

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

PRISCILA RAQUEL NOGUEIRA VIEIRA

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE ESPÉCIES DE
Ocimum FRENTE A CEPAS DE *Candida* SPP. E *Microsporum canis*

FORTALEZA
2009

PRISCILA RAQUEL NOGUEIRA VIEIRA

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE ESPÉCIES DE
Ocimum FRENTE A CEPAS DE *Candida* SPP. E *Microsporum canis*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal.

Linha de Pesquisa: Reprodução e sanidade de carnívoros, onívoros, herbívoros e aves.

Orientador: Prof^ª. Dra. Selene Maia de Moraes

Fortaleza
2009

PRISCILA RAQUEL NOGUEIRA VIEIRA

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE ESPÉCIES DE
Ocimum FRENTE A CEPAS DE *Candida* SPP. E *Microsporum canis*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

Aprovada em: 29/07/2009

Banca Examinadora

Prof^a. Dra. Selene Maia de Moraes
Orientadora – UECE

Dra. Raquel Oliveira dos Santos Fontenelle
Examinadora – UFC

Dra. Érika Helena Sales de Brito
Examinadora

**À Deus, porque dele vem minha força para sempre vencer.
Aos meus pais Vieira e Edvanila, as minhas irmãs
Patrícia e Perla e ao meu noivo Angelo, razão dos
meus esforços e da minha vontade de vencer,**

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus toda a honra deste trabalho, porque sem Ele nada seria feito.

Ao meu pai, Francisco Lucemir Vieira, pelo esforço de toda uma vida para me fazer chegar até aqui. A minha mãe, Maria Edvanila Nogueira Diógenes Vieira, pela dedicação incondicional, a minha irmã Patricia Raquel Nogueira Vieira e, especialmente, a Perla Raquel Nogueira Vieira, pois além de irmã, é amiga, companheira, ajudante e merece a coautoria deste trabalho.

Ao meu noivo, Angelo Antonio Sousa Moreira, pelo amor, cuidado e paciência.

As minhas primas-irmãs Andreza Kelly Souza Vieira e Cyntia Nogueira Bandeira, pelo amor e amizade e por estarem sempre prontas a me ajudar.

À minha orientadora, Selene Maia de Moraes, por não me deixar desistir, pela mente sempre cheia de idéias, por estar sempre de bom humor, enfim, pela mãe que ela é para mim.

Ao meu braço direito, amigo e companheiro Francisco Halley's de Queiroz Bezerra, pelo apoio, força, paciência e por não me deixar trabalhar sozinha, excedendo sempre sua carga horária. Você foi mais que um IC.

A Patrícia Maria Diniz Dias, que pela sua compaixão nos ajudou em muitos experimentos sem nenhuma obrigação.

Aos alunos do Laboratório de Produtos Naturais (LPN) da UECE, Nadja Soares Vila Nova, Davi Varela Magalhães, Micheline Soares Costa Oliveira, Cristiane, Denis, Christiana Duarte, Caroline Costa Barros, Denise Ramos Moreira, Lyeghyna Karla de Andrade Machado, Nayara Rodrigues da Cunha, Agena Câmara de Paula, Léo Eduardo de Lima Moreira, Leonardo Silva Sousa, Igor Rafael Sousa Costa, Naiara Dutra Barroso, Francisco Edson do Nascimento Lima, Maria Noely Marcelino de Sousa, Lucas Barbosa Cavalcante e Francinildo de Sousa Lima Alves pela grande ajuda e pelos dias felizes que passamos.

Ao Prof. Dr. Rui Carlos Barros e aos alunos do Laboratório de eletroquímica e corrosão microbiana (LECOM) da UECE pelo espaço cedido e pela boa vontade em ajudar.

À Profa. Dra. Maria Goretti V. Silva do Laboratório de Produtos Naturais da UFC, por me ceder os óleos essenciais, e a todos os alunos do LPN – UFC, em especial a Írville Ricarte, por serem sempre tão gentis.

À Profa. Dra. Maria Isabel Florindo Guedes e aos alunos Isaque Neto Goes da Silva e Maria Gardenny Ribeiro Pimenta do Laboratório de Bioquímica Humana da UECE, pelo apoio dado nos momentos iniciais desta pesquisa.

Aos amigos que fiz durante o curso, Liliane Moreira Silva, Luciana Faustino, Giovanna Quintino Rodrigues, Camila Virgínio, Débora Castelo Branco, pela ajuda que me deram durante as disciplinas e pela excelente companhia.

Aos meus amigos João Jaime Giffoni Leite, Érika Helena Sales de Brito, Ana Karoline Freire da Costa e Raquel Oliveira dos Santos Fontenelle por serem pessoas com quem eu posso contar nos bons e maus momentos.

À Universidade Estadual do Ceará, através do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, pela oportunidade de realização desse curso.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela concessão da bolsa de estudos.

A todos que contribuíram para a concretização desta dissertação.

*“ A fé só abre os mares quando o momento chegar;
A fé se manifesta quando o limite da força acabar;
A fé tem seus segredos, não se revela ao que tem medo;
Mas, ao que luta até o momento da fé chegar”.*

Sérgio Lopes

RESUMO

Devido à grande incidência das infecções causadas por fungos e a resistência desses microrganismos aos antifúngicos, cresce a importância dos estudos de bioprospecção de produtos naturais com propriedades antimicrobianas e potencial fitoterápico. O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial antifúngico dos óleos essenciais de espécies brasileiras do gênero *Ocimum*. Os óleos essenciais das folhas de *Ocimum americanum*, *O. basilicum* var. *purpurascens*, *O. basilicum* var. *minimum*, , *O. micranthum* e *O. selloi* foram obtidos por arraste a vapor e sua composição química determinada através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa. A atividade antifúngica dos óleos essenciais foi avaliada frente à cepas de *Microsporum canis*, *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. krusei* pelo método de microdiluição em caldo. A análise química mostrou que os principais componentes foram (Z)-metil cinamato e 1,8-cineol para *O. americanum*, linalol e α -muurulol para *O. basilicum* var. *purpurascens*, estragol e linalol para *O. basilicum* var. *minimum*, eugenol e e-cariofileno para *O. micranthum* e linalol e 1,8-cineol para *O. selloi*. A avaliação da atividade antifúngica mostrou que o óleo essencial de *O. basilicum* var. *minimum* apresentou atividade antifúngica apenas contra as cepas de *M. canis*, enquanto o óleo essencial de *O. basilicum* var. *purpurascens* mostrou-se ativo frente as cepas de *M. canis*, *C. albicans* e *C. parapsilosis* e o *O. americanum* inibiu as cepas de *M. canis*, *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. Os óleos essenciais de *O. micranthum* e *O. selloi* foram ativos contra todas as cepas testadas. O *O. micranthum* apresentou os menores valores de CIM, variando entre 312,5 a 1200 mg ml⁻¹. Diante do exposto, os óleos essenciais de *O. americanum*, *O. basilicum* var. *purpurascens*, *O. micranthum* e *O. selloi* apresentaram potencial antifúngico, *in vitro*, contra *Candida* spp. e *M. canis*, mostrando-se como fontes promissoras no desenvolvimento de novos agentes fitoterápicos para tratamento da micoses.

ABSTRACT

Due to high incidence of infections caused by fungi and resistance to antifungal agents of these microorganisms, the growing importance of studies on bioprospecting of natural products with antimicrobial properties and potential phytotherapeutic. This study aimed at finding new antifungal agents from the essential oils of Brazilian species *Ocimum*. The essential oils from the leaves of *Ocimum americanum*, *O. basilicum* var. *purpurascens*, *O. basilicum* var. *minimum*, *O. micranthum* and *O. selloi* were obtained by steam distilled and analyzed by gas chromatography/mass spectrometry. The antifungal activity of essential oils was evaluated against strains of *Microsporum canis*, *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* and *C. krusei* by the method of microdilution in broth. Chemical analysis showed that the main components were (Z)-methyl cinnamate and 1,8-cineole for *O. americanum*, linalool and α -muurulol for *O. basilicum* var. *purpurascens*, linalool and estragole for *O. basilicum* var. *minimum*, e-caryophyllene and eugenol for *O. micranthum* and linalool and 1,8-cineole for *O. selloi*. The evaluation of antifungal activity showed that the *O. basilicum* var. *minimum* essential oil was active only against strains of *M. canis*. *O. basilicum* var. *purpurascens* essential oil was active against strains of *M. canis*, *C. albicans* and *C. parapsilosis* and *O. americanum* inhibited the strains of *M. canis*, *C. albicans*, *C. parapsilosis* and *C. tropicalis*. *O. micranthum* and *O. selloi* essential oils were active against all strains tested. *O. micranthum* showed the lowest values of MIC, ranging from 312.5 to 1200 mg ml⁻¹. Considering the above, the essential oils of *O. americanum*, *O. basilicum* var. *purpurascens*, *O. micranthum* and *O. selloi* were active in vitro against *Candida* spp. and *M. canis* and is promising as sources for the development of new agents for herbal treatment of mycoses.

Keywords: *Ocimum* spp. Antifungal activity. *Candida* spp. *Microsporum canis*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Folhas e inflorescências de <i>O. americanum</i>	24
Figura 2. Aspecto das folhas e inflorescências de <i>O. basilicum</i> var. <i>purpurascens</i> , mostrando a coloração roxa das flores.....	26
Figura 3. Exsicata de <i>O. basilicum</i> var. <i>minimum</i> , arquivada no Herbário Prisco Bezerra.....	27
Figura 4. Folhas e inflorescências de <i>O. micranthum</i>	28
Figura 5. Aspecto das folhas e inflorescências de Elixir Paregórico.....	30
Figura 6. Microconídios em cachos e hifas em espiral, característica de <i>T. mentagrophytes</i>	32
Figura 7. Macroconídeos simétricos com septos de paredes finas e extremidades arredondadas característico de <i>M. gypseum</i>	32
Figura 8. Macroconídios de parede fina, com dois a cinco septos, agrupados em cachos, característico de <i>E. floccosum</i>	33
Figura 9. Achado micromorfológico mostrando macroconídios fusiformes, de paredes grossas, com numerosas septações, característico de <i>M. canis</i>	34
Figura 10. Achado macromorfológico (A) mostrando coloração branca, superfície lisa, textura glabrosa úmida, característica das espécies de <i>Candida</i> e micromorfologia (B) mostrando blastoconídios de <i>Candida albicans</i>	35
Figura 11. Placa de 96 poços, utilizada no método de microdiluição em caldo.....	37
Figure 1. Structures of main compounds of the essential oils of <i>Ocimum</i> species.....	64

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Espécies de plantas cujos óleos essenciais apresentam atividade antifúngica.....	21
--	----

LISTA DE TABELAS

Table 1. Chemical composition of the essential oils of <i>Ocimum</i> species.....	66
Table 2. Minimum inhibitory and fungicidal concentrations of essential oils of <i>Ocimum</i> species against <i>Candida</i> spp. and <i>M. canis</i>	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL - Microlitros

α - Alfa

β - Beta

γ - Gama

δ - Delta

ρ - Para

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*

cm - Centímetro (s)

CO_2 - Gás carbônico

CC - Cromatografia em coluna

CCD - Cromatografia em camada delgada

DCCC - Droplet countercurrent chromatography

DMSO - Dimetilsufóxido

ISO - *International Standard Organization*

MDCCC - Micro droplet counter-current chromatography

mg - Miligrama (s)

mL - Mililitro (s)

mm - Milímetro (s)

NCCLS - *National Committee for Clinical Laboratory Standards*

OMS - Organização Mundial de Saúde

SNC - Sistema nervoso central

UV - Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1 Plantas medicinais.....	17
2.2 Óleos essenciais.....	19
2.2.1 Potencial antimicrobiano dos óleos essenciais.....	21
2.3 Plantas estudadas.....	22
2.3.1 O gênero <i>Ocimum</i>	22
2.3.2 <i>Ocimum americanum</i> L.	23
2.3.3 <i>Ocimum basilicum</i> var. <i>purpurascens</i> e var. <i>minimum</i>	25
2.3.4 <i>Ocimum micranthum</i> Willd.	27
2.3.5 <i>Ocimum selloi</i> Benth.	29
2.4 Fungos.....	31
2.5 Métodos de estudo da atividade antifúngica <i>in vitro</i>.....	36
3 JUSTIFICATIVA.....	39
4 HIPOTESE CIENTÍFICA.....	40
5 OBJETIVOS.....	41
5.1 Objetivo geral.....	41
5.2 Objetivos específicos.....	41
6 CAPÍTULO I.....	42
7 CONCLUSÕES.....	68
8 PERSPECTIVAS.....	69
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70

1 INTRODUÇÃO

As plantas são fontes importantes de compostos biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em modelos para a síntese de um grande número de fármacos. Estima-se que existam de 25.000 a 75.000 espécies vegetais utilizadas nas medicinas tradicionais do mundo, das quais apenas 1% foi validada por estudos científicos, com demonstração de seu valor terapêutico, quando administradas em seres humanos (LIMA et al., 2007). Exemplos importantes de drogas obtidas de plantas são a digoxina (*Digitalis* spp.), a quinina e a quinidina (*Cinchona* spp.), a vincristina e a vinblastina (*Catharanthus roseus*), a atropina (*Atropa belladonna*), a morfina e a codeína (*Papaver somniferum*) (VEIGAS JR et al., 2006; TUROLA, NASCIMENTO, 2006).

O Brasil é o país com maior diversidade genética vegetal do mundo, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas (AZEVEDO E SILVA, 2006). Segundo Simões et al. (2004), apenas 8% desse percentual biológico foi estudado em busca de compostos bioativos e 1.100 espécies vegetais foram avaliadas em suas propriedades medicinais. Dessas, 590 plantas foram registradas no Ministério da Saúde para comercialização.

Nas últimas décadas tem se observado um aumento mundial na incidência de infecções fúngicas, bem como um aumento na resistência de algumas espécies de fungos aos fungicidas utilizados na prática médica e na agricultura (ZANARDI et al., 2008; AMARAL E BARA, 2005). O desafio tem sido o de desenvolver estratégias eficazes para o tratamento de doenças fúngicas oportunistas, considerando o aumento do número de pacientes imunocomprometidos e o uso indiscriminado de antibióticos. Além disso, nos últimos anos se observou um crescente interesse em reduzir o uso de fungicidas sintéticos na agricultura, questionando-se o impacto ambiental e o potencial risco sanitário relacionados ao uso desses compostos. A maioria dos antifúngicos clinicamente utilizados tem vários inconvenientes em termos de toxicidade, eficácia e custo, e sua utilização freqüentemente leva ao aparecimento de espécies resistentes. Assim, existe uma grande demanda por novos antifúngicos de diferentes classes estruturais, agindo seletivamente sobre novas metas, com menos efeitos colaterais (ABAD; ANSUATEGUI; BERMEJO, 2007).

Várias espécies de plantas nativas têm sido largamente empregadas pela população, cujo conhecimento acerca do uso medicinal foi desenvolvido inicialmente por comunidades indígenas e caboclas do país (ROCHA E ROCHA, 2006). Entre as principais plantas nativas de uso popular podem ser citadas as espécies de carqueja (*Baccharis* sp.), pata-de-vaca (*Bauhinia* sp.), embaúba (*Cecropia* sp.), espinheira-santa (*Maytenus* sp.), guaco (*Mikania* sp.) e maracujazeiro

(*Passiflora* sp.) (BORGES et al., 2008; RUIZ et al., 2008; AZEVEDO E SILVA, 2006; PILLA et al., 2006).

Dentre as várias classes de compostos isolados de plantas com propriedades antimicrobianas, os óleos essenciais são reconhecidos por apresentarem atividade contra um grande número de microrganismos, incluindo espécies resistentes a antibióticos e antifúngicos (BERTINI et al., 2005). Nos últimos anos, a crescente resistência dos patógenos aos antimicrobianos e o aumento da população de pacientes imunocomprometidos têm estimulado a busca de compostos terapêuticos alternativos (BERTINI et al., 2005; AMARAL, 2004), tais como os extratos obtidos de diversas espécies dos gêneros *Ocimum* (ZHANG et al., 2009; SHAHID et al., 2008; HUSSAIN et al., 2008; ALVIANO et al., 2005).

Nesse trabalho foram avaliados os óleos essenciais das espécies *Ocimum americanum*, *O. basilicum* var. *purpurascens*, *O. basilicum* var. *minimum*, , *O. micranthum* e *O. selloi*, nativas do Nordeste brasileiro, quanto a sua atividade antifúngica, contra o fungo leveduriforme *Candida* spp. e o dermatófito *Microsporum canis*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PLANTAS MEDICINAIS

As plantas medicinais são a mais antiga fonte de compostos farmacologicamente ativos e praticamente a única fonte de compostos medicinais por séculos (SOUSA et al., 2007). A humanidade utiliza plantas desde antes de Cristo, primeiro numa relação de consumidor e mais tarde para a cura de suas enfermidades. Iniciada antes da medicina moderna, a medicina tradicional é definida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como sendo a soma de todos os conhecimentos teóricos e práticos, explicáveis ou não, utilizados para diagnóstico, prevenção e tratamentos físicos, mentais ou sociais, baseados exclusivamente na experiência e observação e transmitidos verbalmente ou por escrito de uma geração a outra (PEREIRA, OLIVEIRA, LEMOS, 2004).

A medicina tradicional é utilizada em todas as partes do mundo e tem um rápido crescimento econômico pelo uso de plantas medicinais, especialmente nos países em desenvolvimento, onde o serviço de saúde é limitado e as plantas representam o único tratamento acessível. Segundo a OMS, as atuais estimativas sugerem que muitos países desenvolvidos têm uma grande proporção da população que recorre à prática tradicional de saúde, especialmente a utilização das plantas medicinais. Embora o acesso à medicina moderna seja disponível nestes países, o uso de plantas medicinais tem mantido sua popularidade por razões históricas e culturais. Por outro lado, nos países em desenvolvimento, 65-80% da população depende exclusivamente das plantas medicinais como cuidados básicos de saúde, até 80% da população na África, 71% no Chile e 40% na Colômbia, entre outros (AGRA et al., 2008).

Os trabalhos relacionados à atividade antimicrobiana de plantas tiveram início na década de 40. Em 1943, Osborn, pesquisando a atividade de 2.300 plantas superiores, *in vitro*, contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, verificou que 63 gêneros continham substâncias que inibiram o crescimento de um ou de ambos os microrganismos (SARTORI, 2005).

No Brasil, as pesquisas sobre substâncias antimicrobianas de origem vegetal tiveram início com Cardoso e Santos (1948), os quais avaliaram extratos de 100 diferentes espécies vegetais, indicadas na terapêutica popular como antiinflamatórias ou cicatrizantes. Destas, apenas cinco extratos apresentaram atividade inibitória contra *S. aureus*, *E. coli* e *Proteus* X-19. A partir de 1950, foram isolados os primeiros compostos de espécies vegetais: o diterpeno biflorinina e o triterpeno maitenina. Posteriormente, compostos flavonóides com propriedades antimicrobianas efetivas contra *S. aureus* resistentes a metecilina foram isolados, tais como a

primina, a mocinidina, lapachol e derivados, a plumbagina, a xantoxilina, a filantimida, a leteolina e a mirecetina (SARTORI, 2005).

A exploração dos recursos vegetais pode levar a identificação de metabólitos secundários valiosos que podem servir como drogas ou conduzir ao desenvolvimento de novas substâncias terapêuticas (GOBBO-NETO E LOPES, 2007). O metabolismo das plantas é composto por um conjunto de reações químicas que estão ocorrendo continuamente nas células (MORAIS E BRAZ-FILHO, 2007). A síntese de compostos como aminoácidos, açúcares, ácidos graxos e nucleotídeos, essenciais para a sobrevivência dos vegetais, faz parte do metabolismo primário. Já os compostos sintetizados por outras vias, que aparentam não ter relação direta com a sobrevivência do vegetal, fazem parte do metabolismo secundário (CASTRO E PONTIN, 2005). Atualmente, sabe-se que muitas das substâncias produzidas pelo metabolismo secundário possuem propriedades biológicas importantes e estão diretamente envolvidas nos mecanismos que permitem a adequação da planta ao seu meio. As substâncias pertencentes a essa classe de metabólitos possuem diversas funções biológicas, tais como defesa contra herbívoros e microrganismos, proteção contra raios UV, atração de polinizadores ou animais dispersores de sementes (FUMAGALI et al., 2008).

Dentre os metabólitos secundários, vários compostos têm mostrado ação antifúngica, tais como os alcalóides esteroidais cuja atividade está relacionada com a capacidade de desestabilizar membranas biológicas (CASTILHOS et al., 2007). Como exemplo, pode-se citar a tomatina isolada do tomate (*Lycopersicum esculentum* L.), que possui um amplo espectro antimicrobiano, sendo ativa contra *Aspergillus* spp., *Candida albicans* e *Trichophyton* spp., fungos saprófagos, algumas bactérias Gram-positivas e protozoários. Os glicoalcalóides presentes na batata (*Solanum tuberosum* L.), a solanina e a chaconina, também são ativos contra alguns fungos fitopatógenos, tais como *Trichoderma viride*, *Helminthosporium carbonum*, *Fusarium caeruleum* e *Cladosporium fulvum* (SIMÕES et al., 2004).

Outras classes de compostos, tais como as quinonas, têm apresentado atividade antifúngica. O timol (2-isopropil-5-metil fenol) e seu isômero de posição, carvacrol (5-isopropil-2-metil fenol) possuem ação antibacteriana e antifúngica maiores que o fenol, e ao mesmo tempo, menor toxicidade que esse composto. Os taninos, presentes na pitangueira, por exemplo, possuem ação bactericida e fungicida. Os glicosinolatos presentes na mostarda também possuem efeito antimicótico em casos de dermatofitoses produzidas em cobaias (SIMÕES et al., 2004).

2.2 ÓLEOS ESSENCIAIS

Uma planta é classificada como medicinal por possuir substâncias que têm ação farmacológica. Estas substâncias são denominadas princípio ativo e, na maioria das vezes, não se sabe quais destes realmente estão atuando na terapêutica (ROCHA E ROCHA, 2006).

Dentre os agentes terapêuticos provenientes das plantas com uso medicinal popular e científico, destacam-se os óleos essenciais. A ISO (*International Standard Organization*) define óleos essenciais como produtos obtidos de partes de plantas através de destilação por arraste com vapor d'água, bem como os produtos obtidos por compressão dos pericarpos de frutos cítricos (COSTA et al., 2008). Os óleos essenciais também podem ser chamados de óleos voláteis, essências, azeites etéreos ou azeites voláteis e constituem um grupo de substâncias líquidas, voláteis, responsáveis pelo odor aromático de diversas plantas (MATOS E MATOS, 1989). A qualidade das essências pode variar de um gênero a outro, de uma espécie a outra (Amaral, 2004). Os óleos essenciais em geral não são muito estáveis, principalmente na presença de ar, luz, calor, umidade e metais. São raramente encontrados em gimnospermas, no entanto, são abundantes em angiospermas dicotiledôneas (SIMÕES et al., 2004).

Praticamente todos os óleos essenciais constituem uma mistura de princípios químicos muito complexa e variam amplamente em sua composição, sendo a maior parte constituídos principalmente de terpenos (MATOS E MATOS, 1989). Os constituintes variam desde hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas e compostos com enxofre. Na mistura, tais compostos apresentam-se em diferentes concentrações; normalmente um deles é o composto majoritário, existindo outros em menores teores e alguns em baixíssimas quantidades (SIMÕES et al., 2004).

Os óleos essenciais podem ocorrer, dependendo da família, em estruturas secretoras especializadas, tais como em pêlos glandulares (Lamiaceae), células parenquimáticas diferenciadas (Lauraceae, Piperaceae, Poaceae), canais oleíferos (Apiaceae) ou em bolsas lisígenas ou esquizolisígenas (Pinaceae, Rutaceae) (MARQUES et al., 2008). Podem ser extraídos a partir de flores (rosa; *Rosa centifolia*), folhas (marmeleiro preto; *Croton sonderianus*), frutos (funcho; *Foeniculum vulgare*), sementes (sucupira branca; *Pterodum polygalaeflorus*), parte aérea (capim-santo; *Cymbopogon citratus*), raízes (vetiver; *Vetiveria zizanioids*), casca (jatobá; *Hymenaea courbaril*), tubérculos (tiririca; *Cyperus* sp.), capítulos florais (macela; *Egletes viscosa*) e bulbos (alho; *Allium sativum*) (AMARAL, 2004). Embora todos os órgãos de uma planta possam acumular óleos voláteis, sua composição pode variar

segundo a localização anatômica das estruturas produtoras (DESCHAMPS et al., 2008).

Dados da literatura provam que o ambiente no qual o vegetal se desenvolve, bem como o tipo de cultivo, influem sobre a composição química dos óleos voláteis. A temperatura, a umidade relativa, a duração total de exposição ao sol e o regime de ventos exercem uma influência direta, sobretudo sobre espécies que possuem estruturas histológicas de estocagem na superfície (MORAIS et al., 2006).

Os métodos de extração dos óleos essenciais variam conforme a localização do óleo na planta e com a proposta de utilização do mesmo. Os mais comuns são: enfloração, arraste por vapor d'água, extração com solventes orgânicos, prensagem e extração por CO₂ supercrítico (SIMÕES et al., 2004). Uma vez obtido um extrato de uma espécie é necessário fracioná-lo para determinar quais componentes estão presentes, ou quando for o caso, quais componentes possuem atividade biológica. Em geral, na separação e isolamento dos componentes de um extrato ou óleo essencial, utilizam-se métodos cromatográficos, tais como a cromatografia em coluna (CC), cromatografia líquida sob vácuo, cromatografia sob pressão, cromatografia flash, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia em papel, cromatografia-contracorrente-gota-a-gota (“droplet countercurrent chromatography”; DCCC ou “micro droplet counter-current chromatography”; MDCCC) (ARAÚJO, 2005).

Devido a sua composição complexa, os óleos essenciais demonstram uma variedade de ações farmacológicas, tornando-os potenciais fontes para o desenvolvimento de novas drogas (AMARAL, 2004). Dados da literatura mostram que óleos essenciais contendo cânfora (*Salvia officinalis*) provocam aumento do ritmo cardíaco e da pressão arterial. A camomila (*Chamomilla recutita*), macela (*Egletes viscosa*), alho (*Allium sativum*), funcho (*Foeniculum vulgare*) e sálvia (*Salvia officinalis*) possuem óleos essenciais que relaxam a musculatura lisa intestinal (atividade antiespasmódica). O óleo essencial do cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus*), pelo seu alto teor em eugenol, possui atividade anestésica local. Alguns óleos essenciais têm suas atividades sobre o sistema nervoso central (SNC) conhecidas como estimulante (óleos essenciais contendo cânfora), sedativa (melissa; *Melissa officinalis*), ou mesmo provocando convulsões em doses elevadas (sálvia; *Salvia officinalis* e cássia; *Cinnamomum cassia*). Óleos essenciais que contêm azulenos, como a camomila, possuem atividade antiinflamatória. Alguns óleos essenciais possuem atividade analgésica como aqueles extraídos de macela (*Egletes viscosa*) (SIMÕES et al., 2004).

2.2.1 POTENCIAL ANTIMICROBIANO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

A atividade antimicrobiana foi documentada para os óleos essenciais, extraídos de várias espécies de vegetais, tais como, hortelã-pimenta (*Mentha piperita*), *Achillea frangatissima*, cajepute (*Melaleuca leucadendron*), melaleuca (*Melaleuca alternifolia*), rosa-de-Jericó (*Althea rosea*) e capim-limão (*Cymbopogon citratus*), pela presença de componentes como timol, carvacrol, eugenol, 1,8-cineol, linalol, pineno, cariofileno e citral (AMARAL, 2004).

Nos últimos anos a atividade antifúngica de óleos essenciais tem sido relatada para diversas espécies, envolvendo principalmente as famílias Lamiaceae, Asteraceae, Verbenaceae, Rutaceae, Lauraceae e Cupressaceae (ABAD et al., 2007). Alguns dos mais importantes óleos essenciais com atividade antifúngica estão apresentados no quadro 1.

Quadro 1. Espécies de plantas cujos óleos essenciais apresentam atividade antifúngica.

Óleos essenciais	Constituintes isolados	Fungos sensíveis	Referências
<i>Satureja montana</i>		<i>Candida albicans</i>	GIORDANI et al., 2004
<i>Lavandula angustifolia</i>	Linalol Acetato de linalil	<i>Candida albicans</i>	GIORDANI et al., 2004
<i>Lavandula hybrida</i>		<i>Candida albicans</i>	GIORDANI et al., 2004
<i>Lavandula stoechas</i>	Fenchona Limoneno Mirtenol	<i>Rhizoctonia solani</i> <i>Fusarium oxysporum</i> <i>Aspergillus flavus</i>	ANGIONI et al., 2006
<i>Rosmarinus officinalis</i>	α -pineno Borneol Canfeno Canfora	<i>Candida albicans</i> <i>Fusarium graminearum</i>	GIORDANI et al., 2004; ANGIONI et al., 2004
<i>Thymus vulgaris</i>	Timol	<i>Candida albicans</i>	GIORDANI et al., 2004
<i>Origanum vulgaris</i>		<i>Candida albicans</i>	GIORDANI et al., 2004
<i>Ocimum gratissimum</i>		Dermatófitos Leveduras	KOBA et al., 2009
<i>Lippia sidoides</i>	Carvacrol Timol	<i>Candida</i> spp. <i>Microsporum canis</i>	FONTENELLE et al., 2007
<i>Chrysanthemum coronarium</i>	Cânfora α e β -pineno Acetato de liralil	Fitopatógenos	ALVAREZ-CASTELLANOS et al., 2001
<i>Croton zehntneri</i>		<i>Candida</i> spp. <i>M. canis</i>	FONTENELLE et al., 2008
<i>Croton</i>		<i>M. canis</i>	FONTENELLE et al.,

<i>Croton nepetaefolius</i>		<i>M. canis</i>	FONTENELLE et al., 2008
<i>Psiadia lithospermifolia</i>	δ -elemeno Farneseno α -curcumeno β -bisabolenos	<i>Aspergillus ochraceus</i> <i>Candida pseudotropicalis</i> <i>Fusarium moniliforme</i>	GOVINDEN-SOULANGE et al., 2004
<i>Tagetes patula</i>	Piperitona Piperitenona	Fitopatógenos <i>Botrytis cinera</i> <i>Penicillium digitatum</i>	ROMAGNOLI et al., 2005
<i>Citrus sinensis</i>		Fitopatógenos	SHARMA et al., 2006
<i>Haplophyllum tuberculatum</i>	α e β -felandreno Limoneno β -ocimeno	<i>Curvularia lunata</i> <i>Fusarium oxysporium</i>	AL-BURTAMANI et al., 2005
<i>Calocedrus formosana</i>	α -curcumeno Murolo	<i>Lenzites betulina</i> <i>Pycnoporus coccineus</i> <i>Trametes versicolor</i> <i>Laetiporus sulphureus</i>	CHENG et al., 2004
<i>Juniperus communis</i>		<i>Aspergillus</i> spp. <i>Candida</i> spp.	CAVALEIRO et al., 2006

Neste trabalho foram estudados os óleos essenciais de plantas nativas da região Nordeste do Brasil, a saber: *Ocimum americanum*, *O. basilicum* var. *purpurascens*, *O. basilicum* var. *minimum*, *O. micranthum* e *O. selloi*.

2.3 PLANTAS ESTUDADAS

2.3.1 O GÊNERO OCIMUM

O gênero *Ocimum*, família Lamiaceae, compreende mais de 64 espécies herbáceas e subarborescentes encontradas em regiões tropical e subtropical da Ásia, África, América Central e do Sul, mas o principal centro de diversidade é o continente africano. As plantas deste gênero apresentam grande diversidade de espécies, sendo conhecidas, popularmente, como alfavacas e manjericões (DAVID et al., 2006; BLANK et al., 2004; LORENZI E MATOS, 2002).

A nomenclatura botânica correta para as espécies do gênero *Ocimum* é de grande

interesse, devido a grande ocorrência de polinização cruzada, facilitando hibridações e resultando em um grande número de subespécies, variedades e formas. A espécie *O. basilicum*, popularmente conhecido como manjerição, possui mais de 60 variedades, podendo-se questionar a identificação botânica do manjerição citado em algumas literaturas (BLANK et al., 2004).

A Europa e os Estados Unidos comercializam espécies do gênero *Ocimum* para fins ornamentais e aromáticos. Além disso, a seleção de diferentes aromas nesse gênero, buscando espécies de interesse para a indústria de cosméticos e higiene, levou a formação de tipos químicos ricos em certos compostos, sendo denominados em função de seus altos teores de linalol, eugenol, timóis, cinamato de metila, estragol dentre outros (POTZERNHEIM et al., 2006). Ainda algumas espécies podem ser divididas de acordo com outros quimiotipos como metil-linalol, chavicol; eugenol, 1,8-cineol, sesquiterpenos; metil-eugenol, eugenol (MATASYOH et al., 2007). Portanto, em geral, as espécies de *Ocimum* são classificadas segundo a composição química dos óleos essenciais.

Os óleos essenciais constituem a matéria prima de maior valor agregado nos mercados nacional e internacional, obtida a partir de folhas e ápices com inflorescências das plantas do gênero *Ocimum* em estágio de maturidade ideal (SILVA et al., 2006). A produção de óleos essenciais é destinada a fabricação de fármacos, perfumes, além de aplicações como ingredientes em alimentos e aditivos nos produtos cosméticos e de higiene pessoal, devido a suas propriedades antioxidantes e antibacterianas (VANI et al., 2009).

Muitas de suas espécies são utilizadas popularmente no tratamento de doenças, na culinária e como repelente de insetos (AGRA et al., 2008; CHOWDHURY et al., 2008; COSTA FILHO et al., 2006). Diversas propriedades biológicas têm sido comprovadas para as espécies de *Ocimum*, como as atividades hipoglicemiantes, antiinflamatória, antileishmania, tripanossomicida e antinociceptiva atribuídas ao *O. gratissimum* (SANTORO et al., 2007; UEDA-NAKAMURA et al., 2006; RABELO et al., 2003). A atividade antimicrobiana foi relatada para várias espécies, podendo-se destacar as espécies *O. basilicum* do Mediterrâneo, *O. gratissimum* de África e *O. sanctum* da Índia, que mostraram forte atividade antibacteriana e antifúngica (SUPPAKUL et al., 2003).

2.3.5 OCIMUM AMERICANUM L.

A espécie *O. americanum* (sin. *O. canum* Sims) (Figura 1) é comumente chamada de alfavaca na região amazônica. Em outras regiões, é conhecida como remédio-de-vaqueiro,

alfavaca-do-campo, alfavaca-de-vaqueiro e manjeriço. Os dados botânicos mostram que a planta é uma erva com ramos ascendentes, glabros e eretos, de onde partem folhas ovais, denteadas, glabras, verdes e finas; flores vermelhas, verticiladas e dispostas em racemos (DI STASI E HIRUMA-LIMA, 2002).



Fonte: VIEIRA, 2009

Figura 1. Folhas e inflorescências de *O. americanum*.

O. americanum é amplamente distribuído nas regiões tropicais e subtropicais, porém não é nativo da América, como indica o nome. Ao contrário das outras espécies de manjeriços, não é utilizado com frequência na culinária, apresentando maior uso como planta medicinal (VIEIRA et al., 2003). A medicina tradicional faz uso da infusão ou xarope para tratar asma, febre, tosse, gripe, bronquite e indigestão (AGRA et al., 2008; CHOWDHURY et al., 2008). Na Índia o extrato das folhas secas é usado para tratar eczema ou outras infecções epidérmicas (KOCHE et al., 2008) e no Kenya é usado como repelente (SEYOUM et al., 2002).

A espécie é rica em óleos essenciais que podem possuir como constituintes majoritários metil e-cinamato (VIEIRA E SIMOM, 2000) ou eugenol e metil-chavicol (SHADIA et al., 2007), dependendo do local de coleta. Vieira et al. (2003) identificaram no extrato de *O. americanum* 19 flavonóides.

Os óleos essenciais e extratos dessa espécie apresentam diversas atividades biológicas, podendo-se destacar atividade antioxidante (HAKKIM et al., 2008), antimalárica (CLARKSON et al., 2004), repelente (SEYOUM et al., 2002), inseticida (SHADIA et al., 2007), antifúngica contra fitopatógenos (PANDEY E DUBEY, 1992) e antibacteriana frente a *Propionibacterium acnes* (VIYUCH et al., 2006).

2.2.2 OCIMUM BASILICUM VAR. PURPURASCENS E VAR. MINIMUM

O *Ocimum basilicum* L. é uma planta herbácea, anual ou perene, que atinge até 1 m de altura e possui caule muito ramificado. O caráter aromático típico de cada tipo de *O. basilicum* é determinado pelo genótipo e depende dos principais compostos químicos presentes no mesmo (EHLERT et al., 2006).

Segundo Lorenzi e Matos (2002), os principais compostos voláteis da espécie são: timol, metil-chavicol, linalol, eugenol, cineol e pireno. Os óleos essenciais das folhas e inflorescências têm sido extensivamente utilizados na indústria de alimentos, farmacêutica e de cosméticos, além de ser utilizado na medicina popular para combater cefaléia, diarreia, resfriado e como carminativo, digestivo e antiespasmódico (HUSSAIN et al., 2008).

A espécie *O. basilicum* é muito variável na sua morfologia, número de cromossomos e composição química do óleo essencial, dependendo das variações e quimiotipos, da cor e aroma das folhas e inflorescências e do lugar onde foram coletadas. Essas variações são atribuídas ao grande número de cruzamentos para a seleção de características como cheiro e sabor, possibilitando a descrição de muitos quimiotipos de óleos. Durante um levantamento quimiotaxonomico do gênero *Ocimum*, constatou-se que mesmo óleos essenciais das variedades de *O. basilicum* não possuem composição química homogênea. Por exemplo, o *O. basilicum* var. *basilicum* e o *O. basilicum* var. *purpurascens*, que apresentam cinco e três quimiotipos diferentes, respectivamente (GRAYNER et al., 1996).

A variação na composição química das variedades de *O. basilicum* foi estudada por diversos autores. Silva et al. (2003) constataram que o óleo essencial de *O. basilicum* L. e *O. basilicum* var. *purpurascens* (Figura 2) possui como constituinte majoritário o linalol, enquanto no *O. basilicum* var. *minimum* (Figura 3) predomina o estragol. O estudo feito por Trevisan et al. (2006) corrobora com Silva et al. (2003) mostrando o linalol como principal constituinte das espécies *O. basilicum* e *O. basilicum* var. *purpurascens*. Grayer et al. (1996) estudando vários acessos dessas duas variedades e de uma intermediária entre elas, encontraram como principais

constituintes o linalol, estragol e eugenol.

Diversas atividades biológicas foram constatadas para a espécie *O. basilicum* (HUSSAIN et al., 2008), no entanto para a variação *purpurascens* somente a atividade antioxidante e antibacteriana foram estudadas (TREVISAN et al., 2007; NAKHAEI et al., 2006).



Fonte: VIEIRA, 2009

Figura 2. Aspecto das folhas e inflorescências de *O. basilicum* var. *purpurascens*, mostrando a coloração roxa das flores.



Fonte: VIEIRA, 2009

Figura 3. Exsicata de *O. basilicum* var. *minimum*, arquivada no Herbário Prisco Bezerra.

2.3.3 *OCIMUM MICRANTHUM* WILLD.

A espécie *O. micranthum* (sin. *O. campechianum* Mill.) é conhecida popularmente pelos nomes de alfavaca do campo, alfavaca silvestre, alfavaca de galinha, favaquinha e manjerição (MONTELES E PINHEIRO, 2007; SACCHETTI et al., 2004; DI STASI et al., 2002). Apresenta-se como um arbusto (Figura 4) com caule pouco pubescente; folhas pecioladas, ovaladas, agudas, membranosas, margem irregular, levemente pubescentes e inferiormente glandulosas, pequenas; inflorescência racemosa, glomerulada, com flores de cálice tubuloso de lábios superior tetradenteado e corola com tubo campanulado e lábio superior branco e inferior violeta; androceu com estames inclusos; gineceu com ovário ovóide; núculas negras e lisas (DI STASI E HIRUMA-LIMA, 2002).



Fonte: VIEIRA, 2009

Figura 4. Folhas e inflorescências de *O. micranthum*.

O. micranthum é popularmente usado no Brasil para tratar infecções em geral, tosses, bronquite (DI STASIA et al., 2002; MOREIRA et al., 2002), dismenorréia, infecções vaginais (MICHEL et al., 2007) e doenças associadas ao aparelho geniturinário (MONTELES E PINHEIRO, 2007; ALBUQUERQUE E ANDRADE, 2002; HEINRICH et al., 1998). Na Amazônia peruana inala-se o chá para tratar vertigens em idosos (SANZ-BISET et al., 2009). Além do uso na medicina tradicional, *O. micranthum*, é utilizado como condimento, tempero e aromatizante (AMARAL E GUARIM, 2007).

Tal como ocorre com muitas especiarias, uma grande parte do aroma e sabor de *O. micranthum* é devido à presença de óleos essenciais, presentes em folhas, inflorescência e sementes, largamente utilizados pelas indústrias farmacêutica, de alimentos e perfumes devido aos seus constituintes majoritários (LORENZI E MATOS, 2002). Porém, espécies que pertencem à família Lamiaceae são conhecidas por apresentar polimorfismo químico dos seus óleos essenciais (SACCHETTI et al., 2004), já tendo sido identificados três quimiotipos distintos para essa espécie. O quimiotipo indiano que contém principalmente eugenol, 1,8-cineol, β -cariofileno e γ -elemene; o quimiotipo do Norte do Brasil, identificado a partir de plantas da

região amazônica, que possui β -elemene, β -cariofileno e isoeugenol como principais componentes; e o quimiotipo do Nordeste Brasileiro, crescendo em clima de baixa umidade e alta incidência de luz solar, que produz óleo com eugenol, β -cariofileno e elemicina como principais constituintes (SILVA et al., 2004).

Através de ensaios biológicos realizados com os constituintes fixos e voláteis de *O. micranthum* pode-se comprovar a atividade antioxidante (TREVISAN et al., 2006; SACCHETTI et al., 2004; SÁNCHEZ-MEDINA et al., 2001), antimicrobiana (SACCHETTI et al., 2004; SÁNCHEZ-MEDINA et al., 2001), antihemorrágica (OTERO et al., 2000) e antinociceptiva (LINO et al., 2005).

2.3.4 OCIMUM SELLOI BENTH.

Ocimum selloi, popularmente conhecido como elixir paregórico, alfavaquinha ou atroveran (LORENZI E MATOS, 2003), é uma espécie herbácea, perene, de até 1,20 m de altura, com florescimento ao longo de todo o ano. Apresenta caule quadrangular característico, folhas pecioladas, opostas, ovada, com margem serrilhada, ápice acuminado e base atenuada, medindo até 5 cm de comprimento por até 2,5 cm de largura (Figura 5). A inflorescência é uma espiga terminal com flores bilabiadas, agrupadas três a três, mostrando coloração entre roxo ao róseo; nectário na base de cada grupo de três flores. As flores são completas, hermafroditas, cíclicas e hipóginas. Os frutos são tetraquênios, podendo produzir um número máximo de quatro sementes pequenas, amarronzadas e ligeiramente alongadas por fruto (FACANALI, 2008).

Trata-se de uma espécie nativa, de ocorrência nas regiões Sudeste e Sul do Brasil (COSTA et al., 2007), com largo uso na medicina popular como antidiarréico, antiespasmódico e antiinflamatória (COSTA et al., 2009), além do emprego em distúrbios digestivos, no tratamento de inflamações, como gastrite e bronquite e para aliviar dores nas pernas (VIEIRA E SIMON, 2000).



Fonte: VIEIRA, 2009

Figura 5. Aspecto das folhas e inflorescências de Elixir Paregórico.

Possui folhas aromáticas, cujo óleo essencial apresenta como principais constituintes: metil-chavicol (Estragol) (COSTA et al., 2009; PAULA et al., 2004; FARAGO et al., 2004; MORAES et al., 2002), metil eugenol (PAULA et al., 2004; FARAGO et al., 2004), trans-anetol (PAULA et al., 2004; MORAES et al., 2002), elimicina (FACANALI, 2008; DAVID et al., 2006), trans-cariofileno e germacreno D (FACANALI, 2008; DAVID et al., 2006; PAULA et al., 2004), podendo esses constituintes variar dependendo da época e local da coleta (FACANALI, 2008), da temperatura de secagem (DAVID et al., 2006) e condições de armazenamento (COSTA et al. 2009), revelando a presença de quimiotipos diferentes para essa espécie (MORAES et al., 2002).

Estudos realizados com os óleos essenciais de *O. selloi* comprovaram atividade antiespasmódica, antiinflamatória, analgésica (VANDERLINE et al., 1994), repelente (PAULA et al., 2004), antiulcerogênica (COLA et al., 2003) e antimicrobiana frente a *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Além disso, Paula et al. (2004) demonstraram o baixo efeito toxicológico dos quimiotipos estragol e eugenol, mostrando que esses óleos essenciais não são mutagênicos, apoiando assim o uso na medicina tradicional.

2.4 FUNGOS

Os fungos são organismos eucarióticos, com núcleo bem definido circundado por uma membrana nuclear; uma membrana celular que contém lipídeos, glicoproteínas e esteróis; parede celular; mitocôndrias; aparelho de Golgi; ribossomos ligados ao retículo endoplasmático e um citoesqueleto constituído por microtúbulos, microfilamentos e filamentos intermediários. Essa descrição demonstra que esses microrganismos possuem células tão semelhantes às hospedeiras que é difícil elaborar estratégias terapêuticas específicas dirigidas contra o parasita e atóxica para o hospedeiro (SCHAECHTER et al., 2002).

De acordo com sua morfologia os fungos podem ser classificados em filamentosos, leveduras e dimórficos. Este último grupo pode apresentar-se na forma filamentosa ou leveduriforme, dependendo da temperatura a que é exposto; na temperatura ambiente (25 – 28°C), apresentam-se na forma filamentosa e na temperatura de 37 - 39°C mostram-se como leveduras (SIDRIM; ROCHA; CORDEIRO, 2004).

As micoses podem ser classificadas, segundo os tecidos e órgãos atingidos em: micoses superficiais, de localização nas camadas mais superficiais da pele ou dos pêlos; micoses cutâneas ou dermatomicoses, localizadas na pele, no pêlo ou nas unhas; micoses subcutâneas; micoses sistêmicas ou profundas atingindo, principalmente, órgãos internos e vísceras, e as micoses oportunistas que atingem os pacientes imunocomprometidos por doença de base, como câncer, diabetes, ou aqueles que são submetidos a tratamentos com uso de corticoidoterapia, imunossupressores e antibioticoterapia (TRABULSI E ALTERTHUM, 2004).

Dentre as micoses superficiais, estão as dermatofitoses, que se localizam nas zonas planas e intertriginosas da pele (LACAZ et al., 2002), e são produzidas por fungos especializados, denominados dermatófitos, os quais têm a habilidade de degradar a queratina e transformá-la em material nutritivo para seu crescimento (BALDA et al., 2007). Essas micoses são consideradas importantes para a clínica veterinária, pois acometem os animais domésticos, possuindo potencial zoonótico (BRAGA et al., 2007). As espécies zoofílicas são *Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes* var. *mentagrophytes*, *T. verrucosum* (PRADO, 2007)

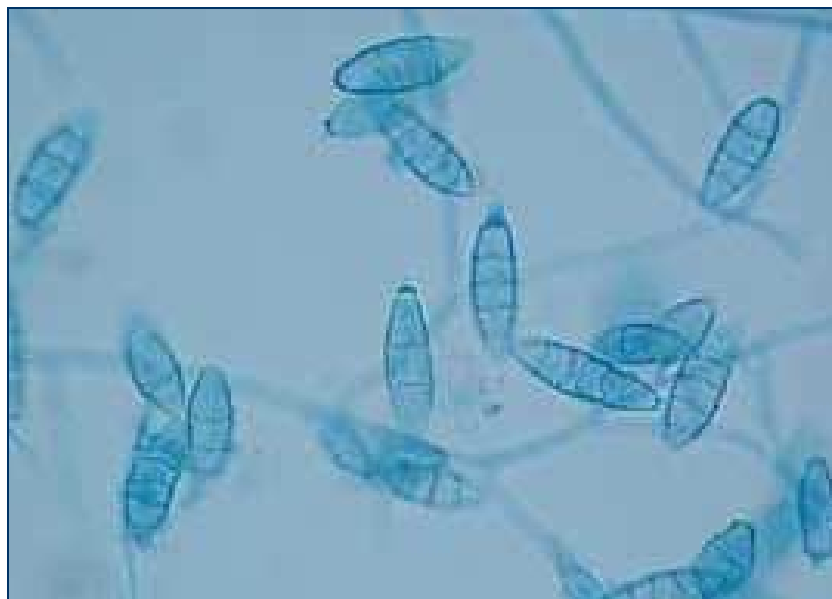
Pertencem ao grupo dos dermatófitos os fungos filamentosos, hialinos, septados, algumas vezes artroconidiados, queratinofílicos, passíveis de colonizar e causar lesões clínicas em pêlos e/ou extrato córneo de homens e animais (COELHO et al., 2008). Os dermatófitos compreendem cerca de 45 espécies enquadradas em três gêneros: *Trichophyton* (Figura 6), *Microsporum* (Figura 7) e *Epidermophyton* (Figura 8). As espécies mais comumente isoladas de dermatofitoses no Brasil são: *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans*, *M. canis*, *M. gypseum*

e *E. floccosum* (SIDRIM, BRILHANTE, ROCHA, 2004). Os fungos desse grupo secretam queratinases, um grupo de enzimas que degradam a queratina, proteína presente no cabelo, na pele, nas unhas e nos pêlos. A infecção é transmitida a partir de um indivíduo para outro, de um animal para o homem ou do homem para o animal, por contato direto ou indireto por fômites contaminados (TORTORA et al., 2002).



Fonte: Brito, 2008

Figura 6. Microconídios em cachos e hifas em espiral, característica de *T. mentagrophytes*.



Fonte: Brito, 2008

Figura 7. Macroconídios simétricos com septos de paredes finas e extremidades arredondadas característico de *M. gypseum*.



Fonte: www.medmicro.wisc.edu

Figura 8. Macroconídios de parede fina, com dois a cinco septos, agrupados em cachos, característico de *E. floccosum*.

As dermatofitoses são infecções cosmopolitas, havendo, no entanto, variações regionais marcantes no que diz respeito a tipos e frequência das espécies isoladas. A literatura mundial aponta o *T. rubrum* como a espécie de dermatófito mais comumente isolada em humanos. Estudos de incidência de dermatofitoses na Região Sul e Sudeste do Brasil têm apontado o *T. rubrum*, *M. canis*, *T. mentagrophytes*, respectivamente, como as três espécies mais prevalentes. Na Região Nordeste foram apontados *T. tonsurans*, seguido de *T. rubrum* e *M. canis* (SIDRIM, BRILHANTE, ROCHA, 2004). No Ceará, as espécies mais envolvidas em dermatofitoses são o *T. rubrum* seguido pelo *T. tonsurans*, *M. canis*, *T. mentagrophytes* e *E. floccosum* (BRILHANTE et al., 2000).

O *Microsporum canis* (Figura 9) é o responsável pela maioria dos casos de micoses em animais de estimação e o mais frequente dermatófito zoofílico de humanos, em diversas áreas urbanas (CAFARCHIA et al., 2006). As enfermidades micóticas têm importância distinta dentro das enfermidades veterinárias devido ao seu potencial zoonótico (NAKAMURA et al., 1999). Vários pesquisadores têm demonstrado a importância epidemiológica dos animais nas dermatofitoses. Dentre os animais domésticos o gato é o principal disseminador do *M. canis* (NOBRE et al., 2001). As dermatofitoses em felinos são clinicamente caracterizadas por áreas de alopecia e quebra de pêlos e em raros casos o *M. canis* tem sido associado com o

desenvolvimento de grânulos e nódulos teciduais (RICHARD et al., 1994). O *M. canis* é cosmopolita, endêmico em criações de felinos, onde todos os animais jovens podem estar clinicamente afetados e em contraste, os adultos portadores podem não apresentar lesões (LACAZ et al., 2002).



Fonte: Brito, 2008

Figura 9. Macroconídios fusiformes, de paredes grossas, com 5 a 7 septações, característica de *M. canis*.

A terapia para tratamento das dermatofitoses consiste na remoção completa de estruturas epiteliais infectadas e mortas, e aplicação de uma substância antimicótica no local (SIDRIM, BRILHANTE, ROCHA, 2004). No tratamento tópico, são utilizados preparados à base de tintura de iodo, ácido salicílico ou antifúngicos em forma de creme ou soluções: cetoconazol, isoconazol, miconazol, tolclato, clotrimazol, bifonazol, ciclopiroxolamina, terbinafina. O tratamento sistêmico é feito por derivados azólicos, cetoconazol, itraconazol e fluconazol, pela terbinafina ou griseofulvina (MORIELO et al., 2006; TRABULSI et al., 2004). Embora a terapia não dependa da espécie fúngica, o sucesso no tratamento pode estar relacionado ao conhecimento do patógeno, e por consequência, do seu perfil ecológico, a fim de garantir a erradicação do microrganismo e a interrupção do ciclo epidemiológico da doença (SIDRIM, BRILHANTE, ROCHA, 2004).

Além dos dermatófitos, fungos leveduriformes também possuem importância veterinária,

como espécies dos gêneros *Candida* e *Malassezia* (BRITO et al., 2007). A história natural das doenças causadas por leveduras é melhor compreendida à luz da susceptibilidade do hospedeiro. O indivíduo normal apresenta mecanismos de defesa inespecíficos e específicos, tais como barreiras anatômicas e fisiológicas, resposta inflamatória e resposta imunológica, que, juntos, representam obstáculo ao estabelecimento da infecção fúngica (MILAN E ZAROR, 2004).

O gênero *Candida* é composto por fungos leveduriformes hialinos, taxonomicamente enquadrados no grupo dos ascomicetos (SIDRIM E ROCHA, 2004). No exame direto do material clínico, o gênero apresenta-se como uma estrutura unicelular ovalada, Gram-positiva com tamanho variável de 2 a 6 μm , e como células alongadas com brotamentos, semelhantes a hifas, denominadas pseudo-hifas. As espécies de *Candida* apresentam colônias de coloração branca, superfície lisa ou levemente rugosa e textura glabrosa úmida (Figura 10a) (MORETTI et al., 2004), que crescem bem dentro de 48 horas, entre temperaturas de 25 e 37°C (SIDRIM E ROCHA, 2004). Com relação à microscopia caracterizam-se por blastoconídios esféricos (Figura 10b) ou levemente ovais, paredes finas e ausência de cápsula, sendo que algumas espécies apresentam clamidoconídios terminais ou intercalares (LACAZ et al., 2002).



Fonte: Brito, 2005



Fonte: Brito, 2005

Figura 10. (A) Colônia de coloração branca, superfície lisa, textura glabrosa úmida, característica das espécies de *Candida* e micromorfologia (B) mostrando clamidoconídios de *Candida albicans*.

Para a identificação das espécies do gênero *Candida* muitos aspectos são levados em consideração, como morfologia, capacidade de formar tubo germinativo, assimilação de carboidratos, assimilação de nitrogênio e fermentação de carboidratos (SIDRIM; ROCHA, 2004).

Em animais as leveduras do gênero *Candida* são isoladas em diferentes sítios, como o tubo digestivo, mucosas e pele, embora seja um microrganismo sapróbio em homens e animais, um desequilíbrio no binômio parasito-hospedeiro, pode torná-lo agente de infecções (BRITO, 2005). Um aumento das infecções fúngicas causadas por *Candida* tem sido descrito especialmente após o advento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, além disso, o uso indiscriminado de antibióticos e imunossupressores estão envolvidos nos casos mais graves da doença (WINGETER et al., 2007). Na medicina veterinária a multiplicação celular das leveduras é facilitada por fatores como alterações do pH, uso de antibióticos, glicocorticóides ou fármacos indutores de neutropenia, deficiência nutricional, principalmente de vitaminas e ferro, doenças metabólicas e endocrinopatias (CLEFF et al., 2007).

A resistência as drogas antifúngicas tem sido monitorada em cepas de *Candida* spp. Em quadros infecciosos humanos (LOEFFLER et al., 2000). Na clínica veterinária Brito et al (2007), em estudo pioneiro de avaliação do perfil de sensibilidade antifúngica de leveduras oriundas de cães, detectaram cepas de *Candida albicans* e *C. tropicalis* resistentes a cetoconazol, fluconazol e itraconazol.

Infecções em animais causadas por *Candida* spp. já foram relatadas em casos de otite (BRITO et al., 2007), infecções urinárias (OZAWA et al., 2005), endoftalmite (LINEK, 2004), lesões cutâneas (MORETTI et al., 2004) e infecções sistêmicas (BROWN et al., 2005). No Brasil a presença de *C. albicans* foi detectada em bovinos com otite (DUARTE et al., 2001) e em casos de dermatomicoses em cães (MORETTI et al., 2004). Além de *C. albicans*, Muller et al. (2002) isolaram cepas resistentes de *C. guilliermondii* em cães com dermatomicoses.

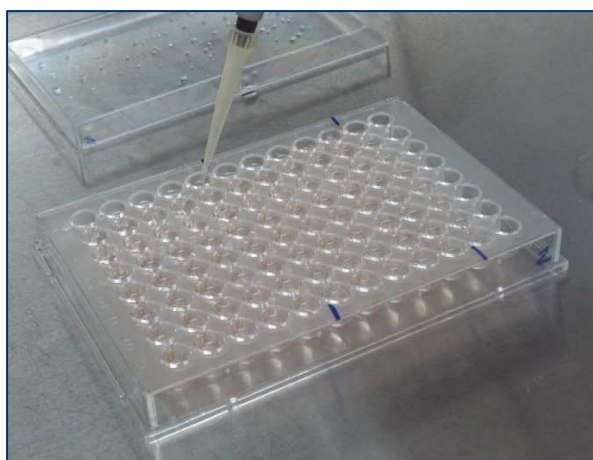
2.6 MÉTODOS DE ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO*

A atividade antifúngica é medida *in vitro*, a fim de determinar a potência de um antibiótico em solução, sua concentração em líquidos e tecidos corporais e a sensibilidade de um determinado microrganismo a concentrações conhecidas deste antibiótico (JAWETZ et al., 2005).

A entidade responsável pela normatização de técnicas de laboratório clínico nos Estados Unidos é o *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, anteriormente denominado *National Committee for Clinical Laboratory Standards* - NCCLS) que padronizou os testes de sensibilidade de fungos à drogas antimicóticas, definindo variáveis como método e preparação de inóculo, composição e pH do meio a ser utilizado, temperatura e tempo de incubação e

determinação dos critérios de leitura do teste (COLOMBO E ALVES, 2004).

A macrodiluição em caldo foi o primeiro método padronizado pelo CLSI (1992), porém por tratar-se de método laborioso e de difícil execução em laboratórios de rotina, houve a busca de métodos alternativos que possibilitassem a determinação da concentração inibitória mínima de drogas antifúngicas. A microdiluição em caldo (Figura 11), realizada segundo parâmetros do CLSI, além da maior facilidade na sua execução, permite a análise de grande número de amostras, com economia de material (COLOMBO E ALVES, 2004). Esse método também foi padronizado pela organização européia *Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing* (AFST-EUCAST), baseado nos procedimentos da referência CLSI M27-A2, mas com algumas modificações a fim de se obter maior exatidão na determinação dos valores de CIM (Concentração inibitória mínima). Estudos têm confirmado que a modificação do documento CLSI M27-A29 com a suplementação do meio RPMI 1640 com 2% de glicose no meio de cultura tornou a metodologia mais vantajosa, por reduzir o tempo de incubação necessário (24 h) para se obter um crescimento suficiente para a determinação dos valores de CIM (STOPPA et al., 2009).



Fonte: Vieira, 2009

Figura 11. Placa de 96 poços, utilizada no método de microdiluição em caldo

Além destes, o método de difusão em disco, padronizado pelo CLSI para leveduras, na norma M44-A (NCCLS, 2004), possibilita análises quantitativas, com bons resultados, alta reprodutibilidade e correlação com a microdiluição em caldo (Espinell-Ingroff et al., 2007).

Os testes de susceptibilidade às drogas antifúngicas podem ser usados não somente na pesquisa de sensibilidade aos antimicrobianos, como também na busca por novos fármacos pela verificação da atividade antifúngica de amostras complexas, como extratos vegetais, e de substâncias puras. As metodologias para a avaliação da atividade antifúngica de produtos

naturais são variáveis, sendo realizadas a bioautografia, a difusão em ágar e a diluição em ágar e caldo (STOPPA et al., 2009).

Os resultados obtidos por cada um desses métodos podem diferir devido a fatores como as variações entre os testes, a exemplo do crescimento microbiano, exposição de microrganismos aos extratos, a solubilidade do extrato ou de seus componentes e o uso e quantidade de diluentes. Por isso, algumas peculiaridades devem ser levadas em consideração, como a volatilidade, insolubilidade em água e complexidade dos óleos essenciais, visto que essas características podem interferir significativamente nos resultados (NASCIMENTO et al., 2007).

3 JUSTIFICATIVA

A pesquisa de novos agentes antifúngicos se faz necessária devido à grande incidência das infecções fúngicas, inclusive em clínicas veterinárias, onde há relatos de cepas isoladas de animais, resistentes as principais drogas clinicamente utilizadas. Esse fato é agravado pelo limitado arsenal antifúngico disponível, associado aos efeitos colaterais e alto preço dessas drogas. Estudos bioprospectivos de novos agentes farmacológicos são de extrema importância, principalmente em países, como o Brasil, que oferecem uma imensa biodiversidade.

Nesses estudos várias espécies de plantas se destacam por apresentarem bioatividades relevantes, como potencial contra um grande número de fungos. Desta forma, o estudo da atividade antifúngica dos óleos essenciais de espécies do gênero *Ocimum*, entre estas *O. americanum*, *O. basilicum* var. *minimum*, *O. basilicum* var. *purpurascens*, *O. micranthum* e *O. selloi* pode contribuir significativamente na busca por substâncias mais eficazes e menos tóxicas com atividade contra fungos frequentemente isolados de animais em clínicas veterinárias.

4 HIPÓTESE CIENTÍFICA

Os óleos essenciais de *O. americanum*, *O. basilicum* var. *purpurascens*, *O. basilicum* var. *minimum*, *O. micranthum* e *O. selloi* possuem atividade contra os fungos *Microsporum canis* e *Candida* spp.

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antifúngica dos óleos essenciais de *O. americanum*, *O. basilicum* var. *minimum*, *O. basilicum* var. *purpurascens*, *O. micranthum* e *O. selloi* frente à cepas de *Candida* spp. e *M. canis*.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a composição química dos óleos essenciais de *O. americanum*, *O. basilicum* var. *minimum*, *O. basilicum* var. *purpurascens*, *O. micranthum* e *O. selloi* por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa;
- Avaliar a atividade antifúngica dos óleos essenciais de *O. americanum*, *O. basilicum* var. *minimum*, *O. basilicum* var. *purpurascens*, *O. micranthum* e *O. selloi* pelo método de microdiluição em caldo, contra fungos dos gêneros *Candida* e *Microsporum*.

6 CAPÍTULO I

Composição química e atividade antifúngica dos óleos essenciais de espécies de *Ocimum* do Nordeste do Brasil

Chemical composition and antifungal activity of essential oils from *Ocimum* Species from Northeastern Brazil

Periódico: Microbiological research (Submetido em 15 de Junho de 2009)

Resumo

Devido à grande incidência das infecções causadas por fungos e a resistência desses microrganismos aos antifúngicos, cresce a importância dos estudos de bioprospecção de produtos naturais com propriedades antimicrobianas e potencial fitoterápico. Os objetivos deste estudo foram encontrar novos agentes antifúngicos a partir dos óleos essenciais de espécies brasileiras *Ocimum*. Os óleos essenciais das folhas de *Ocimum americanum*, *O. basilicum* var. *purpurascens*, *O. basilicum* var. *minimum*, , *O. micranthum* e *O. selloi* foram obtidos por arraste a vapor e analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa. A atividade antifúngica dos óleos essenciais foi avaliada contra cepas de *Microsporum canis*, *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. krusei* pelo método de microdiluição em caldo. A análise química mostrou que os principais componentes foram (Z)-metil cinamato e 1,8-cineol para *O. americanum*, linalol e α -muurulol para *O. basilicum* var. *purpurascens*, estragol e linalol para *O. basilicum* var. *minimum*, eugenol e e-cariofileno para *O. micranthum* e linalol e 1,8-cineol para *O. selloi*. A avaliação da atividade antifúngica mostrou que o óleo essencial de *O. basilicum* var. *minimum* foi ativo apenas contra as cepas de *M. canis*. O óleo essencial de *O. basilicum* var. *purpurascens* foi ativo contra as cepas de *M. canis*, *C. albicans* e *C. parapsilosis* e o *O. americanum* inibiu as cepas de *M. canis*, *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. Os óleos essenciais de *O. micranthum* e *O. selloi* foram ativos contra todas as cepas testadas. O *O. micranthum* apresentou os menores valores de CIM, variando entre 312,5 a 1200 mg ml⁻¹. Diante do exposto, os óleos essenciais de *O. americanum*, *O. basilicum* var. *purpurascens*, *O. micranthum* e *O. selloi* foram ativos *in vitro* contra *Candida* spp. e *M. canis*, mostrando-se como fontes promissoras no desenvolvimento de novos agentes fitoterápicos para tratamento da micoses.

**Chemical composition and antifungal activity of essential oils of *Ocimum* Species from
Northeastern Brazil**

Priscila R. N. Vieira¹, Francisco H. Q. Bezerra², Maria Goretti de Vasconcelos Silva³, Írville
Ricarte de Oliveira³, Selene M. de Moraes^{1,2*}

¹ Faculty of Veterinary, Postgraduate Program in Veterinary Sciences, State University of
Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil;

² Department of Chemistry, State University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil;

³ Laboratory of Natural Products, Department of Organic and Inorganic Chemistry, Federal
University of Ceará , Fortaleza, Ceará , Brazil

*Corresponding author: Selene Maia de Moraes. Rua Ana Bilhar. No. 601. Apto 400:
Meireles. CEP: 60 160-110. Fortaleza, Ceará, Brazil, Phone: 55 (85) 3247-1819. Fax: 55 (85)
3495-8368. E-mail: selene@uece.br

Abstract

With the increasing of microbial diseases and many reports of resistance of microorganisms to antifungal drugs, the importance of studies on bioprospecting of natural products with antimicrobial properties also increases. The aims of this study were to find new antifungal agents among essential oils from Brazilian *Ocimum* species. Plant leaves were steam distilled and the obtained essential oils were analyzed by gas chromatography/mass spectroscopy. The main constituents were (Z)-methyl cinnamate and 1,8-cineole for *O. americanum*, linalool and α -muurulol for *O. basilicum* var. *purpurascens*, estragole and linalool for *O. basilicum* var. *minimum*, eugenol and e-caryophyllene for *O. micranthum* and linalol and 1,8-cineole for *O. selloi*. The antifungal activity of essential oils was evaluated against *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei* and *Microsporum canis* by the broth microdilution method. Among the five plants *O. micranthum* and *O. selloi* showed the best results, with MIC ranging from 312.5 to 1200 $\mu\text{g ml}^{-1}$ against *Candida* spp. strains and from 312.5 to 625 $\mu\text{g ml}^{-1}$ against *M. canis* strains. The studied essential oils are active *in vitro* against the *Candida* spp. and *M. canis* showing to be promising sources for new phytotherapeutic agents to treat mycosis.

Keywords: *Ocimum* spp., antifungal activity, *Candida* spp., *Microsporum canis*

Introduction

In the past few decades, a worldwide increase in the incidence of fungal infections has been observed as well as a rise in the resistance of some species of fungus to different fungicides used in medicinal practice (Abad et al. 2007). Mycosis constitutes a common health problem, especially in tropical and subtropical developing countries; dermatophytes and *Candida* spp. being the most frequent pathogens in humans and animals (Kliemann et al. 2008; Xavier et al. 2008; Wingeter et al. 2007; Brito et al. 2007).

Much attention has been paid to plant-derived antifungal compounds, based on the knowledge that plants have their own defence systems against fungal pathogens. Natural products obtained from many plants have been attracting scientific interest and many authors have reported that essential oils are one of the most promising groups of natural compounds from which a new prototype of antifungal agents may be developed (Fontenelle et al. 2008; Fontenelle et al. 2007; Oliveira et al. 2007; Park et al. 2007; Mondelo et al. 2006).

The genus *Ocimum*, a member of the Lamiaceae family, contains 200 species of herbs and shrubs (Hakkim et al. 2008). This genus has a long history as culinary herbs and their essential oils possess a wide range of applications as ingredients in foods and as flavors, fragrances, and additives in cosmetics and toiletries (Vani et al. 2009). It is also a source of aroma compounds and essential oils containing biologically active constituents with pharmacological activities, such as antioxidant for *O. americanum*, *O. basilicum*, *O. basilicum* var. *purpurascens*, *O. micranthum* and *O. selloi* (Hakkim et al. 2008; Hussain et al. 2008; Trevisan et al. 2006; Sacchetti et al. 2004), insecticidal for *O. americanum*, *O. tenuiflorum* and *O. selloi* (Shadia et al. 2007; Furtado et al. 2005; Paula et al. 2003), antimicrobial for *O. basilicum*, *O. basilicum* var. *pilosum*, *O. basilicum* var. *purpurascens*

and *O. micranthum* (Zhang et al. 2009; Hussain et al. 2008; Nakhaei et al. 2006; Sacchetti et al. 2004; Suppakul et al. 2003) and analgesic for *O. selloi* (Franca et al. 2008) properties. However, the antifungal properties of some essential oils above-cited remain unknown.

The aims of this study were to determine the chemical constitution of the essential oils from *O. americanum*, *O. basilicum* var *purpurascens*, *O. basilicum* var *mininum*, *O. micranthum* and *O. selloi* and perform *in vitro* antifungal tests against *Candida* spp. and *Microsporum canis*.

Materials and methods

Plant material and extraction of essential oils

Leaves of the *Ocimum* species were collected in Francisco José de Abreu Matos Medicinal Plant Garden of Federal University of Ceará, situated in Fortaleza, Ceará capital, Brazil. The taxonomic identification was confirmed by Dr Raymond Harley from the Kew Gardens Herbarium and voucher specimens were deposited of the Prisco Bezerra Herbarium (Federal University of Ceará, Brazil) with reference numbers 18.670, 18.777, 17.611, 29,315 and 27.020 for *O. americanum*, *O. basilicum* var. *purpurascens*, *O. basilicum* var. *minimum*, *O. micranthum* and *O. selloi* respectively. The *Ocimum* species' essential oils were extracted from leaves by the steam distillation method in a Clevenger type apparatus, as described by Craveiro et al. (1976).

Gas-chromatography / mass spectral (GC-MS) analysis

The chemical analysis of the essential oils constituents was performed on a Shimadzu QP-2010 instrument employing the following conditions: column: DB-5ms (Agilent, part No. 122-5532) coated fused silica capillary column (30 m x 0.25mm x 0.25µm); carrier gas: He (1 mL/min, in constant linear velocity mode); injector temperature was 250 °C, in split mode (1:100), and the detector temperature was 250 °C. The column temperature programming was 35 to 180 °C at 4 °C/min then 180 to 280 °C at 17 °C/min, and at 280 °C for 10 min; mass spectra: electron impact 70 eV. The injected sample volume was 1 µL. Compounds were identified by their GC retention times relative to known compounds and by comparison of their mass spectra with those present in the computer data bank (National Institute for Standard Technology – NIST – 147,198 compounds) and published spectra (Adams, 2001).

Fungal strains

The strains were obtained from the URM (University Recife Mycologia) Culture Collection of Department of Mycology (Federal University of Pernambuco, Brazil), where they were maintained in mineral oil at 28°C. At the time of the analysis, an aliquot of each suspension was taken and inoculated onto potato dextrose agar (Difco, Detroit, MI, USA), and then incubated at 28°C for 2–10 days. A total of 3 strains of *Microsporum canis*, 1 strains of *Candida albicans*, 1 strains of *C. glabrata*, 1 strains of *C. tropicalis*, 1 strains of *C. krusei* and 1 strains of *C. parapsilosis* were included in this study. In addition, *C. parapsilosis* ATCC (America Type Culture Collection) 22 019 and *C. albicans* ATCC 11006 strains were used for quality control.

Antifungal susceptibility tests

Inoculum preparation

For the broth microdilution method, standardized inocula ($2.5 - 5 \times 10^3$ CFU/mL for *Candida* spp. and 5×10^4 CFU/mL for *M. canis*) were prepared by turbidimetry. Stock inocula were prepared on day 2 and day 10 for *Candida* spp. and *M. canis* cultures, respectively, grown on potato dextrose agar at 25°C. Sterile normal saline solution (0.9%; 3 mL) was added to the agar slant and the cultures were gently swabbed to dislodge the conidia from the hyphal mat for *M. canis* (Brilhante et al., 2005) and the blastoconidia from *Candida* spp. (Brito et al., 2007). The suspensions of conidia with hyphal fragments of *M. canis* and blastoconidia suspension of *Candida* spp. were transferred to sterile tubes. The suspensions were diluted to 1:2000 for *Candida* spp. and 1:5 for *M. canis*, both with RPMI 1640 medium (Roswell Park

Memorial Institute – 1640) with L-glutamine, without sodium bicarbonate (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.), buffered to pH 7.0 with 0.165M morpholinepropanesulfonic acid (MOPS) (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.), to obtain the inoculum size of approximately $2.5 - 5 \times 10^3$ for *Candida* spp. and 5×10^4 CFU/ml for *M. canis*.

Broth microdilution method

The minimum inhibitory concentration (MIC) for *Candida* spp. was determined by the broth microdilution method, in accordance with the Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI (formerly NCCLS; M27-A2), (NCCLS, 2002). The broth microdilution assay for *M. canis* was performed as described by Fontenelle et al. (2008), based on the M38-A document (CLSI; formerly NCCLS, 2002). The Minimum Fungicidal Concentration (MFC) for both *Candida* spp. and *M. canis* were determined according Fontenelle et al. (2008). In addition, *C. parapsilosis* (ATCC 22019) and *C. albicans* (ATCC 11006) strains were used as quality controls for broth microdilution method.

The essential oils of *Ocimum* species were prepared in 5% DMSO. Amphotericin B (Sigma, Chemical Co., USA) and griseofulvine (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) were prepared in DMSO and ethyl alcohol, respectively. For the susceptibility analysis, the drugs were diluted in RPMI 1640 (Sigma), and tested in a concentration range from 4 to 5000 $\mu\text{g ml}^{-1}$ for the essential oils and 0.01 and 16 $\mu\text{g ml}^{-1}$ for AMB and griseofulvine.

The microdilution assay was performed in 96-well microdilution plates. Growth and sterile control wells were included for each essential oil tested. The microplates were incubated at 37°C and read visually after 2 days for *Candida* spp. and 5 days for *M. canis*. The assays for all essential oils were run in duplicate and repeated at least twice. The MIC was defined as the lowest oil concentration that caused 100% inhibition of visible fungal

growth. The results were read visually as recommended by CLSI. The MFC was determined by subculturing of solution from wells without turbidity, on potato dextrose, at 28°C. The MFCs were determined as the lowest concentration resulting in no growth on the subculture after 2 days *Candida* spp. and 5 days for *M. canis*.

Results and Discussion

The chemical analyses by CG/MS revealed that *O. americanum* has (Z)-methyl cinnamate (29.4%), 1,8-cineole (25.9%), linalool (9.6%) and α -terpineol (9.3%) as main constituents. Shadia et al. (2007) cultivated *O. americanum* in Egypt and the analysis showed that the main constituents were eugenol, estragole, terpineol and farnesene. The authors postulated that *O.*

americanum has a dual biosynthetic pathway, in which two biosynthetic pathways can be thought of functioning either independently or simultaneously. One of them starts with shikimic acid via phenylalanine to produce estragole and eugenol. The second starts with mevalonic acid via geranyl pyrophosphate to produce linalool, then eugenol. This theory could be applied for Brazilian *O. americanum* species nevertheless the main compounds are different.

The main constituents of *O. basilicum* var. *purpurascens* oil are linalool (41.5%), α -muurulol (11.8%) and 1,8-cineole (8.9%). This result is in agreement with that obtained by Silva et al. (2003). The same authors showed that *O. basilicum* var. *minimum* oil presented as major components estragole (84-91%) while in the present work the main constituents were estragole (52.2%) and linalool (16.8%).

The essential oil of *O. micranthum* presented eugenol (64.8%) and *E*-caryophyllene (14.3) as major constituents, and *O. selloi* oil showed linalool (44.0%) and 1,8-cineole (15.5%) (Table 1). The structures of main compounds are given in Fig. 1. Previous analysis of *O. micranthum* showed as main constituent eugenol (91-84%) (Silva et al. 2004). This compound is a constituent of many antifungal essential oils from plants as example, *O. gratissimum* which demonstrated activity against filamentous and yeast fungi (Lemos et al. 2005; Koba et al, 2009). GC/MS analysis reported by Paula et al. (2003) of *O. selloi* oil revealed that its major constituents were methyl-chavicol or estragole (55.3%) and *trans*-anethole (34.2%). Estragole was already identified in high yield in the oil of *Croton zenhtneri* which demonstrated relevant antifungal activity against *Microsporum canis* (Fontenelle et al. 2008).

Among natural products, essential oils are one of the most promising groups from which a new prototype of antifungal agents can be developed (Fontenelle et al, 2008). Corroborating these opinions, different authors have evidenced the antifungal activity of

essential oils from plants of the genus *Ocimum*, such as *O. gratissimum*, which is active against *Cryptococcus neoformans* (Lemos et al. 2005), *Candida albicans* and dermatophytes (Koba et al. 2009), the *Ocimum basilicum* var. *pilosum* with activity against the pathogens (Zhang et al. 2009) and *O. basilicum* chemotype estragole and linalool are active against the phytopathogen *Botrytis faba* (Oxenham et al. 2005).

Through the broth microdilution method, this study shows that essential oil from *O. basilicum* var. *minimum* was effective only against *M. canis* strains with MIC ranging from 625 to 1250 $\mu\text{g ml}^{-1}$ and MFC ranging from 625 to 5000 $\mu\text{g ml}^{-1}$. *O. basilicum* var. *purpurascens* oil was effective against *C. albicans* and *C. parapsilosis* strains, with MIC 5000 $\mu\text{g ml}^{-1}$ and MFC >5000 $\mu\text{g ml}^{-1}$ and against *M. canis* strains with MIC ranging from 1250 to 2500 $\mu\text{g ml}^{-1}$ and MFC ranging from 2500 to 5000 $\mu\text{g ml}^{-1}$. It was seen that the *O. americanum* essential oil was effective against *M. canis*, *C. albicans*, *C. tropicalis* and *C. parapsilosis* strains, with MIC ranging from 2500 to 5000 $\mu\text{g ml}^{-1}$ and MFC ranging from 5000 to >5000 $\mu\text{g ml}^{-1}$ for *Candida* spp. strains and MIC ranging from 625 to 1250 $\mu\text{g ml}^{-1}$ and MFC 1250 $\mu\text{g ml}^{-1}$ against *M. canis* strains.

Nevertheless, the essential oils from *O. micranthum* and *O. selloi* were effective against all tested strains. It was seen that the MIC of *O. micranthum* ranged from 312.5 to 1250 $\mu\text{g ml}^{-1}$ and the MFC ranged from 625 to 1250 $\mu\text{g ml}^{-1}$ for the *Candida* species. The MIC for the *M. canis* strains was 312.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ and the MFC ranged from 312.5 to 625 $\mu\text{g ml}^{-1}$. The *O. selloi* essential oil showed MIC ranging from 312.5 to 1250 $\mu\text{g ml}^{-1}$ and MFC ranging from 625 to 5000 $\mu\text{g ml}^{-1}$ against *Candida* spp. strains and against the *M. canis* strains the MIC 625 $\mu\text{g ml}^{-1}$ and MFC ranging from 625 to 1250 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (Table 2).

The essential oil isolated from plantlets of *Thymus mastichina* L. ssp. *mastichina* was rich in 1,8-cineole (55.5%) and linalool (24.5%). The oil showed antifungal activity against

eight pathogenic fungi of the genus *Fusarium* with MICs and MFCs ranging from 1500 to 2100 µg/mL and from 2.0 to 2.4 mg/mL, respectively (Fraternale et al. 2003).

Previous studies demonstrated the antifungal activity of phenols such as eugenol (Lee et al. 2007; Kishore and Pandi, 2007), estragole and monoterpene alcohols such as linalool and 1,8-cineole (Hammer et al. 2003). The phenolic component eugenol reportedly induces potassium leakage and inhibits energy uptake or utilization in bacteria (Gill and Holley, 2004). Eugenol can damage envelopment of *Candida* by leaking substances (Chami et al. 2005). The antimicrobial activity of terpenes, including the monoterpene alcohols, has been attributed to their interactions with cellular membranes. At relatively low concentrations, these interactions may result in changes such as inhibition of respiration and alteration in permeability and at higher concentrations effects such as total loss of homeostasis, gross membrane damage and death may occur (Carson et al. 2002). The monoterpene alcohols are thought to be particularly antimicrobially active because of their relatively high water solubility and the presence of the alcohol moiety (Hammer et al. 2003).

The essential oils tested in this study were active against strains of *Candida* spp., opportunistic yeast in cases of candidemia in neonates (Xavier et al. 2008), recurrent oropharyngeal candidiasis in AIDS patients (Wingeter et al. 2007), among others. Moreover, it is frequent reporting of *Candida* infections in the veterinary clinic (Ozawa et al. 2005; Brown et al. 2005; Linek, 2004; Moretti et al. 2004). Resistance to azole derivatives has been monitored in strains of *Candida* spp. in human infections (Loeffler et al. 2000), but little is known about the impact of antifungal resistance in veterinary medicine. Brito et al. (2007), pioneer in study of evaluating the antifungal susceptibility profile of yeast cells from dogs, found strains of *C. albicans* and *C. tropicalis* resistant to ketoconazole, fluconazole and itraconazole.

The five essential oils tested showed lower MIC values against strains of *M. canis*, cosmopolitan species, endemic in the creations of cats, responsible for most cases of mycoses in pets and more frequent zoophilic dermatophyte of humans (Cafarchia et al. 2006).

The increasing resistance to antifungal drugs has stimulated the search for natural products as sources of bioactive compounds with potential antimicrobial, able to enhance the limited arms antifungal (Passos et al. 2002). Essential oils are compounds extracted from medicinal plants and their chemical constituents show broad antifungal activity *in vitro* (Mondello et al. 2006). Previous studies showed anticandidal activity of *Plectranthus amboinicus* essential oils (Oliveira et al. 2007), *Lippia sidoides* (Fontenelle et al. 2007), *Croton zehntneri* (Fontenelle et al. 2008), *Thymus pulegioides* (Pinto et al. 2006) and *Melaleuca alternifolia* (Mondello et al. 2006).

Owing to their antifungal activity, *in vitro*, *Ocimum* species essential oils, mainly *O. micranthum* and *O. selloi* are promising sources of new phytotherapeutic agents to treat mycoses. However, studies about the toxicity and efficacy *in vivo* must be performed to confirm its *in vitro* efficacy.

Acknowledgements

We are thankful for the financial support of FUNCAP (Ceará State Research Funding).

References

- Abad MJ, Ansuategui M, Bermejo P. Active antifungal substances from natural sources. *Arkivoc Online* Ed 2007;vii:116-145.
- Adams, R.P. *Identification of essential oil components by Gas Chromatography Quadrupole Mass Spectroscopy*, Allured Publishing Corporation, USA, 2001.
- Brito, E. H. S.; Fontenelle, R. O. S.; Brilhante, R. S. N.; Cordeiro, R. A.; Soares Júnior, F. A.; Monteiro, A. J.; Sidrim, J. J. C.; Rocha, M. F. G. Phenotypic characterization and in vitro antifungal sensitivity of *Candida* spp. and *Malassezia pachydermatis* strains from dogs. *The Veterinary Journal* 2007;174:147–153.

Brilhante RSN; Cordeiro RA; Medrano DJA; Monteiro AJ; Sidrim JJC; Rocha MFG. Antifungal susceptibility and genotypical pattern of *Microsporum canis* strains. Canadian Journal of Microbiology 2005;51:1480-3275.

Brown MR, Thompson CA, Mohamed FM. Systemic candidiasis in an apparently immunocompetent dog. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 2005;17:272–276, 2005.

Cafarchia C, Romito D, Capelli G, Guillot J, Otranto D. Isolation of *Microsporum canis* from the hair coat of pet dogs and cats belonging to owners diagnosed with *M. canis* tinea corporis. Europea Society of Veterinary Dermatology 2006;17:327-331.

Carson CF, Mee BJ, Riley TV. Mechanism of Action of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil on *Staphylococcus aureus* Determined by Time-Kill, Lysis, Leakage, and Salt Tolerance Assays and Electron Microscopy. Antimicrobial agents and chemotherapy 2002;46(6):1914–1920.

Chami N, Bennis S, Chami F, Aboussekhra A, Remmal A. Study of anticandidal activity of carvacrol and eugenol *in vitro* and *in vivo*. Oral Microbiology and Immunology 2005;20(2):106-111.

Craveiro AA, Matos FJA, Alencar JW. A simple and inexpensive steam generator for essential oils extraction. J Chem Edu 1976;53:652.

Fontenelle ROS, Morais SM, Brito EHS, Brilhante RSN, Cordeiro RA, Nascimento NRF, Kerntopf MR, Sidrim JJC, Rocha MFG. Antifungal activity of essential oils of *Croton* species from the Brazilian Caatinga biome. Journal of Applied Microbiology 2008;104(5)1383-1390.

Fontenelle ROS, Morais SM; Brito EHS, Kerntopf MR, Brilhante RSN, Cordeiro RA, Tomé A, Queiroz MG, Nascimento NR, Sidrim JJC, Rocha MFG. Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2007;59:934-940.

Franca CS, Menezes FS, Costa LCB, Niculau ES, Alves PB, Pinto JEB, Marçal RM. Analgesic and antidiarrheal properties of *Ocimum selloi* essential oil in mice. *Fitoterapia* 2008;79:569–573.

Fraternale, D., Giamperi, L., Ricci, D. Chemical composition and antifungal activity of essential oil obtained from in vitro plants of *Thymus mastichina* L. *Journal of essential oil Research* 2003; 15: 278 – 281.

Furtado RF, Lima MGA, Neto MA, Bezerra JNS, Silva MGV. Atividade Larvica de Óleos Essenciais Contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). *Neotropical Entomology* 2005;34(5):843-847.

Gill AO, Holley RA. Mechanisms of Bactericidal Action of Cinnamaldehyde against *Listeria monocytogenes* and of Eugenol against *L. monocytogenes* and *Lactobacillus sakei*. *Applied and environmental microbiology* 2004;70(10):5750-5755.

Hakkim FL, Arivazhagan G, Boopathy R. Antioxidant property of selected *Ocimum* species and their secondary metabolite content. *Journal of Medicinal Plants Research* 2008;2(9):250-257.

Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *Journal of Applied Microbiology* 2003;95:853–860.

Hussain AI; Anwar F; Sherazi STH; Przybylski R. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. *Food Chemistry* 2008;108:986-995.

Kishore GK, Pande S. Evaluation of Essential Oils and Their Components for Broad-Spectrum Antifungal Activity and Control of Late Leaf Spot and Crown Rot Diseases in Peanut. *Plant Disease* 2007;91(4).

- Kliemann DA, Pasqualotto AC, Falavigna M, Giaretta T, Severo LC. *Candida* esophagitis: species distribution and risk factors for infection Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo 2008;50(5):261-263.
- Koba K, Poutouli PW, Raynaud C, Sanda K. Antifungal activity of the essential oils from *Ocimum gratissimum* L. grown in Togo. J. Sci. Res. 2009;1(1):164-171.
- Lee SJ, Han JI, Lee GS, Park MJ, Choi IG, Na KJ, Jeung EB. Antifungal Effect of Eugenol and Nerolidol against *Microsporum gypseum* in a Guinea Pig Model. Biol. Pharm. Bull 2007;30(1):184-188.
- Lemos JA, Passos XS, Fernandes OFL, Paula JR, Ferri PH, Hasimoto e Souza LK, Lemos AA, Silva MRR. Antifungal activity from *Ocimum gratissimum* L. towards *Cryptococcus neoformans*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 2005;100(1):55-58.
- Linek J. Mycotic endophthalmitis in a dog caused by *Candida albicans*. Veterinary Ophthalmology 2004;7:159–162.
- Loeffler J, Hagmeyer L, Hebart H, Henke N, Schumacher U, Einsele H. Rapid detection of point mutations by fluorescence resonance energy transfer and probe melting curves in *Candida* species. Clinical Chemistry 2000;46:631–635.
- Mondello F, De Bernardis F, Girolamo A, Cassone A, Salvatore G. *In vivo* activity of terpinen-4-ol, the main bioactive component of *Melaleuca alternifolia* Cheel (tea tree) oil against azole-susceptible and -resistant human pathogenic *Candida* species. BMC Infectious Diseases 2006;6:158.
- Moretti A, Posteraro B, Boncio L, Mechelli L, Gasperis E, Agnetti F, Raspa M. Diffuse cutaneous candidiasis in a dog. Diagnosis by PCR-REA. Revista Iberoamericana de Micologia 2004;21:139–142.

Nakhaei, M. M.; Malekzadeh, F.; Khaje-Karamoddin, M.; Ramezani, M. *In vitro* Anti-*helicobacter pylori* effects of sweet Brasil (*Ocimum basilicum* L.) and Purple Brasil (*Ocimum basilicum* var. *purpurascens*). Pakistan Journal of Biological Sciences 2006;9(15):2887-2891.

NCCLS M27A. *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: Approved standard M27A*. National Committee Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA; USA: vol. 27, 9, 2002.

NCCLS M38A. *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi: Approved standard M38A*. National Committee Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA; USA: vol. 22, 16, 2002.

Oliveira RAG, Lima EO, Souza EL, Vieira WL, Freire KRL, Trajano, VN, Lima IO, Silva-Filho RN. Interference of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng essential oil on the anti-*Candida* activity of some clinically used antifungals. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 2007;17(2):186-190.

Oxenham SK, Svoboda KP, Walters DR. Antifungal activity of the essential oil of basil (*Ocimum basilicum*). *Journal of phytopathology* 2005;153(3):174-180.

Ozawa H, Okabayashi K, Kano R, Watari T, Watanabe S, Hasegawa A. Rapid identification of *Candida tropicalis* from canine cystitis. *Mycopathologia* 2005;160:159–162.

Park MJ, Gwak KS, Yang I, Choi WS, Jo HJ, Chang JW, Jeung EB, Choi IG. Antifungal Activities of the Essential Oils in *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. Et Perry and *Leptospermum petersonii* Bailey and their Constituents against Various Dermatophytes. *The Journal of Microbiology* 2007;45(5):460-465.

Passos XS, Santos SC, Ferri PH, Fernandes OFL, Paula TF, Garcia ACF, Silva MRR. Atividade antifúngica de *Caryocar brasiliensis* (Caryocaraceae) sobre *Cryptococcus neoformans*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2002;35:623-627.

Paula JP, Gomes-Carneiro MR, Francisco JR, Paumgarten FJR. Chemical composition, toxicity and mosquito repellency of *Ocimum selloi* oil. *Journal of Ethnopharmacology* 2003;88(2-3):253-260.

Pinto E, Pina-Vaz C, Salgueiro L, Gonçalves MJ, Costa-de-Oliveira S, Cavaleiro C, Rodrigues A PA, Martinez-de-Oliveira J. Antifungal activity of the essential oil of *Thymus pulegioides* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *Journal of Medical Microbiology* 2006;55:1367–1373.

Sacchetti, G.; Medici, A.; Maietti, S.; Radice, M.; Muzzoli, M.; Manfredini, S.; Braccioli, E.; Bruni R. Composition and Functional Properties of the Essential Oil of Amazonian Basil, *Ocimum micranthum* Willd., Labiatae in Comparison with Commercial Essential Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2004; 52(11):3486-3491.

Shadia E, Abd EA, Omer EA, Sabra AS. Chemical Composition of *Ocimum americanum* Essential Oil and Its Biological Effects Against, *Agrotis ipsilon*, (Lepidoptera: Noctuidae). *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences* 2007;3(6):740-747.

Silva MGV, Matos FJA, Lopes PRO, Silva FO, Holanda MT. Composition of essential oils from three *Ocimum* species obtained by steam and microwave distillation and supercritical CO₂ extraction. *Arkivoc Online Ed* 2004;vi:66-71.

Silva MGV, Matos FJA, Machado MIL, Craveiro AA. Essential oils of *Ocimum basilicum* L., *O. basilicum* var. *minimum* and *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* grown in North-eastern Brazil. *Flavour and Fragrance Journal* 2003;18(1):13-14, 2003.

Suppakul P, Miltz J, Sonneveld K, Bigger SW. Antimicrobial properties of basil and its possible application in food packaging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2003;51(11):3197-3207

Trevisan MTS, Silva MGV, Pfundstein B, Spiegelhalder B, Owen RW. Characterization of the Volatile Pattern and Antioxidant Capacity of Essential Oils from Different Species of the Genus *Ocimum*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2006;54(12):4378-4382.

Vani SR, Cheng SF, Chuah CH. Comparative Study of Volatile Compounds from Genus *Ocimum*. American Journal of Applied Sciences 2009;6(3):523-528.

Wingeter, M. A.; Guilhermetti, E.; Shinobu, C. S.; Takaki, I.; Svidzinski, T. I. E.. Identificação microbiológica e sensibilidade *in vitro* de *Candida* isoladas da cavidade oral de indivíduos HIV positivos. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 2007;40(3):272-276.

Xavier PCN, Chang MR, Nunes MO, Palhares DB, Andreotti e Silva R. Candidemia neonatal, em hospital público do Mato Grosso do Sul. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 2008;41(5):459-463.

Zhang JW, Li SK, Wu WJ. The main chemical composition and in vitro antifungal activity of the essential oils of *Ocimum basilicum* Linn. var. *pilosum* (Willd.) Benth. Molecules 2009;14:273-278.

Figure 1. Structures of main compounds of the essential oils of *Ocimum* species

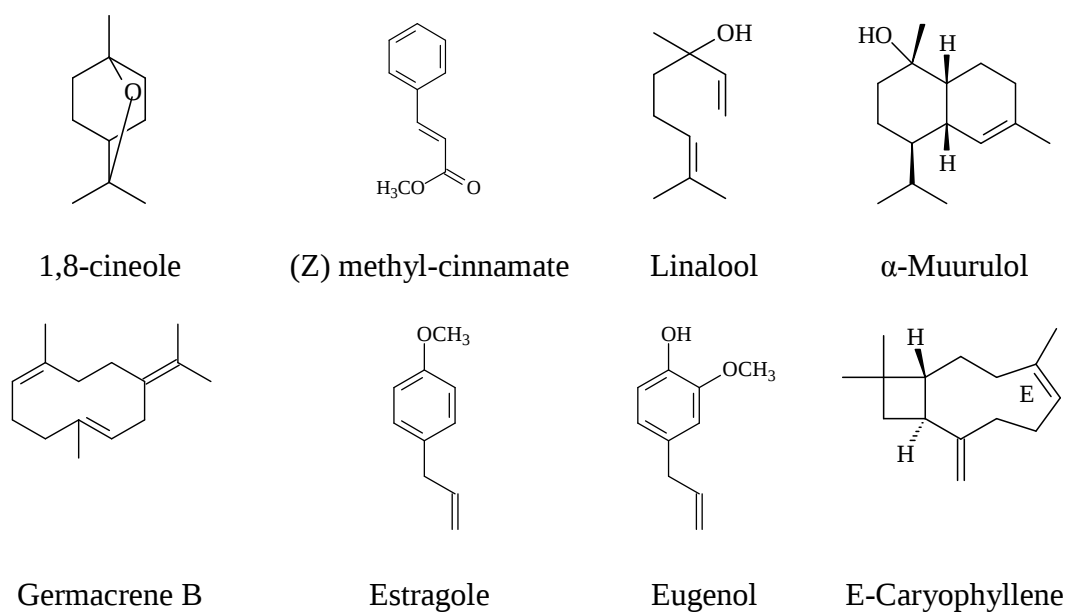


Table 1. Chemical composition of the essential oils of *Ocimum* species

K.I.*	Components	Composition (%**)				
		<i>O.a.</i>	<i>O.b.p.</i>	<i>O.b.m.</i>	<i>O.m.</i>	<i>O.s.</i>
984	β -Pinene	5.8	1.5			2.6
987	Myrcene	-	1.0			1.9
1030	1,8-Cineole	25.9	8.9	7.4	1.5	15.5
1037	(E)- β -Ocimene	-	3.1			4.2
1044	γ -Terpinene	0.5	1.3			2.0
1065	(Z)-Sabinene hydrate			0.8		
1079	(Z)-Linalool oxide			2.8		
1094	(E)-Linalool oxide			2.6		
1108	Linalool	9.6	41.5	16.8	0.7	44.0

1150	Camphor	-	0.9	1.7	1.7
1161	Terpinen-4-ol	3.5	-	2.1	0.7
1182	α -Terpineol	9.3	-		-
1243	Estragole	-	-	52.2	5.7
1285	Bornyl acetate	-	1.2	0.8	0.6
1289	Thymol	-	1.1		0.8
1314	(Z)-Methyl cinnamate	29.4	-		-
1356	Eugenol	-	1.3	64.8	1.1
1378	α -Copaene	-	0.6		-
1392	β -Elemene	-	2.5		0.9
1403	Methyl eugenol	-	0.8		0.4
1420	(E)-Caryophyllene	-	-	14.3	-
1444	(Z)- α -Bergamotene	-	5.7		4.5
1445	α -Guaiene	-	0.9		0.4
1462	α -Humulene	3.1	2.7	2.3	1.1
1466	Allo-aromadendrene			0.7	
1470	γ -Muurolene	-	1.7		
1491	Germacrene D	2.6	5.9		3.4
1498	Bicyclogermacrene			8.1	
1505	Germacrene A			2.0	
1513	α -Bulnesene	3.1	-		1.2
1520	δ -Amorphene	2.3	-		-
1527	γ -Cadinene	-	5.6	1.1	2.6
1555	p-Methoxy- cinnamaldehyde			2.9	

1584	Elemicin				2.0
1605	Caryophyllene oxide	3.8	-		-
1612	Humulene epoxide II			0.9	
1623	1,10-di-epi-cubenol	0.8	-		0.7
1652	α -Muurulol	-	11.8	2.3	4.4

4678	625	1250	2500	2500	625	625	312.5	312.5	625	1250	0.25
4158	1250	1250	1250	5000	625	5000	312.5	625	625	1250	0.25
4962	1250	1250	2500	2500	1250	1250	312.5	312.5	625	625	0.125
Geometric mean	992.1	1250	1984	3150	787.5	1575	312.5	393.7	625	992.1	0.2

O.a., *Ocimum americanum*; *O.b.p.*, *Ocimum basilicum* var. *purpurascens*; *O.b.m.*, *Ocimum basilicum* var. *minimum*; *O.m.*, *Ocimum micranthum*; *O.s.*, *Ocimum selloi*, AMB, Amphotericin B; GRI, Griseofulvine.

MIC: Minimum inhibitory concentration expressed in $\mu\text{g mL}^{-1}$

MFC: Minimum fungicidal concentration expressed in $\mu\text{g mL}^{-1}$

NI = No inhibition

7 CONCLUSÕES GERAIS

- Os óleos essenciais de *O. americanum*, *O. basilicum* var. *purpurascens*, *O. micranthum* e *O. selloi* foram capazes de inibir, *in vitro*, cepas de *Candida* spp. e de *M. canis*. Destes, os óleos essenciais de *O. micranthum* e *O. selloi* foram os únicos capazes de inibir o crescimento de todas as espécies testadas;
- O óleo essencial mais eficaz foi o *O. micranthum*, pois apresentou menores valores de CIM;
- A atividade antifúngica dos óleos essenciais avaliados pode abrir perspectivas, no desenvolvimento de fitoterápicos eficazes e de baixo custo, podendo ser usados no tratamento de doenças infecciosas causadas por microrganismos;
- Estudos posteriores acerca da toxicidade podem levar ao emprego desses óleos *in vivo*.

8 PERSPECTIVAS

A partir dos resultados obtidos sobre a atividade antifúngica dos óleos essenciais de *O. americanum*, *O. basilicum* var. *purpurascens*, *O. basilicum* var. *minimum*, *O. micranthum* e *O. selloi* contra as cepas de *Candida* spp. e *M. canis*, observou-se que essas plantas constituem uma fonte biologicamente ativa com potencial exploração na busca de novos fármacos antifúngicos.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD, M. J.; ANSUATEGUI, M.; BERMEJO, P. Active antifungal substances from natural sources. *Arkivoc Online Ed.*, v. vii, p. 116-145, 2007.

AGRA, M. F.; SILVA, K. N. BASÍLIO, I. J. L. D.; FREITAS, P. F. J.; BARBOSA-FILHO, M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 18, n. 3, p. 472-508, 2008.

ALBUQUERQUE, U. P.; ANDRADE, L. H. C. Uso de recursos vegetais da caatinga: o caso do agreste do estado de Pernambuco (Nordeste do Brasil). *Interciencia*, v. 27, n. 7, p. 336-346, 2002.

AL-BURTAMANI, S. K. S.; FATOPE, M. O.; MARWAH, R. G.; ONIFADE, A. K.; AL-SAIDI, S. H. Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of the essential oil of *Haplophyllum tuberculatum* from Oman. *Journal of Ethnopharmacology*, v.96, p.107–112, 2005.

ALVARES-CASTELLANOS, P. P.; BISHOP, D.C.; PASCUAL-VILLALOBOS, J. M. Antifungal activity of the essential oil of flowerheads of garland chrysanthemum (*Chrysanthemum coronarium*) against agricultural pathogens. *Phytochemistry*, v.57, p.99-102, 2001.

ALVIANO, W. S.; MENDONÇA-FILHO R. R.; ALVIANO, D. S.; BIZZO, H. R.; SOUTO-PADRÓN, T.; RODRIGUES, M. L.; BOLOGNESE, A. M.; ALVIANO, C. S.; SOUZA, M. M. G. Antimicrobial activity of *Croton cajucara* Benth linalool-rich essential oil on artificial biofilms and planktonic microorganisms. *Oral Microbiol Immunol*, v. 20, p. 101–105, 2005.

AMARAL, C. N.; GUARIM, V. L. M. S. Estudo Etnobotânico da Comunidade Rural de Cascavel (Jangada-MT). *Revista Brasileira de Biociências*, v. 5, supl. 1, p. 894-896, 2007.

AMARAL, M. F. Z. J.; BARA, M. T. F. Avaliação da atividade antifúngica de extratos de plantas sobre o crescimento de fitopatógenos. *Revista Eletrônica de Farmácia*, v. 2, n. 2, p. 5-8, 2005.

AMARAL, J. F. DO. *Atividade antiinflamatória, antinociceptiva e gastroprotetora do óleo essencial de Croton sonderianus Muell. Arg.* Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Universidade Federal do Ceará, 2004.

ANGIONI, A.; BARRA, A.; CORONEO, V.; DESSI, S.; CABRAS, P. Chemical Composition, Seasonal Variability, and Antifungal Activity of *Lavandula stoechas* L. Ssp. *Stoechas* Essential Oils from Stem/Leaves and Flowers. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, n. 12, p. 4365, 2006.

ARAÚJO, M. E. M. *Química analítica aplicada aos produtos naturais*. Texto de apoio: Mestrado em química analítica aplicada, 2005.

AZEVEDO, S. K. S.; SILVA, I. M. Plantas medicinais e de uso religioso comercializadas em mercados e feiras livres no Rio de Janeiro, RJ, Brasil. *Acta botânica brasílica*, v. 20, n. 1, p. 185-194, 2006.

BALDA, A.C.; OTSUKA, M.; LARSSON, C. E. Ensaio clínico da griseofulvina e da terbinafina na terapia das dermatofitoses em cães e Gatos. *Ciência Rural*, v. 37, n. 3, p. 750-754, 2007.

BERTINI, L. M. PEREIRA, A. F.; OLIVEIRA, C. L. L.; MENEZES, E. A.; MORAIS, S. M.; CUNHA, F. A.; CAVALCANTI, E. S. B. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. *Infarma*. v. 17, n. 3/4, p. 80-83, 2005.

BLANK, A. F.; CARVALHO FILHO, J. L. S.; SANTOS NETO, A. L.; ALVES, P. B.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; SILVA-MANN, R.; MENDONÇA, M. C. Caracterização morfológica e agronômica de acessos de manjerição e alfavaca. *Horticultura Brasileira*, v. 22, n. 1, p. 113-116, 2004.

BORGES, K. B.; BAUTISTA, H. B.; GUILERA, S. Diabetes – utilização de plantas medicinais como forma opcional de tratamento. *Revista Eletrônica de Farmácia*, v. 5, n. 2, p. 12-20, 2008.

BRAGA, L. T.; NUNES-PINHEIRO, D. C. S.; SOUSA, J. A.V.; SILVA, F. M. S.; FARIAS, V. M.; LEITE, A. K. R. M.; LOPES, C. A. P.; FAÇO, O.; CAMPELLO, C. C.; COSTA, J. H.; NOGUEIRA, T. N. A. G. Efeito do levamisol e do extrato etanólico de folhas de *Momordica charantia* sobre a dermatofitose experimental em coelhos. *Ciência Animal Brasileira*, v. 8, n. 2, p. 285-295, 2007.

BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; MEDRANO, D. J. A.; MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Antifungal susceptibility and genotypical pattern of *Microsporum canis* strains. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 51, p. 1480-3275, 2005.

BRILHANTE, R. S. N.; PAIXÃO, G. C.; SALVINO, L. K.; DIÓGENES, M. J. N.; BANDEIRA, S. P.; ROCHA, M. F. G.; SANTOS, J. B. F.; SIDRIM, J. J. C. Epidemiologia e ecologia das dermatofitoses na cidade de Fortaleza: o *Trichophyton tonsurans* como importante patógeno emergente da *Tinea capitis*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. v. 33, p. 417-425, 2000.

BRITO, E. H. S.; FONTENELLE, R. O. S.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; SOARES JÚNIOR, F. A.; MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Phenotypic characterization and in vitro antifungal sensitivity of *Candida* spp. and *Malassezia pachydermatis* strains from dogs. *The Veterinary Journal*, v.174, p.147–153, 2007.

BRITO, E. H. S. *Caracterização fenotípica e perfil de sensibilidade antifúngica de cepas de candida spp e malassezia pachydermatis, oriundas de cães*. Dissertação (mestrado em ciências veterinárias) Universidade Estadual do Ceará, 2005.

BROWN, M.R., THOMPSON, C.A., MOHAMED, F.M. Systemic candidiasis in an apparently immunocompetent dog. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 17, p. 272–276, 2005.

CAFARCHIA, C.; ROMITO, D.; CAPELLI, G.; GUILLOT, J.; OTRANTO, D. Isolation of *Microsporum canis* from the hair coat of pet dogs and cats belonging to owners diagnosed with *M. canis* tinea corporis. *Europea Society of Veterinary Dermatology*, v. 17, p. 327-331, 2006.

CARSON, C.F.; MEE, B.J.; RILEY, T. V. Mechanism of Action of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil on *Staphylococcus aureus* Determined by Time-Kill, Lysis, Leakage, and Salt Tolerance Assays and Electron Microscopy. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 46, n. 6, p. 1914–1920, 2002.

CASTILHOS, T. S.; GIORDANI, R. B.; HENRIQUES, A. T.; MENEZES, F. S.; ZUANAZZI, J. Â. S. Avaliação in vitro das atividades antiinflamatória, antioxidante e antimicrobiana do alcalóide montanina. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 17, n. 2, p. 209-214, 2007.

CAVALEIRO, C.; PINTO, E.; GONÇALVES, M.J.; SALGUEIRO, L. Antifungal activity of juniperus essential oils against dermatophyte, aspergillus and candida strains. *Journal of applied microbiology*, v.100, p. 1333–1338, 2006.

CHAMI, N.; BENNIS, S.; CHAMI, F.; ABOUSSEKHRA, A.; REMMAL, A. Study of anticandidal activity of carvacrol and eugenol *in vitro* and *in vivo*. *Oral Microbiology and Immunology*, v. 20, n. 2, p. 106-111, 2005.

CHENG, S.; WU, C.; CHANG, H.; KAO, Y.; CHANG, S. Antitermitic and antifungal activities of essential oil of *calocedrus formosana* leaf And its composition. *Journal of Chemical Ecology*, v. 30, n. 10, 2004.

CHOWDHURY, Z.; ALAMGIR, A.N.M.; ALAUDDIN, M.; ISLAM, M. S.; CHAKMA, K.; HOQUE, M. R.; KABIR, G. M. Traditional knowledge related to medicinal and aromatic plants in tribal societies and the quantitative study of alkaloids in medicinal plants of the hill tracts in Bangladesh. *Pharmacognosy Magazine*, v. 4, n. 15 , 2008

CLARKSON, C., MAHARAJ, V. J.; CROUCH, N.R.; GRACE, O.M. ; PILLAY P.; MATSABISA, M. G.; BHAGWANDIN, N.; SMITH, P.J.; FOLB, P.I. *In vitro*

antiplasmodial activity of medicinal plants native to or naturalised in South Africa. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 92, p. 177–191, 2004.

CLEFF, M. B.; LIMA, A. P.; FARIA, R.O.; MEINERZ, A. R. M.; ANTUNES, T. Á.; ARAÚJO, F. B.; NASCENTE, P. S.; NOBRE, M. O.; MEIRELES, M. C. A. Isolation of *candida* spp from vaginal microbiota of healthy canine females during estrous cycle. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 36, p.201-204, 2005.

COELHO, A.C.; ALEGRIA, N.; RODRIGUES, J. Isolamento de dermatófitos em animais domésticos em Vila Real, Portugal. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.60, n.4, p.1017-1020, 2008.

COLA, M.; RAFACHO, B. M.; VUOLO, M. M.; LIMA, C. A H.; ROCHA, L. R. M.; MARQUES, M. O. M.; MORAES, L. A S. de; FACANALI, R. Óleo Essencial de *Ocimum selloi* Benth.: Atividade Antiulcerogênica. In: II SBOE – Simpósio Brasileiro de Óleos Essenciais, Campinas. *Documentos IAC*, v. 74, p. 120-120, 2003.

COLOMBO, A. L.; ALVES, S. H. Teste de susceptibilidade a antifúngicos. In: SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. *Micologia médica à luz de autores contemporâneos*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2004. cap. 10, p. 102-110.

COSTA, L. C. B.; PINTO, J. E. B P.; BERTOLUCCI, S. K. V.; ALVES, P. B.; EVANGELINO, T. S. Variação no rendimento e composição química do óleo essencial de folhas de atroveran (*Ocimum selloi* Benth.) inteiras e moídas sob condições de armazenamento. *Revista Brasileira Plantas Medicinais*, v. 11, n. 1, p. 43-48, 2009.

COSTA, MARCO ANTÔNIO C.; JESUS, JOSÉ G.; FARIAS, JOÃO G.; NOGUEIRA, JOÃO CARLOS M.; OLIVEIRA, ANDRÉ LUIZ R.; FERRI, PEDRO HENRIQUE. Variação estacional do óleo essencial em arnica (*Lychnofora ericoides* Mart.). *Revista de Biologia Neotropical*, v. 5, n. 1, p. 53-65, 2008.

COSTA, L. C. B.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V. Comprimento da estaca e tipo de substrato na programação vegetativa de atroveran. *Ciência rural*, v. 37, n. 4, p. 1157-1160, 2007.

COSTA FILHO, L. O.; ENCARNAÇÃO, C. R. F.; OLIVEIRA, A. F. M. Influência hídrica e térmica no crescimento e desenvolvimento de *Ocimum gratissimum* L. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v. 8, n. 2, p. 8-13, 2006.

CRAVEIRO, A. A.; MATOS F. J. A.; ALENCAR, J. W. A simple and inexpensive steam generator for essential oils extraction. *J Chem Edu*, v. 53, p. 652, 1976.

DAVID, E. F. S.; PIZZOLATO, M.; FACANALI, R.; MORAIS, L. A. S.; FERRI A. F.; MARQUES, M. O. M.; MING, L. C. Influencia da temperatura de secagem no rendimento e composição química do óleo essencial de *Ocimum selloi* benth. *Revista brasileira de plantas medicinais*, v. 8, n. 4, p. 66-70, 2006.

DESCHAMPS, C.; ZANATTA, J. L.; BIZZO, H. R.; OLIVEIRA, M. C.; ROSWALKA, L. C. Avaliação sazonal do rendimento do óleo essencial em espécies de menta. *Ciência agrotécnica*, v. 32, n. 3, p. 725-730, 2008.

DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. *Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica*. São Paulo: Editora Unesp, 2002.

DI STASIA, L. C.; OLIVEIRA, G. P.; CARVALHAESA, M. A.; QUEIROZ-JUNIORA, M.; TIENA, O. S.; KAKINAMIA, S. H.; REISB, M. S. Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. *Fitoterapia* v. 73, p. 69-91, 2002.

DUARTE, E. R.; RESENDE, J. C.; ROSA, C. A.; HAMDAN, J. S. Prevalence of yeasts and mycelial fungi in bovine parasitic otitis in the State of Minas Gerais, Brazil. *Journal of Veterinary Medicine Series B - Infectious Diseases and Veterinary Public Health*, v. 48, p. 631-635, 2001.

EHLERT, P. A. D.; BLANK, A. F.; CAMÊLO, L. C. A.; ALVES, P. B., MENEZES, A. P. P. Variação química de seis genótipos de manjerição no Estado de Sergipe. In: Congresso Brasileiro de Olericultura, 46º, 2006, Goiás. *Diversificação e industrialização na horticultura*, 2006.

FACANALI, R. *Estudo da biologia reprodutiva, diversidade Genética e química de populações de Ocimum selloi Benth.* Tese (Doutorado em Agronomia-Horticultura). Universidade estadual paulista, 2008.

FARAGO, P. V.; PAULA, J. P.; BITTENCOURT, J. M.; ZARPELLON, V.; CHECCHIA, L. E. M. Atividade antibacteriana de óleos essenciais de *Ocimum selloi* benth. (lamiaceae). *Publ. UEPG Ci. Biol. Saúde*, v. 10, n. 3/4, p. 59-63, 2004.

FONTENELLE, R. O. S.; MORAIS, S. M.; BRITO, E. H. S.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; NASCIMENTO, N. R. F.; KERNTOPF, M. R.; SIDRIM, J. J.C.; ROCHA, M. F.G. Antifungal activity of essential oils of *Croton* species from the Brazilian Caatinga biome. *Journal of Applied Microbiology*, v. 104, n. 5, p.1383-1390, 2008.

FONTENELLE, R. O. S.; MORAIS, S. M.; BRITO, E. H. S.; KERNTOPF, M. R.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; TOMÉ, A.; QUEIROZ, M. G.; NASCIMENTO, N. R.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.59, p.934-940, 2007.

FRANCA, C. S.; MENEZES, F. S.; COSTA, L. C. B.; NICULAU, E.S.; ALVES, P. B.; PINTO, J. E. B.; MARÇAL, R. M. Analgesic and antidiarrheal properties of *Ocimum selloi* essential oil in mice. *Fitoterapia*, v.79, p.569–573, 2008.

FRATERNALE, D., GIAMPERI, L., RICCI, D. Chemical composition and antifungal activity of essential oil obtained from in vitro plants of *Thymus mastichina* L. *Journal of essential oil Research*, v.15, p.278 – 281, 2003.

FUMAGALI, E.; GONÇALVES, R. A. C.; MACHADO, M. F. P. S.; VIDOTI, G. J.; OLIVEIRA, A. J. B. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 18, n. 4, p. 627-641, 2008.

FURTADO, R. F.; LIMA, M. G. A.; NETO, M. A.; BEZERRA, J. N. S.; SILVA, M. G. V. Atividade Larvívica de Óleos Essenciais Contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). *Neotropical Entomology*, v. 34, n. 5, p. 843-847, 2005.

GILL, A. O.; HOLLEY, R. A. Mechanisms of Bactericidal Action of Cinnamaldehyde against *Listeria monocytogenes* and of Eugenol against *L. monocytogenes* and *Lactobacillus sakei*. *Applied and environmental microbiology*, v.70, n. 10, p.5750-5755, 2004.

GIORDANI, R.; REGLI, P.; KALOUSTIAN, J.; MIKAÏL, C.; ABOU, L.; PORTUGAL, H. Antifungal Effect of Various Essential Oils against *Candida albicans*. Potentiation of Antifungal Action of Amphotericin B by Essential Oil from *Thymus vulgaris*. *Phytother*, v. 18, p.990–995, 2004.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GOVINDEN-SOULANGE, J.; MAGAN, N. A.; GURIB-FAKIM, A.; GAUVIN, J.; SMADJA, H. K. Chemical Composition and *in Vitro* Antimicrobial Activities of the Essential Oils from Endemic *Psiadia* Species Growing in Mauritius. *Pharmaceutical Society of Japan*, v. 27, n. 11, p.1814—1818, 2004.

GRAY, R.J.; KITE, G.C.; GOLDSTONE F.J.; BRYAN, S.E.; PATON, A.; PUTIEVSKY, E. Intraspecific taxonomy and essential oil chemotypes in Sweet basil, *ocimum basilicum*. *Phytochemistry*, v. 43, n. 5, p. 1033-1039, 1996.

HAKKIM, F. L.; ARIVAZHAGAN, G.; BOOPATHY, R. Antioxidant property of selected *Ocimum* species and their secondary metabolite content. *Journal of Medicinal Plants Research*, v.2, n.9, p. 250-257, 2008.

HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *Journal of Applied Microbiology*, v. 95, p. 853–860, 2003.

HEINRICH, M.; ANKLI, A.; FREI, B.; WEIMANN, C.; STICHER, O. Medicinal plants in Mexico: healers' consensus and cultural importance. *Sociedade ciência medicas*, v. 47, n. 11, p. 1859-1871, 1998.

HUSSAIN, A. I.; ANWAR, F.; SHERAZI, S. T. H.; PRZYBYLSKI, R. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. *Food Chemistry*, v. 108, p. 986-995, 2008.

JAWETZ, E.; MELNICK, L. J.; ADELBERG, E. A. *Microbiologia Médica*, Ed. Artmed, 7 ed., p. 568, 2005.

KISHORE, G. K.; PANDE, S. Evaluation of Essential Oils and Their Components for Broad-Spectrum Antifungal Activity and Control of Late Leaf Spot and Crown Rot Diseases in Peanut. *Plant Disease*, v. 91, n. 4, p. 375-379, 2007.

KLIEMANN, D.A.; PASQUALOTTO, A.C.; FALAVIGNA, M.; GIARETTA, T.; SEVERO, L. C. Candida esophagitis: species distribution and risk factors for infection. *Revista do Instituto de Medicina tropical de São Paulo*, v. 50, n. 5, p. 261-263, 2008.

KOBA, K.; POUTOULI, P.W.; RAYNAUD, C.; SANDA, K. Antifungal activity of the essential oils from *Ocimum gratissimum* L. grown in Togo. *Journal Science Research*, v. 1, n. 1, p.164-171, 2009.

KOCHE, D.K.; SHIRSAT, R.P.; SYED IMRAN, MOHD. NAFEES, A. K. ZINGARE AND K. A. DONODE. Ethnobotanical and Ethnomedicinal Survey of Nagzira Wild Life Sanctuary, District Gondia (M.S.) India- Part I. *Ethnobotanical Leaflets*, v. 12, p. 56-69, 2008.

LACAZ, C. DA S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E. M.; DE MELO, N. T. *Tratado de microbiologia médica*. São Paulo: Sarvier, 2002.

LEE, S. J.; HAN, J. I.; LEE, G. S.; PARK, M. J.; CHOI, I. G.; NA, K. J.; JEUNG, E. B. Antifungal Effect of Eugenol and Nerolidol against *Microsporum gypseum* in a Guinea Pig Model. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, v. 30, n. 1, p. 184-188, 2007.

LEMOS, J. A.; PASSOS, X. S.; FERNANDES, O. F. L.; PAULA, J. R.; FERRI, P. H.; HASIMOTO E SOUZA L. K.; LEMOS, A. A. Silva MRR. Antifungal activity from *Ocimum gratissimum* L. towards *Cryptococcus neoformans*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.100, n.1, p.55-58, 2005.

LIMA, C. B. N.; BELLETTINI, M. T.; SILVA, A. S.; CHEIRUBIM, A. P.; JANANI, J. K.; VIEIRA, M. A. V.; AMADOR, T. S. Uso de Plantas Medicinais pela População da Zona Urbana de Bandeirantes-PR. *Revista Brasileira de Biociências*, v. 5, n. 1, p. 600-602, 2007.

LINEK, J. Mycotic endophthalmitis in a dog caused by *Candida albicans*. *Veterinary Ophthalmology*, v. 7, p. 159–162, 2004.

LINO, C. S.; GOMES, P. B.; LUCETTI, D. L.; DIÓGENES, J. P. L.; SOUSA, F. C. F.; SILVA, M. G. V.; VIANA, G. S. B. Evaluation of Antinociceptive and Antiinflammatory Activities of the Essential Oil (EO) of *Ocimum micranthum* Willd. from Northeastern Brazil. *Phytotherapy research*, v.19, p.708–712, 2005.

LOEFFLER, J.; HAGMEYER, L.; HEBART, H.; HENKE, N.; SCHUMACHER, U.; EINSELE, H. Rapid detection of point mutations by fluorescence resonance energy transfer and probe melting curves in *Candida* species. *Clinical Chemistry*, v.46, p.631–635, 2000.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas*. São Paulo: Instituto Plantarum, 2002.

MARQUES, C. A.; LEITÃO, G. G.; BIZZO, H. R.; KRANZ, W. M.; PEIXOTO, A. L.; VIEIRA, R. C. Considerações anatômicas e análise de óleo essencial do hipanto e do fruto de *Hennecartia omphalandra* J. Poisson (Monimiaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 18, n. 3, p. 415-429, 2008.

MATASYOH, L. G.; MATASYOH, J. C.; WACHIRA, F. N.; KINYUA, M.G.; MUIGAI, A. W. T.; MUKIAMA, T. K. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. growing in Eastern Kenya. *African Journal of Biotechnology*, v. 6, n. 6, p. 760-765, 2007.

MATOS, J. M. D.; MATOS, M. E. O. *Farmacognosia: curso teórico – prático*. Fortaleza: edições UFC, 1989.

MICHEL, J.; DUARTE, R. E.; BOLTON, J. L.; HUANGA, Y. A. C.; VELIZ, M.; SOEJARTO, D. D.; MAHADY, G. B. Medical potential of plants used by the Q'eqchi Maya of Livingston, Guatemala for the treatment of women's health complaints. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 114, p. 92–101, 2007.

MILAN, E. P.; ZAROR, L. Leveduras: identificação laboratorial. In: SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. *Micologia médica à luz de autores contemporâneos*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2004. cap. 9, p. 89-101.

MONTELES, R.; PINHEIRO, C. U. B. Plantas medicinais em um quilombo maranhense: uma perspectiva etnobotânica. *Revista de biologia e ciências da terra*, v. 7, n. 2, 2007.

MONDELLO, F.; BERNARDIS, F.; GIROLAMO, A.; CASSONE, A.; SALVATORE, G. *In vivo* activity of terpinen-4-ol, the main bioactive component of *Melaleuca alternifolia* Cheel (tea tree) oil against azole-susceptible and -resistant human pathogenic *Candida* species. *BMC Infectious Diseases*, v.6, p.158, 2006.

MORAES, L. A. S.; FACANALI, R.; MARQUES, M. O. M.; MING, L. C.; MEIRELES, M. A. A. Phytochemical characterization of essential oil from *Ocimum selloi*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 74, n. 1, p. 183–186, 2002.

MORAIS, S. M.; BRAZ-FILHO, R. *Produtos naturais: estudos químicos e biológicos*. Fortaleza: EdUECE, 2007.

MORAIS, S. M.; CATUNDA JÚNIOR, F. E. A.; SILVA, A. R. A.; MARTINS NETO, J. S.; RONDINA, D.; CARDOSO, J. H. L. Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de *Croton* do Nordeste do Brasil. *Química nova*, v. 29, n. 5, p. 907-910, 2006.

MOREIRA, R. C. T.; COSTA, L. C. B.; COSTA, R. C. S.; ROCHA, E. A. Abordagem Etnobotânica acerca do Uso de Plantas Medicinais na Vila Cachoeira, Ilhéus, Bahia, Brasil. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, v. 21, n. 3, p. 205-11, 2002.

MORETTI, A., POSTERARO, B., BONCIO, L., MECHELLI, L., GASPERIS, E., AGNETTI, F., RASPA, M. Diffuse cutaneous candidiasis in a dog. Diagnosis by PCR-REA. *Revista Iberoamericana de Micologia*, v. 21, p. 139–142, 2004.

MORIELLO, K. A.; NEWBURY, S. Recommendations for the Management and Treatment of Dermatophytosis in Animal Shelters. *Veterinary clinics small animal*, v. 36, p. 89–114, 2006.

MULLER, R.S., BETTENAY, S.V., SHIPSTONE, M. Cutaneous candidiasis in a dog caused by *Candida guilliermondii*. *Veterinary Record*, v. 150, p. 728–730, 2002.

NAKAMURA, Y.; WATANABE, S.; HASEGAWA, A. Dermatomycosis in human and animals. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi*, v. 40, n. 1, p. 9-14, 1999.

NAKHAEI, M. M.; MALEKZADEH, F.; KHAJE-KARAMODDIN, M.; RAMEZANI, M. In vitro Anti-*helicobacter pylori* Effects of Sweet Brasil (*Ocimum basilicum* L.) and Purple Brasil (*Ocimum basilicum* var. *purpurascens*). *Pakistan Journal of Biological Sciences*, v.9, n.15, p. 2887-2891, 2006.

NASCIMENTO, P. F. C.; NASCIMENTO, A. C.; RODRIGUES, C. S.; ANTONIOLLI, Â. R.; SANTOS, P. O.; JÚNIOR, A. M. B.; TRINDADE, R.C. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v.17, n.1, p.108-113, 2007.

NCCLS M44A. *Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts; Approved guideline M44A*. National Committee Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA; USA: vol. 24, n. 15, 2004.

NCCLS M27A2. *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: Approved standard M27A2*. National Committee Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA; USA: vol. 27, 9, 2002.

NCCLS M38A. *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi: Approved standard M38A*. National Committee Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA; USA: vol. 22, 16, 2002.

NOBRE, M. O.; MEIRELES, M. C. A.; CORDEIRO, J. M. C. Importância do felino doméstico na epidemiologia da dermatofitose por *Microsporum canis*. *Revista da FZVA*, v. 7/8, p. 84-91, 2001.

OLIVEIRA, R. A. G.; LIMA, E. O.; SOUZA, E. L.; VIEIRA, W. L.; FREIRE, K. R. L.; TRAJANO, V. N.; LIMA, I. O.; SILVA-FILHO, R. N. Interference of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng essential oil on the anti-*Candida* activity of some clinically used antifungals. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.17, n.2, p.186-190, 2007.

OTERO, R.; NÚÑEZ, V.; BARONA, J.; FONNEGRA, R.; JIMÉNEZ, S. L.; OSORIO, R.G.; SALDARRIAGA, M.; DIAZ, A. Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia Part III: Neutralization of the haemorrhagic effect of *Bothrops atrox* venom. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 73, p. 233–241, 2000.

OXENHAM, S. K.; SVOBODA, K. P.; WALTERS, D. R. Antifungal activity of the essential oil of basil (*Ocimum basilicum*). *Journal of phytopathology*, v.153, n.3, p.174-180, 2005.

OZAWA, H., OKABAYASHI, K., KANO, R., WATARI, T., WATANABE, S., HASEGAWA, A. Rapid identification of *Candida tropicalis* from canine cystitis. *Mycopathologia*, v. 160, p. 159–162, 2005.

PANDEY V. N.; DUBEY, N. K. Effect of essential oils from some higher plants against fungi causing damping-off disease. *Biologia plantarum*, v. 34, n.1-2, p.143-147, 1992.

PARK, M. J.; GWAK, K. S.; YANG, I.; CHOI, W. S.; JO, H. J.; CHANG, J. W.; JEUNG, E. B.; CHOI, I. G. Antifungal Activities of the Essential Oils in *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. Et Perry and *Leptospermum petersonii* Bailey and their Constituents against Various Dermatophytes. *The Journal of Microbiology*, v. 45, n. 5, p. 460-465, 2007.

PASSOS, X. S.; SANTOS, S. C.; FERRI, P. H.; FERNANDES, O. F. L.; PAULA, T. F.; GARCIA, A. C. F.; SILVA, M. R. R. Atividade antifúngica de *Caryocar brasiliensis* (Caryocaraceae) sobre *Cryptococcus neoformans*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.35, p.623-627, 2002.

PAULA, J. P.; GOMES-CARNEIRO, M. R.; FRANCISCO, J. R.; PAUMGARTTEN, F. J. R. Chemical composition, toxicity and mosquito repellency of *Ocimum selloi* oil. *Journal of Ethnopharmacology*, v.88, n.2-3, p.253-260, 2003.

PAULA, J. P.; FARAGO, P. V.; RIBAS, J. L.C ; SPINARDI, G. M. S.; DÖLL, P. M.; ARTONI, R. F.; ZAWADZKI, S. F. *In vivo* evaluation of the mutagenic potential of estragole and eugenol chemotypes of *Ocimum selloi* Benth. essential oil. *Latin American Journal of Pharmacy*, v. 26, n. 6, p. 846-51, 2007.

PEREIRA, R. C.; OLIVEIRA, M. T. R.; LEMOS, G. C. S. Plantas utilizadas como medicinais no município de Campos de Goytacazes - RJ. *Revista Brasileira de farmacognosia*, v. 14, supl. 01, p. 37-40, 2004.

PILLA, M. A. C.; AMOROZO, M. C. M.; FURLAN, A. Obtenção e uso das plantas medicinais no distrito de Martim Francisco, Município de Mogi-Mirim, SP, Brasil. *Acta botânica brasílica*, v. 20, n. 4, p. 789-802, 2006.

PINTO, E.; PINA-VAZ, C.; SALGUEIRO, L.; GONÇALVES, M. J.; COSTA-DE-OLIVEIRA, S.; CAVALEIRO, C.; RODRIGUES, A. P. A. Martinez-de-Oliveira J. Antifungal activity of the essential oil of *Thymus pulegioides* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *Journal of Medical Microbiology*, v.55, p.1367–1373, 2006.

POTZERNHEIM, M., BIZZO, H. R., COSTA, A. T. S., VIEIRA, R. F., CARVALHO, C. M., GRACINDO, L. A. M. B. Chemical characterization of seven *Piper* species (Piperaceae) from Federal District, Brazil, based on volatile oil constituents. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v. 8, p. 10-12, 2006.

PRADO, M. R. *Isolamento de microsporum canis, malassezia spp. e candida tropicalis em cães: um destaque para teste de sensibilidade de malassezia pachydermatis in vitro*. Tese (doutorado em ciências veterinárias) Universidade Estadual do Ceará, 2007.

RABELO, M.; SOUZA, E. P.; SOARES, P. M. G.; MIRANDA, A. V.; MATOS, F. J. A.; CRIDDLE D. N. Antinociceptive properties of the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. (Labiatae) in mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 36, p. 521-524, 2003.

RICHARD, J. L.; DEBEY, M. C.; CHERMETTE, R. Advances in veterinary mycology. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, v. 32, p. 169-187, 1994.

ROCHA, G. M.; ROCHA, M. E. N. Uso popular de plantas medicinais. *Saúde & Ambiente em Revista*, v. 1, n. 2, p. 76-85, 2006.

ROMAGNOLI, C.; BRUNI, R.; ANDREOTTI, E.; RAI, M. K.; VICENTINI, C. B.; MARES, D. Chemical characterization and antifungal activity of essential oil of capitula from wild Indian *Tagetes patula* L. *Protoplasma*, v.225, p. 57–65, 2005.

RUIZ, A. L. T. G.; TAFFARELLO, D.; SOUZA, V. H. S.; CARVALHO, J. E. Farmacologia e toxicologia de *Peumus boldus* e *Baccharis genistelloides*. *Revista Brasileira de farmacognosia*, v. 18, n. 2, p. 295-300, 2008.

SACCHETTI, G.; MEDICI, A.; MAIETTI, S.; RADICE, M.; MUZZOLI, M.; MANFREDINI, S.; BRACCIOLI, E.; BRUNI R. Composition and Functional Properties of the Essential Oil of Amazonian Basil, *Ocimum micranthum* Willd., Labiatae in Comparison with Commercial Essential Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 52, n. 11, p. 3486-3491, 2004.

SÁNCHEZ-MEDINA, A.; GARCÍA-SOSA, K.; MAY-PAT, F.; PEÑA-RODRÍGUEZ, L. M. Evaluation of the biological activity of crude extracts from plants used in Yucatecan Traditional Medicine. Part II. DNA-interacting activity. *Phytomedicine*, v. 8, n.3, p. 236–239, 2001.

SANTORO, G. F.; CARDOSO, M.G.; GUIMARÃES, L.G. L. ; MENDONÇA, L. Z.; SOARES, M. J. *Trypanosoma cruzi*: Activity of essential oils from *Achillea millefolium* L., *Syzygium aromaticum* L. and *Ocimum basilicum* L. on epimastigotes and trypomastigotes. *Experimental Parasitology*, v.116, p. 283–290, 2007.

SANZ-BISET, J.; CAMPOS-DE-LA-CRUZ, J.; EPIQUIÉN-RIVERA, M.A.; CAÑIGUERAL, S. A first survey on the medicinal plants of the Chazuta valley (Peruvian Amazon). *Journal of Ethnopharmacology*, v. 122, p. 333–362, 2209.

SARTORI, M. R. K. *Atividade antimicrobiana de frações de extratos e compostos puros obtidos das flores da Acmela brasiliensis Spreng (Wedelia paludosa) (Asteraceae)*. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade do Vale do Itajaí, 2005.

SCHAECHTER, M. E.; ENGLEBERG, N. C.; EISENSTEIN, B. I.; MEDOFF, G. *Microbiologia: mecanismos das doenças infecciosas*. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

SEYOUM, A.; PALISSON, K., KUNG'A, S. E. W.; LWANDE, W. G. F.; KILLEER; HASSAUALI, A.B.G. J. Traditional use of mosquito-repellent plants in western Kenya and their evaluation in semi-field experimental huts against *Anopheles gambiae*: ethnobotanical studies and application by thermal expulsion and direct burning. *Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene*, v. 96, p. 225-231, 2002.

SHADIA, E.; ABD EL-AZIZ; OMER, E.A.; SABRA, A. S. Chemical Composition of *Ocimum americanum* Essential Oil and Its Biological Effects Against, *Agrotis ipsilon*, (Lepidoptera: Noctuidae). *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, v. 3 n. 6, p. 740-747, 2007.

SHAHID, M.; TAYYAB, M.; NAZ, F.; JAMIL, A.; ASHRAF M.; GILANI, A. H. Activity-guided Isolation of a Novel Protein from *Croton tiglium* with Antifungal and Antibacterial Activities. *Phytotherapy research*, v. 22, p.1646–1649, 2008.

SHARMA, N.; TRIPATHI, A. Fungitoxicity of the essential oil of *Citrus sinensis* on post-harvest pathogens. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v.22, p.587–593, 2006.

SIDRIM, J. J. C.; BRILHANTE, R. S. N.; ROCHA, M. F. G. Aspectos clínicos laboratoriais das dermatofitoses. In: SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. *Micologia médica à luz de autores contemporâneos*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2004. cap. 14, p. 135-161.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G.; CORDEIRO, R. A. Biologia dos fungos. In: SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. *Micologia médica à luz de autores contemporâneos*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2004. cap. 5, p. 41-49.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Candidíase. In: SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. *Micologia médica à luz de autores contemporâneos*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2004. cap. 25, p. 265-273.

SILVA, A. B.; SOUZA, M. F.; SILVA, A. H. B.; SILVA, A. B.; MAFFEI, E. M. D.; AMARA, C. L. F. Descrição morfológica e fenologia floral em alfavaca do campo (*Ocimum campechianum* Mill.). In: Congresso Brasileiro de Olericultura, 46º, 2006, Goiás. *Diversificação e industrialização na horticultura*, 2006.

SILVA, M. G. V.; MATOS, F. J. A.; LOPES, P. R. O.; SILVA, F. O.; HOLANDA, M. T. Composition of essential oils from three *Ocimum* species obtained by steam and microwave distillation and supercritical CO₂ extraction. *Arkivoc Online Ed.*, v. vi, p. 66-71, 2004.

SILVA, M. G. V.; MATOS, F. J. A.; MACHADO, M. I. L.; CRAVEIRO, A. A. Essential oils of *Ocimum basilicum* L., *O. basilicum* var. *minimum* and *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* grown in North-eastern Brazil. *Flavour and Fragrance Journal*, v.18, n.1, p.13-14, 2003.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P.R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS / Editora da UFSC, 2004.

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR., G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.;

BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*, v. 30, n. 2, p.351-355, 2007.

STOPPA, M. A.; CASEMIRO, L. A.; VINHOLIS, A. H. C.; CUNHA, W. R.; ANDRADE, M. L. S.; MARTINS, C. H. G. Estudo comparativo entre as metodologias preconizadas pelo CLSI e pelo EUCAST para avaliação da atividade antifúngica. *Química Nova*, v. 32, n. 2, p.498-502, 2009.

SUPPAKUL P, MILTZ J, SONNEVELD K AND BIGGER SW. Antimicrobial properties of basil and its possible application in food packaging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, n. 11, p. 3197-3207, 2003.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. *Microbiologia*, 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2002.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. *Microbiologia*, 4 ed. São Paulo: Atheneu, 2004.

TREVISAN, M.T. S.; SILVA, M. G. V.; PFUNDSTEIN, B.; SPIEGELHALDER, B.; OWEN, R.W. Characterization of the Volatile Pattern and Antioxidant Capacity of Essential Oils from Different Species of the Genus *Ocimum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, n. 12, p. 4378-4382, 2006.

TUROLLA, M. S. R.; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 42, n. 2, p. 289-306, 2006.

UEDA-NAKAMURA, T.; MENDONÇA-FILHO, R. R.; MORGADO-DÍAZ, J. A.; MAZA, P. K.; DIAS FILHO, B. P.; CORTEZ, D. A. G.; ALVIANO, D. S.; ROSA, M. S. S.; LOPES, A.H.C.S.; ALVIANO, C. S.; NAKAMURA, C. V. Antileishmanial activity of Eugenol-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*. *Parasitology International*, v. 55, p. 99 – 105, 2006.

VANDERLINE, F. A.; COSTA, E. A.; D'ANGELO, L. C. A. Atividades farmacológicas gerais e atividade antiespasmódica do extrato etanólico de *Ocimum selloi* Benth., (elixir paregórico). In: Anais do Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, Fortaleza, UFC, 1994.

VANI, S. R.; CHENG, S.F.; CHUAH, C.H. Comparative Study of Volatile Compounds from Genus *Ocimum*. *American Journal of Applied Sciences*, v. 6, n. 3, p. 523-528, 2009.

VIEIRA, R.F.; GRAYER, R.J.; PATON, A. J. Chemical profiling of *Ocimum americanum* using external flavonoids. *Phytochemistry*, v. 63, p. 555–567, 2003.

VIEIRA R. F.; SIMON J. E. Chemical characterization of basil(*Ocimum* spp.) Found in the markets and used in traditional medicine in Brazil. *Economic Botany*, v. 54, n. 2, p. 207-216, 2000.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Química Nova*, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

VIYUCH, J.; PISUTTHANAN, N.; FAIKREUA, A.; NUPANGTA, K.; WANGTORPOL, K.; NGOKKUEN, J. Evaluation of in vitro antimicrobial activity of Thai basil oils and their micro-emulsion formulas against *Propionibacterium acnes*. *International Journal of Cosmetic Science*, v. 28, p. 125–133, 2006.

XAVIER, P. C. N.; CHANG, M. R.; NUNES, M. O.; PALHARES, D. B.; ANDREOTTI E SILVA, R. Candidemia neonatal, em hospital público do Mato Grosso do Sul. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.41, n.5, p.459-463, 2008.

WINGETER, M. A.; GUILHERMETTI, E.; SHINOBU, C. S.; TAKAKI, I.; SVIDZINSKI, T. I. E. Identificação microbiológica e sensibilidade *in vitro* de *Candida* isoladas da cavidade oral de indivíduos HIV positivos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 40, n.3, p.272-276, 2007.

ZANARDI D.; NUNES, D. H.; PACHECO, A. S.; TUBONE, M. Q.; SOUZA FILHO, J. J. Avaliação dos métodos diagnósticos para onicomicose. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 83, n. 2, p. 119-24, 2008.

ZHANG, J. W.; LI SK, W. W. J. The main chemical composition and in vitro antifungal activity of the essential oils of *Ocimum basilicum* Linn. var. *pilosum* (Willd.) Benth. *Molecules*, v.14, p. 273-278, 2009.