



Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Odontologia de Piracicaba

JANAINA PRISCILA BARBOSA

**Atividade anti-*Candida* de óleos essenciais
de espécies de *Eucalyptus*.**

Piracicaba

2018

JANAINA PRISCILA BARBOSA

**Atividade anti-*Candida* de óleos essenciais
de espécies de *Eucalyptus*.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Biologia Buco-Dental, na Área de Microbiologia e Imunologia.

Orientador: Prof. Dr. José Francisco Höfling

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELA ALUNA JANAINA
PRISCILA BARBOSA E ORIENTADA
PELO PROF. DR. JOSÉ FRANCISCO
HÖFLING.

Piracicaba

2018

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Marilene Girello - CRB 8/6159

B234a Barbosa, Janaina Priscila, 1991-
Atividade anti-*Candida* de óleos essenciais de espécies de *Eucalyptus* /
Janaina Priscila Barbosa. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: José Francisco Hofling.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade
de Odontologia de Piracicaba.

1. Óleos voláteis. 2. Antifúngicos. 3. Eucalipto. 4. *Candida*. I. Hofling, José
Francisco, 1947-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: *Anti-Candida* activity of essential oils from *Eucalyptus* species

Palavras-chave em inglês:

Oils, volatile

Antifungal agents

Eucalyptus

Candida

Área de concentração: Microbiologia e Imunologia

Titulação: Mestra em Biologia Buco-Dental

Banca examinadora:

José Francisco Hofling [Orientador]

Denise Madalena Palomari Spolidorio

Rafael Nobrega Stipp

Data de defesa: 28-02-2018

Programa de Pós-Graduação: Biologia Buco-Dental



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 28 de Fevereiro de 2018, considerou a candidata JANAINA PRISCILA BARBOSA aprovada.

PROF. DR. JOSÉ FRANCISCO HOFLING

PROF^a. DR^a. DENISE MADALENA PALOMARI SPOLIDORIO

PROF. DR. RAFAEL NOBREGA STIPP

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

EPÍGRAFE

*“Porque Dele e por Ele, e para Ele, são todas as coisas; Glória pois,
à Ele eternamente. Amém.” (Romanos 11:36)*

*“Deus é bom o tempo todo e o tempo todo Deus é bom.”
(Ivan Dionizio da Cruz)*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À DEUS

Que tornou esse sonho possível, me dando força para continuar nos momentos difíceis.

À FAMÍLIA

Aos meus pais José e Meire, pelo incentivo e amor incondicional, por sempre acreditar que seria possível, e sem vocês nada disso seria possível.

À minha avó Magnólia por estar sempre presente em minha vida.

Às minhas irmãs Jhoannyne e Josieyne por me apoiarem sempre.

Ao meu amor, Maycon Morato, por toda a paciência, compreensão, carinho e amor. E por dividir mais esse sonho comigo.

AO MEU ORIENTADOR

José Francisco Höfling por ter me dado esta oportunidade, pela confiança, ensinamentos e amizade.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba e Universidade Estadual de Campinas, pela excelência em ensino e pesquisa.

Ao Prof. Jacks Jorge Júnior, pela disponibilidade, paciência e pelas orientações como Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), assim como todos da equipe do CEP-FOP.

Aos Professores da área Dr. José Francisco Höfling, Dra. Renata de Oliveira Mattos- Graner e Dr. Rafael Nobrega Stipp pelo aprendizado e conhecimento transmitidos.

Aos Professores Dra. Denise Madalena Palomari Spolidório e Dr. Rafael Nobrega Stipp por aceitarem compor a banca examinadora.

Aos Professores Dr. Marcelo Fabiano Gomes Boriollo e Dra. Natália Leal Vizoto por aceitarem compor a banca examinadora suplente.

Aos Professores Dr. Marcelo Fabiano Gomes Boriollo, Dra. Janaína de Cássia Orlandi Sardi e Dra. Natália Leal Vizoto por comporem a banca do exame de qualificação.

Aos Técnicos do Laboratório Valéria Defavari Franco e Anderson Laerte Teixeira pelo auxílio nas atividades relacionadas ao desenvolvimento do meu trabalho.

À minha professora da graduação Roselene Canato Felipe de Oliveira, minha grande inspiração, por ter acreditado em mim e me incentivado sempre.

À minha professora da graduação e amiga Jaqueline Soares, por sempre estar presente e me incentivando.

À minha equipe de trabalho Simone Busato de Feiria, Giovana Boni, Marcelle Buso Ramos, Paula Cristina Anibal, Daniele Puppín, Anderson Teixeira e Thaís Oliveira, os meus mais sinceros agradecimentos por toda ajuda e conhecimento compartilhado, em especial a minha amiga/parceira de pesquisa Thaís Oliveira que me deu todo suporte e auxílio durante os experimentos da pesquisa, e pela amizade.

Aos meus colegas e companheiros de laboratório Talita Graziano, Felipe Joia, Josianne Neres, Lívia Alves, Érika Harth Chu e Giovanni Cuya Salvatierra, pela amizade compartilhada.

Às grandes amigadas que foram construídas, Jeferson Júnior da Silva, Rodrigo Bassi, Filipe Matheus Cardoso e Daniele Puppín, muito obrigada por deixarem meus dias mais divertidos.

À minha amiga/irmã Ivete Ribeiro, presente de Deus na minha vida, obrigada por estar sempre ao meu lado em qualquer circunstância, sua amizade foi de extrema importância nos momentos difíceis, obrigada por tudo amiga.

À CAPES e a FAPESP pela bolsa de estudos e auxílio financeiro.

Gratidão!

RESUMO

Os óleos essenciais das folhas de *Eucalyptus citriodora* e *Eucalyptus globulus* apresentam efeitos antimicrobianos demonstrados na literatura, como atividade antibacteriana e antifúngica. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antifúngica dos óleos essenciais de *E. citriodora* e *E. globulus* contra cepas padrão de *Candida* spp. pelo método de microdiluição em caldo M27-A3 (CLSI, 2008), na determinação da CIM e CFM. Os antifúngicos comerciais Anfotericina B e Fluconazol foram utilizados como parâmetros de susceptibilidade. Os óleos essenciais também foram testados nos biofilmes em formação e maduro de *C. albicans* SC5314 e suas respectivas viabilidades celulares foram obtidas pelo corante XTT e leitura em Espectrofotômetro. Imagens dos biofilmes tratados com os óleos foram capturadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Os possíveis efeitos tóxicos dos óleos foram testados em larvas de *Galleria mellonella*. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas. As análises estatísticas foram feitas pelo teste ANOVA um critério, variação *Dunnett*. *E. citriodora* apresentou CIMs e CFMs contra as cepas padrão de *Candida* spp. entre 0,125 mg/mL a 0,5 mg/mL. *E. globulus* apresentou CIMs e CFMs entre 1 mg/mL a 8 mg/mL. Os óleos apresentaram ação antibiofilme contra o biofilme em formação de *C. albicans*, apresentando baixa atividade metabólica até a concentração 1 mg/mL com 7,2% de viabilidade celular do biofilme para *E. citriodora* e 4 mg/mL com 10,7% de viabilidade para *E. globulus*; o biofilme maduro demonstrou atividade metabólica reduzida até a concentração 0,5 mg/mL para *E. citriodora* com 14,1% de viabilidade celular e 8 mg/mL para *E. globulus* com 9,9%. As análises em MEV dos biofilmes de *C. albicans* mostraram diminuição das hifas e deformidades como rugosidade e murchamento nas células e nas hifas presentes. No ensaio de toxicidade realizado em *G. mellonella*, as larvas apresentaram sobrevivência acima de 90% em todas as concentrações testadas indicando baixa toxicidade. Os óleos de *E. citriodora* e *E. globulus* são biologicamente ativos contra as cepas de *Candida* spp.; e o biofilme de *C. albicans*, apresentando baixa toxicidade, podendo ser fontes potenciais para o desenvolvimento de novos fármacos antifúngicos, ou como coadjuvantes.

Palavras-chave: *Eucalyptus* spp., óleo essencial, antifúngico, *Candida* spp.

ABSTRACT

The essential oil of the leaves from *Eucalyptus citriodora* and *Eucalyptus globulus* has been showed as an antibacterial and antifungal alternative agent against microorganisms according the literature. The objective of this work was to evaluate the antifungal activity of the essential oils of *E. citriodora* and *E. globulus* against standard strains of *Candida* spp. by means of the microdilution method in broth M27-A3 (CLSI, 2008), in determining MIC and MFC values. Commercial antifungal agents as Amphotericin B and Fluconazole were used as susceptibility parameters. The essential oils were also tested in the formation and mature biofilms of *C. albicans* SC5314 and their respective cell viabilities were obtained by XTT dye and read in Spectrophotometer. Images of the biofilms treated with the oils were captured by Scanning Electron Microscopy (SEM). The possible toxic effects of the oils were carried out in larvae of *Galleria mellonella*. All trials were performed in triplicates. Statistical analyzes were done using the one-way ANOVA test, *Dunnett* variation. *E. citriodora* presented MICs and MFCs against the standard strains of *Candida* spp. between 0.125 mg/mL and 0.5 mg/mL. *E. globulus* had MICs and MFCs between 1 mg/mL and 8 mg/mL. The oils presented antibiofilm action against the biofilm in the formation of *C. albicans*, presenting low metabolic activity up to the concentration 1 mg/mL with 7.2% of biofilm cell viability for *E. citriodora* and 4 mg/mL with 10.7% viability for *E.globulus*; the mature biofilm showed reduced metabolic activity to 0.5 mg / mL for *E. citriodora* with 14.1% cell viability and 8 mg / mL for *E. globulus* with 9.9%. SEM analyzes of *C. albicans* biofilms showed decreased hyphae and deformities as roughness and wilting in the cells and hyphae present. In the toxicity test performed on *G. mellonella*, larvae showed survival above 90% at all concentrations tested indicating low toxicity. The oils of *E. citriodora* and *E. globulus* presenting low toxicity, being potential sources for the development of new antifungal drugs or as coadjuvants.

Key-words: *Eucalyptus* spp., essential oil, antifungal, *Candida* spp.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Gráfico 1 – Viabilidade celular (%) do biofilme em formação e maduro tratado com *E. citriodora*. 45
- Gráfico 2 – Viabilidade celular (%) do biofilme em formação e maduro tratado com *E. globulus*. 45
- Figura 1 – Controle do biofilme em formação de *C. albicans*. Aumento de 1.500x. 46
- Figura 2 - Controle do biofilme em formação de *C. albicans*. Aumento de 3.000x. 46
- Figura 3 - Biofilme em formação de *C. albicans* exposto ao óleo de *E. citriodora* (0,5 mg/mL) Aumento de 1.500x. 47
- Figura 4 - Biofilme em formação de *C. albicans* exposto ao óleo de *E. citriodora* (0,5 mg/mL) Aumento de 3.000x. 47
- Figura 5 - Biofilme em formação de *C. albicans* exposto ao óleo de *E. citriodora* (1 mg/mL) Aumento de 1.500x. 47
- Figura 6 - Biofilme em formação de *C. albicans* exposto ao óleo de *E. citriodora* (1 mg/mL) Aumento de 3.000x. 47
- Figura 7 - Biofilme em formação de *C. albicans* exposto ao óleo de *E. citriodora* (2 mg/mL) Aumento de 1.500x. 47
- Figura 8 - Biofilme em formação de *C. albicans* exposto ao óleo de *E. citriodora* (2 mg/mL) Aumento de 3.000x. 47
- Figura 9 - Biofilme em formação de *C. albicans* exposto ao óleo de *E. globulus* (4 mg/mL) Aumento de 1.500x. 48

Figura 10 - Biofilme em formação de <i>C. albicans</i> exposto ao óleo de <i>E. globulus</i> (4 mg/mL) Aumento de 3.000x.	48
Figura 11 - Biofilme em formação de <i>C. albicans</i> exposto ao óleo de <i>E. globulus</i> (8 mg/mL) Aumento de 1.500x.	48
Figura 12 - Biofilme em formação de <i>C. albicans</i> exposto ao óleo de <i>E. globulus</i> (8 mg/mL) Aumento de 3.000x.	48
Figura 13 - Biofilme em formação de <i>C. albicans</i> exposto ao óleo de <i>E. globulus</i> (16 mg/mL) Aumento de 1.500x.	48
Figura 14 - Biofilme em formação de <i>C. albicans</i> exposto ao óleo de <i>E. globulus</i> (16 mg/mL) Aumento de 3.000x.	48
Figura 15 - Controle do biofilme maduro de <i>C. albicans</i> . Aumento de 1.500x.	49
Figura 16 - Controle do biofilme maduro de <i>C. albicans</i> . Aumento de 3.000x.	49
Figura 17 - Biofilme maduro de <i>C. albicans</i> exposto ao óleo de <i>E. citriodora</i> (0,5 mg/mL) Aumento de 1.500x.	50
Figura 18 - Biofilme maduro de <i>C. albicans</i> exposto ao óleo de <i>E. citriodora</i> (0,5 mg/mL) Aumento de 3.000x.	50
Figura 19 - Biofilme maduro de <i>C. albicans</i> exposto ao óleo de <i>E. citriodora</i> (1 mg/mL) Aumento de 1.500x.	50
Figura 20 - Biofilme maduro de <i>C. albicans</i> exposto ao óleo de <i>E. citriodora</i> (1 mg/mL) Aumento de 3.000x.	50
Figura 21 - Biofilme maduro de <i>C. albicans</i> exposto ao óleo de <i>E. citriodora</i> (2 mg/mL) Aumento de 1.500x.	50

Figura 22 - Biofilme maduro de *C. albicans* exposto ao óleo de *E. citriodora* (2 mg/mL) Aumento de 3.000x. 50

Figura 23 - Biofilme maduro de *C. albicans* exposto ao óleo de *E. globulus* (4 mg/mL) Aumento de 1.500x. 51

Figura 24 – Biofilme maduro de *C. albicans* exposto ao óleo de *E. globulus* (4 mg/mL) Aumento de 3.000x. 51

Figura 25 – Biofilme maduro de *C. albicans* exposto ao óleo de *E. globulus* (8 mg/mL) Aumento de 1.500x. 51

Figura 26 – Biofilme maduro de *C. albicans* exposto ao óleo de *E. globulus* (8 mg/mL) Aumento de 3.000x. 51

Figura 27 – Biofilme maduro de *C. albicans*. exposto ao óleo de *E. globulus* (16 mg/mL) Aumento de 1.500x. 51

Figura 28 – Biofilme maduro de *C. albicans* exposto ao óleo de *E. globulus* (16 mg/mL) Aumento de 3.000x. 51

Gráfico 3 – Gráfico representativo da sobrevivência (%) das larvas de *Galleria mellonella* expostas ao óleo essencial de *E. citriodora*. 52

Gráfico 4 – Gráfico representativo da sobrevivência (%) das larvas de *Galleria mellonella* expostas ao óleo essencial de *E. globulus*. 53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Compostos do óleo essencial de <i>Eucalyptus citriodora</i> identificados por CG/EM.	41
Tabela 2. Compostos do óleo essencial de <i>Eucalyptus globulus</i> identificados por CG/EM.	42
Tabela 3 - Resultados da leitura visual da CIM e CFM das cepas de <i>Candida</i> spp.	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS - Acquired immunodeficiency syndrome

ATCC - *The Global Bioresource Center*

ATP - Trifosfato de adenosina

CBS - *Centraal Bureau voor Schimmelcultures*

CFM - Concentração Fungicida Mínima

CG – Cromatografia gasosa

CIM - Concentração Inibitória Mínima

CLSI - *Clinical Laboratorial Standart Investigation*

DAPI - 4',6-diamidino-2-fenilindol

DMSO - Dimetil sulfóxido

DNA -desoxirribonucleico

DO - Densidade Óptica

ELISA - Enzyme Linked Immunosorbent Assay

GRAM- Técnica de coloração para diferenciação de microrganismos

GRAS - *Generally Recognized As Safe*

HaCat- linhagem celular de queratinócitos normais humanos imortalizada, não transformada

h - horas

HIV - *Human Immunodeficiency Virus*

IZ - Instituto Zimotécnico-ESALQ/USP

MEC – Matriz Extracelular

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

mg - miligramas

mL – mililitros

nm – nanômetro

OE – Óleo essencial

PBS - *Phosphate Buffered Saline*

PS - Poliestireno

RPMI–1640 - Meio de cultura desenvolvido por *Roswell Park Memorial Institute*

SDA - *Sabouraud Dextrose Agar*

SFB - Soro Fetal Bovino

SIDA - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

SRB - Sulforrodamina B

TCA – Ácido Tricloroacético

UFC – Unidades Formadoras de Colônia

µg – microgramas

XTT - 2,3-Bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide

YND - *Yeast Nitrogen Base*

YPD - *Yeast Peptone Dextrose*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DA LITERATURA	21
3 PROPOSIÇÃO	34
4 MATERIAL E MÉTODOS	35
5 RESULTADOS	41
6 DISCUSSÃO	54
7 CONCLUSÃO	61
REFERÊNCIAS	62
ANEXOS	
ANEXO 1 - Picos cromatográficos (CG/EM) do óleo essencial de <i>Eucalyptus citriodora</i>	70
ANEXO 2 - Picos cromatográficos (CG/EM) do óleo essencial de <i>Eucalyptus globulus</i>	71
ANEXO 3 - Compostos, Índices de Retenção e suas porcentagens identificados no óleo essencial de <i>Eucalyptus citriodora</i> por Cromatografia Gasosa em aparelho com Espectrometria de Massas (CG/EM).	72

ANEXO 4 - Compostos, Índices de Retenção e suas porcentagens identificados no óleo essencial de *Eucalyptus globulus* por Cromatografia Gasosa em aparelho com Espectrometria de Massas (CG/EM).

73

1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais é uma prática milenar onde o homem procurava utilizar recursos naturais para melhorar sua saúde. O começo do uso das plantas medicinais como recurso para o tratamento de doenças foi empírico, tendo em vista que não havia informações sobre o motivo das doenças e sobre as plantas que poderiam ser utilizadas como cura (Petrovska, 2012)

Essa prática tem crescido significativamente em todo o mundo nos últimos anos. Alguns fatores favoreceram o aumento de seu uso tais como, a opção dos consumidores por terapias naturais e um maior interesse em medicamentos alternativos, assim como a insatisfação com os resultados dos produtos farmacêuticos e a automedicação (Ekor et al., 2014). Nesse sentido tem-se investido na busca e validação científica das plantas medicinais e no desenvolvimento de novos medicamentos ou combinações terapêuticas, devido também à resistência aos medicamentos antimicrobianos já em uso (Njimoh et al., 2015; Delaviz et al., 2017).

Os membros do gênero *Eucalyptus*, pertencentes à família Myrtaceae são originados da Austrália, mas tem sido encontrados na maioria dos continentes. Os *Eucalyptus* são utilizados popularmente como anestésico, expectorante, anti-inflamatório e antisséptico (Bachir et al., 2012). São conhecidos na medicina popular por apresentarem atividades antibacteriana, antifúngica, anti-inflamatória e propriedades analgésicas por causa de seus óleos essenciais. Os óleos essenciais dos membros do gênero *Eucalyptus* são utilizados também nas indústrias farmacêuticas, indústrias de alimentos e cosméticos devido a suas atividades biológicas (Mulyaningsih et al., 2011).

A candidose é causada mais comumente pela espécie *Candida albicans*. Essas infecções acometem principalmente pacientes imunodeprimidos, portadores de HIV, pacientes que sofrem de câncer, e também pacientes que fazem uso excessivo de antibióticos e os que fazem uso de terapias imunossupressoras como no caso de transplantes (Hani et al., 2015).

C. albicans é um fungo pleomórfico, apresentando-se sob a forma leveduriforme, ou sob a forma filamentosa com a produção de pseudohifas ou hifas

verdadeiras. Essa capacidade de transição morfológica é conhecida como polimorfismo, sendo que a formação dos tubos germinativos e o consequente desenvolvimento de uma forma filamentosa é considerado um fator de virulência da *C. albicans*, que tem também a capacidade de formação de clamidósporos. As duas formas estão relacionadas ao processo infeccioso, e a forma leveduriforme tem maior capacidade de disseminação, enquanto as hifas têm a capacidade de invadir tecidos escapando de células fagocitárias do hospedeiro (Coutinho, 2009; Mayer et al. 2013).

A incidência de resistência ao tratamento antifúngico de cepas de *Candida* spp. aumentou nas últimas décadas, sendo uma preocupação para os profissionais da saúde (Bhattacharjee, 2016). Os antifúngicos mais utilizados para tratamento de candidoses pertencem à família dos azóis (fluconazol, cetoconazol e itraconazol), e os polienos (nistatina e anfotericina B). O uso excessivo desses fármacos é um dos fatores que podem favorecer o desenvolvimento de cepas resistentes aos antifúngicos (Menezes, 2014). A resistência aos antifúngicos dificulta o tratamento, se tornando um grave problema de saúde pública, o que justifica a procura de novas alternativas com potencial antifúngico (Ramesh, 2010), e por inúmeras pesquisas tem se comprovado a eficiência e confiabilidade das plantas como novos fármacos (Fonseca et al., 2014).

Em virtude do aumento de casos de resistência aos antimicrobianos, os estudos que buscam novos fármacos para tratamento de infecções também tem aumentado, e as plantas medicinais surgem como coadjuvantes ou uma promissora fonte para novos tratamentos. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivos: 1) avaliar a atividade antifúngica dos óleos essenciais de *Eucalyptus citriodora* e *Eucalyptus globulus*, contra leveduras do gênero *Candida*, por método de microdiluição em caldo M27-A3 (CLSI, 2008), na determinação da CIM (concentração mínima inibitória) e determinação da CFM (Concentração fungicida mínima); 2) testar a ação dos óleos essenciais no biofilme em formação e maduro de *Candida albicans*, 3) observar o efeito dos óleos essenciais sobre o biofilme de *Candida albicans* por microscopia eletrônica de varredura e 4) avaliar o possível efeito tóxico dos óleos essenciais em larvas da espécie *Galleria mellonella*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Plantas medicinais e seus óleos essenciais

A natureza é considerada um precioso reservatório de substâncias a serem exploradas para o desenvolvimento de novos fármacos. Diversas drogas foram descobertas por triagem de compostos naturais e já são utilizadas para o tratamento de uma variedade de doenças (Barbosa et al., 2016).

As plantas medicinais atualmente tem sido consideradas uma promissora fonte para novos agentes terapêuticos, devido à presença de fitoquímicos que podem levar ao desenvolvimento de novos medicamentos. A maioria dos fitoquímicos presentes nas plantas medicinais tem tido impacto positivo na saúde e na prevenção do câncer (Azwanida, 2015).

Os tratamentos antibacterianos atualmente disponíveis para o tratamento de doenças causam efeitos adversos e também há relatos do aumento da resistência bacteriana aos antibióticos tradicionais. Sendo assim, o interesse no uso de medicamentos provenientes de plantas tem aumentado nos últimos anos afim de encontrar alternativas para estas condições (Dagli et al., 2015; Ghaffar et al., 2015).

Os óleos essenciais (OEs) são líquidos concentrados de uma mistura complexa de compostos voláteis e podem ser extraídos de vários órgãos da planta, por exemplo, folhas, cascas, flores, brotos e sementes; contendo compostos oxigenados; fenóis, álcoois, ésteres, éteres, cetonas, aldeídos, óxidos, hidrocarbonetos; além de terpenos, enxofre orgânico, compostos nitrogenados e derivados do benzeno. Os OEs são fonte de vários compostos bioativos, resultantes do metabolismo secundário das plantas cujos constituintes são basicamente uma mistura complexa de hidrocarbonetos terpênicos, especialmente monoterpenos e sesquiterpenos, e derivados oxigenados, como aldeídos, cetonas, epóxidos, álcoois e ésteres. Os EOs diferem muito em sua composição. Mesmo a composição dos OEs extraídos das plantas da mesma espécie diferem de acordo com a localização geográfica e de outros fatores. A composição também depende da maturidade da

planta a partir da qual os EOs são extraídos. (Tongnuanchan & Benjakul, 2014; Ghaffar et al., 2015; Dagli et al., 2015).

São conhecidos cerca de 3.000 óleos essenciais, muitos deles utilizados para fragrância e sabores. Há muitos estudos que apontam que os óleos essenciais possuam propriedades antivirais, antifúngicas, antiparasitárias, antioxidantes e antibacterianas, devido à presença de altas percentagens de monoterpenos, eugenol, aldeídos cinâmicos, timol e polifenóis (Vergis et al., 2013; Ghaffar et al., 2015).

Os EOs foram utilizados para o tratamento de várias doenças desde a antiguidade e ganharam popularidade ao longo dos anos. A segurança e a eficácia dos EOs foram provadas por vários ensaios clínicos. Os óleos essenciais podem possuir propriedades antioxidantes e antimicrobianas, sendo utilizados como medicamentos. Além disso os óleos essenciais tem sido utilizados como aditivos naturais para o prolongamento da vida útil de produtos alimentícios (Dagli et al., 2015; Ghaffar et al., 2015).

Os OEs também tem sido empregados na odontologia, no tratamento de doenças bucais, como a cárie e doenças periodontais. Ambas são identificadas como os principais problemas de saúde bucal no mundo. As doenças orais também afetam a saúde geral e a qualidade de vida. Diante dos efeitos adversos e a incidência de resistência bacteriana aos agentes antibacterianos atuais, tem sido necessário explorar novos agentes terapêuticos para o tratamento de infecções, sendo que um dos novos agentes terapêuticos são os óleos essenciais extraídos de plantas medicinais (Dagli et al., 2015).

A ação antimicrobiana dos óleos essenciais está relacionada a lipofilicidade dos óleos, que permite dividir a camada lipídica da membrana celular bacteriana e da mitocôndria fúngica, aumentando a permeabilidade dessas estruturas, levando ao extravasamento de íons e conteúdos celulares ocasionando lise celular (Anibal et al., 2010; Vergis et al., 2013; Dagli et al., 2015).

2.2 *Eucalyptus* spp.

Os membros do gênero *Eucalyptus*, pertencentes à família Myrtaceae são originados da Austrália, mas tem sido naturalizado na maioria dos continentes. Existem aproximadamente 900 espécies e subespécies de eucaliptos (Barbosa et al., 2016). Os eucaliptos são as árvores de madeira mais plantada do mundo. Sua incrível diversidade, adaptabilidade e crescimento o torna um recurso global renovável de fibra e energia. A incrível capacidade de adaptação dos eucaliptos juntamente com o seu crescimento rápido impulsionaram a rápida adoção para a sua plantação em mais de 100 países em seis continentes, tornando os eucaliptos as árvores de floresta de madeira mais amplamente plantadas em todo o mundo (Myburg et al., 2014).

Os eucaliptos apresentam grande diversidade e alta concentração de óleos essenciais, os quais possuem funções ecológicas e usos medicinais e industriais. O óleo essencial obtido a partir das folhas destas espécies é conhecido por apresentar atividade antioxidante, anticâncer, inseticida, antibacteriano, antiviral e antifúngicos (Bachir Racho & Benali, 2012; Davari & Ezazi, 2017).

Mais de 300 espécies deste gênero contêm óleos voláteis em suas folhas, tendo uma produção mundial de óleo essencial de *Eucalyptus* spp. de aproximadamente 3.000 toneladas, tendo como principais produtores a China, Espanha, Portugal, África do Sul e Chile. Os óleos essenciais dos membros do gênero *Eucalyptus* são utilizados nas indústrias farmacêuticas, indústrias de alimentos e cosméticos, como fragrância em produtos como perfumes, e também em sabões e detergentes e em produtos alimentícios conferindo sabor. Além disso, seu uso tem sido empregado na prevenção e tratamento de doenças humanas. O uso do óleo essencial de *Eucalyptus* spp. tem sido tradicionalmente utilizado para o tratamento de distúrbios do trato respiratório, como faringite, bronquite e sinusite, tendo o interesse científico se expandindo nesse campo nos últimos anos (Mulyaningsih et al., 2010; Elaissi et al., 2012; Ghaffar et al., 2015).

Pesquisadores tem relatado a composição química e atividades antioxidantes e antimicrobianas dos eucaliptos, porém, a distribuição geográfica e a variação das espécies afetam de forma significativa essas propriedades, sendo

necessário estudos extensivos afim de explorar o potencial destas plantas (Ghaffar et al., 2015).

2.2.1 *Eucalyptus citriodora*

O *Eucalyptus citriodora* é uma espécie do gênero *Eucalyptus* pertencente à família Myrtaceae, é um vegetal cultivado para vários fins, sendo utilizado como repelente de insetos, controladores da atividade microbiológica de fungos e bactérias e ativador dos mecanismos de defesa latentes por meio de seu óleo essencial (Oliveira et al., 2013). O óleo essencial (OE) de *E. citriodora* é utilizado frequentemente nas indústrias química, medicinal, cosmética e no agronegócios (Gbenou et al., 2012).

O OE extraído das folhas de *E. citriodora* são os mais importantes em termos de volume de comércio mundial. É fonte mais conhecida citronelal, substância amplamente utilizada na fabricação de cosméticos e aromatização de produtos de limpeza, como detergentes e sabões. Esta substância tem propriedades antissépticas, justificando o seu emprego como agente de limpeza e desinfetante. O OE é de grande interesse para a indústria de perfumaria, após sua descoberta em 1882 a sua demanda tem se intensificado. O OE foi considerado não tóxico e colocado na categoria GRAS (Generally Regarded as Safe) pela *Food and Drug Authority* dos EUA (Siddique et al., 2013; Ali et al., 2014; Barbosa et al., 2016).

A composição química do óleo revelou a presença de 22 compostos correspondendo a 95,27% do óleo. Os compostos dominantes foram citronelal (69,77%), citronelol (10,63%) e isopulegol (4,66%). (Tolba et al., 2015). O citronelal se revelou o componente principal do OE de *E. citriodora*, contribuindo principalmente para a atividade antimicrobiana do óleo. Em estudo realizado por Lin e colaboradores (2015), o OE de *E. citriodora* demonstrou atividade antibacteriana contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* reduzindo significativamente a população destas espécies. Neste estudo também pode-se observar que o mecanismo de ação do OE está relacionado com a inibição do metabolismo de DNA e ATP, observados a partir da quantificação de DNA e por método de coloração DAPI e a medição de bioluminescência ATP.

O OE também foi testado contra dermatófitos, demonstrando atividade antifúngica contra os mesmos, com diâmetro de zona de inibição variando (de 12 a 90 mm) e os valores de CIM e CFM variaram de 0,6 a 5 µL/mL e 1,25 a 5 µL/mL), respectivamente (Tolba et al., 2015). O óleo essencial de *E. citriodora* também demonstrou atividade antifúngica contra espécies de fungos filamentosos (Javed et al., 2012). Luqman et al. (2008), também relatou a atividade antimicrobiana de *E. citriodora* contra *Candida albicans*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, e contra as cepas bacterianas de *Escherichia coli* e *Mycobacterium smegmatis*.

Apesar da atividade antibacteriana e antifúngica expressa pelo óleo essencial de *E. citriodora*, o mesmo demonstrou em estudo realizado por Alvarenga e colaboradores (2014), atividade antituberculosa dos componentes presentes no OE, tanto o citronelol puro ou o sinergismo de citronelol, citronelal e eucalyptol foram biologicamente ativos inibindo >90% da tuberculose no ar, podendo assim, reduzir o número de pacientes contagiosos interrompendo a disseminação.

2.2.2 *Eucalyptus globulus*

O *Eucalyptus globulus* é uma espécie do gênero *Eucalyptus* pertencente à família Myrtaceae, é uma árvore de folhas perenes cultivada no mundo todo. É cultivado como madeiras e lenhas em diversos países. Compreende cerca de 65% de toda cultura plantada na Austrália. É rico em compostos fenólicos e taninos hidrolisáveis (Quentin et al., 2016; Park et al., 2018).

O óleo essencial das folhas de *Eucalyptus globulus* é constituído por diversos compostos voláteis em grandes concentrações, se acumulam abundantemente em todo o parênquima das folhas e das cascas da planta. Tem sido utilizado em todo mundo como antisséptico, e também para tratamento de tosses, resfriados, dores de garganta e outras infecções; apresenta atividade antimicrobiana e antiviral; e é comumente utilizado na indústria cosmética (Mulyaningsih et al., 2010; Park et al., 2016; Park et al., 2018). O principal constituinte do óleo essencial a partir de folhas de *Eucalyptus globulus* é o 1,8-cineol com aproximadamente 74,6% da composição do óleo essencial (Vieira et al., 2017).

Em estudo realizado por Mota & colaboradores (2015), demonstrou que o óleo essencial de *Eucalyptus globulus* possui atividade antimicrobiana contra cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris* e contra *Candida albicans*. Vieira e colaboradores (2017), também relataram a atividade antibacteriana do óleo essencial de *E. globulus* contra espécies bacterianas, tais como, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Streptococcus pneumoniae*.

A atividade antimicrobiana do óleo essencial de *E. globulus* também foi demonstrada em estudo realizado por Tyagi et al. (2011), onde o óleo essencial apresentou CIM de 2,25 e 9 mg/mL para células bacterianas (*B. subtilis* e *S. aureus*) e também contra células de leveduras, demonstrando inibição do crescimento de *Candida albicans* em 2,25 mg/mL e de *Saccharomyces cerevisiae* em 1,13 mg/mL. Após 8h de exposição foi observado uma redução de 100% na viabilidade de *C. albicans*. O óleo essencial de *E. globulus* também demonstrou atividade antibacteriana contra bactérias Gram-negativas *Fusobacterium nucleatum* e *Porphyromonas gingivalis* com CIM de 1,14 mg/mL e 0,28 mg/mL respectivamente, podendo ter aplicação terapêutica no tratamento de doenças periodontais (HarkatMadouri et al., 2015).

O *E. globulus* também teve a atividade antibacteriana testada nas cepas bacterianas patogênicas de peixes *Edwardsiella tarda*, *Streptococcus iniae*, *Streptococcus parauberis*, *Lactococcus garviae*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio ichthyenteri* e *Photobacterium damsela*, onde a CIM variou entre 7,8 a 125 mg/mL; estes resultados sugerem que o óleo essencial de *E. globulus* pode ser utilizado também na indústria de peixes como um agente antibacteriano contra as doenças de peixes (Park et al., 2016).

2.3 *Candida* spp. e Candidoses

O gênero *Candida* é originário da divisão taxonômica de ascomicetos, caracterizado como leveduras asporogênicas (não formadora de esporo) com a capacidade de formar pseudo-hifas e hifas. São fungos unicelulares, patógenos oportunistas, que constituem parte da microbiota comensal; sendo capazes de

causar infecções apenas se as barreiras imunológicas do hospedeiro forem violadas. (Sardi et al., 2013(1); Braz et al., 2014; Chin et al., 2016; Ventolini et al., 2016; Hammad et al., 2016).

Desde a década de 1970 a incidência de infecção por *Candida* spp., principalmente infecção nosocomial, tem aumentado de forma constante. Este aumento é resultado do aumento global de pacientes predispostos a infecção por *Candida*, como é o caso dos imunocomprometidos, nos quais o desenvolvimento da candidose sistêmica é considerada uma doença grave frequentemente associada a mortalidade (Chin et al., 2016).

As candidoses são infecções causadas pelo fungo do gênero *Candida*, tendo a *Candida albicans* como a espécie mais comum; embora outras espécies não-*albicans* possam causar infecções, como as espécies *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii* e *C. pseudotropicalis*. As candidoses podem ser consideradas uma infecção oportunista e estão associadas a fatores predisponentes como pacientes imunocomprometidos, como é o caso de pacientes HIV positivo; pacientes que tenham sido submetidos ao uso abusivo de antibióticos, corticosteroides ou citostáticos; pacientes diabéticos; terapia antineoplásica, gestantes; imunossupressão pós-transplante, usuários de prótese dentária, consumo excessivo de carboidratos e radiação. Fatores como AIDS, antibioticoterapia e imunossupressão estão relacionados com a fase aguda da doença e fatores como diabetes estão relacionados à fase crônica da doença. As infecções podem acometer a cavidade oral, vaginal e pulmões, podendo ocasionar infecções sistêmicas (Stramandinoli et al., 2010; Doddanna et al., 2013; Ventolini et al., 2016).

A candidose oral é a infecção causada pelo crescimento excessivo de espécies do gênero *Candida*, sendo a mais prevalente a *Candida albicans*. A colonização do fungo na cavidade oral acontece nas superfícies da mucosa da bochecha, da língua e do palato; a colonização também pode ocorrer em placa subgingival de adultos com periodontite. A incidência de candidose foi relatada em 45% dos neonatos, de 45% a 65% nas crianças saudáveis, 30% a 45% nos adultos saudáveis, 50% a 65% nos portadores de prótese removível, 65% a 88% pacientes em unidade de tratamento intensivo, 90% dos pacientes com leucemia aguda em tratamento quimioterápico e 95% dos pacientes com AIDS. Em pacientes

imunocomprometidos, a candidose oral pode levar a um quadro sistêmico, onde a taxa de mortalidade é relatada entre 71% a 79%. As doenças periodontais de origem fúngica são incomuns em indivíduos saudáveis, mas pode ocorrer em indivíduos imunocomprometidos que tenham a microbiota normal alterada (Sardi et al., 2013(2); Hosseini et al., 2016; Ventolini et al., 2016; Hammad et al., 2016).

A *Candida albicans* é uma levedura comensal, presente na cavidade bucal, no trato gastrointestinal, trato respiratório e na vagina da maioria dos indivíduos considerados saudáveis; sendo assim, somente a presença do fungo não é suficiente para produzir clinicamente a doença, é necessário que haja penetração nos tecidos, a qual ocorre geralmente na superfície; e acontece apenas em algumas situações em que os fatores predisponentes estejam presentes, podendo causar dois tipos de infecções em humanos, infecções superficiais e infecções sistêmicas (Mayer et al., 2013; Rast et al., 2016). A *C. albicans* tem a capacidade de se adaptar muito bem ao corpo humano, colonizando sem produzir sinais de doença quando há condições fisiológicas normais, e o surgimento da doença está associado com a relação hospedeiro-microrganismo. A *C. albicans* é um fungo pleomórfico, apresentando-se sob a forma leveduriforme ou sob a forma filamentosa com a produção de hifas. Essa capacidade de transição morfológica é conhecida como pleomorfismo, sendo que a formação dos tubos germinativos e conseqüentemente o desenvolvimento da forma filamentosa é considerado um fator de virulência da *C. albicans*, que tem também a capacidade de formação de clamidósporos. As duas formas estão relacionadas ao processo infeccioso, a forma leveduriforme tem maior capacidade de disseminação, enquanto as hifas têm a capacidade de invadir tecidos escapando de células fagocitárias do hospedeiro (Coutinho, 2009; Álvares et al., 2007; Mayer et al., 2013).

2.4 Fatores de virulência da *Candida* spp.

Alguns fatores de virulência favorecem a colonização e a proliferação do fungo *Candida* spp. no organismo do hospedeiro. O principal fator de virulência é a capacidade de transição da forma leveduriforme (broto) para a forma filamentosa (hifa); a adesão em células epiteliais e endoteliais do hospedeiro; a capacidade de

secreção de enzimas hidrolíticas, principalmente as proteinases e fosfolipases; a evasão das células imunes do hospedeiro e a formação de biofilmes; (Silva-Rocha et al., 2014).

Na cavidade oral os fatores de virulência de *Candida* spp. favorecem a colonização e proliferação do fungo na mucosa oral e nas bolsas periodontais pela capacidade de se co-agregar em bactérias no biofilme dental e também de se aderir nas células epiteliais do hospedeiro. Estas capacidades estão diretamente associadas a capacidade de invadir o tecido conjuntivo gengival podendo ser importante na colonização microbiana contribuindo para a progressão das doenças bucais. Além da capacidade de invasão, a *Candida* spp. produz enzimas que degradam as proteínas da matriz extracelular e imunoglobulinas do hospedeiro (Sardi et al., 2010).

2.4.1 Pleomorfismo

A espécie *C. albicans* é considerada um fungo pleomórfico devido a sua capacidade de transição entre a forma leveduriforme e filamentosa. A forma filamentosa é caracterizada pelo crescimento tubulares da célula de *Candida*, também conhecida como hifas. A presença de hifas facilita a penetração e invasão do fungo aos tecidos do hospedeiro, enquanto a forma leveduriforme é importante para a disseminação do fungo. Essa transição é considerada um dos fatores de virulência mais importantes do gênero (Aguayo et al., 2017).

2.4.2 Adesão

O gênero *Candida* possui um conjunto de proteínas (adesinas) que medeiam a adesão de *Candida* a outras células desse gênero, a outros microrganismos, superfícies abióticas e também a células do hospedeiro. A adesão à células do tecido do hospedeiro é necessária para a colonização e a instalação do quadro infeccioso. (Pereira et al., 2016). Quando a *Candida* spp. se adere às células endoteliais e epiteliais humanas ganham acesso às células hospedeiras e às

camadas de tecido mais profundas. Esses organismos usam receptores de integrina, glicanos, manoproteínas e outras proteínas de parede celular para entrar em contato com diferentes receptores de células humanas e componentes da matriz extracelular do hospedeiro (Lopez et al., 2014).

2.4.3 Enzimas hidrolíticas

O gênero *Candida* possui a capacidade de secreção de enzimas hidrolíticas extracelulares que desempenham um importante papel na patogenia do gênero. As principais enzimas hidrolíticas secretadas são as proteinases e fosfolipases, estas enzimas facilitam, por danos causados ao tecido do hospedeiro, a aderência e a penetração da célula fúngica ao tecido do hospedeiro permitindo sua invasão (Mayer et al., 2013; Pereira et al., 2016; Canela et al., 2017).

2.4.4 Evasão do sistema imunológico

Após a infecção instalada por *Candida*, o sistema imunológico inato do hospedeiro inicia reações imunes afim de eliminar o patógeno fúngico. Porém, a levedura utiliza várias estratégias para se evadir das respostas imunológicas do hospedeiro. Atravessar barreiras teciduais e migrar para diferentes camadas de tecidos é uma das estratégias empregadas pelo gênero *Candida*. Outra estratégia utilizada para evasão do sistema imunológico é pela ligação a reguladores plasmáticos de complemento humano, como o fator H. Quando o fator H está conectado a superfície da célula fúngica, este regulador bloqueia a cascata do complemento em diferentes níveis inibindo assim a progressão da cascata ajudando na degradação da opsonina C3b impedindo a opsonofagocitose (Lopez et al., 2014).

2.4.5 Biofilmes

A formação de biofilmes por *Candida* spp. é um fator de virulência fornecendo um ambiente de persistência e sobrevivência para as células; estas arranjadas em biofilme exibem propriedades fenotípicas distintas das células em estado planctônico, demonstrando maior resistência aos agentes antimicrobianos. A formação do biofilme é um importante contribuinte para as taxas de mortalidade associadas a infecções por *Candida* spp. Nesse sentido, os biofilmes de *Candida* spp. são clinicamente problemáticos porque são intrinsecamente resistentes aos agentes antimicrobianos (Pereira et al., 2015; Pereira et al., 2016; Alalwan et al., 2017; Pierci et al., 2017).

O biofilme de *Candida* spp. é formado de uma complexa estrutura tridimensional composta de diferentes formas da célula tais como leveduriforme, hifas e pseudo-hifas, estão envolvidas a uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares autoproduzida que confere estrutura e proteção ao biofilme contra uma variedade de estresses ambientais (Pereira et al., 2016; Neji et al., 2017; Zanni et al., 2017).

A forma de crescimento em biofilme fornece as células de *Candida* um refúgio seguro a esses organismos, sendo considerado um reservatório para fontes de infecção, demonstrando elevados níveis de resistência à maioria dos antifúngicos clinicamente utilizados, além de proporcionar às células resistência à ação do sistema imunológico do hospedeiro (Shafreen et al., 2014; Vijayalakshmi et al., 2016; Porfírio et al., 2017).

Na cavidade oral o biofilme tem a capacidade de se conectar a próteses dentárias mantendo um ambiente de retenção e proteção das cepas locais. A proximidade do biofilme e da sua matriz à mucosa oral é um fator desencadeante de respostas inflamatórias inatas, ocasionando estomatite. (Pereira et al., 2015)

A formação do biofilme também pode acontecer em superfícies abióticas como dispositivos médicos, cateteres intravenosos, dispositivos intra-uterinos e também frequentemente em próteses dentárias (Porfírio et al., 2017; Madariaga-Venegas et al., 2017).

Os biofilmes de *Candida albicans* tem se mostrado altamente resistente aos antifúngicos da classe azóis, incluindo os novos medicamentos desta classe, voriconazol e posaconazol. As células em biofilme são até 1000 vezes mais resistentes ao fluconazol comparadas as células em estado planctônico; os triazóis chegam a ser 50% menos eficazes em células de biofilme. Estudos demonstraram que os biofilmes de *C. albicans* também apresentaram resistência à anfotericina B (Madariaga-Venegas et al., 2017).

2.5 Resistência aos antifúngicos

Os antifúngicos mais utilizados para tratamento de candidoses pertencem à família dos azóis (fluconazol, cetoconazol e itraconazol), dos polienos (nistatina e anfotericina B) e também as equinocandinas. Embora o principal objetivo dos antifúngicos sejam agir apenas contra células fúngicas, os antifúngicos podem também ser prejudiciais para células humanas. Além da toxicidade dos antifúngicos convencionais, um número crescente de cepas de várias espécies de *Candida* tornaram-se resistentes a estas drogas (Asdadi et al., 2015).

O uso excessivo desses fármacos favoreceu o desenvolvimento de cepas resistentes aos antifúngicos. Em estudo realizado por Ramesh *et al.* (2010), cepas de *Candida* spp. isoladas dos pacientes HIV-positivos e Tuberculose-positiva demonstraram resistência aos fármacos fluconazol (23,5%), itraconazol (41,1%), cetoconazol (41,1%) e nistatina (11,9%), e cepas isoladas de pacientes não-HIV e não-Tuberculoso também demonstraram resistência aos fármacos fluconazol (14,2%), itraconazol (28,5%), cetoconazol (28,5%) e nistatina (14,2%). A resistência aos antifúngicos dificulta o tratamento, se tornando um grave problema de saúde pública, justificando a procura de novos antifúngicos.

. As células fúngicas tem desenvolvido mecanismos de resistência contra os antifúngicos convencionais, entre os mecanismos desenvolvidos estão a mutação no gene *ERG11* que codifica a síntese do ergosterol, reduzindo assim a eficiência dos medicamentos cujo alvo são o ergosterol; redução da concentração do fármaco no interior da célula pela super expressão de bombas de efluxo; respostas de

estresse celular pelas mudanças nas vias metabólicas e a formação de biofilmes (Quan-Zhen et al., 2016).

2.6 A possibilidade de descoberta de novos fármacos por meio das plantas

Diante do aumento da resistência aos antimicrobianos e uma menor possibilidade de produzir novos fármacos convencionais, tem se ampliado os estudos das plantas medicinais como agente alternativo para tratamento e prevenções de infecções, sendo que por inúmeras pesquisas tem se comprovado a eficiência e confiabilidade das plantas como novos fármacos (Fonseca *et al.*, 2014). Dentre as plantas medicinais pesquisadas, destaca-se o gênero *Eucalyptus* spp., o qual tem demonstrado propriedades terapêuticas como anti-inflamatórias e antimicrobianas, justificando-se ampliar as pesquisas com essas espécies, diante dos inúmeros casos de resistência aos antimicrobianos convencionais existentes (Bachir Racho & Benali, 2012; Davari & Ezazi, 2017).

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo foi avaliar se os óleos essenciais de *Eucalyptus citriodora* e *Eucalyptus globulus* exibem atividade antifúngica em leveduras do gênero *Candida*, bem como o efeito dos óleos essenciais em mecanismos de virulência como biofilme de *Candida albicans* e possível efeito tóxico sobre larvas de *Galleria mellonella*.

Objetivos específicos do estudo:

- a) Avaliar a atividade antifúngica dos óleos essenciais de *Eucalyptus citriodora* e *Eucalyptus globulus* (adquiridos comercialmente da empresa *Terra Flor*) pela determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) em cepas de *Candida* spp.;
- b) Determinar a Concentração Fungicida Mínima (CFM) dos óleos essenciais em espécies de *Candida*;
- c) Testar o efeito dos óleos essenciais sobre a formação do biofilme de *Candida albicans* MYA-2876 e sobre o biofilme maduro;
- d) Verificar o efeito dos óleos essenciais sobre o biofilme de *Candida albicans* MYA-2876 por Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV);
- e) Avaliar o efeito tóxico possível dos óleos essenciais em larvas da espécie *Galleria mellonella*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Óleos essenciais

Os óleos essenciais de *Eucalyptus citriodora* e *Eucalyptus globulus*, foram adquiridos comercialmente da empresa TERRA FLOR.

- *Eucalyptus citriodora* (Lote: C064/16)
- *Eucalyptus globulus* (Lote: L173)

4.2 Cromatografia

Os óleos essenciais de *E. citriodora* e *E. globulus* passaram por uma análise de qualificação e quantificação dos compostos presentes nas amostras por cromatografia gasosa.

4.2.1 - Cromatografia Gasosa (CG)

Foi utilizado cromatógrafo gasoso Hewlett-Packard 5890 Serie II, equipado com detector seletivo de massas Hewlett40 Packard 5971, injetor split/splitless, utilizando-se uma coluna capilar HP-5 (25m x 0,2mm x 0,33µm). Temperaturas: injetor = 220°C, detector = 280°C, coluna = 60°C, 3°C.min⁻¹, 240°C (7 minutos). A vazão do gás de arraste (He super seco) foi igual a 1,0 ml.min⁻¹.

A análise dos dados da CG foi levada a efeito de acordo com a equação de Van den Dool e Kratz para a obtenção do Índice de Retenção seguida de comparação dos índices de retenção e picos cromatográficos dele obtidos com os encontrados na literatura.

$$IR = [(T_s - T_{cn-1}) / (T_{cn} - T_{cn-1})] \times 100 + 100_{cn-1}, \text{ onde:}$$

IR= índice de retenção;

T_s= tempo de retenção da substância analisada;

Tcn= tempo de retenção do n-alcano que elui após a substância analisada;

Tcn-1= tempo de retenção do alcano que elui antes da substância analisada;

Cn-1= número do alcano que elui antes da substância analisada.

4.3 Amostras de Leveduras

Cepas de referência: *Candida rugosa* (IZ 12), *Candida lusitanae* (IZ 06), *Candida glabrata* (IZ 07), *Candida utilis* (CBS 5609), *Candida krusei* (CBS 573), *Candida guilliermondii* (CBS 566), *Candida tropicalis* (CBS 94), *Candida albicans* (CBS 562), *Candida parapsilosis* (CBS 604), *Candida albicans* (ATCC 90028), *Candida albicans* (ATCC MYA-2876), *Candida glabrata* (ATCC 5207) *Candida parapsilosis* (ATCC 22019), *Candida lusitanae* (ATCC 200950), *Candida tropicalis* (ATCC 750), *Candida krusei* (CBS 6258). (CBS - *Centraalbureau voor Schimmelcultures*; IZ - Instituto Zimotécnico - ESALQ/USP; ATCC - *The Global Bioresource Center*).

4.4 Diluição dos óleos essenciais e dos antifúngicos.

Os óleos essenciais de *Eucalyptus citriodora* e *Eucalyptus globulus* foram diluídos em solução Tween 80 (0,025%) e solução DMSO (0,5%), meio de cultura RPMI (Meio de cultura desenvolvido por *Roswell Park Memorial Institute*). O antifúngico Fluconazol foi diluído em água destilada e o antifúngico Anfotericina B foi diluído em DMSO (0,5%).

4.5 Atividade antifúngica dos óleos essenciais

4.5.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Os óleos essenciais foram testadas quanto a sua atividade antifúngica, determinando-se a concentração inibitória mínima (CIM) dos óleos contra diferentes cepas de *Candida* spp. pela técnica de microdiluição em caldo seguindo as recomendações do protocolo M27-A3 (CLSI, 2008).

O ajuste do inóculo foi feito em solução salina (NaCl 0,9%), equivalente a $5,0 \times 10^6$ UFC/mL em espectrofotômetro (0,08 – 0,1 abs, 530 nm). O inóculo foi padronizado a $2,5 \times 10^3$ por diluição seriada.

Em uma microplaca estéril foram distribuídos 100 µl de RPMI em todos os poços, adicionado a primeira coluna 100 µl do óleo essencial na concentração inicial, e então procedeu-se a microdiluição seriada dos óleos essenciais. Após o processo de diluição seriada foram adicionados 100 µl do inóculo ajustado, originando os seguintes grupos:

- Grupo controle positivo 1: meio de cultura e inóculo, para observação do crescimento da levedura;
- Grupo controle positivo 2: meio de cultura, diluente e inóculo, com a finalidade de observar possíveis efeitos tóxicos do diluente para a levedura;
- Grupo controle negativo 1: somente meio de cultura, para observação de possíveis contaminações;
- Grupo controle negativo 2: meio de cultura, óleo essencial e diluente, finalidade de observar possíveis contaminações no processo de microdiluição)
- Grupo teste: óleo essencial de *Eucalyptus citriodora* (Concentração inicial de 16 mg/mL), ou óleo essencial de *Eucalyptus globulus* (Concentração inicial de 16 mg/mL) ou tratamento com antifúngico comercial Fluconazol (Concentração inicial 64 µg/mL) ou Anfotericina B (Concentração inicial 16 µg/mL).

As placas foram incubadas por 24 horas a 37° C em estufa de aerobiose, e posteriormente foi feita leitura visual (CLSI, 2008). Os ensaios foram realizados em triplicata e três ensaios independentes.

4.5.2 Determinação da Concentração fungicida mínima – CFM

A determinação da concentração fungicida mínima (CFM) foi feita em placa de Petri contendo Ágar Sabouraud Dextrose - SDA (KASVI). As placas de 96 poços foram homogeneizadas por pipetagem, e uma alíquota de 10 µl foi transferida para a placa de Petri. Após incubação a 37°C durante 48h, foi estabelecida a menor concentração fungicida. A CFM foi determinada como a concentração mais baixa dos óleos essenciais, que não permite o crescimento de qualquer colônia do fungo em cultura sólida por leitura visual, assim caracterizando os efeitos fungicida e fungistático dos óleos essenciais testados (GULLO et al., 2012). Os ensaios foram realizados em triplicata e três ensaios independentes.

4.6 Efeito dos óleos essenciais sobre biofilme de *Candida albicans*

Os óleos essenciais de *E. citriodora* e *E. globulus* foram testados contra biofilmes de *C. albicans* (MYA- 2876).

Ajuste do inóculo: A cultura foi incubada overnight em YPD a 30°C sob agitação de 180 rpm. Uma alíquota de 7 mL do inóculo foi centrifugada a 3.000 rpm por 5 min. e lavada 2x com PBS para retirada do meio de cultura. Após a última centrifugação a 3.000 rpm por 5 min foi descartado o sobrenadante e o *pelet* foi ressuspenso em 7 mL de YNB. Da suspensão celular resultante foi preparada uma diluição de 1:100, para contagem celular em Câmara de Neubauer por microscopia óptica (aumento de 400x). Após a contagem e realização do cálculo o inóculo foi ajustado a $1,0 \times 10^6$ células/mL, em YNB. (Pierce et al., 2008):

Para o biofilme em formação, na microplaca estéril de 96 poços tipo PS (fundo U) foram depositados 100 µl de inóculo, o qual foi incubado por 90 minutos sob agitação (75 rpm a 37°C) em incubador de microplaca. Em seguida, a placa foi lavada 3x com PBS e foi adicionado 100 µl do óleo essencial diluído em cada concentração testada (16 mg/mL a 0,03125 mg/mL para *E. citriodora* e 64 mg/mL a 0,125 mg/mL para *E. globulus*). A placa contendo o inóculo e óleo foi incubada por 24h a 37°C em estufa de aerobiose (Silva et al., 2010). Para o biofilme maduro, na

microplaca de 96 poços com fundo U foram depositados 100 µl de inóculo o qual foi incubado por 24h. Posteriormente, a placa foi lavada 3x com PBS e foram adicionados 100 µl do óleo essencial diluído em cada concentração testada (16 mg/mL a 0,0312 mg/mL para *E. citriodora* e 64 mg/mL a 0,125 mg/mL para *E. globulus*). A placa foi incubada por 24h a 37°C em estufa de aerobiose (Pierce et al., 2008). Os ensaios foram realizados em triplicata sob três ensaios independentes.

4.6.1 Análise da viabilidade celular do Biofilme

Para a análise da viabilidade celular do biofilme, as placas foram previamente lavadas 3x com PBS e posteriormente coradas com 80 µL de XTT [2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfo-fenil) -2 H -tetrazolium-5-carboxanilida] durante 2 horas. A seguir, o biofilme foi mensurado (A490nm) em leitor de microplacas ELISA (Versa MAX, molecular Devices, EUA). Os valores de absorvância foram subtraídos dos valores de absorvância do controle de modo a avaliar a quantidade de biofilme (Pierce et al., 2008).

4.7 Análise do biofilme por Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV).

Para análise do efeito dos óleos essenciais no biofilme de *Candida albicans* (MYA- 2876) por MEV, o inóculo foi ajustado igualmente ao descrito anteriormente no ensaio de biofilme, resultando em uma concentração de 1×10^6 UFC/mL. A partir da suspensão celular final, o biofilme de *C. albicans* foi produzido em lâminas de cultura (BD Falcon). Para o ensaio de biofilme em formação, as células foram incubadas sob agitação 75 rpm em agitador de microplacas a 37° C por 90 min. e posteriormente foram adicionados os óleos essenciais nas concentrações de 0,5 mg/mL, 1 mg/mL e 2 mg/mL para o óleo essencial de *E. citriodora* e nas concentrações de 4 mg/mL, 8 mg/mL e 16 mg/mL para o óleo essencial de *E. globulus* e foi incubado em estufa de aerobiose a 37° C por 24 horas. Para o biofilme maduro, a suspensão celular foi incubada a 37° C por 24 horas e após o período de incubação, foram adicionados os óleos essenciais nas

concentrações de 0,5 mg/mL, 1 mg/mL e 2 mg/mL para o óleo essencial de *E. citriodora* e nas concentrações de 4 mg/mL, 8 mg/mL e 16 mg/mL para o óleo essencial de *E. globulus* e novamente incubado por mais 24 horas. Após o período de incubação foi retirado o meio de cultura e o biofilme fixado com glutaraldeído (2,0%) por 30 minutos, seguido de secagem em temperatura ambiente. Os espécimes foram desidratados em banhos com concentrações crescentes de etanol (50%, 70%, 90% e 100%) por 10 minutos. Espécimes foram secos, metalizados e armazenados em dessecador para subsequente observação em MEV (JEOL, JSM 5600LV, Japão). Ao controle foram adicionadas apenas amostras de leveduras.

4.8 Avaliação da toxicidade dos óleos essenciais “*in vivo*” – *Galleria mellonella*

O ensaio de toxicidade em larvas de *Galleria mellonella* foi realizado como descrito por Scorzoni et al., 2013. As larvas (0,3-0,5 g, RJ Mous Livebait, The Netherlands) foram alocadas em placas de Petri e incubadas a 37 ° C no escuro, na noite anterior ao experimento. Foram excluídas larvas com alterações de cor, ou seja, manchas escuras ou com melanização aparente. As suspensões dos óleos essenciais foram injetadas no hemocele pela última pró-pata esquerda das larvas usando a seringa de Hamilton de 1 ml. A pró-pata foi previamente lavada com etanol 70%. Um total de 10 uL do óleo essencial foi injetado em cada larva. A morte das larvas foi monitorada por 72h por inspeção visual da cor (marrom - marrom escuro) e pela falta de movimento após toque com uma pinça. Para cada grupo teste, foram usadas um total de 10 larvas. Após a inoculação do óleo essencial, as larvas foram mantidas incubadas a 37 ° C em estufa de aerobiose.

4.9 Análise estatística

Para as avaliações comparativas foi utilizada a análise estatística ANOVA, variação *Dunnnett*, bilateral ($P < 0,05$), (Programa Biostat 5.0).

5 RESULTADOS

5.1 Cromatografia Gasosa (CG)

A análise cromatográfica dos óleos essenciais *E. citriodora* e *E. globulus* detectou uma relação de compostos diversos e seus percentuais em uma amostra de 100 ul de óleo (ANEXO 1) (ANEXO 2). Os compostos mais abundantes foram os monoterpenos Citronelal (53,5%) e Citronelol (36,5%) para o óleo essencial de *E. citriodora* (Tabela 1), e o monoterpeno (48,7%) para o óleo essencial de *E. globulus* (Tabela 2).

Tabela 1: Compostos do óleo essencial de *Eucalyptus citriodora* identificados por CG/EM.

Composto	IR*	Porcentagem
HEPTANOL<N->	969	0.447
SABINENE HYDRATE <TRANS->	1097	1.804
ISOPULEGOL <NEO-ISO>	1168	1.168
CITRONELLOL	1253	36.469
METHYL CITRONELLATE	1257	2.787
CITRONELLAL	1270	53.476
LINALOOL ISOBUTYRATE	1374	2.31
AROMADENDRENE <ALLO->	1461	1.508

*Índice de Retenção

Tabela 2: Compostos do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* identificados por CG/EM.

Compostos	IR*	Porcentagem
SABINENE	976	0.64
ELEMENE <DELTA->	1339	3.801
ISOLEDENE	1373	0.848
ELEMENE <BETA->	1375	1.562
CARYOPHYLLENE<(Z)->	1404	9.881
ELEMENE <GAMMA->	1433	0.804
LINALOOL BUTYRATE	1422	2.134
AROMADENDRENE	1439	6.439
CEDRANE<EPI->	1441	1.18
BERGAMOTENE <ALPHA-TRANS>	1436	4.417
AROMADENDRENE	1439	1.185
AROMADENDRANE<ALLO->	1461	0.851
BISABOLENE <(Z)-ALPHA->	1504	5.583
BISABOLENE <(Z)-GAMMA->	1515	1.325
SESQUISABINENE HYDRATE <CIS->	1545	3.539
GLOBULOL	1583	49.688
CEDR-8(15)-EM-9-ALPHA-OL	1644	3.936
CUBENOL	1642	0.808

*Índice de Retenção

5.2 CIM e CFM das cepas de *Candida* spp.

Os óleos essenciais de *E. citriodora* e *E. globulus* foram testados contra cepas de referência do gênero *Candida* afim de determinar seu efeito inibitório pela técnica de microdiluição em caldo. Ambos os óleos testados apresentaram atividade inibitória sobre as células planctônicas de *Candida* spp. (Tabela 1). Atividades inibitórias de até 8 mg/mL foram detectadas, e as concentrações inibitórias variam de 0,125 mg/mL a 0,5 mg/mL para o óleo essencial de *Eucalyptus citriodora* e 1 mg/mL a 8 mg/mL para o óleo essencial de *Eucalyptus globulus*. Os antifúngicos Fluconazol e Anfotericina B também foram testados contra as cepas de *Candida* spp. a fim de determinar a concentração inibitória mínima pela técnica de microdiluição em caldo. Fluconazol demonstrou atividade inibitória entre 1 a 32

$\mu\text{g/mL}$, enquanto o antifúngico Anfotericina B demonstrou atividade inibitória entre as concentrações 0,25 $\mu\text{g/mL}$ e 1 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 3).

Após a determinação dos valores da CIM dos óleos essenciais, uma alíquota do ensaio de susceptibilidade foi utilizada para determinar a concentração fungicida mínima (CFM) contra as cepas de *Candida* spp. O óleo essencial de *E. citriodora* demonstrou atividade fungicida, variando seu efeito nas concentrações entre 0,25 mg/mL a 0,5 mg/mL. O óleo essencial de *E. globulus* apresentou atividade fungicida entre as concentrações 8 mg/mL a 1 mg/mL (Tabela 3).

Tabela 3: Resultados de leitura visual da CIM e CFM das cepas de *Candida* spp.

Cepas de referência	<i>E. citriodora</i>		<i>E. globulus</i>		Fluconazol	Anfotericina B
	mg/mL		mg/mL		$\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{g/mL}$
	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CIM
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	0,25	0,25	2	2	1	1
<i>C. lusitaniae</i> IZ 06	0,25	0,25	2	2	1	0,5
<i>C. parapsilosis</i> CBS 5604	0,125	0,25	1	4	2	0,25
<i>C. rugosa</i> IZ 12	0,25	0,5	8	8	1	0,25
<i>C. glabrata</i> ATCC 5207	0,25	0,5	1	2	8	0,25
<i>C. guilliermondii</i> CBS 566	0,125	0,125	1	1	1	0,25
<i>C. albicans</i> CBS 562	0,25	0,25	4	4	1	0,25
<i>C. krusei</i> CBS 573	0,125	0,25	2	2	8	0,25
<i>C. tropicalis</i> CBS 94	0,5	0,5	4	4	2	0,25
<i>C. glabrata</i> IZ 07	0,25	0,25	1	2	8	0,25
<i>C. utilis</i> CBS 5609	0,125	0,125	1	1	4	0,25
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0,25	0,25	2	2	2	0,25
<i>C. lusitaniae</i> ATCC 200950	0,25	0,5	4	4	1	1
<i>C. tropicalis</i> ATCC 40281	0,25	0,5	1	1	1	0,25
<i>C. albicans</i> ATCC MYA 2876	0,25	0,25	2	2	1	0,25
<i>C. krusei</i> CBS 6258	0,25	0,25	2	4	32	0,25

CIM – Concentração inibitória Mínima; CFM – Concentração Fungicida Mínima

5.3 Análise da viabilidade celular em biofilmes de *Candida albicans*

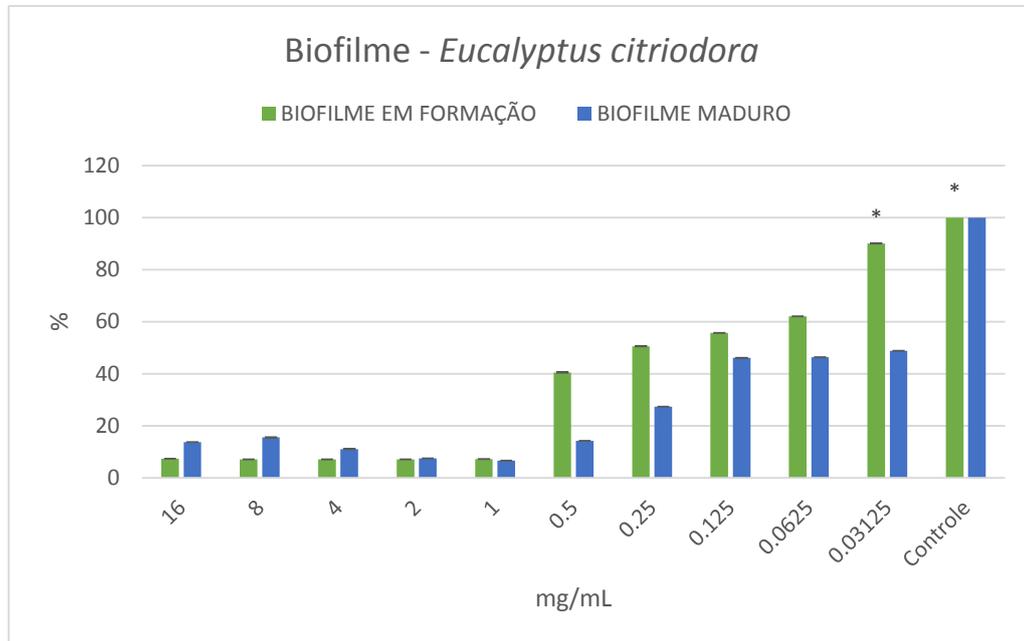
Os óleos essenciais de *E. citriodora* e *E. globulus* foram testados em diferentes concentrações contra o biofilme em formação e maduro de *Candida*

albicans (MYA-2876), com o objetivo de avaliar o efeito dos óleos pela viabilidade celular dos biofilmes

Comparado ao grupo controle (não-tratado), o biofilme de *C. albicans* em formação tratado com *E. citriodora* apresentou baixa atividade metabólica até a concentração 1 mg/mL com 7,2% de viabilidade celular do biofilme e o tratamento com *E. globulus* na concentração 4 mg/mL apresentou 10,7% de viabilidade. O aumento da atividade metabólica do biofilme em formação é observada a partir da concentração 0,5 mg/mL para *E. citriodora* e 2 mg/mL para *E. globulus* ($p < 0,05$); onde houve aumento de células viáveis no biofilme 40,5% e 56% respectivamente. A concentração de 0,0312 mg/mL de *E. citriodora* e 0,125 mg/mL de *E. globulus* não demonstraram diferenças estatísticas comparada ao controle (Gráfico 1 e 2).

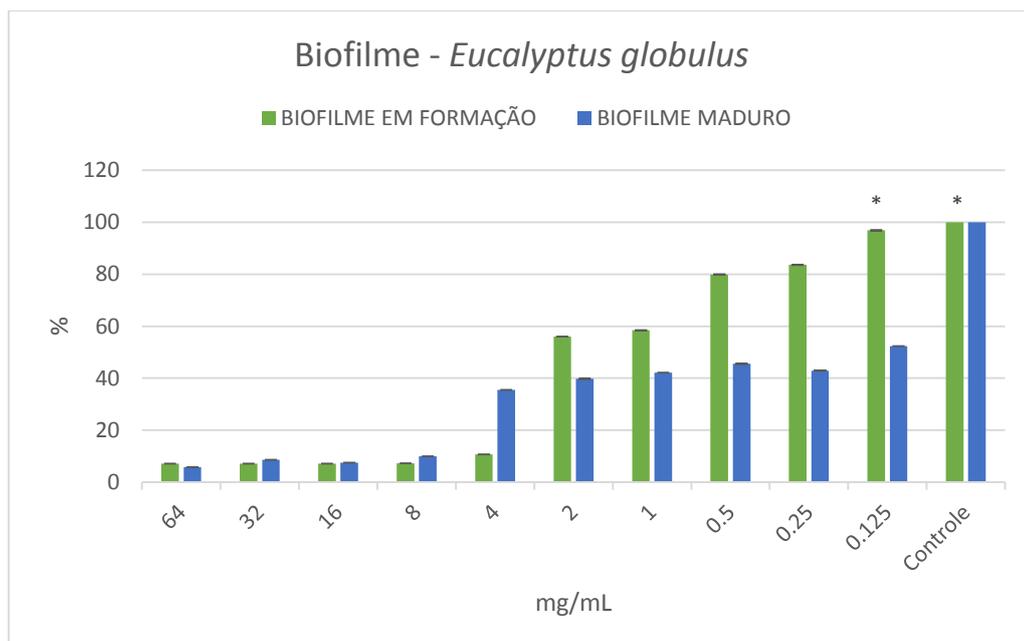
Comparado ao grupo controle (não-tratado), o biofilme de *C. albicans* maduro demonstrou atividade metabólica reduzida até a concentração 0,5 mg/mL para o óleo essencial de *E. citriodora* com 14,1% de viabilidade celular e 8 mg/mL de *E. globulus* com 9,9% de viabilidade celular. O biofilme maduro teve a viabilidade celular aumentada a partir da concentração 0,25 mg/mL para *E. citriodora* e 4 mg/mL para *E. globulus*, 27,3% e 35,4% respectivamente. Todas as concentrações testadas de *E. citriodora* e *E. globulus* tiveram diferença estatística quando comparadas ao controle ($p < 0,05$) (Gráfico 1 e 2).

Gráfico 1 – Viabilidade celular (%) do biofilme em formação e maduro tratado com *E. citriodora*.



*Significância estatística $p < 0,05$ Teste ANOVA 1 critério, variação de *Dunnett*.

Gráfico 2 – Viabilidade celular (%) do biofilme em formação e maduro tratado com *E. globulus*.



*Significância estatística $p < 0,05$ Teste ANOVA 1 critério, variação de *Dunnett*.

5.4. Microscopia eletrônica de Varredura (MEV)

5.4.1. Biofilme em formação tratados com *Eucalyptus citriodora* e *Eucalyptus globulus*

As análises em microscopia eletrônica de varredura mostraram células controles com superfície regular e pseudohifas em quantidades consideráveis e com superfície homogênea; o controle mostra as células de *C. albicans* com sua morfologia intacta (Figuras 1 e 2). Quando tratado com *E. citriodora* na concentração de 0,5 mg/mL, observa-se a diminuição significativa das hifas e pode-se detectar algumas células com deformidades perdendo sua forma original (Fig. 3 e 4), na concentração de 1 mg/mL, observa-se também a diminuição das hifas e deformidades como rugosidade nas células e nas hifas presentes (Fig. 5 e 6) e na maior concentração testada (2 mg/mL), pode-se notar grande variação na morfologia da célula quando comparada ao controle, observando-se diminuição do volume celular (Fig. 7 e 8). Quando tratados com o óleo essencial de *E. globulus* na concentração de 4 mg/mL, foi observado apenas uma pequena diminuição nas hifas quando comparado ao controle (Fig. 9 e 10), e na concentração de 8 mg/mL, também foi observado pequena diminuição das hifas e algumas células em deformidades (Fig. 11 e 12), na maior concentração (16 mg/mL) repetiu-se o fenômeno (Fig. 13 e 14), não havendo alterações morfológicas significantes entre as concentrações testadas.

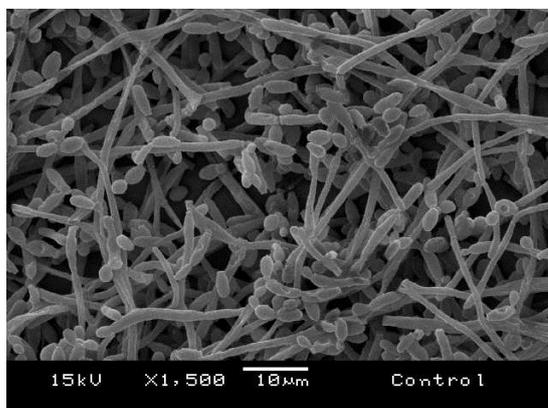


Figura 1: Controle do biofilme em formação de *C. albicans*. Aumento de 1.500x

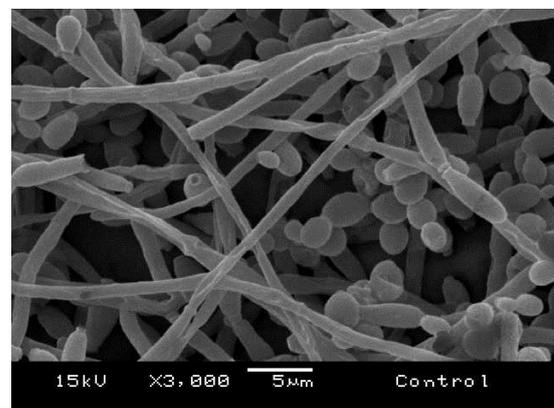


Figura 2: Controle do biofilme em formação de *C. albicans*. Aumento de 3.000x

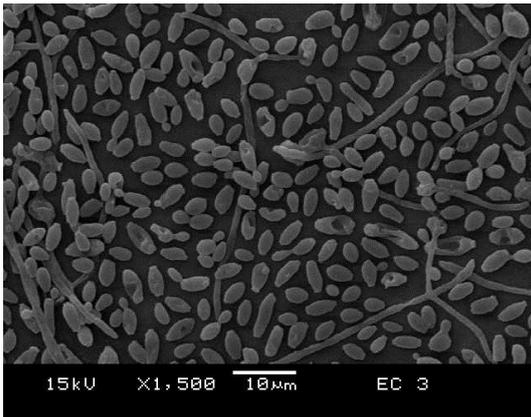


Figura 3: Biofilme em formação de *C. albicans*, exposto ao óleo de *E. citriodora* (0,5 mg/mL). Aumento de 1.500x

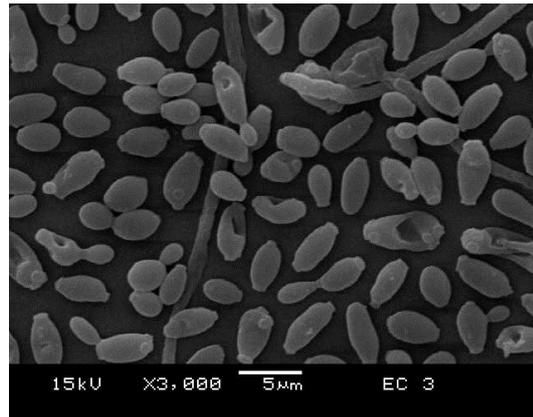


Figura 4: Biofilme em formação de *C. albicans*, exposto ao óleo de *E. citriodora* (0,5 mg/mL). Aumento de 3.000x

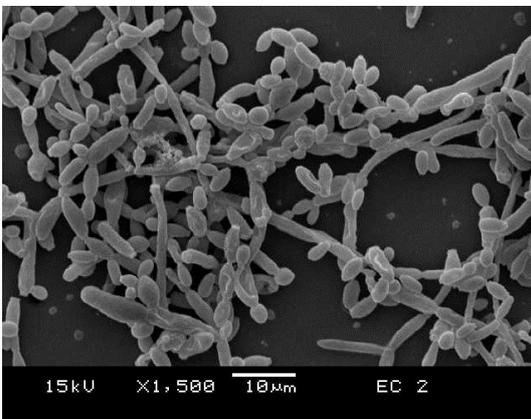


Figura 5: Biofilme em formação de *C. albicans*, exposto ao óleo de *E. citriodora* (1 mg/mL). Aumento de 1.500x

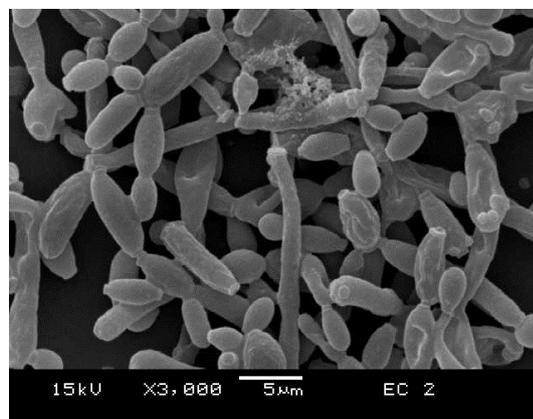


Figura 6: Biofilme em formação de *C. albicans*, exposto ao óleo de *E. citriodora* (1 mg/mL). Aumento de 3.000x

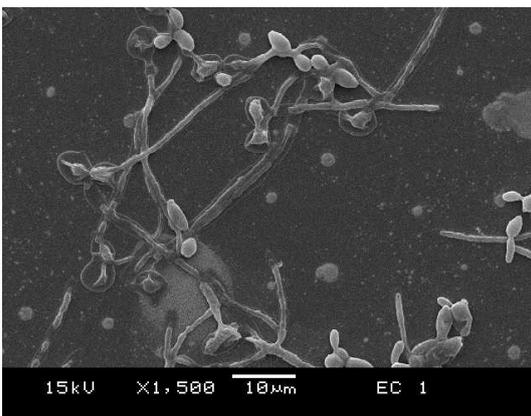


Figura 7: Biofilme em formação de *C. albicans*, exposto ao óleo de *E. citriodora* (2 mg/mL). Aumento de 1.500x

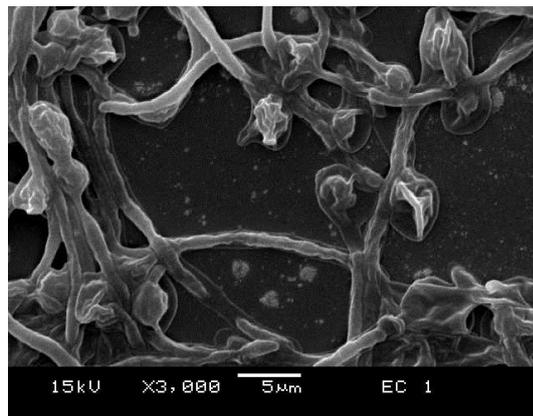


Figura 8: Biofilme em formação de *C. albicans*, exposto ao óleo de *E. citriodora* (2 mg/mL). Aumento de 3.000x

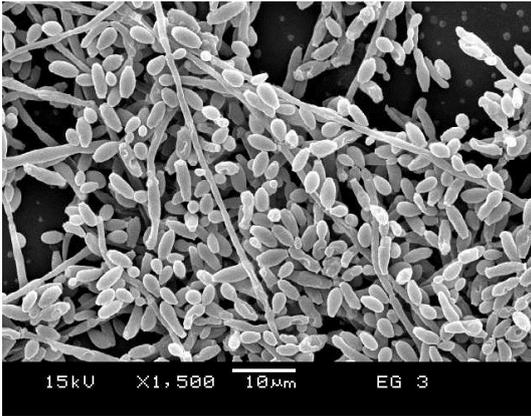


Figura 9: Biofilme em formação de *C. albicans*, exposto ao óleo de *E. globulus* (4 mg/mL). Aumento de 1.500x

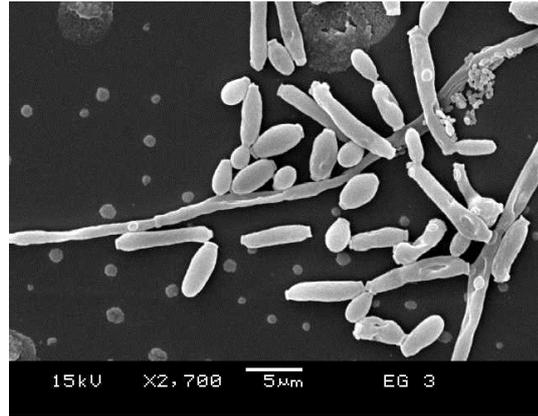


Figura 10: Biofilme em formação de *C. albicans*, exposto ao óleo de *E. globulus* (4 mg/mL). Aumento de 3.000x

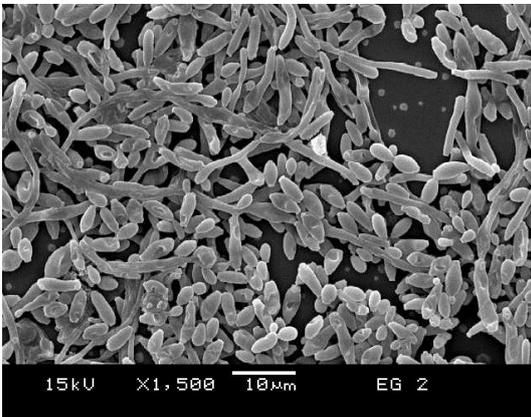


Figura 11: Biofilme em formação de *C. albicans*, exposto ao óleo de *E. globulus* (8 mg/mL). Aumento de 1.500x

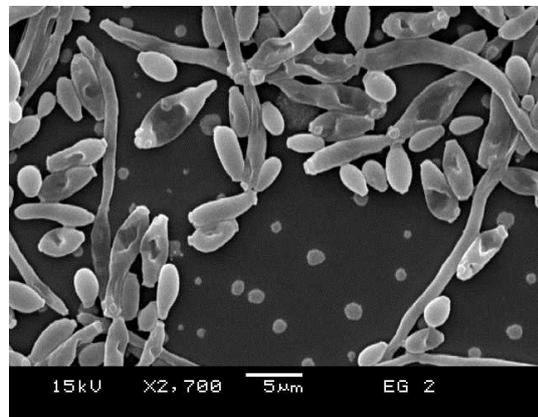


Figura 12: Biofilme em formação de *C. albicans*, exposto ao óleo de *E. globulus* (8 mg/mL). Aumento de 3.000x

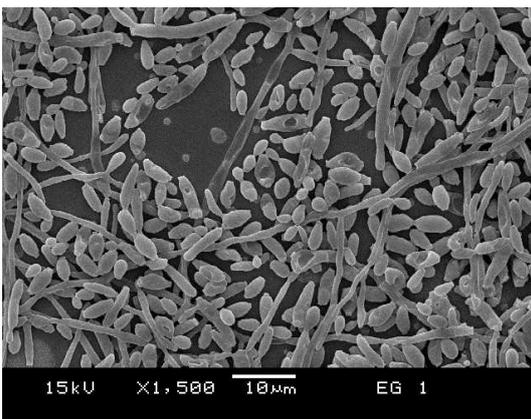


Figura 13: Biofilme em formação de *C. albicans*, exposto ao óleo de *E. globulus* (16mg/mL). Aumento de 1.500x



Figura 14: Biofilme em formação de *C. albicans*, exposto ao óleo de *E. globulus* (16mg/mL). Aumento de 3.000x

5.4.2. Biofilme maduro tratado com *Eucalyptus citriodora* e *Eucalyptus globulus*.

Nas análises de microscopia eletrônica de varredura, no controle do biofilme maduro foram observadas células com superfície regular e hifas com superfície homogênea, como observa-se nas figuras 15 e 16.

Nas imagens do tratamento com *E. citriodora* na concentração de 0,5 mg/mL, observam-se deformidades nas hifas e células, como diminuição do volume celular e rugosidade (Fig. 17 e 18), na concentração de 1 mg/mL, as deformidades apresentadas na concentração anterior estão mais acentuadas (Fig. 19 e 20), e na concentração mais alta de 2 mg/mL, pode-se observar grande variação na morfologia das células, quando comparada com o controle, detectando-se o mesmo fenômeno celular e rugosidade, e também pode-se observar a produção de material viscoso envolvendo as células (Fig. 21 e 22). Quando tratado com o óleo essencial de *E. globulus* na concentração de 4 mg/mL, foi observado apenas rugosidade nas hifas (Fig. 23 e 24), já na concentração de 8 mg/mL, foi observado rugosidades mais acentuadas nas hifas e células e também o rompimento da hifa (Fig. 25 e 26), na concentração mais alta 16 mg/mL, repetiu-se o fenômeno (Fig. 27 e 28).

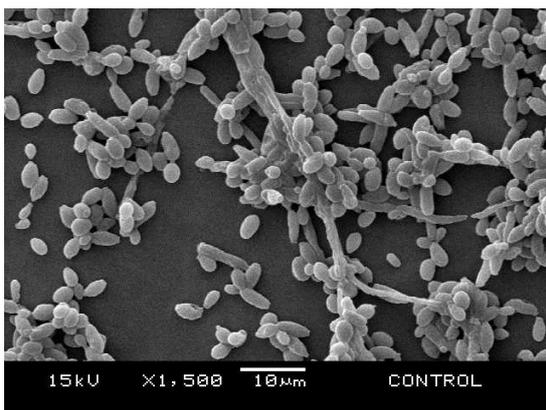


Figura 15: Controle do biofilme maduro de *C. albicans*. Aumento de 1.500x

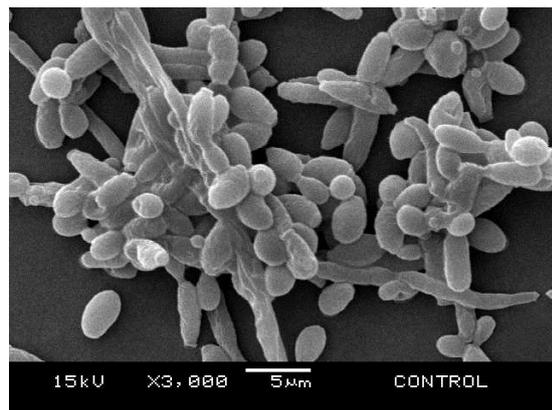


Figura 16: Controle do biofilme maduro de *C. albicans*. Aumento de 3.000x

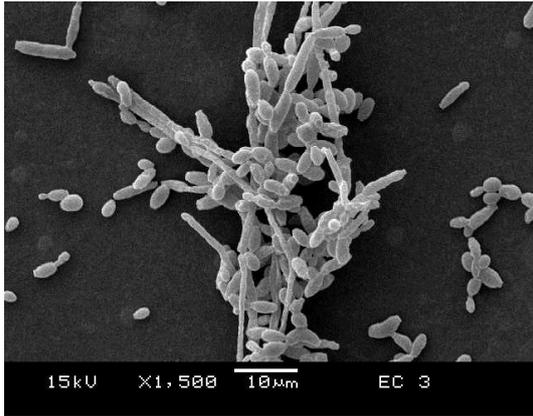


Figura 17: Biofilme maduro de *C. albicans*, exposto ao óleo de *E. citriodora* (0,5 mg/mL). Aumento de 1.500x

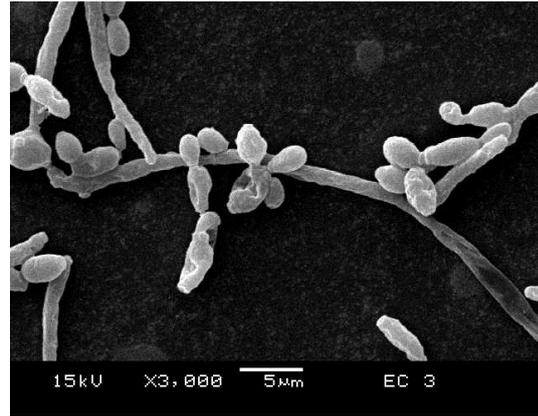


Figura 18: Biofilme maduro de *C. albicans*, exposto ao óleo de *E. citriodora* (0,5 mg/mL). Aumento de 3.000x

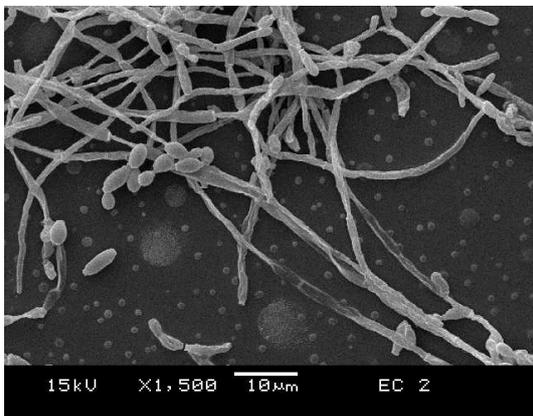


Figura 19: Biofilme maduro de *C. albicans*, exposto ao óleo de *E. citriodora* (1 mg/mL). Aumento de 1.500x

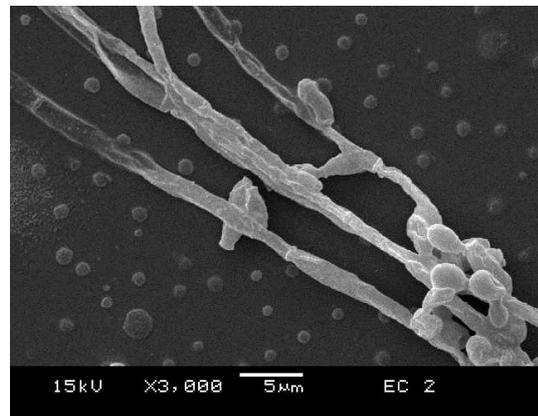


Figura 20: Biofilme maduro de *C. albicans*, exposto ao óleo de *E. citriodora* (1 mg/mL). Aumento de 3.000x

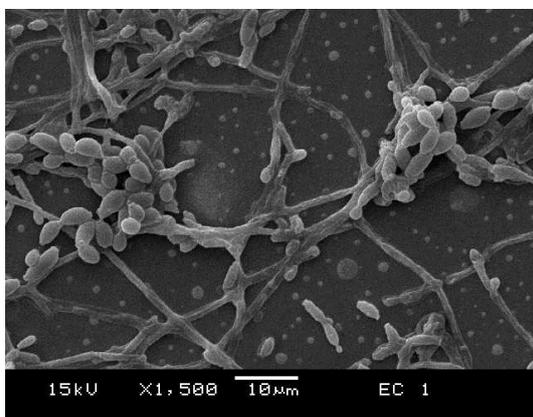


Figura 21: Biofilme maduro de *C. albicans*, exposto ao óleo de *E. citriodora* (2 mg/mL). Aumento de 1.500x

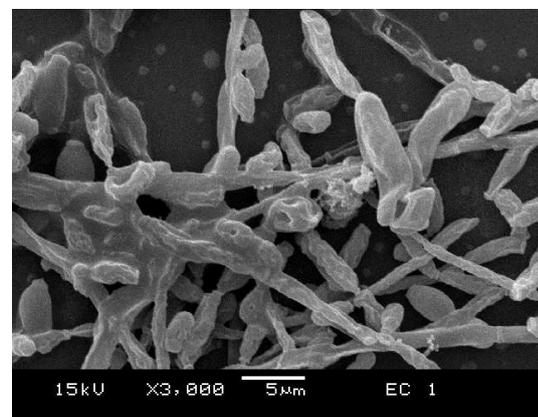


Figura 22: Biofilme maduro de *C. albicans*, exposto ao óleo de *E. citriodora* (2 mg/mL). Aumento de 3.000x

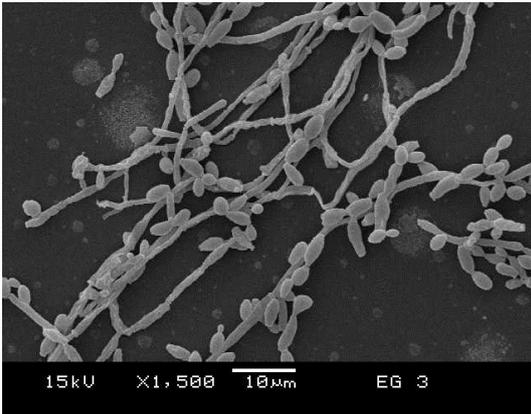


Figura 23: Biofilme maduro de *C. albicans*, exposto ao óleo de *E. globulus* (4 mg/mL). Aumento de 1.500x

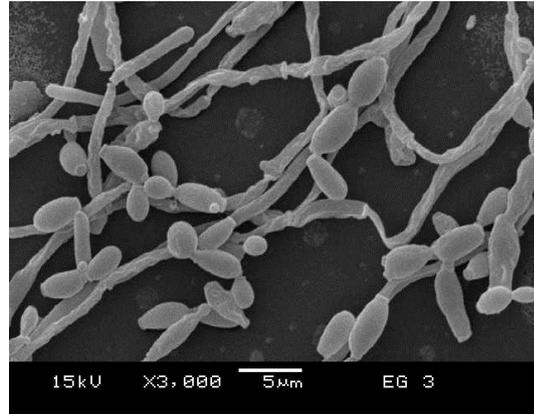


Figura 24: Biofilme maduro de *C. albicans*, exposto ao óleo de *E. globulus* (4 mg/mL). Aumento de 3.000x

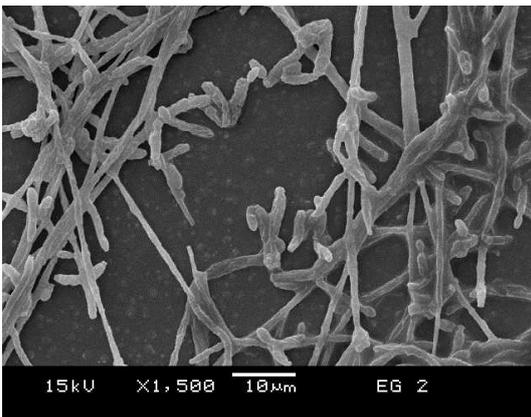


Figura 25: Biofilme maduro de *C. albicans*, exposto ao óleo de *E. globulus* (8 mg/mL). Aumento de 1.500x

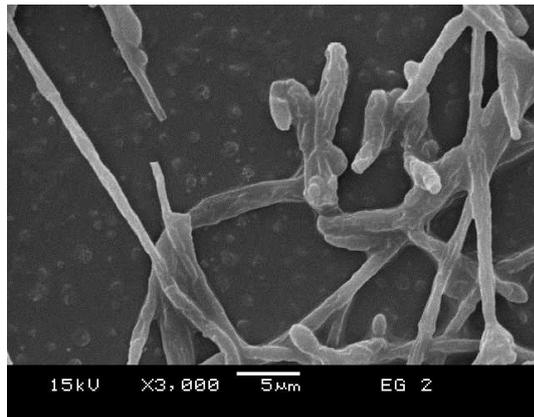


Figura 26: Biofilme maduro de *C. albicans*, exposto ao óleo de *E. globulus* (8 mg/mL). Aumento de 3.000x

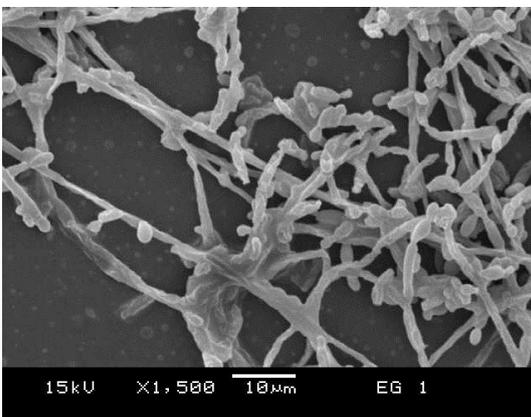


Figura 27: Biofilme maduro de *C. albicans*, exposto ao óleo de *E. globulus* (16 mg/mL). Aumento de 1.500x

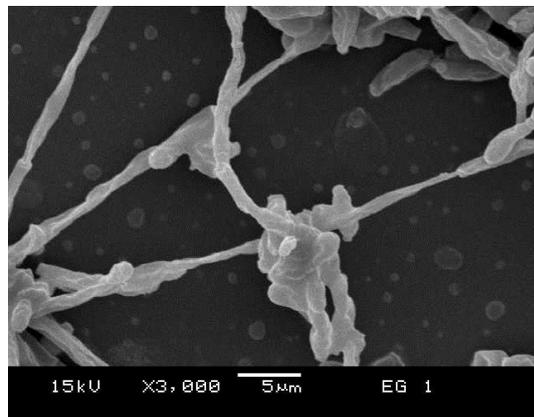


Figura 28: Biofilme maduro de *C. albicans*, exposto ao óleo de *E. globulus* (16 mg/mL). Aumento de 3.000x

5.5 Avaliação citotóxica dos óleos essenciais em larvas de *Galleria mellonella*

Para o teste de toxicidade dos óleos essenciais de espécies de *Eucalyptus* foram utilizadas larvas do inseto *Galleria mellonella* (10 larvas para cada grupo teste) que foram inoculadas com 10 µl do óleo a ser testado no hemocele pela última pró-pata.

O ensaio de atividade citotóxica realizado em larvas de *Galleria mellonella* (Gráfico 3 e 4) expostas nas concentrações do óleo essencial de *E. citriodora* (4 mg/mL e 2 mg/mL) e do óleo essencial de *E. globulus* (32 mg/mL e 16 mg/mL) apresentaram sobrevivência das larvas acima de 50% em todas as concentrações testadas (não apresentou IC₅₀), indicando baixa toxicidade. Todas as concentrações testadas de *E. citriodora* e *E. globulus* não tiveram diferença estatística quando comparadas ao controle ($p < 0,05$)

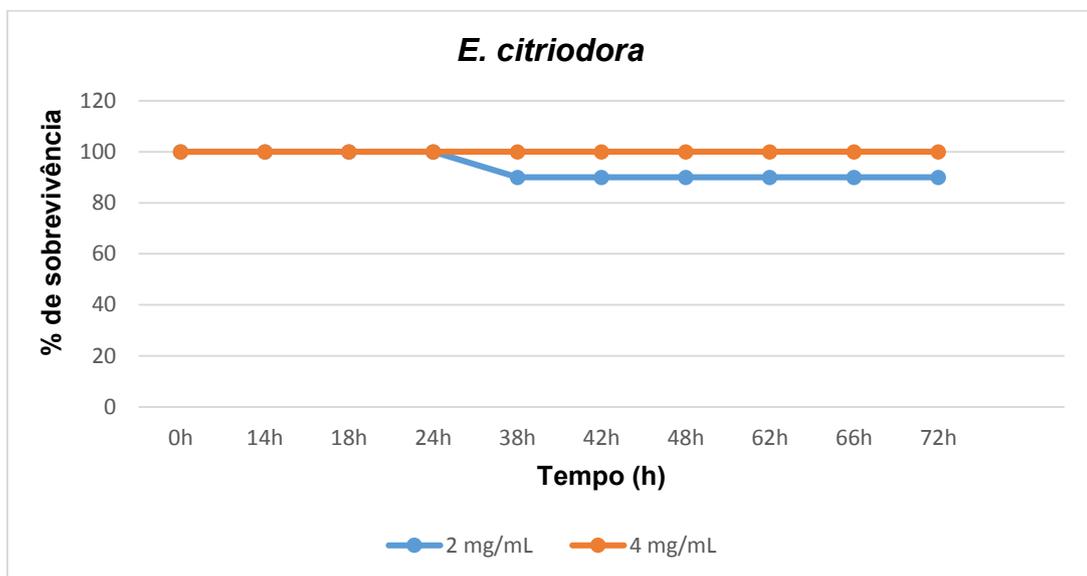


Gráfico 3: Gráfico representativo da sobrevivência (%) das larvas de *Galleria mellonella* expostas ao óleo essencial de *E. citriodora*.

*Significância estatística ($p < 0,05$). *Dunnett*, ANOVA.

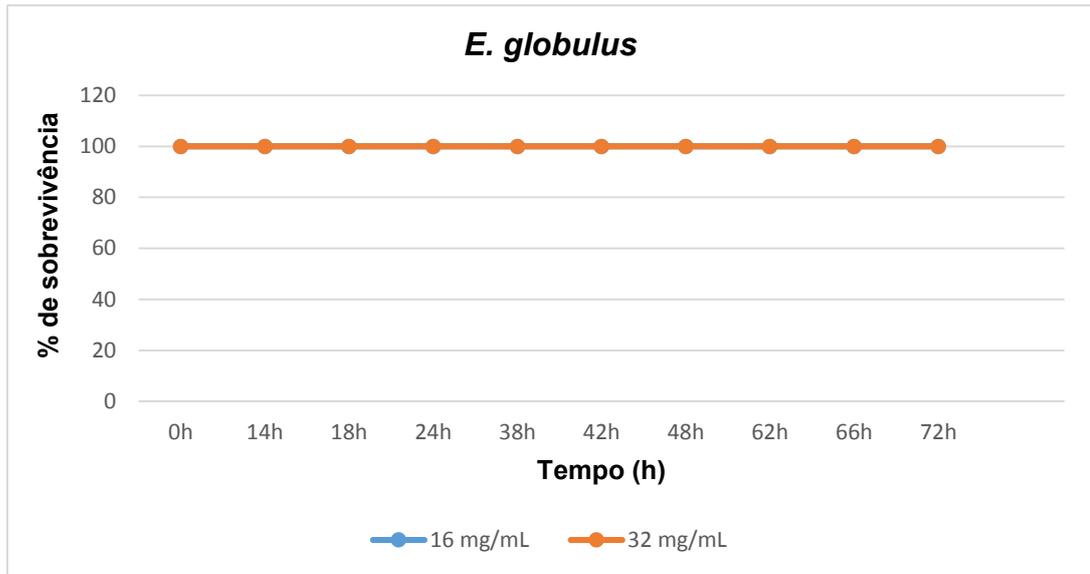


Gráfico 4: Gráfico representativo da sobrevivência (%) das larvas de *Galleria mellonella* expostas ao óleo essencial de *E. globulus*.

*Significância estatística ($p < 0,05$). *Dunnnett*, ANOVA.

6 DISCUSSÃO

Nos últimos anos o tratamento contra a candidíase tem se tornado uma preocupação, devido à toxicidade e o desenvolvimento da resistência aos antifúngicos comerciais (Behbehani et al., 2017). Nesse sentido, a procura por alternativas de substâncias que tenham a propriedade de agir contra microrganismos sem alterar as condições do hospedeiro, tem levado os pesquisadores a procurar essas substâncias em plantas, já que as mesmas tem demonstrado um poder curativo, mesmo que empiricamente ao longo dos anos. Nas últimas décadas, no entanto, tem se podido validar cientificamente essas propriedades, por inúmeras pesquisas.

É do conhecimento científico atual, que o metabolismo secundário das plantas promove a produção de compostos ativos que estão envolvidos em seu sistema defensivo. Estes metabólitos são extraídos de diferentes modos e de diferentes partes da planta, mas compõem principalmente os óleos essenciais e extratos produzidos com diferentes veículos.

O gênero *Eucalyptus* tem sido cultivado e explorado em larga escala há muitos anos. Várias espécies do gênero são usadas na medicina popular como antisséptico e para tratamento de infecções do trato respiratório superior. Os óleos essenciais extraídos da folha dessa planta exibem vários efeitos biológicos como atividade antibacteriana, antifúngica e antioxidante. As propriedades antimicrobianas, analgésicas e anti-inflamatórias das espécies *E. citriodora* e *E. globulus* foram relatadas (Luqman et al., 2008).

No presente estudo, os dados obtidos por método de microdiluição (CLSI, 2008) demonstraram atividade antifúngica dos óleos testados contra células planctônicas de *Candida* spp. Para o óleo essencial de *E. citriodora*, as concentrações de CIM variaram entre 0,5 mg/mL a 0,125 mg/mL entre as cepas testadas. O óleo de *E. globulus* obteve CIM entre 2 mg/mL a 1 mg/mL para as cepas testadas, exceto para a cepa de *Candida rugosa* IZ 12 que teve seu crescimento inibido apenas na concentração 8 mg/mL (Tabela 1). A concentração fungicida mínima (CFM) do óleo essencial de *E. citriodora* nas cepas de *Candida* testadas se

deu entre 0,25 mg/ml a 0,5 mg/mL. O óleo essencial de *E. globulus* apresentou CFM entre as concentrações 1 mg/mL a 8 mg/mL (Tabela 1).

Esses dados, em princípio, demonstram inicialmente ação antimicrobiana desses óleos essenciais corroborando com a literatura, apontando que espécies de *Eucalyptus* possuem atividade antimicrobiana pela presença de compostos bioativos em seu óleo essencial (Luqman et al., 2008). Segundo Tyagi et al. (2011) o óleo de *E. globulus* apresentou atividade antimicrobiana contra *B. subtilis* e *S. aureus*. O óleo de *E. globulus* também apresentou atividade contra células de levedura, com inibição do crescimento de *Candida albicans* e de *Saccharomyces cerevisiae*. Atividade antibacteriana contra as espécies *Fusobacterium nucleatum* e *Porphyromonas gingivalis* foram também observadas por Harkat-Madouri et al. (2015). Em estudo realizado por Dhakad et al. (2017), *E. globulus* exibiu atividade antibacteriana e antifúngica. O óleo essencial de *E. citriodora* também demonstrou atividade antifúngica contra espécies de fungos filamentosos (Javed et al., 2012). Nessa mesma linha de pesquisa, Luqman et al. (2008), também relatou a atividade antimicrobiana de *E. citriodora* contra *Candida albicans*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus niger*, e contra as cepas bacterianas de *Escherichia coli* e *Mycobacterium smegmatis*. Em adição, o óleo de *E. citriodora* também exibiu atividade antifúngica contra os dermatófitos *Microsporum canis*, *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes* (Tolba et al., 2015).

Esses dados quando analisados em conjunto, demonstram que as espécies de *Eucalyptus spp.* são potencialmente antibacterianas e antifúngicas, exibindo ação contra esses microrganismos de maneira diversa.

De acordo com Duarte et al. (2005), a classificação do nível de aceitação de materiais vegetais é feita de acordo com o valor de CIM, concentração inibitória mínima de até 0,5 mg/mL sendo consideradas fortes, de 0,55 a 1,5 mg/mL são consideradas moderadas e acima de 1,5 mg/mL tidas como fracas. Neste sentido, os resultados obtidos com o óleo essencial de *E. citriodora* demonstrou CIM consideradas fortes para todas as cepas testadas. Já o óleo essencial de *E. globulus* demonstrou CIM considerada moderada para as cepas *C. parapsilosis* CBS 5604, *C. glabrata* ATCC 5207, *C. guilliermondii* CBS 566, *C. glabrata* IZ 07, *C. utilis* CBS 5609 e *C. tropicalis* ATCC 40281, sendo que as demais cepas testadas apresentaram CIM acima de 1,5 mg/mL consideradas fracas.

Esses dados sugerem, em princípio, que o perfil de atividade antifúngica dos óleos essenciais das espécies testadas, atua de forma específica em relação às cepas de *Candida*, provavelmente em função das características de seus componentes bioativos, o que poderá ser verificado pela obtenção do espectro desses óleos quando submetidos à Cromatografia Gasosa (CG) e fracionamento dos compostos para que sejam testados quanto ao perfil antifúngico isoladamente.

Testes de susceptibilidade das cepas planctônicas também foram feitos por método de microdiluição com os antifúngicos comerciais Fluconazol e Anfotericina B. A concentração inicial para os testes de susceptibilidade foi de 64 µg/mL para o Fluconazol e 16 µg/mL para a Anfotericina B. O Fluconazol demonstrou inibição do crescimento das cepas de *Candida* na concentração entre 1 µg/mL e 32 µg/mL, sendo a maioria das cepas inibidas na concentração de 1 µg/mL, demonstrando sensibilidade ao Fluconazol; apenas a cepa *C. krusei* ATCC 6258 demonstrou sensibilidade dose dependente ao Fluconazol com CIM de 32 µg/mL. Já a Anfotericina B inibiu as cepas de *Candida* entre as concentrações de 0,25 µg/mL a 1 µg/mL, onde a maioria das cepas foi inibida na concentração de 0,25 µg/mL; todas as cepas testadas demonstraram sensibilidade a Anfotericina B (Tabela 1). Ambos os antifúngicos comerciais demonstraram que seu potencial antifúngico podem variar em relação às espécies de *Candida* em função da interação dessas substâncias com as células leveduriformes.

Quando comparado aos antifúngicos comerciais testados, os resultados de CIM dos óleos essenciais de *E. citriodora* e *E. globulus* foram maiores, apresentando valores de CIMs em concentrações acima dos valores de CIMs dos antifúngicos comerciais. Uma vez que há vários relatos na literatura indicando ação antimicrobiana dessas espécies de plantas, aliado ao fenômeno de resistência microbiana aos antifúngicos comerciais, e uma menor possibilidade de sintetizar novos fármacos, associado ao aumento de infecções por esses microrganismos, estudos mais amplos na tentativa de avaliar o potencial antifúngico dos óleos essenciais utilizando concentrações menores na combinação sinérgica com fármacos convencionais na tentativa de diminuir ou evitar efeitos colaterais desses fármacos, (potencializando a sua atividade antifúngica), deverão ser levados a efeito em pesquisas posteriores.

Os biofilmes são definidos com uma comunidade microbiana ligada à qualquer superfície, onde as células desta comunidade secretam e estão envolvidas por uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares, exibindo características fenotípicas diferentes de células planctônicas (Acker et al., 2014). A formação dessa estrutura é um dos fatores de virulência mais importantes de microrganismos, em especial a da *Candida*, devido a apresentar resistência ao tratamento de vários antifúngicos e afetando as respostas imunológicas do hospedeiro. Acredita-se que a ordem de acontecimentos do desenvolvimento de biofilme de *Candida* “*in vitro*” se inicie pela adesão de células de levedura em um substrato, proliferação celular e a formação de projeções filamentosas, como hifas e pseudohifas, se intercalando ao acúmulo de matriz extracelular (Nobile et al., 2011). Os biofilmes de *Candida* são colonizadores de vários dispositivos médicos, como cateteres venosos centrais, válvulas cardíacas e também próteses orais. As infecções causadas por *Candidas* formadoras de biofilme são frequentemente associadas a maiores taxas de mortalidade (Pumeesat et al., 2017).

A avaliação da ação dos óleos essenciais do gênero *Eucalyptus* na estrutura do biofilme em formação e no biofilme maduro de *Candida albicans* (MYA-2876) foram levados a efeito nesse trabalho. Esses óleos essenciais se mostraram eficientes contra a progressão do biofilme em formação, inibindo em aproximadamente 50% o crescimento do biofilme na concentração 0,25 mg/mL para *E. citriodora* e 2 mg/mL para *E. globulus*. Nas concentrações iniciais testadas para *E. citriodora* (16 mg/mL) e *E. globulus* (64 mg/mL) a inibição do crescimento do biofilme foi de aproximadamente 92% para ambos comparado ao grupo controle. Esses dados sugerem o potencial de ação dessas substâncias, impedindo o processo normal de formação do biofilme de *Candida albicans* quando testados com os óleos essenciais dessas espécies.

Os óleos essenciais também se mostraram eficientes na desorganização do biofilme maduro, comprometendo cerca de 50% do biofilme em concentrações menores quando comparado ao biofilme em formação, 0,125 mg/mL para *E. citriodora* e 0,5 mg/mL para *E. globulus*. Nas concentrações iniciais testadas para *E. citriodora* (16 mg/mL) e *E. globulus* (64 mg/mL) a desorganização do biofilme maduro foi de aproximadamente 86% para *E. citriodora* e 94% para *E. globulus* quando comparado ao grupo controle. Os resultados obtidos com os óleos testados

mostraram resultados satisfatórios em relação à desconstrução do biofilme maduro, sugerindo o seu uso como uma alternativa antimicrobiana na ação contra essa estrutura, quer seja como agente principal ou como coadjuvantes.

A atividade antibiofilme do gênero *Eucalyptus* também foi observada por Mathur et al. (2014) contra o patógeno do trato urinário *Proteus mirabilis*, apresentando aproximadamente 90% de inibição da formação de biofilme. Sugere-se que o 1,8-cineol (44,2%) e α -pineno (13,6%) presentes nos óleos essenciais de *Eucalyptus* sejam os principais componentes que estejam afetando o processo normal de formação do biofilme de *P. mirabilis*. Um conhecimento mais acurado sobre o perfil das substâncias bioativas presentes nessas espécies, poderão contribuir sobremaneira na seleção dessas espécies em relação à sua ação contra microrganismos.

Afim de investigar possíveis alterações na arquitetura do biofilme após o tratamento com os óleos essenciais, as amostras foram analisadas visualmente por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Para o óleo de *E. citriodora* foram utilizadas as concentrações 0,5 mg/mL, 1 mg/mL e 2 mg/mL; para o óleo de *E. globulus* foram utilizadas as concentrações 4 mg/mL, 8 mg/mL e 16 mg/mL. Nas maiores concentrações dos óleos essenciais foram observados deformidades nas hifas e nas células como rugosidade e diminuição do volume celular, comprometendo a estrutura do biofilme devido à diminuição das hifas, o que sugere uma ação efetiva na desestruturação e nos mecanismos de desenvolvimento dessa estrutura.

Os mecanismos da atividade antibiofilme de *Candida* não são muito claros, mas são relatados como agentes principais, a ação dos terpenóides por desestabilizar a membrana celular e modular as funções associadas à membrana, como permeabilidade, sinalização celular (*quórum-sensing*) (Zore et al., 2011). Anibal et al. (2010) pesquisando outras espécies de plantas como *Mentha* spp., sugerem que a presença de flavonoides e terpenos presentes nos óleos essenciais dessas plantas medicinais sejam responsáveis pela toxicidade à células fúngicas devido certo grau de lipofilicidade e pelas interações com os constituintes da membrana e seu arranjo.

Uma vez que os principais constituintes dos óleos essenciais das espécies de *Eucalyptus* contêm terpenos, 1-8-Cineol (75,8%), α -Pineno (7,4%), limoneno (6,4%) em *E. globulus*; e citronelal (69,77%), citronelol (10,63%) em *E. citriodora* isso pode ser um indicativo que os óleos essenciais de *Eucalyptus* podem possuir atividade antibiofilme, promovendo alterações morfológicas e estruturais no biofilme de *Candida albicans* como demonstrado nessa pesquisa (Tolba et al., 2015; Quatrin et al., 2017).

Atualmente tem se substituído os animais convencionais por outros animais durante ensaios para investigar um futuro tratamento e a eficácia de compostos. Muitos estudos confirmam que a patogenicidade microbiana e os determinantes de virulência são os mesmos em humanos, camundongos e mariposas (Benaducci et al., 2016; Ignasiak & Maxwell, 2017).

O modelo *Galleria mellonella* representa um sistema experimental inovador para estudar virulência microbiana, bem como, a eficácia antimicrobiana. O uso das larvas de *G. mellonella* traz alguns benefícios, os insetos podem ser criados rapidamente (ciclo de vida completo dura aproximadamente 6 semanas) e há baixo custo, sem a necessidade de equipamentos especializados, geralmente não havendo a necessidade de submissão a considerações éticas, além disso, o sistema imunológico dos insetos é funcionalmente e estruturalmente semelhante ao sistema imunitário inato de mamíferos (Benaducci et al., 2016; Ignasiak & Maxwell, 2017).

Neste estudo, além dos óleos essenciais de *E. citriodora* e *E. globulus* apresentarem ação antifúngica contra células de *Candida* em estado planctônico e em biofilme, o ensaio de toxicidade das larvas de *G. mellonella* com os óleos, demonstraram sobrevivência das larvas acima de 50% em todas as concentrações testadas (não apresentou IC₅₀), indicando baixa toxicidade, sugerindo pouco ou nenhum efeito tóxico desses componentes, demonstrando possíveis aplicações terapêuticas. Novos ensaios de toxicidade serão realizados nas fases subsequentes da pesquisa, utilizando cultivo de células humanas de diferentes linhagens, afim de esclarecer seu perfil citotóxico em humano.

De modo geral, os resultados apresentados nesta pesquisa corroboram com outros estudos nessa linha de investigação, demonstrando os efeitos antimicrobianos dos óleos essenciais do gênero *Eucalyptus*. Estudos futuros

envolvendo mais espécies, no que diz respeito ao conhecimento dos perfis dessas substâncias bioativas, outros ensaios de citotoxicidade para células do hospedeiro, assim como, a ação sobre uma ampla gama de microrganismos, especialmente fungos, poderão ampliar e embasar com mais propriedade o seu uso como uma alternativa eficaz de ação antimicrobiana, no mínimo como coadjuvantes, de acordo com os dados disponíveis na literatura.

Investigações futuras serão realizadas para avaliar o efeito dos óleos essenciais em isolados clínicos; efeito dos óleos essenciais no biofilme de *Candida albicans* por meio de Microscopia Confocal de Varredura a Laser; avaliar o possível efeito citotóxico dos óleos essenciais nas células epiteliais da linhagem HaCat na tentativa de ampliar o conhecimento sobre estas plantas e seu potencial antifúngico.

7 CONCLUSÃO

✓ Os óleos essenciais (OE) das folhas de *Eucalyptus citriodora* e *Eucalyptus globulus* são biologicamente ativos de maneira dose dependente contra as espécies de *Candida* testadas em sua forma planctônica.

✓ Os OE testados apresentam atividade fungicida dose dependente contra as cepas testadas.

✓ Os OE das folhas de *Eucalyptus citriodora* e *Eucalyptus globulus* são biologicamente ativos nos biofilmes em formação e maduro de *C. albicans*, diminuindo a atividade metabólica de ambos os biofilmes.

✓ Os OE das folhas de *Eucalyptus citriodora* e *Eucalyptus globulus* demonstrado pelo MEV, atuam na morfologia e estrutura do biofilme de *C. albicans*, apresentando rugosidade e diminuição do volume celular nas células leveduriformes e hifas, promovendo diminuição das hifas.

✓ O OE das folhas de *Eucalyptus citriodora* e *Eucalyptus globulus* apresenta baixa toxicidade em larvas de *Galleria mellonella*.

REFERÊNCIAS*

1. Acker HA, Van DP, Coenye P. Molecular mechanisms of antimicrobial tolerance and resistance in bacterial and fungal biofilms. *Trends Microbiol.* 2014; 22 (6): 326-333.
2. Alalwan H, Rajendran R, Lappin DF, Combet E, Shahzad M, Robertson D, et al. The Anti-Adhesive Effect of Curcumin on *Candida albicans* Biofilms on Denture Materials. *Front Microbiol.* 2017; 8:659.
3. Ali A, Khana MMA, Uddina M, Naeema M, Idrees M, Hashmi N, et al. Radiolytically depolymerized sodium alginate improves physiological activities, yield attributes and composition of essential oil of *Eucalyptus citriodora* Hook. *Carbohydrate Polymers.* 2014; 112: 134–144.
4. Alvarenga RFR, Wan B, Inui T, Franzblau SG, Pauli GF, Jaki BU. Airborne Antituberculosis Activity of *Eucalyptus citriodora* Essential Oil. *J. Nat. Prod.* 2014; 77 (3): 603–610.
5. Anibal PC, Sardi JCO, Peixoto ITA, Moraes JJC, Höfling JF. Conventional and alternative antifungal therapies to oral candidiasis. *Braz J Microbiol.* 2010; 41(4): 824–831.
6. Asdadi A, Hamdouch A, Oukacha A, Moutaj R, Gharby S, Harhar H, et al. Study on chemical analysis, antioxidant and in vitro antifungal activities of essential oil from wild *Vitex agnus-castus* L. seeds growing in area of Argan Tree of Morocco against clinical strains of *Candida* responsible for nosocomial infections. *J Mycol Med.* 2015; 25 (4): 118-127.
7. Azwanida NN. A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. *Med Aromat Plants.* 2015; 4: 196.
8. Bachir RG, Benali M. Antibacterial activity of the essential oils from the leaves of *Eucalyptus globulus* against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2012; 9 (2): 739-742.¹
9. Barbosa LCA, Filomeno CA, Robson Ricardo Teixeira RR. Chemical Variability and Biological Activities of *Eucalyptus* spp. Essential Oils. *Molecules* 2016, 21(12): 1671

* De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na padronização do International Committee of Medical Journal Editors - Vancouver Group. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o PubMed.

10. Behbehani J, Shreaz S, Irshad M, Karched M. The natural compound magnolol affects growth, biofilm formation, and ultrastructure of oral *Candida* isolates. *Microb Pathog.* 2017.
11. Benaducci T, Sardi JCO, Lourencetti NMS, Scorzoni L, Gullo FP, Rossi SA. Virulence of *Cryptococcus* sp. Biofilms *In Vitro* and *In Vivo* using *Galleria mellonella* as an Alternative Model. *Front Microbiol.* 2016; 7: 290.
12. Bhattacharjee, P. Epidemiology and antifungal susceptibility of *Candida* species in a tertiary care hospital, Kolkata, India. *Curr Med Mycol.* 2016; 2 (2): 20-27.
13. Blair JM, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJ. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology.* 2015; 13: 42-51.
14. Butler JB, Vaillancourt RE, Potts BM, Lee DJ, King GJ, Baten A, et al. Comparative genomics of *Eucalyptus* and *Corymbia* reveals low rates of genome structural rearrangement. *BMC Genomics.* 2017; 18: 397.
15. Canela HMS, Cardoso B, Vitali LH, Coelho HC, Martinez R, Ferreira MES. Prevalence, virulence factors and antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolated from bloodstream infections in a tertiary care hospital in Brazil. 2018; 61 (1): 11-21.
16. Chin VK, Lee TY, Rusliza B, Chong PP. Dissecting *Candida albicans* Infection from the Perspective of *C. albicans* Virulence and Omics Approaches on Host-Pathogen Interaction: A Review. *Int J Mol Sci.* 2016; 17 (10): 1643.
17. CLSI (2008). Método de referência para testes de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade de leveduras a terapia antifúngica. Clinical and laboratorial standards institute. CLSI Norma M27-A3, v.28, n.14, 2 ed., 2008.
18. Coutinho, HDM. Factors influencing the virulence of *Candida* spp. *West Indian Medical Journal.* 2009; 58 (2): 160-163.
19. Dagli N, Dagli R, Mahmoud RS, Baroudi K. Essential oils, their therapeutic properties, and implication in dentistry: A review. *J Int Soc Prev Community Dent.* 2015; 5(5): 335–340.
20. Delaviz H, Mohammadi J, Ghalamfarsa G, Mohammadi B, Farhadi B. A Review Study on Phytochemistry and Pharmacology Applications of *Juglans Regia* Plant. *Pharmacogn Rev.* 2017; 11 (22): 145-152.
21. Dhakad, AK, Pandey VV, Beg S, Rawat JM, Singh A. Biological, medicinal and toxicological significance of *Eucalyptus* leaf essential oil: a review. *J Sci Food Agric.* 2017.

22. Duarte MC, Figueira GM, Sartoratto Um, Rehder VL, Delarmelina C. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. *J Ethnopharmacol.* 2005; 97(2): 305– 311.
23. Ekor, M. The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. *Front Pharmacol.* 2014; 177 (4): 1-10.
24. Elaissi A, Rouis Z, Salem NAB, Mabrouk S, Salem YB, Salah KBH, et al. Chemical composition of 8 *Eucalyptus* species' essential oils and the evaluation of their antibacterial, antifungal and antiviral activities. *BMC Complement Altern Med.* 2012; 12: 81.
25. Fonseca GM, Passos TC, Ninahuaman MFML, Caroci AS, Costa LS. Avaliação da atividade antimicrobiana do alho (*Allium sativum* Liliaceae) e de seu extrato aquoso. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai.* 2014; 16 (3): 679-684.
26. Gbenou J, Ahounou jf, Akakpo HB, Laleye A, Yayi E, Gbaguidi F, Baba-Moussa L, et al. Phytochemical composition of *Cymbopogon citratus* and *Eucalyptus citriodora* essential oils and their anti-inflammatory and analgesic properties on Wistar rats. *Mol Biol Rep.* 2013; 40: 1127–1134.
27. Ghaffar A, Yameen M, Kiran S, Kamal S, Jalal F, Munir B, Saleem S, et al. Chemical Composition and in-Vitro Evaluation of the Antimicrobial and Antioxidant Activities of Essential Oils Extracted from Seven *Eucalyptus* Species. *Molecules.* 2015; 20 (11): 20487-20498.
28. Gullo FP, Sardi JCO, Santos VAFFM, Sangalli-Leite F, Pitanguí NS, Rossi SA, de Paula e Silva ACA, et al. Antifungal activity of Maytenin and Pristimerin. Hindawi Publishing Corporation, 2012.
29. Hammad MM, Darwazeh AM, Idrees MM. The effect of glycemic control on *Candida* colonization of the tongue and the subgingival plaque in patients with type II diabetes and periodontitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2013; 116 (3): 321-326.
30. Hani U, Shivakumar HG, Vaghela R, Osmani RA, Shrivastava A. Candidiasis: a fungal infection--current challenges and progress in prevention and treatment. *Infect Disord Drug Targets.* 2015; 15 (1): 42-52.
31. Harkat-Madouri L, Asma B, Madani K, Si Disse ZBO, Rigou P, Grenier D, Allalou H et al. Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of essential oil of *Eucalyptus globulus* from Algeria. *Industrial Crops and Products.* 2015; 78: 48–153.

32. Hosseini N, Yazdanpanah S, Saki M, Rezazadeh F, Ghapanchi J, Zomorodian K. Susceptibility of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to Photodynamic Therapy Using Four Dyes as the Photosensitizer. *J Dent (Shiraz)*. 2016; 17(4): 354–360.
33. Ignasiak K, Maxwell A. *Galleria mellonella* (greater wax moth) larvae as a model for antibiotic susceptibility testing and acute toxicity trials. *BMC Res Notes*. 2017; 10: 428.
34. Javed S, Shoaib A, Mahmood Z, Mushtaq S, Iftikhar S. Analysis of phytochemical constituents of *Eucalyptus citriodora* L. responsible for antifungal activity against post-harvest fungi. *Nat Prod Res*. 2012; 26 (18): 1732-1736.
35. JD Braz, Pitangui NS, Yamashita CT, Fusco-Almeida AM, Mendes-Giannini MJS, Sardi JCO. Genetic evaluation and activity of antifungal against clinical isolates *Candida albicans* biofilms. *International Journal of Medical and Health Sciences Research*. 2014; 1 (10): 119-125.
36. Lin L, Cui H, Zhou H, Zhang Xa, Bortolini C, Chen M, et al. Nanoliposomes containing *Eucalyptus citriodora* as antibiotic with specific antimicrobial activity. *Chem. Commun*. 2015; 51: 2653-2655.
37. Lopes CM, Wallich R, Riesbeck K, Skerka C, Zipfel PF. *Candida albicans* uses the surface protein Gpm1 to attach to human endothelial cells and to keratinocytes via the adhesive protein vitronectin. *PLoS One*. 2014; 9 (3): e90796.
38. Luqman S, Dwived GR, Darokar MP, Kalra A, Khanuja SPS. Antimicrobial activity of *Eucalyptus citriodora* essential oil. *International Journal of Essential Oil Therapeutics*. 2008; 2: 69-75.
39. Madariaga-Venegas F, Fernández-Soto R, Duarte LF, Suarez N, Delgadillo D, Jara JA. Characterization of a novel antibiofilm effect of nitric oxide-releasing aspirin (NCX-4040) on *Candida albicans* isolates from denture stomatitis patients. *PLoS One*. 2017; 12 (5): e0176755.
40. Mathur S, Udgire M, Khambhupati A, Paul D. Anti-biofilm activity and bioactive component analysis of *Eucalyptus* oil against urinary tract pathogen. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*. 2014; 3 (5): 912-918.
41. Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*. 2013; 4 (2): 119-128.

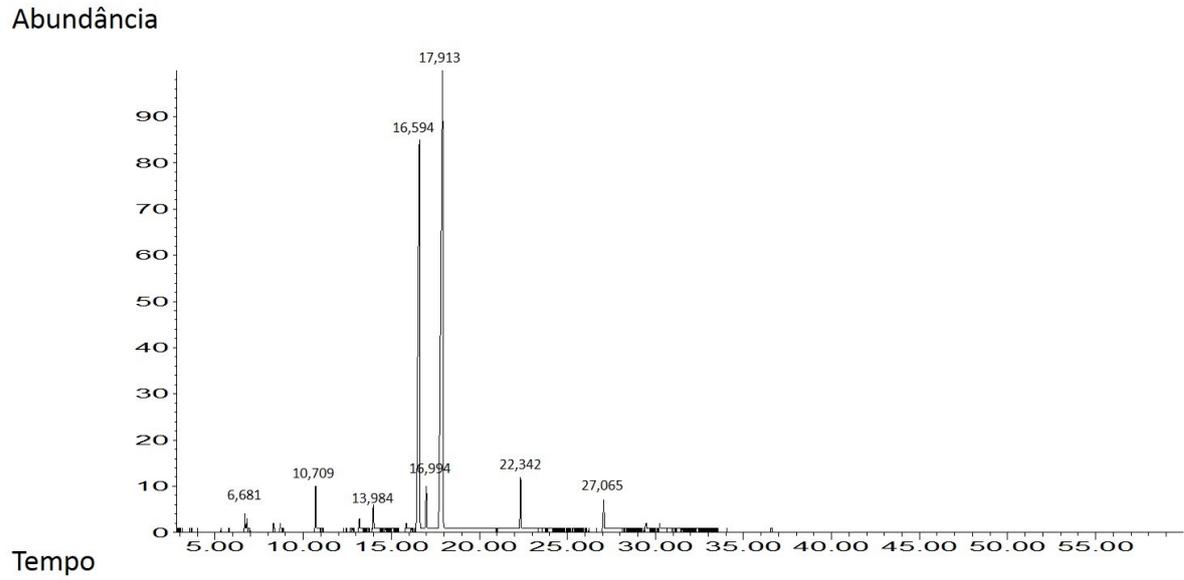
42. Mulyaningsih S, Sporer F, Reichling J, Wink M. Antibacterial activity of essential oils from *Eucalyptus* and of selected components against multidrug-resistant bacterial pathogens. *Pharm Biol.* 2011; 49 (9): 893-899.
43. Myburg AA, Grattapaglia D, Tuskan GA, Hellsten U, Hayes RD, Grimwood J, Jenkins J, et al. The genome of *Eucalyptus grandis*. *Nature.* 2014; 510 (7505): 356-362.
44. Neji S, Hadrich I, Trabelsi H, Abbes S, Cheikhrouhou F, Sellami H, et al. Virulence factors, antifungal susceptibility and molecular mechanisms of azole resistance among *Candida parapsilosis* complex isolates recovered from clinical specimens. *Journal of Biomedical Science.* 2017; 24:67.
45. Nijmoh DL, Assob JCN, Mokake SE, Nyhalah DJ, Yinda CK, Sandjon B. Antimicrobial Activities of a Plethora of Medicinal Plant Extracts and Hydrolates against Human Pathogens and Their Potential to Reverse Antibiotic Resistance. *Int J Microbiol.* 2015.
46. Nobile CJ, Mitchell AP. Genetics and genomics of *Candida albicans* biofilm formation. *Cellular microbiology,* 2006; 8 (9): 1382-1391.
47. Oliveira JSB, Gomes SMTP, Schwan-Estrada KRF, Mesquini RM, Bonato CM, Romano EDB. Pathogenesis of essential oil and homeopathies of *Eucalyptus citriodora* in bean plants (*Phaseolus vulgaris*). *Rev. Bras. Pl. Med.* 2013; 15 (4): 734-741.
48. Park B, Hwang E, Seo SA, Cho JG, Yang JE, Yi TH. *Eucalyptus globulus* extract protects against UVB-induced photoaging by enhancing collagen synthesis via regulation of TGF- β /Smad signals and attenuation of AP-1. *Arch Biochem Biophys.* 2018; 1 (637):31-39.
49. Park JW, Wendt M, Heo GJ. Antimicrobial activity of essential oil of *Eucalyptus globulus* against fish pathogenic bacteria. *Lab Anim Res.* 2016; 32 (2): 87–90.
50. Peixoto ITA, Furletti VF, Anibal PC, Figueira GM, Sartoratto A, Busato de Feiria SN et al. A survey of essential oils from *Mentha* spp. as an antimicrobial potential agent against *Candida* species. *Adv Med Plant Res.* 2016; 4 (2): 58-72.
51. Pereira CA, Domingues N, Araújo MIDSA, Junqueira JC, Back-Brito GN, Jorge AOC. Production of virulence factors in *Candida* strains isolated from patients with denture stomatitis and control individuals. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* 2016; 85: 66–72.

52. Pereira CA, Domingues N, Silva MP, Costa ACBP, Junqueira JC, Jorge AOC. Photodynamic inactivation of virulence factors of *Candida* strains isolated from patients with denture stomatitis. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology* 153. 2015; 82–89.
53. Petrovska, BB. Historical review of medicinal plants' sage. *Pharmacogn Rev.* 2012; 11 (6): 1-5.
54. Pierce CG, Uppuluri P, Tristan AR, Wormley FL Jr, Mowat E, Ramage G, Lopez-Ribot JL. A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. *Nat Protoc.* 2008; 3(9): 1494-500.
55. Pierce CG, Vila T, Romo JA, Montelongo-Jauregui D, Wall G, Ramasubramanian A, et al. The *Candida albicans* Biofilm Matrix: Composition, Structure and Function. *J Fungi (Basel).* 2017; 3 (1).
56. Porfírio BEC, Ribeiro CL, Oliveira MS, Ribeiro EL, Silva MRR, Naves PLF. Cell surface hydrophobicity and biofilm formation of *Candida* yeast species in different culture media. *Biosci. J.* 2017; 33 (3): 739-746.
57. Pumeesat P, Muangkaew W, Ampawong S, Luplertlop N. *Candida albicans* biofilm development under increased temperature. *New Microbiol.* 2017; 40 (3): 1-14.
58. Quan-zhen LV, Yan L, Jiang YY. The synthesis, regulation, and functions of sterols in *Candida albicans*: Well-known but still lots to learn. *Virulence.* 2016; 7 (6): 649-65.
59. Quatrin PM, Verdi CM, Souza ME, Godoi SN, Klein B, Gundel A, et al. Antimicrobial and antibiofilm activities of nanoemulsions containing *Eucalyptus globulus* oil against *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida* spp. *Microbial Pathogenesis.* 2017; 112: 230-242.
60. Ramesh N, Priyadharsini M, Sumathi CS, Balasubramanian V, Hemapriya J, Kannan R. Virulence Factors and Anti Fungal Sensitivity Pattern of *Candida* Sp. Isolated from HIV and TB Patients. *Indian J Microbiol.* 2011; 51 (3): 273-278.
61. Sardi JC, Duque C, Mariano FS, Peixoto IT, Höfling JF, Gonçalves RB. *Candida* spp. in periodontal disease: a brief review. *J Oral Sci.* 2010; 52 (2): 177-185.
62. Sardi JCO, Gullo FP, Pitanguí NS, Fusco-Almeida AM, Mendes-Giannini MJS. In vitro Antifungal Susceptibility of *Candida albicans* Isolates from Patients with Chronic Periodontitis and Diabetes. *Clin Microbiol.* 2013(2); 2:1.

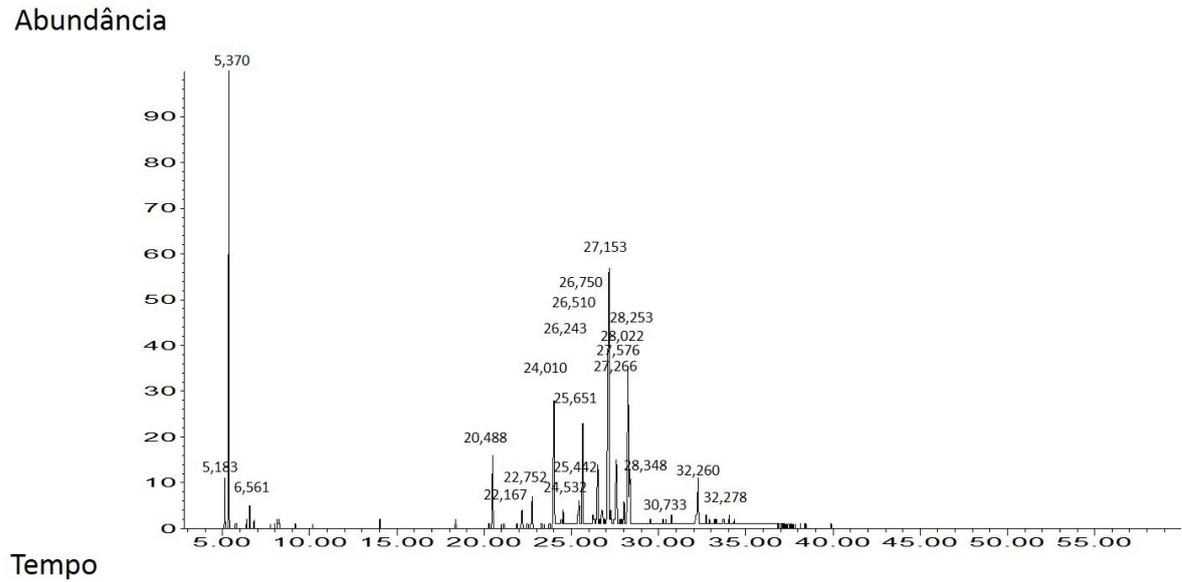
63. Sardi JCO, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida AM, Mendes Giannini MJS. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *Journal of Medical Microbiology*. 2013; 62: 10–24.
64. Shafreen RM, Muthamil S, Pandian SK. Inhibition of *Candida albicans* virulence factors by novel levofloxacin derivatives. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2014; 98 (15): 6775-85.
65. Siddique YH, Mujtaba SF, Jyoti S, Naz F. GC–MS analysis of *Eucalyptus citriodora* leaf extract and its role on the dietary supplementation in transgenic *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Food and Chemical Toxicology*. 2013; 55: 29–35.
66. Silva WJ, Seneviratne J, Samaranayake LP, Del Bel Cury AA. et al. Bioactivity and architecture of *Candida albicans* biofilms developed on poly (methyl methacrylate) resin surface. *Journal of Biomedical material research*. 2010; 94: 149-156.
67. Silva-Rocha WP, Lemos VLB, Svidiziski TIE, Milan EP, Chaves GM. *Candida* species distribution, genotyping and virulence factors of *Candida albicans* isolated from the oral cavity of kidney transplant recipients of two geographic regions of Brazil. *BMC Oral Health*. 2014; 14:20.
68. Taygi AK, Malik A. Antimicrobial potential and chemical composition of *Eucalyptus globulus* oil in liquid and vapour phase against food spoilage microorganisms. *Food Chemistry*. 2011; 126: 228–235.
69. Tolba H, Moghrani H, Benelmouffok A, Kellou D, Maachi R. Essential oil of Algerian *Eucalyptus citriodora*: Chemical composition, antifungal activity. *Journal de Mycologie Médicale*. 2015; 25 (4): 128-133.
70. Tongnuanchan P1, Benjakul S. Essential oils: extraction, bioactivities, and their uses for food preservation. *J Food Sci*. 2014; 79 (7): 1231-1249.
71. Ventolini G, Tsai P, Moore LD. *C. dubliniensis* in an immunocompetent patient with metal lingual frenulum piercing. *Med Mycol Case Rep*. 2016; 14: 27–29.
72. Vergis J, Gokulakrishnan P, Agarwal RK, Kumar A. Essential oils as natural food antimicrobial agents: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2015; 55 (10): 1320-1323.
73. Vieira M, Bessa LJ, Martins MR, Arantes S, Teixeira APS, Mendes A, et al. Chemical Composition, Antibacterial, Antibiofilm and Synergistic Properties of

- Essential Oils from *Eucalyptus globulus* Labill. and Seven Mediterranean Aromatic Plants. Chem. Biodiversity 2017; 14.
74. Vijayalakshmi P, Thenmozhi S, Rajeswari P. The Evaluation of the virulence factors of clinical *Candida* isolates and the anti-biofilm activity of *Elettaria cardamomum* against multi-drug resistant *Candida albicans*. Curr Med Mycol. 2016; 2(2): 8–15.
75. Zanni PCMD, Bonfim-Mendonça PS, Negri M, Nakamura SS, Donatti L, Svidzinski TIE, Consolaro MEL. Virulence factors and genetic variability of vaginal *Candida albicans* isolates from HIV-infected women in the post-highly active antiretroviral era. Rev Inst Med Trop São Paulo. 2017; 59: e44.
76. Zore GB, Thakre AD, Jadhav S, Karuppayil SM. Terpenoids inhibit *Candida albicans* growth by affecting membrane integrity and arrest of cell cycle. 2011; 18 (13): 1181-1190.

ANEXO 1 - Representação dos Picos cromatográficos do óleo essencial de *Eucalyptus citriodora*. Análise realizada através de Cromatografia gasosa em aparelho com espectrometria de massas.



ANEXO 2 - Representação dos Picos cromatográficos do óleo essencial de *Eucalyptus globulus*. Análise realizada através de Cromatografia gasosa em aparelho com espectrometria de massas.



ANEXO 3 - Compostos, Índices de Retenção e suas porcentagens identificados no óleo essencial de *Eucalyptus citriodora* por Cromatografia Gasosa em aparelho com Espectrometria de Massas (CG/EM).

Composto	IR real	Porcentagem
HEPTANOL<N->	969	0.447
SABINENE HYDRATE <TRANS->	1097	1.804
ISOPULEGOL <NEO-ISO>	1168	1.168
LINALOOL ACETATE	1253	36.469
METHYL CITRONELLATE	1257	2.787
GERANIAL	1270	53.476
LINALOOL ISOBUTYRATE	1374	2.31
AROMADENDRENE <ALLO->	1461	1.508

ANEXO 4 - Compostos, Índices de Retenção e suas porcentagens identificados no óleo essencial de *Eucalyptus globulus* por Cromatografia Gasosa em aparelho com Espectrometria de Massas (CG/EM).

Compostos	IR real	Porcentagem
TRYCLICLENE	926	17.118
SABINENE	976	0.64
ELEMENE <DELTA->	1339	3.801
ISOLEDENE	1373	0.848
ELEMENE <BETA->	1375	1.562
CARYOPHYLLENE<(Z)->	1404	9.881
ELEMENE <GAMMA->	1433	0.804
LINALOOL BUTYRATE	1422	2.134
AROMADENDRENE	1439	6.439
CEDRANE<EPI->	1441	1.18
BERGAMOTENE <ALPHA-TRANS>	1436	4.417
AROMADENDRENE	1439	1.185
AROMADENDRANE<DEHYDRO->	1459	22.019
AROMADENDRANE<ALLO->	1461	0.851
BISABOLENE <(Z)-ALPHA->	1504	5.583
BISABOLENE <(Z)-GAMMA->	1515	1.325
SESQUIPELLANDRENE <BETA->	1524	10.034
SESQUISABINENE HYDRATE <CIS->	1545	3.539
GLOBULOL	1583	0.517
CEDR-8(15)-EM-9-ALPHA-OL	1644	3.936
CUBENOL	1642	0.808