

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

LAÍS STEMPNIEWSKI DO NASCIMENTO

**AVALIAÇÃO DE *Lavandula angustifolia* Mill. E *Lavandula dentata* L. SOBRE
CÉLULAS PLANCTÔNICAS E BIOFILMES DE *Candida albicans* E ESPÉCIES NÃO-
albicans DE *Candida* spp.**

ALFENAS-MG

2020

LAÍS STEMPNIEWSKI DO NASCIMENTO

**AVALIAÇÃO DE *Lavandula angustifolia* Mill. E *Lavandula dentata* L. SOBRE
CÉLULAS PLANCTÔNICAS E BIOFILMES DE *Candida albicans* E ESPÉCIES NÃO-
albicans DE *Candida* spp.**

Dissertação/Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Alfenas.

Área de concentração: Interação Patógeno-Hospedeiro

Orientadora: Amanda Latercia Tranches Dias

Coorientador: Marcelo Aparecido da Silva

ALFENAS-MG

2020

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central – Campus Sede

Nascimento, Laís Stempniewski do
N244a Avaliação de *Lavandula angustifolia* Mill. e *Lavandula dentata* L. sobre
células planctônicas e biofilmes de *Candida albicans* e espécies não-*albicans* de
Candida spp.. / Laís Stempniewski do Nascimento – Alfenas, MG, 2020.
99 f.: il. –

Orientadora: Amanda Latercia Tranches Dias.
Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade
Federal de Alfenas, 2020.
Bibliografia.

1. *Lavandula*. 2. *Candida* spp. 3. Atividade antifúngica. 4. Biofilme.
5. Interação. 6. Efeito aditivo. 7. Efeito sinérgico. I. Dias, Amanda Latercia
Tranches. II. Título.

CDD- 576

LAÍS STEMPIEWSKI DO NASCIMENTO

AVALIAÇÃO DE *Lavandula angustifolia* Mill. E *Lavandula dentata* L. SOBRE CÉLULAS PLANCTÔNICAS E BIOFILMES DE *Candida albicans* E ESPÉCIES NÃO-*albicans* DE *Candida spp.*

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação/Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestra em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Interação Patógeno-Hospedeiro.

Aprovada em: 20 de fevereiro de 2020.

Profa. Dra. Amanda Latércia Tranches Dias
Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG

Profa. Dra. Luciana da Silva Ruiz Menezes
Instituição: Instituto Adolfo Lutz

Prof. Dr. Masaharu Ikegaki
Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG



Documento assinado eletronicamente por **Amanda Latércia Tranches Dias, Professor do Magistério Superior**, em 20/02/2020, às 16:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Masaharu Ikegaki, Professor do Magistério Superior**, em 20/02/2020, às 16:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luciana da Silva Ruiz Menezes, Usuário Externo**, em 20/02/2020, às 16:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0266746** e o código CRC **405F6DBC**.

AGRADECIMENTOS

Já dizia um ditado que “a gratidão é a memória do coração”.

Gostaria de agradecer à paciência e os ensinamentos da minha orientadora dra. Amanda Latercia Tranches Dias e meu co-orientador dr. Marcelo Aparecido da Silva.

À Tamires Rodrigues Ribeiro Roberto e Naiara Chaves Silva, pela ajuda na execução prática dos experimentos.

À empresa *O Lavandário*, que cedeu as lavandas para a realização deste trabalho.

À Carla Benedini, Josidel Oliver e todos os outros colegas e funcionários do laboratório do qual fiz parte, o Laboratório de Microbiologia e Imunologia.

Aos alunos e laboratórios que foram nossos parceiros:

Renan Gomes Bastos e ao professor dr. Geraldo Alves da Silva do Laboratório de Plantas Medicinais.

Professora dra. Lívia Diniz e Breno Vilas Boas do Laboratório de Parasitologia da Unifal-MG.

Ao Marcelo José Dias Silva do Laboratório de Bioprospecção de Produtos Naturais (LBPN) da UNESP, Instituto de Biociências do Câmpus do Litoral Paulista IB-CLP, São Vicente - SP.

Aos meus familiares, namorado e amigos que me incentivaram.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, à Universidade Federal de Alfenas, CNPQ, FAPEMIG.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

A todos que contribuíram, de alguma forma, com este trabalho.

RESUMO

Algumas espécies de *Candida* spp. apresentam importantes fatores associados à virulência, dentre eles destaca-se a formação de biofilmes, os quais podem estar associados a mudanças no perfil de sensibilidade dos isolados, aos antifúngicos disponíveis. Devido a esses fatores, faz-se necessária a pesquisa de novas opções terapêuticas para o tratamento de infecções causadas por *Candida* spp., destacando-se, assim, a importância da busca de bioativos em fontes naturais. As plantas do gênero *Lavandula* spp. são utilizadas em todo o mundo devido às suas propriedades terapêuticas. O objetivo deste trabalho foi avaliar e comparar, *in vitro*, as atividades antifúngicas de *Lavandula angustifolia* Mill. e *Lavandula dentata* L. sobre isolados de *Candida albicans* e espécies não-*albicans* de *Candida* spp. cultivados em estado planctônico e na forma séssil, ou seja, biofilme. Primeiramente, realizou-se a caracterização fitoquímica, por cromatografia em camada delgada, dos extratos hidroetanólicos de folhas e flores de *L. angustifolia* e *L. dentata* e sugeriu-se a presença de saponinas, terpenos e flavonóides. Posteriormente, fez-se ensaio de difusão em ágar para triagem da atividade antifúngica dos extratos. Após, fez-se a avaliação da Concentração Inibitória de 50% e 90% (IC₅₀ e IC₉₀) do crescimento dos isolados, em que dos extratos hidroetanólicos de *Lavandula* spp. foram adicionados aos cultivos de *Candida albicans*, *Candida krusei* e *Candida glabrata*. *L. angustifolia* foi ativa em células planctônicas de *C. krusei* e *C. glabrata*: flores e folhas frescas em *C. krusei*, e folhas frescas em *C. glabrata*. *L. dentata* foi ativa em *C. krusei* em estado planctônico: flores e folhas frescas. Em biofilmes de *C. krusei*, o extrato de flores frescas de *L. angustifolia* causou redução da atividade metabólica das células e os extratos de flores e folhas frescas causaram redução da biomassa. Quanto à *L. dentata*, o extrato de flores frescas diminuiu a atividade metabólica das células e levou à redução de biomassa fúngica, enquanto o extrato de folhas frescas diminuiu a atividade metabólica das células. Em biofilmes de *C. glabrata*, o extrato de folhas frescas de *L. angustifolia* causou redução da biomassa fúngica. Não se observou atividade significativa dos extratos sobre *C. albicans* em estado planctônico e biofilme. Quanto ao teste de citotoxicidade, os maiores valores de concentração citotóxica para 50% das células (CC₅₀): foram apresentados pelo extrato de folhas frescas de *L. angustifolia*, seguida pelo extrato de folhas frescas de *L. dentata*, fato que sugere que estes possam ser os extratos mais seguros para uso. Os demais extratos, apresentaram menores valores de CC₅₀: flores frescas de *L. angustifolia* e flores frescas de *L. dentata*. Assim sendo, elegeu-se o extrato de folhas frescas de *L. angustifolia* para a continuidade das avaliações e o mesmo foi submetido à avaliação fitoquímica por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Através desta avaliação, foram detectadas as presenças de flavonoides e elagitaninos. Em relação à avaliação do efeito combinado entre o extrato de folhas frescas de *L. angustifolia* e antifúngicos de uso convencional em células planctônicas, observou-se efeito aditivo na combinação deste extrato com fluconazol contra *C. krusei* (FICI: 0,516) e *C. glabrata* (FICI: 0,625); quanto ao extrato combinado com caspofungina observou-se efeito indiferente contra *C. krusei* (FICI: 2,00) e efeito antagônico contra *C. glabrata* (FICI: 4,282). A interação do extrato de folhas frescas de *L. angustifolia* em biofilme mostrou-se indiferente para *C. krusei* (FICI fluconazol: 1,25; FICI anfotericina B: 1,125). Porém a interação do extrato com anfotericina B para *C. glabrata* mostrou-se aditiva (FICI: 0,503), podendo se tornar uma opção para combater biofilmes em formação. Não houve concentração fungicida mínima em nenhuma das situações (células planctônicas, biofilme e sinergismo) de nenhuma espécie de *Candida* avaliada.

Palavras-chave: *Lavandula*. *Candida* spp. Atividade antifúngica. Biofilme. Interação. Efeito aditivo. Efeito sinérgico.

ABSTRACT

Some species of *Candida* spp. present important factors associated with virulence, among which the formation of biofilms stands out, which may be associated with changes in the sensitivity profile of the isolates, to the available antifungals. Due to these factors, it is necessary to search for new therapeutic options for the treatment of infections caused by *Candida* spp., Thus highlighting the importance of the search for bioactive agents in natural sources. Plants of the genus *Lavandula* spp. are used worldwide due to their therapeutic properties. The aim of this work was to evaluate and compare, *in vitro*, the antifungal activities of *Lavandula angustifolia* Mill. and *Lavandula dentata* L. on *Candida albicans* and non-*albicans* *Candida* spp. grown in planktonic state and in sessile form, that is, biofilm. First, the phytochemical characterization was performed, by thin layer chromatography, of the hydroethanolic extracts of leaves and flowers of *L. angustifolia* and *L. dentata* and the presence of saponins, terpenes and flavonoids has been suggested. Subsequently, an agar diffusion test was carried out to screen the antifungal activity of the extracts. Afterwards, the evaluation of the inhibitory concentration of 50% and 90% (IC₅₀ and IC₉₀) of the growth of the isolates was made, in which of the hydroethanolic extracts of *Lavandula* spp. were added to the cultures of *Candida albicans*, *Candida krusei* and *Candida glabrata*. *L. angustifolia* was active in planktonic cells of *C. krusei* and *C. glabrata*: fresh flowers and leaves in *C. krusei*, and fresh leaves in *C. glabrata*. *L. dentata* was active in *C. krusei* in planktonic state: fresh flowers and leaves. In *C. krusei* biofilms, the extract of fresh flowers of *L. angustifolia* caused a reduction in the metabolic activity of cells and extracts of fresh flowers and leaves caused a reduction in biomass. As for *L. dentata*, the extract of fresh flowers decreased the metabolic activity of the cells and led to the reduction of fungal biomass, while the extract of fresh leaves decreased the metabolic activity of the cells. In *C. glabrata* biofilms, fresh leaf extract from *L. angustifolia* caused a reduction in fungal biomass. There was no significant activity of extracts on *C. albicans* in planktonic state and biofilm. As for the cytotoxicity test, the highest cytotoxic concentration values for 50% of the cells (CC₅₀): were presented by the extract of fresh leaves of *L. angustifolia*, followed by the extract of fresh leaves of *L. dentata*, a fact that suggests that they may be the safest extracts to use. The other extracts showed lower CC₅₀ values: fresh flowers of *L. angustifolia* and fresh flowers of *L. dentata*. Therefore, the extract of fresh leaves of *L. angustifolia* was chosen for the continuity of the evaluations and it was submitted to phytochemical evaluation by high performance liquid chromatography (HPLC). Through this evaluation, the presence of flavonoids and ellagitannins was detected. Regarding the evaluation of the combined effect between the extract of fresh leaves of *L. angustifolia* and antifungals of conventional use in planktonic cells, an additive effect was observed in the combination of this extract with fluconazole against *C. krusei* (FICI: 0.516) and *C. glabrata* (FICI: 0.625); as for the extract combined with caspofungin, there was an indifferent effect against *C. krusei* (FICI: 2.00) and an antagonistic effect against *C. glabrata* (FICI: 4.282). The interaction of fresh leaf extract of *L. angustifolia* in biofilm was indifferent to *C. krusei* (FICI fluconazole: 1.25; FICI amphotericin B: 1.125). However, the interaction of the extract with amphotericin B for *C. glabrata* proved to be additive (FICI: 0.503), and can become an option to combat biofilms in formation. There was no minimum fungicidal concentration in any of the situations (planktonic cells, biofilm and synergism) of any *Candida* species evaluated.

Keywords: *Lavandula*. *Candida* spp. *Candida albicans*. Antifungal activity. Biofilm. Interaction. Additive effect. Synergistic effect.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquema dos estágios de formação de biofilme de <i>Candida albicans</i>	18
Figura 2 - Espécie <i>Lavandula angustifolia</i> , coletada no dia 03/05/2018, no município de Cunha, São Paulo (23° 07' 46,80" latitude Sul e 44° 55' 51,10" longitude Oeste).....	23
Figura 3 - Espécie <i>Lavandula dentata</i> , coletada no dia 03/05/2018, no município de Cunha, São Paulo (23° 07' 46,80" latitude Sul e 44° 55' 51,10" longitude Oeste).....	24
Figura 4 - Representação esquemática da metodologia deste trabalho.....	29
Figura 5 - Espécies de <i>Lavandula</i> spp. cultivadas em <i>O Lavandário</i> situado na cidade de Cunha, estado de São Paulo.....	31
Figura 6 - Representação do cálculo da Concentração Inibitória Fracionada – FICL.....	42
Figura 7 - Resultado da Cromatografia em camada delgada dos extratos analisados de <i>L. angustifolia</i> e <i>L. dentata</i>	48
Figura 8 - Perfil cromatográfico, em diferentes comprimentos de onda, do extrato de folhas frescas <i>L. angustifolia</i> obtidas por CLAE-UV.....	53
Figura 9 - Espectros de Ultra-Violeta (UV) obtidos dos compostos eluídos e detectados nos cromatogramas verificados em diferentes comprimentos de onda (254, 280 e 360 nm), do extrato de folhas frescas de <i>L. angustifolia</i> obtidas por CLAE.....	54
Figura 10 - Espectro de massas <i>full-scan</i> , do extrato de <i>L. angustifolia</i> , modo negativo.....	55
Figura 11 - Resultado do teste de difusão em ágar, extratos de <i>L. angustifolia</i> e <i>L. dentata</i> sobre <i>C. krusei</i>	60
Figura 12 - Porcentagem de inibição da proliferação celular pelos extratos de <i>L. angustifolia</i> e <i>L. dentata</i>	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados dos rendimentos dos extratos de <i>L. angustifolia</i> ...	45
Tabela 2 - Resultados dos rendimentos dos extratos <i>L. dentata</i>	45
Tabela 3 - Sugestões de prováveis compostos encontrados nas folhas frescas de <i>L. angustifolia</i>	57
Tabela 4 - Média dos halos de inibição dos extratos de <i>L. angustifolia</i> e de anfotericina B.....	59
Tabela 5 - Média dos halos de inibição dos extratos de <i>L. dentata</i> e de anfotericina B.....	60
Tabela 6 - Valores de IC ₅₀ e IC ₉₀ referentes aos extratos de <i>L. angustifolia</i> e <i>L. dentata</i> sobre as espécies em estado plactônico de <i>Candida krusei</i> e <i>Candida glabrata</i> (µg/mL)....	63
Tabela 7 - Concentrações inibitórias (IC ₅₀ e IC ₉₀), em µg/mL, do crescimento de células sésseis do biofilme em formação de <i>C. krusei</i> e <i>C. glabrata</i> pelos extratos hidroetanólicos de <i>L. angustifolia</i> e <i>L. dentata</i> determinadas por avaliação da atividade metabólica e da biomassa fúngica.....	67
Tabela 8 - Concentração citotóxica para 50% das células Vero (µg/mL)..	73
Tabela 9 - Índice de seletividade calculado para as respectivas espécies de <i>Candida</i> spp.....	74
Tabela 10 - Índice de concentração inibitória fracionada (FICI) obtido a partir das associações dos valores de CIM (µg/mL) de extrato de folhas frescas de <i>L. angustifolia</i> e antifúngicos contra células planctônicas de <i>C. krusei</i>	75
Tabela 11 - Índice de concentração inibitória fracionada (FICI) obtido a a partir das associações dos valores de CIM (µg/mL) de extrato de folhas frescas de <i>L. angustifolia</i> e antifúngicos contra células planctônicas de <i>C. glabrata</i>	76
Tabela 12 - Índice de concentração inibitória fracionada (FICI) obtido a a partir das associações dos valores de CIM (µg/mL) de extrato de folhas frescas de <i>L. angustifolia</i> e antifúngicos contra biofilme de <i>C. krusei</i>	78

Tabela 13 - Índice de concentração inibitória fracionada (FICI) obtido a partir das associações dos valores de CIM ($\mu\text{g/mL}$) de extrato de folhas frescas de <i>L. angustifolia</i> e antifúngicos contra biofilme de <i>C. glabrata</i>	78
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CC₅₀	Concentração citotóxica das células
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
DMSO	Dimetilsulfóxido
EPS	Exopolissacarídeos
EUCAST	“European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing”
IC	Concentração Inibitória
G	Gramas
MTT	(3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina)
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão fosfato-salina
SC	<i>Spanish Collection</i>
UV	Ultravioleta
XTT	[2,3-(2- methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl) -5- [(phenylamino) carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide)]

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 <i>Candida</i> spp.	14
2.2 Biofilme e Resistência Antifúngica de <i>Candida</i> spp.....	16
2.3 Medicamentos antifúngicos	20
2.4 Tratamentos Naturais e Lavanda	21
2.5 Associações entre antifúngicos e produtos naturais	25
3 OBJETIVOS	26
3.1 Objetivo Geral	26
3.2 Objetivos Específicos	26
4 METODOLOGIA	27
4.1 Estratégia de Ação	29
4.2 Obtenção E Cadastramento Das Plantas.....	30
4.3 Preparo Dos Extratos Vegetais.....	31
4.3.1 Extrato das plantas frescas e secas de <i>L. angustifolia</i> e <i>L. dentata</i>	32
4.4 Avaliação do perfil fitoquímico de <i>L. angustifolia</i> e <i>L. dentata</i>	33
4.4.1 Avaliação dos extratos de <i>Lavandula</i> por Cromatografia em Camada Delgada.....	33
4.4.2 Ensaio de saponinas.....	34
4.4.2.1 Identificação da presença de saponinas nos extratos	34
4.4.2.2 Avaliação da atividade hemolítica de saponinas	34
4.5 Avaliação do perfil qualitativo do extrato de folhas frescas de <i>L. angustifolia</i> por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	35
4.6 Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos de <i>L. angustifolia</i> e <i>L. dentata</i> por teste de difusão em ágar.....	35
4.7 Avaliação da concentração inibitória mínima dos extratos de <i>L. angustifolia</i> e <i>L. dentata</i> sobre <i>Candida</i> spp. em estado planctônico.	36
4.8 Formação de biofilme de <i>Candida</i> spp.....	37
4.8.1 Avaliação da concentração inibitória mínima dos extratos de <i>L. angustifolia</i> e <i>L. dentata</i> sobre <i>Candida</i> spp. em estado sésil (biofilme)	38
4.9 Avaliação da citotoxicidade dos extratos hidroetanólicos de <i>L. angustifolia</i> e <i>L. dentata</i> sobre células Vero	39
4.10 Avaliação do índice de seletividade dos extratos	40
4.11 Avaliação da interação entre o extrato de folhas frescas de <i>L. angustifolia</i> e antifúngicos	41
4.11.1 Avaliação da interação entre o extrato de folhas frescas de <i>L. angustifolia</i> e antifúngicos em células planctônicas de <i>C. krusei</i> e <i>C. glabrata</i>	41

4.11.2 Avaliação da interação entre o extrato de folhas frescas de <i>L. angustifolia</i> e antifúngicos em biofilme de <i>C. krusei</i> e <i>C. glabrata</i>	43
4.12 Avaliação da concentração fungicida mínima dos extratos de <i>L. angustifolia</i> e <i>L. dentata</i>.....	44
4.13 Análise Estatística.....	44
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5.1 Preparo Dos Extratos Vegetais.....	45
5.1.1 Extrato das plantas frescas e secas	45
5.2 Avaliação do perfil fitoquímico de <i>L. angustifolia</i> e <i>L. dentata</i>.....	46
5.2.1 Avaliação dos extratos hidroetanólicos de <i>L. angustifolia</i> e <i>L. dentata</i> por Cromatografia em Camada Delgada	47
5.2.2 Ensaio de identificação da presença de saponinas nos extratos	51
5.2.3 Avaliação da atividade hemolítica de saponinas	51
5.3 Avaliação do perfil qualitativo do extrato de folhas frescas de <i>L. angustifolia</i> por Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	52
5.4 Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos de <i>L. angustifolia</i> e <i>L. dentata</i> por teste de difusão em ágar.....	59
5.5 Avaliação da Concentração Inibitória Mínima dos extratos de <i>L. angustifolia</i> e <i>L. dentata</i> sobre <i>Candida</i> spp. em estado planctônico	62
5.6 Avaliação da Concentração Inibitória Mínima dos extratos de <i>L. angustifolia</i> e <i>L. dentata</i> sobre biofilmes formados de <i>Candida</i> spp.	66
5.7 Avaliação da citotoxicidade dos extratos hidroetanólicos de <i>L. angustifolia</i> e <i>L. dentata</i> sobre células Vero	71
5.8 Avaliação Índice de seletividade.....	73
5.9 Avaliação da interação entre extrato hidroetanólico de folhas frescas de <i>L. angustifolia</i> e antifúngicos.....	74
5.9.1 Avaliação da interação entre o extrato de folhas frescas de <i>L. angustifolia</i> e antifúngicos em células planctônicas	74
5.9.2 Avaliação da interação entre o extrato de folhas frescas de <i>L. angustifolia</i> e antifúngicos em biofilme.....	77
5.10 Avaliação da Concentração Fungicida Mínima dos extratos de <i>Lavandula angustifolia</i> Mill. e <i>Lavandula dentata</i> L.....	79
6 CONCLUSÃO.....	80
REFERÊNCIAS	82

1 INTRODUÇÃO

O aumento das infecções fúngicas, com alta prevalência nas últimas décadas, especialmente em indivíduos imunocomprometidos, gerou mudanças nas políticas de saúde em todo o mundo, a fim de encontrar mecanismos para controlar as infecções, as quais podem estar associadas a elevados índices de morbidade e mortalidade e têm impacto direto nos custos de assistência à saúde (COLOMBO *et al.*, 2006; CORNISTEIN *et al.*, 2013; YAPAR, 2014).

Dentre as espécies de fungos causadores de infecções hospitalares e em comunidade destacam-se as leveduras do gênero *Candida* spp., as quais podem provocar aftas, vaginite e infecções invasivas em pacientes com imunidade reduzida. Um estudo conduzido por Braga *et al.*, que analisou os microrganismos que causam infecções associadas a cuidados de saúde em 28 hospitais brasileiros, mostrou que *Candida* spp. contabilizou 8,4% dos isolados encontrados (BRAGA *et al.*, 2018).

Candida spp. podem apresentar diversos fatores associados à virulência e, dentre estes, a formação de biofilme é um dos principais fatores e pode estar associada à diminuição da sensibilidade a antifúngicos. O biofilme é considerado uma comunidade altamente estruturada envolvida por uma matriz extracelular, composto por células que formam microcolônias e que estão irreversivelmente aderidas a um substrato, a uma interface, ou ainda umas às outras. Apresentam um fenótipo alterado, que contribui para aumentar a probabilidade de desenvolvimento de processos infecciosos e uma maior resistência às terapias antifúngicas e aos mecanismos de defesa do hospedeiro (ABRÃO *et al.*, 2003; PIRES, 2010).

Atualmente, os principais fármacos antifúngicos administrados frente às infecções por *C. albicans* são os pertencentes à classe das equinocandinas, embora, o uso de classes como os azólicos e poliênicos ainda se faça importante na prática clínica (PAPPAS *et al.*, 2016). Os fármacos usados no tratamento da candidíase muitas vezes apresentam eficácia limitada, dificultando o tratamento da doença em questão.

Associado a este fator, destaca-se o aumento da resistência destes fungos aos antifúngicos disponíveis, a qual pode estar associada tanto a processos de evolução natural do microrganismo ou a estados fisiológicos da célula como planctônicos ou sésseis, quanto ao uso indiscriminado destes fármacos (PFALLER, 2012). Devido ao aparecimento de linhagens resistentes aos antifúngicos convencionais e à capacidade de formação de biofilme, faz-se necessária a

pesquisa de novas substâncias com potencial antifúngico, tais como os produtos de origem natural.

O uso de fitoterápicos tem-se intensificado em vários países do mundo, inclusive no Brasil, país que possui uma flora rica e diversa, tornando o uso de produtos de origem natural uma alternativa importante. Diversos fatores colaboram com o desenvolvimento de práticas de saúde que incluam plantas medicinais, principalmente de baixo custo e fácil manuseio (ALMEIDA, MENEZES, 2002).

As plantas do gênero *Lavandula* spp. pertencem a família *Lamiaceae*, sendo o nome derivado do latim "lavare" que significa "lavar", referindo-se ao uso destas plantas aromáticas em banhos. Estas plantas também são denominadas lavanda, lavanda comum, lavanda inglesa, dentre outras. A lavanda tem origem na região do Mediterrâneo, e apresenta cerca de 25 a 30 espécies diferentes, é um arbusto perene, e sua flor é azul-lilás (McNAUGHTON, 2006). As espécies de uso medicinal mais conhecidas são *Lavandula dentata*, *Lavandula angustifolia*, *Lavandula latifolia*, *Lavandula intermedia*, *Lavandula stoechas*, *Lavandula dhofarensis* (HANAMANTHAGOUDA *et al.*, 2010; URWIN, MAILER, 2008).

A *Lavandula* spp. tem sido utilizada para uma variedade de propósitos cosméticos e terapêuticos e caracteriza-se por apresentar diversa bioatividade, tais como ação anti-inflamatória, antiparasitária, antioxidante e cicatrizante. Seu óleo essencial é utilizado mundialmente, há relatos de que este óleo apresenta efeitos neurológicos que melhoram os sintomas de estresse e depressão, efeito analgésico, antiespasmódico, pesticida e antimicrobiano, com atividade antifúngica e antibacteriana (SILVEIRA *et al* 2012).

Destaca-se que a maioria das avaliações antimicrobianas de *Lavandula* spp. são realizadas com óleos essenciais extraídos de diferentes partes do vegetal. Até o momento, não há disponível na literatura, relatos de avaliação da atividade antifúngica de extrato hidroetanólico de flores e folhas das espécies *Lavandula angustifolia* Mill. e *Lavandula dentata* L. sobre biofilmes de *Candida* spp. Este trabalho tem como objetivo a avaliação, *in vitro*, das atividades antifúngicas, isoladas e combinadas a fármacos, dos extratos de *L. angustifolia* Mill. e *L. dentata* L. sobre isolados de *Candida albicans* e espécies não-*albicans* de *Candida* spp. em estado planctônico e na forma de biofilme.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Candida* spp.

As infecções fúngicas sistêmicas são uma das principais causas de morte em pacientes imunocomprometidos hospitalizados, principalmente internados em unidades de terapia intensiva (UTIs) e pacientes transplantados receptores de medula óssea (YOUSIF; JAMAL; RAAD, 2015). O número de indivíduos em risco de desenvolver infecções fúngicas está aumentando devido ao aumento da expectativa de vida e ao progresso médico no tratamento de problemas graves, como transplante, comprometimento do sistema imunológico ou câncer (BROWN *et al.*, 2012).

Os tratamentos médicos avançados permitem que esses pacientes vivam mais, porém a exposição a cirurgia e dispositivos médicos resultam em nichos ecológicos de microrganismos produtores de biofilme e aumenta o risco de doenças infecciosas, incluindo aquelas causadas por fungos oportunistas (RAMAGE *et al.*, 2005).

Candidíases são infecções causadas por leveduras do gênero *Candida* spp., patógenos oportunistas, os quais são comuns em hospedeiros imunocomprometidos, motivo pelo qual são reconhecidos como os maiores agentes de infecções hospitalares (MENDES, 2011). A Candidíase vulvovaginal é a causa mais comum de infecção ginecológica em mulheres que procuram tratamento. Estudos mostram que cerca de 75% das mulheres adultas podem apresentar algum episódio de candidíase uma vez na vida (DAN, 2002; HOLANDA *et al.*, 2007; MARDH *et al.*, 2002).

Candida spp. podem se apresentar como microrganismos comensais quando em equilíbrio com a microbiota de indivíduos saudáveis. Entretanto, algumas espécies de *Candida* podem ser consideradas patógenos oportunistas por se aproveitarem de distúrbios na microbiota, como no caso de aumento da população fúngica por uso de antimicrobiano, comprometimento do sistema imune e lesões na pele e mucosas (HA *et al.*, 2011).

Estudos sobre o isolamento de *Candida* spp. da mucosa vulvovaginal de mulheres, mostram que *C. albicans* é predominante. De fato, essa espécie é considerada a de maior virulência do gênero, estando relacionada à maioria dos casos de candidíase vulvovaginal descritos, e, geralmente, representa mais da metade dos isolados identificados (BRANDOLT *et al.*, 2017; DIAS *et al.*, 2011; GUNTHER *et al.*, 2014).

No estudo realizado por Brandolt *et al.* (2017) em um hospital do Rio Grande do Sul, *C. albicans* representou mais de 60% dos isolados em pacientes com candidíase vulvovaginal e aproximadamente 25% dos casos foram causados por espécies não-*albicans* de *Candida* spp. Entre estas, *C. glabrata*, descrita como a segunda espécie mais importante nos casos de candidíase vulvovaginal, devido à sua frequência e maior resistência aos antifúngicos.

Um estudo conduzido por Braga *et al.*, que analisou os microrganismos que causam infecções associadas a cuidados de saúde em 28 hospitais brasileiros, mostrou que *Candida* spp. contabilizou 8,4% dos isolados encontrados (BRAGA *et al.*, 2018). O estudo de Colombo *et al.*, analisou a incidência de candidemia em sete hospitais privados e dois públicos brasileiros de atenção terciária e observou que de 4.363 episódios de infecção da corrente sanguínea, 300 foram causados por *Candida* spp. correspondendo a 6,9% (COLOMBO *et al.*, 2013).

O estudo de Maranhão *et al.* (2019) avaliou dados de pacientes de laboratórios de Alagoas e observou que as leveduras foram as principais causadoras de micose, sendo que 79,8% foram causadas por *Candida* spp. *C. albicans* foi a espécie mais frequente (18,9%), seguida por *C. krusei* (5,1%) e *C. tropicalis* (0,6%). 55,1% não foram especificadas. Observou-se que embora *C. albicans* seja mais prevalente e virulenta, isolados de espécies não-*albicans* de *Candida* spp., as também denominadas NACs, estão emergindo significativamente.

Estudos de hemoculturas obtidas de pacientes hospitalizados, mostraram que *C. albicans* foi a espécie mais frequentemente isolada com índices variando de 34,3% a 66,6% (ALENCAR, 2013; ALMEIDA *et al.*, 2013; MARRA *et al.*, 2011).

Candida spp. é um fungo pleomórfico que pode se manifestar na forma de levedura ou formar filamentos (hifas ou pseudo-hifas); algumas espécies como *C. albicans* podem crescer de ambas as formas (BARBEDO; SGARBI, 2010; THOMPSON; CARLISLE; KADOSH, 2011; KADOSH, 2013). Na forma de levedura há um deslocamento rápido através de superfícies mucosas, fluidos corporais e corrente sanguínea. Porém, a forma filamentosa permite melhor adesão, formação de biofilmes, invasão das camadas de células epiteliais e outros tecidos do hospedeiro e evasão e lise de macrófagos e neutrófilos (THOMPSON; CARLISLE; KADOSH, 2011).

São conhecidas mais de 200 espécies de *Candida* spp., as quais, em sua maioria habita a microbiota normal e, cerca de 10% são patogênicas. *Candida* spp. pode ser encontrada no solo, em ambientes hospitalares e nas superfícies de objetos e alimentos (EGGIMAN *et al.*, 2003; PASQUALOTTO, 2004).

As espécies de maior interesse clínico são: *C. albicans*, *C. krusei*, *Candida* do complexo “*psilosis*” (*C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis*), *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *Candida* do complexo *guilliermondii* (complexo que compreende várias espécies, das quais 3 foram relatadas como patógenos humanos: *C. guilliermondii sensu stricto*, *C. fermentati* e *C. carpophila*), *C. lusitaniae* e *Candida auris* (BAI, 2000; CHAABANE *et al.*, 2019; COLEMAN *et al.*, 1998; MARCOS-ZAMBRANO *et al.*, 2017; PASQUALOTTO, 2004; TAVANTI *et al.*, 2005).

As espécies descritas acima podem estar associadas a quadros de infecções superficiais e invasivas em humanos. As infecções fúngicas invasivas têm uma incidência muito menor do que infecções superficiais, e constituem-se em uma preocupação maior porque estão associadas a taxas de mortalidade inaceitavelmente altas (BROWN, 2012).

Muitos tipos de infecções, especialmente as que envolvem pele e mucosas são um grave problema em países tropicais e subtropicais, sendo as leveduras do gênero *Candida* e os fungos dermatófitos os agentes microbianos mais frequentemente encontrados (DUARTE, 2006; PORTILLO, 2001). Leveduras desse gênero normalmente causam infecções superficiais em pacientes saudáveis e infecções sistêmicas em pacientes com a imunidade reduzida (SHAO, HUANG, HSUEH, 2007).

2.2 Biofilme e Resistência Antifúngica de *Candida* spp.

Os microrganismos têm a capacidade de crescer e persistir como células planctônicas individuais em seus respectivos ambientes; no entanto, esse raramente é o caso, pois sugere-se que cerca de 80% dos mesmos, principalmente como já descrito para as bactérias, têm preferência pela integração social, ao invés de viver como células flutuantes. Os microrganismos bacterianos e fúngicos têm uma predileção social em existir nas comunidades complexas e densas das células intercaladas. Essas populações são definidas como biofilmes (WILLIAMS, RAMAGE, 2014).

Nos últimos anos, tem-se percebido a capacidade de formação de biofilmes também em espécies fúngicas patogênicas (FANNINGE MITCHELL, 2012; RAMAGE *et al.* 2009; SAYED *et al.* 2012; *apud* WILLIAMS, RAMAGE, 2014). Este modo de crescimento permite aos microrganismos uma série de vantagens, incluindo resistência antimicrobiana de alto nível

que pode causar problemas no tratamento das infecções às quais estão associados (DONLAN, COSTERTON, 2002).

Algumas espécies de *Candida* possuem importantes fatores associados à virulência sendo a formação de biofilme um dos principais e que pode estar associada ao aumento de resistência a antifúngicos. Além do biofilme, *Candida* spp. pode apresentar capacidade de adesão às células hospedeiras, alterações fenotípicas e morfológicas, produção de substâncias nocivas para as células, como hemolisinas, capacidade de resistir ao peróxido de hidrogênio e derivados e a capacidade para produzir e secretar enzimas hidrolíticas (SILVA; NERY; DIAS, 2014; WHITE; AGABIAN, 1995).

A formação do biofilme acontece em três etapas: aderência à superfície, formação da matriz e aumento da matriz, formando uma estrutura tridimensional (MOTTA, 2009).

Fase I (inicial 1-11 h): Na fase inicial, a célula planctônica na forma de levedura adere à superfície do substrato. Essa aproximação ao substrato pode ser aleatória ou atraída por quimiotaxia. Após a aproximação, há uma interação hidrofóbica ou eletrostática destas com a superfície. A produção de adesinas pela levedura e a aderência de plaquetas e fibrinas do hospedeiro ao substrato ajudam ainda mais na adesão primária (MUKHERJEE *et al*, 2005; SILVA, 2012).

Fase II (Intermediária 12-30 h): Na fase secundária, há a proliferação das células aderidas formando microcolônias, e início da produção da matriz extracelular. Ocorre o aparecimento de mecanismos de comunicação intracelulares que levam à expressão diferencial de genes. Esses genes são responsáveis pela transição de leveduras para hifas, na arquitetura da parede celular e na coesividade do biofilme dada pela matriz (MUKHERJEE *et al*, 2005; SILVA, 2012).

Fase III (maturação 38-72 h): Por último, quando as células começam a se unir e começam a construção de uma rede formada pelas células diferenciadas em pseudohifas, hifas e leveduras, tudo envolvido pela matriz extracelular polimérica e promovendo um crescimento tridimensional (MUKHERJEE *et al*, 2005; SILVA, 2012).

De acordo com Silva (2012), o complexo de adesão é um mecanismo influenciado principalmente pelo meio, virulência do patógeno e pelas características da superfície que está sendo colonizada (FIGURA 1).

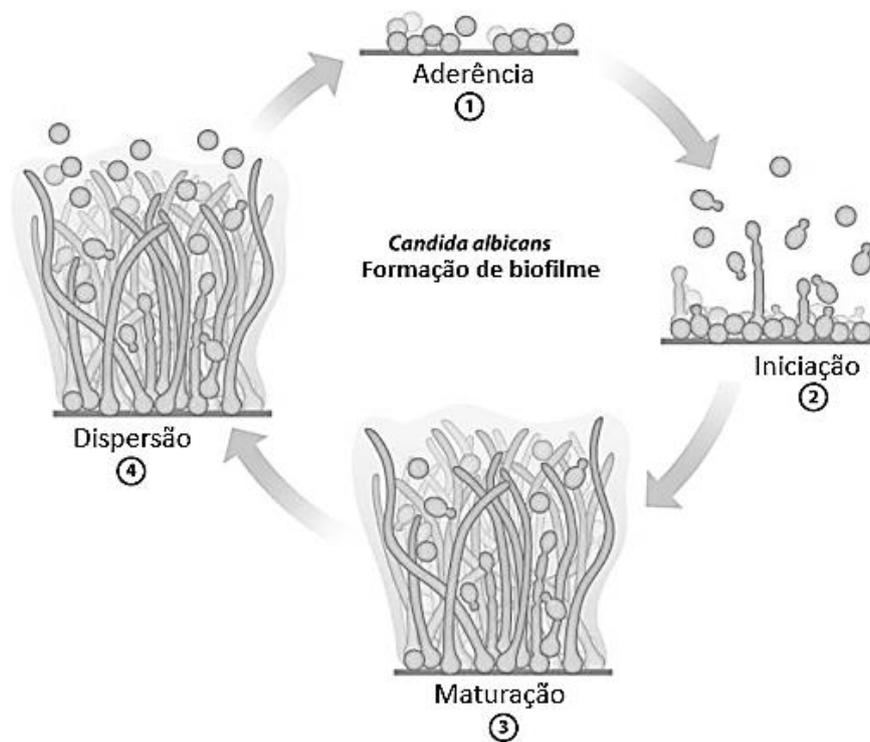


Figura 1 - Esquema dos estágios de formação de biofilme de *Candida albicans*.
 Fonte: modificado de Nobile, Johnson (2016).

O biofilme é uma comunidade altamente estruturada, envolta por uma matriz de substâncias poliméricas. Ele possui características únicas que trazem vantagens de sobrevivência sobre a forma planctônica mesmo quando usados diferentes agentes antifúngicos, como anfotericina B, fluconazol, itraconazol e cetoconazol (SENEVIRATNE *et al.*, 2008). *Candida* spp. consegue adaptar-se a diferentes ambientes e formar biofilmes, que é a união de hifas e pseudo-hifas, facilitando a aderência a diversos tipos de superfícies, aumentando a probabilidade de processos infecciosos (WHITEWAY; OBERHOLZER, 2004).

Candida albicans é a espécie de fungo mais importante em termos de produção de biofilmes clinicamente relevantes. Este fungo pleomórfico existe tanto em forma de leveduras quanto em hifas e pseudohifas que resultam em um biofilme estruturalmente complexo (WILLIAMS, RAMAGE, 2014).

As espécies de *Candida* são a quarta causa mais comum de infecção de corrente sanguínea em pacientes que necessitam de cuidados intensivos e o agente etiológico mais comum de infecção fúngica causada por biofilme. Dispositivos médicos, como cateteres intravasculares,

colonizados por *Candida* spp. permitem o desenvolvimento de biofilmes dos quais as células podem se destacar e causar fungemia aguda e/ou infecção disseminada. Estudos experimentais relataram que as células que se destacam do biofilme, tem uma maior associação com citotoxicidade e mortalidade do que as leveduras planctônicas equivalentes (UPPULURI et al. 2010).

Embora os biofilmes de fungos sejam os mais perigosos em unidades de terapia intensiva (UTI), eles não se limitam a esse ambiente. Eles são clinicamente onipresentes, variando desde de estomatite relacionada à dentição na cavidade oral a biofilmes polimicrobianos complexos de feridas traumáticas. Eles também estão localizados nas vias aéreas superiores e inferiores, bem como nos tratos gastrointestinal e geniturinário, o que facilita seu encontro com a maioria dos biomateriais implantados e superfícies hospedeiras (RAMAGE, WILLIAMS, 2013).

Segundo Douglas (2003) os biofilmes microbianos são resistentes a diversos agentes antimicrobianos, como antibióticos, antissépticos e biocidas industriais. Os possíveis mecanismos de resistência do biofilme são: resistência à penetração dos fármacos devido à matriz do biofilme; alterações fenotípicas devido a uma baixa taxa de crescimento ou limitada nutrição; indução da expressão de genes responsáveis pela resistência.

Além destes, outros mecanismos podem estar envolvidos na resistência do biofilme, incluindo: bombas de efluxo de drogas, através das quais o antifúngico é bombeado para fora da célula; sistema de comunicação *quorum sensing*, alteração da densidade celular; células basais persistentes e respostas ao estresse oxidativo; nos quais seus efeitos indiretos podem regular a resistência (MATHÉ; DIJCK, 2013).

A resistência aos antifúngicos também pode estar associada a tratamentos profiláticos recomendados a indivíduos internados em unidades de terapia intensiva (UTIs) ou transplantados, que são considerados pacientes de alto risco para candidíase invasiva (MICELI; DÍAZ; LEE, 2011; PFALLER, 2012). Estes tratamentos expõem a *Candida* spp. a antifúngicos em baixas concentrações por um longo tempo podendo estimular a produção e secreção de fatores associados à virulência, estimulando a seleção de linhagens resistentes (SILVA; NERY; DIAS, 2014).

Os cateters são utilizados em pacientes com neoplasias, pacientes cirúrgicos e receptores de transplantes. Porém, estes dispositivos podem expor os pacientes a complicações infecciosas locais, sistêmicas ou metastáticas, sendo uma importante fonte de infecção em hospitais, representando mais de 90% de todas as infecções da corrente sanguínea. A incidência de

cateteres relacionados a infecção varia com a composição do material e tipo de dispositivo, tempo de uso, frequência de manipulação, capacidade de aderir ao cateter e fatores de virulência de patógenos e condição clínica do pacientes (CALANDRA, 2005; GOWARDMAN *et al.*, 1998; GREENE, 1996; O'GRADY *et al.*, 2002; RAMASETHU, 2008 *apud* SARDI, 2013).

Em estudo de Ahmad, Khan (2011), foi mostrado que a maioria das manifestações de candidíase estão associadas à formação de biofilmes de *Candida* spp. em amostras biológicas e inertes. Também foi relatado nesse estudo que a formação de biofilme aumentou em 1024 vezes a resistência dos fungos a fármacos antifúngicos.

Mattos *et al.* (2017) fizeram um estudo sobre candidíase em dois hospitais do Mato Grosso do Sul/ Brasil e observaram que *C. albicans* representava 35,3% dos isolados clínicos e espécies não-*albicans* de *Candida* spp. (NACs) correspondiam a 64,7% das infecções. Dentre as NACs, *C.krusei* é reconhecida como intrinsecamente resistente ao fluconazol.

O aumento da resistência aos medicamentos é um problema que não pode ser ignorado, particularmente ao fluconazol, que é um dos antifúngicos de primeira escolha para o tratamento da candidíase em pacientes imunossuprimidos como nos casos de pacientes com leucemia aguda, receptores de transplante de medula óssea e AIDS. Além disso, existem fungos que têm resistência intrínseca aos antifúngicos comumente usados na clínica (RAUTEMAA, RAMAGE, 2011; SANGLARD, 2016).

2.3 Medicamentos antifúngicos

São poucos os medicamentos convencionais usados para tratamento de infecções fúngicas, sendo fluconazol e anfotericina B os mais usados. O fluconazol, que é um derivado azólico, atua na inibição da biossíntese do ergosterol pela interação com a enzima lanosterol demetilase, responsável pela conversão do lanosterol a ergosterol, componente essencial da membrana fúngica (DEL PALACIO *et al.*, 1998).

A anfotericina B, que é um derivado poliênico, possui como mecanismo de ação ligar-se ao ergosterol da membrana celular fúngica alterando a permeabilidade da membrana, levando à saída de íons e morte celular (NOBRE, 2002; WYNN, 2003). Segundo Kabir, Ahmad (2013), a anfotericina B tem alta especificidade contra patógenos fúngicos, entretanto, tem efeito tóxico

consideravelmente alto em células humanas, levando à insuficiência renal nos pacientes submetidos a este tratamento.

Outra classe utilizada para fins clínicos é a das equinocandinas, como caspofungina, micafungina e anidulafungina. Esses fármacos são inibidores específicos não competitivos da enzima β - (1,3) -glucano-sintase, uma proteína de membrana, responsável pela síntese de β -glucana. β -glucana é o principal biopolímero que compõe a parede celular de leveduras e fungos, auxiliando na manutenção da rigidez e integridade da mesma (PERLIN, 2011).

Os fármacos utilizados no tratamento de infecções fúngicas podem causar diversos efeitos colaterais e custos elevados dos esquemas terapêuticos em que são empregadas limita o tratamento da doença em questão (DEL PALACIO *et al.*, 1998). Além disso alguns possuem eficácia limitada, pois com a evolução genética, os agentes etiológicos adquiriram resistência a determinados antifúngicos, devido ao uso indiscriminado dos mesmos, selecionando cepas resistentes capazes de suportar a ação de antimicrobianos (DOS SANTOS *et al.*, 2005).

Segundo Newman e Cragg (2016) a maioria dos agentes antifúngicos nos anos de 1981 a 2014 são de origem sintética (90% são classificados como não sendo baseados em produtos naturais). Essa escassez de produtos de fontes naturais pode ser vista em regimes de tratamento que ainda usam agentes como anfotericina e griseofulvina, que são ambos listados no banco de dados Integrity como sendo lançados em 1958. Devido a estes fatos faz-se necessária a pesquisa de novas substâncias com potencial antifúngico, especialmente de fontes naturais.

2.4 Tratamentos Naturais e Lavanda

Com o aumento do número de microrganismos que se tornaram resistentes à terapia tradicional, estimulou-se a busca por novas opções em fontes vegetais, fazendo dos produtos de origem natural uma opção notável no tratamento de infecções microbianas (CRISAN *et al.*, 1995, MOLINA 2008; SILVEIRA, 1997). A Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgou, no início da década de 1990, que 65-80% da população dos países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde. Ao longo do tempo foram registrados diversos procedimentos clínicos tradicionais com a utilização de plantas medicinais (VEIGA JR., PINTO, MACIEL, 2005).

As folhas e flores da lavanda são utilizadas na medicina popular no mundo todo em

virtude das suas propriedades terapêuticas como diurética, antiespasmódica, estimulante e sedativa. A biodiversidade e o fato de 25% da flora mundial estar presente no Brasil favorecem o emprego da fitoterapia no país (OLIVEIRA, AKISSUE, 2000).

As plantas do gênero *Lavandula* spp. pertencem a família *Lamiaceae*. A lavanda é um arbusto perene, e sua flor é em geral azul-lilás se dispondo ao longo de um caule fino que cresce acima das folhas. Muitas espécies são originárias de países europeus e regiões da África, Arábia até a Índia. A planta é originária da região do Mediterrâneo na Europa, apresentando cerca de 25 a 30 espécies diferentes de lavandas (McNAUGHTON, 2006). O gênero contém espécies conhecidas como lavanda ou alfazema, além de subespécies e variedades, sendo algumas híbridas conhecidas por lavandins (BIASI, DESCHAMPS, 2009).

Há na literatura mundial, um número crescente de publicações sobre a lavanda comum (*L. angustifolia*), mas poucos deles apresentaram estudos de seus diferentes cultivares (ADASZYŃSKA *et al.* 2013; KARA, BAYDAR 2013; ROBU *et al.* 2012). Estes estudos mostram que a composição de componentes ativos de lavanda depende da parte da planta e de outros fatores como fase de desenvolvimento. Mas ainda assim, o conhecimento sobre o uso de talos de folhas e sua fitoquímica é limitado (ADASZYŃSKA-SKWIRZYŃSKA, M.; DZIEŃCIOŁ, 2017).

O gênero *Lavandula* abrange seis seções que envolvem plantas com características distintas e originárias de diferentes regiões do mundo, que são: *Lavandula* (região do Mediterrâneo, especificamente da França); *Stoechas* (Mediterrâneo); *Dentata* (Mediterrâneo, Macaronésia e sul da Arábia); *Pterostoechas* (Norte da África e Macaronésia); *Chaetostachys* (Índia); *Subnuda* (Arábia e África) (DALLA RIVA, 2012).

As espécies mais comuns que se acredita terem valor medicinal são: *Lavandula dentata*, *Lavandula angustifolia*., *Lavandula latifolia*, *Lavandula intermedia*, *Lavandula stoechas*, *Lavandula dhofarensis* (HANAMANTHAGOUDA *et al.*, 2010; URWIN, MAILER, 2008).

Lavandula angustifolia (FIGURA 2) pertence à seção *Lavandula* conhecida por lavanda-comum, lavanda-verdadeira, alfazema ou lavanda-inglesa, apresentando uma altura de cerca de 60-70 centímetros (DALLA RIVA, 2012). A espécie é usada como remédio para cólicas, tontura e náuseas, enjoos, flatulência, cefaleia, dor de cabeça, nevralgias, acne, reumatismo, insônia, úlceras, asma, bronquite e gripe (DUKE, 2000; ITF, 2008). Estudos realizados mostraram que o óleo essencial de *L. angustifolia* apresentou atividade na redução da ansiedade (GNATTA *et al.*, 2011).

Lavandula dentata L. (FIGURA 3) pertence à seção *Dentata* conhecida como lavanda-francesa ou alfazema. Plantas deste subgênero atingem altura em torno de 0,9-1 metro, apresentando folhas lineares estreitas e margens revolutas. É utilizada na medicina tradicional como antidiabético, contra resfriado comum, para cólica renal, como antiespasmódico, anti-hipertensivo e anti protozoário. Também é utilizado na ornamentação e como planta melífera (BOUSMAHA *et al.*, 2006; DUARTE, SOUZA, 2014; MACHADO *et al.*, 2011; UPSON, 2000 *apud* JUSTUS, 2016).



Figura 2 - Espécie *Lavandula angustifolia*, coletada no dia 03/05/2018, no município de Cunha, São Paulo (23° 07' 46,80" latitude Sul e 44° 55' 51,10" longitude Oeste).

Fonte: © Dipartimento di Scienze della Vita, Università degli Studi di Trieste, picture by Andrea Moro. Comune di Padova, Orto Botanico. PD, Veneto, Italia. Disponível em: http://dbiodbs.univ.trieste.it/carso/chiavi_pub26_palm?spez=6045. Acesso em 28/07/2018.



Figura 3 - Espécie *Lavandula dentata*, coletada no dia 03/05/2018, no município de Cunha, São Paulo (23° 07' 46,80" latitude Sul e 44° 55' 51,10" longitude Oeste).

Fonte: JUSTUS, 2016.

Os metabólitos secundários das plantas estão envolvidos em inúmeras funções, como sinalização entre plantas, atração de polinizadores, defesa e proteção contra estresses bióticos e abióticos (BAKKALI *et al.*, 2008; CASER *et al.*, 2016, 2017; DUDAREVA *et al.*, 2013; KNUDSEN *et al.*, 2006; NOGUÉS *et al.*, 2015; RAUT, KARUPPAYIL, 2014; *apud* DEMASI, 2018). A interação da planta com o ambiente contribui em grande parte para a expressão de fitoquímicos (BINNS *et al.*, 2002; DUDAREVA *et al.*, 2013; HOLOPAINEM *et al.*, 2013; LORETO *et al.*, 2014; SELMAR, KLEINÄCHTER, 2013), sendo provado que afeta a composição química da lavanda (PRUSINOWSKA, SMIGIELSKI, 2014).

Os caules folhosos, as flores e folhas de *L. angustifolia* demonstraram um amplo espectro de propriedades biológicas devido às substâncias ativas que os constituem. O extrato metanólico de caules folhosos de *L. angustifolia* cultivada na Polônia apresenta compostos fenólicos e flavonoides em maiores quantidades quando comparado com o extrato de flores. A quantidade de flavonoides presentes nas folhas é afetada pelas condições de cultivo da planta, sendo os mais encontrados: apigenina, luteolina e quercetina. Em relação às substâncias fenólicas, o ácido rosmarínico é o composto mais abundante nas flores e caules folhosos, ácido cafeico também está presente, porém em menor quantidade (ADASZYŃSKA-SKWIRZYŃSKA; DZIĘCIOŁ, 2017).

O extrato hidroetanólico 70% de resíduos secos de *L. angustifolia* cultivada na Bulgária, é rico em polifenóis, como os flavonoides, catequinas e ácido rosmarínico, substâncias com atividade antioxidante, além de monoterpenos, como linalol e linalil acetato, e, sesquiterpenos β cariofileno e β -farneseno, os quais possuem potencial antimicrobiano (VASILEVA *et al.*, 2018).

Plantas de *Lavandula* spp. apresentam óleos essenciais constituídos por terpenos, acetatos, alcoóis, ésteres, aldeídos, entre outros componentes (KIM, LEE, 2002). E tem como componentes majoritários os monoterpenos, dentre eles o linalol e o acetato de linalol (GONÇALVES, ROMANO, 2013; JUSTUS, 2016; MASETTO *et al.*, 2009). D'Auria (2005) estudou a atividade antifúngica do óleo essencial de *L. angustifolia* Mill. sobre células

plânctônicas de *C. albicans*, e relatou que o óleo, usado em baixas concentrações, inibiu a formação de tubos germinativos da levedura, limitando a progressão da infecção.

Até o momento, não foi encontrada na literatura, a avaliação da atividade de *Lavandula* spp. sobre a inibição da formação de biofilmes ou sobre biofilmes já formados de espécies de *Candida* spp.

2.5 Associações entre antifúngicos e produtos naturais

Opções terapêuticas alternativas estão sendo estudadas na tentativa de reverter esse cenário de resistência dos fungos. A associação de agentes antifúngicos tem sido descrita e foi visto que algumas combinações têm efeitos sinérgicos, sendo eficazes na inibição de leveduras resistentes (ALVES *et al.* 2012). Segundo Pippi *et al.* (2015), substâncias sintéticas e naturais têm sido propostas para o desenvolvimento de novos medicamentos.

Segundo Newman e Cragg (2012) os extratos vegetais, quando triados em avaliações *in vitro*, têm sido considerados menos eficazes de que os antifúngicos existentes. Assim sendo, o conhecimento sobre os efeitos combinados/sinérgicos dos extratos vegetais ou fitoconstituintes com antimicrobianos tradicionais tem se feito cada vez mais necessário no sentido de potencializar a atividade de antifúngicos já disponíveis e assim diminuir os valores de concentração inibitória e toxicidade dos mesmos.

De acordo com Mukherjee *et al.* (2005), os estudos de terapia combinada são baseados em associar agentes que possuem mecanismos de ação complementares. A terapia combinada apresenta alguns benefícios potenciais tais como espectro amplo de eficácia, maior potência do que dos medicamentos utilizados em monoterapia, melhor segurança, tolerabilidade e redução do número de organismos resistentes.

As vantagens das terapias combinadas incluem doses menores de antifúngicos, possíveis ações sinérgicas entre antifúngicos maximizando suas atividades, e menores índices de desenvolvimento de resistência a fármacos (SANTOS, 2018).

O sinergismo entre compostos tem sido utilizado hoje em dia como uma opção contra *Candida* spp., tanto na formação de biofilmes quanto na modulação da expressão de genes associados à invasão tecidual (FELDMAN *et al.*, 2014; JEBALI *et al.*, 2014; KIM *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2014; LOPES *et al.*, 2013).

Um dos protocolos mais conhecidos para avaliar a atividade antimicrobiana combinada é o método do *chequerboard*, que proporciona uma disposição bidimensional de diferentes concentrações das substâncias avaliadas (ODDS, 2003). Os compostos antifúngicos associados podem gerar maior eficácia dos fármacos, permitindo, a utilização de menores doses de cada fármaco (CUENCA-ESTRELLA, 2004).

Há a possibilidade do uso de produtos naturais associados aos antimicrobianos tradicionais, na tentativa de melhorar a atividade antimicrobiana dos fármacos. Há produtos naturais que não apresentam efeitos antimicrobianos tão eficientes mas que, quando associados, a produtos sintéticos, podem apresentar ação sinérgica (ZAGO *et al.*, 2009).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade antifúngica do extrato hidroetanólico de folhas e flores de *Lavandula angustifolia* Mill. e *Lavandula dentata* L. sobre isolados de *Candida albicans* e espécies não-*albicans* de *Candida* spp. em estado planctônico e biofilme.

3.2 Objetivos Específicos

- a) Obter o extrato hidroetanólico das folhas e flores frescas e secas de *L. angustifolia* Mill. e *L. dentata* L.
- b) Avaliar o perfil fitoquímico dos extratos hidroetanólicos das flores e folhas frescas e secas de *L. angustifolia* Mill. e *L. dentata* L.
- c) Determinar a concentração inibitória mínima do crescimento planctônico e biofilme de *C. albicans* e espécies não-*albicans* de *Candida* spp.
- d) Determinar a concentração fungicida mínima do crescimento planctônico e biofilme de *C. albicans* e espécies não-*albicans* de *Candida* spp.
- e) Avaliação da atividade citotóxica dos extratos hidroetanólicos de *L. angustifolia* Mill. e *L. dentata* L.
- f) Determinar a concentração inibitória mínima fracionada da interação entre os extratos hidroetanólicos e antifúngicos de uso convencional.

4 METODOLOGIA

Encontra-se a seguir uma representação esquemática das etapas da metodologia executada neste trabalho.

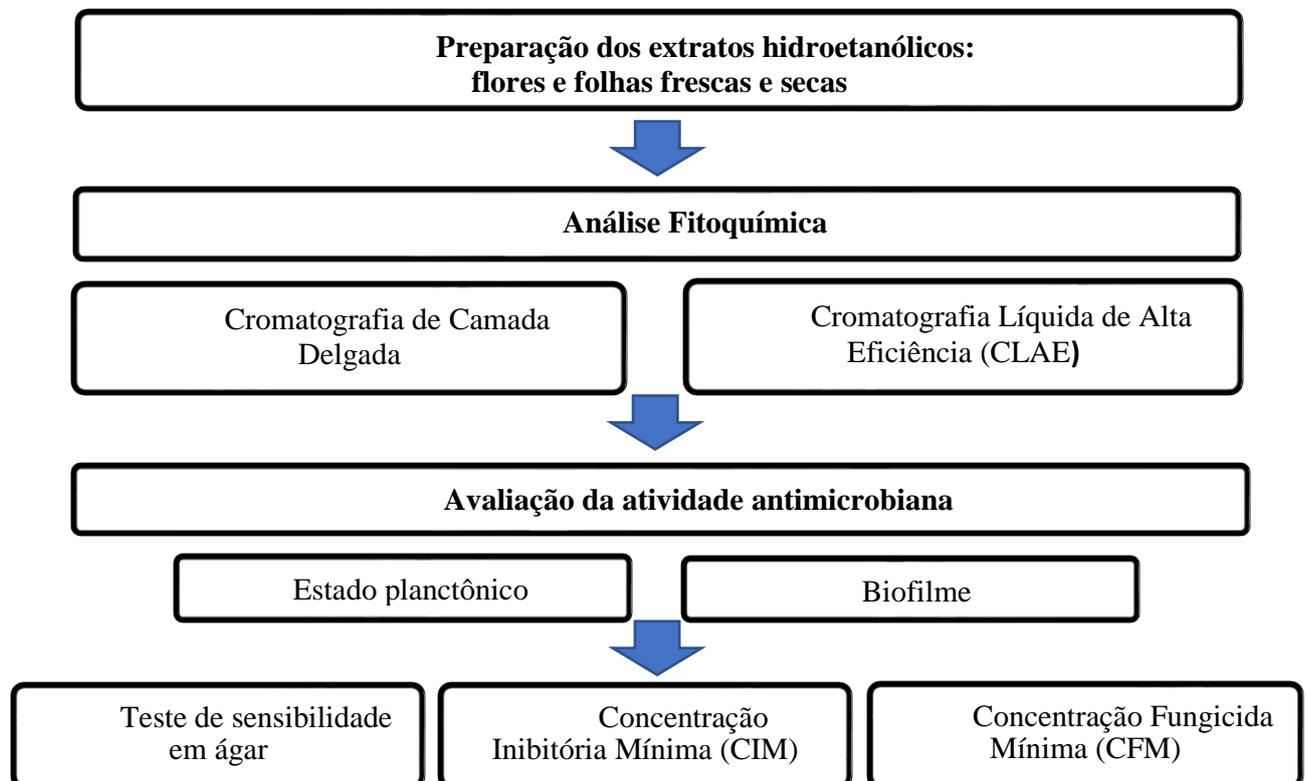


Figura 4 – Representação esquemática da metodologia deste trabalho.

Fonte: Do autor.

4.1 Estratégia de Ação

O trabalho foi realizado na Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG) no Laboratório de Microbiologia e Imunologia Básicas e em parceria com o Laboratório de Plantas Medicinais e Fitoterápicos da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG). As culturas de *Candida* spp. utilizadas estão mantidas, a -80°C, no repositório de microrganismos do Laboratório de Microbiologia e Imunologia Básicas da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG). Foram utilizadas neste estudo três amostras padrões do gênero *Candida* spp.: *C. albicans* SC5314, *C. glabrata* ATCC 90030 e *C. krusei* ATCC 6258.

Candida albicans SC5314 é um isolado clínico humano que foi utilizado no projeto do sequenciamento do genoma de *C. albicans* (ODDS, BROWN, GOW, 2004). A linhagem SC5314 foi originalmente isolada de um paciente com infecção generalizada por *Candida* spp. por Margarita Silva-Hutner em Nova York, EUA (candidagenome, 2019). *C. glabrata* ATCC 90030 foi isolada a partir de amostra de sangue em Iowa e foi depositada por MA Pfaller. *C. krusei* ATCC 6258 foi isolada de escarro de paciente com broncomicose no Sri Lanka e depositada por A Castellani (ATCC, 2019).

O trabalho foi realizado em parceria com a empresa *O Lavandário*, situado no município de Cunha, São Paulo, o qual foi responsável pela cessão dos espécimes vegetais utilizados. *O Lavandário* investe em pesquisa, cultivo de lavandas e ervas aromáticas, destilação de óleos essenciais e desenvolvimento de produtos com os óleos e plantas. O cultivo de lavandas em Cunha nasceu da visão de uma atividade que pudesse atender objetivos pessoais e comunitários; que resultasse da integração entre pessoas e ambiente e que também pudesse contribuir para a saúde e a criação de novas oportunidades de desenvolvimento na região (*O Lavandário*, 2018).

4.2 Obtenção E Cadastramento Das Plantas

As amostras de folha e flores de *Lavandula angustifolia* Mill. e *Lavandula dentata* L., oriundos de manejo orgânico, foram coletadas no dia 03/05/2018, na empresa *O Lavandário*, localizada no município de Cunha, estado de São Paulo (23° 07' 46,80" latitude Sul e 44° 55' 51,10" longitude Oeste) a uma elevação de 1200 metros do nível do mar (FIGURA 4).



Figura 5 - Espécies de *Lavandula* spp. cultivadas em *O Lavandário* situado na cidade de Cunha, estado de São Paulo.

Fonte: Da autora, 2018.

As espécies foram cadastradas no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado – SisGen, número do cadastro: A049D79 (ANEXO I).

As exsiccatas de *L. angustifolia* Mill. e *L. dentata* L. foram depositadas no herbário UALF localizado na UNIFAL - Alfenas/MG. A espécie *Lavandula angustifolia* Mill. recebeu o número de registro 3045, e a espécie *Lavandula dentata* L. o número de registro 3046. As espécies foram, gentilmente, identificadas pelo Professor Dr. Geraldo Alves da Silva, da Faculdade de Farmácia, UNIFAL-MG.

4.3 Preparo Dos Extratos Vegetais

Após a coleta das amostras de folhas e flores de *Lavandula angustifolia* Mill. e *Lavandula dentata* L. foram preparados extratos hidroetanólicos da planta fresca e seca no Laboratório de Plantas Medicinais e Fitoterápicos da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), sob colaboração da discente Tamires Rodrigues Ribeiro e coordenação do professor Dr. Marcelo Aparecido da Silva, co-orientador desta pesquisa.

4.3.1 Extrato das plantas frescas e secas de *L. angustifolia* e *L. dentata*

Para a obtenção dos extratos da planta fresca, os extratos hidroetanólicos foram preparados da seguinte maneira: foram pesadas 150 g de flores e 150 g de folhas das duas espécies de lavanda, com adição de etanol 70% (v/v) (líquido extrator). Assim, foi realizada a extração por maceração, durante sete dias, ao abrigo da luz, com agitação manual uma vez ao dia, segundo Prista, Alves e Morgado (2008).

Após a maceração, os extratos foram filtrados em gaze. Posteriormente, foram submetidos à concentração em rotaevaporador (Büchi®), a 40°C. Após, foram congelados e submetidos ao processo de liofilização em liofilizador L101 (Liotop®) nas condições ideais de pressão (380 mmHg), temperatura (-40°C) e tempo (72 horas).

Antes da liofilização, os frascos foram pesados para a determinação da massa obtida de cada extrato seco, para definir, em sequência, o rendimento de cada extrato, calculado pela expressão:

$$\text{Rendimento (\%)} = (\text{massa do extrato seco} / \text{massa do material vegetal fresco}) \times 100$$

Após determinação do rendimento, os extratos foram mantidos sob congelamento à -20°C.

No preparo dos extratos da planta seca as amostras de folhas e flores de *L. angustifolia* Mill. e *L. dentata* L., foram desidratadas a 60°C em estufa com circulação de ar, até a obtenção do peso constante. A seguir foram moídos em moinho de facas e acondicionados a 4 °C, até o momento do uso.

Os extratos hidroetanólicos foram preparados da seguinte maneira: foram pesadas as quantidades descritas de cada planta (TABELA 1 e 2). Assim, foi realizada a extração por maceração, com adição de etanol 70% (v/v) (líquido extrator), durante sete dias, ao abrigo da luz, com agitação manual diária, segundo Prista, Alves e Morgado (2008).

Após a maceração, os extratos foram filtrados em gaze. Posteriormente, foram submetidos à concentração em rotaevaporador (Büchi®), à temperatura de 40°C. Posteriormente, foram congelados e submetidos ao processo de liofilização em liofilizador L101 (Liotop®) nas condições ideais de pressão (380 mmHg), temperatura (-40°C) e tempo (72 horas).

Antes da liofilização, os frascos foram pesados para a determinação da massa obtida de cada extrato seco, para definir em sequência, o rendimento de cada extrato, calculado pela expressão:

$$\text{Rendimento (\%)} = (\text{massa do extrato seco} / \text{massa do material vegetal fresco}) \times 100$$

Após determinação do rendimento, os extratos foram mantidos sob congelamento à -20°C.

4.4 Avaliação do perfil fitoquímico de *L. angustifolia* e *L. dentata*

O perfil fitoquímico foi avaliado por Cromatografia em Camada Delgada, teste para saponinas e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

4.4.1 Avaliação dos extratos de *Lavandula* por Cromatografia em Camada Delgada

A triagem fitoquímica dos extratos frescos de *L. angustifolia* Mill. e *L. dentata* L. foi realizada inicialmente através da técnica de cromatografia em camada delgada (CCD), no Laboratório de Plantas Medicinais e Fitoterápicos da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), com auxílio do doutorando Renan Gomes Bastos e coordenação do professor Dr. Marcelo Aparecido da Silva.

Cada um dos extratos foi dissolvido em metanol, obtendo-se a concentração de 1,0 mg/mL. As análises cromatográficas foram feitas em microplacas de sílica gel 60 F254, utilizando mistura de acetato de etila, metanol, água e ácido acético glacial (81:11:6:2) como fase móvel. O experimento foi realizado em triplicata.

Primeiramente, foram aplicados 10 µL das soluções-amostras, seguindo-se do mesmo volume de soluções de padrões autênticos (Sigma®) na mesma concentração (1,0 mg/mL). Padrão de flavonoides: quercetina (primeira microplaca), padrão de polifenóis: ácido gálico, ácido tânico, catequina (segunda microplaca) e padrão de alcaloides: quinina (terceira microplaca). Em seguida, cada microplaca, foi exposta a um revelador: a primeira ao anisaldeído sulfúrico com aquecimento a 100°C (WAGNER; BLADT; ZGAINSKY, 2009), a

segunda ao cloreto férrico a 1% (p/v) em metanol e, a terceira ao reagente de Dragendorff (SIMÕES *et al.*, 2010).

As manchas presentes nas placas após reveladas, foram comparadas com as colorações das classes descritas na literatura para que se descobrisse as classes de substâncias presentes nos extratos (WAGNER; BLADT; ZGAINSKY, 2009).

4.4.2 Ensaio de saponinas

Foram realizados ensaios para observação da presença ou ausência de saponinas e para avaliação da atividade hemolítica das mesmas.

4.4.2.1 Identificação da presença de saponinas nos extratos

Os extratos secos foram diluídos em tubos de ensaio contendo água destilada, seguindo-se de agitação enérgica, até formação de uma espuma consistente. Posteriormente, adicionaram-se algumas gotas de ácido clorídrico diluído 10%. Se a espuma continuar persistente, confirma-se a presença de saponinas (SIMÕES *et al.*, 2010).

4.4.2.2 Avaliação da atividade hemolítica de saponinas

Esse experimento foi baseado na metodologia proposta em Simões *et al.* (2010) com algumas modificações. Foram preparadas soluções-mãe dos extratos na concentração 40 mg/mL em dimetilsulfóxido (DMSO) 100% de pureza. Foi utilizado meio de cultura agar sangue tamponado e foram feitos orifícios no ágar, em pontos equidistantes. Posteriormente, 15 µL da solução-mãe de cada extrato foram adicionados aos poços. O DMSO 100% de pureza foi utilizado como controle negativo, e extrato da casca de quilaia em DMSO como controle positivo.

A quilaia é uma das principais fontes conhecidas e estudadas pela sua alta concentração de saponinas presentes no caule, de 5 a 20% da casca (LYRIO, 2016).

4.5 Avaliação do perfil qualitativo do extrato de folhas frescas de *L. angustifolia* por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Esta avaliação foi realizada em parceria com o Laboratório de Bioprospecção de Produtos Naturais (LBPN) da UNESP, Instituto de Biociências do Campus do Litoral Paulista IB-CLP, São Vicente – SP, sob supervisão do pós-doutorando Marcelo José Dias.

O extrato de folhas frescas de *L. angustifolia* foi analisado por Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de Ultravioleta (CLAE-UV). O extrato foi submetido à etapa de clean-up por extração em fase sólida (SPE) em cartuchos de fase reversa C18 com 500 mg por 6 mL (45 µm, Chromabond®). Os cartuchos foram previamente ativados com metanol (4,5 mL) e equilibrados com água (4,5 mL) e metanol/água (85:15, v/v) (4,5 mL). O extrato (10 mg) foi previamente solubilizado em 1,5 mL da solução metanol/água (85:15, v/v), carregado no cartucho e eluído com a mesma proporção de fase móvel. Após a secagem, 2 mg da amostra foram ressuspensos em 2 mL de uma solução metanol/água (1:1, v/v) fornecendo uma solução com uma concentração de 1 mg/mL. Ao fim, a solução foi filtrada em filtro PTFE Millex® com tamanho de poro 0,22 µm.

O perfil químico cromatográfico foi realizado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplado a um detector de arranjo de foto diodos (PDA), modelo MD-2018 (Jasco®). As separações em CLAE foram conduzidas em uma coluna Luna (Phenomenex®, Torrance, CA, USA) de fase reversa C18 (250 mm x 4,6 mm d.i., 5 µm). O volume de injeção foi de 10 µL e a vazão de 1 mL/min. Para a eluição da amostra foi utilizado um gradiente linear com uma fase móvel composta por água acidificada com 0,1% de ácido fórmico (solvente A) e metanol (solvente B), de 5 a 100% (B) em 60 min.

Na espectrometria de massas (THERMO®), todas as análises foram operadas no modo negativo. Para injeção direta: fluxo de 5µL/min; temperatura do capilar de 270°C; 80 unidades arbitrárias de nitrogênio; gás auxiliar com 5 unidades arbitrárias. Os compostos prováveis foram identificados com base na literatura.

4.6 Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos de *L. angustifolia* e *L. dentata* por teste de difusão em ágar

Para a triagem da atividade antimicrobiana foi utilizado protocolo descrito no documento M44A2 (CLSI, 2009) com algumas modificações. Foram testados extratos de flores e folhas frescas, flores e folhas secas de ambas as espécies de *Lavandula* spp.

As suspensões de células de espécies de *Candida* spp. foram preparadas com turvação correspondente ao tubo 0,5 da Escala de McFarland, a qual equivale a $1-5 \times 10^6$ UFC/mL, realizando a leitura da absorvância de 0,08-0,13 a 625 nm em espectrofotômetro (BEL PHOTONICS 2000 UV).

Cada suspensão de microrganismo foi inoculada na superfície do meio ágar Mueller Hinton suplementado com de 2% de glicose. Em seguida, foi aplicado o equivalente a 1 mg dos extratos sobre o meio de cultura em pontos equidistantes. Foi utilizado 20 µL de anfotericina B, na concentração de 3,2 µg/mL, como controle positivo. DMSO a 2,5 %, diluído em água destilada, foi aplicado como controle negativo. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

As placas foram incubadas a 37°C por 24 h conforme modificações na metodologia proposta no documento M44-A2 (CLSI, 2009). Posteriormente, foi realizada a leitura dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento microbiano.

4.7 Avaliação da concentração inibitória mínima dos extratos de *L. angustifolia* e *L. dentata* sobre *Candida* spp. em estado planctônico.

A avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) de todos os extratos foi realizada pela técnica de microdiluição em caldo conforme metodologia proposta no documento E.DEF 7.3.1 (EUCAST, 2016) com algumas modificações.

Os isolados de *Candida* spp. foram subcultivados, em meio ágar Sabouraud por 24 h a 37°C. A partir destes, as suspensões de microrganismos foram preparadas com turvação correspondente ao tubo 0,5 da Escala de McFarland e densidade ótica (DO) avaliada, espectrofotometricamente (BEL PHOTONICS 2000 UV), a 625nm com valores de 0,080 a 0,130, equivalentes à presença de $1-5 \times 10^6$ células/mL.

Neste teste, foi usado caldo RPMI 1640 duas vezes concentrado com L-glutamina e sem bicarbonato, tamponado com ácido 3-(N-morfolino) propanossulfônico (MOPS) a uma concentração final de 0,165 mol/L, pH 7,0 e suplementado com 2% de glicose.

As soluções-trabalho de extratos hidroetanólicos de flores e folhas frescas e secas de *L. angustifolia* Mill. e *L. dentata* L. a 4 mg/mL. As soluções-trabalho de DMSO foram preparadas na concentração de 10%, diluído em água destilada, e a de fluconazol, na concentração de 256 µg/mL, em meio RPMI 1640. Fluconazol e DMSO foram utilizados como controles positivo e negativo, respectivamente.

O ensaio foi realizado em microplacas de fundo chato contendo 96 poços, distribuídos em oito linhas (A - H) e 12 colunas (1 - 12). Os extratos foram avaliados nas concentrações (µg/mL): 1000 a 1,95. As concentrações de fluconazol variaram de 64 µg/mL a 0,125 µg/mL e as concentrações de DMSO variaram de 2,5% a 0,004%. O experimento foi executado em quadruplicata.

As microplacas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Posteriormente, foi realizada a leitura visual das microplacas e também foi feita a leitura da DO a 530 nm no leitor de placas automatizado (Biochrom® Anthos Zenyth 200 rt). Ao final, foi possível calcular a Concentração Inibitória de 50% (IC₅₀) e 90% (IC₉₀) do crescimento microbiano.

4.8 Formação de biofilme de *Candida* spp.

Os biofilmes foram formados de acordo como descrito inicialmente por Ramage e *et al.* (2001), com algumas modificações sugeridas por Melo *et al.* (2011). Realizou-se subcultivo das linhagens de *Candida* spp. As células foram colhidas e lavadas duas vezes com tampão fosfato-salina (PBS) pH 7,2 e ajustadas a uma densidade óptica de 0,4 a 530nm, equivalente a $1-5 \times 10^7$ células/mL em caldo RPMI 1640.

A adesão iniciou-se por meio de interações hidrofóbicas e cargas eletrostáticas (SENEVIRATNE *et al.*, 2008). Sendo assim, foram utilizadas placas de poliestireno não tratado e, as cargas, foram estabilizadas pela umidificação de sua base externa, facilitando o processo de adesão e a expressão gênica específica para tal. Este processo dura em torno de 1 h e 30 min, podendo ser estendido até 2h (SENEVIRATNE *et al.*, 2008).

Em cada poço da microplaca de 96 poços foram adicionados 100 µL da suspensão celular (exceto na coluna 1) e esta foi incubada em estufa de agitação orbital por 1 h e 30 min, a 37°C e 75rpm. Posteriormente, cada poço foi lavado com 150 µL de PBS para a remoção de células não aderidas, e incubados por mais 24h sob as mesmas condições. Para controle do meio, a

coluna 1 de cada placa de microtitulação foi manuseada de maneira idêntica, exceto pela não adição de suspensão de *Candida* spp. A coluna 12 foi usada como controle de crescimento do microrganismo. Os ensaios foram feitos em triplicata.

Além da avaliação das substâncias sobre o biofilme já formado, também avaliou-se o biofilme em formação. Esta avaliação foi feita da seguinte forma: os extratos foram colocados antes da adesão total do biofilme, colocando-os com 1 h e 30 min de adesão, para avaliar se os extratos e antifúngicos teriam interferência na formação do biofilme. O processo realizado foi o mesmo do item “4.6.1 Avaliação da concentração inibitória mínima dos extratos de *L. angustifolia* e *L. dentata*. sobre *Candida* spp. em estado séssil (biofilme)”.

4.8.1 Avaliação da concentração inibitória mínima dos extratos de *L. angustifolia* e *L. dentata* sobre *Candida* spp. em estado séssil (biofilme)

Após a incubação, retirou-se 100 µL da suspensão microbiana da microplaca e posteriormente adicionaram-se 100 µL dos extratos de *L. angustifolia* Mill. e *L. dentata* L, nas colunas 2 a 11 e nas linhas de A a F das micplacas. Na linha G foram adicionados 100 µL de anfotericina B em diferentes concentrações e na H foi adicionado o solvente DMSO.

Os extratos foram usados nas concentrações de (em µg/mL): 5000 a 9,76. As concentrações testadas de anfotericina B foram de (em µg/mL) 1200 a 2,36. E as concentrações de DMSO foram de (em %): 8,4 a 0,016. Tais concentrações foram obtidas por diluição seriada da solução mãe em meio RPMI 1640. As microplacas foram incubadas a 37°C, por 24h a 75rpm.

Após 24h, os poços tiveram 150 µL do meio aspirado e foram lavados duas vezes com 200µL de tampão PBS, para a remoção de células não aderidas e dos compostos. Após isso, realizaram-se dois ensaios, um para avaliar a atividade metabólica do biofilme e outro para avaliar a sua biomassa.

Em uma das microplacas, a avaliação da atividade metabólica do biofilme, foi realizada através do ensaio de redução do XTT [2,3-(2- methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl) -5-[(phenylamino) carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide)] conforme método descrito anteriormente por Ramage *et al.* (2001), com algumas modificações. O XTT foi solubilizado a 1 mg/mL em PBS e reservado. Uma solução de Menadiona (2-metil-1,4-naftoquinona) foi

preparada a 0,4 mM em acetona e misturada à solução de XTT, à proporção de 1:5 (v/v), respectivamente. Em seguida a mistura foi ressuspendida em 20 mL de PBS e filtrada. Em cada poço, pré-lavado duas vezes com PBS, foram adicionados 200 µL da solução XTT-Menadiona e a microplaca incubada ao abrigo da luz, durante 2h a 37°C.

Após a incubação, 100 µL de solução da microplaca foram transferidos para uma nova placa e avaliados em leitor de microplacas (Biochrom® Anthos Zenyth 200 rt) a 490 nm. A CIM do biofilme foi determinada de acordo com a inibição de, no mínimo, 50% da atividade metabólica dos biofilmes tratados com os extratos. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

A mudança na coloração é proporcional ao número de células vivas e pode ser quantificada. O ensaio de redução de XTT quantifica a capacidade da enzima desidrogenase presente na mitocôndria de converter o sal tetrazólio hidrossolúvel (XTT) (cor amarela) em compostos de formazan (cor laranja).

Na outra placa, a biomassa do biofilme foi avaliada utilizando-se cristal violeta a 0,4%. Após 24h, os poços tiveram o meio aspirado e foram lavados com tampão PBS, para a remoção de células não aderidas e dos compostos. Após isso, retirou-se todo o líquido residual e deixou-se a placa secar por 20 min a 35°C. Após isto, adicionou-se em cada poço 110 µL de solução aquosa de Cristal Violeta 0,4% e aguardou-se 15 min. Retirou-se o corante lavando os poços duas vezes com 200 µL de água Mili-Q. Em seguida, Adicionou-se 200 µL de Etanol 95% e aguardou-se 15 min. Após a descoloração, transferiram-se 25 µL de cada poço para uma nova placa que foi completada com 75 µL de água ultrapura (Milli Q®) (diluindo 1:4) e fez-se leitura a 595 nm.

4.9 Avaliação da citotoxicidade dos extratos hidroetanólicos de *L. angustifolia* e *L. dentata* sobre células Vero

O ensaio de citotoxicidade foi realizado no Laboratório de Parasitologia da Unifal, com colaboração do mestrando Breno Vilas Boas e sob supervisão da professora Dra. Livia de Figueiredo Diniz Castro.

Para avaliar os efeitos tóxicos dos compostos sobre as células hospedeiras, foram utilizadas culturas de células Vero (células de rim de macaco verde africano), incubadas com concentrações decrescentes dos extratos (5 diluições seriadas 1:2 a partir de 1000 µg/mL) por 24 horas e posteriormente a viabilidade celular foi quantificada. Duzentos microlitros de suspensão de células Vero, na concentração de $4,5 \times 10^4$ células/mL, foram pipetados em placas de 96 poços e incubados a 37°, 5% CO₂.

Após 24 horas o meio de cultura foi removido e substituído por 200 µL de meio contendo ou não os compostos. Após 24 horas a 37°C, o sobrenadante foi removido e então adicionados, em cada poço, 200 µL de meio de cultura contendo 20 µL de resazurina 1mM, um indicador de proliferação celular (Mazzeti *et al.*, 2019). Após 7 h de incubação, a 37°C, realizou-se a leitura da absorbância em leitor de microplacas (570 nm e 600 nm). No ensaio foram incluídos controles negativos (meio); positivos (meio+células). Como controle de morte celular foi usado DMSO a 30%. O percentual de inibição da proliferação celular induzida pelos fármacos foi calculado pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ inibição} = 100 - [A570 - (A600 \times R0) \text{ Tratado} / A570 - (A600 \times R0) \text{ Controle}] \times 100$$

Nesta fórmula, A570= Absorbância a 570nm; A600= Absorbância a 600 nm; Controle é o poço contendo células, meio e resazurina, na ausência dos extratos. Ro é o fator de correção, calculado a partir dos valores de absorbância do controle negativo (C-), ou seja, apenas meio de cultura e resazurina na ausência de células [Ro = (A570 /A600) C-]. A absorbância do meio de cultura foi subtraída de todas as amostras (meio na ausência de resazurina). Os gráficos foram construídos com auxílio do software *GraphPad Prism 7.0*. Todas as avaliações *in vitro* foram realizadas em triplicata e repetidas duas vezes.

4.10 Avaliação do índice de seletividade dos extratos

O índice de seletividade determina o quanto o composto é ativo sem causar danos à viabilidade celular. Este índice foi calculado avaliando-se a razão entre a CC₅₀ e a CIM (KLEYMANN, WERLING, 2004).

Valores superiores a 1 foram considerados promissores e nortearão a seleção dos extratos para estudos posteriores (RIBEIRO, 2017).

4.11 Avaliação da interação entre o extrato de folhas frescas de *L. angustifolia* e antifúngicos

Esta avaliação foi realizada sobre células planctônicas e sobre biofilmes.

4.11.1 Avaliação da interação entre o extrato de folhas frescas de *L. angustifolia* e antifúngicos em células planctônicas de *C. krusei* e *C. glabrata*

Este teste é realizado em microplacas de 96 poços, onde certas linhas e colunas contêm diluições em série das substâncias, uma sendo o extrato a ser testado e outra um antifúngico. Para avaliar a interação foi utilizado o extrato das folhas frescas de *L. angustifolia* e os antifúngicos fluconazol, anfotericina B e caspofungina. Foi escolhido este extrato para testar as associações pois este extrato apresentou boa IC₅₀ e foi o extrato com menos toxicidade dos que foram avaliados.

O extrato foi analisado a partir da concentração de 2000 µg/mL até 7,8 µg/mL para *C. krusei* e *C. glabrata*. O fluconazol foi testado a partir da concentração de 64 µg/mL até 2 µg/mL para *C. krusei* e 16 µg/mL até 0,5 µg/mL para *C. glabrata*. A anfotericina B e a caspofungina foram testadas a partir de 1 µg/mL até 0,03 µg/mL.

A coluna 1 foi utilizada como controle de esterilidade do meio de cultura; a coluna 12 como controle de crescimento do microrganismo; a coluna 2 como controle de turvação do antifúngico e a coluna 3 como controle de atividade do antifúngico (antifúngico mais microrganismo). A Linha G foi utilizada como controle de atividade do extrato de folhas frescas de *L. angustifolia* (extrato mais microrganismo); a Linha H como controle de turvação do extrato de folhas frescas de *L. angustifolia*.

Utilizando concentrações próximas e abaixo de CIMs, levam a uma combinação única das duas substâncias em cada poço. O Índice de Concentração Inibitória Fracionada (FICI) é calculado pela soma dos valores da Concentração Inibitória Fracionada (FIC) que é definido para X como: CIM de X em combinação dividido por CIM de X sozinho (SVETAZ *et al.*, 2016). Da mesma forma é calculado o FIC de Y.

Este método permite a avaliação do FICI a partir da obtenção de uma curva de dose-resposta. O FICI é formado por duas análises somatórias, que analisam a menor concentração de cada composto, capaz de inibir 50% do crescimento (IC_{50}) sob associação, e divide pela menor concentração do mesmo com mesma atividade, quando isolado (FIVELMAN; ADAGU; WARHURST, 2004 *apud* LIMA, 2017).

Amostra	Dose	FIC	FICI
< IC Composto combinado	A	$\frac{A}{A_i}$	(FIC A) + (FIC B)
IC Composto isolado	A_i	A_i	
< IC FLC combinado	B	$\frac{B}{B_i}$	
IC FLC isolado	B_i	B_i	

Figura 6 - Representação do cálculo da Concentração Inibitória Fracionada – FICI.

Nota: FLC, Fluconazol; IC 50, Concentração inibitória mínima para inibição de 50% do crescimento; <IC, menor concentração do composto sob combinação, capaz de inibir 50% do crescimento.

Fonte: Lima, 2017.

Um $FICI \leq 0,5$ é indicativo de sinergismo; um $FICI > 4,0$ indica antagonismo e um FICI de 0,5 - 4,0 é indicativo de ausência de interação (ODDS, 2003). No entanto, outros autores consideram outros limites para o FICI, e também descrevem os resultados que não são sinérgicos nem antagônicos, usando termos diferentes, como "aditivo", "somatório", "nenhuma interação" e "indiferença" (ODDS, 2003, MARTINEZ-IRUJO, 1996).

Para Schelz, Molnar, Hohmann, (2006) os resultados podem também ser interpretados da seguinte forma: sinérgico ($<0,5$), aditivo (0,5-1,0), indiferente (> 1 e $> 4,0$) ou antagônico ($> 4,0$). Já para Carradori *et al.* (2016), o FICI pode indicar um efeito sinérgico quando for $\leq 0,5$, como aditivo ou indiferente quando $> 0,5$ e ≤ 2 , e como antagônico quando for > 2 .

Foram preparadas suspensões fúngicas de *Candida* spp. e ajustadas ao tubo 0,5 da escala McFarland, a qual corresponde a aproximadamente 10^6 UFC/mL. As suspensões foram colocadas nos poços com as devidas substâncias a serem testadas e a microplaca foi incubada a 37°C por 24 horas.

4.11.2 Avaliação da interação entre o extrato de folhas frescas de *L. angustifolia* e antifúngicos em biofilme de *C. krusei* e *C. glabrata*

Os biofilmes foram formados como descrito no item “4.6 Formação de biofilme de *Candida* spp.”

Para avaliar a interação foi utilizado o extrato das folhas frescas de *L. angustifolia* e os antifúngicos fluconazol e anfotericina B. O extrato foi analisado a partir da concentração de 5000 µg/mL a 39,062 µg/mL para *C. krusei* e *C. glabrata*. O fluconazol foi testado a partir da concentração de 2048 µg/mL a 64 µg/mL. A anfotericina B foi testada a partir de 1200 µg/mL a 37,5 µg/mL.

A coluna 1 foi utilizada como controle de esterilidade do meio de cultura; a coluna 12 como controle de crescimento do microrganismo; a coluna 2 como controle de turvação do antifúngico e a coluna 3 como controle de atividade do antifúngico (antifúngico mais microrganismo). A Linha G foi utilizada como controle de atividade do extrato de folhas frescas de *L. angustifolia* (extrato mais microrganismo); a Linha H como controle de turvação do extrato de folhas frescas de *L. angustifolia*.

Utilizando concentrações próximas e abaixo de seus CIMs, levam a uma combinação única das duas substâncias em cada poço. O Índice de Concentração Inibitória Fracionada (FICI) é calculado pela soma dos valores da Concentração Inibitória Fracionada (FIC) que é definido para X como: CIM de X em combinação dividido por CIM de X sozinho (SVETAZ *et al.*, 2016). Da mesma forma é calculado o FIC de Y.

Após 24h, os poços foram lavados duas vezes com 200 µL de tampão PBS, para a remoção de células não aderidas e dos compostos. Após isso, realizaram-se dois ensaios, um para avaliar a atividade metabólica do biofilme (utilizando-se ensaio de redução de XTT) e outro para avaliar a sua biomassa (utilizando-se cristal violeta). Estes ensaios foram realizados de acordo com o descrito no item “4.7.1 Avaliação da concentração inibitória mínima dos extratos de *L. angustifolia* e *L. dentata*. sobre *Candida* spp. em estado sésil (biofilme)”

4.12 Avaliação da concentração fungicida mínima dos extratos de *L. angustifolia* e *L. dentata*

A determinação da concentração fungicida mínima (CFM) dos extratos foi realizada com base nos resultados da CIM. No ensaio em questão, volumes de 100 µL de suspensão proveniente de cada poço da microplaca, uma ou duas concentrações imediatamente superiores à CIM, foram adicionados em placas contendo meio ágar Sabouraud solidificado e distribuídos sobre a superfície do respectivo meio de cultura. Após incubação, a 37°C por 24 horas, verificou-se a presença ou ausência de crescimento microbiano. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.13 Análise Estatística

As análises estatísticas foram feitas no *Graphpad Prism*, versão 6.0 e 7.0, onde foram realizados o teste de Análise de Variância (ANOVA) e o teste de *Tukey* com intervalo de confiança de 95%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Preparo Dos Extratos Vegetais

Foram preparados extratos utilizando as plantas frescas e secas de *L. angustifolia* Mill. e *L. dentata* L.

5.1.1 Extrato das plantas frescas e secas

Os compostos foram extraídos das plantas pela técnica de maceração com solvente álcool 70%. Segundo a Farmacopéia Brasileira (2019), extratos fluidos são preparados utilizando álcool etílico, misturas hidroetíflicas em proporções apropriadas ou água.

As massas dos extratos obtidos da extração de flores e folhas frescas e secas de *L. angustifolia* Mill. e *L. dentata* L. foram as seguintes:

Tabela 1 – Resultados dos rendimentos dos extratos de *L. angustifolia*.

Planta	Massa inicial do material vegetal (em gramas)	Massa final do extrato seco (em gramas)	Rendimento (%)
Flores frescas	150	15,2	10,1
Flores secas	150	3,09	2,06
Folhas frescas	150	8,7	5,8
Folhas secas	75	3,2	4,27

Fonte: Do autor.

Tabela 2 – Resultados dos rendimentos dos extratos *L. dentata*.

Planta	Massa inicial do material vegetal (em gramas)	Massa final – extrato seco (em gramas)	Rendimento (%)
Flores frescas	150	3,89	2,6
Flores secas	150	7,18	4,79
Folhas frescas	150	3,94	2,63
Folhas secas	75	4,4	5,87

Fonte: Do autor.

Os rendimentos foram calculados a partir das massas dos extratos secos das plantas em questão, utilizando-se a fórmula:

$$\text{Rendimento (\%)} = (\text{massa do extrato seco} / \text{massa do material vegetal fresco}) \times 100$$

$$\text{Exemplo: Rendimento dos extratos secos de flores frescas} = (15,2/150) \times 100 = 10,1\%$$

Analisando-se os resultados foi possível perceber que houve, em valores absolutos, maior rendimento dos extratos das flores frescas de *L. angustifolia*. As flores frescas desta espécie, possivelmente têm uma grande quantidade de óleos essenciais. Já as flores secas tiveram menor rendimento devido, possivelmente, à volatilidade dos óleos e à eliminação dos mesmos no processo de secagem das flores.

O óleo essencial pode ser encontrado em diversas partes da planta: raízes, rizomas, caules, cascas, folhas, flores, frutos, sementes, sendo produzidos em estruturas secretoras especializadas (SALES, 2015). O estudo realizado por Muñoz-Bertomeu *et al.* (2007) mostrou que o rendimento total do óleo essencial de *Lavandula latifolia* variou segundo o órgão da planta (flores ou folhas) e que as flores tiveram maior quantidade de óleo essencial.

Os extratos das plantas secas de *L. dentata* L. tiveram os maiores rendimentos: o maior rendimento foi das folhas secas, seguido pelas flores secas. *L. dentata* apresentou maior rendimento nas partes secas, principalmente nas folhas secas, possivelmente os constituintes destas partes secas se concentraram pela perda de água.

Os métodos de extração envolvem a separação de constituintes que podem ou não apresentar potencial biológico sobre células, vegetais e microbianas. Tais métodos, influenciam diretamente na extração, e conseqüentemente no rendimento total do extrato (TIWARI, 2011).

A maceração é um método de extração muito utilizado, que se baseia em colocar a planta em contato com um solvente preestabelecido, à temperatura ambiente e em recipiente fechado, durante 2 a 14 dias. Este processo é influenciado por fatores que dependem da composição da planta e do solvente. Em relação ao solvente, sua seletividade e quantidade em volume podem influenciar na extração (Farmacopéia Brasileira, 1996).

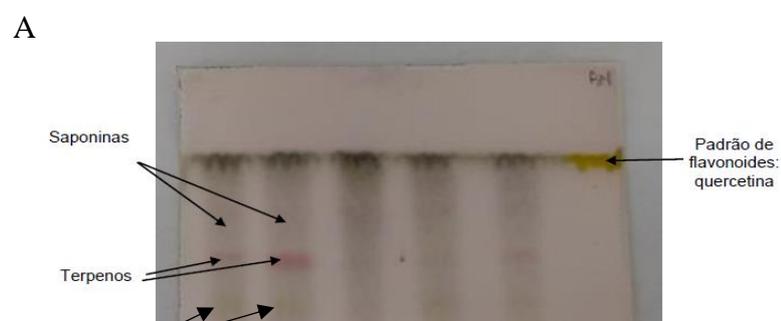
As condições de plantio das Lavandas utilizadas podem afetar no rendimento. As plantas sofrem influência de diversos fatores, tanto internos quanto externos, que podem alterar a quantidade e até mesmo a natureza dos constituintes ativos das mesmas. Alguns desses fatores são: variações sazonais e horário de coleta, temperatura, incidência de sol e chuva, disponibilidade de nutrientes e altitude (GOBBO-NETO, LOPES, 2007).

5.2 Avaliação do perfil fitoquímico de *L. angustifolia* e *L. dentata*

O perfil fitoquímico foi avaliado por Cromatografia em Camada Delgada, teste para saponinas e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

5.2.1 Avaliação dos extratos hidroetanólicos de *L. angustifolia* e *L. dentata* por Cromatografia em Camada Delgada

Os resultados da triagem Fitoquímica de *L. angustifolia* Mill. e *L. dentata* L se encontram na Figura 7.



B

C

Figura 7 – Resultado da Cromatografia em camada delgada dos extratos analisados de *L. angustifolia* e *L. dentata*.

Nota: A – revelação com anisaldeído sulfúrico e aquecimento a 100°C; B – revelação com cloreto férrico; C – revelação com reativo de Dragendorff; 1 – extrato de flor fresca de *Lavandula angustifolia*; 2 – extrato de folha fresca de *L. angustifolia*; 3 – extrato de flor fresca de *L. dentata*; 4 – extrato de folha fresca de *L. dentata*; 5 – quercetina; 6 – ácido gálico; 7 – ácido tânico; 8 – catequina; 9 – quinina.

Fonte: Do autor.

Foram utilizados os extratos que apresentaram atividade antimicrobiana no ensaio de avaliação da sensibilidade antifúngica e determinação da CIM. contra as espécies de *Candida* spp., que no caso foram os extratos de flores frescas e folhas frescas de *L. angustifolia* e flores e folhas frescas de *L. dentata*. Os extratos das plantas secas não foram analisados pois não apresentaram atividade, o que sugere que o processo de secagem das plantas pode ter ocasionado as perdas de substâncias ativas.

No ensaio representado na figura 7-A, foi utilizado o revelador anisaldeído sulfúrico, que auxilia na detecção de terpenos, saponinas, flavonoides, propilpropanoides, entre outras substâncias. Os terpenos apresentam coloração violeta e as saponinas azul-violeta a amarelo-acinzentado (WAGNER; BLADT; ZGAINSKY, 2009).

Nas análises de flores e folhas frescas de *L. angustifolia* foram observados em ambos extratos, mancha de coloração púrpura, característica de terpenos, e, mancha acinzentada, característica de saponinas, e manchas amareladas características de ácidos fenólicos. Estes metabólitos podem aparecer quando revelados com anisaldeído sulfúrico (FIGURA 7-A).

Nas análises de flores e folhas frescas de *L. dentata*, foram observados em ambos extratos mancha acinzentada, característica de saponinas, e manchas amareladas características de ácidos fenólicos. Foi observada mancha de coloração púrpura, característica de terpenos, somente no extrato das folhas frescas de *L. dentata*.

Ao comparar os resultados obtidos com a coloração apresentada pelo padrão de flavonoides (quercetina) (FIGURA 7-A), não foi observada este tipo de flavonóide nos extratos de flores e folhas frescas de *L. angustifolia* e nem nos extratos de flores e folhas frescas de *L. dentata*.

O ácido gálico, os flavonoides, o ácido tânico, as catequinas e as antraquinonas são polifenóis que se oxidam facilmente, devido ao seu poder redutor, resultando em substâncias coradas. O alto grau de conjugação nesses compostos promove a cor dos produtos de oxidação. O cloreto férrico (FIGURA 7-B) é empregado para a caracterização de polifenóis, uma vez que apresenta atividade oxidante, e a positividade desta reação pode ser observada pelo desenvolvimento de coloração azul ou verde-azulada (SIMÕES *et al.*, 2010).

Ao contrapor os resultados obtidos dos extratos de flores frescas, folhas frescas de *L. angustifolia* com os padrões (FIGURA 7-C), não foram identificados alcaloides e nem polifenóis em nenhum dos extratos analisados.

As quininas pertencem à classe dos alcaloides, os quais podem ser caracterizados pela reação com Reagente de Dragendorff (solução de iodeto de potássio e subnitrito de bismuto), visto que os alcaloides formam sais complexos com metais, apresentando coloração que variam do branco ao marrom-alaranjado (SIMÕES *et al.*, 2010).

É fundamental a confirmação da presença de terpenos e saponinas nos extratos por técnica mais sofisticada de caracterização. A suspeita da presença de saponinas nos extratos,

direcionou a execução dos testes para a identificação da presença de saponinas e sua atividade hemolítica e foi identificada a presença de saponinas não-hemolíticas em todos os extratos.

Com base nos resultados obtidos, e comparando-se com os padrões, não foram identificados alcaloides e polifenóis em nenhum dos extratos hidroetanólicos de flores e folhas frescas de *L. dentata* (FIGURA 7-B e 7-C).

Não foram encontradas na literatura, pesquisas que utilizassem metodologia de CCD para a determinação de substâncias nos extratos hidroetanólicos de flores e folhas frescas de *L. angustifolia* e *L. dentata*. Porém, esta é uma metodologia muito utilizada para a análises de diversas plantas.

O extrato de *L. angustifolia* tem efeitos antioxidantes, amplamente atribuídos a seus polifenóis (GALLEGO et al. 2013), e, acredita-se que estes compostos possam estar em grande quantidade em lavandas e podem ser obtidos desde que seja empregada a tecnologia de extração apropriada (RADULESCU, 2017).

Contreras *et al.* (2018) avaliaram o perfil dos constituintes fitoquímicos dos extratos hidrometanólicos de *L. stoechas* e *L. dentata*, os quais foram obtidos por extração líquida pressurizada. Os dados espectrométricos revelaram perfis complexos constituídos por uma ampla gama de fitoquímicos polares e semi-polares, principalmente compostos fenólicos. Enquanto os ácidos hidroxicinâmicos constituíram a maior classe em ambos os extratos, as flavonas foram as classes mais abundantes, representando 10,44 g em *L. dentata* e 4,85 g em *L. stoechas*, por 100 g de extrato seco.

O estudo conduzido por Alexa *et al.* (2018) investigou a composição fitoquímica de *Mentha × piperita* L. e *Lavandula angustifolia* Mill. em relação ao teor de ácido hidroxicinâmico (HCAs), em particular, ácido cafeico (CA), p-cumárico (CU), ferúlico (FE) e rosmarínico (RS) usando cromatografia líquida com espectrômetro de massa (LC-MS). Os resultados mostraram que RS e FE representam os compostos majoritários, o maior conteúdo de FE foi encontrado em *L. angustifolia*. Os valores reportados na literatura em relação ao conteúdo dos HCAs variam dependendo do genótipo, do cultivo e do método de extração (SPIRIDON, 2011). Acredita-se que variações deste tipo possam ocorrer com outros compostos presentes nas plantas.

Esta diferença de compostos encontrados pode ser explicada pelo fato de a produção de metabólitos secundários da espécie vegetal poder ser influenciada por diversos fatores como: variações sazonais, latitude e longitude, quantidade de sol e chuva. O estudo de Demasi (2018)

utilizando *L. angustifolia* demonstrou que os fatores latitude e longitude, afetam qualitativamente e quantitativamente a composição da mesma. Possivelmente a mesma variação ocorra com a *L. dentata*, sendo um fator que dificulta a comparação de diferentes pesquisas sobre caracterização e quantificação de substâncias encontradas na planta.

5.2.2 Ensaio de identificação da presença de saponinas nos extratos

Neste ensaio foram utilizados apenas os extratos que foram avaliados na CCD.

Em solução aquosa, as saponinas formam espuma persistente e abundante, a qual é estável à ação de ácidos minerais diluídos (SIMÕES *et al.*, 2010). Ao acrescentar-se o ácido clorídrico 10% à espuma do extrato, a espuma permaneceu intacta, indicando a presença de saponina em todos os extratos analisados.

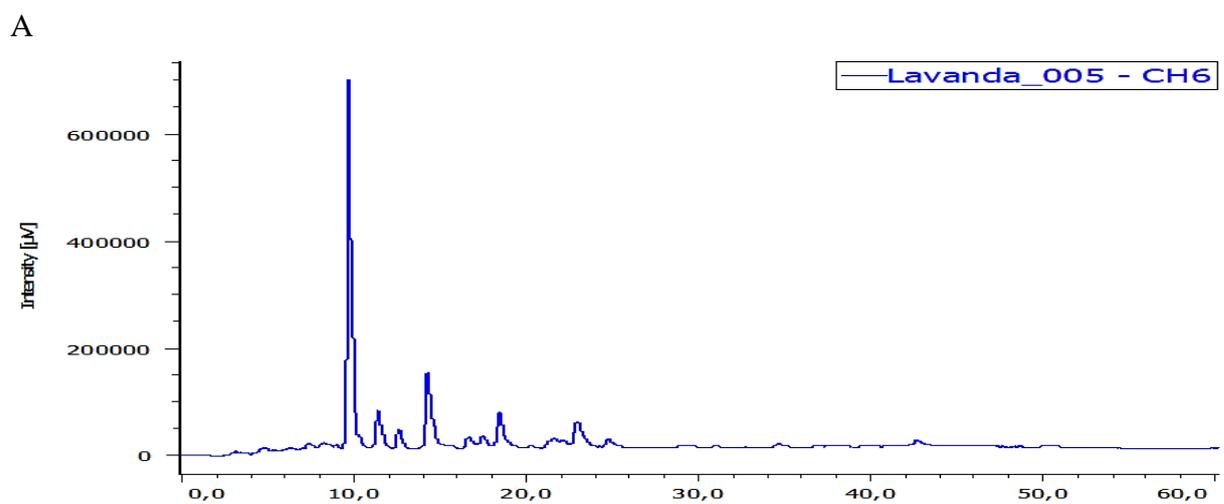
As saponinas possuem uma ampla variedade de atividades relacionadas a efeitos protetores contra o câncer, anti-inflamatórias, anti-alérgicas e antivirais, e atividades biológicas sobre a fisiologia dos sistemas cardíaco e sanguíneo, bem como atividades moluscidas (LACAILLE-DUBOIS, WAGNER, 1996, PELAH, ABRAMOVICH, Z.; WIESMAN, M. K., 2002). Sharabai, Afolayan (2017) observaram que as saponinas presentes nas folhas de *Agapanthus praecox* podem possuir atividade anti-inflamatória e antibacteriana, o que pode justificar seu uso na medicina tradicional para o tratamento de alguns tipos de feridas.

5.2.3 Avaliação da atividade hemolítica de saponinas

A maioria das saponinas monodesmosídicas possuem a capacidade de causar hemólise, o que não é visto nas saponinas bidesmosídicas (WAGNER; BLADT; ZGAINSKY, 2009). Sendo assim, analisando-se o resultado do ensaio em questão, não foram observados halos de hemólise no meio de cultura ágar sangue nos locais em que os extratos foram aplicados, o que sugere que as saponinas determinadas nos ensaios anteriores são classificadas como bidesmosídicas. No controle positivo foi verificado o halo de hemólise, o que indica que os compostos utilizados estavam propícios ao teste. O controle negativo de DMSO 100% de pureza, não demonstrou ação hemolítica.

5.3 Avaliação do perfil qualitativo do extrato de folhas frescas de *L. angustifolia* por Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A seguir estão representados os cromatogramas e espectro de massas de primeira-ordem, em *full-scan*, do extrato de folhas frescas de *L. angustifolia*.



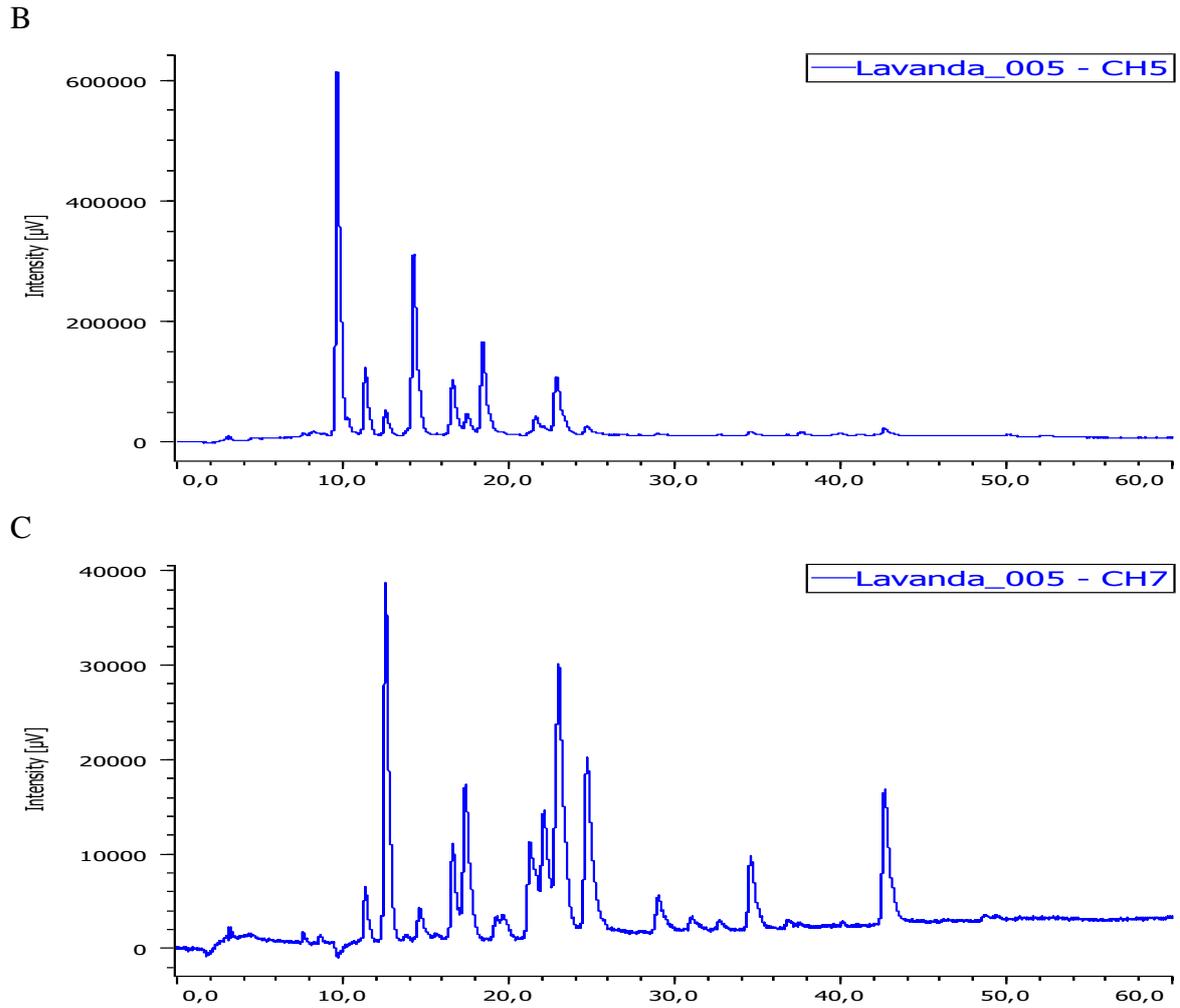
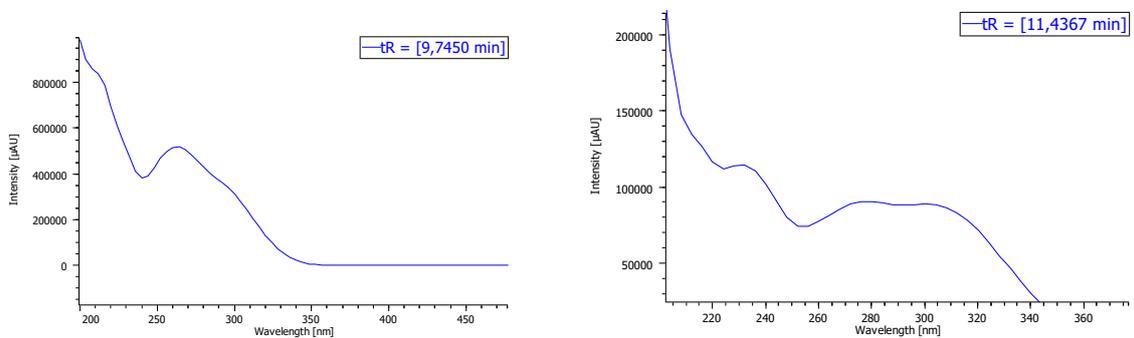


Figura 8 - Perfil cromatográfico, em diferentes comprimentos de onda, do extrato de folhas frescas *L. angustifolia* obtidas por CLAE-UV.

Nota: Eixo Y: intensidade de absorção (% de Absorbancia). Eixo x: Tempo de Retenção (min).

Comprimentos de onda: A: 254 nm, B: 280 nm e C: 360 nm.

Fonte: Do autor.



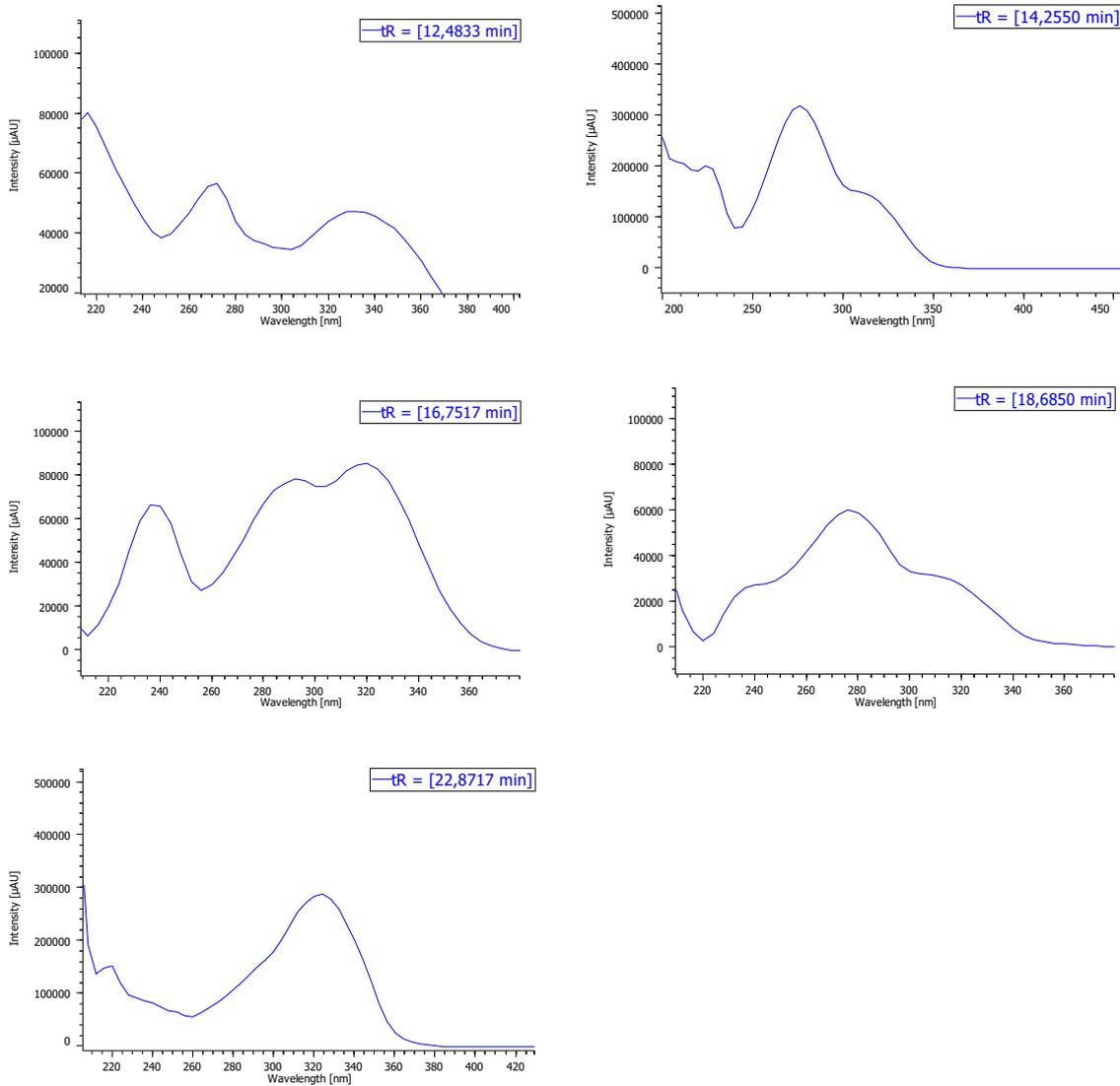
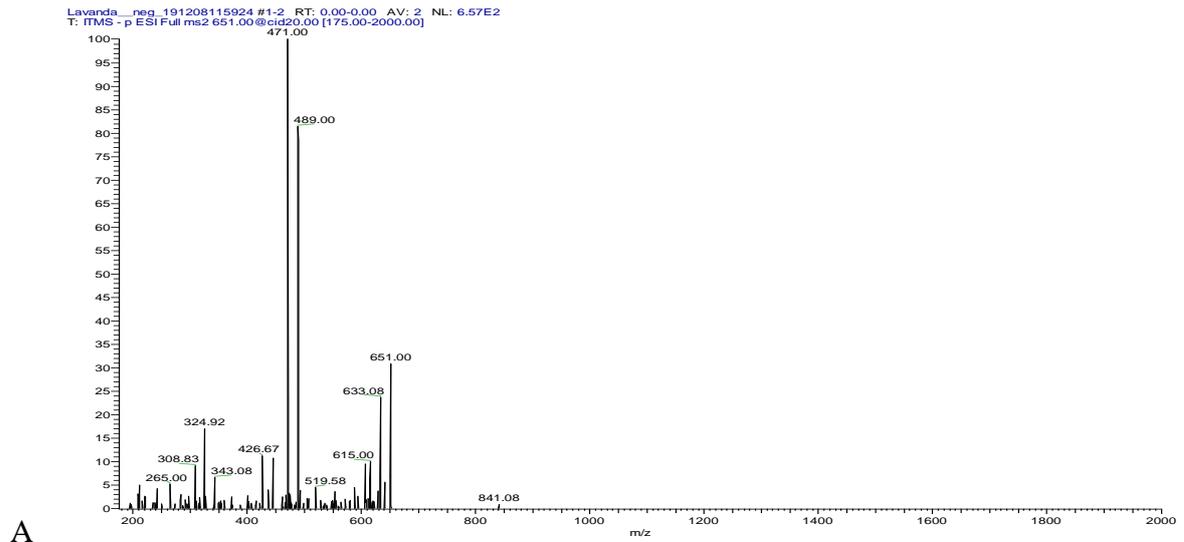


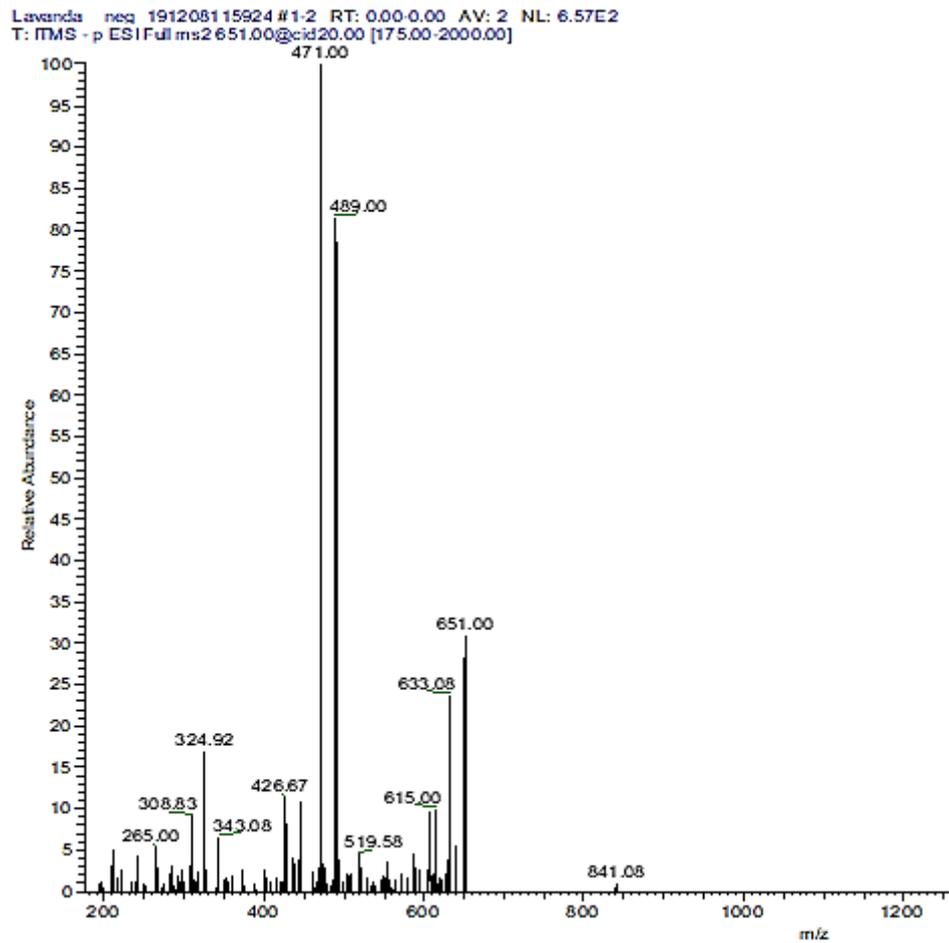
Figura 9 - Espectros de Ultra-Violeta (UV) obtidos dos compostos eluídos e detectados nos cromatogramas verificados em diferentes comprimentos de onda (254, 280 e 360 nm), do extrato de folhas frescas de *L. angustifolia* obtidas por CLAE.

Nota: Eixo y: intensidade de absorção; eixo x: comprimento de onda (nm).

Fonte: Do autor.



A



B

Figura 10 - Espectro de massas *full-scan*, do extrato de *L. angustifolia*, modo negativo.

Nota: Figura B: corte feito na figura, para ampliar a visibilidade dos picos. Eixo x: absorvância; eixo y: m/z - razão massa-carga.

Fonte: Do autor.

Em todas as análises de CLAE-DAD foram detectados vários picos. Nos comprimentos de onda de 254 e 280 nm vários componentes foram detectados. Detecções a 254 e 280 nm são indicativas de compostos fenólicos na composição.

Estas análises preliminares foram realizadas apenas com o intuito de se verificar as características dos cromatogramas que seriam obtidos, uma vez que esse tipo de extrato, conforme relatado na literatura pode conter vários compostos que interferem na identificação e quantificação de outros (Turgut *et al.*, 2017).

Em estudo realizado por Turgut *et al.* (2017), evidenciou-se no extrato de *L. angustifolia* Mill. a presença de ácido gálico, ácido 2,3,4-diidroxibenzóico, ácido 4-hidroxibenzóico, ácido clorogênico, ácido vanílico, ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, apigenina, ácido rosmarínico e ácido cinâmico.

Diante das evidências da existência de flavonoides e ácidos fenólicos, decidiu-se investigar as substâncias químicas da espécie. Para tanto, elegeu-se o extrato de folhas frescas e *L. angustifolia* que demonstrou um maior nível de segurança no ensaio de citotoxicidade. O objetivo deste estudo foi produzir informações espectrais qualitativas sobre a constituição da matriz avaliada de forma rápida e direta. A otimização dos parâmetros de ionização em que os perfis foram obtidos e realizados de maneira sistemática, levou em consideração o maior número de íons detectados com a menor fragmentação possível na fonte e baixa concentração da amostra.

Os estudos foram realizados nos modos positivo e negativo. O modo negativo foi escolhido tendo em vista o conhecimento prévio da composição flavonoídica desta espécie e que estas classes de metabólitos secundários ionizam facilmente pela desprotonação das hidroxilas fenólicas. No entanto, confirma-se a necessidade de novos parâmetros para a continuação desses estudos para uma maior compreensão dos compostos.

A identificação química dos compostos presente em um extrato avaliado biologicamente é de grande importância, pois investiga a correlação entre estrutura e atividade biológica.

Observou-se elagitaninos e diversos flavonoides. Algumas sugestões de prováveis compostos estão desmonstrados na tabela 3:

Tabela 3 - Sugestões de prováveis compostos encontrados nas folhas frescas de *L. angustifolia*.

<i>m/z</i>	Composto	Classe	Referência
427	Ácido epiteaflávicico	Flavonoide	Berkowitz, J.E.; Coggon P.; Sanderson G.W. (1971).
471	4''-Metilepigalocatequina- <i>O</i> -galato	Flavonoide	Chiu, F.L.; Lin, J. (2005).
489	Canferol- <i>O</i> -acetilhexose	Flavonoide	Kajdžanoska M.; Gjamovski, V.; Stefova M.T. (2010).
519	Purifolina	Flavonoide	Harborne, J.B.; Baxter H. (1999).
615	Quercetina- <i>O</i> -galoilhexose	Flavonoide	Matsuzaki K. <i>et al</i> (2010).
633	Punicacorteína A	Elagitanino	Anibal, P.C. <i>et al</i> (2013).
651	Crisoeriol- <i>O</i> -diglicuronídeo	Flavonoide	Plazonic A. <i>et al</i> (2009).
841	Canferol-3-(<i>O</i> -desoxihexose- <i>O</i> -hexose)-7-(<i>O</i> -malonilhexose)	Flavonoide	Kazuma, K.; Noda, N.; Suzuki, M. (2003)

Nota: *m/z*: razão massa carga

Fonte: Do autor.

Na análise por CCD não foi possível detectar a presença de todas as classes de compostos nas amostras. Assim, observa-se a importância de se realizar as análises por um método mais preciso como a CLAE, que é considerado um método mais sensível, tanto para a identificação quanto para quantificação dos metabólitos que possam estar presentes nas amostras.

O ácido elágico (EA) é um derivado do ácido gálico que existe principalmente em plantas superiores, combinado com seu precursor ácido hexa-hidroxi-difênico ou ligado na forma de elagitaninos (KLEIN G., *et al.* 2007).

Em relação à atividade antimicrobiana dos elagitaninos, estudos mostraram que a punicalagina, que é um tipo de elagitanino, foi relatada como sendo eficiente contra

Staphylococcus aureus, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* e *Aspergillus fumigatus* (LAVANYA, VEERAPPAN, 2012; SONI, PRAKASH, 2012; UEDA-YAMAGUCHI, *et al.*, 2011; *apud* ASCACIO-VALDÉS; 2013).

O estudo de Ueda-Yamaguchi *et al.* (2011) investigou as propriedades antifúngicas de *Ocotea odorifera*, e observou que extrato das suas folhas teve atividade antifúngica contra *C. parapsilosis* ATCC 22019. O extrato de metanólico de *O. odorifera* foi submetido a separação cromatográfica sucessiva e produziu Tellimagrandin II (TEL), um tipo de elagitanino. Elagitaninos são taninos hidrolisáveis, compostos em que o ácido gálico é ligado através de uma ligação éster a um núcleo de D-glicose. Estes compostos estão bem descritos por causa de sua atividade antimicrobiana (UEDA-YAMAGUCHI, *et al.*, 2011).

Devido à rica diversidade, os taninos são subdivididos quanto as suas propriedades estruturais e químicas. Os elagitaninos são um tipo de taninos hidrolisáveis que estão presentes em folhas e galhos de diversas espécies de plantas. Os taninos são capazes de precipitar proteínas, propiciando um efeito antimicrobiano e antifúngico. (MONTERIO *et al.*, 2005).

Em relação à atividade dos flavonóides, o trabalho de Onsare e Arora (2014) avaliou o potencial antibiofilme de flavonóides extraídos da semente de *Moringa oleifera* coat (SC) contra *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida* spp. Foi observado que os flavonóides presentes na *M. oleifera* exibiram potencial antibiofilme contra os microrganismos testados.

O estudo de Candiracci, Citterio, Piatti (2011) investigou o potencial de proteção do extrato flavonóide de mel no dimorfismo de *Candida* e observou que os flavonóides do mel têm potencial como alternativa anti-infecciosa contra *C. albicans*. O estudo de Ávila e *et al.* (2011) realizou o fracionamento bioguiado do extrato etanólico de *Piper septuplinervium* (Piperaceae) obtendo substâncias do tipo flavonóide, sendo ativas contra os fungos fitopatógenos *Fusarium oxysporum* e *Botrytis cinérea*.

Os flavonóides exibem propriedades antimicrobianas significativas contra patógenos bacterianos e fúngicos. A atividade é principalmente através da interação com proteínas de membrana levando a alterações na permeabilidade celular e propriedades da superfície celular (UPADHYAY *et al.*, 2014).

O estudo de Cao *et al.* (2008) observou que o flavonóide Baicalein, isolado das raízes de *Scutellaria baicalensis*, inibiu os biofilmes em desenvolvimento e pré-formados de *C. albicans*.

Sugeriu-se então, que a atividade em concentrações se devia à redução da CSH pela regulação negativa da expressão do gene CSH 1 em *C. albicans*.

5.4 Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos de *L. angustifolia* e *L. dentata* por teste de difusão em ágar

Foram testados todos os extratos de *L. angustifolia* e *L. dentata* em DMSO, anfotericina B e DMSO a 2,5%. Os resultados da *L. angustifolia* estão apresentados na Tabela 4 e os da *L. dentata* na tabela 5, onde pode-se observar os resultados das médias e dos desvios padrões no teste de difusão em ágar.

Tabela 4 - Média dos halos de inibição dos extratos de *L. angustifolia* e de anfotericina B.

Extratos	Média dos halos de inibição (em mm) \pm Desvio Padrão		
	<i>C. albicans</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. glabrata</i>
Flores frescas	7,33 \pm 6,35 ^b	16,67 \pm 1,15 ^b	11,67 \pm 0,58 ^b
Flores secas	10,67 \pm 1,53 ^b	16,66 \pm 0,58 ^b	11,33 \pm 0,58 ^b
Folhas frescas	7,33 \pm 6,35 ^b	11,67 \pm 1,15 ^a	3,33 \pm 5,8 ^a
Folhas secas	0 ^a	10,67 \pm 0,58 ^a	10,66 \pm 0,58 ^b
Anfotericina B	30 \pm 1,73 ^c	23,67 \pm 4,51 ^c	27,33 \pm 1,15 ^c

Nota: valores seguidos da mesma letra não diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$)

Fonte: Do autor.

Tabela 5 - Média dos halos de inibição dos extratos de *L. dentata* e de anfotericina B.

Extratos	Média dos halos de inibição (em mm) \pm Desvio Padrão		
	<i>C. albicans</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. glabrata</i>
Flores frescas	0 ^a	12,67 \pm 4,04 ^a	0 ^a
Flores secas	0 ^a	6 \pm 5,20 ^a	0 ^a
Folhas frescas	0 ^a	5,67 \pm 0,58 ^a	0 ^a
Folhas secas	0 ^a	9,67 \pm 2,31 ^a	0 ^a
Anfotericina B	30 \pm 1,73 ^b	23,67 \pm 4,51 ^b	27,33 \pm 1,15 ^b

Nota: valores seguidos da mesma letra não diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$).

Fonte: Do autor.

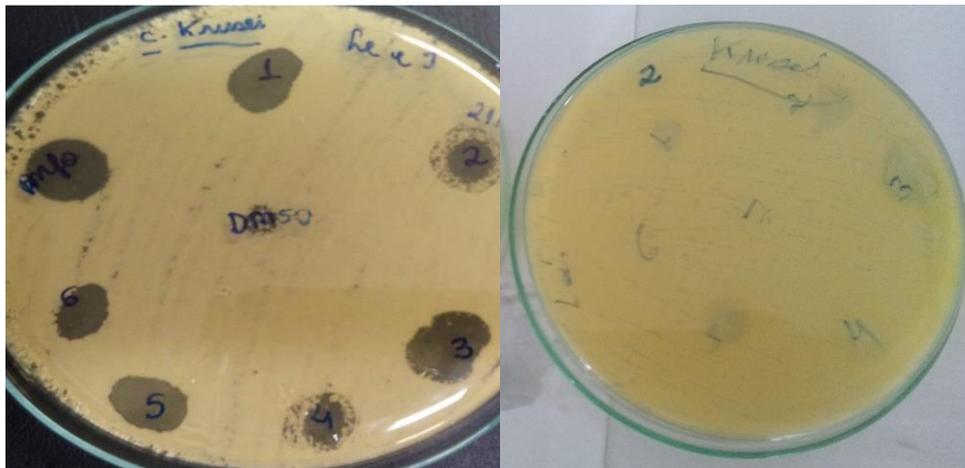


Figura 11 – Resultado do teste de difusão em ágar, extratos de *L. angustifolia* e *L. dentata* sobre *C. krusei*.

Nota: à esquerda: extratos de *L. angustifolia*; à direita: extratos de *L. dentata*.

1 - Extrato hidroetanólico de flores frescas; 2 - Extrato hidroetanólico de flores secas; 3 - Extrato hidroetanólico de folhas frescas; 4- Extrato hidroetanólico de folhas secas. Controles: Anfotericina B e DMSO.

Fonte: Do autor.

No teste de difusão em ágar, a anfotericina B utilizada como controle positivo, apresentou médias e desvios padrões dos diâmetros dos halos de inibição de 30mm; 23 mm e 27mm sobre *C. albicans* SC5314, *C. krusei* ATCC6258 e *C. glabrata* ATCC90030, respectivamente. Desta forma, pôde-se comprovar que todos os componentes utilizados estavam aptos ao ensaio, uma vez que a anfotericina B reportada como agente antimicrobiano no documento M27S4E (CLSI, 2012) apresentou atividade antifúngica.

A anfotericina B inibiu o crescimento de todas as três espécies de *Candida* testadas, sendo estatisticamente diferente dos extratos. O DMSO a 2,5% utilizado no mesmo volume dos extratos não inibiu o crescimento microbiano, ou seja, não se observou a presença de halo de inibição.

Os resultados do ensaio de triagem da atividade antifúngica dos extratos de *L. angustifolia* contra *C. albicans*, em meio sólido em placa, mostraram halos de inibição na presença dos extratos de flores e folhas frescas e flores secas sem diferença estatística entre eles. Para o extrato de folhas secas não houve a presença de halos de inibição contra *C. albicans*. Todos os extratos de *L. angustifolia* foram ativos sobre *C. krusei*, com algumas diferenças estatísticas entre os valores de diâmetros dos halos de inibição: as flores frescas e flores secas apresentaram o mesmo significado estatístico, e foram diferentes estatisticamente das folhas frescas e secas.

Todos os extratos de *L. angustifolia* demonstraram halo de inibição contra *C. glabrata*, com algumas diferenças estatísticas: os extratos de flores frescas e flores secas apresentaram mesmo significado estatístico; já o extrato das flores secas apresentou valor estatístico diferente. É possível que o extrato de flores secas tenha apresentado diferença pelo fato de os óleos essenciais presentes nas flores tenham evaporado no processo de secagem e com isso tenha se perdido compostos de ação antifúngica.

Os resultados do teste de sensibilidade em meio sólido com extratos de *L. dentata* contra *C. albicans* não apresentaram atividade. Todos os extratos de *L. dentata* demonstraram atividade sobre *C. krusei*, sem diferenças estatísticas entre os valores dos diâmetros dos halos de inibição. Os extratos de *L. angustifolia* não apresentaram atividade sobre *C. glabrata*.

Em relação a estes resultados deve-se destacar que os melhores resultados dos extratos de *Lavandula* spp. foram contra *C. krusei*, sendo considerado um resultado importante pois *C. krusei* é considerada intrinsicamente resistente ao fluconazol (MATOS, 2017). Os extratos de *L. angustifolia* também apresentaram bom efeito contra *C. albicans* e *C. glabrata*, sendo importante especialmente para *C. glabrata*. *C. glabrata* também pode estar associada a casos de infecções refratárias ao tratamento e algumas cepas podem ser resistentes ou apresentar sensibilidade diminuída a agentes antifúngicos azólicos, especialmente fluconazol, e como consequência, apresentarem alta taxa de mortalidade em pacientes hospitalizados (CARVALHO, 2018; LI, DONGARI-BAGTZOGLOU, 2007).

Um estudo realizado por Elemike *et al.* (2016) avaliou a atividade antimicrobiana pelo método de disco difusão utilizando *Lavandula x intermedia* contra *C. albicans*, e esta foi considerada resistente à lavanda utilizada. Os resultados encontrados nesses estudos foram compatíveis com os encontrados de *L. dentata* contra *C. albicans* e *C. glabrata*. Pode-se observar que somente *C. krusei* foi sensível aos extratos de *L. angustifolia* e *L. dentata*.

No estudo de Bayrak, Okmen e Arslan (2017), a avaliação de atividade antimicrobiana foi realizada por ensaio de difusão em disco e determinação da CIM. Os extratos etanólico e metanólico de *Lavandula stoechas* foram avaliados *in vitro* contra oito microrganismos, inclusive *C. albicans*. Os extratos desta espécie não determinaram efeitos contra *C. albicans*. Pela técnica de difusão em disco, foi mostrado que os extratos de *Lavandula stoechas* não foram efetivos, pois não houve formação de halo de inibição contra *C. albicans*. O crescimento de *C. albicans* foi avaliado frente à nistatina, havendo a formação de halo de inibição.

Em diversos estudos como os citados acima, de Bayrak, Okmen e Arslan (2017) e Elemike *et al.* (2016), a atividade antimicrobiana foi testada por ensaio de difusão em disco e determinação da CIM. Existem diversos métodos para avaliar a atividade antimicrobiana de extratos vegetais. Os mais conhecidos incluem método de difusão em ágar, método de macrodiluição e microdiluição em meio líquido. O método de microdiluição em caldo possui maior sensibilidade quando comparado com a técnica de difusão em ágar. Além disso, requer a utilização de uma menor quantidade de reagentes, possibilitando maior número de replicatas, o que proporciona maior confiabilidade dos resultados (OSTROSKY *et al.*, 2008).

É importante ressaltar que o teste de difusão em ágar é um teste qualitativo, no qual as substâncias de caráter apolar podem não se difundir muito bem no meio utilizado. Já o teste de microdiluição em caldo é um teste, além de qualitativo, também quantitativo, sendo considerado mais sensível (RIBEIRO, 2014).

5.5 Avaliação da Concentração Inibitória Mínima dos extratos de *L. angustifolia* e *L. dentata* sobre *Candida* spp. em estado planctônico

Foram analisados todos os extratos (flores e folhas frescas e flores e folhas secas) das duas espécies de Lavanda. Na tabela 6, estão dispostos os resultados.

Tabela 6: Valores de IC₅₀ e IC₉₀ referentes aos extratos de *L. angustifolia* e *L. dentata* sobre as espécies em estado plactônico de *Candida krusei* e *Candida glabrata* (em µg/mL).

Espécie de <i>Lavandula</i>		Espécie de <i>Candida</i>	IC ₅₀	IC ₉₀
<i>L. Angustifolia</i>	Flores frescas	<i>Candida krusei</i>	500	1000
		<i>Candida glabrata</i>	*	*
<i>L. Dentata</i>	Folhas frescas	<i>Candida krusei</i>	1000	*
		<i>Candida glabrata</i>	500	*
Fluconazol	Flores frescas	<i>Candida krusei</i>	1000	*
		<i>Candida glabrata</i>	*	*
	Folhas frescas	<i>Candida krusei</i>	1000	*
		<i>Candida glabrata</i>	*	*
DMSO		<i>Candida krusei</i>	*	*
		<i>Candida glabrata</i>	*	*

Nota: * Não houve atividade

Fonte: Do autor.

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos sobre *Candida* spp. foi realizada pela técnica de microdiluição em caldo, na qual foi possível avaliar a atividade dos extratos de folhas e flores frescas e secas de *Lavandula* spp. Todos os extratos de *L. angustifolia* e *L. dentata* foram avaliados contra todas as três espécies de *Candida* spp., porém apenas quatro dos extratos apresentaram atividade contra alguma(s) da(s) espécies de *Candida* spp. (TABELA 6).

Os métodos de diluição são utilizados para estabelecer a CIM de agentes antimicrobianos, sendo métodos de referência para os testes de sensibilidade a antimicrobianos. A CIM é definida como a menor concentração capaz de inibir o crescimento microbiano em 50%, como Concentração Inibitória de 50% (IC₅₀) e em 90%, Concentração Inibitória de 90% (IC₉₀).

A CIM informa sobre a sensibilidade ou resistência de determinado microrganismo a antimicrobiano específico, o que pode auxiliar nas decisões de tratamento (EUCAST, 2016).

O ensaio de sensibilidade aos antimicrobianos é importante para a vigilância da resistência dos microrganismos, estudos epidemiológicos e comparação da atividade *in vitro* de novos compostos com antifúngicos convencionais (EUCAST, 2016).

O fluconazol se mostrou ativo sobre *C. glabrata* ($IC_{50} = 32 \mu\text{g/mL}$). O fluconazol é um antifúngico seguro e eficaz no tratamento de candidíase, a não ser que haja suspeita que um paciente esteja infectado com uma espécie azol-resistente como *C. krusei* ou algumas linhagens de *C. glabrata* (SPELLBERG; FILLER; EDWARDS JR, 2006).

O DMSO (controle negativo), na faixa de concentração avaliada (2,5% a 0,004%), não ocasionou inibição do crescimento das espécies de *Candida* spp. O estudo de De Almeida *et al.* (2018) apresentou resultados semelhantes utilizando o DMSO como solvente na concentração de 3,5%.

Os extratos citados na tabela 6 (flores frescas e folhas frescas, respectivamente) também foram testados contra *C. albicans*, mas não apresentaram atividade. Os demais extratos de *L. angustifolia* e *L. dentata* não apresentaram atividade contra as espécies de *C. albicans*, *C. krusei* e *C. glabrata*. O estudo de Bayrak, Okmen e Arslan (2017), que analisou oito microrganismos, incluindo *C. albicans*, também não demonstrou atividade de *Lavandula stoechas* contra *C. albicans* no ensaio de microdiluição em caldo, sendo um resultado semelhante a este estudo.

O estudo de Chavasco *et al* (2014) analisou a atividade antimicrobiana de extratos hidroetanólicos de plantas sobre bactérias e leveduras. No teste de microdiluição em caldo, o extrato de *Bidens pilosa* sobre *C. albicans* apresentou CIM (IC_{50}) de 25 mg/mL para o extrato de flores e 12,5 mg/mL para o extrato de folhas. Este resultado difere dos encontrados neste estudo, pois neste os extratos de *Lavandula* spp. não apresentaram atividade, na faixa de concentrações avaliadas, para *C. albicans*. Porém observa-se que para *Lavandula* spp. foram utilizadas concentrações inferiores a 1 mg/mL.

O estudo de Blazekovic *et al.* (2011) avaliou as atividades antibacteriana e antifúngica *in vitro* utilizando extratos etanólicos de flores, caules e folhas e de *Lavandula × intermedia* Emeric ex Loisel. 'Budrovka'. Um forte efeito antifúngico dos extratos de flores também foi confirmado pelo método de microdiluição. No entanto, os valores de CIM para extratos de folhas e caules foram significativamente maiores. *C. krusei* foi um dos fungos que apresentou-

se com sensibilidade mais intensa pelo método de microdiluição, o mesmo pode-se observar em nosso estudo, pois *C. krusei* demonstrou maior sensibilidade de que *C. glabrata*.

Os extratos secos, quando avaliados pelo método de diluição em caldo, não apresentaram atividade antimicrobiana. Baydar, Erbaþ (2009) analisaram a influência da temperatura do ar de secagem na constituição da *Lavandula × intermedia* Emeric. Observou-se que, com o aumento da temperatura de secagem (de 30°C para 60°C), 75,7% do óleo essencial era perdido, levando à perda de componentes importantes da planta. É possível que perda semelhante de constituintes ativos tenha acontecido no processo de aquecimento e secagem das partes de *Lavandula* spp. avaliadas em nosso estudo.

Durante o processo de secagem do material vegetal, a temperatura pode modificar os teores dos metabólitos secundários presentes no mesmo. O processo de secagem e armazenamento do vegetal podem causar rearranjos, oxidações e reduções das moléculas bioativas, diminuindo as propriedades de um possível fitoterápico (ASTARITA, SANTARÉM, 2007; CALIXTO, 2000; DINIZ,). O estudo de Diniz, Astarita, Santarém (2007) que avaliou o efeito da secagem de plantas de *Hypericum perforatum*, demonstrou que a temperatura de secagem teve impacto no perfil de flavonóides do extrato hidrolisado. A variação mais drástica ocorreu na secagem realizada a 25 °C, temperatura na qual houve intensa redução nos teores de flavonóides analisados.

Um estudo semelhante foi realizado por Oliveira *et al.* (2016), no qual o maior teor de óleo essencial foi obtido da extração de folhas frescas de *Campomanesia adamantium* quando comparado com os teores encontrados nos extratos da planta seca artificialmente a 40°C em estufa com circulação forçada de ar e seca naturalmente a sombra. Estes estudos sugerem que a perda da atividade antimicrobiana pode estar relacionada com a secagem do material vegetal, uma vez que as plantas medicinais e aromáticas são sensíveis a este processo (MELO; RADÜNZ; MELO, 2004).

Segundo os dados apresentados na tabela 6, *L. angustifolia* parece ser mais ativa contra as espécies de *Candida* avaliadas, uma vez que apresentou atividade contra *C. krusei* e *C. glabrata*, ao contrário da *L. dentata* que só apresentou atividade contra *C. krusei*. Em relação às duas espécies de *Candida*, *C. glabrata* apresentou menor sensibilidade.

Os resultados encontrados são importantes pois linhagens de *C. krusei* são problemáticas pela sua resistência aos derivados azólicos (ex. fluconazol), podendo também ter reduzida sensibilidade para outras alternativas terapêuticas (RIBEIRO *et al.*, 2004). *C. glabrata*

também apresenta casos refratariedade ao tratamento agentes antifúngicos azólicos e algumas cepas podem ser resistentes aos mesmos (CARVALHO, 2018; LI, DONGARI-BAGTZOGLOU, 2007).

De acordo com os compostos caracterizados nos extratos, a ação antifúngica pode ser atribuída ao sinergismo entre saponinas e terpenos, uma vez que ambos possuem potencial antimicrobiano (SIMÕES *et al.*, 2010; VASILEVA *et al.*, 2018).

A atividade antifúngica dos extratos hidroetanólicos de flores e folhas frescas de *L. angustifolia* observada é promissora, visto que *C. krusei* apresenta resistência intrínseca ao fluconazol (MATTOS *et al.*, 2017).

5.6 Avaliação da Concentração Inibitória Mínima dos extratos de *L. angustifolia* e *L. dentata* sobre biofilmes formados de *Candida* spp.

A partir dos resultados observados nas células planctônicas, foram feitas avaliações do potencial ativo dos extratos nos respectivos biofilmes.

Os resultados da avaliação inibitória dos extratos das flores e folhas frescas de *L. angustifolia* e de *L. dentata* sobre biofilme em formação de *C. krusei* e *C. glabrata* estão apresentados a seguir na tabela 7.

Tabela 7 - Concentrações inibitórias (IC₅₀ e IC₉₀), em µg/mL, do crescimento de células sésseis do biofilme em formação de *C. krusei* e *C. glabrata* pelos extratos hidroetanólicos de *L. angustifolia* e *L. dentata* determinadas por avaliação da atividade metabólica e da biomassa fúngica.

		<i>C. krusei</i>				<i>C. glabrata</i>			
<i>Lavandula</i> <i>spp./</i> antifúngico (controle)		Atividade metabólica		Biomassa fúngica		Atividade metabólica		Biomassa fúngica	
		IC ₅₀	IC ₉₀	IC ₅₀	IC ₉₀	IC ₅₀	IC ₉₀	IC ₅₀	IC ₉₀
<i>L.</i> <i>angustifolia</i>	Flores Frescas	2500	*	1250	*	*	*	2500	*
	Folhas frescas	*	*	2500	*	*	*	*	*
<i>L. dentata</i>	Flores frescas	2500	*	2500	*	*	*	*	*
	Folhas frescas	2500	*	*	*	*	*	*	*
anfotericina B		300	1200	*	*	*	*	150	*

Fonte: Do autor.

Primeiramente, foi avaliada a ação sobre biofilme completamente formado, isto é, com adesão de 24 horas. Neste contexto, nenhum dos quatro extratos testados apresentaram atividade sobre biofilmes formados. Não observou-se interferências nem atividade metabólica e nem em biomassa fúngica, contra *C. krusei* e *C. glabrata*. As concentrações iniciaram-se a 2500 µg/mL do extrato e anfotericina B (controle positivo) a 1200 µg/mL. Devido a este fato, optou-se por testar as substâncias no biofilme em formação, adicionando-se os extratos com 1h e 30 min, logo após a etapa de adesão.

Ao analisar a tabela 7, percebe-se que, de acordo com o ensaio de redução do XTT, os extratos que apresentaram atividade contra o biofilme em formação de *C. krusei*, reduzindo 50% a atividade metabólica, foram: flores frescas de *L. angustifolia* (2500 µg/mL) e flores e folhas frescas de *L. dentata* (2500 µg/mL). Em relação à biomassa fúngica, houve redução de 50% da biomassa dos biofilmes em formação de *C. krusei* na presença de extratos de flores frescas (1250 µg/mL) e folhas frescas (2500 µg/mL) de *L. angustifolia* e flores frescas de *L. dentata* (2500 µg/mL). A anfotericina B diminuiu 50% da atividade metabólica na concentração de 300 µg/mL e reduziu 50% da biomassa dos biofilmes em formação de *C. krusei* na concentração de 1200 µg/mL.

Em relação à *C. glabrata*, houve atividade de redução de 50% da biomassa fúngica dos biofilmes em formação pelo extrato de flores frescas de *L. angustifolia* na concentração de 2500 µg/mL. A anfotericina B reduziu 50% da biomassa dos biofilmes em formação de *C. krusei* na concentração de 150 µg/mL. Não houve redução significativa da atividade metabólica dos biofilmes em formação de *C. glabrata* pelos extratos testados e nem pela Anfotericina B.

O estudo de Girardot M., Guerineau A., Boudesocque L. (2014) avaliou a interferência do extrato de *Vaccinium macrocarpon* Aiton nas etapas de adesão e formação de biofilme de *C. albicans* e *C. glabrata*. O extrato mostrou uma atividade anti-adesão contra *C. albicans* e *C. glabrata*, sendo capaz de prevenir as fases precoces e de maturação destes biofilmes. Além disso o pré-tratamento de superfície com o extrato comercial de “cranberry” reduziu a atividade metabólica em 50% nas linhagens de *C. albicans* e 100% das linhagens de *C. glabrata*.

O estudo de Da Rosa *et al* (2015), testou as infusões de folhas e raízes da planta *Sida tuberculata* contra biofilmes maduros de *C. krusei*. A atividade antibiofilme foi avaliada pela determinação da eficiência de remoção de biofilmes de cateter venoso central contaminado. A inibição do biofilme cultivado na superfície do cateter venoso central foi significativa e evidente com exposição de 90 min de concentração de 0,5 mg/mL de infusões. Os ecdisteróides,

compostos marcadores de *Sida* spp., foram considerados responsáveis pela atividade antifúngica.

Diversos métodos foram desenvolvidos para quantificar a formação de biofilme, incluindo o ensaio de redução de XTT e coloração com cristal violeta (CV) (JIN et al, 2003; RAMAGE *et al*, 2001 *apud* Melo *et al*, 2011). Pelo ensaio do XTT avalia-se a atividade metabólica do biofilme frente às substâncias testadas. Quanto menor a intensidade de coloração dos poços, menor o metabolismo fúngico, mostrando a ação dos antifúngicos na redução da formação do biofilme (KUHN et al., 2002).

A coloração do cristal violeta avalia a biomassa do biofilme. A partir da coluna de controle positivo, ou seja, os poços onde só havia crescimento fúngico, sem presença de nenhum antifúngico, consegue-se avaliar o crescimento máximo, ou seja, a maior quantidade de biomassa formada. A partir desses valores, determinou-se a quantidade de biomassa formada em cada poço contendo os extratos e os antifúngicos. No ensaio do cristal violeta, os biofilmes são corados com o cristal violeta podendo ser medidos espectrofotometricamente. Quanto menor a absorbância, menor a quantidade de células (biomassa) do biofilme, supondo-se que os antifúngicos apresentaram atividade na redução da biomassa do biofilme.

No ensaio de redução do XTT, a intensidade da cor apresentada no teste correlaciona-se com a atividade metabólica. Este teste mede apenas as células viáveis, pois o XTT é reduzido a formazan apenas por células metabólicas ativas. Porém o cristal violeta cora todas as células presentes nos biofilmes, independentemente de sua viabilidade. Ou seja, é analisada a quantidade total de células presente no biofilme, mas estas podem estar vivas ou inativas (mortas) (MELO *et al.*, 2011).

Baseado nos resultados encontrados, observa-se que o biofilme em formação de *C. krusei* apresentou sensibilidade a maior quantidade de extratos, quando comparado ao biofilme em formação de *C. glabrata*. Também foi possível observar que os extratos agiram limitando a formação do biofilme e não erradicando biofilmes já formados. Os extratos que foram ativos apresentaram efeito fungistático, visto que nos ensaios de avaliação de atividade metabólica e biomassa fúngica foi observada apenas inibição de 50% (IC₅₀). Estes resultados mostram que os extratos não eliminaram totalmente o biofilme em formação, apenas impediram seu crescimento.

O biofilme exige uma concentração mais alta dos antimicrobianos utilizados, por ser uma forma de resistência e por isso existe maior dificuldade de eliminação de microrganismos na

forma de biofilme do que em células planctônicas. O estudo de Torey, Sasidharan (2011), avaliou a atividade de *Cassia spectabilis* contra biofilme em formação de *C. albicans*, e observou que a Concentração Inibitória Mínima foi de 6,25 mg/mL.

Observa-se que os testes feitos com biofilme iniciam com uma concentração mais alta dos extratos. Em nossas avaliações, foi escolhido o valor inicial de 2500 µg/mL de concentração dos extratos em concordância com teste de citotoxicidade dos mesmos. Alguns extratos apresentaram baixas concentrações citotóxicas, sendo mais tóxicas as concentrações citotóxicas próximas de 1000 µg/mL.

Sabe-se que entre as leveduras oportunistas do gênero *Candida*, existe uma grande diversidade no controle transcricional sobre processos como adesão, formação de biofilme, filamentação, e produção de exopolissacarídeos (EPS). Essas diferenças têm implicações na persistência de colonização e infecções, também na resistência antifúngica tipicamente encontrada em células de biofilme de *Candida* spp., potencializadas por EPS, que funciona como uma barreira à difusão de fármacos, e à superexpressão de transportadores de fármacos. Essa variabilidade aumenta o desafio de encontrar uma solução eficaz para combater os biofilmes de *Candida* spp. (CAVALHEIRO, TEIXEIRA, 2018).

Na avaliação dos extratos por CCD (flores e folhas frescas de *L. angutifolia* e *L. dentata*) houve a sugestão da presença de terpenos nos extratos. Supõe-se que vários mecanismos estejam envolvidos na inibição de biofilmes de *C. albicans* mediada por terpenoides. Em geral, a habilidade dos terpenóides para evitar a troca morfo genética das leveduras às hifas foram propostas como responsáveis por atividades anti-adesão na prevenção de biofilmes de *Candida*. O efeito fungicida através de danos à membrana celular foi considerado responsável pela redução de biofilmes maduros (RAUT *et al.* 2013).

O processo de adesão de *Candida* spp. e sua subsequente formação de biofilme foi correlacionada com a hidrofobicidade da superfície celular. O farnesol, uma molécula que faz parte do mecanismo de *quorum sensing* de *Candida* spp., parece afetar a hidrofobicidade da superfície celular através da regulação do Gene CSH1, levando à supressão do crescimento do biofilme (BORGHI *et al.* 2011 RAUT, RATHOD, KARUPPAYIL, 2010; *apud* RAUT, KARUPPAYIL, 2016).

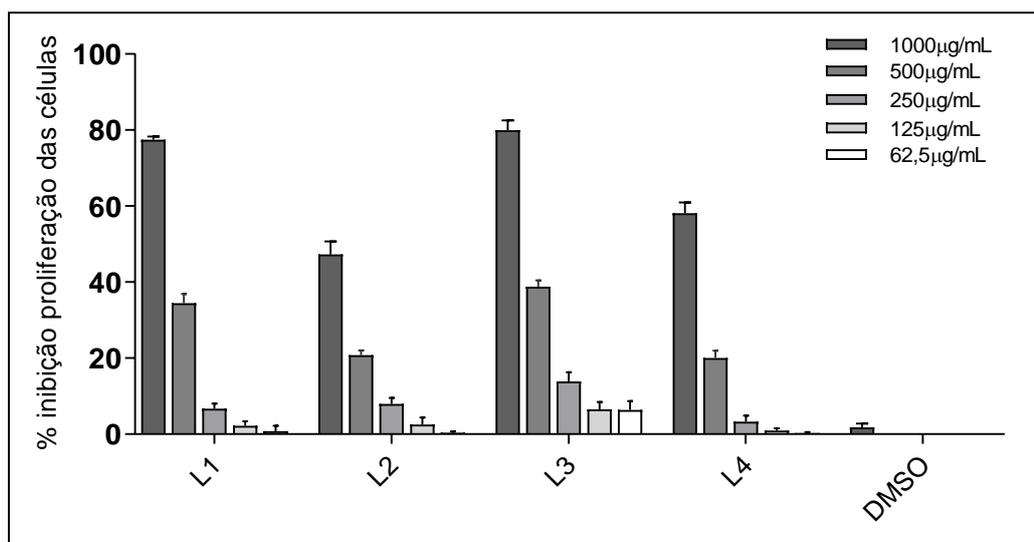
O estudo de Xie, Sun, Meng *et al.* (2015) investigou as propriedades fungicidas da planta *Carpesium macrocephalum*. Uma fração do extrato de metanol da planta exibiu inibição dos biofilmes de *Candida* spp., sendo investigada para as moléculas constituintes. Entre as

moléculas puras isoladas, três sesquiterpenos foram potentes inibidores da formação de biofilme em *C. albicans* com valores de IC₅₀ variando de 15-38 µg / mL.

5.7 Avaliação da citotoxicidade dos extratos hidroetanólicos de *L. angustifolia* e *L. dentata* sobre células Vero

Foi avaliada somente a citotoxicidade dos extratos que apresentaram atividade antimicrobiana no teste de microdiluição em caldo.

Os resultados estão apresentados a seguir:



A

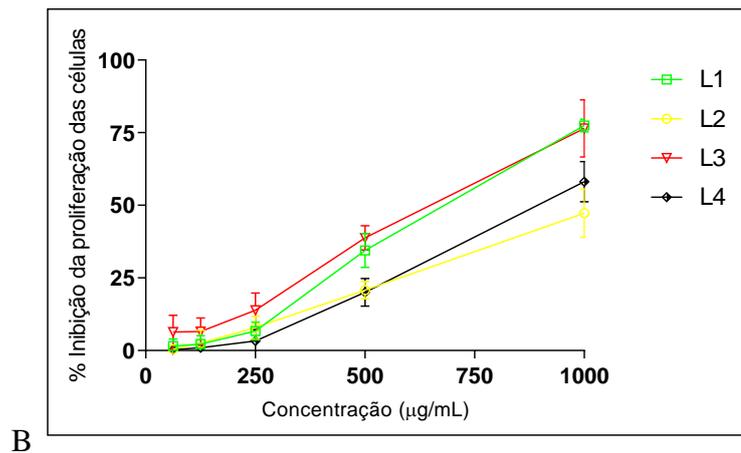


Figura 12 - Porcentagem de inibição da proliferação celular pelos extratos de *L. angustifolia* e *L. dentata*.

Nota: L1- extrato de *L. angustifolia* flores frescas, L2 – extrato de *L. angustifolia* folhas frescas, L3- extrato de *L. dentata* flores frescas, L4- extrato de *L. dentata* folhas frescas.

Fonte: Do autor.

Tabela 8 - Concentração citotóxica para 50% das células Vero (µg/mL).

Substância	Solução estoque [mg/mL]	[inicial µg/mL]	CC ₅₀
1	100	1000	638,43
2	100	1000	1058,61
3	50	1000	605,71
4	100	1000	954,27

Nota: Células Vero (9×10^3 /poço) foram mantidas em microplacas de 96 poços por 24 horas, a 37° C em atmosfera úmida contendo 5% CO₂. Concentrações decrescentes das substâncias (5 diluições seriadas 1:2 partindo de 1000 µg/mL) foram incubadas com as células por 24 horas, nas mesmas condições. A viabilidade das células foi aferida utilizando resazurina. Foram realizados dois experimentos independentes, em triplicata. CC-50 – concentração citotóxica para 50% das células.

Fonte: Do autor.

Na figura 12-A, observa-se que os extratos L1 e L3 apresentam maior inibição de células Vero, ou seja, o perfil de inibição de células é muito semelhante nestes extratos nas maiores concentrações avaliada (1000 µg/mL e 500 µg/mL). Os perfis nas menores concentrações (250, 125 e 62,5 µg/mL) é muito semelhante nos extratos L1 e L2; já o comportamento dos extratos L3 e L4 nessas 3 concentrações, é diferente dos demais. O DMSO não interferiu significativamente na inibição da proliferação celular.

Observa-se segundo a tabela 8, que a concentração citotóxica para 50% das células (CC₅₀) relativa aos extratos variou de 638,43 a 1058,61 µg/mL. Tal resultado é condizente com o estudo de Zahra *et al.* (2014), no qual foi avaliada a citotoxicidade de extratos de *L. angustifolia* contra fibroblastos humanos e o CC₅₀ foi maior do que 500 µg/mL.

O extrato 2 foi o que apresentou a maior concentração citotóxica. Os extratos 1 e 3 apresentaram a menor concentração citotóxica para 50% das células (CC₅₀), o que pode inviabilizar sua utilização como antimicrobianos no futuro, uma vez que uma baixa concentração citotóxica maior a probabilidade de haver problemas para o usuário.

Observa-se que os extratos 1, 3 são de flores, e estes foram os que apresentaram melhor perfil de inibição das células nas maiores concentrações avaliadas (1000 µg/mL e 500 µg/mL) e menor CC₅₀. Os extratos 2 e o 4 são de folhas de Lavanda e estes apresentaram um pior perfil de inibição das células nas maiores concentrações avaliadas (1000 µg/mL e 500 µg/mL) e menor CC₅₀. O perfil de inibição das células nas maiores concentrações avaliadas (1000 µg/mL e 500 µg/mL) se comportou de forma inversamente proporcional à CC₅₀.

O estudo de Mantovani *et al.* (2013) pesquisou a citotoxicidade do óleo essencial das folhas de *Lavandula angustifolia* Mill., cultivada no sudeste do Brasil. A citotoxicidade foi avaliada em fibroblastos humanos (GM07492-A) e os efeitos citotóxicos significativos foram expressos após exposição a concentrações superiores a 200 µg / mL por 24 h (IC₅₀ = 243,7 µg / mL). A metodologia utilizada para esta análise foi “Toxicology *in vitro* kit de ensaio colorimétrico” (XTT; Roche Diagnostics). Determinou-se a viabilidade de culturas, estabelecendo uma relação entre valores de absorvância para os grupos tratados e não tratados (controle).

5.8 Avaliação Índice de seletividade

Os valores estão relatados na tabela 9.

Tabela 9 – Índice de seletividade calculado para as respectivas espécies de *Candida* spp.

Espécie de <i>Lavandula</i>		Espécie de <i>Candida</i>	Índice de Seletividade
<i>Lavandula angustifolia</i>	Flores frescas	<i>Candida krusei</i>	1,28
	Folhas frescas	<i>Candida krusei</i>	1,06
		<i>Candida glabrata</i>	2,12
<i>Lavandula dentata</i>	Flores frescas	<i>Candida krusei</i>	0,61
	Folhas frescas	<i>Candida krusei</i>	0,95

Fonte: Do autor.

Segundo Ribeiro (2017), valores superiores a 1 foram considerados promissores e nortearam a seleção dos extratos para estudos posteriores.

Os extratos de flores e folhas frescas de *L. angustifolia* apresentaram potencial para futuros estudos e talvez como futuros candidatos a fármacos. Estes extratos apresentam bom perfil entre atividade farmacológica e toxicidade celular.

5.9 Avaliação da interação entre extrato hidroetanólico de folhas frescas de *L. angustifolia* e antifúngicos

Esta avaliação foi realizada sobre células planctônicas e sobre biofilmes.

5.9.1 Avaliação da interação entre o extrato de folhas frescas de *L. angustifolia* e antifúngicos em células planctônicas

Pelo método do *checkerboard*, foram cruzadas as concentrações do extrato de folhas frescas de *L. angustifolia* com cada fármaco isolado obtendo-se as combinações entre estes.

Neste estudo, foi avaliado o efeito da interação do extrato de folhas frescas de *L. angustifolia* com os antifúngicos fluconazol, anfotericina B e caspofungina contra células planctônica de *C. krusei* e *C. glabrata*.

Os resultados estão nas tabelas 10 e 11.

Tabela 10 - Índice de concentração inibitória fracionada (FICI) obtido a partir das associações dos valores de CIM ($\mu\text{g/mL}$) de extrato de folhas frescas de *L. angustifolia* e antifúngicos contra células planctônicas de *C. krusei*.

Combinação	IC ₅₀ extrato		IC ₅₀ antifúngico		Resultados	
	Sozinho	Combinado	Sozinho	Combinado	FICI	Interação
Fluconazol + Extrato	1000	15,63	32	16	0,516	Adtiva
Caspofungina + Extrato	1000	1000	0,250	0,250	2,000	Indiferente
Anfotericina B + Extrato	1000	15,63	0,250	0,125	0,516	Aditiva

Nota: FICI interpretada da seguinte forma: sinérgico (<0,5), aditivo (0,5-1,0), indiferente (> 1 e > 4,0) ou antagonico (> 4,0). IC₅₀ está apresentado em $\mu\text{g/mL}$.

Fonte: Do autor.

Tabela 11 - Índice de concentração inibitória fracionada (FICI) obtido a partir das associações dos valores de CIM ($\mu\text{g/mL}$) de extrato de folhas frescas de *L. angustifolia* e antifúngicos contra células planctônicas de *C. glabrata*.

Combinação	IC ₅₀ extrato		IC ₅₀ antifúngico		Resultados	
	Sozinho	Combinado	Sozinho	Combinado	FICI	Interação
Fluconazol + Extrato	500	250	16	2	0,625	Adtiva
Caspofungina + Extrato	1000	250	0,062	0,250	4,282	Antagônica
Anfotericina B + Extrato	250	15,63	0,062	0,062	1,062	Indiferente

Nota: FICI interpretada da seguinte forma: sinérgico (<0,5), aditivo (0,5-1,0), indiferente (> 1 e > 4,0) ou antagonico (> 4,0). IC₅₀ está apresentado em $\mu\text{g/mL}$.

Fonte: Do autor.

Observa-se na tabela 10, na qual estão representados os valores de FICI do extrato de folhas frescas de *L. angustifolia* e antifúngicos contra *C. krusei*, que a associação do extrato com o fluconazol e a associação do extrato com a anfotericina B foram interessantes pois a IC₅₀ do extrato sozinho era de 1000 µg /mL e ao se combinar com o fluconazol passou para 15,63 µg/mL. O IC₅₀ do fluconazol também sofreu uma alteração na associação pois quando sozinho, o fluconazol apresentou IC₅₀ de 32 µg/mL e quando combinado, 16 µg/mL. Em relação ao FICI, o valor de 0,516 pode ser referente a um efeito aditivo.

Na associação com a caspofungina, a IC₅₀ do extrato sozinho e do extrato combinado com a caspofungina foi a mesma (1000 µg /mL). A IC₅₀ da caspofungina sozinha e combinada com o extrato permaneceu a mesma (0,25 µg /mL). O valor de FICI foi de 2,00, o que retrata efeito do tipo indiferente. Isso pode ser explicado devido à fórmula do FICI e à ação antifúngica apresentada pela caspofungina, pois não há diferença entre o CIM das substâncias isoladas e combinadas, portanto, não houve sinergismo.

Observa-se na tabela 11, na qual estão representados os valores de FICI do extrato de folhas frescas de *L. angustifolia* e antifúngicos contra *C. glabrata*, que a associação do extrato com o fluconazol gerou uma redução do IC₅₀ do extrato sozinho de 500 µg /mL para 250 µg /mL do extrato combinado com o fluconazol. O IC₅₀ do fluconazol sofreu uma grande alteração na associação pois quando sozinho, o fluconazol apresentou IC₅₀ de 16 µg/mL e quando combinado, 2 µg/mL. O valor de FICI foi de 0,625 podendo ser referente a um efeito aditivo.

Em relação à associação com a caspofungina, a IC₅₀ do extrato sozinho foi 0,062 µg/mL e do extrato combinado com a caspofungina foi de 0,250. O valor de FICI foi 4,282, podendo ser referente a um efeito antagônico.

Na associação com a anfotericina B, a IC₅₀ do extrato sozinho foi de 250 µg /mL e do extrato combinado com a anfotericina B passou para 15,63 µg/mL. A IC₅₀ da anfotericina B sozinha e combinada com o extrato permaneceu a mesma (0,062µg /mL). O valor de FICI foi de 1,062 podendo ser referente a um efeito indiferente.

Na busca de associações de fármacos e/ou produtos naturais com potencial para atividade sinérgicas o fluconazol se destaca dentre os medicamentos usados pois tem um amplo uso. Ele mostrou efeitos sinérgicos comprovados com diferentes tipos de compostos como Eugenol e Metileugenol (fenilpropanol), Fluoxetina (antidepressivo), Ciclosporina A (imunos

supressor) e Glabridina (isoflavona) (AHMAD; KHAN; KHAN; et al., 2010; GU et al., 2016; LIU et al., 2014; UPPULURI et al., 2008 *apud* LIMA, 2017).

O resultado da interação aditiva entre fluconazol e extrato mostrou-se interessante para as duas espécies de *Candida* testadas, porém é um resultado especialmente importante para *C. krusei*, pois a mesma possui resistência inata ao fluconazol (MATTOS, 2017). Já *C. glabrata* possui menor sensibilidade aos agentes azólicos, principalmente em pacientes com exposição prévia a esse antifúngico (COLOMBO et al., 2013).

Há a possibilidade da administração combinada do fluconazol com o extrato de folhas frescas de *L. angustifolia* ser visto como uma possibilidade terapêutica, o que poderia gerar a redução de doses e consequentemente de efeitos colaterais de fármacos convencionalmente usadas.

5.9.2 Avaliação da interação entre o extrato de folhas frescas de *L. angustifolia* e antifúngicos em biofilme

Foi realizada a avaliação da interação do extrato de folhas frescas de *L. angustifolia* com os antifúngicos fluconazol e anfotericina B contra biofilme em formação de *C. krusei* e *C. glabrata*, por meio da avaliação da atividade metabólica (ensaio do XTT).

Devido aos resultados da interação entre o extrato de folhas frescas de *L. angustifolia* em associação com a caspofungina não serem interessantes, ela não foi utilizada na realização dos testes em biofilme.

Tabela 12 - Índice de concentração inibitória fracionada (FICI) obtido a partir das associações dos valores de CIM ($\mu\text{g/mL}$) de extrato de folhas frescas de *L. angustifolia* e antifúngicos contra biofilme de *C. krusei*.

Combinação	IC ₅₀ extrato		IC ₅₀ antifúngico		Resultados	
	Sozinho	Combinado	Sozinho	Combinado	FICI	Interação
Fluconazol + Extrato	5000	1250	256	256	1,25	Indiferente
Anfotericina B + Extrato	2500	312,5	300	150	1,125	Indiferente

Nota: FICI interpretada da seguinte forma: sinérgico (<0,5), aditivo (0,5-1,0), indiferente (> 1 e > 4,0) ou antagônico (> 4,0). IC₅₀ está apresentado em $\mu\text{g/mL}$.

Fonte: Do autor.

Tabela 13 - Índice de concentração inibitória fracionada (FICI) obtido a partir das associações dos valores de CIM ($\mu\text{g/mL}$) de extrato de folhas frescas de *L. angustifolia* e antifúngicos contra biofilme de *C. glabrata*.

Combinação	IC ₅₀ extrato		IC ₅₀ antifúngico		Resultados	
	Sozinho	Combinado	Sozinho	Combinado	FICI	Interação
Fluconazol + Extrato	*	*	*	*	*	*
Anfotericina B + Extrato	5000	5000	150	75,5	0,503	Aditiva

Nota: FICI interpretada da seguinte forma: sinérgico (<0,5), aditivo (0,5-1,0), indiferente (> 1 e > 4,0) ou antagônico (> 4,0). IC₅₀ está apresentado em $\mu\text{g/mL}$.

Fonte: Do autor.

Observa-se na tabela 12, na qual estão representados os valores de FICI do extrato de folhas frescas de *L. angustifolia* e antifúngicos contra biofilme de *C. krusei*, que a associação do extrato com o fluconazol obteve resultado indiferente. A IC₅₀ do extrato sozinho era de 5000 $\mu\text{g/mL}$ e ao se combinar com o fluconazol passou para 1250 $\mu\text{g/mL}$. O IC₅₀ do fluconazol não sofreu alteração nesta associação. Em relação ao FICI, o valor de 1,25 pode ser referente a um efeito indiferente. Este resultado pode ser explicado devido à fórmula do FICI e à ação antifúngica apresentada pelo fluconazol, pois não há diferença entre o CIM da substância isolada e combinada, portanto, não ocorrendo sinergismo.

A associação do extrato com a anfotericina B obteve resultado indiferente, pois a IC₅₀ do extrato sozinho era de 2500 $\mu\text{g/mL}$ e ao se combinar com a anfotericina B passou para 312,5 $\mu\text{g/mL}$. O IC₅₀ da anfotericina B também sofreu uma alteração na associação pois quando sozinha, apresentou IC₅₀ de 300 $\mu\text{g/mL}$ e quando combinado, 150 $\mu\text{g/mL}$. Em relação ao FICI, o valor de 1,125 pode ser referente a um efeito indiferente.

Observa-se na tabela 13, na qual estão representados os valores de FICI do extrato de folhas frescas de *L. angustifolia* e antifúngicos contra biofilme de *C. glabrata*, que a associação do extrato com a anfotericina B não alterou a IC₅₀ do extrato (5000 $\mu\text{g/mL}$). O IC₅₀ da anfotericina B sofreu uma alteração na associação pois quando sozinha, apresentou IC₅₀ de 150 $\mu\text{g/mL}$ e quando combinado, 75,5 $\mu\text{g/mL}$. Em relação ao FICI, o valor de 0,503 pode ser referente a um efeito aditivo, o que corresponde a uma associação promissora e que deverá ser melhor investigada.

Pode-se perceber que a associação do extrato de folhas frescas de *L. angustifolia* com fluconazol e anfotericina B sobre o biofilme de *C. krusei* apresentou interação indiferente. Em comparação com a associação do extrato com estes antifúngicos, obteve-se interação aditiva em ambos, podendo-se observar que a interação do extrato com o fluconazol foi mais efetiva nas células planctônicas.

Já em relação à associação do extrato de folhas frescas de *L. angustifolia* com a anfotericina B sobre o biofilme de *C. glabrata* houve interação aditiva. A atividade antifúngica de anfotericina B sobre a formação do biofilme de *C. glabrata* se mostrou eficaz promovendo o impedimento do crescimento de um biofilme adequado, comparado a quando não houve adição de agentes antifúngicos. Em comparação com a associação do extrato com a anfotericina B sobre células planctônicas de *C. glabrata*, obteve-se interação indiferente. Conclui-se que a interação do extrato com a anfotericina B foi mais efetiva no biofilme.

Este resultado na interação do extrato com *C. glabrata* é interessante pois conseguiu diminuir a concentração de anfotericina B usada, podendo se tornar uma opção para atuar no biofilme em formação em diferentes ambientes e, principalmente, em centros de saúde, alimentação e ambientes industriais. Embora esse seja um bom resultado, são necessários mais estudos sobre o desenvolvimento do biofilme de espécies de *Candida* spp. e sobre os seus mecanismos de predomínio nos diversos ambientes e resistência antifúngica.

5.9 Avaliação da Concentração Fungicida Mínima dos extratos de *Lavandula angustifolia* Mill. e *Lavandula dentata* L.

Foram testadas concentrações acima do valor de IC₅₀ do extrato de folhas frescas de *L. angustifolia* e da interação entre os antifúngicos (fluconazol e caspofungina) e o extrato de folhas frescas de *L. angustifolia*.

Não houve concentração fungicida mínima em nenhuma das situações testadas (células planctônicas, biofilme e sinergismo) pois não houve total inibição do crescimento de nenhuma das espécies de *Candida* avaliadas.

6 CONCLUSÃO

Observou-se neste trabalho que na avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos por teste de difusão em ágar, todos extratos apresentaram atividade contra alguma das espécies de *Candida*. Na avaliação da CIM contra as células planctônicas de *C. krusei* e *C. glabrata*: tiveram atividade os extratos de flores frescas e folhas frescas de *L. angustifolia* e flores e folhas frescas de *L. dentata*. Os extratos das plantas secas em estufa a 60 °C não apresentaram atividade contra nenhuma das espécies de *Candida* utilizadas. E pôde-se perceber que *C. krusei* apresentou maior sensibilidade aos extratos citados acima. Nenhum extrato apresentou atividade contra *Candida albicans*.

O biofilme em formação de *C. krusei* apresentou sensibilidade a maior quantidade de extratos, quando comparado ao biofilme em formação de *C. glabrata*. Também foi possível observar que os extratos agiram limitando a formação do biofilme e não erradicando biofilmes já formados.

Em relação à citotoxicidade, o maior valor de concentração citotóxica para 50% das células (CC₅₀) foi apresentado pelo extrato de folhas frescas de *L. angustifolia*, sendo considerado o extrato mais seguro entre os analisados. A análise por CCD sugeriu a presença de saponinas e terpenos nos extratos, e a análise por CLAE sugeriu a presença de flavonoides e elagitaninos, sendo estas classes de compostos já conhecidas por sua atividade antimicrobiana.

O extrato de folhas frescas de *L. angustifolia* quando sozinho apresentou menor redução de células planctônicas de *C. krusei* e *C. glabrata* do que quando usados em interação com os antifúngicos. Para a interação com o fluconazol, obteve-se uma interação aditiva para ambas as *Candida* deste trabalho e para a interação com anfotericina B obteve-se uma interação aditiva para *C. krusei*. A interação do extrato com antifúngicos em biofilme mostrou-se indiferente para *C. krusei*, porém a interação do extrato com anfotericina B para *C. glabrata* mostrou-se aditiva, sendo interessante pois conseguiu diminuir a concentração de anfotericina B usada, podendo se tornar uma opção para combater biofilmes em formação. Os resultados que demonstraram interações aditivas mostrou-se interessante e promissor havendo a possibilidade futura da administração combinada de fluconazol com o extrato de folhas frescas de *L. angustifolia* como uma possibilidade terapêutica. Porém outros estudos ainda precisam ser feitos para a obtenção de respostas mais completas sobre o uso da *Lavandula* spp. contra *Candida* spp.

REFERÊNCIAS

- ABRÃO, F. Y. *et al.* Atividade *in vitro* de Fluconazol e Itraconazol em biofilmes de *Candida albicans*. 15 f. Trabalho de de iniciação científica do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP)- Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Goiás, Goiás.
- ADASZYŃSKA-SKWIRZYŃSKA, M.; DZIĘCIOŁ, M. Comparison of phenolic acids and flavonoids contents in various cultivars and parts of common lavender (*Lavandula angustifolia*) derived from Poland. **Natural Product Research**, United Kingdom, v. 31, n. 21, p. 2575-2580, 2017.
- AHMAD, I.; KHAN, M. S. A. Antibiofilm activity of certain phytochemicals and their synergy with fluconazole against *Candida albicans* biofilms. **J Antimicrob Chemother**. 2012.
- ALEXA E. *et al.* Phytochemical Screening and Biological Activity of *Mentha × piperita* L. and *Lavandula angustifolia* Mill. Extracts. **Analytical Cellular Pathology**. 2018.
- ALENCAR, D. S. O. Caracterização de *Candida* spp. isoladas de hemocultivo e aspectos clínicos de candidemia. 2013. 80f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Campo Grande, 2013.

ALMEIDA, A. A. *et al.* Antifungal susceptibility and distribution of *Candida* spp. isolates from the University Hospital in the municipality of Dourados, State of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 3, 2013.

ALMEIDA, E.C., MENEZES, H. Anti-inflammatory activity of propolis extracts. **J Venom Anim Toxins**, v. 8, n. 2, p. 5-8, 2002.

ALVES, I.A., BANDEIRA, L.A., MARIO, D.A.N., *et al.* Effects of antifungal agents alone and in combination against *Candida glabrata* strains susceptible or resistant to fluconazole. **Mycopathologia**, v. 174, p. 215–221. 2012.

ANIBAL, P. C *et al* (2013). Antifungal activity of the ethanolic extracts of *Punica granatum* L. and evaluation of the morphological and structural modifications of its compounds upon the cells of *Candida* spp. **Brazilian journal of microbiology** [publication of the Brazilian Society for Microbiology]. 44. 839-48. 10.1590/S1517-83822013005000060.

ARAÚJO, S. A. C. Avaliação *in vitro* da atividade citotóxica de drogas antivirais em fibroblastos caprinos. **Ciência Animal**, Ceará, v. 18, n. 1, p.25-31, 2008.

ASCACIO-VALDÉS J. *et al* (2013). Antifungal ellagitannin isolated from *Euphorbia antisiphilitica* Zucc. **Asian Pacific journal of tropical biomedicine**, v. 3, p. 41-6. 10.1016/S2221-1691(13)60021-0.

American Type Culture Collection - ATCC. Disponível em: < <https://www.atcc.org> >. Acesso em: Julho. 2019.

BAI, F. Y.; LIANG, H. Y.; JIA, J. H. Taxonomic relationships among the taxa in the *Candida guilliermondii* complex, as revealed by comparative electrophoretic karyotyping. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**. v. 50, Pt 1, p. 417-22. 2000.

BARBEDO, L. S.; SGARBI, D. B. G. Candidíase. DST - **Jornal brasileiro de doenças sexualmente transmissíveis**, v. 22, n. 1, p. 22-38, 2010.

BAYDAR H, ERBA S (2009). Effects of harvest time and drying on essential oil properties in lavandin (*lavandula × intermedia emeric* ex loisel.). **Acta Horticulturae**, 826:377-382.

BAYRAK, D., OKMEN, G., ARSLAN, A. (2017). The Biological Activities of *Lavandula stoechas* L. against Food Pathogens. **International journal of secondary metabolite**, v. 4, p. 270-279, 2017.

BERKOWITZ, J.E., COGGON, P., & SANDERSON, G. (1971). Formation of epitheaflavic acid and its transformation to thearubigins during tea fermentation. **Phytochemistry**, v. 10, p. 2271-2278, 1971.

BIASI, L. A.; DESCHAMPS, C. *Plantas Aromáticas: do cultivo à produção de óleo essencial*. Curitiba: Layer Studio Gráfico e Editora Ltda, 2009. 160 p.

- BINNS S. E., ARNASON J. T., BAUM B. R. (2002). Phytochemical variation within populations of *Echinacea angustifolia* (Asteraceae). **Biochem. Syst. Ecol**, v. 30, p. 837–854, 2002.
- BLAZEKOVIĆ, B. et al. “In Vitro Antibacterial and Antifungal Activity of *Lavandula × intermedia* Emeric ex Loisel. ‘Budrovka’.” **Molecules**, v. 16, n. 5, p. 4241–4253, 2011.
- BRAGA I. A. *et al.* Multi-Hospital Point Prevalence Study of Healthcare-Associated Infections in 28 Adult Intensive Care Units in Brazil, **Journal of Hospital Infection** (2018), doi: 10.1016/j.jhin.2018.03.003.
- BRANDOLT, T. M. *et al.* Prevalence of *Candida* spp. in cervical-vaginal samples and the in vitro susceptibility of isolates. **Braz. J. Microbiol.**, São Paulo, v. 48, n. 1, p.145-150, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2016.09.006>.
- BROWN, G. D., *et al.* (2012). Hiddenkillers: human fungal infections. **Sci.Transl.Med.** 4, 165rv13. doi:10.1126/scitranslmed.3004404.
- CANDIRACCI, CITTERIO, PIATTI (2012). Antifungal activity of the honey flavonoid extract against *Candida albicans*. **Food Chemistry**, v. 131, p. 493–499. 10.1016/j.foodchem.2011.09.012.
- CAGGIANO, G. *et al.* *Candida* Bloodstream Infections in Italy: Changing Epidemiology during 16 Years of Surveillance. **BioMed research international**, v. 2015, p. 256-580, 2015.
- CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phototherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 2, p. 179-189, 2000.
- CANDIDA GENOME. Disponível em: <<http://www.candidagenome.org/Strains.shtml>>. Acesso em: Julho. 2019.
- CAO, et al. In vitro activity of baicalein against *Candida albicans* biofilms. **Int J Antimicrob Agents**, v. 32, n. 1, p. 73-7, 2008.
- CARRADORI, S. *et al.* Antimicrobial activity, synergism and inhibition of germ tube formation by *Crocus sativus* -derived compounds against *Candida* spp. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, p. 1–5, 2016.
- CARVALHO, R.R., *et al.* Promising synergistic activity of fluconazole with bioactive Guttiferone-A and derivatives against non -albicans *Candida* species. **Journal de Mycologie Médicale**. 2018.
- CASTRO, R. D., Atividade antifúngica do óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* Blume (canela) e sua associação com antifúngicos sintéticos sobre espécies de *Candida*. Tese (Doutorado) – UFPB/CCS, Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. 2010.

CAVALHEIRO, M., TEIXEIRA, M. C. *Candida* Biofilms: Threats, Challenges, and Promising Strategies. **Front. Med.** 2018.

CHAABANE F. *et al.* Review on Antifungal Resistance Mechanisms in the Emerging Pathogen *Candida auris*. **Front Microbiol**, v. 29, n. 10, p. 2788, 2019. doi: 10.3389/fmicb.2019.02788.

CHIU, F.L.; LIN, J. HPLC Analysis of Naturally Occurring Methylated Catechins, 3'- and 4'-Methyl-epigallocatechin Gallate, in Various Fresh Tea Leaves and Commercial Teas and Their Potent Inhibitory Effects on Inducible Nitric Oxide Synthase in Macrophages. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, p. 7035-42, 2005.

CLSI. Clinical Laboratory Standards Institute. Document M27-S4. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Fourth Informational Supplement. [S.l.]: [s.n.], 2012.

CLSI. Clinical Laboratory Standards Institute. Document M27-A3 Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. [S.l.]: [s.n.], 2008.

CLSI. Clinical Laboratory Standards Institute. Document M44-A2. Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of yeasts; Approved Guideline-Second Edition, 2009.

COLEMAN DC, Rinaldi MG, Haynes KA, Rex JH, Summerbell RC, Anaissie EJ, Li A, Sullivan DJ. Importance of *Candida* species other than *Candida albicans* as opportunistic pathogens. **Med Mycol**, v. 36 (Suppl 1), p. 156-65, 1998.

COLOMBO, A. L. *et al.* *Candida glabrata*: an emerging pathogen in Brazilian tertiary care hospitals. **Medical Mycology**, v. 51, n. 1, p. 38-44, 2013.

COLOMBO, A. L. *et al.* Epidemiology of Candidemia in Brazil: a Nationwide Sentinel Surveillance of Candidemia in Eleven Medical Centers. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 8, p. 2816-2823, 2006. doi: 10.1128/JCM.00773-06.

CONTRERAS M.D.M., *et al.* Phytochemical profiling of anti-inflammatory Lavandula extracts via RP-HPLC-DAD-QTOF-MS and -MS/MS: Assessment of their qualitative and quantitative differences. **Electrophoresis**, v. 39, p. 1284-1293, 2018. Doi: 10.1002/elps.201700393. Epub 2017 Dec 29.

CORNISTEIN, W. *et al.* *Candida*: Epidemiology and risk factors for non-*albicans* species. **Enfermedades y Microbiología Clínica Infecciosas**, v. 19, n. 12, p. 322-329, 2013.

CRISAN, I. *et al.* Natural propolis extract NIV CRI SOL in the treatment of acute and chronic rhinopharyngitis in children. **Rom J Virol**, v. 46, n. 3, p. 115-33, 1995.

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

D'AURIA, F. D. D. *et al.* Antifungal activity of *Lavandula angustifolia* essential oil against *Candida albicans* yeast and mycelial form. **Medical Mycology**, v. 43, n. 5, p. 391-396, 2005.

DALLA RIVA, A. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E ANATÔMICA DE *Lavandula dentata* E *L. angustifolia* E ESTUDOS DE VIABILIDADE PRODUTIVA NA REGIÃO CENTRO NORTE, RS. 2012. 185 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo.

DAN M, Poch F, Levin D. High rate of vaginal infections caused by non-*C. albicans* species among asymptomatic women. **Med Mycol**, v. 40, n. 4, p. 383-386, 2002.

DA ROSA HS, *et al.* Ecdysteroids in *Sida tuberculata* RE Fries (Malvaceae): Chemical composition by LC–ESI-MS and selective anti- *Candida krusei* activity. **Food Chem**, v. 182, p. 193-199, 2015.

DE ALMEIDA, J. *et al.* Effects of three γ -alkylidene- γ -lactams on the formation of multispecies biofilms. **European Journal of Oral Sciences**, v. 126, n. 3, p. 214-221, 2018.

DEL PALACIO, A. *et al.* 1998; Reservas sobre la utilización de terbinafina (Lamisil) en tiñas del cuero cabelludo por *Microsporum canis*. **Act. Dermosif**, v. 89, p.317-318, 1998.

DEMASI, S. *et al.* Latitude and altitude influence secondary metabolite production in peripheral alpine populations of the mediterranean species *Lavandula angustifolia* Mill. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, n. 983, 2018.

DIAS L.B., *et al.* Vulvovaginal candidiasis in Mato Grosso, Brazil: pregnancy status, causative species and drugs tests. **Braz J Microbiol**, v. 42, p. 1300-1307, 2011.

DINIZ, A. C. B. ; ASTARITA, L. V.; SANTAREM, E. R. Alteração dos metabólitos secundários em plantas de *Hypericum perforatum* L. (Hypericaceae) submetidas à secagem e ao congelamento. **Acta Bot. Bras.**, v. 21, n. 2, p. 442-450, 2007 .

DINIZ, L. DE F. *et al.* Benznidazole and Posaconazole in Experimental Chagas Disease: Positive Interaction in Concomitant and Sequential Treatments. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 8, 2013.

DONLAN R.M., COSTERTON J.W. (2002) Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clin Microbiol Rev**, v. 15, p. 167–193

DOS SANTOS, I.D.J. *et al.* Características gerais da ação, do tratamento e da resistência fúngica ao fluconazol. **Scientia Medica**, v. 15, n 3, Porto Alegre: PUCRS, 2005.

DOUGLAS, L. J. *Candida* biofilms and their role in infection. **Trends Microbiol**, v. 11, p.30-36. Trends in microbiology. 11. 30-6. 10.1016/S0966-842X(02)00002-1.

- DUARTE, M. C. T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **Multiciência**, Campinas, v. 7, out. 2006. Disponível em: < http://www.multiciencia.unicamp.br/artigos_07/a_05_7.pdf>. Acesso em: 16 de julho. 2018.
- DUDAREVA, N.; KLEMPIEN, A.; MUHLEMANN, J. K.; KAPLAN, I. Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. **New Phytol**, v. 198, p. 16–32, 2013.
- EGGIMANN P., Garbino J., Pittet D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. **Lancet Infect Dis**, v. 3, p. 685-702, 2003.
- ELEMIKE E. E. *et al.* Biosynthesis, characterization, and antimicrobial effect of silver nanoparticles obtained using *Lavandula × intermedia*. **Research on Chemical Intermediates**. 2016.
- EUCAST. E.DEF 7.3.1 EUCAST antifungal MIC method for yeasts. v. 7.3.1, p. 1–21, 2016.
- EUCAST. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Antifungal Agents Breakpoint tables for interpretation of MICs. v. 9.0. 2018.
- ERGÜN, N. *et al.* “The Antibacterial Activities of *Lavandula stoechas* and *Crepis sancta* Leaf and Flower Against Mastitis Pathogens and Enzymatic and Non-Enzymatic Antioxidant Activities of The Extracts.” **Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology**, v. 6, n. 5, p. 543-549, 2018.
- FARMACOPEIA BRASILEIRA. 6. ed, v. 1. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA, 2019.
- FELDMAN, M. *et al.* Therapeutic potential of thiazolidinedione-8 as an antibiofilm agent against *Candida albicans*. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, p. 2–9, 2014.
- FRANCO, J. *et al.* Composição química e atividade antimicrobiana *in vitro* do óleo essencial de *Eucalyptus cinerea* F. Mull. ex Benth., Myrtaceae, extraído em diferentes intervalos de tempo. **Rev. Bras. Farmacognosia**, v. 15, n. 3, p.191-194, 2005.
- GALLEGO, M. G. *et al.* Antioxidant properties of three aromatic herbs (rosemary, thyme and lavender) in oil-in-water emulsions. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 90, n.10, p.1559–68, 2013. Doi:10.1007/s11746-013-2303-3.
- GIRARDOT M, GUERINEAU A, BOUDEUSOCQUE L, *et al.* Promising results of cranberry in the prevention of oral *Candida* biofilms. **Pathog Dis**, v. 70, n. 3, 432-439, 2014.
- GNATTA, J. R.; DORNELLAS, E. V.; SILVA, M. J. P. da. O uso da aromaterapia no alívio da ansiedade. **Acta Paulista de Enfermagem**, São Paulo, v. 24, n. 2, p. 257-63, 2011.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P.; **Quim. Nova**, v. 30, p. 374, 2007.

GUNTHER L. S. A., *et al.* Prevalence of *Candida albicans* and non-*albicans* isolates from vaginal secretions: comparative evaluation of colonization, vaginal candidiasis and recurrent vaginal candidiasis in diabetic and non-diabetic women. **São Paulo Med J.** v. 132, n. 2, p.116-120, 2014.

HA, J. F. *et al.* Candidemia and invasive candidiasis: A review of the literature for the burns surgeon. **Burns**, v. 37, n. 2, p. 181-195, 2011.

HANAMANTHAGOUDA, M. S.; KAKKALAMELI, S. B.; NAIK, P. M.; NAGELLA, P.; SEETHARAMAREDDY, H. R.; MURTHY, H. N. Essential oils of *Lavandula bipinnata* and their antimicrobial activities. **Food Chemistry**, v. 118, p. 836-839, 2010.

HOLANDA, A. A. R. *et al.* Candidíase vulvovaginal: sintomatologia, fatores de risco e colonização anal concomitante. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 1, p. 3-9, 2007 .

HOLOPAINEN J. K., *et al.* Ecological functions of terpenoids in changing climates, in Natural Products eds Ramawat K. G., Mérillon J.-M., editors. (Berlin: Springer;), 2913–2940, 2013.

JEBALI, A. *et al.* Triangular gold nanoparticles conjugated with peptide ligands: A new class of inhibitor for *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase. **Biochemical Pharmacology**, v. 90, n. 4, p. 349–355, 2014.

JEFREY H.; HARBORNE, F.R.S.; BAXTER H. The Handbook of Natural Flavonoids. 18 de jun. de 1999 - 1800 pag.

JUSTUS, B. MORFOANATOMIA FOLIAR E CAULINAR, ANÁLISE QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO ÓLEO VOLÁTIL DE *Lavandula dentata* L., LAMIACEAE. 2016. 96 f. Dissertação (Mestrado em Farmacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia) - UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA, Ponta Grossa, 2016.

KABIR, M. A.; AHMAD, Z. “*Candida* Infections and Their Prevention,” **ISRN Preventive Medicine**, vol. 2013, Article ID 763628, 13 pages, 2013. <https://doi.org/10.5402/2013/763628>.

KAJDZANOSKA, M.; GJAMOVSKI, V.; STEFOVA, M. (2010). HPLC-DAD-ESI-MSn identification of phenolic compounds in cultivated strawberries from Macedonia. **Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering.** 29.

KADOSH, D. Shaping Up for Battle: Morphological Control Mechanisms in Human Fungal Pathogens. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 12, p. e1003795. 2013. Doi: 10.1371/journal.ppat.1003795.

KARA N, BAYDAR H. Determination of lavender and lavandin cultivars (*Lavandula* sp.) containing high quality essential oil in Isparta, Turkey. **Turk J Field Crops**, v. 18, p. 58–65, 2013.

KIM N. S.; LEE, S. D. Comparison of different extraction methods for the analysis of fragrances from *Lavandula* species by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 982, p. 31-47, 2002.

KIM, Y. S. *et al.* Quantitative and qualitative analysis of the antifungal activity of allicin alone and in combination with antifungal drugs. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, p. 1–8, 2012.

KLEIN G, *et al.* Antidiabetes and anti-obesity activity of *Lagerstroemia speciosa*. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 4, p. 401-407, 2007.

KLEYMANN, G.; WERLING, H.O.A. Generally applicable, high-throughput screening compatible assay to identify, evaluate, and optimize – Antimicrobial agents for drug therapy. **J Biomol Screen**, v. 9, p. 578-587, 2004.

KUHN, D. M. *et al.* Antifungal Susceptibility of *Candida* Biofilms: Unique Efficacy of Amphotericin B Lipid Formulations and Echinocandins. **Antimicrobial agents and Chemotherapy**, p. 1773–1780, 2002.

LACAILLE-DUBOIS M.A., WAGNER H. A review of the biological and pharmacological activities of saponins. **Phytomedicine**, v. 2, p. 363-386, 1996.

LI, L.; REDDING, S.; DONGARI-BAGTZOGLOU, A. *Candida glabrata*, an emerging oral opportunistic pathogen. **J Dent Res**, v. 86, p. 2014-2015, 2007.

LIMA, C. M. P. Análise de expressão dos genes SAP9 e SAP10, de aspectos bioquímico e ultraestrutural em linhagem padrão de *Candida albicans*, em estado planctônico e biofilme, antes e após a associação de Fluconazol e Guttiferona A. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas – Universidade Federal de Alfenas. 2017.

LIU, W. *et al.* Synergistic Antifungal Effect of Glabridin and Fluconazole. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, p. e103442, 2014.

LOPES, G. *et al.* Antifungal Activity of Phlorotannins against Dermatophytes and Yeasts: Approaches to the Mechanism of Action and Influence on *Candida albicans* Virulence Factor. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, 2013.

LORETO F., *et al.* Plant volatiles and the environment. **Plant. Cell Environ**, v. 37, p. 1905–1908, 2014.

LYRIO, N. N. Avaliação da atividade antimicrobiana e do poder surfactante das saponinas do juá (*Ziziphus joazeiro*) modificadas enzimaticamente. Dissertação (Mestrado), Instituto de Química - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2016. Disponível em: <https://ppgcal.iq.ufrj.br/wp-content/uploads/2017/06/Natalia_Lyrio_DISSERTACAO.pdf>. Acesso em 20 de junho de 2019.

MANTOVANI, A.L.L. *et al.* Chemical composition, antischistosomal and cytotoxic effects of the essential oil of *Lavandula angustifolia* grown in Southeastern Brazil. **Rev. Bras. Farmacogn**, v. 23, n. 6, p. 877-884, 2013.

MARANHÃO, F. C. A. *et al.* Mycoses in northeastern Brazil: epidemiology and prevalence of fungal species in 8 years of retrospective analysis in Alagoas. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 50. 10.1007/s42770-019-00096-0, 2019.

MARCOS-ZAMBRANO *et al.* *Candida guilliermondii* complex is characterized by high antifungal resistance but low mortality: a report on 22 cases of candidemia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 61. AAC.00099-17. 10.1128/AAC.00099-17, 2017.

MARDH P.A., Rodrigues A.G., Genc M, Novikova N., Martinez-de-Oliveira J., Guaschino S. Facts and myths on recurrent vulvovaginal candidosis-a review on epidemiology, clinical manifestations, diagnosis, pathogenesis and therapy. **Int J STD AIDS**, v. 13, n. 8, p. 522-539, 2002.

MARRA, A. R. *et al.* Nosocomial Bloodstream Infections in Brazilian Hospitals: Analysis of 2,563 Cases from a Prospective Nationwide Surveillance Study. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 5, p. 1866-1871, 2011. Doi:10.1128/JCM.00376-11.

MARTINEZ-IRUJO J, Villahermosa M, Alberdi E, *et al.* A checkerboard method to evaluate interactions between drugs. **Biochem Pharmacol**, v. 51, p. 635-44, 1996.

MASETTO, M. A. M. *Ácido giberélico e extrato de alga marinha na produtividade e composição do óleo essencial de Lavanda (Lavandula dentata L.)*. 2009. 96 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Área de produção Vegetal) – Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo do Setor de Ciências Agrárias, Universidade federal do Paraná, Curitiba, 2009.

MASETTO, M.A.M. *et al.* Teor e composição do óleo essencial de inflorescências e folhas de *Lavandula dentata* L. em diferentes estádios de desenvolvimento floral e épocas de colheita. **Rev. Bras. Plantas Med.**, v. 13, n. 4, p. 413-421, 2011.

MATHÉ, L.; DIJCK, P. VAN. Recent insights into *Candida albicans* biofilm resistance mechanisms. **Current Genetics**, v. 59, n. 4, p. 251–264, 2013.

MATSUZAKI K. *et al.* (2010). New benzophenone and quercetin galloyl glycosides from *Psidium guajava* L. **Journal of natural medicines**. 64. 252-6. 10.1007/s11418-010-0400-2.

MATTOS, K. *et al.* Variability in the clinical distributions of *Candida* species and the emergence of azole-resistant non-*Candida albicans* species in public hospitals in the Midwest region of Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 6, p. 843-847, 2017.

MAZZANTI, G. Antifungal activity of *Lavandula angustifolia* essential oil against *Candida albicans* yeast and mycelial form. **Medical Mycology**, v. 43, 391-396, 2005.

MAZZETI A.L, DINIZ, L.F.; GONÇALVES, K.R.; WONDOLLINGER, R.S.; ASSÍRIA, T.; RIBEIRO, I, Synergic Effect of Allopurinol in Combination with Nitroheterocyclic Compounds against *Trypanosoma cruzi*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 63, n. 6, p. 24, 2019.

McNAUGHTON, V. Lavender: the grower's guide. Portland (USA): Timber Press, 192 p., 2006.

MELECCHI, M. I. S. Caracterização química de extratos de *Hibiscus tiliaceus*: estudo comparativo de métodos de extração. Dissertação (Doutorado), Instituto de Química - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2005.

MELO, A. S. *et al.* Biofilm production and evaluation of antifungal susceptibility amongst clinical *Candida* spp. isolates, including strains of the *Candida* parapsilosis complex. **Medical mycology**, v. 49, p. 253–262, 2011.

MELO, E. C.; RADÜNZ, L. L.; MELO, R. C. A. Influência do processo de secagem na qualidade de plantas medicinais – revisão. **Engenharia na Agricultura**, v. 12, n. 4, p. 307-315, 2004.

MENDES, J. M. Investigação da Atividade Antifúngica do Óleo Essencial de *Eugenia caryophyllata Thunb.* sobre cepas de *Candida Tropicalis*. 2011. 74f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciência da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2011.

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

MOLINA, F. P. *et al.* Própolis, sálvia, calêndula e mamona – atividade antifúngica de extratos naturais sobre cepas de *Candida albicans*. **Cien. Odontol. Bras.**, v. 11, n. 2, p. 86-93, 2008.

MONTEIRO, J.M.; ALBUQUERQUE, U. O.; ARAÚJO, E.L. Taninos: uma abordagem da química a ecologia. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 892-896, 2005.

MOTTA, A. L. Análise da Prevalência e Perfil de suscetibilidade das Espécies de *Candida* isoladas de hemoculturas. 2009. Dissertação Mestrado (Fisiopatologia experimental)- Faculdade de Medicina, USP, São Paulo, 2009.

MUKHERJEE, P. K., *et al.* Combination treatment of invasive fungal infections. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 18, p. 163–194, 2005. Doi: 10.1128/CMR.18.1.163-194.

MUKHERJEE, P. K. *et al.* (2005). *Candida* biofilm: A well-designed protected environment. *Medical mycology: official publication of the International Society for Human and Animal Mycology*. 43. 191-208. 10.1080/13693780500107554.

MUÑOZ-BERTOMEU, J.; ARRILLAGA, I.; SEGURA, J. Essential oil variation within and among natural populations of *Lavandula latifolia* and its relation to their ecological areas. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, p. 479-88, 2007.

NEUWIRTH, A.; CHAVES, A. L. R.; BETTEGA, J. M. R. *Propriedades dos óleos essenciais de cipreste, lavanda e hortelã-pimenta*. Disponível em: <[http://Siaibib01.univali.br/pdf/Amanda Neuwirth e Ana Chaves.pdf](http://Siaibib01.univali.br/pdf/Amanda%20Neuwirth%20e%20Ana%20Chaves.pdf)>. Acesso em: 16 jun. 2018.

NEWMAN, D. J, CRAGG, G. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**. 79. 10.1021/acs.jnatprod.5b01055, 2016.

NEWMAN, D. J., CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **J. Nat. Prod.** 75, 311–335, 2012. Doi: 10.1021/np200906s

NOBILE, C.J., JOHNSON, A.D. *Candida albicans* Biofilms and Human Disease. **Annu Rev Microbiol**, v. 69, p. 71–92, 2015. Doi: 10.1146/annurev-micro-091014-104330

NOBRE, M. O. *et al.* Antifungal drugs for small and large animals. **Ciência Rural**, v.32, n.1, p.175-184, 2002.

NUNES, R., PASKO, P.; TYSZKA-CZOCHARA, M.; SZEWCZYK, A.; SZLOSARCZYK, M., CARVALHO, I.S. Antibacterial, antioxidant and anti-proliferative properties and zinc content of five south Portugal herbs. **Pharmaceutical Biology**, v. 55, n. 1, p. 114-123, 2017.

ODDS, F. C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 1, p. 1, 2003.

ODDS, F. C.; BROWN, A. J. P.; GOW, N. A. R. *Candida albicans* genome sequence: a platform for genomics in the absence of genetics. **Genome biology**, v. 5, n. 7, p. 230, 2004.

O LAVANDÁRIO. Disponível em: <<https://lavandario.com.br/o-lavandario/>>. Acesso em: Junho. 2018.

OLIVEIRA, F. de.; AKISSUE, G. *Fundamentos em farmacobotânica*. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2000. 178 p.

OLIVEIRA, J. D. *et al.* Rendimento, composição química e atividades antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial de folhas de *Campomanesia adamantium* submetidas a diferentes métodos de secagem. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Campinas**, v. 18, n. 2, p. 502-510, 2016.

ONSARE J. G., ARORA, D. S. Antibiofilm potential of flavonoids extracted from *Moringa oleifera* seed coat against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*. **Journal of Applied Microbiology**. 118. 10.1111/jam.12701, 2014.

OSTROSKY, E. A. *et al.* Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

PAPPAS *et al.*, Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. **IDSA Guidelines**. 2016.

PASQUALOTTO, A. C. Epidemiologia das infecções por *Candida* spp. na corrente sanguínea: coorte retrospectiva em hospital terciário brasileiro. 2004. 144f. Tese (Doutorado), Programa de Pós-Graduação em Pneumologia – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

PERLIN, D. S; “Current perspectives on echinocandin class drugs,” **Future Microbiology**, v. 6, n. 4, p. 441–457, 2011.

PFALLER, M. A. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. **The American Journal of Medicine**, v. 125, n. 1, p. S3–S13. 2012.

PIPPI, *et al.* *In vitro* evaluation of the acquisition of resistance, antifungal activity and synergism of Brazilian red propolis with antifungal drugs on *Candida* spp. **J Appl Microbiol.**, v. 118, n. 4, p. 839-50, 2015. Doi: 10.1111/jam.12746.

PIRES, R. H. Formação de biofilmes e resistência a antifúngicos e biocidas em *Candida parapsilosis* e *C. orthopsilosis* isoladas de águas usadas para hemodiálise. 2010. 172 f.

PLAZONIC, A. *et al.* Identification and Quantification of Flavonoids and Phenolic Acids in Burr Parsley (*Caucalis platycarpos* L.), Using High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection and Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Molecules* (Basel, Switzerland). 14. 2466-90. 10.3390/molecules14072466. 2009.

PORTILLO A., Vila R., Freixa B., Adzet T., Cañigüeral S. Antifungal activity of Paraguayan plants used in traditional medicine, **J. of Ethnopharmacology**, v. 76, p. 93-98, 2001.

PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R. M. R. Tecnologia Farmacêutica. 6 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, v. 2, 2008.

PRUSINOWSKA R., SMIGIELSKI K. B. (2014). Composition, biological properties and therapeutic effects of lavender (*Lavandula angustifolia* L). A review. **Herba Pol**, v. 60, p. 56–66, 2014.

RADALESCU C., *et al.* Characterization of Phenolics in *Lavandula angustifolia*. **Analytical Letters.**, v. 50, n. 17, p. 2839-2850, 2017.

RAMAGE, G. *et al.* *Candida* Biofilms: an Update. **Eukaryotic Cell**, v. 4, n. 4, p. 633-638, 2005. Doi:10.1128/EC.4.4.633-638.2005.

RAMAGE, G. *et al.* Standardized method for *in vitro* antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms, **Antimicrob Agents Chemother**, v. 45, p. 2475-2479, 2001.

RAMAGE G, WILLIAMS C. The clinical importance of fungal biofilms. **Adv Appl Microbiol**, v. 84, p. 27–83, 2013.

RAUT JS, *et al.* Terpenoids of plant origin inhibit morphogenesis, adhesion, and biofilm formation by *Candida albicans*. **Biofouling**, v. 29, n. 1, p. 87-96, 2013.

RAUT, J., KARUPPAYIL, S. M. Phytochemicals as Inhibitors of *Candida* Biofilm. *Current pharmaceutical design*. 22. 10.2174/1381612822666160601104721. 2016.

RAUTEMAA, R., and RAMAGE, G. Oral candidosis—clinical challenges of a biofilm disease. **Crit. Rev. Microbiol**, v. 37, p. 328–336, 2011.

RIBEIRO, A. C. Pesquisa de bioativos e avaliação da atividade antimicrobiana de extratos hidroetanólicos de *Cola acuminata*. 2017. 51 f. Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicada à Saúde) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2017.

RIBEIRO, G. E. Triagem fitoquímica, atividade antimicrobiana, antioxidante e citotoxicidade de extratos hidroetanólicos de *Euphorbia cotinifolia* (Leiteiro vermelho). 2014. 64 f. Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicada à Saúde) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2014.

ROBU, S, Miron, A, Cioanka O, Stanescu U, Hancianu M. *In vitro* antioxidant activity of ethanolic extracts from some *Lavandula* species cultivated in Romania. **Farmacia**, v. 60, p. 394–401, 2012.

RIBEIRO, L. R. *et al.* Aspectos das leveduras de *Candida* vinculadas as infecções nosocomiais. **News Lab**. Edição 64. 2004.

SALES, H.J.S.P. *Lavandula L.* - aplicação da cultura *in vitro* à produção de óleos essenciais e seu potencial económico em Portugal. **Rev. Bras. Plantas Med.**, v. 17, n. 4, p. 992-999, 2015.

SANGLARD, D. Emerging threats in antifungal-resistant fungal pathogens. **Front. Med**, v. 3, p. 11, 2016. Doi: 10.3389/fmed.2016.00011.

SANTOS, G. C. O. *et al.* *Candida* Infections and Therapeutic Strategies: Mechanisms of Action for Traditional and Alternative Agents. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1351, 2018.

SANTOS, T. A. Avaliação de diferentes métodos e solventes de extração sobre a composição fenólica e centesimal, atividade antimicrobiana e citotóxica de extratos dos frutos da *Momordica charantia L.* Universidade Federal de Sergipe. 2018.

- SARDI, J. C. O. *et al.*, A Mini Review of *Candida* Species in Hospital Infection: Epidemiology, Virulence Factor and Drugs Resistance and Prophylaxis. **Trop Med Surg**, v. 1, n. 5, p. 1000141, 2013.
- SCHELZ Z., MOLNAR J., HOHMANN J. Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils. **Fitoterapia**, v. 77, p. 279-85, 2006.
- SELMAR D., KLEINWÄCHTER M. (2013). Influencing the product quality by deliberately applying drought stress during the cultivation of medicinal plants. **Ind. Crops Prod.**, v. 42, p. 558–566, 2013.
- SENEVIRATNE, C. J. *et al.* Cell density and cell aging as factors modulating antifungal resistance of *Candida albicans* biofilms. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 52, n. 9, p. 3259–3266, 2008.
- SHAO, P. L.; HUANG, L. M.; HSUEH, P. R. Recent advances and challenges in the treatment of invasive fungal infections. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 30, p. 487-495, 2007.
- SILVA, M. J. A. Formação de biofilme de *candida albicans* na superfície de uma resina acrílica termopolimerizável tratada com polimento químico. 2012. Dissertação de Mestrado- Faculdade de Odontologia de Bauru, USP, Bauru, 2012.
- SILVA, N. C.; NERY, J. M.; DIAS, A. L. T. Aspartic proteinases of *Candida* spp.: role in pathogenicity and antifungal resistance. **Mycoses**, v. 57, p. 1-11, 2014.
- SILVA, V.V. *et al.* Vigilancia de la resistencia de levaduras a antifúngicos. **Revista Chilena de Infectología**, v. 19, supl.2, 2002.
- SILVEIRA, F. 1997. *Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais*. Curitiba, 26p. Monografia (Especialização em Ciências Farmacêuticas – Produtos Naturais), Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.
- SILVEIRA, S. M. *et al.* Composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Cymbopogon winterianus* (citronela), *Eucalyptus paniculata* (eucalipto) e *Lavandula angustifolia* (lavanda). **Rev. Inst. Adolfo Lutz (Impr.)**, v. 71, n. 3, 2012.
- SIMÕES, C. M. O. *et al.* Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6. ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2010.
- SPELLBERG, B. J.; FILLER, S. G.; EDWARDS JR, J. E. Current Treatment Strategies for Disseminated Candidiasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 42, n. 2, p. 244-251, 2006.
- SPIRIDON, I. *et al.* “Antioxidant capacity and total phenolic contents of oregano (*Origanum vulgare*), lavender (*Lavandula angustifolia*) and lemon balm (*Melissa officinalis*) from Romania,” **Natural Product Research**, v. 25, n. 17, p. 1657–1661, 2011.

- SVETAZ L.A., POSTIGO A., BUTASSI E., *et al.* Antifungal drugs combinations: a patent review 2000–2015. **Expert Opin Ther Pat**, v. 26, p. 439–53, 2016.
- TAVANTI, A.; DAVIDSON, A. D.; GOW, N. A. R.; MAIDEN, M. C. J.; ODDS, F. C. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. To Replace *Candida parapsilosis* Groups II and III. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 284-292, 2005.
- TIWARI, P. *et al.* Phytochemical screening and Extraction: A Review. **International e Pharmaceutica Scientia**, v.1, n.1, p.98-106, 2011.
- THOMPSON, D. S.; CARLISLE, P. L.; KADOSH, D. Coevolution of Morphology and Virulence in *Candida* Species. **Eukaryotic Cell**, v. 10, n. 9, p. 1173-1182, 2011. Doi:10.1128/EC.05085-11.
- TOREY, A and SASIDHARAN, S. Anti-*Candida albicans* biofilm activity by *Cassia spectabilis* standardized methanol extract: An ultrastructural study. **European review for medical and pharmacological sciences**. 2011.
- TURGUT A.C. *et al.* Chemical Characterization of *Lavandula angustifolia* Mill. as a Phytocosmetic Species and Investigation of its Antimicrobial Effect in Cosmetic Products Aslihan. **JOTCSA**, v. 4, n. 1, p. 283-298, 2017.
- UEDA-YAMAGUCHI M, *et al.* Antifungal effects of ellagitannins isolated of *Ocotea odorífera* (Lauraceae). **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 99, n.3, p. 507-514, 2011.
- UPADHYAY A, *et al.* Combating pathogenic microorganisms using plant-derived antimicrobials: A minireview of the mechanistic basis. **BioMed Res Int**, 2014 Doi:10.1155/2014/761741.
- UPPULURI P., *et al.* Dispersion as an important step in the *Candida albicans* biofilm developmental cycle. **PLoS Pathog**, v. 6, p. e1000828, 2010.
- UPSON, T. M.; GRAYER, R. J.; GREENHAM, J. R.; WILLIAMS, C. A.; AL-GHAMDI, F.; CHEN, F. Leaf flavonoids as systematic characters in the genera *Lavandula* and *Sabaudia*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 28, p. 991-1007, 2000.
- URWIN, N.A.R.; MAILER, J. Oil Content and fatty acid profiles of seed oil from the genus *Lavandula*. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.85, p.491-492, 2008.
- VASILEVA, I. *et al.* Effect of lavender (*Lavandula angustifolia*) and melissa (*Melissa Officinalis*) waste on quality and shelf life of bread. **Food Chemistry**, v. 253, s. n., p. 13-21, 2018.
- VEIGA JR., V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL; M.A.M, Plantas Mediciniais, Cura Segura? **Quimica Nova**, v.28, n. 3, p. 519-528, 2005.

WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKY, E.M. *Plant drug analysis – A thin layer chromatography atlas*, London: Springer, 2009, 384 p.

WHITE, T. C.; AGABIAN, N. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases: isoenzyme pattern is determined by cell type, and levels are determined by environmental factors. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 18, p. 5215–21, 1995.

WHITE, T. C.; MARR, K. A.; BOWDEN, R. A. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v.11, n.2, p.382-402, 1998.

WHITEWAY, M; OBERHOLZER, U. *Candida* morphogenesis and host–pathogen interactions. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 350–357, 2004.

WILLIAMS C., RAMAGE G. Fungal Biofilms in Human Disease. In: Donelli G. (eds) Biofilm-based Healthcare-associated Infections. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 831. Springer, Cham. 2015.

WYNN, R. L.; JABRA-RIZK, M. A.; MEILLER, T. F. Fungal drug resistance, biofilms, and new antifungals. **Gen Dent**, v. 51, p. 94–98, 2003.

XIE C, SUN L, MENG L, et al. Sesquiterpenes from *Carpesium macrocephalum* inhibit *Candida albicans* biofilm formation and dimorphism. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 25, n. 22, p. 5409-11, 2015.

YAP, P. S. X.; KRISHNAN, T.; YIAP, B. C.; HU, C. P.; CHAN, K. G.; LIM, S. H. E. Membrane disruption and anti-*quorum* sensing effects of synergistic interaction between *Lavandula angustifolia* (lavender oil) in combination with antibiotic against plasmid-conferred multi-drug-resistant *Escherichia coli*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 116, p. 1119-1128, 2014.

YAPAR, N. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 10, n. 1, p. 95, 2014.

YOUSIF, A.; JAMAL, M. A.; RAAD, I. Biofilm-Based Central Line-Associated Bloodstream Infections. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 830, s.n, 2015, p. 157–179, 2015.

ZAGO, J. A. A.; USHIMARU, P. I.; BARBOSA, L.N.; FERNANDES JÚNIOR, A. Sinergismo entre óleos essenciais e drogas antimicrobianas sobre linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n.4, p 828-833, 2009.

ZAHRA, T. N., et al. Comparative Studies of Cytotoxic and Apoptotic Properties of Different Extracts and the Essential Oil of *Lavandula angustifolia* on Malignant and Normal Cells, **Nutrition and Cancer**, v. 66, n. 3, p. 424-434. 2014.



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Certidão

Cadastro nº A049D79

Declaramos, nos termos do art. 41 do Decreto nº 8.772/2016, que o cadastro de acesso ao patrimônio genético ou conhecimento tradicional associado, abaixo identificado e resumido, no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado foi submetido ao procedimento administrativo de verificação e não foi objeto de requerimentos admitidos de verificação de indícios de irregularidades ou, caso tenha sido, o requerimento de verificação não foi acatado pelo CGen.

Número do cadastro: **A049D79**
Usuário: **UNIFAL-MG**
CPF/CNPJ: **17.879.859/0001-15**
Objeto do Acesso: **Conhecimento Tradicional Associado**
Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

Espécie

Lavandula angustifolia Mill. e Lavandula dentata L

Fonte do CTA

CTA de origem não identificável

Título da Atividade: **AVALIAÇÃO DE Lavandula angustifolia Mill. E Lavandula dentata L. SOBRE CÉLULAS PLANCTÔNICAS E BIOFILMES DE Candida albicans E ESPÉCIES NÃO-albicans DE Candida spp.**

Equipe

Marcelo Aparecido da Silva	UNIFAL-MG
Amanda Latercia Tranches Dias	UNIFAL-MG
Laís Stempniewski Nascimento	UNIFAL-MG
Tamires Rodrigues Ribeiro Roberto	UNIFAL-MG
Geraldo Alves da Silva	UNIFAL-MG
Renan Gomes Bastos	UNIFAL-MG

Data do Cadastro: **22/10/2018 09:04:26**

Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **14:44** de **06/12/2019**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - **SISGEN**