHMED et al., 2015). Apesar das vantagens apresentadas por este antifúngico, é preciso ter bastante cuidado com sua utilização, pois este fármaco apresenta diversas desvantagens tal como a sua estreita margem terapêutica, além das reações adversas apresentadas devido a estrutura química do colesterol do hospedeiro ser bastante semelhante à do esterol do microrganismo (Figura 2, p. 17), atuando nas membranas celulares do hospedeiro desencadeando os efeitos adversos, sendo a nefrotoxicidade a reação mais relevante. No entanto, outras reações adversas são possivelmente observadas quanto a perfusão do fármaco, entre elas: febre, cefaleias, calafrios e mialgias (KONTOYIANNIS; MANTADAKI; SAMONIS, 2003; METCALF; DOCKRELL, 2007; GROSSMAN; CHILLER; LOCKHART, 2014; PARAMYTHIOTOU et al., 2014).

Figura 2 - Diferenças estruturais entre o ergosterol (A) e o colesterol (B)



Fonte: NEUMANN et al., 2013.

Os derivados azólicos correspondem a classe de antifúngicos com maior número de fármacos. Dentre os azóis, os triazóis são os mais usados em casos de candidemia, atuando com atividade fungistática, assim como os imidazólicos (SPAMPINATO; LEONARDI, 2013; GROSSMAN; CHILLER; LOCKHART, 2014; MAUBON et al., 2014). A diminuição da sensibilidade ou a resistência adquirida aos azóis frente a espécies de *Candida* é mediada por

vários mecanismos, os quais podem atuar simultaneamente numa mesma célula fúngica, principalmente quando ocorre uma exposição sequencial ao fármaco. Os principais mecanismos de resistência dessa classe são a diminuição da concentração intracelular de azóis, baseando-se na mutação de genes que codificam a regulação positiva das duas principais bombas de efluxo. Outro mecanismo envolvido é a diminuição da permeabilidade da membrana aos antifúngicos, mutações ou o aumento da expressão da lanosterol 14- α -desmetilase, sítio de ação destes fármacos (CANNON et al., 2009; NOEL, 2012).

A resistência aos antifúngicos é um fenômeno crescentemente reconhecido e pode ser explicado pelo seu uso excessivo e inapropriado tanto no tratamento como na profilaxia. Mecanismos de resistência antifúngica podem ser primários ou secundários, e estão relacionados com as características intrínsecas ou adquiridas do microrganismo, que pode interferir com o mecanismo de ação da respectiva classe do medicamento ou nas concentrações necessárias para ocorrer a resposta terapêutica (BRUDER-NASCIMENTO et al., 2010; SILVA et al., 2012; SARDI et al., 2013). Resistência também pode ser adquirida quando fatores ambientais levam à colonização ou a substituição de uma espécie sensível ao fármaco a uma espécie resistente (PEMAN; CANTON; ESPINEL-INGROFF, 2009).

Observando as limitações para o uso de antifúngicos convencionais, como a ocorrência de reações indesejáveis, o alto custo, como também a resistência microbiana frente aos fármacos disponíveis, algumas substâncias têm sido apontadas e estudadas como possibilidades de tratamento das infecções fúngicas, que se apresentem com uma faixa de ação fungicida ampla e com poucos efeitos tóxicos ao hospedeiro.

As propriedades terapêuticas das plantas representam um meio para o tratamento das doenças, normalmente vêm sendo reconhecidas e incorporadas ao saber científico associado ao conhecimento popular (DANTAS; GUIMARÃES, 2007). Os produtos e derivados das plantas são reconhecidamente importantes na pesquisa farmacológica e no desenvolvimento de novas ferramentas terapêuticas. Assim, tornam-se uma importante fonte de novos compostos biologicamente ativos e podem ser utilizados como uma nova possibilidade de intervenção terapêutica (SAAD, 2010; SARDI et al., 2013). Estudos utilizando avaliação *in vitro* são instrumentos úteis para a descoberta de novos potenciais agentes antifúngicos a partir de produtos naturais, como óleos essenciais e extratos derivados de plantas (RAI; MARES, 2003).

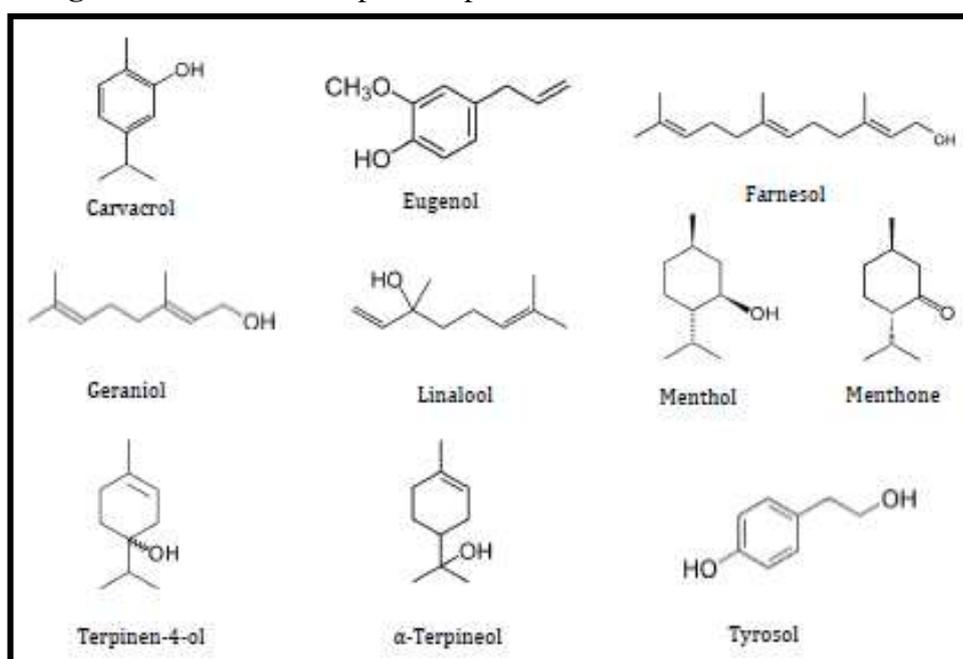
A descoberta de produtos naturais com princípios ativos que apresentem atividade antimicrobiana intrínseca ou combinada com antibióticos/antifúngicos de uso comum podem representar uma nova alternativa de tratamento frente aos microrganismos multirresistentes,

além de impedir o contato destes microrganismos com os produtos sintéticos, diminuindo o risco de se desenvolver novos ou melhores mecanismos de resistência (COUTINHO, 2008).

Os óleos essenciais constituem uma mistura complexa de compostos voláteis extraídos de plantas aromáticas, os quais são produzidos como consequência do metabolismo secundário. Esta mistura geralmente é odorífera e líquida, apresenta sabor acre ou ácido, cor ligeiramente amarelada ou incolor e são instáveis na presença de luz, calor, umidade e metais. Na natureza, esses compostos desempenham um importante papel na proteção dos vegetais, atuando como agentes antimicrobianos, inseticidas, favorecendo a dispersão do pólen e sementes e repelindo insetos indesejáveis. Devido a essas propriedades, os óleos essenciais são largamente empregados pela indústria farmacêutica (BAKKALI et al., 2008).

De acordo com Khan et al. (2010) os óleos essenciais possuem um largo espectro de ação antimicrobiana atribuídos ao alto teor de derivados terpênicos (Figura 3, p. 19), e por esta razão têm sido relatados como tendo atividade antifúngica significativa. Os terpenos são encontrados em compostos de óleos essenciais e formam estruturalmente e funcionalmente diferentes classes. A formação dos terpenos se dá pela condensação de várias unidades de carbono (C5) chamadas isoprenos (C₅H₈), que, por sua vez, origina-se biossinteticamente a partir do isopentilpirofosfato, que é o precursor destes compostos. O isopreno é um composto orgânico da classe dos alcadienos, que são hidrocarbonetos insaturados com duas ligações duplas. A nomenclatura oficial desse composto é 2-metil-1,3-butadieno (LEITE, 2015).

Figura 3 - Derivados terpênicos presentes em diversos óleos essenciais



Fonte: MARCOS-ARIAS et al., 2011.

Os principais terpenos classificados de acordo com o número de unidades de isoprenos são os hemiterpenos (C5), monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), triterpenos (C30) e tetraterpenos (C40) e ainda existem os terpenos oxigenados (terpenoides). Eles possuem vários grupos funcionais, entre eles: os álcoois (geraniol), aldeídos (geranial), éteres (1,8-cineol) e fenóis (carvacrol). Os monoterpenos são as moléculas mais representativas constituindo 90% dos óleos essenciais, e dotados de uma grande variedade estrutural (BAKKALI et al., 2008).

Sabe-se que as plantas são fontes significativas de novas substâncias químicas que apresentam potencial efeito terapêutico, como é o caso do carvacrol (2-metil-5-isopropilfenol), um monoterpeno fenólico constituinte dos óleos essenciais de inúmeras plantas das famílias Lamiaceae, Euphorbiaceae, Verbenaceae e Poaceae, especialmente em espécies dos gêneros *Origanum*, *Satureja*, *Thymus*, *Thymbra*, *Acalypha*, *Lippia* e *Cymbopogon*, comumente utilizadas na medicina popular. Em relação à sua atividade biológica, já é evidenciado ação antimicrobiana, antioxidante, antitrombótica, antinociceptiva e anti-inflamatória do carvacrol (DAMASCENO et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2012). Este fitoconstituente é biossintetizado a partir γ -terpineno por meio do p-cimeno. Portanto, estes dois compostos estão sempre presentes em óleos essenciais contendo carvacrol. O carvacrol é um composto bastante volátil, sendo sempre encontrado na forma líquida, na cor amarelo claro e de odor característico (BASER, 2008).

Na literatura encontram-se vários estudos sobre a atividade antimicrobiana de extratos de plantas, óleos essenciais e seus fitoconstituíntes. O carvacrol já foi testado contra *C. albicans*, *Aspergillus spp.*, e a atividade antibacteriana testada contra cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Cryptococcus neoformans*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* e *Fusobacterium nucleatum* (LAMBERT et al., 2001; ABBASZADEH et al., 2014; CIANDRINI et al., 2014; CHAILLOT et al., 2015; NÓBREGA et al., 2016). Neste trabalho, o carvacrol terá sua atividade antifúngica avaliada contra *C. não-albicans*.

Segundo Cuenca-Estrella (2004) o desenvolvimento de novos medicamentos antimicrobianos parece estar em declínio. Por outro lado, estudos realizados mostram que estratégias de combinação de antimicrobianos estão em desenvolvimento. O combate a patógenos refratários é um problema emergente nos dias atuais e se baseia em duas possibilidades: o desenvolvimento de novos fármacos antimicrobianos ou a combinação de substâncias já existentes (DRAGO et al., 2007).

Efeitos interativos entre substâncias tem uma longa história. Para os fármacos antimicrobianos, o uso de duplas ou triplas combinações tem início com a realização de estudos *in vitro* que indicam interações positivas capazes de promover a inibição do crescimento dos microrganismos. No caso de substâncias antimicrobianas uma das vantagens que podem ser alcançadas com a associação de substâncias antifúngicas é promover maior efetividade do tratamento, permitindo, assim, a utilização de menores doses de cada substância ou diminuindo as reações adversas presentes em concentrações normais de tratamento (ODDS; BROWN; GOW, 2003; MITSUGUI et al., 2008). Na literatura há diversos estudos com combinação entre antifúngicos convencionais e produtos naturais (ROSATO et al., 2008; AMBER et al., 2010; SAAD et al., 2010; WAGNER, 2011).

Rosato et al. (2008) realizaram um estudo que demonstrou o efeito sinérgico com a associação dos óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia*, *Origanum vulgare* e *Pelargonium graveolens* e anfotericina B sobre 11 cepas de *C. albicans*. A melhor atividade sinérgica foi observada pela associação de *P. graveolens* e anfotericina B.

Há muitos modelos experimentais para medir esses efeitos combinados. Entre eles, o método *Checkerboard* é uma técnica usada para medir *in vitro* a atividade da combinação entre agentes antimicrobianos. As vantagens do método são várias, como o fácil entendimento, a interpretação e os cálculos matemáticos empregados serem simples, pode ser utilizado em sistemas de microdiluição e é frequentemente usado em estudos de sinergismo. O termo *Checkerboard* refere-se a múltiplas diluições com duas substâncias testadas em concentrações equivalentes, abaixo ou acima das CIM's para os microrganismos testados. O *Checkerboard* consiste de colunas contendo alguma quantidade da substância A diluídas ao longo do eixo-x e linhas contendo a substância B diluídas ao longo do eixo-y (LORIAN, 1991; MUKHERJEE et al., 2005).

A combinação de antifúngicos com diferentes mecanismos de ação poderá representar uma opção terapêutica válida e efetiva. Teoricamente, a interação entre dois fármacos pode potencializar a atividade antifúngica de ambos, reduzindo a concentração dos mesmos, a duração do tratamento e conseqüentemente o surgimento de microrganismos resistentes (MUKHERJEE et al., 2005).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Avaliar a atividade antifúngica do carvacrol quando associado com o fluconazol, cetoconazol ou anfotericina B contra cepas de *C. não-albicans*.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar a CIM do carvacrol frente a cepas de *C. não-albicans*.
- Determinar a CIM do fluconazol, cetoconazol e anfotericina B contra cepas de *Candida não-albicans*.
- Investigar o efeito da associação do carvacrol quando combinado os antifúngicos através da determinação do ICIF contra espécies de *C. não-albicans*.

4 METODOLOGIA

4.1 Local do estudo

Este trabalho foi realizado nos Laboratórios de Bioquímica (J08) e Microbiologia (J11) da Unidade de Saúde, do Centro de Educação e Saúde da Universidade Federal de Campina Grande, Cuité-PB.

4.2 Meios de cultura

Os meios de cultura utilizados nos estudos para avaliação da atividade antifúngica foi o meio sólido ágar sabouraud dextrose (ASD) e o meio líquido foi o caldo sabouraud dextrose (CSD), ambos adquiridos da Difco®.

4.3 Cepas fúngicas

Para os ensaios foram selecionadas um total de 9 cepas de *Candida não-albicans*. As estirpes utilizadas foram *C. tropicalis* laboratório de micologia (LM)-10, *American Type Culture Collection* (ATCC) 13803; *C. guilliermondii* LM-103, LM-301, LM-703; *C. Krusei* LM-120, LM-13 e *C. parapsilosis* ATCC 20019, ATCC 22019 fornecidas pelo Laboratório de Micologia da Universidade Federal da Paraíba.

4.4 Preparação da emulsão do carvacrol

O carvacrol que foi utilizado no ensaio foi adquirido da Sigma-Aldrich®. O produto permaneceu armazenado de acordo com as recomendações do fabricante. As emulsões nas diferentes concentrações foram preparadas no momento da execução dos testes, dissolvendo-o em água destilada estéril e utilizando 50 µl de Tween 80® (polissorbato) e solubilizando-o. A mistura foi agitada por 5 minutos para completa solubilização. Também foram realizados controles com o Tween 80® nas mesmas concentrações utilizadas com o carvacrol.

4.5 Antifúngicos

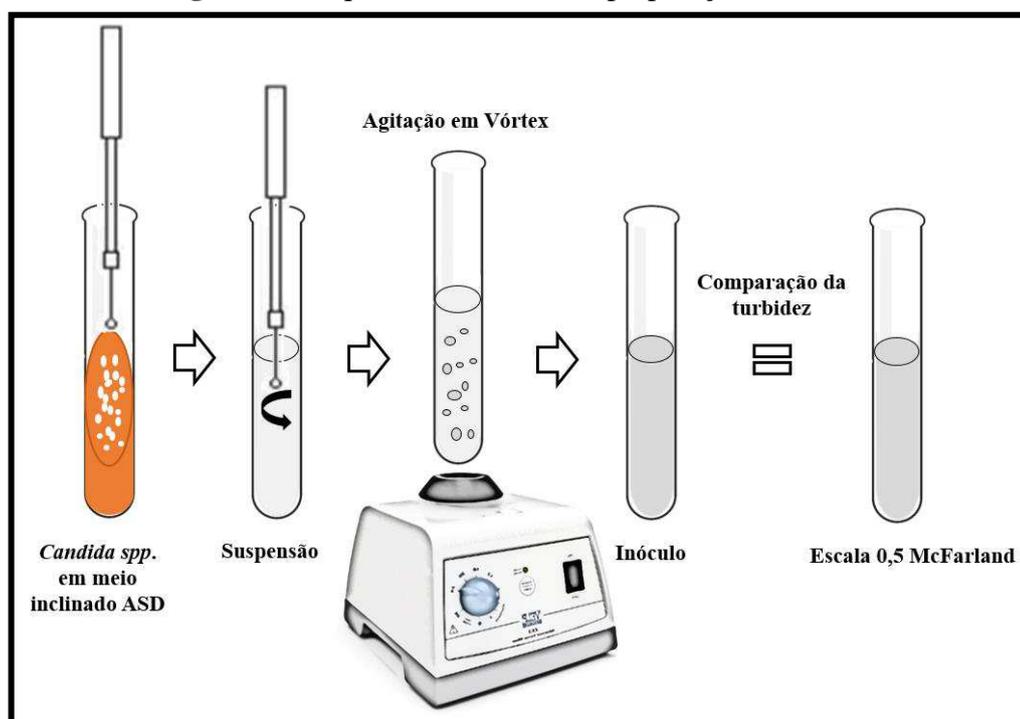
Os antifúngicos utilizados foram o cetoconazol, fluconazol e anfotericina B. As soluções dos antifúngicos foram preparadas somente no momento da execução dos testes, dissolvendo-

os em água destilada estéril com o auxílio de 50 µl de dimetilsulfóxido (DMSO) e solubilizando-os com aparelho vórtex. Foram testados controles com o DMSO nas mesmas concentrações utilizadas com os antifúngicos.

4.6 Preparação do inóculo

Na preparação do inóculo, culturas de *Candida spp.* foram primeiramente cultivadas em meio ASD e incubadas a temperatura de 37 graus celsius (°C) durante 24-72 horas (h). Posteriormente, colônias desta cultura foram suspensas em tubos contendo salina estéril, cloreto de sódio a 0,85% p/v. Em seguida, essas suspensões foram agitadas por 2 minutos com o auxílio do aparelho vórtex. Logo após, cada suspensão teve turbidez comparada e ajustada àquela apresentada pela escala 0,5 *McFarland*, a qual corresponde a um inóculo de aproximadamente $1-5 \times 10^6$ unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL) (Figura 4, p. 24).

Figura 4 - Esquema ilustrativo da preparação do inóculo



Fonte: Elaborada pelo autor.

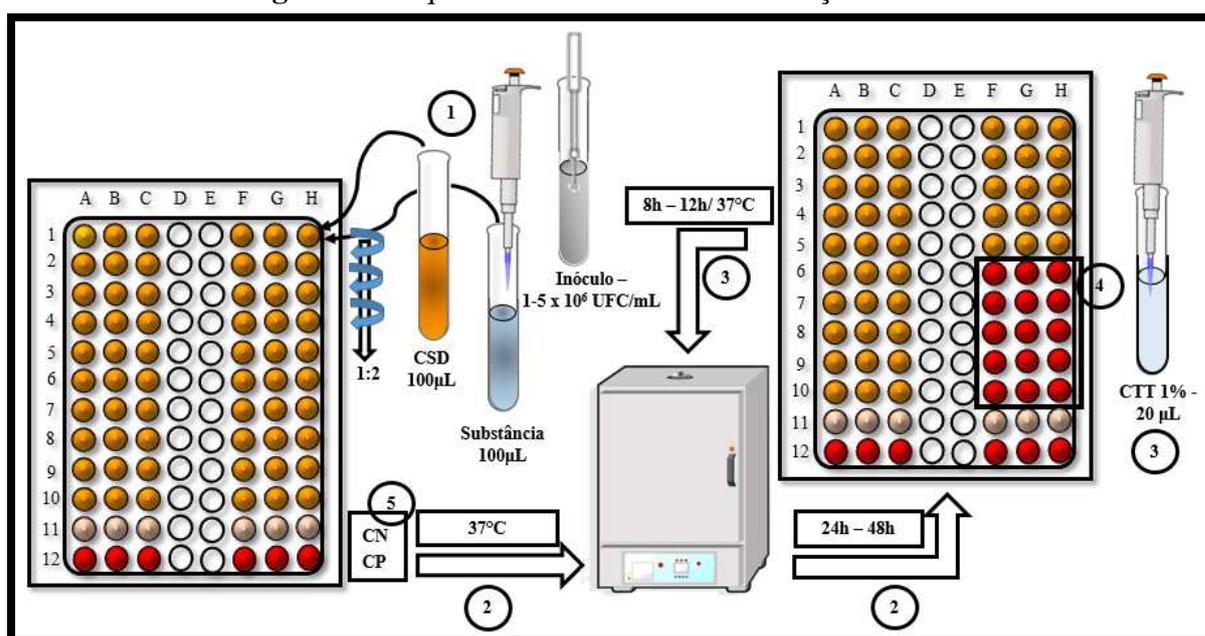
4.7 Determinação da concentração inibitória mínima

As CIM's do carvacrol, fluconazol, cetoconazol e anfotericina B foram determinadas pelo método de microdiluição em caldo. O ensaio foi conduzido de acordo com as normas

propostas pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (2008), documento M27-A3, com algumas modificações. A determinação da CIM (Figura 5, p. 25) de cada substância foi determinada em microplacas de 96 cavidades e utilizado CSD como meio de cultura, cada substância foi diluída seriadamente na proporção de 1:2, no caso do carvacrol as concentrações foram diluídas de 2.048 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, já os antifúngicos variaram as concentrações de 1.024 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 0,0625 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A determinação da CIM foi conduzida com aproximadamente $1-5 \times 10^5$ UFC/mL do microrganismo em cada cavidade da microplaca (1, Figura 5, p. 25). As placas foram incubadas a 37°C e a leitura foi feita após 24-48h, observando presença ou ausência de crescimento fúngico visível (2, Figura 5, p. 25). Em seguida, 20 μL de 1% de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (CTT) foi adicionado a cada uma das 96 cavidades, sendo a microplaca incubada por mais 8-12h (3, Figura 5, p. 25). A CIM foi considerada como a menor concentração do carvacrol ou dos antifúngicos capaz de inibir o crescimento fúngico visível, tal como foi indicado pelo CTT através da leitura das microplacas de 96 cavidades (4, Figura 5, p. 25). Foram testados controles negativos (apenas CSD) e controles positivos (CSD e o microrganismo) (5, Figura 5, p. 25). Todos os testes foram realizados em triplicata.

O cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio é incolor na forma oxidada e vermelho quando reduzido. Microrganismos vivos por ação enzimática reduzem o CTT, originando trifênil formazan, sendo este mantido dentro de grânulos nas células, as quais se tornam vermelhas (RAMOS; PIZZOLITTO; PIZZOLITTO, 2006).

Figura 5 - Esquema ilustrativo da determinação da CIM

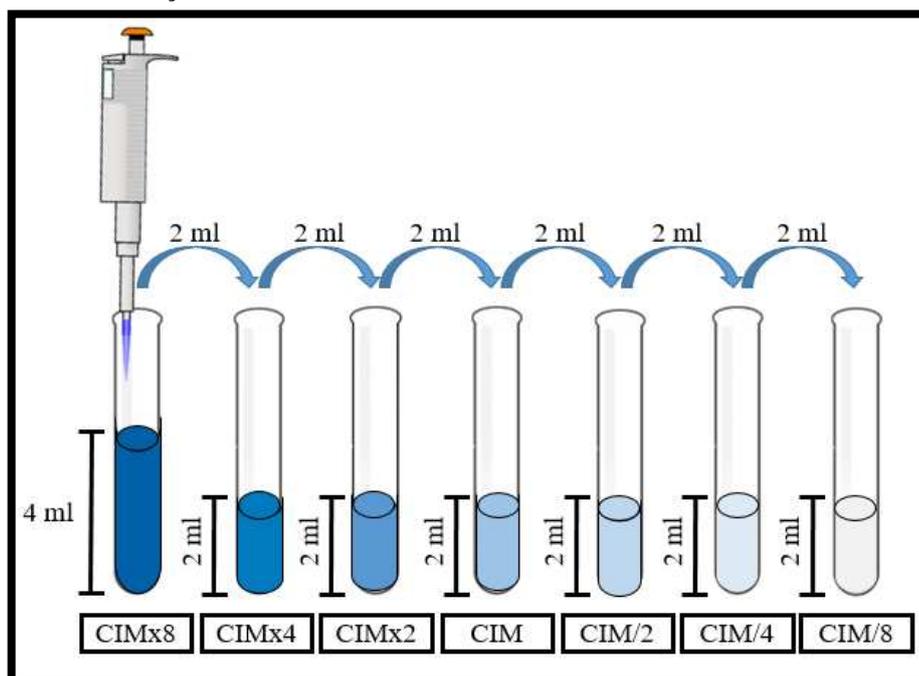


Fonte: Elaborada pelo autor.

4.8 Método *Checkerboard*

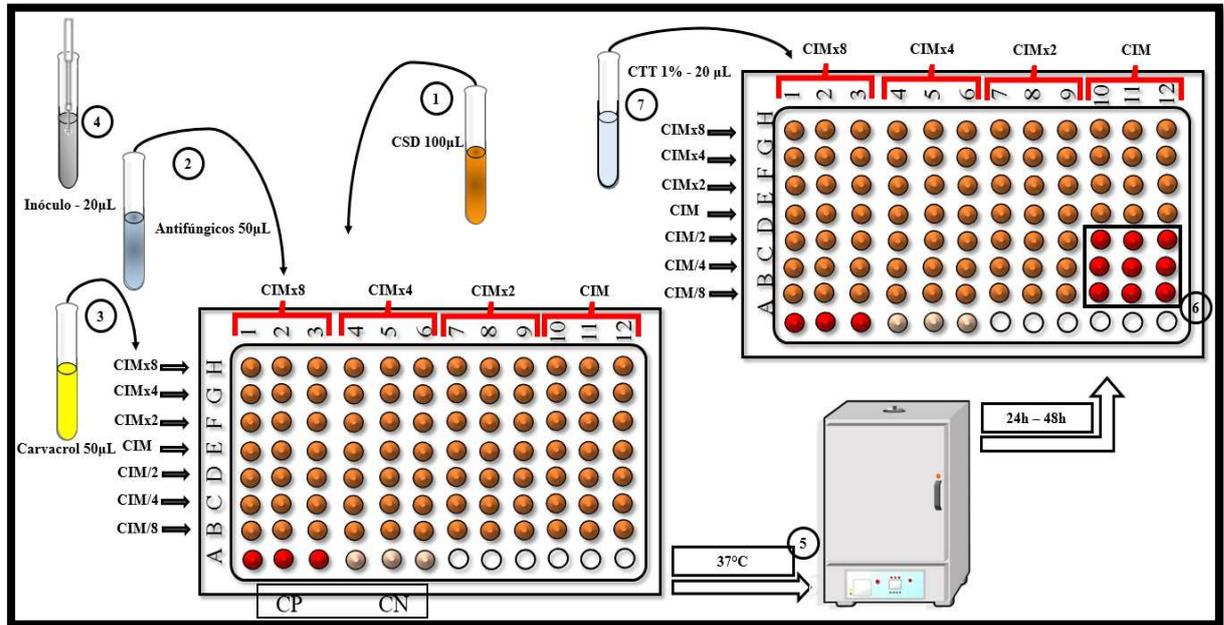
Após a determinação da CIM do carvacrol e de cada fármaco antifúngico, foram realizadas as combinações. O estudo de associação entre o fitoconstituente e os antifúngicos foi conduzido utilizando-se a técnica por *Checkerboard*. Inicialmente, foram preparadas diluições das substâncias a serem testadas em sete concentrações diferentes CIMx8, CIMx4, CIMx2, CIM, CIM/2, CIM/4 e CIM/8 (Figura 6, p. 26). Posteriormente, 100 µL do CSD foram distribuídos nas 96 cavidades da microplaca de microdiluição (1, Figura 7, p. 27). Depois 50 µL do antifúngico em diversas concentrações (CIMx8, CIMx4, CIMx2, CIM, CIM/2, CIM/4 e CIM/8) foram adicionados no sentido vertical (2, Figura 7, p. 27) e 50 µL do carvacrol também em diferentes concentrações foram adicionados no sentido horizontal da microplaca (3, Figura 7, p. 27). Desta maneira, as diversas concentrações do carvacrol foram testadas na presença de várias concentrações dos antifúngicos. Por último, foram acrescentados 20 µL do inóculo (4, Figura 7, p. 27) das cepas *C. guilliermondii* LM-103, *C. tropicalis* ATCC 13803, *C. krusei* LM-13 e *C. parapsilosis* ATCC 22019, previamente ajustadas de acordo com a escala 0,5 *McFarland*. As microplacas foram incubadas a 37°C (5, Figura 7, p. 27) e a leitura foi feita após 24h-48h para observar a presença ou não do crescimento fúngico (6, Figura 7, p. 27), assim como foi indicado após 8-12h da adição de 20 µL CTT a 1% (7, Figura 7, p. 27). Todos os ensaios foram realizados em triplicata e os controles testados (Figura 7, p. 27).

Figura 6 - Diluições das substâncias a serem testadas em diversas concentrações



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 7 - Método Checkerboard



Fonte: Elaborada pelo autor.

As concentrações inibitórias fracionadas (CIF's) foram calculadas, onde $CIF_A = CIM$ da substância A na combinação/CIM da substância A individual e $CIF_B = CIM$ da substância B na combinação/CIM da substância B individual (Equação 1, p. 28). O índice da concentração inibitória fracionada (ICIF) para cada antifúngico associado com o carvacrol foi determinado pela soma da CIF_A (substância A) + CIF_B (substância B) (BERENBAUM, 1977). O ICIF foi interpretado da seguinte forma: sinergismo ($\leq 0,5$), aditividade ($> 0,5$ a $1,0$), indiferença (> 1 e < 4) ou antagonismo ($\geq 4,0$) (LEWIS et al., 2002; CORREA-ROYERO et al., 2010).

$$CIF_A = \frac{CIM_A \text{ em combinação}}{CIM_A \text{ individual}} \text{ e } CIF_B = \frac{CIM_B \text{ em combinação}}{CIM_B \text{ individual}} \quad (1)$$

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A associação entre substâncias com propriedades antifúngicas promissoras pode traçar novos mecanismos de ação ou intensificá-los, além de possivelmente agregar outros benefícios quando comparada aos medicamentos antifúngicos como diminuir as reações adversas, aumentar o espectro de ação, tratar microrganismos resistentes, ser aplicada a diferentes tipos de infecções, aumentar as alternativas de tratamento e diminuir a toxicidade. Porém, para determinarmos os efeitos de uma associação temos que conhecer a atividade antifúngica isolada de cada substância a ser testada em combinação.

5.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do carvacrol

As substâncias derivadas de plantas vêm sendo usadas pelo homem ao longo da história. Em todas as épocas e culturas, o homem aprendeu a tirar os benefícios dos recursos naturais, seja na busca de fontes nutricionais ou na busca de alternativas terapêuticas para, assim, aumentar suas chances de sobrevivência através da melhoria de sua saúde (ROSA; CÂMARA; BÉRIA, 2011).

Um fato importante citado por Rossato et al. (2012) é o fato que o potencial terapêutico de muitas espécies de plantas medicinais compreende uma extensa variedade de aplicações, que podem relacionar-se com patologias de fácil tratamento, até complicações mais severas. No entanto, a utilização terapêutica destas preparações naturais no tratamento convencional de diversas patologias tem como maior problema a falta de dados científicos que comprovem a eficácia dos mesmos. Por esta razão, existe a necessidade de estudos científicos que visem à comprovação do efeito farmacológico destas plantas e de seus metabólitos secundários.

Os valores das CIM's do carvacrol contra espécies de *C. não-albicans*, determinadas pela técnica de microdiluição em caldo, são mostrados na Tabela 1, p. 29. A concentração 512 µg/mL inibiu o crescimento de todas as cepas, enquanto que 128 µg/mL foi capaz de inibir 44,4% das estirpes ensaiadas.

Vale ressaltar que os controles positivo (microrganismo mais CSD) e negativo (apenas CSD) mostraram viabilidade do microrganismo e esterilidade do meio de crescimento, respectivamente. Além desses, o controle do Tween 80® mostrou que as concentrações do polissorbatos usadas nos experimentos não alteraram o crescimento do microrganismo.

Tabela 1 - Concentração inibitória mínima (CIM) do carvacrol contra espécies de *C. não-albicans*

Cepas	CIM ($\mu\text{g/mL}$) CARVACROL
<i>C. tropicalis</i> LM-10	128
<i>C. tropicalis</i> ATCC 13803	128
<i>C. guilliermondii</i> LM-103	512
<i>C. guilliermondii</i> LM-301	256
<i>C. guilliermondii</i> LM-703	256
<i>C. krusei</i> LM-120	512
<i>C. krusei</i> LM-13	256
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 20019	128
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	128

Fonte: Dados do autor, 2016.

Diversos estudos vêm sendo realizados em busca da atividade biológica de óleos essenciais, por apresentarem uma rica e complexa mistura de substâncias químicas com propriedades distintas. Entretanto, o potencial de plantas como fonte de novos fármacos ainda é pouco explorado (ABBASZADEH et al., 2014; WANKHAR et al., 2015).

Os resultados apresentados neste estudo indicam elevada atividade antifúngica do carvacrol contra espécies de *C. não-albicans*. Segundo Sartoratto et al. (2004) valores da CIM entre 50 - 500 $\mu\text{g/mL}$, são considerados de elevada atividade, sendo que, de 600 - 1.500 $\mu\text{g/mL}$ e acima de 1.500 $\mu\text{g/mL}$, são considerados de média e baixa atividade, respectivamente.

Diversos estudos mostram a atividade antimicrobiana do carvacrol, seja frente a bactérias, fungos leveduriformes ou filamentosos. Por exemplo, a literatura relata que o carvacrol possui atividade antibacteriana contra *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* (CIM 0,25% v/v) (CIANDRINI et al., 2014) e atividade antifúngica contra *C. albicans* (CIM 128 $\mu\text{g/mL}$) (LIMA et al., 2013), como também contra 33 isolados clínicos de *Candida spp.*, entre elas: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*, todas resistentes ao fluconazol (CIM 75 à 100 $\mu\text{g/mL}$) (AHMAD et al., 2011), outro estudo mostrou ação contra *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, *A. ochraceus*, *Cladosporium spp.* (CIM 100 $\mu\text{g/mL}$), *Penicillium chrysogenum*, *Fusarium oxysporum* (CIM 125 $\mu\text{g/mL}$), *P. citrinum* (CIM 150 $\mu\text{g/mL}$) e contra *Rhizopus oryzae* (CIM 200 $\mu\text{g/mL}$)

(ABBASZADEH et al., 2014). As CIM's encontradas neste trabalho estão de acordo com os valores obtidos em outros estudos.

Estudos realizados *in vitro* mostraram uma forte atividade do carvacrol contra isolados de candidíase oral, entre eles *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. albicans*, porém a maior atividade foi mostrada contra a *C. parapsilosis* (MARCOS-ARIAS et al., 2011), assim como também mostram os resultados obtidos neste estudo. Valores encontrados por Manohar et al. (2001) em que o carvacrol apresentou uma CIM de 250 µg/mL frente a cepa padrão de *C. albicans*, também corroboram com os valores encontrados neste trabalho.

A atividade antimicrobiana do carvacrol é conhecida desde a década de 90. No entanto, a investigação de sua atividade contra microrganismos emergentes vem sendo cada vez mais estudada. O carvacrol se destaca de outros fitoconstituintes, porque mesmo em baixas concentrações, sua atividade se apresenta superior à de outros terpenos (BARROSO, 2010; LOBO et al., 2014).

Além de oferecer resultados semi-quantitativos e por não ser influenciado pela velocidade de crescimento dos microrganismos, o método de microdiluição proporciona vantagens frente a outras técnicas, como a de difusão em disco. A metodologia proposta pelo CLSI oferece uma maior confiabilidade ao estudo em virtude de a metodologia apresentar vantagens como a sensibilidade e a quantidade mínima de reagentes utilizada, o que facilita um maior número de repetições. No método da microdiluição as substâncias são solubilizadas, ocorrendo um maior contato entre o fitoconstituente e as células fúngicas, o que torna o método mais robusto para a determinação da CIM, minimizando a inconsistência dos resultados (SCORZONI et al., 2007). Além de proporcionar a utilização de controle positivo (controle de crescimento) e de controle de esterilidade que reduzem o viés metodológico, proporcionando uma maior confiabilidade nos resultados apresentados (CASTRO; LIMA, 2010).

5.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos antifúngicos

Os valores das CIM's das substâncias antifúngicas (fluconazol, cetoconazol e anfotericina B) frente as cepas de *C. não-albicans* são mostrados na Tabela 2, p. 31. A anfotericina B apresentou inibição de 100% das cepas à concentração de 2 µg/mL, enquanto que 0,5 µg/mL foi capaz de inibir apenas 22,2% dos microrganismos. Em relação ao cetoconazol, a concentração de 0,5 µg/mL inibiu o crescimento de 50% de todos os isolados.

Já o fluconazol, apresentou 22,2% das CIM's maiores que as concentrações testadas no experimento.

Tabela 2 - Concentração inibitória mínima (CIM) dos antifúngicos contra espécies de *C. não-albicans*

Cepas	CIM (µg/mL)	CIM (µg/mL)	CIM (µg/mL)
	FLU	CET	ANFOT. B
<i>C. tropicalis</i> LM-10	32	2	2
<i>C. tropicalis</i> ATCC 13803	32	0,5	2
<i>C. guilliermondii</i> LM-103	2	32	1
<i>C. guilliermondii</i> LM-301	> 1.024	-	0,5
<i>C. guilliermondii</i> LM-703	8	0,125	0,5
<i>C. krusei</i> LM-120	> 1.024	64	2
<i>C. krusei</i> LM-13	256	0,5	2
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 20019	16	0,5	2
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	16	0,5	2

Fonte: Dados do autor, 2016.

FLU: fluconazol; CET: cetoconazol; ANFOT. B: anfotericina B.

-: CIM não determinada

>: CIM maior do que as concentrações testadas

A anfotericina B é um antifúngico que possui atividade fungicida dependente da concentração, enquanto que o fluconazol não aumenta significativamente sua atividade com incrementos na concentração do fármaco (GOODMAN; GILMAN, 2012). Por esta razão, não foi investigado CIM's maiores para o fluconazol.

Ambos CLSI e o *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) estabeleceram *breakpoints* (pontos de ruptura) clínicos para o fluconazol contra *Candida*, tendo em vista as distribuições das CIM's, mecanismos de resistência, parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos apresentados pelo gênero. No entanto, esses *breakpoints* (pontos de ruptura) não são específicos das espécies e sim, apenas, para o gênero. Os valores atribuídos são de CIM ≤ 8 µg/mL como sensível, 16-32 µg/mL como sensíveis dose-dependente e ≥ 64 µg/mL como resistentes ao fluconazol (PFALLER; DIEKEMA; SHEEHAN, 2006). De acordo com essas determinações entre as 9 cepas testadas neste trabalho, duas são sensíveis, quatro são sensíveis dose-dependente e três são isolados clínicos considerados resistentes ao fluconazol. Dentre as espécies de *Candida*, as duas cepas de *C. krusei* apresentaram intrínseca

resistência ao agente antifúngico. Comportamento este já relatado em diversos estudos (KONTOYIANNIS; MANTADAKIS; SAMONIS, 2003; BRUDER-NASCIMENTO et al., 2010; PARAMYTHIOTOU et al., 2014).

O fluconazol é o antifúngico mais prescrito mundialmente. Este fármaco equivale a um tratamento barato e eficaz para candidíase invasiva e é o tratamento de primeira escolha para a maioria das infecções fúngicas. Devido ao seu grande uso, seja de forma profilática ou empírica, frequentemente, atribui-se ao seu uso a principal causa de resistência de espécies de *Candida* (SANTOS JÚNIOR et al., 2005).

Para o CLSI (2008) a sensibilidade de uma cepa pode ser definida de acordo com a determinação da CIM de cada agente antifúngico, para a anfotericina B quando a CIM for ≤ 1 $\mu\text{g/mL}$ a cepa é considerada sensível, para o cetoconazol a CIM sendo ≥ 16 $\mu\text{g/mL}$ o microrganismo é considerado resistente. Neste caso, podemos dizer que entre as cepas testadas apenas as de *C. guilliermondii* foram sensíveis a anfotericina B. Ao passo que o cetoconazol apresentou apenas duas cepas resistentes, *C. guilliermondii* LM-103 e *C. krusei* LM-120.

Em concordância com os resultados obtidos neste trabalho, Lima et al. (2013) obtiveram CIM's para a anfotericina B entre 0,5 e 4 $\mu\text{g/mL}$ contra 16 cepas de *C. albicans*. Resultados idênticos também foram encontrados por Mota et al. (2012) que determinaram a CIM da anfotericina B igual a 4 $\mu\text{g/mL}$ para 92% das cepas investigadas de *Rhizopus oryzae*. Em estudo realizado para avaliar a atividade do cetoconazol as CIM's variaram entre 0,75 a > 32 $\mu\text{g/mL}$ contra 5 cepas de *Cryptococcus neoformans*, o mesmo estudo demonstrou CIM's para o fluconazol entre 6 e > 256 $\mu\text{g/mL}$ (MEZZARI et al., 2015).

Recentemente foi determinada a CIM de diversos antifúngicos frente a isolados de *C. não-albicans*, os valores das CIM's contra 14 isolados de *C. tropicalis* variaram de 0,125 a 1 $\mu\text{g/mL}$ para o fluconazol e ente 0,5 a 2 $\mu\text{g/mL}$ para a anfotericina B. Logo, para 4 isolados de *C. krusei* foram entre 8 e 32 $\mu\text{g/mL}$ para o fluconazol e para anfotericina B variaram entre 1 e 2 $\mu\text{g/mL}$. Por último, 20 isolados de *C. parapsilosis* apresentaram CIM de 0,125 a 1 $\mu\text{g/mL}$ e 0,5 a 2 $\mu\text{g/mL}$ para o fluconazol e anfotericina B, respectivamente (PEDROSO et al., 2014).

Para a realização dos ensaios foi crucial a determinação das CIM's dos antifúngicos, tanto para avaliação individual da sua atividade contra *C. não-albicans*, como também para a realização da associação com o carvacrol. As CIM's foram determinadas antecedentes ao ensaio de associação, pois os valores eram necessários para a realização do experimento.

5.3 Determinação do índice da concentração inibitória fracionada (ICIF) da associação entre os antifúngicos e o carvacrol pelo método de *Checkerboard*

Os resultados das combinações entre o carvacrol e o fluconazol, cetoconazol e anfotericina B contra cepas de *C. não-albicans* estão mostrados na Tabela 3, p. 34. O carvacrol foi capaz de reduzir a CIM de 92% dos antifúngicos em combinação quando comparados aos valores das CIM's individuais dos mesmos. Diversas formas de interações entre o fitoconstituente e os antifúngicos foram observadas, dentre elas: sinergismo em 25% das associações, aditividade também em 25% e, por fim, 50% das combinações apresentaram efeito indiferente, entretanto não foram encontrados resultados antagônicos.

Tabela 3 - Índice da concentração inibitória fracionada (ICIF) da associação entre o carvacrol e os antifúngicos contra espécies de *C. não-albicans*

Cepas	CIM ^a	CIM ^b	CARV ^a	CARV ^b	ICIF	INT
<i>C. guilliermondii</i> LM-103						
ANF. B	1	0,125	512	64	0,25	SIN
CET	32	4	512	64	0,25	SIN
FLU	2	0,125	512	512	1,06	IND
<i>C. tropicalis</i> ATCC 13803						
ANF. B	2	0,25	128	128	1,125	IND
CET	0,5	0,25	128	16	0,625	ADI
FLU	32	32	128	32	1,25	IND
<i>C. krusei</i> LM-13						
ANF. B	2	0,25	256	256	1,125	IND
CET	0,5	0,0625	256	256	1,125	IND
FLU	256	128	256	32	0,625	ADI
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019						
ANF. B	2	1	128	16	0,625	ADI
CET	0,5	0,0625	128	128	1,125	IND
FLU	16	2	128	16	0,25	SIN

Fonte: Dados do autor, 2016.

^a: CIM ($\mu\text{g/mL}$) individual da substância.

^b: CIM ($\mu\text{g/mL}$) da substância em combinação.

ANF. B: anfotericina B; CET: cetoconazol; FLU: fluconazol; CARV: carvacrol.

INT: interpretação; SIN: sinergismo; ADI: aditividade; IND: indiferença.

Em estudo realizado por Ahmad et al. (2013) na avaliação da combinação entre o carvacrol e o fluconazol contra espécies de *Candida* sensíveis e resistentes a este fármaco, foi visto que para as cepas de *C. tropicalis* sensíveis ao fluconazol o ICIF da combinação variou entre 0,25 a 1, obtendo resultados sinérgicos e aditivos. No entanto, para as cepas de *C. tropicalis* resistentes ao fluconazol os resultados obtidos para as associações foram sinérgicos, porém a sensibilidade das cepas frente ao carvacrol foram maiores que a apresentada neste estudo. Para a espécie *C. krusei* resistente ao fluconazol o ICIF mostrou resultados aditivos e indiferentes para as combinações realizadas. Logo, para a *C. parapsilosis* a associação entre o fluconazol e o carvacrol obtiveram resultados idênticos aos apresentados neste trabalho.

Recentemente a atividade das combinações entre o carvacrol e antifúngicos foram avaliadas contra 25 cepas de *Pythium insidiosum*, a associação entre o carvacrol e a anfotericina B obteve resultado indiferente para 60% das associações. Resultados da associação entre o carvacrol + caspofungina, carvacrol + itraconazol e carvacrol + terbinafina obtiveram resultados sinérgicos de 44%, 96% e 32% frente a cepas de *P. insidiosum*, respectivamente (JESUS et al., 2015).

A atividade do carvacrol em combinação também foi avaliada contra bactérias. No trabalho realizado por Magi; Marini e Facinelli (2015) a associação entre o carvacrol e a eritromicina também foi testada contra cepas de *Streptococcus* do Grupo A resistentes a eritromicina, onde foi detectado que contra as 32 cepas testadas a associação teve efeito sinérgico em 21, resultados indiferentes e antagônicos não foram encontrados. Em outro estudo realizado recentemente por Mohaddese e Kazempour (2016) a atividade sinérgica foi mostrada entre a associação do carvacrol e a gentamicina frente *Escherichia coli*.

Saad et al. (2010) mostraram resultados bastante significativos na associação do óleo essencial de *Thymus maroccanus*, que tem como principal constituinte químico o carvacrol com 89,15% da presença do mesmo em seu óleo essencial, quando associado com o fluconazol e a anfotericina B evidenciaram um efeito sinérgico contra *C. albicans*. Resultado também sinérgico contra *C. albicans* foi observado por Giordani et al. (2004) quando a atividade antifúngica da combinação do óleo essencial de *Thymus vulgaris* com a anfotericina B foi testada. Comportamento semelhante ao que foi mostrado neste estudo entre a associação do carvacrol com o fluconazol e com a anfotericina B contra *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii*, respectivamente.

A atividade sinérgica da associação entre o óleo essencial de *Origanum vulgare* e o fluconazol contra *C. albicans* foi evidenciada por Bharti; Vasudeva e Dhuhhan (2013), que determinaram a composição do óleo essencial e obtiveram como principal fitoconstituinte o

carvacrol (86,58%). Resultado sinérgico também foi observado entre a combinação do óleo essencial de *Origanum vulgare* e anfotericina B frente a *C. albicans* (ROSATO et al., 2008).

Uma série de métodos *in vitro* têm sido descritos para detectarem os efeitos das interações entre as substâncias associadas, no entanto os métodos *Checkerboard*, *time-kill* e *Etest* são as técnicas mais utilizadas. O método *Checkerboard* é um teste relativamente fácil de realizar, entretanto é apenas uma medida relativa de potência para a combinação. O método de *time-kill*, dos testes de sinergia, avalia a atividade bactericida e fungicida, mas é demorado e trabalhoso. Vários estudos têm comparado os resultados gerados pelos métodos *Checkerboard*, *time-kill* e *Etest* (WEINSTEIN; YOUNG; HEWITT, 1975; CHAN; ZABRANSKY, 1987). Estudo realizado por White et al. (1996) para comparar os métodos de detecção de sinergismo, concluiu que os resultados do método *Etest* parecem concordar muito bem com os resultados do método *Checkerboard* e *time-kill* apesar das diferenças de pontos finais (de inibição em comparação com morte) e meios de crescimento (caldo em comparação com ágar).

Para o ensaio de *Checkerboard* a CIF é calculada para uma determinada cavidade da microplaca, sendo escolhida aquela onde o crescimento microbiano é negativo e a mesma encontra-se na interface entre o crescimento e o não crescimento do microrganismo. A concentração da substância na combinação é dividida pela CIM da mesma substância testada individualmente contra o organismo teste, determinando assim a CIF da substância. O ICIF é a soma de ambas CIFs das substâncias utilizadas (Equação 2, p. 36), na mesma cavidade escolhida em associação (HSIEH; YU; YU, 1993).

$$\text{ICIF} = \frac{\text{CIM}_A \text{ em combinação}}{\text{CIM}_A \text{ individual}} + \frac{\text{CIM}_B \text{ em combinação}}{\text{CIM}_B \text{ individual}} \quad (2)$$

A terapia de combinação antifúngica é importante uma vez que pode trazer efeitos sinérgicos ou, pelo menos, aditividade entre as substâncias utilizadas (OSTROSKY-ZEICHNER, 2008). O sinergismo é entendido como um aumento da eficácia da atividade antifúngica em uma magnitude maior que a soma dos efeitos de cada antifúngico isolado, este efeito é observado quando os fármacos em associação atuam de diferentes modos ou em diferentes alvos farmacológicos. No entanto, a aditividade é descrita como um tipo de resposta sinérgica que ocorre entre fármacos que possuem os mesmos mecanismos de ação (OGA; BASILE, 1994; SKIDMORE-ROTH, 1997; GOODMAN; GILMAN, 2012; PIPPI, 2014). Outros efeitos que podem ocorrer da associação é a indiferença que ocorre quando o mecanismo de ação de um não interfere no mecanismo de ação do outro, as duas substâncias não interagem

sob nenhum aspecto de sua ação farmacocinética ou farmacodinâmica. Já o antagonismo ocorre quando a resposta farmacológica de uma substância é reduzida na presença de outra através de mecanismos químicos, farmacocinéticos, competição ou mesmo bloqueio de um mesmo receptor (OLIVEIRA, 1986).

É importante ressaltar que atualmente a combinação de medicamentos antifúngicos já é usualmente utilizada para tentar superar os problemas encontrados na terapia individual. No entanto, paralelamente são realizados estudos que determinam a atividade antifúngica de substâncias que não foram desenvolvidas ou conhecidas sua atividade antimicrobiana, e o desenvolvimento da terapia de combinação com essas substâncias é capaz de promover uma terapia mais eficaz (NYILASI et al., 2010).

O melhor efeito esperado na associação entre duas substâncias é a sinergia. Logo, não podemos desconsiderar a importância pelo conhecimento do real efeito produzido na combinação de fitoconstituintes e antifúngicos, mesmo que os resultados produzidos sejam de aditividade, indiferença ou antagonismo. Porém, é importante salientar que efeito antagônico não foi observado, resultado este que seria ruim e impossibilitaria uma possível terapia combinada. Nas associações entre o carvacrol e os antifúngicos realizadas podemos observar que efeitos aditivos foram mostrados e que diante a própria definição, acaba sendo uma interação benéfica entre as substâncias e que possibilitariam seu uso combinado. Todavia, resultados indiferentes foram mostrados e que apesar de não ocorrer interação propriamente dita entre as substâncias, o carvacrol foi capaz de reduzir a CIM dos antifúngicos na maioria dessas associações, o que não deixaria de ser uma importante alternativa terapêutica.

6 CONCLUSÕES

Os resultados evidenciados por este estudo mostraram atividade antifúngica do carvacrol frente as cepas de *C. não-albicans*, fato este importante pois tal informação fornece expectativas mais claras para os estudos farmacológicos futuros, como o ponto de vista de sua toxicidade, sua possível aplicação terapêutica, possíveis mecanismos de ação envolvidos e eficácia para assegurar, assim, seu uso *in vivo*. Outro aspecto importante, foi o perfil de atividade dos antifúngicos contra as cepas utilizadas, sendo esta uma informação importante para conhecermos o perfil de sensibilidade destas cepas frente aos antifúngicos disponíveis no mercado, independentes de serem isolados clínicos ou cepas padrões. A maior atividade antifúngica foi vista com o cetoconazol, seguido da anfotericina B, e por último, o fluconazol.

Os efeitos das associações entre o carvacrol e os antifúngicos permitiu concluir que a combinação entre o fitoconstituente com cetoconazol e anfotericina B promoveram atividade sinérgica frente a *C. guilliermondii* LM-103, ao passo que a associação com o fluconazol teve atividade sinérgica quando testado contra *C. parapsilosis* ATCC 22019. Resultados aditivos foram encontrados em 25% das associações, essa interação é benéfica, visto que a aditividade é uma forma de sinergia entre as substâncias. A indiferença também foi observada neste estudo, em 50% das associações. Ponto importante a ser considerado, é que resultados antagônicos não foram encontrados, já que é interessante que os estudos de associação entre substâncias antifúngicas não apresentem o antagonismo, onde tal efeito poderia levar a uma interação negativa entre as substâncias.

REFERÊNCIAS

- ABBASZADEH, S.; SHARIFZADEH, A.; SHOKRI, H.; KHOSRAVI, A. R.;
 ABBASZADEH, A. Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agentes to control the growth of food-relevant fungi. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 24, n. 2, p. 51-56, jun. 2014.
- AJENJO, H. M. C.; AQUEVEDO, S. A.; GUZMA Ñ, D. A. M.; POGGI, M. H.; CALVO, A. M.; CASTILLO, V. C.; LEOÑ, C. E.; ANDRESEN, H. M.; LABARCA, L. J.
 Epidemiological profile of invasive candidiasis in intensive care units at a university hospital. **Revista Chilena Infectologia**, v. 28, n. 2, p. 118-122, abr. 2011.
- AHMAD, A.; KHAN, A.; AKTAR, F.; YOUSUF, S.; XESS, I.; KHAN, L. A.; MANZOOR, N. Fungicidal activity of thymol and carvacrol by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 30, n. 1, p. 41-50, jan. 2011.
- AHMAD, A.; KHAN, A.; MANZOOR, N. Reversal of efflux mediated antifungal resistance underlies synergistic activity of two monoterpenes with fluconazol. **European Journal of pharmaceutical Sciences**, v. 48, n. 1-2, p. 80-86, jan. 2013.
- AHMED, A.; AZIM, A.; BARONIA, A.; MARAK, R. K.; GURJAR, M. Invasive candidiasis in non neutropenic critically ill-need for region-specific management guidelines. **Indian Journal of Critical Care Medicine**, v. 19, n. 6, p. 333-339, jun. 2015.
- ALMIRANTE, B.; RODRIGUEZ, D.; CUENCA-ESTRELLA, M.; ALMELA, M.; SANCHEZ, F.; AYATS, J.; ALONSO-TARRES, C.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L.; PAHISSA, A. Epidemiology, risk factors, and prognosis of *Candida parapsilosis* bloodstream infections: case-control population-based surveillance study of patients in Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. **Journal Clinical Microbiology**, v. 44, n. 5, p. 1681-1685, maio 2006.
- AMBER, K.; AIJAZ, A.; IMMACULATA, X.; LUQMAN, K. A.; NIKHAT, M. Anticandidal effect of *Ocimum sanctum* essential oil and its synergy with fluconazole and ketoconazole. **Phytomedicine**, v. 17, n. 12, p. 921-925, out. 2010.
- ARENDRUP, M.; HORN, T.; FRIMODT-MOLLER, N. *In vivo* pathogenicity of eight medically relevant *Candida* species in an animal model. **Infection**, v. 30, n. 5, p. 286-291, out. 2002.

ARENDRUP, M. C.; FUURSTED, K.; GAHRN-HANSEN, B.; JENSEN, I. M.; KNUDSEN, J. D.; LUNDGREN, B.; SCHØNHEYDER, H. C.; TVEDE, M. Seminal surveillance of fungemia in Denmark: notably high rates of fungemia and numbers of isolates with reduced azole susceptibility. **Journal Clinical Microbiology**, v. 43, n. 9, p. 4434–4440, set. 2005.

ARENDRUP, M. C.; FUURSTED, K.; GAHRN-HANSEN, B.; SCHONHEYDER, H. C.; KNUDSEN, J. D.; JENSEN, I. M.; BRUUN, B.; CHRISTENSEN, J. J.; JOHANSEN, H. K. Semi-national surveillance of fungaemia in Denmark 2004-2006: increasing incidence of fungaemia and numbers of isolates with reduced azole susceptibility. **Clinical Microbiology Infection**, v. 14, n. 5, p. 487-494, maio 2008.

ARENDRUP, M. C.; BRUUN, B.; CHRISTENSEN, J. J.; FUURSTED, K.; JOHANSEN, H. K.; KJAELDGAARD, P.; KNUDSEN, J. D.; KRISTENSEN, L.; MOLLER, J.; NIELSEN, L.; ROSENVINGE, F. S.; RÖDER, B.; SCHONHEYDER, H. C.; THOMSEN, M. K.; TRUBERG, K. National surveillance of fungemias in Denmark (2004 to 2009). **Journal Clinical Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 325-334, jan 2011.

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

BARROSO, J. A. **Atividade do carvacrol e timol in vivo na inibição de *Streptococcus mutans* e experiência de cárie em crianças livres de cárie: um estudo longitudinal**. 2010. 206 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Programa de Pós-graduação em Odontologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 2010.

BASER, K. H. Biological and Pharmacological Activities of Carvacrol and Carvacrol Bearing Essential Oils. **Current Pharmaceutical Design**, v. 14, n. 29, p. 3106-3120, 2008.

BEDOUT, C.; GOMEZ, B. *Candida* y candidiasis invasora: un reto continuo para su diagnóstico temprano. **SciELO**, v. 14, n. 2, p. 159–171, dez. 2010.

BERENBAUM, M. C. Synergy, additivism and antagonism in immunosuppression-a critical review. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 28, n. 1, p. 1-18, abr. 1977.

BHARTI, V.; VASUDEVA, N.; DHUHAN, J. S. Combination studies of *Origanum vulgare* extract fractions and volatile oil along with ciprofloxacin and fluconazole against common fish pathogens. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 3, n. 1, p. 239-246, fev. 2013.

BRITO, E. H. S. **Caracterização fenotípica e perfil de sensibilidade antifúngica de cepas de *Candida spp.* e *Malassezia pachydermatis*, oriundas de cães**. 2005. 140 f. Dissertação

(Mestrado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza. 2005.

BRUDER-NASCIMENTO, A.; CAMARGO, C. H.; SUGIZAKI, M. F.; SADATSUNE, T.; MONTELLI, A. C.; MONDELLI, A. L.; BAGAGLI, E. Species distribution and susceptibility profile of *Candida* species in a Brazilian public tertiary hospital. **BMC Research Notes**, v. 3, n. 1, p. 1-5, jan. 2010.

CANNON, R. D.; LAMPING, E.; HOLMES, A. R.; NIIMI, K.; BARET, P. V.; KENIYA, M. V.; TANABE, K.; NIIMI, M.; GOFFEAU, A.; MONK, B. C. Efflux-mediated antifungal drug resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 2, p. 291–321, abr. 2009.

CASTRO, R. D.; LIMA, E. O. Atividade antifúngica in vitro do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* L. sobre *Candida* spp.. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 39, n. 3, p. 179-184, maio/jun. 2010.

CHAILLOT, J.; TEBBJI, F.; REMMAL, A.; BOONE, C.; BROWN, G. W.; BELLAOUI, M.; SELLAM, A. The monoterpene generates endoplasmic reticulum stress in the pathogenic fungus *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 59, n. 8, p. 4584-4592, maio 2015.

CHAN, E. L.; ZABRANSKY R. J. Determination of synergy by two methods with eight antimicrobial combinations against tobramycin-susceptible and tobramycin-resistant strains of *Pseudomonas*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 6, n. 2, p. 157-164, fev. 1987.

CIANDRINI, B.; CAMPANA, R.; FEDERICI, S.; MANTI, A.; BATTISTELLI, M.; FALCIERI, E.; PAPA, S.; BAFFONE, W. In vitro activity of Carvacrol against titanium-adherent oral biofilms and planktonic cultures. **Clinical Oral Investigations**, v. 18, n. 8, p. 2001-2013, nov. 2014.

CLSI. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Document M27-A3**, v. 28, n. 14, abr. 2008. 51 p.

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

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T.; SILVA, L. R. B. F.; MONFARDINI, L. P. D. A.; CUNHA, A. K. B.; RADY P.; ALVES, T.; ROSAS, R. C. Prospective observational study of

candidemia in São Paulo, Brazil: incidence rate, epidemiology, and predictors of mortality. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 28, n. 5, p. 570-576, maio 2007.

CORREA-ROYERO, J.; TANGARIFE, V.; DURÁN, C.; STASHENKO, E.; MESA, A. *In vitro* antifungal activity and cytotoxic effect of essential oils and extracts of medicinal and aromatic plants against *Candida krusei* and *Aspergillus fumigatus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 5, p. 734-741, set. 2010.

COSTA-DE-OLIVEIRA, S.; PINA-VAZ, C.; MENDONÇA, D.; RODRIGUES, A. G. A first Portuguese epidemiological survey of fungaemia in a university hospital. **European Journal Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 27, n. 5, p. 365–374, maio 2008.

COUTINHO, H. D. M. **Avaliação da atividade antibacteriana e fotossensibilizante de produtos naturais da região do cariri cearense**. 2008. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Departamento de Farmacologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa. 2008.

CRUZ, M. C. S.; SANTOS, P. O.; BARBOSA JÚNIOR, A. M.; MÉLO, D. L. F. M.; ALVIANO, C. S.; ANTONIOLLI, A. R.; ALVIANO, D. S.; TRINDADE, R. C. Antifungal activity of Brazilian medicinal plants involved in popular treatment of mycoses. **Journal of Ethnopharmacol**, v. 111, n. 2, p. 409–412, maio 2007.

CUENCA-ESTRELLA, M. Combinations of antifungal agents in therapy-what value are they. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 54, n. 5, p. 854-869, nov. 2004.

DAMASCENO, S. R. B.; OLIVEIRA, F. R. A. M.; CARVALHO, N. S.; BRITO, C. F. C.; SILVA, I. S.; SOUSA, F. B. M.; SILVA, R. O.; SOUSA, D. P.; BARBOSA, A. L. R.; FREITAS, R. M.; MEDEIROS, J. V. R. Carvacryl acetate, a derivative of carvacrol, reduces nociceptive and inflammatory response in mice. **Life Sciences**, v. 94, n. 1, p. 58–66, jan. 2014.

DANTAS, I. C.; GUIMARÃES, F. R. Plantas medicinais comercializadas no município de Campina Grande, PB. **Biofar: Revista de Biologia e Farmácia**, v. 1, n. 1, p. 1-13, 2007.

DUGGAL, S. D.; JENA, P. P.; GUR, R.; KUMAR, A.; RONGPHARPI, S. R.; PANDEY, M.; XESS, I.; WADHWA, V. Recurring Events of *Candida krusei* Septicaemia: First Report from na ICU. **Journal of Mycology**, v. 2015, p. 1-6, set. 2015.

DRAGO, L.; DE VECCHI, E.; NICOLA, L.; GISMONDO, M. R. *In vitro* evaluation of antibiotics for emprirical therapy of suspected methicilin resistant *Staphylococcus aureus* severe respiratory infections. **BMC Infections Diseases**, v. 7, n. 111, p. 1-7, set. 2007.

EGGIMANN, P.; GARBINO, J.; PITTET, D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. **Lancet Infectious Diseases**, v. 3, n. 11, p. 685–702, nov. 2003.

ENDO, E. H, CORTEZ, D. A, UEDA-NAKAMURA, T; NAKAMURA, C. V; DIAS FILHO, B. P. Potent antifungal activity of extracts and pure compound isolated from pomegranate peels and synergism with fluconazole against *Candida albicans*. **Research in Microbiology**, v. 161, n. 7, p. 534-540, set. 2010.

FARIAS, N. M.; LIMA, E. O. **Atividade antifúngica de óleos essenciais obtidos de plantas medicinais contra leveduras do gênero *Candida*: uma alternativa no controle da infecção hospitalar**. XVI Prêmio Jovem Cientista. Edição: Saúde da população, controle da infecção hospitalar. Porto Alegre, 2000.

GIOLO, M. P.; SVIDZINSKI, T. I. E. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, n. 3, p. 225-234, jun. 2010.

GIORDANI, R.; REGLI, P.; KALOUSTIAN, J.; MIKAIL, C.; ABOU, L.; PORTUGAL, H. Antifungal effect of various essential oils against *Candida albicans*. Potentiation of antifungal action of amphotericin B by essential oil from *Thymus vulgaris*. **Phytotherapy Research**, v. 18, n. 12, p. 990–995, dez. 2004.

GIRI, S.; KINDO, A. J. A review of *Candida* species causing blood stream infection. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 30, n. 3, p. 270–278, jul./set. 2012.

GOODMAN, M. J.; GILMAN, A. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 12. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2012.

GONZALEZ, G. M.; ELIZONDO, M.; AYALA, J. Trends in species distribution and susceptibility of bloodstream isolates of *Candida* collected in Monterrey, Mexico, to seven antifungal agents: results of a 3-year (2004 to 2007) surveillance study. **Journal Clinical Microbiology**, v. 46, n. 9, p. 2902–2905, set. 2008.

GROSSMAN, N. T.; CHILLER, T. M.; LOCKHART, S. R. Epidemiology of Echinocandin Resistance in *Candida*. **Current Fungal Infection Reports**, v. 8, n. 4, p. 243–248, dez. 2014.

HACHEM, R.; HANNA, H.; KONTOYIANNIS, D.; JIANG, Y.; RAAD, I. The changing epidemiology of invasive candidiasis: *Candida glabrata* and *Candida krusei* as the leading

causes of candidemias in hematologic malignancy. **Cancer**, v. 112, n. 11, p. 2493-2499, jun. 2008.

HSIEH, M. H.; YU, C. M.; YU, V. L. Synergy Assessed by Checkerboard. A critical analysis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 16, n. 4, p. 343-349, maio/jun. 1993.

HOPE, W.; MORTON, A.; EISEN, D. D. P. Increase in prevalence of nosocomial non-*Candida albicans* candidemia and the association of *Candida krusei* with fluconazole use. **Journal of Hospital Infection**, v. 50, n. 1, p. 56-65, jan. 2002.

JESUS, F. P. K.; FERREIRO, L.; BIZZI, K. S.; LORETO, É. S.; PILOTTO, M. B.; LUDWIG, A.; ALVES, S. H.; ZANATTE, R. A.; SANTURIO, J. M. In vitro activity of carvacrol and thymol combined with antifungals or antibacterials against *Pythium insidiosum*. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 25, n. 2, p. e89-e93, jun. 2015.

KHAN, A.; AHMAD, A.; AKHTAR, F.; YOUSUF, S.; XESS, I.; KHAN, L. A.; MANZOOR, N. *Ocimum sanctum* essential oil and its active principles exert their antifungal activity by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity. **Research in Microbiology**, v. 161, n. 10, p. 816-823, dez. 2010.

KONTOYIANNIS, D. P.; MANTADAKIS, E.; SAMONIS, G. Systemic mycoses in the immunocompromised host: An update in antifungal therapy. **Journal of Hospital Infection**, v. 53, n. 4, p. 243–258, abr. 2003.

LAMBERT, R. J. W.; SKANDAMIS, P.; COOTE, P. J.; NYCHAS, G. J. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal Applied Microbiololy**, v. 91, n. 3, p. 453–462, set. 2001.

LEITE, M. C. A. **Citral e geraniol: atividade antifúngica in vitro sobre leveduras do gênero *Candida* de importância hospitalar**. 2015. 81 f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Departamento de Farmacologia, Universidade Federal Paraíba, João Pessoa. 2015.

LEWIS, R. E.; DIEKEMA, D. J.; MESSER, S. A.; PFALLER, M. A.; KLEPSEK M. E. Comparison of *Etest*, *checkerboard* dilution and *time-kill* studies for the detection of synergy or antagonism between antifungal agents tested against *Candida* species. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 49, n. 2, p. 345–351, fev. 2002.

LIGUORI, G.; ONOFRIO, V.; LUCARIELLO, A.; GALLE, F.; SIGNORIELLO, G.; COLELLA, G.; D'AMORA, M.; ROSSANO, F. Oral candidiasis: a comparison between

conventional methods and multiplex polymerase chain reaction for species identification. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 24, n. 1, p. 76–78, fev. 2009.

LIMA, I. O.; PEREIRA, F. O.; OLIVEIRA, W. A.; LIMA, E. O.; MENEZES, E. A.; CUNHA, F. A.; DINIZ, M. M. F. F. Antifungal activity and mode of action of carvacrol against *Candida albicans* strains. **Journal of Essential Oil Research**, v. 25, n. 2, p. 1-6, jan. 2013.

LOBO, P. L.; FONTELES, C. S.; MARQUES, L. A.; CARVALHO, C. B.; FONSECA, S. G.; JAMACARU, F. V.; MORAES, M. E. The efficacy of three formulations of *Lippia sidoides* Cham. essential oil in the reduction of salivary *Streptococcus mutans* in children with caries: A randomized, double-blind, controlled study. **Phytomedicine**, v. 21, n. 2, p. 1043-1047, jul./ago. 2014.

LOCKHART, S. R. Current Epidemiology of *Candida* Infection. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 36, n. 17, p. 131–136, set. 2014.

LORIAN, V. **Antibiotics in Laboratory Medicine**. 3. ed. New York: Williams & Wilkins, 1991. 1250 p.

MAGI, G.; MARINI, E.; FACINELLI, B. Antimicrobial activity of essential oils and carvacrol, and synergy of carvacrol and erythromycin, against clinical erythromycin-resistant Group A *Streptococci*. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 6-165, mar. 2015.

MANOHAR, V.; INGRAM, C.; GRAY, J.; TALPUR, N. A.; ECHARD, B. W.; BAGCHI, D.; PREUSS, H. G. Antifungal activities of origanum oil against *Candida albicans*. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 228, n. 1-2, p. 111-117, dez. 2001.

MARCOS-ARIAS, C.; ERASO, E.; MADARIAGA, L.; QUINDÓS, G. *In vitro* activities of natural products against oral *Candida* isolates from denture wearers. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, p. 111-119, nov. 2011.

MASALA, L.; LUZZATI, R.; MACCACARO, L.; ANTOZZI, L.; CONCIA, E.; FONTANA, R. Nosocomial cluster of *Candida guilliermondii* fungemia in surgical patients. **European Journal Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 22, n. 11, p. 686–688, nov. 2003.

MAUBON, D., GARNAUD, C., CALANDRA, T., SANGLARD, D. E CORNET, M. Resistance of *Candida spp.* to antifungal drugs in the ICU: where are we now? **Intensive Care Medicine**, v. 40, n. 9, p. 1241–1255, set. 2014.

MEDEIROS, E. A.; LOTT, T. J.; COLOMBO, A. L.; GODOY, P.; COUTINHO, A. P.; BRAGA, M. S.; NUCCI, M.; BRANDT, M. E. Evidence for pseudo-outbreak of *Candida guilliermondii* fungemia in a university hospital in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 942-947, mar. 2007.

METCALF, S. C.; DOCKRELL, D. H. Improved outcomes associated with advances in therapy for invasive fungal infections in immunocompromised hosts. **Journal of Infection**, v. 55, n. 4, p. 287–299, out. 2007.

MEZZARI, A.; WLIBBELLING, A. M. P.; MAY, G. G.; ALBÉ, G. C.; FILIK, H. P.; ESQUERDO, D.; FIDALGO, N. C. G.; BEHAR, P. R. P. Presença e susceptibilidade aos antifúngicos do *Cryptococcus spp.* em excretas de pombos nos arredores dos grandes hospitais de Porto Alegre. **Revista da Associação Médica do Rio Grande do Sul**, v. 59, n. 3, p. 204-208, jul./set. 2015.

MICELI, M. H.; D'IAZ, J. A.; LEE S. A. Emerging opportunistic yeast infections. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 11, n. 2, p. 142–151, fev. 2011.

MITSUGUI, C. S.; TOGNIM, M. C. B.; CARRARA-MARRONE, F. E.; GARCIA, L. B. Efeito antimicrobiano *in vitro* da associação de polimixina B e ceftazidima em amostras clínicas de *Pseudomonas aeruginosa*. **Ciência, Cuidado e Saúde**, v. 7, suplement. 1, p. 76-81, 2008.

MOHADDESE, M.; KAZEMPOUR, N. The antibacterial activity of *Satureja Khuzestanica* essential oil against clinical isolates of *E. coli*. **Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products**, v. 11, n. 2, p. 1-6, maio. 2016.

MOTA, K. L. S.; PEREIRA, F. O.; OLIVEIRA, W. A.; LIMA, I. O.; LIMA, E. O. Antifungal activity of *Thymus vulgaris* L. essential oil and its constituent phytochemicals against *Rhizopus oryzae*: interaction with ergosterol. **Molecules**, v. 17, n. 12, p. 14418-14433, dez. 2012.

MUKHERJEE, P. K.; SHEEHAN, D. J.; HITCHCOCK, C. A.; GHANNOUM, M. A. Combination Treatment of Invasive Fungal Infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, n. 1, p. 163-194, jan. 2005.

NEUMANN, A.; BAGINSKI, M.; WINCZEWSKI, S.; CZUB, J. The Effect of Sterols on Amphotericin B Self-Aggregation in Lipid Bilayer as Revealed by Free Energy Simulations. **Biophysical Journal**, v. 104, n. 7, p. 1485-1494, abr. 2013.

NÓBREGA, R. O.; TEIXEIRA, A. P.; OLIVEIRA, W. A.; LIMA, E. O.; LIMA, I. O. Investigation of the antifungal activity of carvacrol against strains of *Cryptococcus neoformans*. **Pharmaceutical Biology**, v. 25, p. 1-6, maio 2016.

NOEL, T. The cellular and molecular defense mechanisms of the *Candida* yeasts against azole antifungal drugs. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 22, n. 2, p. 173–178, jun. 2012.

NUCCI, M.; QUEIROZ-TELLES, F.; TOBO'N, A. M.; RESTREPO, A.; COLOMBO, A. L. Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. **Clinical Infections Diseases**, v. 51, n. 5, p. 561–570, set. 2010.

NYILASI, I.; KOCSUBÉ, S.; KRIZSÁN, K.; GALGÓCZY, L.; PESTI, M.; PAPP, T.; VÁGVÖLGYI, C. *In vitro* synergistic interactions of the effects of various statins and azoles against some clinically importante fungi. **FEMS Microbiology Letters**, v. 307, n. 2, p. 175-184, jun. 2010.

ODDS, F. C.; BROWN, A. J. P.; GOW, N. A. R. Antifungal agents: mechanisms of action. **Treds in Microbiology**, v. 11, n. 6, p. 272-279, jun. 2003.

OGA, S.; BASILE, A. C. **Medicamentos e suas interações**. São Paulo: Atheneu, 1994.

OLIVEIRA, D. S. Interação Medicamentosa: parte II. **Caderno de Farmácia**, v. 2, n. 2, p. 97-110, 1986.

OLIVEIRA, I. S.; SILVA, F. V.; VIANA, A. F.; SANTOS, M. R.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; MARTINS, M. C.; NUNES, P. H.; OLIVEIRA, F. A.; OLIVEIRA, R. C. Gastroprotective activity of carvacrol on experimentally induced gastric lesions in rodents. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 385, n. 9, p. 899–908, set. 2012.

OSTROSKY-ZEICHNER, L. Combination antifungal therapy: a critical review of the evidence. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, suplem. 4, p. 65-70, maio 2008.

PAHWA, N.; KUMAR, R.; NIRKHIWALE, S.; BANDI, A. Species distribution and drug susceptibility of *Candida* in clinical isolates from a tertiary care centre at Indore. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 32, n. 1, p. 44–48, jan./mar. 2014.

PAPON, N.; COURDAVAULT, V.; CLASTRE, M.; BENNETT, R. J. Emerging and Emerged Pathogenic *Candida* Species: Beyond the *Candida albicans* Paradigm. **Pathogens**, v. 9, n. 9, p. 1-4, set. 2013.

PARAMYTHIOTOU, E.; FRANTZESKAKI, F.; FLEVARI, A.; ARMAGANIDIS, A.; DIMOPOULOS, G. Invasive fungal infections in the ICU: How to approach, how to treat. **Molecules**, v. 19, n. 1, p. 1085–119, jan. 2014.

PEDROSO, R. S.; MENEZES, R. P.; FERREIRA, J. C.; PENATTI, M. P. A.; SÁ, W. M.; MALVINO, L. D. S.; CANDIDO, R. C.; MOREIRA, T. A. Sensibilidade de isolados de *Candida spp.* a antifúngicos por disco-difusão em ágar e microdiluição em caldo. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 1, p. 304-311, jan./fev. 2014.

PEMAN, J.; CANTON, E.; ESPINEL-INGROFF, A. Antifungal drug resistance mechanisms. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 7, n. 4, p. 453-460, maio 2009.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; SHEEHAN, D. J. Interpretive breakpoints for fluconazole and *Candida* revisited: a blueprint for the future of antifungal susceptibility testing. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 2, p. 435-447, abr. 2006.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; PROCOP, G. W.; RINALDI, M. G. Multicenter comparison of the VITEK 2 antifungal susceptibility test with the CLSI broth microdilution reference method for testing amphotericin B, flucytosine, and voriconazole against *Candida spp.* **Journal Clinical Microbiology**, v. 45, n. 11, p. 3522–3528, nov. 2007.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 1, p. 133–163, jan. 2007.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; GIBBS, D. L.; NEWELL, V. A.; ELLIS, D.; TULLIO, V.; RODLOFF, A.; FU, W.; LING, T. A. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. **Journal Clinical Microbiology**, v. 48, n. 4, p. 1366–1377, abr. 2010.

PFALLER, M. A.; MESSER, S. A.; MOET, G. J.; JONES, R. N.; CASTANHEIRA, M. *Candida* bloodstream infections: comparison of species distribution and resistance to echinocandin and azole antifungal agents in intensive care unit (ICU) and non-ICU settings in the SENTRY antimicrobial surveillance program (2008e2009). **International Journal Antimicrobial Agents**, v. 38, n. 1, p. 65-69, jul. 2011.

PIPPI, B. **Avaliação da capacidade de *Candida parapsilosis* e *Candida glabrata* desenvolverem resistência fenotípica á Própolis Vermelha Brasileira e ao fluconazol e avaliação de sua atividade antifúngica em associação com fluconazol e anidulafungina.** 2014. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2014.

RAI, M.; MARES, D. **Plant-derived antimycotics: current trends and future prospects**. New York: Taylor & Francis, 2003.

RAMOS, T. Z.; PIZZOLITTO, E. L.; PIZZOLITTO, A. C. Uso do teste com cloridrato de trifetil tetrazólio (CTT) para detecção de bacteriúria sintomática e assintomática. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 38, n. 3, p. 197-199, ago. 2006.

RUKAYADI, Y.; HAN, S.; YONG, D.; HWANG, J. In vitro activity of xanthorrhizol against *Candida glabrata*, *C. guilliermondii*, and *C. parapsilosis* biofilms. **Medical Mycology**, v. 49, n. 1, p. 1–9, jan. 2011.

ROSA, C.; CÂMARA, S. G; BÉRIA, J. U. Representações e intenção de uso da fitoterapia na atenção básica à saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 16, n. 1, p. 311-318, jan. 2011.

ROSATO, A.; VITALI, C.; GALLO, D.; BALENZANO, L.; MALLAMACI, R. The inhibition of *Candida* species by selected essential oils and their synergism with amphotericin B. **Phytomedicine**, v. 15, n. 8, p. 635-638, ago. 2008.

ROSSATO, A. E. **Fitoterapia Racional: Aspectos Taxonômicos, Agroecológicos, Etnobotânicos e Terapeúticos**. 1. ed. Florianópolis: DIOESC, 2012. 213 p.

SAAD, A.; FADLI, M.; BOUAZIZ, M.; BENHARREF, A.; MEZRIOUI, N. E.; HASSANI, L. Anticandidal activity of the essential oils of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* and their synergism with amphotericin B and fluconazol. **Phytomedicine**, v. 17, n. 13, p. 1057-1060, nov. 2010.

SANGLARD, D. Resistance and tolerance mechanisms to antifungal drugs in fungal pathogens. **Mycologist**, v. 17, n. 2, p. 74-78, maio 2003.

SANTOS JÚNIOR, I. D.; SOUZA, I. M. A.; BORGES, R. G.; SOUZA, L. S. B.; SANTANA, W. J.; COUTINHO, H. M. D. Características gerais da ação, do tratamento e da resistência fúngica ao fluconazol. **Scientia Medica**, v. 15, n. 3, p. 189-197, jul./set. 2005.

SARDI, J. C.; ALMEIDA, A. M.; MENDES-GIANNINI, M. J. New antimicrobial therapies used against fungi present in subgingival sites - a brief review. **Archives of Oral Biology**, v. 56, n. 10, p. 951-959, out. 2011.

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

SARTORATTO, A.; MACHADO, A. L. M.; DELARMELENA, C.; FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, M. T. C.; REHDER, V. G. L. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 275-280, out./dez. 2004.

SAVINI, V.; CATAVITELLO, C.; ONOFRILLO, D.; MASCIARELLI, G.; ASTOLFI, D.; BALBINOT, A.; FEBBO, F.; D'AMARIO, C.; D'ANTONIO, D. What do we know about *Candida guilliermondii*? A voyage through-out past and current literature about this emerging yeast. **Mycoses**, v. 54, n. 5, p. 434–441, set. 2011.

SCORZONI, L.; BENADUCCI, T.; ALMEIDA, A. M. F.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; MENDES-GIANNINI, M. J. S. Comparative study of disk diffusion and microdilution methods for evaluation of antifungal activity of natural compounds against medical yeasts *Candida spp* and *Cryptococcus sp*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 1, p. 25-34, jul. 2007.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz dos autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. 396 p.

SINGH, S.; SOBEL, J. D.; BHARGAVA, P.; BOIKOV, D.; VAZQUEZ, J. A. Vaginitis due to *Candida krusei*: epidemiology, clinical aspects, and therapy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 35, n. 9, p. 1066–1070, nov. 2002.

SILVA, S.; NEGRI, M.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D. W.; AZEREDO, J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 2, p. 288–305, mar. 2012.

SKIDMORE-ROTH, L. **Nursing Drug Reference**. St. Louis: Mosby, 1997.

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

SYDNOR, E. R. M.; PERL, T. M. Hospital epidemiology and infection control in acute-care settings. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 1, p. 141–173, jan. 2011.

TRAGIANNIDIS, A.; TSOULAS, C.; GROLL, A. H. Invasive candidiasis and candidaemia in neonates and children: update on current guidelines. **Mycoses**, v. 58, n. 1, p. 10–21, jan. 2015.

TROFA, D.; GACSER, A.; NOSANCHUK, J. D. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. **Clinical of Microbiology Reviews**, v. 21, n. 4, p. 606-625, out. 2008.

VAN ASBECK, E. C.; CLEMONS, K. V.; STEVENS, D. A. *Candida parapsilosis*: a review of its epidemiology, pathogenesis, clinical aspects, typing and antimicrobial susceptibility. **Critical Reviews Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 283–309, 2009.

WAGNER H. Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. **Fitoterapia**, v. 81, n. 1, p. 34-37, jan. 2011.

WANKHAR, W.; SRINIVASAN, S.; RAJAN, R.; RATHINASAMY, S. Phytochemicals screening and antimicrobial efficacy of *Scoparia dulcis* Linn (Scrophulariaceae) against clinical isolates. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 3, n. 6, p. 17-21, mar./abr. 2015.

WEINSTEIN, R. J.; YOUNG L. S.; HEWITT W. L. Comparison of methods for assessing in vitro antibiotic synergy against *Pseudomonas* and *Serratia*. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 86, n. 5, p. 853–862, nov. 1975.

WHITE, R. L.; BURGESS, D. S.; MANDURU, M.; BOSSO, J. A. Comparison of three different *in vitro* methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard, and E test. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 40, n. 8, p. 1914–1918, ago. 1996.

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

ZAITZ, C.; CAMPBELL, I.; MARQUES, S. A.; RUIZ, L. R. B.; FRAMIL, V. M. S. **Compêndio de micologia médica**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.