

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E PARASITOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA



Tese

**CANDIDA SPP. NA CAVIDADE ORAL DE INDIVÍDUOS HOSPITALIZADOS E
NÃO-HOSPITALIZADOS E AÇÃO ANTIFÚNGICA DE ÓLEOS ESSENCIAIS
SOBRE ISOLADOS DE CANDIDÍASE ATRÓFICA CRÔNICA**

Juliana Nunes Vieira

Pelotas, 2016

JULIANA NUNES VIEIRA

***CANDIDA* SPP. NA CAVIDADE ORAL DE INDIVÍDUOS HOSPITALIZADOS E
NÃO-HOSPITALIZADOS E AÇÃO ANTIFÚNGICA DE ÓLEOS ESSENCIAIS
SOBRE ISOLADOS DE CANDIDÍASE ATRÓFICA CRÔNICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (área de conhecimento: Parasitologia).

Orientador: Prof. Dr^a. Patrícia da Silva Nascente

Pelotas, 2016

Banca examinadora:

Prof. Dr^a. Patrícia da Silva Nascente (UFPel) (Orientadora)

Prof. Dr^a. Maria Elisabeth Aires Berne (UFPel)

Prof. Dr^a. Marlete Brum Cleff (UFPel)

Prof. Dr^a. Renata Osório de Faria (UFPel)

Prof. Dr. Rogério Antonio Freitag (UFPel)

Prof. Dr^a. Ana Raquel Mano Meinerz (UFPel) (Suplente)

Dedico este trabalho aos meus pais, Salatiel e Etienne,
ao meu esposo Marcos, e a minha filha Luisa,
por todo amor, carinho, compreensão e incentivo.

Agradecimentos:

Agradeço a Deus, pelo AMOR maior, pelas bênçãos e por ter me concedido o privilégio de construir uma família maravilhosa e realizar este grande desafio.

Aos meus pais Salatiel e Etienne, pela vida, por serem responsáveis pela pessoa que sou, pelo incentivo, apoio e pelo amor a mim dedicados. Agradeço por sempre terem acreditado em mim e por ensinarem que na vida nunca devemos desistir de nossos sonhos.

Ao meu marido Marcos, minha eterna gratidão, amor e reconhecimento pela grande ajuda, força, compreensão, paciência e carinho - estímulo indispensável em todos os momentos - e por fazer parte da minha vida. A minha querida filha Luisa, pelo grande amor e carinho dedicados a mim, e que me fazem continuar sempre. Amo vocês!

Aos meus irmãos Caio e Manuela, meus maiores amigos, fiéis companheiros, por estimularem e apoiarem a busca deste objetivo.

Às minhas queridas avós, Arlinda e Dalva, agradeço pelo carinho que sempre tiveram comigo.

À minha orientadora, Prof. Patrícia da Silva Nascente, pela amizade, incentivo, pela credibilidade a mim conferida, e por suas sugestões e conhecimentos na realização deste projeto.

Ao Prof. Rogério Freitag, por ter cedido as plantas e ter disponibilizado seu laboratório para a extração dos óleos essenciais.

Aos Profs. Beth, Marlete, Renata e Rogério, por terem aceitado o convite de fazer parte da minha banca examinadora. Muito obrigada!

À Prof. Adriana da Silva, por seu auxílio na realização do teste de citotoxicidade, na faculdade de odontologia.

Aos colegas de laboratório Carol, Pedro, Cristina, Pablo, Isabele, por todos os momentos bons compartilhados, pela amizade e grande ajuda no decorrer dessa jornada.

À querida colega Carol, pela sua amizade, apoio, e disposição em ajudar em várias etapas do trabalho. Obrigada de coração!

Ao colega Pablo, pela sua disponibilidade, carinho e auxílio para realizar as traduções dos artigos.

Às colegas Victoria e Ivandra, por terem realizado as extrações e cromatografias dos óleos essenciais e por toda ajuda quando precisei.

Aos professores e funcionários do Departamento de Microbiologia e Parasitologia.

À UFPel e à coordenação do Programa de Pós-Graduação de Parasitologia, pela oportunidade única de crescimento profissional e pessoal.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela concessão da bolsa de estudo que viabilizou essa pesquisa.

Enfim, agradeço a todos que de alguma maneira, colaboraram para a realização deste trabalho.

“Superar é preciso.

Seguir em frente é essencial.

Olhar para traz é perda de tempo.

Passado se fosse bom era presente.”

(Clarice Lispector)

Resumo:

VIEIRA, J. N. ***Candida* spp. na cavidade oral de indivíduos hospitalizados e não-hospitalizados e ação antifúngica de óleos essenciais sobre isolados de Candidíase Atrófica Crônica**. 2016. 82f. Tese (Doutorado em Parasitologia) – Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Um dos objetivos deste estudo foi comparar a frequência de *Candida* spp. na cavidade oral de indivíduos hospitalizados e não-hospitalizados. Como a candidíase constitui a infecção micótica bucal mais comum, a mesma é frequente em usuários de aparelhos protéticos, que podem desenvolver a candidíase atrófica crônica. Portanto, devido à resistência aos fármacos antifúngicos e tendo a necessidade de obtenção de novos compostos terapêuticos para o tratamento de candidíase oral, outro objetivo desta pesquisa foi avaliar a composição química e a citotoxicidade dos óleos essenciais de *Cuminum cyminum* (cominho), *Anethum graveolens* (endro), *Pimpinella anisum* (erva-doce) e *Foeniculum vulgare* (funcho), bem como a sua atividade antifúngica *in vitro* contra isolados de *Candida* spp.. Os resultados mostraram colonização de *Candida* spp. em 47,1% dos indivíduos não-hospitalizados e de 85,7% dos pacientes hospitalizados, sendo que os hospitalizados apresentaram 6,73 vezes mais chances de possuir *Candida* spp.. Os principais componentes químicos dos óleos essenciais foram cuminaldeído (32,66%) para o cominho, carvona (34,89%) para o endro, *trans*-anetol (94,01%) para a erva-doce e anetol (79,62%) para o funcho. No ensaio de viabilidade celular, realizado com fibroblastos de ratos, os óleos de funcho e erva-doce não foram citotóxicos em todas as concentrações testadas, no entanto, o óleo de cominho foi citotóxico na concentração de 20 mg.mL⁻¹ e o óleo de endro nas concentrações de 20 e 8 mg.mL⁻¹. Todas as dez leveduras foram sensíveis aos óleos essenciais avaliados, sendo o óleo de *C. cyminum* o que apresentou a menor Concentração Inibitória Mínima (CIM), de 4,375mg.mL⁻¹. Pode-se concluir que *Candida* spp. está presente em maior frequência em pacientes hospitalizados e que os óleos essenciais de *C. cyminum*, *P. anisum* e *F. vulgare* não foram citotóxicos nas mesmas concentrações inibitórias mínimas obtidas para os fungos.

Palavras-chave: citotoxicidade, concentração inibitória mínima, óleos essenciais, Apiaceae, candidíase.

Abstract:

VIEIRA, J. N. ***Candida* spp. na cavidade oral de indivíduos hospitalizados e não-hospitalizados e ação antifúngica de óleos essenciais sobre isolados de Candidíase Atrófica Crônica.** 2016. 82f. Tese (Doutorado em Parasitologia) – Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

One of the aims of this study was to compare the frequency of *Candida* spp., in the oral cavity of non-hospitalized and hospitalized subjects. Candidiasis constitutes the most common oral mycotic infection, with a high frequency in users with prosthetic devices, who can develop chronic atrophic oral candidiasis. Therefore, due to the antifungal drug resistance and with the need to obtain new therapeutic compounds for the oral candidiasis treatment, the other aim of this research was to evaluate the chemical composition and the cytotoxicity of the essential oils of *Cuminum cyminum* (cumin), *Anethum graveolens* (dill), *Pimpinella anisum* (anise) and *Foeniculum vulgare* (fennel), as well as their *in vitro* antifungal activity against isolates of *Candida* spp. The results showed colonization of *Candida* spp., in 47,1% of the non-hospitalized individuals and of 85,7% in the hospitalized patients, being that these presented 6,73 times more likely to have *Candida* spp. The main chemical components of the essential oils were; the cuminaldehyde (32,66%) for the cumin, the carvone (34,89%) for the dill, the trans-anethole (94,01%) for the anise and the anethole (79,62%) for the fennel. In the cellular viability assay, performed in mice's fibroblasts, the fennel and anise essential oils were not cytotoxic in all the tested concentrations; however the cumin essential oil was cytotoxic in the concentration of 20 mg.mL⁻¹ and the dill essential oil in the concentrations of 20 and 8 mg.mL⁻¹ respectively. All the ten yeasts were sensitive to the evaluated essential oils, being the *C. cyminum* the one that presented the lowest Minimum Inhibitory Concentration (MIC), being of 4,375mg.mL⁻¹. It can be concluded that *Candida* spp., has a higher frequency in hospitalized patients and the essential oils of *C. cyminum*, *P. anisum* and *F. vulgare* were not cytotoxic at the same minimum inhibitory concentrations obtained for fungi.

Key words: cytotoxicity, minimum inhibitory concentration, essential oils, Apiaceae, candidiasis.

LISTA DE FIGURAS

Página

ARTIGO 2

Figure 1: Cytotoxicity activity <i>in vitro</i> of the <i>Cuminum cyminum</i> (cumin), <i>Anethum graveolens</i> (dill), <i>Pimpinella anisum</i> (anise) and <i>Foeniculum vulgare</i> (fennel) essential oils in Mouse fibroblasts L929 (20×10^3 well ⁻¹) cells.....	61
---	----

LISTA DE TABELAS

Página

ARTIGO 1

Table 1: Comparison of the prevalence of <i>Candida</i> spp., and <i>Candida albicans</i> in hospitalized and non-hospitalized individuals from the city of Pelotas, Rio Grande do Sul state, Braz.....	45
--	----

ARTIGO 2

Table 1: Main chemical compounds identified in the cumin, dill, anise and fennel essential oils, using the chromatography GC/MS technic.....	60
Table 2: Inhibitory Minimum Concentration (mg.mL ⁻¹) of the <i>Cuminum cyminum</i> (cumin), <i>Anethum graveolens</i> (dill), <i>Pimpinella anisum</i> (anise) and <i>Foeniculum vulgare</i> (fennel) essential oils against the ten <i>Candida</i> species isolates.....	61

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	11
1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS.....	16
2.1 Objetivo geral	16
2.2 Objetivos específicos.....	16
3. REVISÃO DA LITERATURA	17
3.1 <i>Candida</i> spp	17
3.2 Candidíase Oral	18
3.3 Candidíase Atrófica Crônica.....	19
3.4 Antifúngicos e tratamento na candidíase.....	21
3.5 Fitoterapia	22
3.6 Óleos essenciais	24
3.7 Citotoxicidade.....	26
3.8 Família Apiaceae.....	27
3.8.1 Cominho (<i>Cuminum cminum</i>).....	27
3.8.2 Endro (<i>Anethum graveolens</i>).....	28
3.8.3 Erva-Doce (<i>Pimpinella anisum</i>).....	29
3.8.4 Funcho (<i>Foeniculum vulgare</i>).....	30
4. ARTIGO 1. Avaluation of the frequency of <i>candida</i> spp. in hospitalized and non-hospitalized subjec.....	32
4.1. Abstract.....	33
4.2. Introduction.....	35
4.3. Matrials and Methods.....	36
4.4. Results.....	37
4.5. Discussion.....	38
4.6. References.....	42

5. ARTIGO 2. Chemical composition of essential oils from the Apiaceae family, cytotoxicity, and their antifungal activity <i>in vitro</i> against <i>Candida</i> species from oral cavit.....	47
5.1. Abstract.....	48
5.2. Introduction.....	49
5.3. Material and Methods.....	49
5.3.1. Research location and fungal isolates.....	49
5.3.2. Essential Oils.....	50
5.3.3. Chromatographic analysis of the essential oils.....	50
5.3.4. Cytotoxicity assay.....	50
5.3.5. Minimum Inhibitory Concentration (MIC).....	51
5.4. Results and Discussion.....	51
5.5. Conclusion.....	54
5.6. References.....	56
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	58
REFERÊNCIAS.....	59
ANEXOS.....	73
ANEXO A: Aprovação do comitê de ética referente ao Artigo 1.....	74

1. INTRODUÇÃO:

A candidíase é uma micose oportunista causada pela proliferação de espécies de *Candida*, principalmente *Candida albicans*, sendo esta, a espécie mais patogênica em humanos (MENEZES et al., 2009). *Candida* spp. vive como microrganismo comensal em indivíduos saudáveis, mas pode causar infecção, se existirem condições favoráveis relacionadas à baixa imunidade do hospedeiro. Essa levedura também pode ser transmitida, principalmente, por contato através da mucosa oral, via iatrogênica, entre outras, podendo causar doenças em pessoas que possuem algum fator predisponente. Os quadros clínicos mais rotineiramente reportados relacionados à candidíase são as do tipo cutaneomucosa, sistêmica/visceral e alérgica (LACAZ et al., 2002; SIDRIM; ROCHA, 2004).

As infecções fúngicas nosocomiais por leveduras do gênero *Candida* têm se elevado cada vez mais nos últimos anos, e são responsáveis por altas taxas de morbidade e mortalidade (PU et al., 2015). A presença destas leveduras na microbiota humana favorece a ocorrência destas infecções, principalmente, devido a fatores de virulência do fungo e da sua interação com os pacientes hospitalizados, que apresentam debilidade do sistema imunitário (MOYSES; NAGLIK et al., 2011; SILVA et al. 2014; SIQUEIRA et al., 2014). Nestes pacientes, *C. albicans* é a mais frequente da microbiota oral, podendo-se encontrar mais de uma espécie de *Candida* no mesmo paciente, sendo mais comum nos imunocomprometidos (PIRES et al., 2011). Essas espécies podem estar presentes na pele, boca, língua, garganta e órgãos internos, causando lesões superficiais ou profundas, agudas ou crônicas (CLIFF et al., 2008; BARBEDO et al., 2010).

As infecções orais causadas por espécies de *Candida* são as mais comumente diagnosticadas, e no âmbito da Odontologia, tais infecções são frequentes devido a alterações locais e sistêmicas que modificam a microbiota oral. Entre as variações locais estão o uso de aparelhos ortodônticos, tabagismo, hipossalivação, mudança de hábitos alimentares, higiene oral deficiente e pacientes portadores de aparelhos protéticos (STRAMANDINOLI et al., 2010), que assumem destacada importância, já que a presença de espécies de *Candida* na superfície da prótese, em contato com a mucosa, é o fator determinante para o aparecimento da Candidíase Atrófica Crônica (CAC) (TELLES et al, 2004). Esta doença, também conhecida como “estomatite por dentadura”, é caracterizada por eritema localizado crônico dos tecidos cobertos pela dentadura (NEVILLE et al., 2002).

Embora *Candida albicans* seja a espécie predominante nos quadros clínicos, a proporção de espécies de *Candida* não *albicans* (NAC) têm aumentado rapidamente, como *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei* (WINGARD, 1995; VASQUEZ et al., 2000).

Há muito tempo, as infecções por *Candida* spp. crescem a uma velocidade alarmante, assim como o desenvolvimento de resistência em relação aos fármacos antifúngicos comumente utilizados. Contudo, há um aumento do interesse gerado entre acadêmicos e pesquisadores no estudo de plantas com finalidades terapêuticas, para obtenção de outros compostos químicos que possam ter aplicações biológicas comprovadas através de ensaios pré-clínicos, que visam analisar parâmetros de segurança e de eficácia por meio de estudos de citotoxicidade e da atividade *in vitro* e *in vivo* (WEYERMANN et al., 2005).

A flora vegetal brasileira tem várias espécies de plantas que são usualmente utilizadas como antifúngicos, e é notório que o Brasil, pela sua diversidade botânica, é conhecido mundialmente pela grande variedade de produtos com ações medicinais, amplamente utilizadas em suas diversas regiões (FENNER et al., 2006).

Entre as numerosas espécies de plantas aromáticas, as da família Apiaceae vêm sendo investigadas. Seus membros incluem muitos vegetais comumente cultivados como: cominho, cenoura, aipo, coentro, endro, salsa, erva-doce, funcho, dentre outros, que devem seu sabor característico, em grande parte, a diversos compostos voláteis nos frutos e folhas, que não só representam a sua utilização culinária, mas, também, sua ampla aplicação na medicina (DOWNIE, et al., 2000; SIMÕES, 2010).

Dessa forma, este estudo justifica-se pela possibilidade de uma planta não citotóxica se constituir em recurso terapêutico alternativo, e ainda, pela descoberta e elaboração de substâncias que apresentem ação significativa, com menor índice de desvantagens e que possam ser aplicadas em pacientes hospitalizados, e também em indivíduos com problemas de candidíase oral (como a CAC), com objetivos curativos e preventivos, diminuindo, assim, a ocorrência de infecções fúngicas.

2. OBJETIVOS:

2.1. Objetivo Geral

Verificar a presença de *Candida* spp. na cavidade oral de indivíduos hospitalizados e não hospitalizados e avaliar a ação de óleos essenciais em espécies de *Candida* de pacientes com candidíase atrófica crônica.

Objetivos específicos

- Avaliar a frequência de *Candida* spp. na cavidade oral de indivíduos não-hospitalizados com a de indivíduos hospitalizados;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos óleos essenciais de *Cuminum cyminum* (cominho), *Anethum graveolens* (endro), *Pimpinella anisum* (erva-doce) e *Foeniculum vulgare* (funcho) frente a leveduras de *Candida* spp. isoladas de pacientes com candidíase atrófica crônica;
- Identificar os constituintes majoritários dos óleos essenciais por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-MS);
- Testar a citotoxicidade dos óleos essenciais que apresentarem ação fungistática *in vitro*.

3. REVISÃO DE LITERATURA:

3.1 *Candida* spp.

O gênero *Candida* pertence ao reino Fungi, grupo Eumycota, filo Deuteromycota, classe Blastomycetes, ordem Cryptococcales e faz parte da família Criptococcacea (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; MIRANDA et al., 2012). Este fungo apresenta espécies em forma de levedura, medindo aproximadamente de 2 a 6µm, que se reproduzem por brotamento. A maior parte das espécies forma pseudo-hifas e hifas nos tecidos. As colônias possuem coloração branca a creme e têm superfície lisa ou rugosa (KAUFFMAN, 2005; ÁLVARES et al., 2007).

Espécies de *Candida* vivem como comensais no homem e nos animais, estão presentes na microbiota humana desde o nascimento sem causar infecção, e coexistem com o hospedeiro durante toda a sua vida. Podem habitar, principalmente, a cavidade bucal, a vagina, o trato gastrointestinal, os aparelhos urinário e respiratório, entre outras localizações (MENEZES et al., 2013). Essas espécies não causam doença, a não ser que ocorra um desequilíbrio nos mecanismos de defesa ou fatores externos, como por exemplo, o uso de antimicrobianos, que podem alterar a microbiota normal. A candidíase está presente, numa frequência de 5% dos recém-nascidos, 5% de pessoas com doenças neoplásicas e 10% dos pacientes idosos com saúde precária (ROGEZI; SCIUBBA, 2000). Entretanto, a infecção por *Candida* ocorre mais em pessoas nos extremos da idade (SONIS et al, 1996; KAUFFMAN, 2005).

Candida albicans é considerada a espécie mais frequente, mas tem havido mudanças nesse perfil, com a emergência de espécies de *Candida* não *albicans*, como: *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *Candida kefyr*, *C. lusitaniae*, e *C. guilliermondii*. As razões para tal mudança no padrão de distribuição das espécies, ainda não foram completamente esclarecidas, podendo estar relacionadas com fatores imunológicos do hospedeiro, com a resistência desses microrganismos aos antifúngicos, assim como aos fatores de virulência do fungo, o que coloca as espécies de *Candida* entre os mais importantes fungos oportunistas (MENEZES et al., 2009; DALAZEN et al., 2011; DEMITTO et al., 2012; PU et al., 2015).

Dentre os fatores de virulência da *Candida*, citam-se as capacidades de aderência aos tecidos e superfícies, formação de tubos germinativos e a produção de proteases e fosfolipases extracelulares que ajudam na degradação de tecidos e facilita a proliferação da levedura na mucosa. Desta forma, *Candida* spp. pode causar doença no homem por invasão tecidual, por indução de estados de hipersensibilidade, ou por produção de toxinas (BUDTZ-JORGENSEN,1990; TORRES et al., 2007; SARDI et al., 2010; SIMÕES et al., 2013).

Assim como muitos microrganismos, a capacidade de *Candida* spp. se aderir a superfícies é, presumidamente, uma característica importante de sobrevivência e/ou patogenicidade (JAIN et al., 2010).

As formas de manifestação da candidíase são basicamente de três tipos: mucocutânea, cutânea e sistêmica. A forma mucocutânea acomete a cavidade oral e o canal vaginal, sendo a mais comum nos seres humanos. A candidíase cutânea pode acometer regiões úmidas do corpo como: mamas, axilas, pregas das virilhas, espaços interdigitais, debaixo de unhas. Em neonatos, o uso de fraldas pode causar erupções, que é também uma manifestação comum de *Candida* cutânea. A forma disseminada ou sistêmica é rara, e ocorre em pacientes terminais com doenças debilitantes, neoplásicas, doenças imunossupressivas e após transplantes de órgãos (STRAMANDINOLI et al., 2010; COUTO et al., 2011).

3.2. Candidíase oral

A microbiota oral é bastante variável, com mais de 700 espécies de microrganismos identificados, dos quais muitos ainda não foram expressamente descritos. Nessa ampla e complexa ecologia microbiana da cavidade oral humana, encontram-se, pelo menos, vinte gêneros e, aproximadamente, noventa espécies de leveduras isoladas e classificadas. Dentre estas, algumas espécies de *Candida* são consideradas patogênicas: *Candida albicans*, *Candida guilliermondii*, *Candida glabrata*, *Candida kefyr*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* e *Candida viswanathii* (MENEZES et al., 2009).

Espécies de *Candida* fazem parte e colonizam a cavidade oral de até 60% de todos os indivíduos saudáveis com média de 300 a 500 unidades formadoras de colônias por mililitro de saliva (MUZYKA, 2005).

Vários fatores orais locais, tais como o uso de próteses removíveis, aparelhos ortodônticos fixos e removíveis, boca seca, alta dieta de açúcar, e má higiene oral, podem aumentar a presença de espécies do gênero *Candida* na cavidade oral, podendo comportar-se como patógenos oportunistas, originando infecções (CAMPISI et al., 2002; DALAZEN et al., 2011; SIMÕES et al., 2013; KHANPAYEH et al., 2014).

Essas infecções podem ser superficiais ou profundas, e fatores predisponentes como recém-nascido, diabetes, antibioticoterapia, xerostomia, imunossupressão e AIDS estão associados com a forma aguda, enquanto a diabetes, prótese superior e queilite angular, relacionam-se com a forma crônica. (SCULLY et al., 1992; MOREIRA et al., 2002).

Candida albicans e *C. tropicalis* têm sido identificadas como as principais espécies envolvidas em infecções fúngicas orais e possuem como principal fator de virulência a capacidade de adesão aos tecidos orais e formação de biofilmes mistos (THEIN et al., 2006).

Devido ao desenvolvimento de resistência em relação aos fármacos antifúngicos sintéticos utilizados, e às reações indesejadas apresentadas pelos usuários, infecções por espécies de *Candida* têm aumentado. Com isso, novos produtos são propostos na tentativa de diminuir tais ocorrências, dentre eles, os óleos essenciais de plantas medicinais (LIMA et al., 2006; POZZATTI, 2008; CASTRO e LIMA, 2010;2011; KAMBLE, 2015; YANG et al., 2015).

3.3 Candidíase Atrófica Crônica (CAC):

A candidíase é a infecção fúngica bucal mais comumente diagnosticada. Na área da Odontologia, a candidíase assume destacada importância nos pacientes portadores de aparelhos protéticos (NETO et al., 2005). A utilização de próteses dentárias totais, como forma de recuperar a função mastigatória e a estética, é capaz de promover a alteração da diversidade microbiana, facilitando o desenvolvimento de doenças bucais (EMILSON; THORSELIUS, 1988). O uso contínuo de próteses e a má adaptação destas, pode atuar como um elemento importante, estimulando um processo que promove degeneração das glândulas salivares palatinas e diminuição do pH, propiciando a multiplicação de leveduras do gênero *Candida* (SHIMIZU, et al., 1987). As leveduras quando presentes na mucosa

bucal, causam o surgimento de áreas eritematosas denominadas candidíase atrófica crônica (CAC), também conhecida como “estomatite por dentadura”, “estomatite da prótese” ou “inflamação bucal por dentadura”, que se caracteriza por vários graus de eritema, petéquias hemorrágicas, localizadas na área das bordas da dentaduras de uma prótese removível, e ocorre frequentemente em pessoas que usam próteses superiores completas (PINDBORG, 1981; KAUFFMAN, 2005). A reação também pode decorrer de desenho inapropriado da dentadura, alergia à sua base, ou polimerização inadequada do acrílico (MOREIRA et al., 2002).

O paciente com CAC apresenta alterações inflamatórias vistas por debaixo da prótese total, com uma superfície vermelha viva, aveludada a pedregosa, de forma circunscrita ou difusa, ulcerada ou não. O palato encontra-se hiperemiado e doloroso (REGEZI; SCIUBBA, 2000). Em manifestações mais graves, estão presentes pequenas vesículas e erosões confluentes (REGEZI; SCIUBBA, 2000). Esta forma de lesão pode acometer até 65% das pessoas idosas que utilizam prótese, especialmente a dentadura total superior, podendo, também, surgir na mucosa de suporte de uma prótese parcial removível, entretanto, em menor presença (SCULLY, 1992; REGEZI; SCIUBBA, 2000).

As causas responsáveis pelo surgimento da estomatite por dentadura são várias, como: traumatismo crônico, secundário a próteses mal adaptadas; relações oclusais não ideais, e não remoção da prótese durante a noite, relacionada à má higiene do paciente (REGEZI; SCIUBBA, 2000). Dentre os sintomas clínicos da candidíase atrófica crônica estão: dor, irritação e distúrbios da salivação, porém, muitos pacientes que adquirem esta doença, podem não apresentar manifestação alguma (PINDBORG, 1981).

Para Neto et al. (2005), a prevenção da candidíase engloba a higienização da boca e da prótese, incluindo a escovação e o uso de agentes químicos.

Os pacientes portadores de prótese total removível devem realizar a remoção mecânica e/ou química dos fungos retidos nas irregularidades e depressões dos aparelhos protéticos. A remoção mecânica pode ser feita através da escovação, e a remoção química, geralmente é feita deixando-se a peça protética durante toda a noite mergulhada em solução apropriada (BORAKS, 1999; TELLES et al, 2004).

3.4. Antifúngicos e tratamento na candidíase

Frequentemente, as infecções por fungos são de difícil tratamento, o que está relacionado intrinsecamente à obtenção de resistência por parte de seus agentes etiológicos frente à ação de fármacos antifúngicos (ARAÚJO et al., 2004). O arsenal terapêutico destes fármacos de uso sistêmico e tópico ainda é limitado, e é clara a necessidade de novos compostos menos tóxicos e mais eficazes (FREIRES et al., 2011; SAVOIA et al., 2012).

Diante das infecções causadas por leveduras de *Candida*, alguns antifúngicos sintéticos têm sido indicados no tratamento, como o grupo dos poliênicos (nistatina, anfotericina B) e o grupo dos azóis, baseado nos núcleos imidazóis (clotrimazol, econazol, fenticonazol, cetoconazol, miconazol, tioconazol e sulconazol) ou triazol (itraconazol, voriconazol e fluconazol) (RANG, DALE, 2003; KURIYAMA et al., 2005). Ambos os grupos compartilham do mesmo mecanismo de ação, sendo que os triazóis sistêmicos são metabolizados mais lentamente e têm um efeito menor sobre a síntese de esteróis humanos do que os imidazóis (GOODMAN et al., 2003).

A anfotericina B, não é absorvida pelo trato gastrointestinal e deve ser administrada por via intravenosa. Tem sido considerada a droga de referência para o tratamento de infecções fúngicas, mas seu uso é limitado pela toxicidade sistêmica e local que apresenta (BATISTA et al., 1999; BURGESS, et al., 2000). Já a nistatina, é um fungistático e fungicida do mesmo grupo e seu mecanismo e espectro de ação são semelhantes aos da anfotericina B, porém, é altamente tóxica quando usada por via sistêmica (SERRACARBASSA; DOTTO, 2003). Os triazólicos fluconazol e itraconazol podem ser administrados via oral ou intravenosa, e são comumente utilizados no tratamento das infecções por fungos, pois são menos tóxicos que os poliênicos (BURGESS, et al., 2000).

É descrita a resistência da *Candida* a alguns destes fármacos antifúngicos, o que pode comprometer o tratamento do paciente (MOREIRA et al., 2002).

O desenvolvimento de técnicas para avaliar a suscetibilidade aos antifúngicos tem sido o propósito de vários estudos nas últimas décadas (DEMITTO et al., 2012). Com isso, o Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) tem desenvolvido e padronizado testes para determinação da suscetibilidade *in vitro* de leveduras, como o método de microdiluição em caldo (MD), considerado o padrão-ouro (CLSI, 2008).

Na área odontológica, estudos com produtos naturais tiveram um crescimento acirrado nos últimos anos, devido à procura de novos compostos com maior

atividade farmacológica, menor toxicidade e maior biocompatibilidade, além de apresentarem custos mais acessíveis à população (CASTILHO et al., 2007; POZZATTI, 2008). O emprego desses compostos naturais que apresentam ação antifúngica terapêutica em microrganismos resistentes mostram-se promissores modelos na constituição de produtos odontológicos como, por exemplo, em próteses dentárias, e como apoio na prevenção e tratamento de diversas patologias bucais, como a cárie dentária, doença periodontal e candidíase oral, como a candidíase atrófica crônica.

3.5. Fitoterapia:

A fitoterapia constitui-se na prática do uso de plantas ou de suas partes com finalidade medicinal (MACIEL et al., 2002). Os chineses, no ano 3000 a.C., foram os que deram início ao uso de fitoterápicos. A Alemanha hoje é um dos principais países pioneiros no uso de fitoterápicos (70% dos profissionais prescrevem fitoterápicos nos serviços de saúde) (VEIGA JUNIOR et al., 2005).

A ciência que estuda todos os produtos de origem animal ou vegetal de uso popular é conhecida como *etnofarmacologia*. A utilização da planta inteira refere-se a um Fitoterápico, enquanto que medicamentos à base de plantas que possuem um princípio ativo isolado, ou seja, que possuem uma substância medicamentosa isolada a partir de óleos ou extratos refere-se a um fitofármaco (MACIEL et al., 2002; BRASIL, 2004).

Pesquisas comprovam que muitas espécies de plantas aromáticas possuem atividade inibitória frente a bactérias e fungos (GAUCH et al., 2014). Devido às várias atividades biológicas demonstradas pelos compostos de origem natural, óleos essenciais têm sido pesquisados para determinação da atividade antimicrobiana (LIMA et al., 2006; POZZATTI, 2008; CASTRO; LIMA, 2010, GAUCH et al., 2014; KAMBLE, 2015; YANG et al., 2015). Esta atividade depende das condições de cultivo, dos métodos de extração e dos solventes utilizados, que permitem uma variação dos princípios ativos (ARAUJO et al., 2010).

Quando o produto natural é selecionado através da realização de pesquisa bibliográfica; extração de informações botânicas, taxonômicas e químicas; análise de fatores ambientais (local da coleta, época, temperatura, etc.); verificação da atividade farmacológica; realização de estudo etnofarmacológico, são realizados ensaios farmacológicos e toxicológicos para confirmar sua atividade, e após,

verifica-se se a substância ativa é conhecida, se existe faixa de concentração/dose para uso e a sua toxicidade (MACIEL et al., 2002; BRASIL, 2004; BOMBARDELLI; BOMBARDELLI, 2005; VEIGA JUNIOR et al., 2005).

Antigamente, a fitoterapia era mais adotada pela população carente da área rural ou urbana, devido à fácil disponibilidade e menores custos (DUARTE, 2006). O ressurgimento do interesse no tratamento com produtos naturais e o aumento da demanda de consumo por compostos efetivos e seguros, requerem mais dados sobre os extratos e óleos de plantas (NASCIMENTO et al., 2007; SAVOIA et al., 2012). A Organização Mundial de Saúde indica o uso de plantas medicinais, sobretudo, em países em desenvolvimento, nos programas de saúde pública (CARRICONTE et al., 1995; MARTINS et al., et al., 1998). Atualmente, o uso desses produtos como fonte terapêutica, é uma opção para problemas de saúde, e está bem definido em algumas culturas e tradições, especialmente na Ásia, América Latina e África (DUARTE, 2006).

Outro tópico a ser ressaltado, é a realização de estudos de *screening* na tentativa de descobrir a atividade farmacológica de novos agentes de origem natural, sendo de relevante importância, principalmente no Brasil, país que oferece uma imensa biodiversidade e tem uma posição privilegiada por possuir cerca de 25% da flora mundial, que pode ser uma rica fonte de matéria-prima de produtos naturais com ação antimicrobiana, e representa uma opção promissora no ataque às cepas multirresistentes.

Muitos componentes de plantas e/ou seus derivados semi-sintéticos, constituem uma parcela apreciável de medicamentos recém lançados no mercado (WILSON; DANISHEFSKY, 2006).

Atualmente, alguns estudos demonstram a atividade antifúngica de óleos essenciais de algumas plantas sobre espécies de *Candida*. Castro e Lima (2010) investigaram a atividade antifúngica *in vitro* do óleo essencial do *Eucalyptus globulus* L. (eucalipto) frente a espécies de *Candida* envolvidas com infecções bucais, e concluíram que todas as cepas apresentaram-se sensíveis ao óleo essencial de eucalipto. Cavalcanti e colaboradores (2011) avaliaram a atividade antifúngica dos óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia* (melaleuca), *Cymbopogon winterianus* (citronela), e *Rosmarinus officinalis* (alecrim) sobre *Candida albicans*, *C. krusei* e *C. tropicalis*, e observaram que os produtos avaliados exerceram atividade antifúngica sobre as espécies de *Candida*. Freires et al. (2011), avaliaram as mesmas espécies

de *Candida* frente *Schinus terebinthifolius* (aroeira), que também apresentou ação antifúngica sobre as leveduras.

Segundo a toxicologia, toda substância pode ser considerada um agente tóxico, dependendo das circunstâncias de exposição, como: dose administrada ou absorvida, tempo e frequência de exposição, e vias pela qual é administrada. Assim, é fundamental conhecer as condições de uso seguro de substâncias químicas para a saúde humana e ambiental (OGA, 2003).

3.6. Óleos essenciais:

As plantas produzem uma grande diversidade de compostos resultantes do metabolismo primário. Esses compostos são polissacarídeos, açúcares, proteínas e ácidos graxos, substâncias essenciais à sobrevivência e desenvolvimento destes vegetais (VERPOORTE; MEMELINK, 2002). Além dos metabólitos primários, as plantas produzem uma grande variedade de metabólitos secundários que têm um papel importante na sobrevivência da planta em seu ecossistema. (SANTOS, 2000; 2010).

Os óleos essenciais originam-se do metabolismo secundário, e caracterizam-se por conterem misturas complexas, voláteis e geralmente odoríferas. Em temperatura ambiente, apresentam-se em estado líquido, incolor ou ligeiramente amarelado, não sendo muito estáveis. Podem ser extraídos de diversas partes de plantas como folhas, sementes e caules (SANTOS, 2010). São constituídos por uma mistura de compostos, principalmente terpenos (monoterpenos e sesquiterpenos), e derivados oxigenados (álcoois, aldeídos, ésteres, éteres, cetonas, fenóis e óxidos). Outros compostos voláteis incluem fenilpropanóides e substâncias contendo enxofre ou nitrogênio (VALERIANO et al., 2012). Esses óleos constituem os elementos voláteis contidos em muitos órgãos vegetais, e estão relacionados com diversas funções necessárias à sobrevivência da planta, exercendo papel crucial na defesa contra microrganismos, apresentando-se, deste modo, como promissores no tratamento de doenças infecciosas (OGUNWANDE et al., 2005; LIMA et al., 2006; CASTRO; LIMA, 2010).

São constituídos por complexas misturas naturais que podem conter 20-60 compostos em concentrações bastante diferentes. Porém, existem, na maioria das vezes, dois ou três componentes em concentrações mais elevadas que são

denominados majoritários, podendo estar presentes em concentrações de até 70% ou mais (BAKKALI, et al., 2008). Estes compostos majoritários determinam as propriedades biológicas dos óleos essenciais (SALEHIARJMAND et al., 2014; SINTIM et al., 2015; GONÇALVES, 2015).

De um modo geral, os autores atribuem a atividade antimicrobiana e antioxidante dos óleos essenciais a estes componentes principais que se encontram em maior quantidade, e à ação sinérgica, ou antagônica, que ocorre entre as moléculas dos elementos que estão em menor quantidade. (IACOBELLIS et al., 2005; RADULESCU et al., 2010).

Uma característica importante dos óleos essenciais e seus componentes é sua hidrofobicidade, que permite sua interação com estruturas celulares que têm constituição lipídica, promovendo aumento da permeabilidade, o que pode ocasionar uma saída extensiva de eletrólitos, indispensáveis à sobrevivência celular (CASTRO; LIMA, 2010).

A extração dos óleos é realizada através da técnica de arraste a vapor de água, na grande maioria das vezes, assim como pela prensagem do pericarpo de frutos cítricos, que no Brasil, dominam o mercado de exportação. Têm grande aplicação na perfumaria, cosmética, alimentos, e como coadjuvantes em medicamentos. São aplicados, principalmente, como aromas, fragrâncias, fixadores de fragrâncias, formas farmacêuticas, e comercializados na sua forma bruta ou beneficiada, fornecendo substâncias purificadas como o limoneno, citral, citronelal, eugenol, mentol e safrol (BIZZO et al., 2009; SANTOS, 2010).

Vários estudos têm demonstrado algumas propriedades terapêuticas dos óleos, destacando as seguintes: analgésica, antiespasmódica, antiviral, antimicrobiana, cicatrizante, expectorante, relaxante, antisséptica das vias respiratórias, anti-helmíntica, larvícida e anti-inflamatória (COSTA et al., 2005; OYEDJI; AFOLAYAN, 2006; LIMA et al., 2006; NASCIMENTO et al., 2007).

As ações antimicrobianas de substâncias presentes em extratos e óleos essenciais são reconhecidas experimentalmente há séculos, mas foram comprovadas cientificamente há pouco tempo, e tem sido descritas em muitos países como Brasil, Cuba, Índia, Jordânia e México, que possuem uma vegetação diversificada e uma rica tradição no uso de plantas medicinais, com propriedades antibacterianas ou antifúngicas (DUARTE et. al., 2005; 2006).

Devido aos usos, efeitos e propriedades farmacológicas de plantas naturais com finalidade medicinal em fitoterapia, outros estudos com óleos essenciais se fazem necessários, já que servirão de guia para a seleção de plantas com atividades antifúngicas para outros trabalhos de âmbito toxicológico e farmacológico, na perspectiva de uma possível aplicação terapêutica desses produtos (MENEZES et al., 2009).

3.7. Citotoxicidade

Recomenda-se que novos compostos de ação ainda desconhecida devem ser avaliados quanto a sua biocompatibilidade, através de estudos *in vitro* de cultivo celular – o mais utilizado para testes de toxicidade – e de experimentos em animais para, posteriormente, serem estudados clinicamente em humanos. Esta técnica visa permitir o estudo da reação celular em meio controlado, livre das complexas interações do organismo. As vantagens desse método são, além do controle ambiental das células, rapidez, baixo custo, e a facilidade de execução (FRESHNEY, 2000).

Os testes de toxicidade celular fornecem as primeiras informações sobre a resposta biológica dos compostos pesquisados em células de mamíferos, sendo que a grande maioria das moléculas é descartada logo de início, devido a sua citotoxicidade (SANTOS et al., 2013).

A cultura de células fornece uma importante ferramenta para estudo da citotoxicidade de compostos com potencial atividade terapêutica (VASCONCELOS et al., 2005), definindo o potencial de degeneração ou morte celular provocado pelo material constituinte nos produtos. Assim, resultados positivos no ensaio de citotoxicidade descaracterizam a condição de inocuidade do produto, sendo possível causar processos de irritabilidade nos usuários (CHORILLI, et. al., 2009).

Embora os resultados dos testes que avaliam a citotoxicidade *in vitro* possam não ter uma correlação direta com os *in vivo*, podemos afirmar que, se um material não induz comprovadamente uma reação citotóxica em testes envolvendo cultura de células, é muito provável que não desenvolva toxicidade quando aplicado em tecido vivo (OSÓRIO et al., 1998).

3.8. Família Apiaceae:

A família Apiaceae, antigamente denominada Umbelliferae, compreendem de 300-450 gêneros e 3000-3700 espécies, às quais muitas se destacam por suas propriedades medicinais, condimentares e aromáticas, sendo conhecidas, principalmente, pela utilização na culinária, através de suas características

aromáticas. Estas plantas destacam-se ainda, por suas características bioativas, que lhes atribuem ações farmacológicas (CONSTANCE, 1971; PIMENOV; LEONOV, 1993; DOWNIE et al., 2000).

São ervas anuais, bienais ou perenes, de pequeno a médio porte, raramente lenhosas, acaulescentes ou caulescentes, neste caso, caules frequentemente fistulosos; geralmente fortemente aromáticas por produzirem óleos essenciais nas folhas, como limoneno e linalol; monoterpenos e cumarinas. O linalol é um composto fenólico que inibe o crescimento de bactérias e fungos, funcionando como antisséptico. O limoneno desempenha o papel de proteção contra insetos nas plantas. Os terpenos são voláteis e conferem aromaticidade à planta, e desempenham um papel muito relevante, atuando como agente de defesa contra o ataque de insetos e herbívoros, além de auxiliarem como moléculas de sinalização para polinização e reprodução (RADULESCU et al., 2010; SALEHIARJMAND et al., 2014, EVERGETIS et al., 2015). As cumarinas possuem ação antioxidante e podem ser utilizadas na prevenção de doenças causadas por radicais livres. Também podem apresentar atividades vasodilatadora, espasmolítica e antitrombótica (MARTINS et al., 2005).

Dentre os representantes da família Apiaceae, algumas são conhecidas popularmente, como: cenoura, coentro, cominho, endro, erva doce, funcho e salsa. Essas espécies são amplamente distribuídas no Brasil, mas também cultivadas em diferentes regiões do mundo (KAZEMI et al., 2012; SARKHAIL, 2014; EVERGETIS et al., 2015; GONÇALVES, 2015).

3.8.1. *Cuminum cyminum* (Cominho)

Cuminum cyminum é uma planta herbácea anual (altura: 15-50 cm), com ramos e caules estriados, folhas alternas verde-escuras, e flores alvas em umbrelas

terminais. Os seus frutos, também chamados de sementes, têm coloração cinza-amarelados, com meio centímetro de comprimento, cobertos por uma fina penugem. Possui características aromáticas e aplicação culinária e medicinal. Tem sua origem na região do Mediterrâneo e alto Egito e é amplamente cultivado na Índia, Marrocos, China, Irã, Turquia e outros países (VIEIRA, 1992). Essa planta vive bem de 9 a 26°C e é intolerante a longos períodos de calor seco e geadas (CHAUDHARY et al., 2014).

É aplicado na medicina popular iraniana, há mais de 200 anos. Tem sido demonstrado que os seus frutos têm aplicação medicinal no tratamento de diarreia, cólicas, dor de dentes, epilepsia e dispepsia (ZARGARI, 1994). Também possui ação diurética, carminativa para distúrbios estomacais, e propriedade antiespasmódica e adstringente (SHANKARACHARYA; NATARAJAN, 1971; KHOSRAVI et al., 2015; TAGHIZADEH et al., 2015). Recentemente, alguns documentos têm indicado a utilização de cominho no tratamento do excesso de peso e de anomalias metabólicas (KAN et al., 2007).

Além da sua utilização na medicina tradicional para o tratamento de algumas doenças, *C. cyminum* é o segundo tempero mais popular do mundo depois de pimenta preta e é amplamente utilizado em alimentos. É uma das especiarias populares usadas em muitos tipos de aromatizantes compostos, especialmente em curries e preparações culinárias de caráter oriental (SHANKARACHARYA; NATARAJAN, 1971; CHAUDHARY et al., 2014). O óleo de semente de cominho é usado em perfumaria e para conferir sabor a licores e xaropes. Também possui ação antimicrobiana (IACOBELLIS et al., 2005; KHOSRAVI et al., 2015).

Os principais compostos encontrados no cominho são cuminaldehide, limoneno, α - e β -pinenes, 1,8-cineol, o- e p-cimeno, α - e γ -terpinenes, safranól e linalol (AGARWAL, 1996; LI; JIANG, 2004).

Alguns trabalhos realizados com o *C. cyminum* verificaram atividade desta planta frente a espécies de *Candida* (SHETTY et al., 1994; PAI et al., 2010; WANNER et al., 2010; KAMBLE, 2015).

3.8.2. *Anethum graveolens* (Endro)

A planta *Anethum graveolens*, conhecido popularmente no Brasil como Endro, é uma planta aromática, de pequeno porte com variação de altura entre 50 cm a 150

cm, cujas flores pequenas e amarelas são dispostas em umbela (forma de guarda-chuva), com múltiplos frutos e raízes longas e fusiformes. Possui caules delgados e ramificados, e suas folhas são finamente divididas. Suas sementes e suas flores são as partes da planta mais utilizadas, tanto na culinária, quanto na indústria, sendo as sementes conhecidas por produzirem óleos essenciais de odor agradável e característico, com diversas propriedades biológicas, podendo ser aplicados nas mais diferentes áreas, sendo a produção de cosméticos e fármacos as mais evidentes. Já suas flores são conhecidas por apresentarem propriedades antioxidantes, podendo ser amplamente aplicadas na indústria alimentícia (RADULESCU et al., 2010; SALEHIARJMAND et al., 2014; SINTIM et al., 2015).

Os óleos podem ser encontrados na casca, nas flores, nas folhas, e nas sementes das plantas, pois, ainda que vários tecidos possam acumular óleos essenciais, a composição química varia em função da região o qual é extraído (YILI et al., 2009; RADULESCU et al., 2010; SALEHIARJMAND et al., 2014).

A espécie *A. graveolens* se adapta a condições de cultivo em diversas regiões do Brasil, sendo uma planta nativa da região Mediterrânea. Muitas propriedades do Endro tais como antibacteriana, antioxidante, anti-inflamatória, anti-hipercolesterolêmica, e efeitos quimio-preventivo de cancro, têm sido relatadas. Na medicina popular, é comumente usado para melhorar a irritação gástrica, indigestão, dor de estômago, insônia e cólica. (MASADEH et al., 2013; SARKHAIL, 2014; MONSEF et al., 2015).

No óleo essencial de endro, aproximadamente 40 compostos são identificados, contudo, apenas os compostos majoritários, extraídos nas maiores concentrações, são explorados na literatura (SALEHIARJMAND et al., 2014; SINTIM et al., 2015), como: carvona, dihidrocarvona, limoneno, miristicina, apiol, α -felandreno, e óxido de limoneno que interferem diretamente na atividade biológica da planta (SINTIM et al., 2015).

Trabalhos realizados com o *Anethum graveolens* com atividade anti-*candida* foram verificados por Yili et al. (2009) e Zeng et al. (2011).

3.8.3. *Pimpinella anisum* (Erva-doce)

A Erva-doce, também conhecida como anis ou anis doce, é uma espécie nativa da Europa e amplamente cultivada em todo o Brasil. É uma planta anual, herbácea de ciclo perene, aromática, possui caule ereto (30-70 cm), forma touceiras,

possui folhas recortadas de cor verde amarelada, flores brancas e dispostas em umbelas (RIBEIRO et al., 2013). Os frutos, que são as partes utilizadas da planta, são do tipo aquênios, de sabor adocicado, e aroma acentuado.

É conhecida como uma erva aromática e especiaria desde a antiguidade, e tem sido usada na medicina popular, farmácia e indústria de alimentos. Seu óleo essencial é utilizado na fabricação de licores e perfumes e seus grãos são utilizados na confeitaria como aromatizantes em pães, bolos e biscoitos.

Essa planta possui uso medicinal aprovado internacionalmente como medicação para o controle de resfriados, tosse, bronquite, febre, cólicas, inflamações, digestão e perda de apetite (TORRES, 2004). Também é usado como antipirético, antiparasitário, antifúngico e em transtornos digestivos, na forma de pó, infusão, tinturas e xaropes (NOORIZADEH et al., 2011).

O óleo essencial da planta tem efeitos anticonvulsivantes e relaxantes, e é usado no tratamento de algumas doenças, tais como a epilepsia (AKHTAR, et al., 2008). Também possui efeito antibiótico contra bactérias e fungos patogênicos que afetam os seres humanos e animais (SHOJAI; FARD, 2012).

Alguns estudos relatam que o óleo essencial e extrato de *P. anisum* também possuem uma ampla gama de atividades biológicas, como antioxidante, antimicrobiana e antifúngica (RIBEIRO et al., 2013; SKALICKA-WOZNIAC et al., 2013; JAMSHIDZADEH et al., 2015).

Os principais componentes identificados como majoritários na erva-doce são o *trans*-anetol, estragol, limoneno, carvona, dentre outros (OZCAN; CHALCHAT, 2006; SHOJAI; FARD, 2012).

A erva-doce foi testada em espécies de *Candida*, verificando-se potencial atividade antifúngica desta planta (KOSALEC et al. 2005).

3.8.4. *Foeniculum vulgare* (Funcho)

O Funcho (*Foeniculum vulgare*), também conhecido como falsa Erva-Doce ou Anis-Doce, é originário do continente africano, Ilha da Madeira e Açores; outros acreditam que é nativo da Europa e região do Mediterrâneo (SILVA, 2001; ANUBHUTI et al., 2011).

É uma erva aromática, condimentar, anual, bienal ou perene, glabra e ramosa. Possui porte baixo, com 40-90 cm de altura, folhas inferiores alargadas

podendo atingir até 30 cm de comprimento, e superiores mais estreitas, flores pequenas, hermafroditas e de cor amarelo-pálida (BONFIM et al., 2013). As flores são minúsculas (2 a 5 mm de diâmetro), amarelo a amarelo-esverdeadas, e se reúnem em umbelas grandes, compostas e terminais, radiadas, muito variáveis, contendo de 10 a 30 raios (CORRÊA, 1984).

O funcho é bem conhecido no Brasil, mas mesmo assim ainda é motivo de confusão com outras plantas, principalmente com a erva-doce. Algumas espécies são amargas, outras lembram o aroma do anis e outras são adocicadas (BONFIM et al., 2013).

É uma planta que se adapta muito bem em vários tipos de clima. Basta ter insolação o suficiente para promover seu crescimento. Em temperaturas que não sejam muito quentes, nem muito frias, o funcho se desenvolve muito bem (BONFIM et al., 2013).

Na culinária, os frutos, denominados popularmente de sementes, são utilizados para condimentar e aromatizar pães, bolos e biscoitos. Além disso, o óleo essencial é utilizado na cosmética e perfumaria (CARVALHO et al., 2011).

As principais propriedades farmacêuticas atribuídas ao óleo essencial do fruto do funcho são: ação anti-inflamatória, diurética, antisséptica, ações carminativa e eupéptica (nas cólicas abdominais) e expectorante e antiespasmódica (na bronquite e asma) (TINOCO et al., 2007).

É composto de diversos monoterpenos e fenilpropanoides, onde o anetol, trans-anetol, estragol, fenchona, α -pineno e limoneno, constituem os componentes principais (LAWRENCE, 1994; CHOI; HWANG, 2004; DADALIOGLU; EVRENDILEK, 2004). Gulfraz (2008), Pai et al. (2010) e Skrobonja et al. (2013) foram alguns dos estudos realizados com o funcho frente ao gênero *Candida*.

AVALUATION OF THE FREQUENCY OF *CANDIDA* SPP. IN HOSPITALIZED AND NON-HOSPITALIZED SUBJECTS

Running title: Frequency of *candida* spp. in hospitalized and non-hospitalized subjects

Vieira, J. N.^{a*}, Feijó, A. M.^a, Bueno, M. E.^a, Gonçalves, C. L.^a, Lund, R. G.^b, Mendes, J. F.^c,
Villarreal, J. P. V.^a, Villela, M. M.^a, Nascente, P. S.^a

^a Laboratory of Parasitology, Institute of Biology, Department of Microbiology and Parasitology, Federal University of Pelotas, Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brazil. CEP 96010-900 – Pelotas – RS – Brazil, Phone: 55 (53)-3275-7620.

^b Restorative Dentistry Department, School of Dental Medicine, Federal University of Pelotas (UFPel), Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil. Street: Gonçalves Chaves, 457- Centro. CEP 96020-080 – Pelotas – RS- Brazil, Phone: +55 (53) 3222-4162.

^c Department of Preventive Veterinary, Faculty of Veterinary, Center for Diagnosis and Veterinary Research, Federal University of Pelotas, Capão do Leão, s/n, CEP 96001-970, Capão do Leão - RS, Brazil.

Corresponding author: Juliana Nunes Vieira - Campus Universitário s/n Capão do Leão – Institute of Biology, Building 18 Rom. 03. CEP 96010-900 – Pelotas – Rio Grande do Sul – Brazil, Phone: 55 (53)-8139-3575 e-mail: jujununesvieira@yahoo.com.br

Número de Tabelas: 1

Abstract

The aim of this study was to evaluate the frequency of *Candida* species between a non-hospitalized and a hospitalized population. For this purpose, samples of saliva were sampled through sterile swabs, moistened in peptone water and rubbed in the oral cavity of 140 individuals, from which, 70 were hospitalized patients from the Medical Clinic of a Teaching Hospital and the other 70 were non-hospitalized subjects. All saliva samples were plated in Sabouraud Dextrose agar added with Chloramphenicol and incubated at 36°C for 48 hours. The morphology identification was performed through macroscopic and microscopic characterization, the CHROMagar *Candida* medium and the VITEK® system Yeast Biochemical Card (bio Mérieux SA, France). The results showed a colonization of *Candida* spp., in 85.7% the hospitalized individuals, where the species found were *C. albicans* (60%), *C. tropicalis* (23.4%), *C. krusei* (3.3%) and *Candida* spp. (13.3%). In the non-hospitalized individuals the colonization by *Candida* spp was 47.1%, and the species found were: *C. albicans* (45.5%), *C. krusei* (9.1%), *C. guilliermondii* (9.1% %), *C. tropicalis* (3.0%), *C. famata* (3.0%) and *Candida* spp. (30.3%). In spite of their presence in oral cavity in both groups, *Candida* spp. was more frequently isolated in hospitalized individuals, who were 6.73 times more likely to have this fungus in the oral cavity and were 3.88 times more likely to have *Candida albicans*.

KEYWORDS: Oral *Candida* spp., colonization, hospitalized patients, nosocomial infections.

AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE *CANDIDA* SPP. EM INDIVÍDUOS HOSPITALIZADOS E NÃO HOSPITALIZADOS

Resumo:

O objetivo deste estudo foi avaliar a frequência de espécies de *Candida* entre uma população de indivíduos não-hospitalizados e hospitalizados. Para o efeito, amostras de saliva foram coletadas através de swabs estéreis, umedecidas em água de peptona e friccionadas na cavidade bucal de 140 indivíduos, dos quais 70 eram pacientes internados em uma Clínica Médica de um Hospital Escola e os outros 70 eram indivíduos não hospitalizados. Todas as amostras de saliva foram plaqueadas em ágar Sabouraud dextrose adicionadas de cloranfenicol e incubadas a 36 ° C durante 48 horas. A identificação morfológica foi realizada através da caracterização macroscópica e microscópica, com o meio CHROMagar *Candida* e do sistema VITEK® Biochemical Card (bio Mérieux SA, França). Os resultados mostraram uma colonização de *Candida* spp. em 85,7% dos indivíduos hospitalizados, onde as espécies encontradas foram: *C.albicans* (60%), *C. tropicalis* (23,4%), *C. krusei* (3,3%) e *Candida* spp. (13,3%). Nos indivíduos não-hospitalizados a colonização por *Candida* spp foi de 47,1%, e as espécies encontradas foram: *C. albicans* (45,5%), *C. krusei* (9,1%), *C. guilliermondii* (9,1%), *C. tropicalis* (3,0%), *C. famata* (3,0%) e *Candida* spp. (30,3%). Apesar de sua presença na cavidade oral em ambos os grupos, *Candida* spp. foi mais frequentemente isolada em indivíduos hospitalizados, que foram 6,73 vezes mais propensos a ter este fungo na cavidade oral e foram 3,88 vezes mais propensos a ter *Candida albicans*.

Palavras-Chave: *Candida* spp. oral, colonização, pacientes hospitalizados, infecções hospitalares.

Introduction

The yeasts of *Candida* species are microorganisms of the oral microbiota of humans, in which colonization occurs immediately after birth. This microbiological condition usually offers a harmonious balance between the parasite and the host, as the maintenance of the immune system, keeping the integrity of tissue barriers. This balance, however, may be disrupted due to a low immunity or by a mechanical, physical and iatrogenic change in the oral cavity, compromising the immune system and facilitating endogenous opportunistic infections caused by *Candida* spp. ^(1,2,3). Thus, *Candida* spp., virulence, may present pathogenic action when the host's resistance is overcome ⁽⁴⁾.

Opportunistic nosocomial infections are more frequently and severe in patients with poor oral health care, as well those who have been exposed to long intensive drug therapies. Some authors have stated that hospitalized patients tend to develop a higher oral candidiasis prevalence, due to both local and systemic alterations, changing the microbiota and contributing to this kind of infections ^(1,5,6). In addition, many intrinsic and extrinsic factors influence the composition, metabolic activity and pathogenicity of a variety of microorganisms in the oral cavity ⁽⁷⁾.

Hospital-acquired infections caused by yeasts, may have an exogenous source, and are generally transmitted by the hands of health professionals, surfaces of materials, lab coats of health care practitioners ⁸ and by people getting in contact with the patient, or by an endogenous source, such as the pre-existing microorganisms in the host, turning pathogenic for some reason. In view of the above, the aim of the present paper was to verify the occurrence and frequency of the yeasts of *Candida* spp., in the oral cavity of both non-hospitalized subjects and hospitalized patients from a Medical clinic of a Teaching Hospital situated in the city of Pelotas, Rio Grande do Sul.

Material and Methods

140 subjects took part in this study; they were divided in two groups. One group of 70 patients under hospitalization in the Federal University Hospital of Pelotas, and the second group of 70 non-hospitalized subjects, mainly students and professionals from the same University; none of the 140 subjects presented oral lesions.

The evaluation was based on a questionnaire where the non-hospitalized subjects also declared that they did not carried any infectious diseases at the time of sampling nor in the preceding month; they also declared that they did not have any underlying diseases and that they had not been submitted to antibiotic and corticoid therapy in the six months previous to evaluation. These individuals age ranged between 18 - 75 years.

From the 70 hospitalized patients, 50 developed some kind of internal or systemic bacterial infection and were under antibiotic therapy during the last month, and 20 were submitted to cancer treatment; their age ranged of 19 - 86 years.

The sampling was performed from the mucosa of the cheek in the oral cavity, through sterile swabs, moistened in peptone water. Each sample was identified with the corresponding number of the clinical report within the information of the patient. The reports were referred, along with the sampled material, to the Laboratory of Mycology of the Biology Institute from the UFPel.

The samples were plated in Sabouraud Dextrose agar added with Chloramphenicol and incubated at 36°C for 48 hours. The macro morphology was analysed by Gram-stain smears observed by light microscopy (1000X). Followed by the germ tube test and microculture in cornmeal media, the samples were replicated in CHROMagar *Candida* medium for an initial differentiation of the species. Unidentified isolates were evaluated through the assimilation of carbohydrates by the Vitek® system Yeast Biochemical Card (bio Mérieux SA, France). A descriptive comparison of both study groups (hospitalized patients

and non-hospitalized subjects) of different variables was developed, expressing frequency (value - n) and percentages (%) values. The statistical tests between the groups was performed using the chi-square test ($p \leq 0.05$), and the evaluation of the odds ratio (OR) with 95% of confidence intervals ($CI_{95\%}$).

This research was approved by the Research Ethics Committee of the Federal University of Pelotas (UFPel), according to the Declaration of Helsing, and the participants signed an Informed Consent Agreement.

Results

Candida spp. were isolated in 60 (85.7%) from the 70 samples of the hospitalized patients. The identified species were: *C. albicans* in 36 (51.4%) samples; *C. tropicalis* in 14 (20%) samples; *C. krusei* in two (2.9%), and *Candida* spp. in eight (11.4%). From patients hospitalized due to cancer chemotherapy (20 individuals), 14 were positive for fungus (70%) and *C. albicans* was isolated in 11 of the samples from these patients and *Candida* spp. in three. Yeasts were isolated in 46 (92%) of the 50 samples from patients undergoing antibiotic therapy due to infection (p -value = 0.017, OR = 4.93, $CI_{95\%}$ = 1.22 - 19.99). Of these 46 samples, 25 (54.3%) were by *Candida albicans*.

Candida isolates were found in 33 (47.1%) of the 70 samples from the non-hospitalized individuals. The species isolated were: *C. albicans* in 15 (21.4%) individuals; *C. krusei* in three (4.3%); *C. guilliermondii* in three (4.3%); *C. tropicalis* in one (1.4%); *C. famata* in one (1.4%), and 10 (14.3%) were identified as *Candida* spp.

A statistical significant difference (p -value<0.0001) was observed in the isolation of the yeast from oral cavity in both groups included in this study – non-hospitalized individuals and hospitalized patients from the Medical Clinic (Table 1). Hospitalized patients had 6.73 (p -value<0.0001, $CI_{95\%}$ = 2.97 – 15.24) times more likely to have *Candida* spp., and 3.88 (p -

value <0.0001 , $CI_{95\%} = 1.85 - 8.13$) times more likely to have *C. albicans* compared to the non-hospitalized subjects.

Table 1. Frequency of *Candida* spp., and *Candida albicans* in hospitalized (n=70) and non-hospitalized individuals (n=70) from the city of Pelotas, Rio Grande do Sul state, Brazil.

Variables	+	-	p-val/ue	OR
	n (%)	n (%)		(CI _{95%})
Presence of <i>Candida</i> spp.				
Hospitalized	60 (85.7)	10 (14.3)	<0.0001	6.73
non-hospitalized individuals	33 (47.1)	37 (52.9)		(2.97 – 15.24)
Presence of <i>Candida albicans</i>				
Hospitalized	36 (51.4)	34 (48.6)	<0.0001	3.88
non-hospitalized individuals	15 (21.4)	55 (78.6)		(1.85 – 8.13)

Discussion

Candida species live as commensals and are part of the normal microbiota of healthy subjects. A great variety of microorganisms with the ability of moving out and reintroducing themselves rapidly into the human system are regularly found in the oral cavity. This relation of microbial coexistence with the human health is possible by the immunological mechanisms through a continuous process of adaptation ^(2,7,9). Fungal infections have increased in recent years, and are responsible for high morbidity and mortality rates. *Candida* still causes most of the fungal nosocomial infections; the presence of these yeasts in human microbiota favours the incidence of these infections, mainly due to the virulence factors of the fungus and its interaction with the hospitalized patients who presented a weak immune system ^(10, 11, 12).

In this study, *Candida* spp. was found in 47.1% of the non-hospitalized subjects, and this agrees with other studies showing a 10 to 70% variation of *Candida* spp., in healthy individuals ⁽¹³⁾. 47.3% of positivity of *Candida* spp., in the oral cavity was also found in a group of children of a school from different socioeconomic status without candidiasis lesions, in which *C. albicans* was the prevailing specie, corresponding to 95% of all the isolates ⁽¹⁴⁾. Yeasts of *Candida* play an extremely important role in high frequent infections and colonization in humans ^(1, 8, 15). These findings agrees with the reported by several authors related to the colonization prevalence of *C. albicans* over other species in the oral cavity, and consequently on the subsequent candidiasis development ^(1, 2, 5, 14, 16).

The yeast was isolated from the hospitalized patients in 85.7%, being twice the frequency observed in the non-hospitalized individuals. The isolated species were: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* and *Candida* spp. The most frequent isolated specie was again *C. albicans*, found in 51.4% of the patients. *C. albicans* is without a doubt the most frequently isolated specie in both superficial and invasive infections from different anatomic sites, and the most common cause of candidiasis and candidemia worldwide ^(1,8, 12).

A study performed by Domaneschi et al. ⁽¹⁷⁾ revealed that the prevalence of *Candida* spp., in the oral cavity of immunocompromised patients (aids paediatric patients), and found it in 62% of the analysed samples and the most frequent isolated specie in this study was *C. albicans*. Another study by St-Germain et al. ⁽¹⁸⁾, in which a total of 453 episodes of candidemia from 54 laboratories from hospitals in Quebec, Canada, founded *Candida albicans* in 62% of the isolates, and the authors reported that in North America and in most countries worldwide, *C. albicans* continues to be the single most common specie causing candidemia.

The presence of yeasts of *Candida* spp. on human skin and mucosa, facilitates the occurrence of oral or systemic candidiasis ⁽¹⁾. The virulence factors of the fungus and the

immune status of the individual are two parameters which controls the onset of *Candida* spp. (19, 20). The occurrence of nosocomial infections is a worrying factor, once it is directly connected to the onset of resistant infections in most of the cases (21, 22).

The fact that the hospitalized patients undergoing antibiotic therapy, had a higher significant prevalence of *Candida* spp., (p value = 0.017), deserves attention. This fact, was verified by other authors, however, this prevalence can depend of the quantity of administrated antibiotics per day, type of drug used (mainly those with broad spectrum), the length of treatment, the *Candida* specie (*C. albicans* or non-*albicans* *Candida* species), among others (23, 24, 25).

Commensal microorganisms become pathogenic due to alterations in the host defence mechanisms (immunosuppression), or in the secondary anatomical barriers – such as burns or invasive medical procedures. Alterations in the host defence mechanisms may also result from physiological changes in childhood (prematurity), aging, often associated with degenerative, congenital or acquired immune deficiencies, as well as hospitalizations or immune depression induced by medical action (2, 7, 8, 26), therefore the importance of knowing the microorganisms that are part of the microbiota of patients with a differentiated immune condition.

From the patients diagnosed with cancer, 70% (fourteen cases) had *Candida* spp. This result is higher to those obtained by Schelenz et al. (27), who found a prevalence of oral yeast colonization in 56.8% (227/400) of cancer patients. *C. albicans* was also the predominant (74%) specie in this research, followed by *C. glabrata* (11.5%), *C. tropicalis* (2.6%), *C. krusei* (2.6%) and *C. parapsilosis* (1.9%). Finally, this and others authors reported a significant increased risk of clinical oral fungal infection during cancer therapy (27, 28).

In conclusion, the present study showed that hospitalized patients have 6.73 more chances to have *Candida* spp. compared with the non-hospitalized individuals and 3.88 more chances to have *Candida albicans*. Besides that, the prevalence of *Candida* spp., is higher in

those hospitalized patients under antibiotic therapy (p-value<0.0001). This finding deserves an important attention in the clinical and medical area due to the association of the frequency of the gender *Candida* spp., in hospitalized patients, since the infection caused by this fungus is associated with a higher severity clinical response and by the immunosuppression that these individuals have.

Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Moris, DV, Melhem, MSC, Martins, MA, Mendes, RP., 2008. Oral *Candida* spp. Colonization in human immunodeficiency virus-infected individuals. Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases, vol. 14, no. 2, p. 224-257.
2. Moyes, DL, Naglik, JR., 2011. Mucosal immunity and *Candida albicans* infection. Clinical and Developmental Immunology, 9 pages.
<http://dx.doi.org/10.1155/2011/346307>.
3. Simões, RJ, Fonseca, P, Figueiral, MH., 2013. Oral infections by *Candida* spp. Odontologia Clínico-Científica, vol. 12, no. 1, p. 19-22.
4. Santana, DP, Ribeiro, EL, Menezes, ACS, Naves, PLF., 2013. New approaches on virulence factors of *Candida albicans*. Revista de Ciências Médicas e Biológicas, vol. 12, p. 229-233.
5. Grimoud, AM, Marty, N, Bocquet, H, Andrieu, S, Lodter, JP, Chabanon, G., 2003. Colonization of the oral cavity by *Candida* species: risk factors in long-term geriatric care. Journal of Oral Science, vol. 45, no. 1, p. 51-55.
6. Meurman, JH, Hamalainen, P., 2006. Oral health and morbidity: implication of oral infections on the elderly. Gerodontology, vol. 23, no. 1, p. 3-16.

7. Bodineau, A, Folliquet, M, Séquier, S., 2009. Tissular senescence and modifications of oral ecosystem in the elderly: risk factors for mucosal pathologies. *Current Aging Science Journal*, vol. 2, no. 2, p. 109-120.

8. Savastano, C, de Oliveira Silva, E, Gonçalves, LL, Nery, JM, Silva, NC, Dias, AL., 2016. *Candida glabrata* among *Candida* spp. from environmental health practitioners of a Brazilian Hospital. *Brazilian Journal of Microbiology*, vol. 47, no. 2, p. 367-72.

9. Naglik, JR, Moyes, D., 2011. Epithelial cell innate response to *Candida albicans*. *Advances in Dental Research*, vol. 23, no. 1, p. 50-55.

10. Heo, SM, Sung, RS, Scannapieco, FA, Haase, EM., 2011. Genetic relationships between *Candida albicans* strains isolated from dental plaque, trachea, and bronchoalveolar lavage fluid from mechanically ventilated intensive care unit patients. *Journal of Oral Microbiology*, vol. 3, p. 10 pages, doi: 10.3402/jom.v3i0.6362. Epub 2011 Jun 20.

11. Silva, AKF, Lisboa, JES, Barbosa, MPC, Lima, AF., 2014. Infecções urinárias nosocomiais causadas por fungos do gênero *Candida*: uma revisão. *Ciencias Biológicas e da Saúde*. vol. 2, no. 1, p. 45-57.

12. Hinrichsen, SL, Falcão, E, Vilella, TAS, Rêgo, L, Lira, C, Almeida, L, Martins, M, Araújo, C, Duarte, M, Lopes, G., 2009. *Candida* isolates in tertiary hospitals in northeastern Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. vol. 40, no. 2, p. 325-328.

13. Motta, AL, Almeida, GMD, Almeida Júnior, JN, Burattini, MN, Rossi, F., 2010. Candidemia epidemiology and susceptibility profile in the largest Brazilian teaching hospital complex. *Brazilian Journal of Infections Disease*, vol. 14, p. 441-448.

14. Moreira, D, Spolidório, DMP, Rodrigues, JAO, Boriollo, MFG, Pereira, CV, Rosa, EAR, Höfling, JF., 2001. *Candida* spp. biotypes in the oral cavity of school children from different socioeconomic categories in Piracicaba - SP, Brazil. *Pesquisa Odontológica Brasileira*, vol. 15, no. 3, p. 187-195.

15. Lass-Flörl, C., 2009. The changing face of epidemiology of invasive fungal disease in Europe. *Mycoses*, vol. 52, no. 3, p. 197-205.

16. Naglik, JR, Challacombe, J, Hube, B., 2003. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 67, no. 3, p. 400-428.

17. Domaneschi, C, Massarente, DB, Freitas, RS, de Sousa Marques HH, Paula, CR, Migliari, DA, Antunes, JL., 2011. Oral colonization by *Candida* species in AIDS pediatric Patients. *Journal Oral Disease*, vol. 17, no. 4, p. 393-398.

18. St-Germain, G, Laverdière, M, Pelletier, R, René, P, Bourgault, AM, Lemieux, C, Libman, M., 2008. Epidemiology and antifungal susceptibility of bloodstream *Candida* isolates in Quebec: Report on 453 cases between 2003 and 2005. *Canadian Journal of Infections Diseases and Medical Microbiology*, vol. 19, no. 1, p. 55-62.

19. Hube, B., 2004. From commensal to pathogen: stage- and tissue-specific gene expression of *Candida albicans*. *Current Opinion in Microbiology*, vol. 7, no. 4, p. 336-341.

20. Pfaller, MA, Diekema, DA., 2007. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clinical Microbiology Reviews*. vol. 20, no. 1, p. 133-163.

21. Soll, DR, Lockhart, SR, Zhao, R., 2003. Mating and virulence of *Candida albicans*. *Mycologist*. vol. 17, no. 2, p. 64-69.

22. Cantón, E, Pemán, J, Sastre, M, Romero, M, Espinel-Ingroff, A., 2006. Killing kinetics of caspofungin, micafunigin, and amphotericin B against *Candida guilliermondii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. vol. 50, no. 8, p. 2829-2832.

23. Krcmery, V Jr, Oravcova, E, Spanik, S, Mrazova-Studenaa, M , Truplc, J , Kunovac, A, Stopkova-Greya, K, Kukuckovaa, E, Krupovaa, I , Demitrovicovaa, A, Kralovicovaet, K., 1998. Nosocomial breakthrough fungaemia during antifungal prophylaxis or empirical antifungal therapy in 41 cancer patients receiving antineoplastic chemotherapy: analysis of a etiology risk factors and outcome. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 41, no. 3, p. 373-80.

24. Singh, N., 2001. Trends in the epidemiology of opportunistic fungal infections: predisposing factors and the impact of antimicrobial use practices. *Clinical Infectious Diseases*, vol. 33, no. 10, p. 1692-1696.

25. Al Thaqafi, AH, Farahat, FM, Al Harbi, MI, Al Amri, AF, Perfect, JR., 2014. Predictors and outcomes of *Candida* bloodstream infection: eight-year surveillance, western Saudi Arabia. *International Journal of Infection Diseases*, vol. 21, p. 5-9.

26. Lund, RG, Nascente, OS, Etges, A, Ribeiro, GA, Rosalen, PL, Del Pino, FAB., 2010. Occurrence, isolation and differentiation of *Candida* spp. and prevalence of variables associated to chronic atrophic candidiasis. *Mycoses*, vol. 53, no. 3, p. 232-238.

27. Schelenz, S, Abdallah, S, Gray, G, Stubbings, H, Gow, I, Baker, P, Hunter, PR., 2011. Epidemiology of oral yeast colonization and infection in patients with hematological malignancies, head neck and solid tumors. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, vol. 40, no. 1, p. 83-89.

- 28 Lalla, RV, Latortue, MC, Hong, CH, Ariyawardana, A, D'Amato-Palumbo, S, Fischer, DJ, Martof, A, Nicolatou-Galitis, O, Patton, LL, Elting, LS, Spijkervet, FKL, Brennan, MT., 2010. A systematic review of oral fungal infections in patients receiving cancer therapy. *Support Care Cancer*, vol. 18, no. 8, p. 985-992.

Chemical composition of essential oils from the Apiaceae family, cytotoxicity, and their antifungal activity *in vitro* against *Candida* species from oral cavity.

Juliana Nunes Vieira[†], Carolina Lambrecht Gonçalves[†], José Pablo Villarreal Villarreal[†], Victoria de Moraes Gonçalves[‡], Rogério Antonio Freitag[‡], Adriana Fernandes da Silva[§], Rafael Guerra Lund[§], Patrícia da Silva Nascente[†]

[†]Laboratory of Parasitology, Institute of Biology, Department of Microbiology and Parasitology, Federal University of Pelotas, Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brazil. Cep 96010-900 – Pelotas – RS – Brazil.

[‡]Department of Organic Chemistry, Federal University of Pelotas, Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brazil. Cep 96010-900 – Pelotas – RS – Brazil.

[§]Department of Restorative Dentistry, School of Dentistry, Federal University of Pelotas (UFPel), Pelotas, RS, Brazil. Street: Gonçalves Chaves, 457- Centro. Cep 96020-080 – Pelotas – RS – Brazil.

Corresponding author*: Juliana Nunes Vieira - Campus Universitário s/n Capão do Leão – Instituto de Biologia Prédio 18 sala 03. Cep 96010-900 – Pelotas – RS – Brasil, Fone: 55 (53)-8139-3575 jujununesvieira@yahoo.com.br

ABSTRACT:

The aims of this research were: evaluate the chemical composition and the cytotoxicity of the *Cuminum cyminum* (cumin), *Anethum graveolens* (dill), *Pimpinella anisum* (anise) and *Foeniculum vulgare* (fennel) essential oils, as well as their antifungal activity *in vitro* against ten *Candida* spp. isolates. The chemical composition of the oils was analyzed by means of gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC/MS). The cytotoxicity assays were performed, using the cell proliferation reagent WST-1 in L929 mouse fibroblasts (20×10^3 well⁻¹). The determinate the Minimum Inhibitory Concentration (MIC), was performed through the Broth Microdilution technique (CLSI). The chemical main components were the cuminaldehyde (32,66%) for cumin, carvone (34,89%) for the dill, *trans*-anethole (94,01%) for the anise and anethole (79,62%) for the fennel. Anise and fennel did not were cytotoxic in all the tested concentrations, however the cumin oil was cytotoxic in the concentration of 20 mg.mL⁻¹ and the dill in the concentrations of 20 and 8 mg.mL⁻¹. All yeasts were susceptible against the evaluated essential oils. Cumin presented the lowest MIC against yeasts. We concluded that all the essential oils presented inhibitory action against *Candida* spp., and *C. cyminum*, *P. anisum* and *F. vulgare* were not cytotoxic in the same minimum inhibitory concentrations for the fungi.

Key-words: *Cuminum cyminum*; Chronic Atrophic Candidiasis; *Candida* spp.; antifungal.

Introduction:

Candida spp. are the most common cause of fungal infections in humans, are important commensal microorganisms from the oral cavity, turning them pathogenic, if favorable conditions related to the host low immunity exist¹. Infections commonly known as oral candidiasis or moniliasis, have different clinical forms, such as pseudomembranous candidiasis, commonly known as thrush, erythematous candidiasis, hyperplastic and mucocutaneous candidiasis, being common problems faced by dental professionals.²

Clinical Chronic Atrophic Oral Candidiasis or denture stomatitis is an erythematous oral candidiasis, characterized by different degrees of erythema and hemorrhagic petechiae, localized in the edge of the denture area of a superior removable prosthesis. This reaction can result from; an inappropriate denture design, an allergy at its base or by an acrylic inadequate polymerization.³

In the last decade, the infections by *Candida* species had been growing in an alarming speed, as well as their resistance development towards antifungal drugs commonly used with unwished reactions in patients. There by, new alternative products are proposed to minimize such of these negative facts.⁴⁻⁵

By the above, fitotherapeutic alternatives, such as essential oils, have entered into the market, with the purpose to reduce the costs of production, this is why rigorous tests are required to control their quality in relation to their effectiveness, antimicrobial activity, security and toxicity when compared to others types of synthetic drugs, as well as the reduce the side effects in patients.⁶⁻⁷

Among the many species of aromatic plants, the ones from the family Apiaceae had been investigated for medical use, due to their antimicrobial properties. These plants produce essential oils, characterized for releasing a relative high amount of volatile compounds.⁸ Among some representative species of the Apiaceae family, we can mention; the *Cuminum cyminum* (cumin), *Anethum graveolens* (dill), *Pimpinella anisum* (anise) and *Foeniculum vulgare* (fennel) and the fennel (*Foeniculum vulgare*), plants with culinary and medical applications.⁹

The aim of this research was to evaluate the cytotoxicity and chemical composition of the *C. cyminum*, *A. graveolens*, *P. anisum* and *F. vulgare* essential oils, as well as their *in vitro* antifungal activity against *Candida* spp. isolates from clinical Chronic Atrophic Oral Candidiasis cases.

Material and Methods:

Research location and fungal isolates

The microbial assays were performed in the Laboratory of Mycology located in the Biology Institute from the Federal University of Pelotas (UFPEL). The isolates tested were obtained from the mycology collection of the Oral Microbiology Laboratory in the Faculty of Odontology, from clinical Chronic Atrophic Oral Candidiasis cases, being the following *Candida* species: *Candida albicans* (23778, 23651, 23609, 24073 e 23536), *Candida parapsilosis* (2340 e 23459), *Candida glabrata* (23453), *Candida krusei* (23932) and *C. albicans* ATCC (62342).

Essential oils

The *C. cyminum*, *A. graveolens*, *P. anisum* and *F. vulgare* essential oils were obtained through the Department of Organic Chemistry of the Chemical Science, Pharmaceutics and Food Center (CCQFA) of the UFPel, by means of hydrodistillation (1.5 L of distilled H₂O / 100 g of plant material) in a Clevenger apparatus. The plants were commercially acquired from the Luar Sul L.T.D.A., company and the parts used were: seeds, for the cumin, dill and anise; and leaves for the fennel. The essential oil yield for each plant was of 2,5 mL for the cumin and anise, 1,9mL for the dill and 2,3 mL for the fennel.

Chromatographic analysis of the essential oils

The essential oils were submitted to chromatography analysis coupled with mass spectrometry (GC/MS) in a Shimadzu QP2010 apparatus, equipped with split/splitless injector with capillary column Rtx-5MS RESTEK (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m), in the following chromatographic conditions: Helium gas as carrier, obtained fragments by the impact of the electrons at the energy of 70 eV, flow 1.2 ml/min, split 1:10, 1 μ L of sample injected volume. Oven programmed temperature: Initial temperature of 40°C, with a heating ramp at 5°C/min to 280°C, remaining stable in this temperature for 10 minutes, with a total time of 8 minutes, being the injector temperature of 58°C and the interface of 200°C. The compounds were analyzed according to the chromatographic standards, based on the GC/MS NIST08 library. The oil was diluted in hexane (analytical grade, ultra-pure).

Cytotoxicity assay

The cytotoxicity assay was realized by the Department of Restorative Dentistry, School of Dentistry, from the Federal University of Pelotas (UFPel). The cell viability was performed according to the ISO 10993-5 (2009)¹⁰. Mouse fibroblasts cell line L929 (20x10³ well⁻¹) were maintained in Dulbeccos's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10 % of fetal bovine serum (FBS), 2 % of L -glutamine, penicillin (100 U.mL⁻¹) and streptomycin (100 mg.mL⁻¹) using a plate of 96-wells, incubated for 24 h at 37 °C in a humidified atmosphere of CO₂ 5 % in air until sub confluence was achieved. The essential oils were made by a mold (6 mm diameter and 1 mm depth), and photo-activated by Radium Cal (n = 5). The essential oils were diluted and tested at concentrations of 20, 8, 4 e 2 mg.mL⁻¹. After 24 hours, 200 μ L of each dilution oils were transferred to the 96-well plates previously prepared and incubated for 24 h. WST-1 assay was used to assess cell metabolic function by mitochondrial dehydrogenase activity. The absorbance at 450nm was measured via a microplate reader (SpectraMax M5; Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Each assay was performed in triplicate. Statistical analysis was performed using Kruskal-Wallis (One Way Analysis of Variance on Ranks) followed by Turkey complementary test. Cell viability values above 70% indicate that the chemical compound was not cytotoxic, according ISO 10993-5 (2009)¹⁰.

Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

The determination of the Minimum Inhibitory Concentrations of the essential oils was performed using the Broth Microdilution technique, in accordance with the document M27-A4 by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2013)¹¹, adapted to phyto pharmaceuticals. Initially, 100 μL of RPMI media - 1640 (DIFCO[®], Detroit, Michigan, EUA) were distributed in each well of the microdilution plate which contains 96 wells with a "U" bottom form. For the MIC evaluation of the essential oils, 10 successive dilutions in RPMI medium were performed; obtaining concentrations of 70 to 0,137 mg.mL^{-1} , arranged in a volume of 100 μL according to the sense of the lines in the microdilution plate. In the each well of each column, aliquots of 100 μL of each inoculum of each corresponding *Candida* species were added, for further analysis. The yeast's suspension was adjusted in a spectrophotometer (530 nm) to obtain a final concentration of approximately 5×10^6 cells mL^{-1} .

The tests were performed by duplicate, with three repetitions; a column used for the positive control (inoculum/medium) and another column for the negative control (essential oil/medium).

Jointly the same procedure was performed with the fluconazole, considered a model in clinical use, in successive concentrations, from 16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ to 0.0313 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (CLSI, 2013)¹¹, by the microdilution technique.

The microplates were incubated at 35 °C for 48 hours. The lecture for the MIC determination of the essential oils against the yeasts strains was performed through turbidity visualization, related to the microorganism growth and compared to the positive and negative controls. It was considered as MIC, the minor concentration of the drug capable to produce growth inhibition of the yeasts, compared with the positive control well (CLSI, 2013)¹¹.

Results and Discussion:

In Table 1, the majority compound present in the cumin essential oil was the cuminaldehyde (32,66%), for the dill the carvone (34,89%), for the anise the *trans*-anethole (94,01%) and for the fennel the anethole (79,62%).

In the present study, cytotoxicity assays showed that only cumin and dill oils were cytotoxicity, since present below of 70% of cell viability (Figure 1). In relation to the yeasts' MIC, the cumin, anise and fennel did not shown cytotoxicity, however the dill oil in the concentrations of 20 and 8 mg.mL^{-1} were cytotoxic related to the MIC.

The antifungal tests with ten *Candida* species demonstrated that all tested yeasts showed susceptibility against the evaluated essential oils, being that the cumin (*Cuminum cyminum*) essential oil, showed the best antifungal activity, with the lowest MICs, that varied from 2.188 to 4.375 mg.mL^{-1} . The essential oil of fennel (*Foeniculum vulgare*) also showed low minimum inhibitory concentration (MIC: 4.375 mg.mL^{-1}) against *Candida albicans* isolate (24073), however, this was equal to the CMI verified for cumin (Table 2).

Due to the problems faced by patients carrying oral candidiasis, especially clinical Chronic Atrophic oral Candidiasis, mainly by the *Candida* species resistance against antifungal drugs commonly use, the search of new compounds, such as essential oils, which have antimicrobial actions against resistant

microorganisms, are necessary. As result of the present study, it was verified that the essential oils of *C. cyminum*, *A. graveolens*, *P. anisum* and *F. vulgare* showed antifungal activity against ten tested oral *Candida* species, all isolates were sensitive to the synthetic antifungal fluconazole, used as control.

Several studies have shown the excellent therapeutic properties of essential oils, meanwhile, in the assays of antifungal *in vitro* activity of the oils, it is possible to verified a variety of methodologies proposed, such are the agar diffusion, the disk diffusion and the broth dilution⁷⁻¹²⁻¹³⁻¹⁴⁻¹⁵⁻¹⁶⁻¹⁷, making hard to compared between the present study and these studies. There by, the recognition of the pharmacologic activity of the presented plants in this study represents important information to evaluate the obtained viability of the product in clinical use.

In our results, the *C. cyminum* essential oil had the lowest inhibitory concentration against *Candida* species, compared to the other oils. Results with inhibition values and good antimicrobial activity of *C. cyminum*, against the *Candida* species, were also registered by other authors. Shetty et al, (1994)¹⁸, using the agar diffusion method, founding positive results, however with a minor inhibitory concentration of 0,10 mg.mL⁻¹. Pai et al, (2010)¹⁴ and Wanner et al, (2010)¹⁵ used the disk diffusion method, confirming the cumin as an anti-*Candida* potential agent. Kamble et al, (2015)⁷, had good inhibition results against *Candida albicans* and not *albicans* using the disk diffusion and the broth micro and macrodilution techniques (Minimum Inhibitory Concetration).

C. parapsilosis (23459) had the highest susceptibility against cumin essential oil (CIM de 2,188 mg.mL⁻¹), meanwhile the others isolates showed inhibition at higher concentrations, to this and the others essential oils.

In the dill, anise and fennel essential oils, the antifungal activity was practically the same against *Candida* spp. isolates, having few variations. In other works using the dill essential oil, the antifungal activity against *A. graveolens* was analyzed and confirmed against the *Candida* spp. clinical isolates. In the study by Zeng et al, (2011)¹⁹, using the broth microdilution technic (MIC), microbiological and histological technics in mice, demonstrated that dill was active *in vitro* and *in vivo* against all the *Candida* species tested. Yili et al, (2009)²⁰, analyzed the MIC through the Barry method, with an ethylene oxide addition, and they found inhibition results of 0.00273 mg.mL⁻¹ in *C. albicans*, affirming that the yeast growth, sharply decreased with this component addition in the nutrient medium.

In studies using anise, Kosalec et al. (2005)¹², evaluated the antifungal activity of the extract fluid and essential oil of *P. anisum* in *Candida* species, through the agar diffusion and broth dilution methods and verified that the essential oil exhibit a low minimum inhibitory concentration *in vitro* against yeasts.

As for the fennel essential oil, Gulfranz (2008)¹³ and Pai et al. (2010)¹⁴ also confirmed the effective antifungal effect of the oil of *F. vulgare* against *C. albicans*, through the disk diffusion method, however, Skrobonja et al, (2013)²¹, in one of the used technics, found results *in vitro* with MICs of 0, 06 and 0, 02 mg. mL⁻¹ against this yeast.

In this research, the antifungal activity determination of the oils was performed through the broth microdilution technic (CLSI, 2013)¹⁰, with the aim to proportionate a major contact between the tested products and the fungic cells¹⁶, being the MIC

obtained one of the better patterns in evaluating the antifungal activity of the essential oils.⁵

According to Menezes et al. (2009)²² and Cavalcanti et al. (2011)¹⁶, vegetal products with good antimicrobial activity must present a MIC equal or inferior to 100 mg.mL⁻¹, and in the present study, 97.5% of essential oils were equal to or below 8.75 mg.mL⁻¹, demonstrating an adequate inhibitory activity in low concentrations and appropriate antifungal activity, with the application capacity of these compounds as antimicrobial substances in dental practice.

The higher and lower biological activity of the essential oils has been dependent to its composition, in other words of its chemicals constituents.⁴

Elevated concentrations of these constituents and their proportions are of great importance in the product efficacy, confirming their properties and medical applications. However, studies demonstrated that these isolated compounds don't have the same efficacy of the essential oil.⁸⁻²⁰

In the chromatographic analysis of the *C. cyminum* essential oil, the majority constituents were Cuminaldehyde, γ -terpinene, β -pinene, o-cymene, 2-carene-10-al, 1-phenyl-1-butanol and D-limonene agreeing with the results found by others authors, only with few variations.⁷⁻¹⁵⁻¹⁸

In the chromatography analysis of the essential oil of *A. graveolens*, the principal identified constituents were Carvone, Apiol, D-limonene, Dihydrocarvone and Trans-dihydrocarvone agreeing with the studies by Zeng et al. (2011)¹⁹; Tian et al. (2011)²³, featuring the carvone, limonene and apiol as the majority compounds.

In the essential oil of *P. anisum*, the principal compounds found were *trans*-anethole and Estragole. Other constituents of the oil present in lower quantity were *cis*-(-)-2,4a,5,6,9a-Hexahydro-3,5,5,9-tetramethyl(1H)benzocycloheptene, *cis*-anethole, (+)-Carvone, Di-epi-alpha-cedrene, Limonene, p-Cumic aldehyde and beta-Chamigrene. Similar results were reported in other works.²⁴⁻²⁵

In the chromatography result of *F. vulgare*, the following constituents were verified in higher quantity: Anethole, Fenchone, Estragol, methyl nonadecanoate and 1R- α -pinene. Other studies also confirmed such identified components as the main.²⁶⁻²⁷

The antimicrobial activity of the essential oils is attributed to their principal components and to the resulted synergic or antagonist action. However, the minor components also contribute to their biologic activity.²⁸

In the present study, the cell viability test WST-1 in the Mouse fibroblasts L929 (20x10³ well⁻¹) was made for cytotoxicity evaluation. We sought, with this analysis; information in relation to the biological behavior of the oils, so that they can subsequently be used for *in vivo* studies. The cytotoxicity evaluation provides a security parameter in the compounds utilization having potential therapeutic activity.²⁹

As for the cytotoxicity assay, the oils of cumin, anise and fennel were not cytotoxic in the same minimum inhibitory concentrations found for the tested yeast. Such results suggest that these oils showed to be promising models in the selection of natural products with antifungal activity, to prevent and treat fungal infections in oral tissue.

Given the above, it is possible to note the need to investigate the potential application of these phytotherapeutic oils in the formulation of dental products such as in the prevention and treatment of candidiasis on dental prostheses, which indicates conducting further research to know the effectiveness of these oil constituents in the formulation of these new dental products.

Conclusion

The essential oils of different species of the Apiaceae family, proved to be a promising source of biomolecules, with antifungal potential activity. Inside the experimental conditions of the present study, it was possible to conclude that the *C. cyminum* essential oil exhibit the lowest MIC against the tested *Candida* species, and cumin, anis and fennel essential oils were not cytotoxic to Mouse fibroblasts in the same minimum inhibitory concentrations found for the tested yeast. However, other specific *in vivo* studies and clinical assays about the security and efficacy of these oils are necessary, to evaluate the relevance practice of the results obtained *in vitro*, for the future development of new products with possible therapeutic applications.

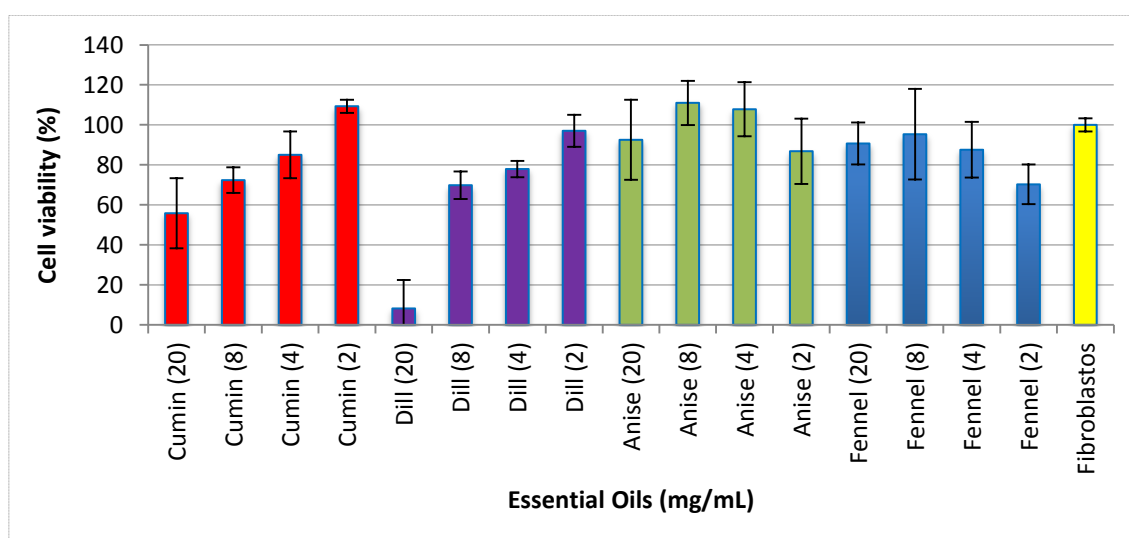
Table 1. Main chemical compounds identified in the *Cuminum cyminum*, *Anethum graveolens*, *Pimpinella anisum* and *Foeniculum vulgare* essential oils, using the chromatography GC/MS technic

Chemical Compounds	Essential Oils			
	Cumin	Dill	Anise	Fennel
Cuminaldehyde	32,66%			
γ -terpinene	19,87%			
β -pinene	15,22%			
<i>o</i> -cymene	14,00%			
2-carene-10-al	8,54%			
1-phenyl-1-butanol	8,01%			
D-limonene	1,7%	18,92%		
<i>trans</i> -anethole			94,01%	
Estragole			2,46%	3,65%
<i>cis</i> -anethole				
<i>cis</i> -(-)-2,4a,5,6,9a-Hexahydro-3,5,5,9-tetramethyl(1H)benzocycloheptene			1,7%	
<i>cis</i> -anethole			0,83%	
(+)-Carvone			0,29%	
Di-epi-alpha-cedrene			0,24%	
Limonene			0,18%	
<i>p</i> -Cuminic aldehyde			0,16%	
beta-Chamigrene			0,13%	
Carvone		34,89%		
Apiol		22,02%		
Dihydrocarvone		16,91%		
Trans-dihydrocarvone		7,26%		
Anethole				79,62%
Fenchone				12,19%
Methyl nonadecanoate				2,89%
1R- α -pinene				1,65%

Table 2. Inhibitory Minimum Concentration (mg.mL^{-1}) of the *Cuminum cyminum*, *Anethum graveolens*, *Pimpinella anisum* and *Foeniculum vulgare* essential oils against the ten *Candida* species isolates

Essential Oils	Cumin	Dill	Anise	Fennel
Yeasts				
<i>C. albicans</i> ATCC (62342)	8.75	8.75	8.75	8.75
<i>C. albicans</i> (23778)	4.375	8.75	8.75	8.75
<i>C. albicans</i> (23651)	4.375	8.75	8.75	8.75
<i>C. albicans</i> (23609)	4.375	8.75	8.75	8.75
<i>C. albicans</i> (24073)	4.375	8.75	8.75	4.375
<i>C. albicans</i> (23536)	4.375	8.75	8.75	8.75
<i>C. parapsilosis</i> (2340)	4.375	8.75	8.75	8.75
<i>C. parapsilosis</i> (23459)	2.188	8.75	8.75	8.75
<i>C. glabrata</i> (23453)	4.375	17.5	8.75	8.75
<i>C. krusei</i> (23932)	4.375	8.75	8.75	8.75

Figure 1. Cytotoxicity activity *in vitro* of the *Cuminum cyminum*, *Anethum graveolens*, *Pimpinella anisum* and *Foeniculum vulgare* essential oils in Mouse fibroblasts L929 (20×10^3 well⁻¹) cells



References :

- (1) Simões, R.J.; Fonseca, P.; Figueiral, M.H. *Odontol. Clín.Cient.* **2013**, *12*, 19-22.
- (2) Simões, R.J.; Fonseca, P.; Maria Helena Figueiral, M.H. *Odontol. Clín.-Cient.* **2013**, *12*, 19-22.
- (3) Moreira, A.C.A; Falcão, A.F.P.; Andrade, A.P.A.; Souza, E.R. *R. Ci. Méd. Biol.* **2002**, *1*, 124-128.
- (4) Lima, I. O.; Oliveira, R. A. G.; Lima, E. O.; Farias, N. M. P.; Souza, E. L. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2006**, *16*, 197-201, 2006.
- (5) Pozzatti, P. Suscetibilidade de *Candida* spp sensíveis e resistentes ao fluconazol frente a óleos essenciais extraídos de condimentos. 2007. 148p. Dissertação (Mestrado - Área de Concentração em Ciências Farmacêuticas) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, SantaMaria.
- (6) Castro, R. D.; Lima, E. O. *Rev. Odontol UNESP.* **2010**, *39*, 179-184, 2010.
- (7) Kamble, V.A. *AJPCT.* **2015**, *3*, 264-275.
- (8) Simões, C.M.O., Schenkel, E.P., Gosmann, G., Palazzo de Mello, J.C., Mentz, L.A. *Farmacognosia: da planta ao medicamento.* Porto Alegre, RS, Brazil, 2010, UFRGS (6 Ed); pp. 1102.
- (9) Downie, S.R.; Katz-Downie, D.S.; Spalik, K. *Am. J. Bot.* **2000**, *87*, 76–95.
- (10) Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. INTERNATIONAL STANDARD. ISO 10993-5:2009(E).
- (11) CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard-third edition M27-A3. *CLSI*, Wayne, PA, USA, 2013.
- (12) osalec, I.; Pepeljnjak, S.; Kustrak, D. *Acta Pharm.* **2005**, *55*, 377–385.
- (13) Gulfranz, M.; Mehmood, S.; Minhas, N.; Jabeen, N.; Kausar, R.; Jabeen, K.; Arshad, G. *Afr. J. Biotechnol.* 2008, *7*, 4364-4368.
- (14) Pai, M.B.H.; Prashant, G.M.; Murlikrishna, K.S.; Shivakumar, K.M.; Chandu, G.N. *Indian J Dent Res.* **2010**, *21*, 334-6.

- (15) Wanner, J.; Bail, S.; Jirovetz, L.; Buchbauer, G.; Schmidt, E.; Gochev, V.; Girova, T.; Atanasova, T.; Stoyanova, A. *Nat Prod Commun.* **2010**, *5*, 1355-1358.
- (16) Cavalcanti, Y.W.; Pérez, A.L.A.L.; Xavier, G.D.R.; Almeida, L.F.D. *Rev. Odontol. UNESP.* **2011**, *40*, 208-214.
- (17) Cleff, M.B.; Madrid, I.; Meinerz, A.R.; Meireles, M.C.A.; Mello, J.R.B.; Rodrigues, M.R.; Escareño, J.J.H. *Afr. J. Microbiol. Res.* **2013**, *7*, 2245-2250.
- (18) Shetty, R.S.; Singhal, R.S.; Kulkarni, P.R. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **1994**, *10*, 232-233.
- (19) Zeng, H.; Tian, J.; Zheng, Y.; Ban, X.; Zeng, J.; Mao, Y.; Wang, Y. *J. Evid. Based Complementary Altern Med.* **2011**, *01*, 1-8.
- (20) Yili, A.; Aisa, H. A.; Maksimov, V. V.; Veshkurova, O. N.; Salikhov, S. I. *Chem. Nat. Compd.* **2009**, *45*, 280-281.
- (21) Skrobonja, J.R.; Delic, D.N.; Karaman, M.A.; Matavulj, M.N.; Bogavac, M.A. *Jour. Nat. Sci. Matica Srpska Novi Sad.* **2013**, *124*, 195—202.
- (22) Menezes, T. O. A.; Alves, A. C. B. A.; Vieira, J. M. S.; Menezes, S. A. F.; Alves, B. P.; Mendonça, L. C. V. *Ver. Odontol. UNESP.* **2009**, *38*, 184-91.
- (23) Tian, J.; Ban, X.; Zeng, H.; Huang, B.; He, J.; Wang, Y. *Food Control, China*, v. 22, p. 1992-1999, **2011**.
- (24) Shojaii, A.; Fard, M. A. *ISRN Pharmaceutics. Volume 2012, Article ID 510795, 8 pages doi:10.5402/2012/510795*, **2012**.
- (25) Ozcan, M.M.; Chalchat, J.C. *Ann. Microbiol.* **2006**, *56*, no. 4, pp. 353– 358, 2006.
- (26) Anwar, F.; Ali, M.; Hussain, A.I.; Shahid, M. *Flavour Frag. J.* **2009**, *24*, 151–207.
- (27) Peixoto, J.V.; Rocha, M.G.; Nascimento, R.T.L.; Moreira, V.V.; Kashiwabara, T.G.B. *Braz. J. Surgery Cl Res.* **2014**, *8*, 75-82.
- (28) Iacobellis, N. S.; Cantore, P.; Capasso, F.; Senatore, F. *Antibacterial Activity of Cuminum cyminum L. and Carum carvi L. Essential Oils. J. Agr. Food Chem.* **2005**, *53*, 57-61.
- (29) Yamaguchi, K.K.L.; Veiga-Junior, V.F.; Pedrosa, T.N.; Vasconcellos, M.C.; Lima, E.S. *Quim. Nova.* **2013**, *36*, 826-830.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em vista dos objetivos do presente estudo, e dos resultados expostos e discutidos pode-se concluir que:

- *Candida* spp. é mais frequentemente isolada em pacientes hospitalizados, e estes são 6,73 vezes mais propensos a ter essa levedura presente na cavidade oral;
- Os óleos essenciais de *Cuminum cyminum* (cominho), *Anethum graveolens* (endro), *Pimpinella anisum* (erva-doce) e *Foeniculum vulgare* (funcho) apresentam ação inibitória frente às leveduras de *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. krusei*;
- O óleo essencial de *C. cyminum* (cominho) apresentou a menor Concentração Inibitória Mínima (CIM) contra *Candida* spp. testadas;
- Os óleos de *Cuminum cyminum* (cominho), *Pimpinella anisum* (erva-doce) e *Foeniculum vulgare* (funcho) não foram citotóxicos nas concentrações inibitórias para as espécies de *Candida*;
- Apenas o óleo essencial de *A. graveolens* (endro) foi citotóxico nas concentrações de 20 e 8 mg. mL⁻¹, que foram próximas às CIM para as leveduras;
- O perfil químico dos óleos essenciais é constituído principalmente por terpenos, onde os principais compostos identificados foram: cuminaldeído (32,66%) para o cominho, carvona (34,89%) para o endro, *trans*-anetol (94,01%) para a erva-doce, e anetol (79,62%) para o funcho.

Os óleos essenciais de cominho, erva-doce e funcho mostraram ser uma promissora fonte de biomoléculas com potencial atividade antimicrobiana. As perspectivas para dar continuidade às pesquisas com tais óleos contemplam sua aplicação frente a espécies de *Candida* resistentes, associadas às causas de infecções hospitalares em humanos, e também, frente a espécies fúngicas relacionadas às doenças da cavidade oral, além da sua ação em biofilme da levedura.

REFERÊNCIAS:

AGARWAL, S. Volatile oil constituents and wilt resistance in cumin (*Cuminum cyaminum* L.). **Current Science India**. v. 71, p. 177–178, 1996.

AKHTAR, A.; DESHMUKH, A. A.; BHONSLE, A. V.; KSHIRSAGAR, P. M.; KOLEKAR, M. A. *In vitro* antibacterial activity of *Pimpinella anisum* fruit extracts against some pathogenic. **Veterinary World**. v. 1, n. 9, p. 272-274, 2008.

AKPAN, A.; MORGAN, R. Oral candidiasis. **Postgraduate Medical Journal**. v. 78, n. 2, p. 455-9, 2002.

ÁLVARES C. A.; SVIDZINSKI, T. I. E.; CONSOLARO, M. E. L. Vulvovaginal candidíasis: susceptibility factors of the host and virulence of the yeasts. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 43, p. 319–27, 2007.

ANUBHUTI, P.; RAHUL, S.; KANT, K. C. Standardization of Fennel (*Foeniculum vulgare*), Its Oleoresin and Marketed Ayurvedic Dosage Forms. **International Journal of Pharmaceutical Science and Drug Research**. v. 3, n. 3, p. 265-269, 2011.

ARAÚJO, J. C. L. V.; LIMA, E. O.; CABALLOS, B. S. O.; FREIRE, K. R. L.; SOUZA, E. L. Ação antimicrobiana de óleos essenciais sobre microorganismos potencialmente causadores de infecções oportunistas. **Revista de Patologia Tropical**, v. 33, n. 1, p. 55-64, 2004.

ARAUJO, Rosilma de Oliveira. **Investigação da atividade biológica de *Foeniculum vulgare* Mill (Umbelliferae/Apiaceae) como alternativa terapêutica**. 2010. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2010.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446–475, 2008.
BARBEDO, L. S.; SGARBI, D. B. G. Candidíase. DST - Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis. v. 22, n. 1, p. 22-38, 2010.

BATISTA, J. M.; BIRMAN, E. G.; CURY, A. E. Suscetibilidade a antifúngicos de cepas de *Candida albicans* isoladas de pacientes com estomatite protética. **Revista**

de **Odontologia da Universidade de São Paulo**, v. 13, n. 4, p. 343-348, out/dez. 1999.

BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009.

BOMBARDELLI, E., BOMBARDELLI, V. Twenty years experience in the botanic health food market. **Fitoterapia**, v. 76, p. 495-507, 2005.

BONFIM, F. P. G.; SOUZA, K. F.; GUIMARÃES, S. F.; DORES, R. G. R.; FONSECA, M. C. M.; CASALI, V. W. D. Efeito de extratos aquosos de funcho na germinação e vigor de sementes de alface e salsa. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 7, n. 3, 2013.

BORAKS, S. **Diagnóstico Bucal**. 2.ed. São Paulo: Artes Médicas, 1999. p.106; 134; 149.

BRASIL. Resolução RDC – nº48, de 18 de março de 2004 (DOU 18/03/2004). Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. ANVISA, Brasília, 2004.

BUDTZ-JORGENSEN, E. Etiology, pathogenesis, therapy and prophylaxis of oral yeast infections. **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 48, n. 1, p. 61-9, 1990.

BURGESS, D. S.; HASTINGS, R. W.; SUMMERS, K. K.; HARDIN, T. C.; RINALDI, M. G. Pharmacodynamics of fluconazole, itraconazole, and anphotericin B against *Candida albicans*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 36, p. 13-18, 2000.

CAMPISI, G.; PIZZO, G.; MILICI, M. E. Candidal carriage in the oral cavity of human immunodeficiency virus-infected subjects. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**. v. 93, n. 3, p. 281-6, 2002.

CARRICONTE, C.; MORES, D.; FRISHTCHEN, M. VON; CARDOSO, Jr. LE: **Plantas Medicinais & Plantas alimentícias**. Centro Nordestino de Medicina Popular: Universidade Federal Rural de Pernambuco, Olinda; 1995. 1:63-5.

CARVALHO, L. M.; OLIVEIRA, I. R.; CARNELOSSI, M. A. G.; NUNES, R. S. Caracterização da produtividade do funcho (*Foeniculum vulgare* Mill.) no sertão de Sergipe. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.13, especial, p.527-532, 2011.

CASTILHO, A. R.; MURATA, R. M.; PARDI, V. Produtos Naturais em Odontologia. **Revista Saúde-UnG**, pp.11-19, 2007.

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

CHAUDHARY, N.; HUSAIN, S. S.; ALI, M. Chemical composition and antimicrobial activity of volatile oil of the seeds of *cuminum cyminum* L. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**. v. 3, n. 7, p. 1428-41, 2014.

CHOI, E. M.; HWANG, J. K. Antiinflammatory, analgesic and antioxidant activities of the fruit of *Foeniculum vulgare*. **Fitoterapia**. v. 75, n.6, p. 557-565, 2004.

CHORILLI, M.; TAMASCIA, P.; ROSSIM, C.; SALGADO, H. R. N.; J. **Basic Applied Pharmaceutical Science**, v. n. 30, p. 19, 2009.

CLIFF, P.R; SANDOE, JT; HERITAGE, J, et al. Use of multilocus sequence typing for the investigation of colonisation by *Candida albicans* in intensive care unit patients. **Journal of Hospital Infection**. v. 69, n.1, p. 24-32, 2008.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard-third edition M27-A3. **CLSI**, Wayne, PA, USA, 2013.

COLOMBO, A. L.; MATTA, D.; ALMEIDA, L. P.; ROSAS, R.; Fluconazole susceptibility of Brazilian *Candida* isolates assessed by a disk diffusion method. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador v.6 n.3., p. 118-123, 2002.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 36. n. 5, p. 599-607, 2003.

CONSTANCE, L. 1971. History of the classification of Umbelliferae (Apiaceae). In: Heywood V.H. (ed.), **The Biology and Chemistry of the Umbelliferae**, 1–8. Academic Press, London, U.K.

CORRÊA, M. P. **Dicionário de Plantas Úteis do Brasil**. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal. v.3, p. 360, 1984.

COSTA, J. G. M.; RODRIGUES, F. F. G.; ANGÉLICO, E. C.; SILVA, M. R.; MOTA, M. L.; SANTOS, N. K. A.; CARDOSO, A. L. H.; LEMOS, T. L. G. Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzigium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 4, p. 304-309, 2005.

COUTO, E. M. P.; CARLOS, D.; MACHADO, E. R. Candidíase em neonatos: uma revisão epidemiológica. **Ensaio e Ciência: Biológicas, Agrárias e da Saúde**, São Paulo. v. 15, p. 197-213, 2011.

CROCCO, E.; MIMICA, L. M. J.; MURAMATU, L. H.; GARCIA, C.; SOUZA, V. M.; RUIZ, L. R. B., et al. Identificação de espécies de *Candida* e susceptibilidade antifúngica *in vitro*: estudo de 100 pacientes com candidíases superficiais. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 79, n. 6, p. 689-97, 2004.

DADALIOGLU, I.; EVRENDILEK, G. A. Chemical Compositions and Antibacterial Effects of Essential Oils of Turkish Oregano (*Origanum minutiflorum*), Bay Laurel (*Laurus nobilis*), Spanish Lavender (*Lavandula stoechas* L.), and Fennel (*Foeniculum vulgare*) on Common Foodborne Pathogens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 52, n.26, p. 8255–8260, 2004.

DALAZEN, D.; ZANROSSO, D.; WANDERLEY, L.; SILVA, N. L.; MENEGHELLO FUENTEFRIA, A. M. Comparação do perfil de suscetibilidade entre isolados clínicos de *Candida* spp. orais e vulvovaginais no Sul do Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n. 1, p. 33-38, 2011.

DOWNIE, S.R.; KATZ-DOWNIE, D.S.; SPALIK, K. A phylogeny of apiaceae tribe scandiceae: evidence from nuclear ribosomal dna internal transcribed spacer sequences. **American Journal of Botany**, v. 7, n. 1, p. 76–95, 2000.

DEMITTO, F. O.; AMARAL, R. C. R.; BIASI, R. P.; GUILHERMETTI, E.; SVIDZINSKI, T. I. E.; BAEZA, L. C. Suscetibilidade a antifúngicos *in vitro* de *Candida* spp. em pacientes do Hospital Universitário Regional de Maringá-PR. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 48, n. 5, p. 315-321, 2012.

DUARTE, M. C. T.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V.L.G.; MACHADO, A.L.M.; DELARMELINA, C. Anti-*Candida* activity of essential oils and

extracts from native and exotic medicinal plants used in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 2, p. 305-311, 2005.

DUARTE, M. C. T. Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais e Aromáticas utilizadas no Brasil. **Multi Ciência**, v. 7, p. 1-16, 2006.

EMILSON, C. G.; THORSELIUS, I. Prevalence of mutans streptococci and lactobacilli in elderly Swedish individuals. **Scand. Journal of Dental Research** v. 9, n 5, p. 14-21, 1988.

EVERGETIS, E.; KOULOCHERI, S. D.; HAROUTOUNIAN, S. A. Exploitation of Apiaceae family plants as valuable renewable source of essential oils containing crops for the production of fine chemicals: Part II. **Industrial Crops and Products**, v. 64, p. 59-67, 2015.

FENNER, R; BETTI, A. H.; MENTZ, L. A.; RATES, S. M. K. "Plants with potencial antifungal activity employed in Brazilian folk medicine," **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 3, p. 369–394, 2006.

FREIRES, I. A.; ALVES, L. A.; JOVITO, V. C.; CASTRO, R. D. Atividade antifúngica de *Schinus terebinthifolius* (Aroeira) sobre cepas do gênero *Candida*. **Revista Odontológica do Brasil Central**, v. 20, n.52, p. 41-45, 2011.

FRESHNEY, R. I. **Culture of animal cells: a manual of basic technique**, 4a Edn. Indianapolis, In: Wiley-Liss, 2000.

GAUCH, L. M. R.; PEDROSA, S. S.; ESTEVES, R. A.; GOMES, F. S.; GURGEL, E. S. C.; ARRUDA, A. C.; MARQUES-da-SILVA, S.H. Actividad antifúngica de *Rosmarinus officinalis* Linn. aceite esencial contra *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, *Candida parapsilosis* y *Candida krusei*. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 5, n.1, p. 61-66, 2014.

GAVALDÀ, J.; RUIZ, I. Recomendaciones para el tratamiento de la infección fúngica invasiva. Infección fúngica invasiva por *Candida* spp. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 21, p. 498-508, 2003.

GOODMAN, Louis Sanford; GILMAN, Alfred Goodman; HARDMAN, Joel G.; LIMBIRD, Lee E. Goodman e Gilman: **As bases farmacológicas da terapêutica**. 10^a ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2003. 1647 p.

GONÇALVES, Victoria de Moraes. **Atividade bacteriana de extratos e óleo essencial de *anethum graveolens* frente a isolados clínicos de origem veterinária**. 2015. 75 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção do Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

GULFRAZ, M.; MEHMOOD, S.; MINHAS, N.; JABEEN, N.; KAUSAR, R.; JABEEN, K.; ARSHAD, G. Composition and antimicrobial properties of essential oil of *Foeniculum vulgare*. **African Journal of Biotechnology** v. 7, n. 24, p. 4364-4368, 2008.

IACOBELLIS, N. S.; CANTORE, P.; CAPASSO, F.; SENATORE, F. Antibacterial Activity of *Cuminum cyminum* L. and *Carum carvi* L. Essential Oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 1, p. 57-61, 2005.

JAIN, P. A.; VEERABHADRU, K.; KULKARNI, R; D.; AJANTHA, G. S.; SHUBHADA, C.; AMRUTHKISHAN, U. Comparative study of adherence of oral *Candida albicans* isolates from HIV sero-positive individuals and HIV sero-negative individuals to human buccal epithelial cells. **Indian Journal of Pathology and Microbiology**. v. 53, n. 3, p. 513-517, 2010.

JAMSHIDZADEH, A.; HEIDARI, R.; RAZMJOU, M.; KARIMI, F.; MOEIN, M.R.; FARSHAD, O.; AKBARIZADEH, A.R.; SHAYESTEH, M.R.H. An *in vivo* and investigation on hepatoprotective effects of *Pimpinella anisum* seed essential oil and extracts against *in vitro* carbon tetrachloride-induced toxicity. **Iranian Journal of Basic Medical Science**, v. 18, p. 205-11, 2015.

KAMBLE, V.A. *In vitro* Anti-Fungal Activity of *Cuminum cyminum* (Cumin Seed) Essential Oil against Clinical Isolates of *Candida* Species. **American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics**. v. 3, n. 03, p. 264-275I 2015.

KAN, Y.; KARTAL, M.; OZEK, T.; ASLAN, S.; BASER, K. Composition of essential oil of *Cuminum cyminum* L. according to harvesting times. **Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 1, p. 25–29, 2007.

KAUFFMAN, C. A. Candidíase. In: GOLDMAN, L.; AUSIELLO, D. Cecil: **Tratado de Medicina Interna**. 22^a. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. 3280 p.

KAZEMI, M.; ROSTAMI, H.; SHAFIEI, S. Antibacterial and antifungal activity of some medicinal plants from Iran. **Journal of Plant Sciences**, v. 07, n. 2, p. 55-66, 2012.

KHANPAYEH, E.; JAFARI, A. A.; TABATABAEI, Z. Comparison of salivary *Candida* profile in patients with fixed and removable orthodontic appliances therapy. **Iranian Journal of Microbiology**, v. 6, n. 4, p. 263-268, 2014.

KHOSRAVI, A. R.; SHOKRI, H.; MOKHTARI, A. R. Efficacy of *Cuminum cyminum* essential oil on *FUM1* gene expression of fumonisin-producing *Fusarium verticillioides* strains. **Avicenna Journal of Phytomedicine**, v. 5, n. 1, p. 34-42, 2015.

KOSALEC, I.; PEPELJNJAK, S.; KUSTRAK, D. Antifungal activity of fluid extract and essential oil from anise fruits (*Pimpinella anisum* L., Apiaceae). **Acta Pharmaceutica**, v. 55, p. 377–385, 2005.

KURIYAMA, T.; WILLIAMS, D.W.; BAGG, J.; COULTER, W. A.; READY, D.; LEWIS, M. A. *In vitro* susceptibility of oral *Candida* to seven antifungal agents. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 20, n. 6, p. 349-53, 2005.

LACAZ, C. S. et al. **Tratado de Micologia Médica**. 9ª ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 1104 p.

LAWRENCE, B. M. "Progress in Essential Oils". **Perfumer & Flavorist**, v.19, p.31-32, 1994.

LI, R.; JIANG, Z. Y. Chemical composition of the essential oil of *Cuminum cyminum* L. from China. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 19, p. 311–314, 2004.

LIMA, I. O.; OLIVEIRA, R. A. G.; LIMA, E. O.; FARIAS, N. M. P.; SOUZA, E. L. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 2, p. 197-201, 2006.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR, V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MARTINS, E. R; CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D. C.; DIAS, J. E. **Plantas Medicinais**. Viçosa, UFV: 1998. p. 220.

MARTINS NETO, M.; DANESI, C. C.; UNFER, D. T. Candidíase bucal: revisão da literatura. **Revista Saúde**, v. 31, n. 1-2, p. 16-26, 2005.

MASADEH, M. M.; ALKOFABI, A. S.; TUMAH, H. N.; MHAIDAT, N. M.; ALZOUBI, K. H. Antibacterial activity of some medicinal plants grown in Jordan. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 26, n. 02, p. 267-270, 2013.

MENEZES, T. O. A.; ALVES, A. C. B. A.; VIEIRA, J. M. S.; MENEZES, S. A. F.; ALVES, B. P.; MENDONÇA, I. C. V. Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica de óleos essenciais e extratos de plantas da região amazônica sobre cepa de *Candida albicans*. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 38, n. 3, p. 184-91, 2009.

MENEZES, V. M.; VALE, I. N. F.; MONTEIRO, S. G.; GONÇALVES, L. H. B.; FIGUEIREDO, P. M. S.; MONTEIRO, C. A. Classificação da capacidade de adesão de isolados clínicos de *Candida* spp em padrões de arranjos celulares distintos. **Revista de Patologia Tropical**, v. 42, n. 3, p. 289-300, 2013.

MIRANDA, L. N.; RODRIGUES, E. C. A.; COSTA, S. P.; VAN DER HEIJDEN, I. M.; DANTAS, K. C.; LOBO, R. D.; BASSO, M.; VARKULJA, G. F.; KREBS, V. L. J.; GIBELLI, M. A. B. C.; CRIADO, P. R.; LEVIN, A. S. *Candida parapsilosis* candidaemia in a neo-natal unit over 7 years: a case series study. **BMJ Open**, v. 2, n. 4, p. 1-6, 2012.

MONSEFI, M.; GHASEMI, A.; ALAEE, S.; ALIABADI, E. Effects of *Anethum graveolens* L. (dill) on Oocyte and Fertility of Adult Female Rats. **Journal of Reproduction & Infertility**, v. 16, n. 1, p. 10-17, 2015.

MOREIRA, A. C. A.; FALCÃO, A. F. P.; ANA PAULA ANDRADE, A. P.; SOUZA, E. R. Isolamento de *Candida parapsilosis* em paciente com diagnóstico clínico de candidíase atrófica crônica. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 1, n. 1, p. 124-128, 2002.

MOYSES, D. L.; NAGLIK, J. R. Mucosal immunity and *Candida albicans*. **Clinical and Developmental Immunology**, doi:10.1155/2011/346307. 2011.

MUZYKA, B. C. Oral fungal infections. **Dental Clinics of North America**, v. 49, n. 1, p. 49-65, 2005.

NAGLIK, J. R.; MOYES, D. Epithelial cell innate response to *Candida albicans*. **Advances in Dental Research**, v. 23, p. 50-55, 2011.

NASCIMENTO, P. F. C.; NASCIMENTO, A. C.; RODRIGUES, C. S.; ANTONIOLLI, A. R.; SANTOS, P. O.; BARBOSA JÚNIOR, A. M.; TRINDADE, R. C. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 17, n. 1, p. 108-113, 2007.

NETO, M. M., DANESI, C. C.; UNFER, D. T. Candidíase bucal: Revisão de literatura. **Revista de Saúde** (Santa Maria), Santa Maria, v. 31, p.16-26, 2005.

NEVILLE, B. W.; DAMM, D. D.; ALLEN, C. M.; BOUQUOT, J. E. **Oral & maxillofacial pathology**. 2nd edn. Philadelphia: Saunders Company; 2002.

NIKAWA, H.; NISHIMURA, H.; HAMADA, T.; YAMASHIRO, H.; SAMARANAYAKE, L.P. Effects of modified pellicles on *Candida* biofilm formation on acrylic surfaces. **Mycoses**. v.42, n.1,;p 37-40, 1999.

NOORIZADEH, H.; FARMANY, A.; NOORIZADEH, M. Application of GA-PLS and GA-KPLS calculations for the prediction of the retention indices of essential oils. **Química Nova**, v. 34, n. 8, p.1398-1404, 2011.

OGA, Seizi. **Fundamentos de toxicologia**. 2ªEdição. São Paulo: Atheneu, 2003

OGUNWANDE, I. A; OLOWORE, N. O.; EKUNDAYO, O.; WALKER, T. M.; SCHMID, J. M.; SETZER, W. N., et al. Studies on the essential oils composition, antibacterial and cytotoxicity of *Eugenia uniflora* L. **International Journal of Aromatherapy**. v. 15, n. , p. 147-52, 2005.

OSÓRIO, R. M.; HEFTI, A.; VERTUCCI, F. J.; SHAWLEY, A.L. Cytotoxicity of Endodontic Materials. **Journal Of Endodontics**, v. 24, p. 91-96, 1998.

OYEDJI, O. A.; AFOLAYAN, A. J. Chemical composition na antibacterial activity of essential oil of the South African *Mentha longifolia*. **Journal of Essential Oil Research**, v. 18, p. 57-59, 2006.

OZCAN, M. M.; CHALCHAT, J. C. "Chemical composition and "antifungal effect of anise (*Pimpinella anisum* L.) fruit oil at ripening stage," **Annals of Microbiology**, v. 56, n. 4, p. 353– 358, 2006.

PAI, M. B. H.; PRASHANT, G. M.; MURLIKRISHNA, K. S.; SHIVAKUMAR, K. M.; CHANDU, G. N. Antifungal efficacy of *Punica granatum*, *Acacia nilotica*, *Cuminum*

cuminum and *Foeniculum vulgare* on *Candida albicans*: An *in vitro* study. **Indian Journal of Dental Research**. v. 21, n. 3, p. 334-6, 2010.

PIMENOV, M. G.; LEONOV, M. **The Genera of the Umbelliferae: A Nomenclator**. Royal Botanic Gardens, Kew, 1993. 156 p.

PINDBORG, J. J. **Atlas das doenças da mucosa oral**. 3^a.ed. São Paulo: Editorial Médica Panamericana, 1981. p. 54-62.

PIRES, J. R.; MATARELI, S.; FERREIRA, R. G.; et al. Espécies de *Candida* e a condição bucal de pacientes internados em unidade de terapia intensiva. **Revista da Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas**, v. 65, n. 5, p. 332-7, 2011.

POZZATTI, P. *In vitro* activity of essential oils extracted from plants used as aspices against fluconazole resistant and fluconazole-susceptible *Candida* spp. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 54, n. 6, p. 950-6, 2008.

PU, S.; NIU, S.; ZHANG, C.; XU, X.; QIN, M.; HUANG, S.; ZHANG, L. Epidemiology, antifungal susceptibilities, and risk factors for invasive candidiasis from 2011 to 2013 in a teaching hospital in southwest China. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**. doi: 10.1016/j.jmii.2015.01.005.

RADULESCU, V.; POPESCU, M. L.; ILIES, D. C. Chemical composition of the volatile oil from different plant parts of *Anethum graveolens* L. (Umbelliferae) cultivated in Romania. **Pharmacia**, v. 58, n. 05, p. 594-600, 2010.

RANG, H. P.; DALE, M. Maureen. **Farmacologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2003. 829 p.

REGEZI, J. A.; SCIUBBA, J. J. **Patologia Bucal-Correlações Clinicopatológicas**. 3^a.ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 2000. p.0-25; 0-35; 76-80; 101.

SALEHIARJMAND, H.; EBRAHIMI, S. N.; HADIAN, J.; GHORBANPOUR, M. Essential oils main constituents and antibacterial activity of seeds from Iranian local landraces of dill (*Anethum graveolens* L.). **Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology**, v. 18, n. 02, p. 1-9, 2014.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PALAZZO DE MELLO, J. C.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Eds.). **Farmacognosia - da planta ao**

medicamento. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed.da UFSC, 2000. p.323-354.

SANTOS, A. C. A.; ROSSATO, M.; SERAFINI, L. A.; BUENO, M.; CRIPPA, L. B.; SARTORI, V. C.; DELLACASSA, E.; P. MOYNA, P. "Antifungal effect of *Schinus molle* L., Anacardiaceae, and *Schinus terebinthifolius* Raddi, Anacardiaceae, essential oils of Rio Grande do Sul". **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v. 20, p. 154–159, 2010.

SANTOS, M.; ANDRADE, A. C. S. P.; ALEIXO, A. A; ALVES, R. J.; BRETAS, A. C. O.; ANDRADE, S. F.; FERREIRA, J. M. Avaliação da citotoxicidade de compostos sintéticos como potenciais fármacos contra Dengue vírus. **BBR - Biochemistry and Biotechnology Reports**. Edição Especial, v. 2, n. 2, p. 57-59, 2013.

SARDI, J. C.; DUQUE, C.; MARIANO, F. S.; PEIXOTO, I. T.; HÖFLING, J. F.; GONÇALVES, R. *Candida* spp. in periodontal disease: a brief review. **Journal of Oral Science**, v. 52, n. 2, p.177-85, 2010.

SARKHAIL, P. Traditional uses, phytochemistry and pharmacological properties of the genus *Peucedanum*: A review. **Journal of Ethnopharmacology**, Iran, v.156, n., p. 235-270, 2014.

SAVOIA, D. Plant-derived antimicrobial compounds: alternatives to antibiotics. **Future Medicine-Future Microbiology**, v.07, n. 08, p. 979-990, 2012.

SCULLY, C. **Atlas de Diagnóstico Bucal**. 1ª.ed. São Paulo: Santos, 1992. p. 20 e 21; 52 e 53; 132 e 133.

SERRACARBASSA, P. D.; DOTTO, P. Endoftalmite por *Candida albicans*. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, São Paulo, v. 66 n. 5, p. 701- 707, 2003.

SHANKARACHARYA, N. B.; NATARAJAN, C. P. Chemical composition and uses of cumin. **Indian Food Packer**, v. 25, n. 6, p. 22 –28, 1971.

SHETTY, R.S.; SINGHAL, R.S.; KULKARNI, P.R. Antimicrobial properties of cumin. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 10, p. 232-233, 1994.

SHIMIZU, K.; SHIMIZU, F.; KAMIYAMA, K. Microbiological studies on denture - induced stomatites in children. **Pediatric Denistry**. v.9, p.304-307, 1987.

SHOJAIL, A.; FARD, M. A. Review of Pharmacological Properties and Chemical Constituents of *Pimpinella anisum*. **International Scholarly Research Notices: Pharmaceutics**. p. 1-8, 2012.

SIDRIM, J. C.; ROCHA, M. F. G. 2004. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 388 p.

SILVA, R. C. **Plantas Medicinais na Saúde Bucal**. Vitória, 2001. 130 p.
SILVA, A. K. F.; LISBOA, J. E. S.; BARBOSA, M. P. C. S.; LIMA, A. F. Nosocomial Urinary Tract Infections caused by fungi of the genus *Candida*: a review. **Ciências Biológicas e da Saúde** v.2, n.3, p. 45-57, 2014.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PALAZZO DE MELLO, J. C.; MENTZ, L. A.; In: UFRGS (6^a Ed). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre, RS, Brazil 2010. p. 1102.

SIMÕES, R. J.; Fonseca, P.; Figueiral, M. H. Infecções por *Candida* spp na Cavidade Oral. **Odontologia Clínico-Científica**, v. 12, n. 1, p. 19-22, 2013.

SINTIM, H. Y.; BURKHARDT, A.; GAWDE, A.; CANTRELL, C. L.; ASTATKIE, T.; OBOUR, A. E.; ZHELJAZKOV, V. D.; SCHLEGEL, V. Hydrodistillation time affects dill seed essential oil yield, composition, and bioactivity. **Industrial Crops and Products**, v. 63, n. 9, p. 190-196, 2015.

SIQUEIRA, J. S. S.; BATISTA, A. S.; SILVA, A. JR.; FERREIRA, M. F.; AGOSTINI, M.; TORRES, S. R. Candidíase oral em pacientes internados em UTI. **Revista Brasileira de Odontologia** (Rio de J), v. 71, p. 176-9, 2014.

SKALICKA-WOZ´NIAK, K.; WALASEK, M.; LUDWICZUK, A. et al. Isolation of terpenoids from *Pimpinella anisum* essential oil by high-performance counter-current chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 36, p. 2611–2614, 2013.

SKROBONJA, J.R.; DELIC, D.N.; KARAMAN, M.A.; MATAVULJ, M.N.; BOGAVAC, M.A. Antifungal properties of *Foeniculum vulgare*, *Carum carvi* and *Eucalyptus* sp. essential oils against *Candida albicans* strains. **Journal of Natural Science**, v. 124, p. 195—202, 2013.

SONIS, S. T.; FAZIO, R. C.; FANG, L. **Princípios e Prática de Medicina Oral**. 2.^aed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p.440.

STRAMANDINOLI, R. T.; SOUSA, P. H. C.; WESTPHALEN, F. H., et al. Prevalência de candidose bucal em pacientes hospitalizados e avaliação dos fatores de risco. **Revista Sul-Brasileira de Odontologia**, v. 7, n. 1, p. 66-72, 2010.

TAGHIZADEH, M.; MEMARZADEH, M. R.; ZATOLLAH ASEMI, Z.; ESMAILLZADEH, A. Effect of the *cumin cyminum* L. Intake on Weight Loss, Metabolic Profiles and Biomarkers of Oxidative Stress in Overweight Subjects: A Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Clinical Trial. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 66, n. 2-3, p. 117-124, 2015.

TELLES, D.; HOLLWEG, H.; CASTELLUCCI, L. **Prótese Total Convencional e Sobre Implantes**. 2^a.ed. São Paulo: Santos, 2004. p.274-6.

TINOCO, M. T.; MARTINS, M. R.; CRUZMORAIS, J. Atividade antimicrobiana do óleo essencial do *Foeniculum vulgare* Miller. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 30, n. 1, p. 448-54, 2013.

TORRES, S. B. Teste de envelhecimento acelerado em sementes de erva-doce. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 26, nº 2, p.20-24, 2004

TORRES, S. R.; PEIXOTO, C. B.; CALDAS, D. M.; et al. A prospective randomized trial to reduce oral *Candida* spp. colonization in patients with hyposalivation. **Brazilian Oral Research**, v. 21, n. 2, p. 1-8, 2007.

VALERIANO, C.; PICCOLI, R. H.; CARDOSO, M. G.; ALVES, E. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais em bactérias patogênicas de origem alimentar. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais** v. 14 n. 1, p. 57-67, 2012.

VASCONCELLOS, M.C.; MONTENEGRO, R.C.; MILITAO, G.C.; FONSECA, A.M.; PESSOA, O.D.L.; LEMOS, T.L.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; COSTA-LOTUFO, L.V., Bioactivity of biflorin, a typical o-naphthoquinone isolated from *Capraria biflora*, L. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v.60, p. 394-398, 2005.

VAZQUEZ, J. A.; ARGANOZA, M. T.; BOIKOV, D.; VAISHAMPAYAN, J. K.; AKINS, R. A. *In vitro* susceptibilities of *Candida* and *Aspergillus* species to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 17, n. 3, p. 60-63, 2000.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v.28, n.3, p.519-528, 2005.

VERPOORTE, R.; MEMELINK, J. Engineering secondary metabolite in plants. *Current Opinion in Biotechnology*, v.13, p.181-187, 2002.

VIEIRA, L. S. Cominho. **Fitoterapia da Amazônia: Manual das plantas Medicinais (A Farmácia de Deus)**. 2^a ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres L.T.D.A., 1992. 120 p.

WANNER, J.; BAIL, S.; JIROVETZ, L.; BUCHBAUER, G.; SCHMIDT, E.; GOCHEV, V.; GIROVA, T.; ATANASOVA, T.; STOYANOVA, A. Chemical composition and antimicrobial activity of cumin oil (*Cuminum cyminum*, Apiaceae). **Natural Products Communication**, v. 5, n. 9, p.1355-8, 2010.

WEYERMANN, J.; LOCHMANN, D.; ZIMMER, A. A practical note on the use of cytotoxicity assays. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 288, p. 369–376, 2005.

WILSON, R. M.; DANISHEFSKY, S. J. Small Molecule Natural Products in the Discovery of Therapeutic Agents: The Synthesis Connection. **The Journal of organic chemistry**, v. 71, n. 22, p. 8329–8351, 2006.

WINGARD, J. R. Importance of *Candida* Species Other than *C. albicans* as Pathogens in Oncology Patients. **Clinical Infectious Diseases**, v. 20, n. 1, p. 115-125, 1995.

YANG, C.; HU, D.H.; FENG, Y. Essential oil of *Artemisia vestita* exhibits potent *in vitro* and *in vivo* antibacterial activity: Investigation of the effect of oil on biofilm formation, leakage of potassium ions and survival curve measurement. **Molecular medicine reports**, v. 12, p. 5762-5770, 2015.

YILI, A.; AISA, H. A.; MAKSIMOV, V. V.; VESHKUROVA, O. N.; SALIKHOV, S. I. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil from seeds of *Anethum graveolens* growing in Uzbekistan. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 45, n. 02, p. 280-281, 2009.

ZARGARI A. **Medical Plants**, 6^a ed. Tehran, Tehran University, 1994. 195 p.

ZENG, H.; TIAN, J.; ZHENG, Y.; BAN, X.; ZENG, J.; MAO, Y.; WANG, Y. *In vitro* and *in vivo* activities of essential oil from the seed of *Anethum graveolens* L. against *Candida* spp. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 01, n. 01, p. 1-8, 2011.

ANEXOS

ANEXO A: Aprovação do comitê de ética referente ao Artigo 1