

Universidade Federal do Maranhão
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
Mestrado

**PADRONIZAÇÃO DE EXTRATOS PARA A OBTENÇÃO
DE PRODUTO FITOTERÁPICO ANTIFÚNGICO DE
Origanum vulgare L.**

SAMARA ARAÚJO BEZERRA

São Luís

2021

SAMARA ARAÚJO BEZERRA

**PADRONIZAÇÃO DE EXTRATOS PARA A OBTENÇÃO
DE PRODUTO FITOTERÁPICO ANTIFÚNGICO DE
Origanum vulgare L.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Denise Fernandes Coutinho

São Luís

2021

Araújo Bezerra, Samara.

PADRONIZAÇÃO DE EXTRATOS PARA A OBTENÇÃO DE PRODUTO
FITOTERÁPICO ANTIFÚNGICO DE *Origanum vulgare* L / Samara
Araújo Bezerra. - 2021.

74 f.

Orientador(a): Denise Fernandes Coutinho.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em
Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, São
Luís, 2021.

1. Ácido rosmarínico. 2. Antioxidante. 3. Candidíase. 4.
Orégano. 5. Óvulo vaginal. I. Fernandes
Coutinho, Denise. II. Título.

SAMARA ARAÚJO BEZERRA

**PADRONIZAÇÃO DE EXTRATOS PARA A OBTENÇÃO
DE PRODUTO FITOTERÁPICO ANTIFÚNGICO DE
Origanum vulgare L.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Banca Examinadora

Avaliado em: / /

Prof.^a Dr.^a Denise Fernandes Coutinho
Orientadora - Universidade Federal do Maranhão

Prof.^a Dr.^a Flávia Maria Mendonça do Amaral Neiva
Universidade Federal do Maranhão

Prof.^a Dr.^a Ludmilla Santos Silva de Mesquita
Faculdade Pitágoras

Prof. Dr. Valério Monteiro Neto
Universidade Federal do Maranhão

*Esperiei com paciência no SENHOR, e ele se
inclinou para mim, e ouviu o meu clamor.*

(Salmos 40:1)

Dedico

*À minha família, Socorro e Maurício,
Sarah e João, pela paciência e amor.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente à Deus, por essa conquista, por sempre guiar o meu caminho, cercar-me de cuidados e me fazer crescer em meio às dificuldades que encontrei nos caminhos da vida.

Aos meus pais, Socorro e Maurício, meus maiores exemplos de heróis, batalhadores incansáveis e que não mediram esforços e incentivos para que eu pudesse chegar até aqui. São vinte e seis anos de amor e dedicação, cuidados, conselhos e confiança. Vocês são meu porto seguro. Os amo muito! Muito obrigada! Às minhas duas preciosidades, João Victor e Sarah, os maiores presentes que eu pude ganhar, apesar de todas as brigas de irmãos, nosso amor prevalece e eu sou incompleta sem tê-los comigo.

Aos meus avós, por todo amor que me foi oferecido desde o meu nascimento, pela proteção e carinho, mais uma etapa da minha vida acadêmica tão sonhada. À minha família materna, de Manaus, sinto muitas saudades de cada um, meus amados tios e primos, apesar da distância, o amor que tenho por vocês não diminuiu, em especial aos meus tios José Paulo, Socorro e Sílvia, que cuidaram de mim em oração. Deus os guarde sempre.

À família paterna, com a qual eu tive a alegria de conviver nestes anos morando em São Luís, meus tios-avós Terezinha e Ivo, vocês são uma raridade e um exemplo de casal. Obrigado por me acolherem com tanto amor. Meu tio Balbernak e Matthew, meu primo e irmão, meus parceiros fiéis de passeios, aventuras e risadas.

À Prof.^a Dr.^a Denise e toda equipe do Laboratório de Farmacognosia II, José Antonio, Edilene, longe ou perto, por contribuir com este trabalho. À Tássio Rômulo, um amigo e irmão que me foi dado, muito obrigado pelos ensinamentos, aulas, dicas, conversas e pela paciência comigo, principalmente. Você é parte essencial da realização deste trabalho. A todos que direta ou indiretamente estiveram comigo, me apoiando, muito obrigada! Não vou citar nomes para acabar sendo injusta com alguém.

À minha amada família em Cristo, Igreja Cristã Evangélica em Bequimão, Pr. Lindomar Moreira e Abigail, pelo apoio emocional e em orações por mim, glórias à Deus por suas vidas. Nilson, grande colega de experimentos e aperreios, que se tornou um grande amigo, um presente em minha vida, obrigada por tudo!

RESUMO

Dentre as principais doenças infecciosas, a candidíase é considerada oportunista, sendo a enfermidade mais comum ocasionada por fungos. A resistência às terapias antifúngicas é um problema de saúde pública e vem sendo ocasionado pela extensa prescrição desses fármacos associada à baixa adesão ao tratamento, além de terapia repetida ou prolongada. Visando a descoberta de alternativas terapêuticas eficazes, busca-se, nas plantas medicinais, compostos que possam ser empregados nesse contexto, explorando benefícios terapêuticos a partir da grande variedade de metabólitos biologicamente ativos. Este trabalho teve como objetivo padronizar o extrato das folhas da espécie *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae – orégano), para subsidiar a elaboração de um produto de uso vaginal, contribuindo na obtenção de alternativas para o tratamento de candidíase vulvovaginal. Folhas secas de *Origanum vulgare* L. foram coletadas na Universidade Federal do Maranhão, cidade de São Luís, Maranhão e submetidas a três diferentes métodos de extração: maceração, percolação e soxhlet, utilizando para cada extração os hidromódulos: 1:8, 1:10 e 1:12. Os extratos obtidos foram avaliados qualitativamente empregando-se testes fitoquímicos, quanto ao teor de flavonoides e polifenóis e foram submetidos a avaliação de seu potencial antifúngico frente cepas de *Candida*. A extração por Soxhlet, hidromódulo 1:10 apresentou 41,11% de rendimento, enquanto a triagem fitoquímica evidenciou variações nos constituintes, presença de polifenóis e taninos em diferentes concentrações para os extratos testados, indicando também atividade antioxidante diferenciada que pode corroborar com o mecanismo antifúngico. A cromatografia líquida apontou nove principais picos, entre eles ácido rosmarínico, definido como marcador analítico. Todos os extratos apresentaram atividade fungistática. A partir dos resultados, com o objetivo de padronizar o processo de extração, foi escolhido extrato obtido por soxhlet 1:10, que apresentou melhores resultados fitoquímicos e antifúngicos, além de rendimento superior. Com o extrato padronizado foi elaborado bioproduto piloto, na forma farmacêutica de óvulos à 5%, tendo demonstrado boa estabilidade por 20 dias. Dessa forma, demonstrou-se o processo de obtenção de um extrato das folhas de *Origanum vulgare* além de formulações estáveis para uso terapêutico, portanto, uma alternativa promissora no tratamento de candidíase vulvovaginal.

Palavras-chave: Candidíase; óvulo vaginal; orégano; antioxidante; ácido rosmarínico.

ABSTRACT

Among the main infectious diseases, candidiasis is considered opportunistic, being the most common disease caused by fungi. Resistance to antifungal therapies is a public health problem and has been caused by the extensive prescription of these drugs associated with low adherence to treatment, in addition to repeated or prolonged therapy. In order to discover effective therapeutic alternatives, medicinal plants are sought for compounds that can be used in this context, exploring therapeutic benefits from the wide variety of biologically active metabolites. This work aimed to standardize the extract of the leaves of the species *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae - oregano), to subsidize the elaboration of a product for vaginal use, contributing to obtain alternatives for the treatment of vulvovaginal candidiasis. Dry leaves of *Origanum vulgare* L. were collected at the Federal University of Maranhão, city of São Luís, Maranhão and submitted to three different extraction methods: maceration, percolation and soxhlet, using hydromodules for each extraction: 1: 8, 1:10 and 1:12. The extracts obtained were evaluated qualitatively using phytochemical tests, regarding the content of flavonoids and polyphenols and were subjected to evaluation of their antifungal potential against strains of *Candida*. Extraction by Soxhlet, hydromodule 1:10 showed 41.11% yield, while phytochemical screening showed variations in constituents, presence of polyphenols and tannins in different concentrations for the tested extracts, also indicating differentiated antioxidant activity that may corroborate with the mechanism antifungal. Liquid chromatography showed nine main peaks, including rosmarinic acid, defined as an analytical marker. All extracts showed fungistatic activity. From the results, in order to standardize the extraction process, an extract obtained by soxhlet 1:10 was chosen, which presented better phytochemical and antifungal results, in addition to superior yield. With the standardized extract, a pilot bioproduct was prepared, in the pharmaceutical form of eggs at 5%, having demonstrated good stability for 20 days. Thus, it was demonstrated the process of obtaining an extract of the leaves of *Origanum vulgare* in addition to stable formulations for therapeutic use, therefore, a promising alternative in the treatment of vulvovaginal candidiasis.

Keywords: Candidiasis; vaginal ovum; oregano; antioxidant; rosmarinic acid

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANVISA– Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC - American Type Culture Collection
CDC - Centers for Disease Control and Prevention
CE₅₀ – Concentração Efetiva em 50% dos organismos
CFM - Concentração Fungicida Mínima
CIM - Concentração Inibitória Mínima
CLAE/EM - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massa
CVV - Candidíase Vulvovaginal
CVVR - Candidíase Vulvovaginal Recorrente
DPPH - 1,1-difenil-2-picrilhidrazil
EHE - Extrato Hexânico de *Origanum vulgare*
EMA - European Medicines Agency
EMD - Exame Micológico Direto
EME - Extrato Metanólico de *Origanum vulgare* L.
ESI - Electrospray ionization
FDA - Food and Drug Administration
FFFB1S1 - Primeiro Suplemento do Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira
FRAP - Ferric reducing antioxidant power
GAE - Ácido Gálico
GLASS - Global Antimicrobial Resistance Surveillance System
IC - Isolado Clínico
IV - Intravenoso
m/z – Relação Massa/Carga
MS – Íon fragmento
MS2 – Espectro de íons de produto de 2º geração
MS3 – Espectro de íons de produto de 2º geração
OMS - Organização Mundial da Saúde
QE - Quercetina
RENAME - Relação Nacional de Medicamentos Essenciais
TR – Tempo de retenção

UFC - Unidade Formadora de Colônia

UI – Unidades Internacionais

VO - Via Oral

WHO - World Health Organization

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tratamentos farmacológicos empregados para diferentes tipos de candidíase, descritos em literatura, e algumas observações adicionais.	30
Tabela 2. Rendimentos dos métodos extrativos e seus hidromódulos, respectivamente, expressos em (%).	43
Tabela 3. Avaliação qualitativa dos constituintes químicos nos extratos hidroetanólicos das folhas de <i>Origanum vulgare</i> L. obtidos por diferentes procedimentos extrativos.	44
Tabela 4. Determinações do teor de polifenóis e flavonoides totais e avaliação da atividade antioxidante dos extratos hidroetanólicos de <i>Origanum vulgare</i> L.	44
Tabela 5. Determinação da Concentração Inibitória Mínima da atividade antifúngica in vitro dos extratos hidroetanólicos de <i>Origanum vulgare</i> L.	46
Tabela 6. Determinação da Concentração Fungicida Mínima in vitro dos extratos hidroetanólicos de <i>O. vulgare</i> L.	47
Tabela 7. Principais constituintes do extrato hidroetanólico das folhas de <i>Origanum vulgare</i> L. P1:10 identificados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas	49
Tabela 8. Principais constituintes do extrato hidroetanólico das folhas de <i>Origanum vulgare</i> L. M 1:12 identificados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas	50
Tabela 9. Principais constituintes do extrato hidroetanólico das folhas de <i>Origanum vulgare</i> L. S 1:10 identificados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas	50
Tabela 10. Composição dos óvulos vaginais testados e aparência final nos tempos 1, 2, 3 e 4.	51
Tabela 11. Faixa de fusão, tempo de desintegração e pH das formulações F1 a F5.	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Imagem de leveduras do gênero <i>Candida</i> obtidas por microscopia eletrônica de varredura.....	20
Figura 2. Variações de sinais nas manifestações clínicas de candidíase oral.....	22
Figura 3. Esquema resumido dos principais sítios-alvo dos agentes antifúngicos.....	29
Figura 4. Partes aéreas cultivadas de <i>Origanum vulgare</i> L.....	36
Figura 5. Cromatograma do extrato hidroetanólico P 1:10 de <i>Origanum vulgare</i> L. (270 nm)	48
Figura 6. Cromatograma do extrato hidroetanólico M 1:12 de <i>Origanum vulgare</i> L. (270 nm)	48
Figura 7. Cromatograma do extrato hidroetanólico S 1:10 de <i>Origanum vulgare</i> L. (270 nm).	49
Figura 8 Óvulos da formulação F1, à base de ágar, tamanho médio e pequeno, durante T1 (24 horas).	52
Figura 9. Óvulos da formulação F3, à base de gelatina e ágar, tamanho médio, durante T1 (24 horas)	52
Figura 10. Óvulos da formulação F5, à base de gelatina, ágar e polietilenoglicol, tamanho grande, durante T1 (24 horas).....	53

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1 Fungos	18
2.2 <i>Candida</i> sp.	19
2.3 Candidíase	21
2.4 Diagnóstico de candidíase	24
2.5 Agentes antifúngicos e tratamento da candidíase	26
2.6 Resistência fúngica	31
2.6.1 Resistência a azóis.....	31
2.6.2 Resistência a equinocandinas	32
2.6.3 Resistência a fluorocitosina	32
2.6.4 Resistência a poliênicos.....	33
2.7 Plantas medicinais: importância da validação, marcos legais no Brasil e plantas antifúngicas	33
3 OBJETIVOS	38
3.1 Objetivo geral	38
3.2 Objetivos específicos	38
4 MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1 Coleta do material vegetal	38
4.2 Obtenção dos extratos	38
4.3 Caracterização química dos extratos	39
4.3.1 Screening fitoquímico	39
4.3.2 Análise química por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	39
4.3.3 Determinação do teor de polifenóis e flavonoides totais	39
4.4 Determinação da atividade antioxidante	40
4.4.1. Método 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH)	40
4.4.2 Método capacidade redutora de ferro (Ferric reducing antioxidant power - FRAP)	40
4.5 Avaliação da atividade antifúngica	41
4.5.1 Determinação de Concentração Inibitória Mínima (CIM)	41
4.5.2 Determinação de Concentração Fungicida Mínima (CFM)	41
4.6 Desenvolvimento do bioproduto e base do extrato padronizado de <i>Origanum vulgare</i> L.	42
4.6.1 Obtenção das formulações.....	42
4.6.2 Estudo de estabilidade	42
4.7 Análise estatística	42
5 RESULTADOS	43
5.1 Análise química dos extratos de <i>Origanum vulgare</i> L.	43
5.1.1 Rendimentos.....	43

5.1.2 Avaliação qualitativa dos extratos	43
5.2 Determinações do teor de flavonoides totais, polifenóis e antioxidante.....	43
5.3 Atividade antifúngica	45
5.4 Avaliação química dos extratos hidroetanólicos das folhas de <i>Origanum vulgare</i> L.	48
5.4.1 Escolha do extrato	51
5.5 Caracterização dos óvulos vaginais.....	51
5.5.1 Aspecto físico.....	51
5.5.2 Controle de qualidade.....	53
6 DISCUSSÃO.....	53
7 CONCLUSÃO	58
REFERÊNCIAS.....	59

1 INTRODUÇÃO

Doenças causadas por microrganismos tem destaque no contexto nacional e mundial por apresentar elevados índices de morbimortalidade (WHO, 2010). Dentre as principais, a candidíase, doença oportunista, é a mais comum das infecções fúngicas (PEIXOTO et al., 2014). São conhecidas cerca de 200 diferentes espécies do gênero *Candida*, porém poucas relatadas por promover infecções em humanos (JAMES et al., 2006, PEIXOTO et al., 2014), sendo *C. albicans* a mais patogênica entre todos e de grande prevalência, em 70 a 90% dos casos (MENEZES et al., 2012; HANI et al., 2015).

Agentes antifúngicos disponíveis empregados em candidíase incluem geralmente polienos, azóis ou fluoropirimidinas, e em casos de infecções resistentes utilizam-se equinocandinas (BASMA et al., 2009). A resistência às terapias antifúngicas originou-se da extensa prescrição associada à baixa adesão ao tratamento, promovendo irregularidades geralmente sub-ótimas nas concentrações do fármaco (SHIELDS et al., 2014), terapia repetida ou prolongada e exposição profilática a medicamentos (SANGLARD, 2016).

A resistência a esses medicamentos pode ser classificada em primária (intrínseca), encontrada naturalmente entre fungos que não foram expostos previamente e secundária (adquirida), quando as espécies tornam-se suscetíveis geralmente devido à expressão gênica alterada na exposição contínua a certas drogas (SHOR; PERLIN, 2015).

Indiretamente, o emprego de fungicidas agrícolas favorece o surgimento de organismos resistentes, devido à semelhança dos alvos moleculares por antifúngicos empregados na clínica (SHOR; PERLIN, 2015), bem como recursos terapêuticos insuficientes para o controle de algumas doenças fúngicas, decorrente dos diferentes mecanismos desenvolvidos para invalidar a ação dos fármacos, como a regulação da bomba de efluxo, que promove redução intracelular da droga, mudanças qualitativa e/ou quantitativas nos sítios alvos e alterações metabólicas (SANGLARD, 2016).

Visando a descoberta de alternativas terapêuticas eficazes, e como forma de contribuir com a elaboração de produtos, várias pesquisas vêm concentrando suas buscas em plantas medicinais que possuam caráter antifúngico, embasada no fato que representam uma fonte importante de substâncias bioativas e constituem modelos para síntese de um grande número de fármacos (HARVEY et al., 2015).

As plantas têm sido usadas expressivamente desde os tempos antigos pelas sociedades primitivas de todos os continentes por seus benefícios terapêuticos (MARTINS et

al., 2014), e estudos indicam que grande parte da população brasileira usa a medicina alternativa como fonte de recursos curativos ou paliativos (ROSA et al., 2012). Sendo assim, o mercado farmacêutico de produtos à base de plantas é um ramo promissor, além de constituir-se em uma opção eficaz e culturalmente aceita (COUTO et al., 2009; SIMÕES et al., 2017).

Os metabólitos presentes nas plantas, principalmente os secundários, são os responsáveis por suas ações farmacológicas, podendo destacar os flavonoides, taninos, fenóis simples e além dos que compõem os óleos essenciais. Plantas que apresentam óleos essenciais em sua composição são conhecidas como aromáticas (SIMÕES, 2017). Dentre as espécies com óleos essenciais, pode-se destacar os exemplares da família Lamiaceae, composta por 250 gêneros e 7.000 espécies (THE PLANT LIST, 2013), cujo uso envolve fins culinários, ornamentação e medicinais (TOPCU; KUSMAN, 2014) e detém gêneros de importância econômica conhecidos pela presença de compostos voláteis e odor marcante, como *Lavandula* L., *Mentha* L., *Ocimum* L., *Melissa* L. e *Origanum* L. (MESQUITA et al., 2018).

O gênero *Origanum* compreende 43 espécies (LUKAS et al., 2013) as quais são tradicionalmente aplicadas no combate a diversas doenças, além de ter importância na alimentação (KOYUNCU et al., 2010). *Origanum vulgare* L., vulgarmente conhecido como orégano, compreende uma erva aromática e perene, frequentemente presente na alimentação devido ao aroma e sabor marcantes e também na medicina tradicional com finalidade digestiva, expectorante, antisséptico e antiespasmódica (CINBILGEL; KURT, 2019). É uma espécie bem disseminada por todo sudoeste da Ásia, Américas, Europa e África, sendo facilmente cultivada (BORGES, 2012).

Entre as atividades biológicas de interesse clínico descritas na literatura estão a antibacteriana, inseticida, antioxidante e antifúngica (BARROS et al., 2010). Apresenta óleo essencial (BORGES et al., 2012) rico principalmente em monoterpenos fenólicos, timol e carvacrol (BAKKALI et al., 2008), compostos largamente investigados por inúmeras ações, como antimicrobiano e larvicida (KHALFI et al., 2008; KURSAT et al., 2011; NOSTRO; PAPALIA, 2012; SUNTRES et al., 2015) e cujas concentrações nesses exemplares podem variar conforme sua localidade e condições de cultivo (MECHERGUI et al., 2016).

Como o óleo essencial é considerado o produto principal de *O. vulgare*, grande parte dos estudos científicos dessa espécie volta-se para sua investigação, inclusive seu potencial antimicrobiano, assim, tem sido direcionado no desenvolvimento de produtos de limpeza

(BRASIL, 2020), mas ainda com escassos estudos sobre sua ação nas células epiteliais (HAN; PARKER, 2017). Apesar dos óleos essenciais serem empregados em inúmeras formulações ou mesmo puros, há relatos de intolerância em parcela dos pacientes, devendo assim utilizá-los com precaução, devido à possibilidade de ocasionar fotossensibilidade, bem como efeitos neurotóxicos e hepatotóxicos que já foram relatados (MARTINS et al., 2014). O óleo de *O. vulgare* foi descrito em literatura por sua ação cáustica e potencialmente tóxico (MANOHAR et al., 2001), orientando-se cautela ao uso indiscriminado tópico e interno.

Considerando a problemática das resistências antifúngicas e buscando contribuir com formulações seguras e obtidas com extratos padronizados para uso tópico com esta atividade a partir de espécies vegetais de fácil obtenção, este trabalho teve como objetivo realizar a caracterização química e avaliar a atividade antifúngica frente cepas de *Candida* sp. de extratos das folhas da espécie *Origanum vulgare* L., cultivada em São Luís, Maranhão, selecionando um procedimento ideal para obtenção de extratos padronizados e formulação de um produto de uso vaginal estável, assim contribuindo no levantamento de alternativas terapêuticas para o tratamento de candidíase vulvovaginal.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Fungos

Os fungos são espécies pertencentes à classe dos Eucariotos e podem ser divididos em dois subgrupos morfológicamente distintos: leveduras e bolores. Leveduras geralmente tem tamanho reduzido, crescem individualmente ou em aglomerado (ALIMARDANITHEUIL et al., 2011). Bolores desenvolvem-se de forma multicelular, formando estruturas denominadas micélio, sistema ramificado em que se observam células agregadas (CAIXETA, 2019). Geneticamente, podem apresentar-se haploides, diploides ou poliploides (MOLINARO et al., 2009); dependem de substâncias orgânicas previamente formadas como fonte de energia e para formação estrutural e constituição celular; possuem parede rígida rica em quitina responsável por vários processos biológicos essenciais, como definição do formato da célula, proteção física, suporte osmótico, adesão, reprodução (MAGNELLI et al., 2005) e nutrição, a partir da absorção de nutrientes solúveis simples e reservam energia sob a forma de glicogênio (OLIVEIRA, 2014). Podem reproduzir-se de forma vegetativa, sexual, assexual e parassexual (PEIXOTO et al., 2014).

Possuem larga distribuição, sendo cosmopolita, porém necessitam que o substrato forneça substâncias para sua nutrição, mantendo-os assim em estado de saprofitismo, parasitismo, simbiose ou mutualismo (MOLINARO et al., 2009). Alguns fungos têm capacidade de colonizar o homem e os animais e cerca de 150 espécies são descritas como patogênicas aos seres humanos (BRASIL, 2013).

A maioria desenvolve-se melhor em temperaturas amenas, entre 25° a 30° C. Alguns fungos isolados do estado parasitário preferem temperaturas próximas de 37° C, para seu isolamento inicial, preferencialmente em ambientes saturado de umidade, não necessitando de luz para se desenvolver, em sua maioria (OLIVEIRA, 2014).

Comercialmente, podem ser empregados na indústria alimentícia, como o *Agaricus bisporus* (champignon-de-Paris)(CITRS, 2011), na produção de substâncias químicas, como ácido cítrico (obtido a partir de *Aspergillus sp.*) e na terapêutica: vitamina B ou riboflavina (obtida da espécie *Ashbya gossypii*), antibióticos e estatinas, como penicilina e lovastatina, provenientes de *Penicillium* e *Aspergillus terreus* (ALIMARDANITHEUIL et al., 2011; SANTIAGO, 2011) e a ciclosporina, droga imunossupressora inibidora de calcineurina, isolada de *Tolypocladium inflatum gams*. Estudos avaliam que algumas espécies podem auxiliar na degradação de poluentes ambientais e resíduos industriais, através da produção de enzimas (VARJANI; UPASANI, 2017; GU et al., 2017; CAIXETA, 2019).

O metabolismo de certos fungos do gênero *Aspergillus* (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus nomius* e *Aspergillus pseudotamarii*) produz micotoxinas, conhecidas como aflatoxinas, capazes de promover quadros de intoxicação graves a necrose aguda, cirrose e carcinoma de fígado, (CDC, 2013). Algumas espécies são conhecidas por sua ação alucinógena e neurotóxica, principalmente *Psilocybe cubensis* (Ear.) Sing (cogumelo mágico) e *Amanita muscaria* (L.Fr.) Hook (amanita), cuja semelhança a cogumelos comestíveis promove confusão e conseqüente intoxicação por ingesta (CITRS, 2011). Outros gêneros, como *Candida*, que geralmente habitam a pele de seres humanos não possuem micotoxinas, entretanto, merecem destaque visto que podem causar quadros de infecção simples ou graves, de grande incidência no mundo inteiro (CDC, 2019).

2.2 *Candida sp.*

O gênero abrange cerca de 200 espécies, na maioria comensais que compõem a microbiota da pele e mucosas vaginal e digestiva, encontradas na forma de esporos,

filamentos - denominados hifas ou pseudo-hifas – colonizando tecidos em seu hospedeiro - (Figura 1), blastoconídeos e leveduras, variando de 2 a 6 µm, apresentando formato esférico, alongado ou ovóide (SBI, 2019), cuja estrutura é composta por quitina, membrana plasmática fosfolipídica e associação de esteróis, principalmente ergosterol (NAVES et al., 2013). Reproduzem-se por brotamento e desenvolvem colônias de cor creme a branca, com aspectos liso ou rugoso (ÁLVARES et al., 2007) e organizam-se em estrutura denominada clamidoconídios, forma latente para situações cujo meio não possui todos os nutrientes necessários para seu desenvolvimento (BARBEDO; SGARBI, 2010). Crescem favoravelmente em temperaturas variando entre 20°C a 38°C, pH ácido (na faixa de 2,5 até 7,5), têm capacidade fermentativa e em teste de Gram, cora-se positiva (ÁLVARES et al., 2007).



Figura 1. Imagem de leveduras do gênero *Candida* obtidas por microscopia eletrônica de varredura.

Fonte: <https://www.cdc.gov/fungal/diseases/candidiasis/antifungal-resistant.html>

Normalmente, mantêm-se em equilíbrio com o hospedeiro, entretanto, alterações na microbiota normal resultam em desequilíbrio local, comumente relacionados com o excessivo crescimento de *Candida* sp. e poucas bactérias colonizadoras (GOLDMAN; SCHAFER, 2015). Sob condições endógenas e exógenas, como variação hormonal, gestação, extremos de idade (recém-nascidos e idosos), uso de contraceptivos orais, diabetes mellitus descompensada, desnutrição aguda, hábitos de higiene inadequados, rompimento das barreiras cutânea e mucosa, exposição direta aos fungos, quimioterapia, transplantes, resistência a antifúngicos (BARBEDO;SGARBI, 2010), terapia com corticosteroides e alterações na

resposta imunológica podem desencadear um amplo espectro de doenças que variam em gravidade conforme a localização e a disseminação do microrganismo (GOLDMAN; SCHAFER, 2015).

Assim como muitos microrganismos, *Candida* sp. dispõe de fatores de virulência eficientes. Pode-se destacar:

1. aderência às células do hospedeiro através de adesinas, codificada por diferentes glicoproteínas de superfície, facilitando o processo de adesão (DE OLIVEIRA et al., 2015)

2. Variação morfológica ou dimorfismo, essencial para escapar de ataques do sistema imune (JIMENEZ-LOPEZ et al., 2013)

3. Modulação do sistema imune empregando mananas e manoproteínas, capazes de ativar e desativar a ação das defesas do hospedeiro e influenciam o processo de indução de lise de macrófagos através de piroptose (WELLINGTON et al., 2014).

4. Adaptação ao ambiente oxidativo em que genes são temporariamente induzidos ou reprimidos, garantindo a flexibilidade do metabolismo em ambiente hostil (NOBLE, 2013; BROWN et al., 2014);

5. Liberação da protease candidalisina, promotora de lesões e poros em membranas que permite ao microrganismo atravessar o epitélio do hospedeiro (KRYSAN et al., 2014; MOYES et al., 2016).

2.3 Candidíase

Os termos candidíase, monilíase ou candidose abrangem grande variedade de doenças fúngicas (DEPAUW et al., 2008): sistêmicas ou invasivas como candidoses disseminadas agudas ou crônicas, candidemia e infecções superficiais (mucocutâneas) (PAPPAS et al., 2009; PEIXOTO et al., 2014). Candidemia é frequentemente citada como infecção mais comum por *Candida* e que leva à óbito a partir de quadros invasivos, observados em pacientes hospitalizados em uso de sondas, cateteres, imunossuprimidos ou submetidos a procedimentos cirúrgicos (PAPPAS et al., 2015; RUHNKE, 2019). Classicamente, não se consideram invasiva quando acometem mucosas, especialmente orofaringe, esôfago e vagina (KÖHLER et al., 2017).

a) Candidíase orofaríngea

Candida albicans é encontrada em mais de 90% dos isolados da cavidade bucal (CORONADO-CASTELLOTE; JIMENEZ-SORIANO, 2013), seguida de *C. glabrata*, *C.*

guilliermondii, *C. kruesi*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis*, *C. pseudotropicalis*, *C. stellatoidea* e *C. tropicalis*, promovendo a chamada candidíase oral ou pseudomembranosa (SINGH et al., 2014). O uso de esteróides inalatórios empregados na terapia para asma, como a fluticasona, suprime a resposta imune e conseqüentemente aumentam os riscos de acometimento da mucosa (RHEN; CIDLOWSKI, 2005).

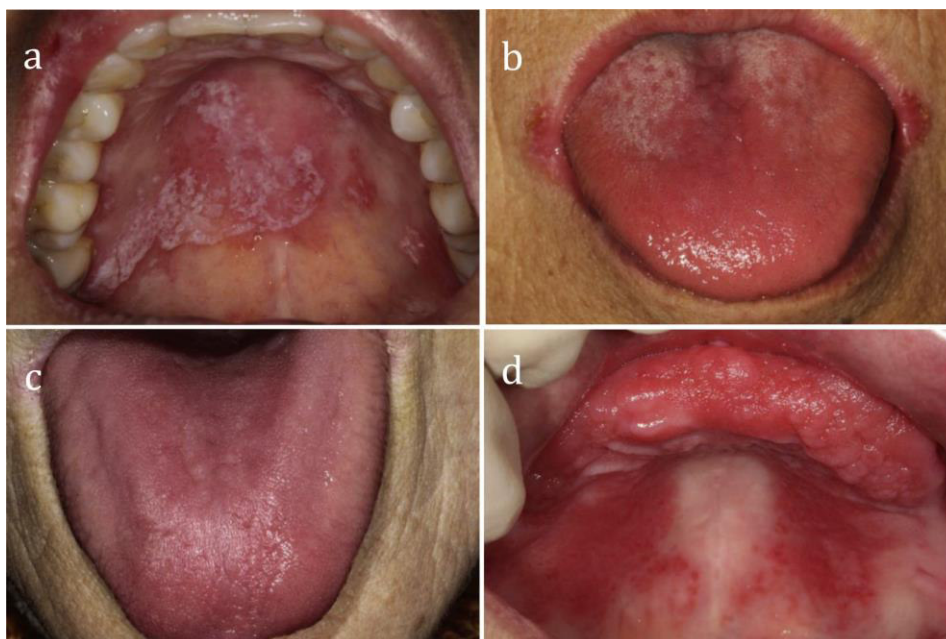


Figura 2. Variações de sinais nas manifestações clínicas de candidíase oral.
Fonte: Lijun Hu et al., 2019.

Os principais sinais manifestam-se por placas brancas na mucosa bucal, palato, orofaringe ou língua. Raspando as lesões com depressor de língua, evidencia-se uma mucosa eritematosa e sem úlceras sob as placas (RUHNKE, 2019). A estomatite, inflamação da mucosa oral, manifesta-se quase sempre como um palato eritematoso doloroso, além de rachaduras nos cantos da boca, que podem ocorrer com ou sem aftas (GOLDMAN; SCHAFER, 2015). Pode ser classificada como aguda ou crônica conforme a duração dos sintomas (PATIL et al., 2015).

A esofagite pode acompanhar a candidíase orofaríngea ou pode ocorrer independentemente das lesões na orofaringe. O desenvolvimento de esofagite por *Candida* está quase sempre relacionado à disfunção imunológica, pacientes com leucemia ou terapias imunossupressoras. Os sintomas clássicos são odinofagia (dor ao engolir) e disfagia (dificuldade para deglutir), enquanto exames como endoscopia e esofagoscopia atestam a

presença de úlceras e erosões no esôfago (GOLDMAN; SCHAFER, 2015; RUHNKE, 2019).

b) Candidíase gastrointestinal

Naturalmente, pode haver presença de *Candida* sp. no trato gastrointestinal e raramente são consideradas promotoras de infecções ou lesões do estômago ou intestinos em pessoas saudáveis (BASMACIYAN et al., 2019). Em indivíduos imunossuprimidos/imunocomprometidos, pode haver formação de ulcerações ou erosões purulentas na mucosa gástrica, favorecendo a colonização por leveduras, expressas na presença de placas esbranquiçadas, semelhantes às lesões no intestino delgado e grosso (SHEPPARD; FILLER, 2014).

Apesar da classificação não invasiva, a capacidade de aderência e entrada em membranas do hospedeiro favorece a incursão na barreira mucosa intestinal, porta de acesso para a corrente sanguínea, atingindo a camada epitelial e possivelmente disseminando-se no sangue (SHEPPARD; FILLER, 2014). Os sintomas clínicos incluem náuseas, diarreia, vômitos, desconforto abdominal e sangramento gastrointestinal (BARBEDO; SGARBI, 2010).

c) Candidíase cutânea

A infecção da pele ocorre principalmente nas áreas intertriginosas (virilhas, axilas, dobras em geral) e interdigitais (mãos ou pés), caracterizando-se por lesões com bordas bem delimitadas, avermelhadas, com prurido e frequentemente há formação de pústulas, quase sempre associados a lesões menores, cuja presença auxilia no diagnóstico de infecção por *Candida* ou *Tinea (cruris ou corporis)* (GOLDMAN; SCHAFER, 2015).

A onicomicose afeta as unhas dos pés e/ou mãos e expressa-se por espessamento, opacidade, mudança de coloração, formato e onicólise (descolamento), acompanhada ou não de dor e aspecto esponjoso (SBD, 2017). Pode causar inflamação nas pregas da lâmina basal, denominada paroníquia, especialmente em indivíduos que frequentemente imergem as mãos na água pelas atividades exercidas profissionalmente (BARAN; NAKAMURA, 2018), considerado assim um fator de manutenção para o quadro, bem como clima e disfunção hormonal (CHANUSSOT; ARENAS, 2007).

d) Candidíase vulvovaginal

A candidíase vulvovaginal (CVV) instala-se a partir do desequilíbrio e favorecimento do aumento de *Candida*, com até 50% das mulheres assintomáticas (BRASIL, 2015) e em

idade fértil, principalmente por serem associadas diretamente a mudanças hormonais como aumento dos níveis de estrogênio (SBI, 2019).

Os sintomas clínicos de CVV incluem episódios de coceira na vulva e vagina, irritação, inflamação, edema, ardor ao urinar, dor durante o ato sexual e leucorreia, representada por corrimento vaginal sem odor, irregular (sem um padrão característico) e pode apresentar-se com textura fina e aquosa (FEBRASGO, 2010) ou espesso e branco, assemelhando-se a leite coalhado e aderido às paredes vaginais (GUNTHER et al., 2014; MENDLING et al., 2015).

Tratamentos à base de antibióticos de amplo espectro e glicocorticóides sistêmicos, pacientes diabéticas descompensadas (GONÇALVES et al., 2016), uso de contraceptivos orais combinados (JACOB et al., 2018) e gravidez estão diretamente associados com o surgimento de candidíase. Cerca de 50% das mulheres que apresentam prurido vaginal são realmente ocasionados por *Candida albicans* ou *C. glabrata*, mas em grande parte, outras condições favorecem este sintoma, como hábitos de higiene inadequados, vestuário justo e que favoreça aumento de umidade na região e contato com substâncias irritantes à região íntima (SBI, 2019). Casos frequentes (4 vezes ou mais no período de 12 meses) não devem ser desconsiderados por indicar um quadro de candidíase vulvovaginal recorrente (CVVR), que acomete 5% das mulheres (BARBEDO; SGARBI, 2010).

e) Balanite

Balanopostite ou balanite apresenta-se como um quadro que acomete homens, de forma infecciosa ou não, levando a inflamação aguda ou crônica da glândula do pênis, geralmente sem sintomas ou apenas leve prurido, secreção fétida e surgimento de vesículas no pênis. Em casos mais graves, geram placas pseudomembranosas, intensa coceira, vermelhidão, dor, fissuras, erosões e pústulas superficiais na glândula (SBU, 2018).

Se não tratadas, as lesões podem atingir escroto e às pregas da pele, associado a uretrite transitória, em alguns casos. A balanite pode estar associada diretamente com relações sexuais com parceiro infectado, homens não circuncidados, e semelhantemente à candidíase feminina, à terapia com antimicrobianos, má higienização e descontrolado no diabetes mellitus (BARBEDO; SGARBI, 2010; SBU, 2018).

2.4 Diagnóstico de candidíase

O diagnóstico para candidíase cutânea é realizado através de anamnese do paciente,

avaliando sintomas e características da área afetada e montagem de uma lâmina com fragmentos da pele obtido por raspagem para identificação microscópica de hifas (MOLINARO et al., 2009).

O diagnóstico de onicomicoses pode ser realizado inicialmente observando as características e confirmando através de exame micológico direto (EMD), por cultura fúngica ou exame histopatológico (ZANARDI et al., 2008). O EMD é a primeira etapa do diagnóstico laboratorial e indica se o material examinado contém estruturas fúngicas, avaliando-as quanto à morfologia e coloração: agentes hialinos e hifas regulares são sugestivos de dermatófitos; pseudo-hifas ou hifas irregulares e conídios, podem indicar presença de fungos miceliais não dermatófitos (CORREIA et al., 2005); leveduras ovóides com pseudofilamentos sem coloração e dispostas em colônias induz a suspeita de *Candida* sp. Nestes casos, faz-se cultura para diferenciar e confirmar o achado (ZANARDI et al., 2008).

Casos de candidíase gastrointestinal, esofágica e esofagite podem ser avaliados por endoscopia e esofagoscopia, além das queixas apresentadas pelo paciente (SHEPPARD; FILLER, 2014).

Pacientes com queixa de sintomatologia de CVV, antes de supor um autodiagnóstico, devem ser submetidas à avaliação padrão, através de exame físico, em que se observam placas esbranquiçadas sob o colo uterino. Laboratorialmente, para diferenciar doenças com sintomas semelhantes, faz-se:

a. Teste de Whiff (teste das aminas ou “do cheiro”): uma gota de KOH a 10% é adicionada ao conteúdo vaginal coletado sobre uma lâmina de vidro. A presença de “odor de peixe” é considerada positivo e sugestivo de vaginose bacteriana, excluindo CVV (BRASIL, 2015);

b. Exame a fresco: faz-se um esfregaço em lâmina de vidro com lamínula de amostra do material vaginal e uma gota de salina, examinando sob objetiva com aumento de 400x, avaliando a presença de leucócitos, células parabasais, leveduras e/ou pseudo-hifas e *Trichomonas* sp. móveis (WORKOWSKI; BERMAN, 2006; FEBRASGO, 2010).

c. Bacterioscopia por coloração de Gram: presença de células epiteliais escamosas de aspecto granuloso pontilhado e bordas indefinidas cobertas por numerosos cocobacilos (clue cells) indicam vaginose bacteriana (BRASIL, 2015)

O pH vaginal não pode ser utilizado isoladamente como diagnóstico, mas o complementa; quando o pH > 4,5 considera-se sugestivo para vaginose bacteriana ou

tricomoniase, enquanto $\text{pH} < 4,5$ é sugestivo para candidíase (BRASIL, 2015).

O principal diagnóstico para balanites embasa-se nos sintomas referidos pelo paciente e no exame físico, avaliando a lesão. Para diferenciação da origem, inflamatória ou infecciosa, coleta-se uma amostra do líquido presente nas lesões. Para descartar outras doenças em casos graves, como câncer de pênis, opta-se por realizar biópsia (SBU, 2018).

2.5 Agentes antifúngicos e tratamento da candidíase

Os agentes antifúngicos utilizados atualmente estão divididos em cinco classes: Polienos, azóis, equinocandinas, alilaminas e análogo de nucleosídeo. Destacaremos as classes mais utilizadas. As escolhas da classe de antifúngico e forma de administração são feitas a partir do quadro clínico do paciente, local da micose e a espécie fúngica envolvida (TRABULSI; ALTERTHUM, 2015). Um resumo dos mecanismos de ação pode ser observado na figura 3.

a) Polienos

Polienos incluem anfotericina B e nistatina, descobertos na década de 50 e obtidos a partir de *Streptomyces noursey* e *Streptomyces nodosus*, bactérias aeróbias com atividade antifúngica de amplo espectro (COLOMBO et al., 2013) e ambas empregadas em infecções por *Candida*: anfotericina B em formas graves de candidíase invasiva, enquanto a nistatina é utilizada somente em infecções superficiais, na forma de suspensão, pomada ou pasta associada a óxido de zinco, devido ao seu caráter nefrotóxico (GRANINGER et al., 2018).

Sua principal ação parte da interação com esteroides presentes nas membranas celulares, promovendo ruptura da célula. Sugere-se que esta classe induza a produção de radicais livres de oxigênio por fagócitos no hospedeiro (GRANINGER et al., 2018). Por décadas considerou-se anfotericina B o padrão ouro, entretanto, não absorvível por via oral e uso exclusivamente intravenoso, apesar da ação nefrotóxica, minimizada quando veiculado em formulações lipossômica e lipídica (ALMEIDA, 2013; STEIMBACH et al., 2017).

b) Azóis

Frequentemente os medicamentos desta classe são utilizados em quadros invasivos e não invasivos devido ao amplo espectro de ação e disponibilidade de formas farmacêuticas, entre cremes, injetáveis, óvulos vaginais, shampoo e comprimidos (COLOMBO et al., 2013); divide-se em duas subclasses:

- Imidazóis

Dentre muitos agentes, clotrimazol é o primeiro antifúngico tópico, lançado em meados da década de 60, seguido por miconazol. Em seguida, por terapia oral, incluiu-se o cetoconazol. Entretanto, a desvantagem em seu uso é a elevada toxicidade quando utilizados por via oral (FDA, 2016), que pode estar relacionado ao seu mecanismo de ação que inibe diversas enzimas e bloqueia a formação de colesterol no fígado, promovendo hepatotoxicidade e queda na esteroidogênese e consequentemente, alterações dos níveis de testosterona e cortisol (SHEA; DEL POETA, 2006).

- Triazóis

Os triazóis de primeira geração são o itraconazol e o fluconazol, enquanto que o voriconazol e o posaconazol são considerados de segunda geração. São os representantes mais utilizados nesta categoria, com vantagem de maior especificidade aos sítios alvo, comparado aos imidazólicos, estabelecendo-se como seus substitutos (ARNOLD et al., 2010; DE VASCONCELOS et al., 2011). Estão disponíveis para administração via oral e intravenosa. Entre estes, o fluconazol é o mais comumente prescrito para infecções por *Candida*, devido à sua farmacocinética desejável e eficácia dentro do hospedeiro (ROBBINS et al., 2016). Porém, apresenta atividade reduzida contra *C. glabrata* e *C. krusei*, comparado às demais espécies de *Candida*.

O mecanismo de ação dos azólicos está relacionado à inibição da enzima lanosterol desmetilase do citocromo P450 (14 α -desmetilase), codificada pelo gene ERG11, na via de biossíntese do ergosterol. O átomo de nitrogênio livre presente no anel azólico liga-se a um átomo de ferro dentro do grupo heme da enzima (SANGUINETTI et al., 2015). Desta forma, não há ativação do oxigênio, levando à desmetilação do lanosterol, que inibe o processo de biossíntese do ergosterol, um componente essencial das membranas celulares do fungo. Quando inibido, há acúmulo dos esteróis metilados na membrana celular fúngica, promovendo a intoxicação e interrupção do crescimento celular (ROBBINS et al., 2017). Outros mecanismos são incluídos, como a inibição da transformação de levedura em micélio e menor adesão do fungo à célula (HEERES et al., 2010; COLOMBO et al., 2013).

Reações adversas mais comuns descritas incluem cefaleia, dor abdominal, diarreia, náuseas, vômitos e aumento de enzimas hepáticas (ARNOLD et al., 2010).

c) Equinocandinas

São compostos lipopeptídicos recentemente empregados em casos de infecções fúngicas sistêmicas, exclusivamente por via parenteral. São obtidos por diferentes processos,

como semi-síntese a partir da fermentação de *Glarea lozoyensis* ou modificação de um lipopeptídio solúvel em água presente na espécie *Coleophoma empedri* (GRANINGER et al., 2018). As equinocandinas possuem grande espectro de ação, atuando como fungicidas e fungistáticas frente a cepas de *Candida* sp. e *Aspergillus* sp., respectivamente, porém têm ação reduzida sobre cepas *Cryptococcus neoformans* e *Mucorales* (PATTERSON et al., 2016).

Três agentes compõem esta classe: caspofungina, micafungina e anidulafungina, empregados em infecções invasivas em que os azóis foram ineficientes, inibindo a síntese de beta (1,3) -d-glucano, componente essencial e exclusivo da parede celular fúngica, tornando-se a classe melhor tolerada e mais segura na terapêutica (SUCHER et al., 2009). Não são metabolizadas no fígado, portanto tem chances mínimas de interação com outras drogas, comparada à outras classes já descritas (COLOMBO et al., 2013), com vantagens em relação a efeitos adversos, geralmente raros ou leves, como febre, elevação transitória de enzimas hepáticas, flebite local, erupção cutânea, prurido, broncoespasmo e sensação de calor (MENICHETTI, 2009).

d) Alilaminas

Classe composta por agentes empregados em tratamento de onicomicoses e dermatomicoses por *Candida* e *Tinea*, a terbinafina, burtenafina e naftifina, podem ser encontrados nas formas de comprimido e cremes. Sua ação dá-se pela interrupção na cadeia produtora de ergosterol, bloqueando a enzima esqualeno epoxidase e favorecendo acúmulo de esqualeno no citoplasma e consequente morte fúngica (SHEA; DEL POETA, 2006). Exibem afinidade com tecido adiposo e queratina, permitindo sua manutenção farmacologicamente ativa por seis semanas na pele após a suspensão do tratamento (CRAWFORD; HOLLIS, 2007).

Reações adversas descritas, principalmente para uso por via oral, incluem dores de cabeça, náuseas, perda de apetite, dor abdominal leve, desconforto estomacal (azia), diarreia, inchaço, erupções cutâneas (comichão), dores musculares e articulares, distúrbio de humor, perda de sentido do paladar, tonturas e cansaço (COLOMBO et al., 2013).

e) Análogo de nucleosídeo

A 5-flucitosina ou fluorocitosina é um inibidor sintético específico de uma enzima essencial para a síntese de DNA em fungos, a timidilato sintetase, comprometendo a divisão celular e a síntese proteica, prejudicando o crescimento fúngico (GRANINGER et al., 2018).

É empregado em casos que necessitam de grande penetração nos tecidos, por sua facilidade de permeação; seu espectro é estreito, incluindo a maioria de *Candida* sp., *Cryptococcus neoformans* e isolados de *Cladophialophora carrionii*, portanto, atualmente limita-se ao tratamento de meningite criptocócica e candidíase sistêmica. Reações adversas incluem náuseas e vômitos, erupções cutâneas e aumento de enzimas hepáticas em cerca de 10% dos pacientes, em administração oral (COLOMBO et al., 2013).

f) Amorolfina e ciclopirox

Amorolfina, derivado morfolínico, é largamente empregado em tratamentos de onicomicoses e dermatomicoses, nas formas creme e esmalte, (COLOMBO et al., 2013) apresentando efeito fungistático e fungicida a partir da alteração da membrana da célula fúngica, interrompendo a biossíntese correta do esterol e acúmulo de esteróis defeituosos devido à redução de ergosterol (GRANINGER et al., 2018).

Ciclopirox olamina é um agente antifúngico derivado de hidroxipiridonas e corresponde a única classe com mecanismo de ação diferente dos outros antifúngicos tópicos já descritos, pois atua através da quelação de cátions metálicos polivalentes, como férrico (Fe^{3+}) e alumínio (Al^{3+}), levando à inibição de enzimas dependentes de metal (citocromos, catalase e peroxidase), interrompendo atividades celulares básicas, como produção de energia e ingestão de nutrientes através da membrana celular por alteração da permeabilidade (SUBSSI et al., 2010; GRANINGER et al., 2018). Assim como a amorolfina, é possível encontra-lo nas formas de esmalte e loção.

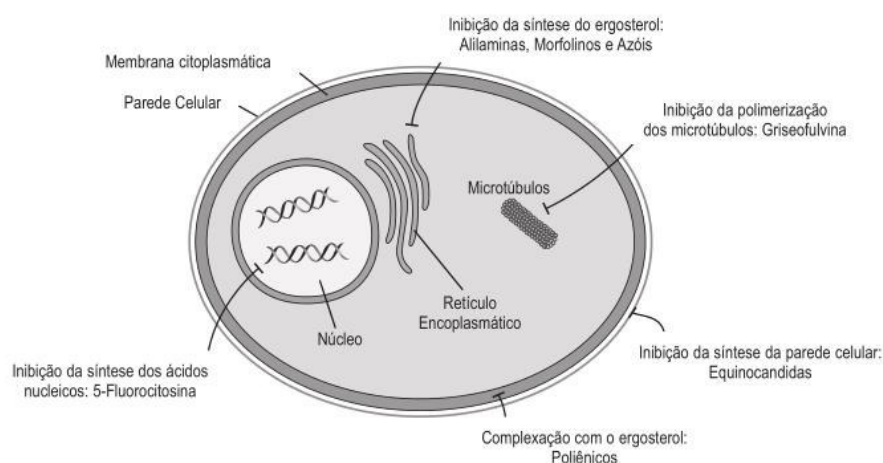


Figura 3. Esquema resumido dos principais sítios-alvo dos agentes antifúngicos.
Fonte: Trabulsi; Alterthum, 2015.

Tabela 1. Tratamentos farmacológicos empregados para diferentes tipos de candidíase, descritos em literatura, e algumas observações adicionais.

Tipo de infecção	Primeira opção	Segunda opção	Observações
Candidíase vulvovaginal	Miconazol creme a 2%, via vaginal, um aplicador cheio, à noite ao deitar-se, por 7 dias ou Nistatina 100.000 UI, uma aplicação, via vaginal, à noite ao deitar-se, por 14 dias.	Fluconazol 150 mg, VO, dose única ou Itraconazol 100 mg, 2 comprimidos, VO, 2 x dia, por 1 dia	Durante a gravidez, o tratamento deve ser realizado somente por via vaginal. O tratamento oral está contraindicado na gestação e lactação
Candidíase orofaríngea	Nistatina 100.000-400.000 UI / mL e 4-6 mL, 4x ao dia por 14 dias ou Itraconazol 200 mg VO com alimentos por 7-14 dias	Fluconazol 200 mg VO ou IV no primeiro dia, seguido de 100 mg VO por 14-21 dias	
CVVR	Triazol tópico 7-14 dias ou Fluconazol 150 mg / dia a cada 72 h (dias 1, 4 e 7) ou até a remissão completa dos sintomas	Fluconazol 150 mg / dia 1x / semana durante seis meses	
Candidíase cutânea	Cetoconazol tópico ou oral	Fluconazol 150 mg 1x/sem – 2-6 sem	
Onicomicose	Amorolfina 5% esmalte – 1 x por semana Ciclopirox 8% esmalte - diariamente Tioconazol solução 28% - diariamente	Itraconazol 200 mg/d 6- 12 sem (mãos) e 12-24 sem (pés) ou Fluconazol 150 a 300 mg/sem – até cura	Deve-se lixar semanalmente as unhas permitindo maior contato do medicamento com a área infectada
Balanite	Fluconazol 150 mg VO dose única		

Legendas: UI – Unidades internacionais; VO – Via oral; CVVR – Candidíase vulvovaginal recorrente. Fontes: Trabulsi; Alterthum, 2015; Pfaller et al., 2015.

2.6 Resistência fúngica

O gênero *Candida* é responsável por 3.400 casos de infecção por ano e novas cepas vem apresentando-se resistentes ao fluconazol, com estimativa de 1.700 óbitos e 34 mil hospitalizações no ano de 2017 nos Estados Unidos, variando de casos simples de candidíase a infecções invasivas (CDC, 2019b). No Brasil, existem poucos dados específicos e atualizados deste gênero (FRANÇA et al., 2008; RIBEIRO, 2013).

As espécies *Candida tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata* apresentam taxas de resistência entre 4-9%, 2-6% e 11-13%, respectivamente (PFALLER et al., 2015). Em outras cepas, pode haver resistência ao fluconazol mesmo sem exposição prévia ao antimicrobiano (primária), como observado em *C. krusei* (PFALLER et al., 2008).

A ascendência de *Candida auris* têm levado diversas instituições a estado de alerta, devido à multirresistência a antifúngicos comumente usados para tratar infecções por este patógeno (polienos, azóis e equinocandinas), aliada a fatores como difícil remoção de superfícies em ambientes de saúde e possibilidade de longos períodos colonizando pacientes hospitalizados. Em 2018, a incidência de casos aumentou em 318%, comparado aos anos de 2015 a 2017; somente em 2019 nos Estados Unidos, foram confirmados 684 casos de pacientes infectados e 1209 estão sob investigação (CDC, 2019b). No Brasil, foi emitido um alerta de risco pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em dezembro/2020, com a notificação de um caso no estado da Bahia, o primeiro confirmado no Brasil, desde a implantação da Rede Nacional para identificação de *Candida auris* em serviços de saúde, no ano de 2017 (BRASIL, 2020). Ao todo, 32 países notificaram casos de infecção por *C. auris*, incluindo Colômbia e Venezuela (CDC, 2019a).

Os mecanismos de resistência podem diferir entre as classes de agentes antifúngicos, a partir da forma de ação e resistências primária e secundária.

2.6.1 Resistência a azóis

São descritos pelo menos três mecanismos.

a) por indução de bombas multidrogas que atuam reduzindo a concentração do fármaco na enzima alvo lanosterol 14- α -esterol desmetilase na célula fúngica (SANGUINETTI., 2015). As bombas de efluxo em espécies de *Candida* são codificadas pelos genes *CDR* e *MDR*, promovendo resistência nas espécies *C. albicans*, *C. glabrata* e *C.*

dublinsiensis, especificamente (SANGLARD et al., 2016). Embora a indução de bombas codificadas por *CDR* apresente resistência a quase todos os azóis, as codificadas por *MDR* aparentam seletividade para a resistência ao fluconazol (KANAFANI; PERFECT, 2008).

b) regulação ou alteração da enzima alvo lanosterol 14- α -esterol desmetilase, codificada pelo gene *ERG11*, e quando ocorrem mutações, a ligação entre azóis e sítio enzimático é comprometida (SANGUINETTI et al., 2015).

c) desenvolvimento de via de escape, através da mutação do gene *ERG3*, impedindo a formação do produto tóxico 14- α -metil-3,6-diol, por conseguinte, impede a ruptura da membrana celular fúngica (COWEN et al., 2015).

2.6.2 Resistência a equinocandinas

Cepas resistentes a esta classe são casos raros com taxas de incidência variáveis entre 0% a 1,7% (DĄBROWSKA et al., 2019). Cerca de 38% dos isolados de *Candida glabrata* que se mostram resistentes à equinocandina também são resistentes ao fluconazol (PFALLER et al., 2013), fator alarmante que reduz as opções de tratamento disponíveis.

O mecanismo de resistência não é totalmente conhecido, entretanto pode estar correlacionado à mutação de um gene (*FKS1*) que promove aumento de saída da droga através da bomba de efluxo *Cdr2p* e degradação da substância (TRABULSI; ALTERTHUM, 2015)

2.6.3 Resistência a fluorocitosina

Entre as categorias de agentes antifúngicos, esta comumente apresenta a barreira natural da resistência primária, principalmente em espécies não-albicans, além de riscos em até 30% de desenvolvimento para resistência secundária. Fungos leveduriformes são susceptíveis a fluorocitosina, porém empregado isoladamente pode gerar resistência e desta forma, combina-se a terapia com outros antifúngicos de diferentes mecanismos, como anfotericina B ou fluconazol (TRABULSI; ALTERTHUM, 2015).

Os mecanismos descritos incluem perda da atividade da citosina permease e diminuição da atividade uracil fosforibosil transferase, responsável pela conversão e ativação da molécula 5-fluoruracila em 5-fluoruridina monofosfato (COLOMBO et al., 2013; TRABULSI; ALTERTHUM, 2015).

2.6.4 Resistência a poliênicos

Grande maioria das cepas de *Candida* são sensíveis a anfotericina B e a nistatina. Os mecanismos relacionados à resistência envolvem principalmente diminuição, modificação de posicionamento na membrana ou alteração estrutural de ergosterol, molécula alvo, reduzindo a afinidade pelos poliênicos, através de alterações genéticas (ERG2 e ERG3) (ESPINEL-INGROFF et al., 2017).

Para conter o surgimento de novas cepas, a OMS lançou em 2015 o Global Antimicrobial Resistance Surveillance System (GLASS), um sistema de vigilância em que se agrupam dados sobre infecções agudas gerando relatórios mais completos, permitindo visualizar o cenário atual dos países frente a RAM (OMS, 2018). Até dezembro/2018, o GLASS contava com 71 países, incluindo o Brasil. O sistema prioriza microrganismos com elevado índice de infecções em humanos, através de hospitais e laboratórios credenciados.

Dessa forma, faz-se necessário o emprego de novas substâncias como agentes alternativos para obtenção de antibióticos a partir de compostos ativos do metabolismo vegetal (PEZZANI et al., 2017) e que atualmente representam percentual significativo das novas moléculas aprovadas pela European Medicine Agency (EMA) e *Food and Drug Administration* (FDA) (PATRIDGE et al., 2016), devido a representatividade que esses derivados secundários têm demonstrado como potencial terapêutico (ZHANG et al., 2014; LEYVA-LÓPEZ et al., 2017) contra doenças infecciosas e não-infecciosas (CASTRO et al., 2016; THOMFORD et al., 2018).

2.7 Plantas medicinais: importância da validação, marcos legais no Brasil e plantas antifúngicas

O histórico de uso de plantas medicinais no Brasil é extenso e costumeiramente baseia-se na experiência e transmissão oral de informações entre pessoas próximas, familiares ou em comunidades (BRUNING et al., 2012), principalmente quando tratam-se de distúrbios menores, condições em que há problemas de saúde, porém considerados não graves e que respondem ao tratamento sintomático (MACHUCA et al., 2005).

Apesar da ampla utilização de plantas no tratamento de doenças, é importante ressaltar ser de suma importância que as espécies sejam validadas cientificamente para garantir a eficácia e segurança no tratamento, além da confirmação de sua qualidade (BRITO et al.,

2016). Assim, são essenciais estudos etnobotânicos, farmacognósticos, fitoquímicos, farmacológicos, de toxicidade e farmacotécnicos para a determinação da eficácia farmacológica de novos compostos, além da identificação de marcadores analíticos utilizados em testes de qualidade para a confirmação da integridade dessas drogas vegetais (BRITO et al., 2016; LUZ et al., 2019).

Desta maneira, a padronização da extração dos compostos químicos constitui etapa primordial para a avaliação de eficácia do melhor processo extrativo além da sua caracterização qualitativa e quantitativa, promovendo a elaboração de um bioproduto com ação efetiva e segura, estabelecendo características químicas e físico-químicas que assegurem qualidade e reprodutibilidade (AGUADO et al., 2006; DADAR et al., 2018), garantindo a constância do fitocomplexo, definido como o conjunto de todas as substâncias, responsáveis pelos efeitos biológicos da planta medicinal (ANVISA, 2018). Para tanto, podem ser empregadas diversas variáveis nos diferentes processos extrativos, como secagem, granulometria, proporção de solventes/droga vegetal, temperatura, tempo e agitação para definir as melhores condições de obtenção do extrato (YULIANA et al., 2011).

Segundo a OMS, estima-se que 85% da população de países em desenvolvimento utilizem preparações à base de plantas medicinais; No Brasil, apenas no ano de 2018, foram dispensados 2.328.919 fitoterápicos e produtos derivados (ANVISA, 2019). Estes fatos estimulam a pesquisa e elaboração de monografias mais completas que possam garantir a eficácia e segurança no tratamento (LOPES et al., 2019). O Governo Brasileiro vem publicando vários documentos para disciplinar o uso de plantas, garantindo seu uso racional. Dentre estes, tem-se a Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) que desde 2006, conta com plantas medicinais e na sua última versão 2017, traz 12 plantas medicinais; Memento terapêutico, com várias monografias de plantas (BRASIL, 2016), o Formulário Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, na sua primeira edição 2011 e seu 1º Suplemento do Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira (FFFB1S1), aprovado e publicado em 2018, todos agregando informações sobre indicação e forma de preparo de várias espécies vegetais empregadas como antimicrobianas, anti-inflamatórias, no tratamento de distúrbios gastrointestinais e urinários, antigripais e antiespasmódicos.

Algumas espécies presentes nos Formulários e em seu suplemento, no Memento Fitoterápico e na RENAME são expressivamente empregadas no tratamento de afecções e corrimentos vaginais na forma de banhos de assento e sabonetes como *Lippia sidoides* Cham.,

Schinus terebinthifolia Raddi e *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (BRASIL, 2014; BRASIL, 2018), principalmente por sua ação anti-inflamatória local. Segundo De Freitas et al. (2018) a casca do caule de barbatimão, além de reduzir a inflamação, também atua como antifúngico, a partir dos taninos presentes em sua composição, capazes de combater espécies resistentes a medicamentos.

Revisões de Murtaza et al. (2015) e Vikrant et al. (2015) apontam que algumas famílias largamente utilizadas na medicina popular expressam significativa ação antifúngica e anti-*Candida*, especificamente, destacando-se Rutaceae, Solanaceae, Ameranthaceae, Asteraceae, Cupressaceae, Myrtaceae, Rosaceae, Zingiberaceae e Lamiaceae, inibindo ou destruindo o fungo através de metabólitos secundários, como terpenoides, compostos organossulfurados e fenólicos, alcalóide de isoquinolina, lactona, flavonoides, ácidos graxos e naftoquinona (VIKRANT et al., 2015). Citada em ambos trabalhos, a família *Lamiaceae* desperta grande interesse farmacológico e econômico, devido à variedade de espécies e compostos bioativos (TRINDADE et al., 2016).

Atualmente, cerca de 258 gêneros compõem a família Lamiaceae, totalizando 7.193 espécies, originárias das regiões mediterrâneas, Oriente Médio e as montanhas subtropicais, expandidas por todos os continentes e distribuição cosmopolita (MBG, 2019), entre árvores, arbustos e ervas. No Brasil, ocorrem em média 23 gêneros, somando 232 espécies nativas, dentre os quais destacam-se *Thymus*, *Ocimum*, *Mentha* e *Origanum* (LORENZI; MATOS, 2002). Estas espécies possuem em comum o aroma acentuado e difundido emprego em culinária, característica geralmente presente nesta família devido aos óleos essenciais (TRINDADE et al., 2016).

O gênero *Origanum* possui 45 espécies, 6 subespécies, 3 variedades e 17 híbridos, distribuídos em torno da região do Mediterrâneo (SKOULA; HARBORNE, 2002; MBG, 2019). É nativo da Ásia Tropical, África e Europa, mas foi introduzido na Índia, costa oeste e leste da América do Norte e México (MARRELLI et al., 2018). É difusamente utilizado na indústria alimentícia, como aromatizante para molhos, sopas, carnes e peixes; em muitos países, é uma importante planta medicinal aromática, empregada no tratamento de reumatismo, indigestão e diarreias, dores de cabeça e musculares e asma (ERENLER et al., 2017).

Quatro exemplares principais são comumente usados para fins culinários: orégano grego (*Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart), orégano espanhol (*Coridothymus*

capitatus (L.) Hoffmanns & Link), orégano turco (*Origanum onites* L.) e orégano mexicano (*Lippia graveolens* HBK). Muitas espécies de diferentes famílias e gêneros são conhecidas como “orégano”, refletindo a extensão da variação morfológica que o gênero exibe (MARRELLI et al., 2018). A espécie mais importante é *O. vulgare subsp. L. vulgare* (D’ANTUONO et al., 2000).

Origanum vulgare L., cujo tamanho varia entre 30-50 cm de altura, com flores brancas e tons de roxo a lilás, folhas opostas, lanceoladas e dentadas (Fig. 4) (PIGNATTI, 1982), possui 6 subespécies descritas (D’ANTUONO et al., 2000). Como os exemplares do gênero, é utilizada em distúrbios brônquicos e estomacais em forma de chá digestivo, no tratamento de resfriados, como antisséptico e aromaterapia (PEZZANI et al., 2017).



Figura 4. Partes aéreas cultivadas de *Origanum vulgare* L.
Fonte: Arquivo Pessoal, 2019.

As folhas são o principal local de armazenamento de óleo essencial, rico em componentes bioativos, como carvacrol e/ou timol, linalol e p-cimeno (GUTIÉRREZ-GRIJALVA et al., 2017), descritos por sua ação antiinflamatória (PEZZANI et al., 2017), antioxidante, antiviral (ZHANG et al., 2014), antiespasmódica (GONCEARIUC et al., 2015), neuroprotetora (GÍRD et al., 2016), antiproliferativa (ELSHAFIE et al., 2017; PEZZANI et al., 2017), antibacteriana e antifúngica (AKRAYI et al., 2015). Diferentes partes utilizadas (folhas, caules, cascas ou rizomas) podem efetivamente exercer esta atividade, seja por meio de extratos orgânicos, pós ou óleos essenciais.

São descritos de forma recorrente em sua composição taninos, fenóis simples, glicosídeos, esteróis, flavonoides e triterpenos (RAT et al., 2016; BENNAOUM et al., 2017), responsáveis pelas ações antioxidante (KAURINOVIC et al., 2011; SPIRIDON et al., 2011), antifúngica e antibacteriana frente cepas gram-positivas e negativas, como *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (GUTIERREZ; BARRY-RYAN, 2008; MARTINS et al., 2014; BHARTI et al., 2014), atividade anti-Giardia (DAVOODI; ABBASI-MALEKI, 2018) e anti-hiperglicêmica (LEMHADRI et al., 2004). A distribuição dos constituintes pode diferir tanto em óleo essencial quanto em extrato conforme o tempo de colheita, região de origem, condições pluviométricas, entre outros fatores (LICINA et al., 2013), potencializando ou reduzindo a ação destes metabólitos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Desenvolver estudo de validação da espécie *Origanum vulgare* L. com ênfase na padronização dos seus extratos hidroetanólicos com atividade antifúngica e elaborar produto fitoterápico estável, visando contribuição efetiva na obtenção de novas alternativas terapêuticas para o tratamento da candidíase vulvovaginal.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar parâmetros químicos e físico-químicos dos extratos das folhas de *O. vulgare* obtidos por planejamento fatorial;

Realizar estudo qualitativo e quantitativo de caracterização dos constituintes químicos nos extratos de *O. vulgare*;

Avaliar o potencial antifúngico dos extratos estudados;

Desenvolver formulações de uso vaginal a partir do extrato padronizado;

Determinar a estabilidade das formulações antifúngicas;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Coleta do material vegetal

A espécie em estudo foi coletada no município de São Luís, Maranhão, Brasil, no Horto Prof.^a Dr.^a Berta Lange de Morretes (2°33'13.5'' S 44°18'80.8'' W), no mês de setembro de 2018 (período seco), na Universidade Federal do Maranhão – Campus Dom Delgado. Uma exsicata do material foi enviada ao Herbário do Maranhão (MAR), da Universidade Federal do Maranhão, registrada sob o número 11.084.

4.2 Obtenção dos extratos

As folhas foram secas à temperatura ambiente por sete dias e pulverizadas em moinho de facas, com granulometria de pó grosso (Farmacopeia Brasileira, 2019). Nesta etapa do estudo, foram definidas como variáveis do hidromódulo as relações de droga/solvente (p/v) de 1:8, 1:10 e 1:12, e empregados 3 (três) métodos extrativos empregando solução hidroetanólica a 70% como solvente, sendo 2 (dois) processos à frio: maceração sob agitação manual (duas vezes por dia) durante 15 dias e percolação, e à quente em aparelho de Soxhlet, em ciclos de

dez sifonagens completas. Posteriormente foram filtrados e concentrados em evaporador rotativo.

Os extratos foram identificados utilizando a inicial do método + a proporção utilizada, Macerados (M1:8; M1:10; M1:12), Percolados (P1:8; P1:10; P1:12) e Soxhlet (S1:8; S1:10; S1:12).

4.3 Caracterização química dos extratos

4.3.1 *Screening* fitoquímico

Os extratos hidroetanólicos foram submetidos à pesquisa de metabólitos secundários através dos testes de prospecção fitoquímica de acordo com a metodologia proposta por Matos (2009).

4.3.2 Análise química por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Um extrato de cada método foi selecionado com base nos melhores rendimento e atividade biológica para identificação dos compostos empregando a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplado a detector de massas – CLAE-EM (Thermo Finnigan Surveyor Autosampler liquid chromatography). Utilizando uma coluna analítica Hypersill BDS C-18 de fase reversa (250 x 3,6 mm, 5 µm, Thermo Electron) protegida por uma pré-coluna C - 18 (4 x 3 mm, 5 µm, Luna, Phenomenex). O volume utilizado na injeção do sistema foi de 5 µL com amostras previamente filtradas por um filtro de seringa de Nylon 0,22- um. Como fase móvel foi utilizada água ultrapura contendo 0,1% de ácido fórmico (A) e 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila (B) com gradiente: 0-1 min, 10% de B; 2-15 min, 30% de B; 16-22 min, 50% de B; 23-34 min, 100% de B; 35-36 min, 10% de B. O fluxo foi de 1,0 mL/min, em temperatura ambiente (MARTINS et al., 2014).

4.3.3 Determinação do teor de polifenóis e flavonoides totais

As concentrações de polifenóis totais foram determinadas utilizando reagente de Folin-Ciocalteau (Merck) e carbonato de sódio a 20%, por espectrofotometria (espectrofotômetro UV-Vis Lambda 35, Perkin Elmer) a 760 nm, após 2 horas de reação (KHODDAMI; WILKES; ROBERTS, 2013). Os resultados foram expressos como equivalentes de ácido gálico (Sigma) (%), calculados a partir de uma curva padrão de ácido

gálico (1 a 30 µg/mL) usada para obtenção da equação da reta.

A concentração de flavonoides totais foi determinada utilizando solução metanólica de cloreto de alumínio (AlCl₃) a 5%, por espectrofotometria UV-Vis (Lambda 35, Perkin Elmer) a 425 nm. Concentrações de quercetina (Merck) foram utilizadas como padrões; os resultados foram expressos em porcentagem de quercetina (DUTRA et al., 2008; FUNARI; FERRO, 2006). Os teores de polifenóis e flavonoides totais dos extratos foram realizados em triplicata e expressos como média ± desvio padrão.

4.4 Determinação da atividade antioxidante

4.4.1. Método 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH)

A redução do radical livre 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) foi determinada pela mudança colorimétrica, homogeneizando em tubos o etanol, 500 µl de DPPH 250 µM e as concentrações 10 µl, 20 µl, 50 µl e 100 µl de amostra. Após 30 minutos, sob temperatura ambiente, realizou-se a leitura das amostras, do branco (sem amostra e sem DPPH) e controle positivo (apenas DPPH) a 517 nm em espectrofotômetro UV-Vis (Lambda 35, Perkin Elmer Corporation, Massachusetts, EUA). O poder antioxidante foi calculado pela porcentagem de inibição da atividade do radical livre (IA %), de acordo com a equação

$$\text{DPPH scavenging activity (\%)} = 100 - [(A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}) \times 100 / A_{\text{control}}]$$

onde A_{amostra} = absorvância da amostra após 30 min de reação, A_{branco} = absorvância do branco, e A_{controle} = absorvância do controle (BRAND-WILLIAMS, CUVELIER, BERST, 1995).

4.4.2 Método capacidade redutora de ferro (Ferric reducing antioxidant power - FRAP)

Utilizou-se o método FRAP para determinar a atividade antioxidante baseada na redução do ferro, inserindo a amostra em meio ácido (pH 3,6), produzindo uma cor azul intensa atribuível à redução do complexo de tripiridiltriazina férrico (Fe III -TPTZ) para a forma ferrosa (Fe II) (DUTRA et al., 2008). O reagente FRAP foi preparado imediatamente antes da análise, misturando 25 mL de tampão de acetato (300 mM, pH 3,6), 2,5 mL de solução de TPTZ (TPTZ 10 mM em HCl 40 mM) e 2,5 mL de FeCl₃ · 6 H₂O (20 mM) em solução aquosa. Diferentes concentrações de 100 µL das amostras (1 a 100 µg mL⁻¹) foram adicionados a 300 µL de água destilada e 3 mL de reagente FRAP e incubadas em banho-

maria a 37 ° C por 30 min. As absorbâncias das reações e o branco (FRAP) foram lidas a 593 nm usando um espectrofotômetro UV-Vis (Lambda 35, Perkin Elmer Corporation, Massachusetts, EUA). A curva de calibração foi construída usando diferentes concentrações de FeSO₄ .7H₂O (100 a 2000 µM) ($r^2 = 0,9987$) e os resultados são expressos como milimoles de Fe II por grama de amostra. Os padrões de ácido gálico e Trolox (Sigma) foram tratados nas mesmas condições que as amostras (BENZIE; STRAIN,1996).

4.5 Avaliação da atividade antifúngica

4.5.1 Determinação de Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da CIM foi realizada através da técnica de microdiluição, utilizando-se microplacas de fundo chato com 96 poços, onde, todos estes foram preenchidos com 150 µL de caldo Mueller Hinton. Em seguida, foram adicionados 150 µL da solução dos extratos avaliados na concentração máxima de 200 mg/mL, em todos os poços de diluição 1:2, realizando-se a diluição seriada até a concentração de 1:64. O mesmo processo de diluição foi repetido para o solvente utilizado para dissolução do extrato (Controle negativo). Como controle positivo, adicionou-se o antifúngico nistatina 100.000 UI/mL ou fluconazol 0,2 mg/mL, no poço com caldo Mueller Hinton. Ao final, preparou-se uma suspensão fúngica. Foram selecionadas 5 espécies: *Candida krusei* (ATCC 6258), *Candida parapsilosis* (IC), *Candida tropicalis* (IC), *Candida albicans* (ATCC 14053) e *Candida glabrata* (IC). Em uma placa previamente preparada com as espécies a serem testadas, foi feita a retirada de colônias e ressuspendidas em solução salina (0,9 %), concentrados entre 1×10^5 e $2,5 \times 10^5$ UFC/mL, e adicionado 5 µL em todos os poços. A microplaca foi incubada por 24-48h, à 37°C fazendo-se a revelação da placa com resazurina (0,1%), aguardando-se mais 2-6h para leitura (CLSI, 2017).

4.5.2 Determinação de Concentração Fungicida Mínima (CFM)

A Concentração Fungicida Mínima (CFM) foi realizada fazendo-se a semeadura em ágar Mueller Hinton de todas as concentrações onde não houve crescimento de microrganismo no teste da CIM. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica por 24/48h à 37° C e em seguida realizou-se a leitura do teste (CLSI, 2013).

4.6 Desenvolvimento do bioproduto e base do extrato padronizado de *Origanum vulgare* L.

4.6.1 Obtenção das formulações

O produto foi desenvolvido na forma de óvulo vaginal, a partir do extrato seco escolhido no processo de padronização, em concentração adequada à formulação e efetividade de ação. O extrato seco foi incorporado às bases de gelatina, ágar ou polietilenoglicol (PEG 4000), desenvolvidas para permitir a obtenção de preparação apropriada (ALLEN Jr. Et al., 2007; FERREIRA; LEITENBERG, 2013).

4.6.2 Estudo de estabilidade

A formulação foi analisada sob os parâmetros de aspecto físico, quebra ao manuseio, faixa de fusão, determinação do peso médio, tempo de desintegração e determinação do pH (BRASIL, 2019; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2019), nos tempos 1 (24 horas); 2 (dez dias); 3 (vinte dias) e 4 (trinta dias), exposto sob três diferentes condições térmicas: temperatura ambiente, baixa ($5 \pm 2^\circ \text{C}$) e elevada (em estufa, $40 \pm 2^\circ \text{C}$) (BRASIL, 2004).

4.7 Análise estatística

Os resultados das análises para padronização dos extratos foram expressos em média \pm desvio padrão ($X \pm DP$), ou média \pm erro padrão ($X \pm EP$). Todos os dados foram analisados pelo Programa GraphPad Prism versão 7.0 (GraphPad Software Inc., San Diego CA, EUA). Análise de variância (ANOVA) e teste de comparações múltipla de Tukey foram utilizados para determinar diferenças significativas entre as médias.

5 RESULTADOS

5.1 Análise química dos extratos de *Origanum vulgare* L.

5.1.1 Rendimentos

Os rendimentos entre hidromódulos em um mesmo método apresentaram diferença estatística. A extração por soxhlet demonstrou-se como o processo mais efetivo em extração e o hidromódulo 1:10 apresentou o maior rendimento (41,11%), seguido de 1:12 (38,64%) e 1:8 (36,22%) (Tabela 2).

Tabela 2. Rendimentos dos extratos obtidos por diferentes métodos extrativos e seus hidromódulos, respectivamente, expressos em (%).

Rendimentos (%)	1:8	1:10	1:12
Maceração	25,39 ^{a,a}	25,3 ^{a,a}	28,71 ^{b,a}
Percolação	30,98 ^{a,b}	32,82 ^{b,b}	28,05 ^{c,a}
Soxhlet	36,22 ^{a,c}	41,11 ^{b,c}	38,64 ^{c,c}

Valores representados em média. Letras diferentes indicam diferença estatística (teste de Tukey, $p > 0,05$). A primeira letra representa comparação entre hidromódulos na mesma linha, enquanto a segunda letra representa comparação entre métodos linha x coluna.

5.1.2 Avaliação qualitativa dos extratos

Os extratos de maceração e percolação apresentaram odor *sui generis* do vegetal e cor esverdeada intensa, enquanto o extrato por soxhlet mostrou-se esverdeado claro e odor característico. Testes fitoquímicos mostraram-se positivos para saponinas, cumarinas e compostos fenólicos do tipo fenóis simples e taninos condensados, em todos os hidromódulos de maceração, percolação e soxhlet. Foram detectados alcaloides e flavonoides do tipo flavononas em alguns hidromódulos (Tabela 3).

5.2 Determinações do teor de flavonoides totais, polifenóis e antioxidante

Os teores de flavonoides totais e polifenóis encontram-se descritos na Tabela 4. Maceração com hidromódulo 1:10 expressa o melhor valor de obtenção para flavonoides, enquanto percolação 1:12 tem o melhor índice de obtenção de polifenóis. Todos os extratos apresentaram boa atividade antioxidante, com valores próximos ao controle positivo.

Tabela 3. Avaliação qualitativa dos constituintes químicos nos extratos hidroetanólicos das folhas de *Origanum vulgare* L. obtidos por diferentes procedimentos extrativos.

Metabólito Secundário	M 1:8	M 1:10	M 1:12	P 1:8	P 1:10	P 1:12	S 1:8	S 1:10	S 1:12
Fenóis	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Taninos	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cumarinas	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Triterpenos	+	+	+	-	-	+	+	+	+
Esteroides	+	-	+	-	+	+	+	+	+
Saponinas	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Alcaloides	-	-	-	+	+	+	-	-	-
Catequinas	-	-	-	+	-	-	+	-	-
Flavonoides:									
Antocianidinas e Antocianidas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Flavonas, xantonas, flavonóis	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Chalconas e Auronas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Flavononois	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Leucoantocianidinas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Flavononas	+	+	-	-	-	+	+	-	+

Legenda: (-) ausência; (+) presença; M - Maceração; P - Percolação; S - Soxhlet. Resultados expressos como média dos ensaios de avaliação qualitativa de constituintes químicos e realizados em triplicata.

Tabela 4. Determinações do teor de flavonoides totais, polifenóis e avaliação da atividade antioxidante dos extratos hidroetanólicos de *Origanum vulgare* L.

Amostra	Flavonoides totais (mg EQ/g)	Polifenóis totais (mg EAG/g)	DPPH CE₅₀ (µg/mL)	FRAP (mmol Fe²⁺/g)
M1:8	13.88 ± 0.39 ^a	24.9 ± 2.8 ^a	2.75 ± 0.01 ^a	4.78 ± 0.2 ^a
M1:10	14.95 ± 0.54 ^a	24.8 ± 1.3 ^a	2.66 ± 0.04 ^a	2.84 ± 0.05 ^b
M1:12	8 ± 0.1 ^b	21.7 ± 0.9 ^b	2.72 ± 0.04 ^a	6.31 ± 1.7 ^c
P1:8	7.72 ± 0.17 ^b	18.52 ± 1.5 ^c	2.81 ± 0.5 ^a	3.53 ± 0.7 ^d
P1:10	7.85 ± 0.63 ^b	22.18 ± 0.8 ^b	2.79 ± 0.08 ^a	2.88 ± 0.4 ^a
P1:12	10.34 ± 0.04 ^c	25.9 ± 2.4 ^a	2.77 ± 1.1 ^a	5.01 ± 1.9 ^e
S1:8	13.12 ± 0.45 ^a	20.3 ± 3.4 ^b	2.51 ± 0.6 ^a	3.35 ± 0.1 ^d
S1:10	12.48 ± 0.25 ^a	24.7 ± 3.9 ^a	2.48 ± 0.02 ^a	6.48 ± 1.1 ^c
S1:12	11.41 ± 0.51 ^c	23.03 ± 3.6 ^a	2.55 ± 0.07 ^a	5.22 ± 0.30 ^e
C+			1.5 ± 0.5	9.09 ± 0.10

Valores representados como média ± desvio padrão. Legenda: M - Maceração; P - Percolação; S - Soxhlet; EQ - Quercetina; EAG - Ácido gálico; Fe²⁺ - Ferro II; Ácido gálico e Trolox (controle positivo). Letras diferentes indicam diferença estatística (teste de Tukey, p>0,05).

5.3 Atividade antifúngica

Os extratos obtidos por maceração, percolação e soxhlet foram efetivos na inibição do crescimento sobre as cepas *Candida krusei* (ATCC 6258), *C. parapsilosis* (IC), *C. tropicalis* (IC), *C. albicans* (ATCC 14053) e *C. glabrata* em todos os hidromódulos avaliados (1:8, 1:10, 1:12) (Tabela 5), demonstrando similaridade e pouca variância nos valores de CIM, principalmente na extração por soxhlet.

Os valores obtidos para determinação da Concentração Fungicida Mínima encontram-se dispostos na tabela 6. Observa-se que extratos obtidos pelo método soxhlet não apresentaram variação; independente dos hidromódulos, as CFM foram iguais para todas as cepas verificadas. *Candida glabrata* foi a única cepa que apresentou resultados similares em todos os hidromódulos e métodos, cujos CIM e CFM foram 12,5 e 25, respectivamente.

Tabela 5. Determinação da Concentração Inibitória Mínima *in vitro* dos extratos hidroetanólicos de *Origanum vulgare* L.

Microrganismos	CIM (mg/ml)									Controle negativo	Controle positivo
	M1:8	M1:10	M1:12	P1:8	P1:10	P1:12	S1:8	S1:10	S1:12		
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	3,12 ^a	3,12 ^a	3,12 ^a	12,5 ^b	12,5 ^b	12,5 ^b	6,25 ^c	6,25 ^c	6,25 ^c	C	SC
<i>Candida parapsilosis</i> IC	12,5 ^a	12,5 ^a	12,5 ^a	3,12 ^b	3,12 ^b	3,12 ^b	3,12 ^b	3,12 ^b	3,12 ^b	C	SC
<i>Candida tropicalis</i> IC	3,12 ^a	3,12 ^a	3,12 ^a	50 ^b	50 ^b	50 ^b	12,5 ^c	12,5 ^c	12,5 ^c	C	SC
<i>Candida albicans</i> ATCC 14053	3,12 ^a	12,5 ^b	3,12 ^a	12,5 ^b	3,12 ^a	3,12 ^a	3,12 ^a	3,12 ^a	3,12 ^a	C	SC
<i>Candida glabrata</i> IC	12,5 ^a	12,5 ^a	12,5 ^a	12,5 ^a	12,5 ^a	12,5 ^a	12,5 ^a	12,5 ^a	12,5 ^a	C	SC

Legenda: CIM - Concentração inibitória mínima; C - Crescimento; SC - Sem crescimento; M - Maceração; P - Percolação; S - Soxhlet. Controle positivo: nistatina 100.000 UI/ml ou fluconazol 0,2 mg/ml. Letras diferentes indicam diferença estatística (teste de Tukey, $p > 0,05$).

Tabela 6. Determinação da Concentração Fungicida Mínima *in vitro* dos extratos hidroetanólicos de *Origanum vulgare* L.

Microrganismos	CFM (mg/ml)									Controle negativo	Controle positivo
	M1:8	M1:10	M1:12	P1:8	P1:10	P1:12	S1:8	S1:10	S1:12		
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	25 ^a	25 ^a	25 ^a	25 ^a	12,5 ^b	12,5 ^b	12,5 ^b	12,5 ^b	12,5 ^b	C	SC
<i>Candida parapsilosis</i> IC	12,5 ^a	12,5 ^a	25 ^b	25 ^b	25 ^b	50 ^c	12,5 ^a	12,5 ^a	12,5 ^a	C	SC
<i>Candida tropicalis</i> IC	25 ^a	50 ^b	100 ^c	25 ^a	12,5 ^d	12,5 ^d	12,5 ^d	12,5 ^d	12,5 ^d	C	SC
<i>Candida albicans</i> ATCC 14053	50 ^a	50 ^a	50 ^a	50 ^a	50 ^a	50 ^a	12,5 ^b	12,5 ^b	12,5 ^b	C	SC
<i>Candida glabrata</i> IC	25 ^a	25 ^a	25 ^a	25 ^a	25 ^a	25 ^a	25 ^a	25 ^a	25 ^a	C	SC

Legenda: CFM - Concentração Fungicida Mínima; C - Crescimento; SC - Sem crescimento; M - Maceração; P - Percolação; S - Soxhlet. Controle positivo: nistatina 100.000 UI/ml ou fluconazol 0,2 mg/ml. Letras diferentes indicam diferença estatística (teste de Tukey, $p > 0,05$).

5.4 Avaliação química dos extratos hidroetanólicos das folhas de *Origanum vulgare* L.

A partir de parâmetros anteriores, como maior teor de rendimento, melhor atividade antioxidante e antifúngica, foram selecionados três extratos: P 1:10, M 1:12 e S 1:10 para a análise por HPLC. Pode-se observar o perfil de eluição cromatográfica dos extratos nas figuras 5 - 7.

A identificação das estruturas foi realizada através de espectrometria de massas em modo negativo; foram detectados 9 principais picos, com pequena variação de intensidade.

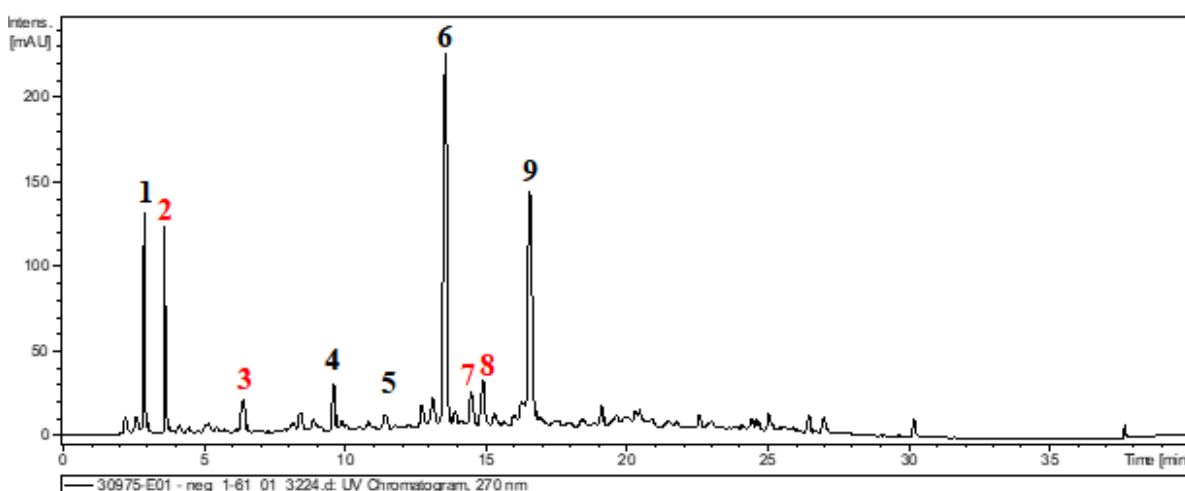


Figura 5. Cromatograma do extrato hidroetanólico P 1:10 de *Origanum vulgare* L. (270 nm). **Pico 1** – 3,0 minutos; **Pico 2** – 3,8 minutos; **Pico 3** – 6,5 minutos; **Pico 4** – 9,7 minutos; **Pico 5** – 11,6 minutos; **Pico 6** – 13,6 minutos; **Pico 7** – 14,5 minutos; **Pico 8** – 15,0 minutos; **Pico 9** – 16,7 minutos. Números em vermelho: substância não identificada. (Fonte: Bezerra, 2019).

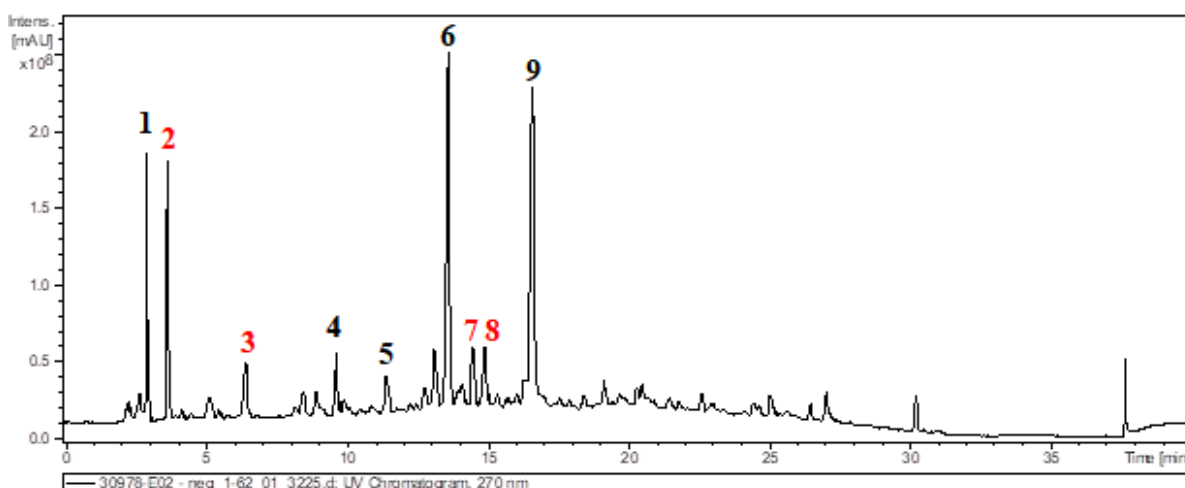


Figura 6. Cromatograma do extrato hidroetanólico M1:12 de *Origanum vulgare* L. (270 nm). **Pico 1** – 2,9 minutos; **Pico 2** – 3,8 minutos; **Pico 3** – 6,5 minutos; **Pico 4** – 9,7 minutos; **Pico 5** – 11,6 minutos; **Pico 6** – 13,7 minutos; **Pico 7** – 14,5 minutos; **Pico 8** – 15,0 minutos; **Pico 9** – 16,7 minutos. Números em vermelho: substância não identificada. (Fonte: Bezerra, 2019).

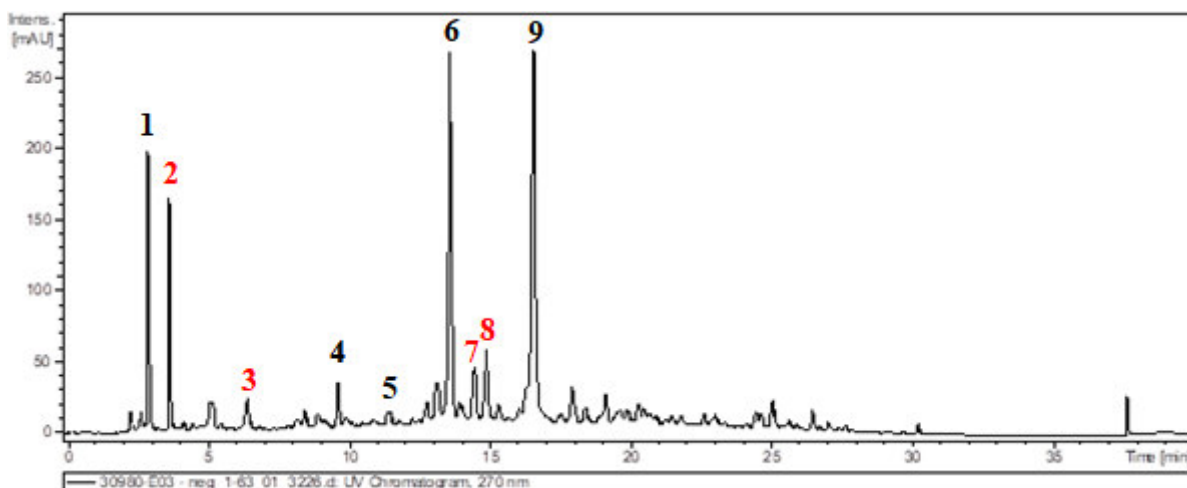


Figura 7. Cromatograma do extrato hidroetanólico S 1:10 de *Origanum vulgare* L. (270 nm). **Pico 1** – 2,9 minutos; **Pico 2** – 3,8 minutos; **Pico 3** – 6,5 minutos; **Pico 4** – 9,7 minutos; **Pico 5** – 11,6 minutos; **Pico 6** – 13,7 minutos; **Pico 7** – 14,5 minutos; **Pico 8** – 15,0 minutos; **Pico 9** – 16,7 minutos. Números em vermelho: substância não identificada. (Fonte: Bezerra, 2019).

Nas tabelas de 7 a 9 estão descritas as substâncias identificadas. Os picos 1, 4, 5 e 6 sofreram variação em sua intensidade, mas ionização e fragmentações mantiveram-se, identificando-os como Ácido acetil-hexosil-cafeico, Apigenina-6,8 Di- C glicosídeo, 4- [2', 5' di-hidroxibenzoil) oxil] metil] e Ácido 3,5-O-dicafeoilquinóico, respectivamente. O pico 9 é caracterizado como ácido rosmarínico, que ao sofrer uma trimerização na fonte, ioniza-se como outro composto, o alfa terpinoleno.

Tabela 7. Principais constituintes do extrato hidroetanólico das folhas de *Origanum vulgare* L. P1:10 identificados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas.

Picos	[M-H] ⁻	Fragmentações (m/z)	
		MS ²	Substância proposta
1	383	191	Ácido acetil-hexosil cafeico
4	593	473;353	Apigenina-6,8 Di-C glicosídeo
5	421	259;183	4- [2', 5' di-hidroxibenzoil) oxil] metil]
6	515	353;173	Ácido 3,5-O-dicafeoilquinóico
9	1079	719;359	Ácido rosmarínico (trímero)

[M-H]⁻ - íon molecular modo negativo; m/z - relação massa/carga; MS² - espectro de íons de produto de 2^o geração

Tabela 8. Principais constituintes do extrato hidroetanólico das folhas de *Origanum vulgare* L. M1:12 identificados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas.

Picos	[M-H] ⁻	Fragmentações (m/z)	
		MS ²	Substância proposta
1	383	191	Ácido acetil-hexosil cafeico
4	593	473;353	Apigenina-6,8 Di-C glicosídeo
5	421	259;183	4- [2', 5' di-hidroxibenzoil) oxi] metil]
6	515	353;173	Ácido 3,5-O-dicafeoilquinóico
9	1079	719;359	Ácido rosmarínico (trímero)

[M-H]⁻ - íon molecular modo negativo; m/z - relação massa/carga; MS² - espectro de íons de produto de 2^o geração

Tabela 9. Principais constituintes do extrato hidroetanólico das folhas de *Origanum vulgare* L. S1:10 identificados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas

Picos	[M-H] ⁻	Fragmentações (m/z)	
		MS ²	Substância proposta
1	383	191	Ácido acetil-hexosil cafeico
4	593	473;353	Apigenina-6,8 Di-C glicosídeo
5	421	259;183	4- [2', 5' di-hidroxibenzoil) oxi] metil]
6	515	353;173	Ácido 3,5-O-dicafeoilquinóico
9	1079	719;359	Ácido rosmarínico (trímero)

[M-H]⁻ - íon molecular modo negativo; m/z - relação massa/carga; MS² - espectro de íons de produto de 2^o geração

Constantes em todos os cromatogramas, Ácido rosmarínico e ácido 3,5-O-dicafeoilquinóico podem ser considerados marcadores químico para o extrato hidroetanólico de *Origanum vulgare*.

5.4.1 Escolha do extrato

Com base nos parâmetros de análise empregados para esse estudo de padronização (caracteres organolépticos, rendimento, atividade antioxidante e antifúngica) pode-se constatar que o extrato obtido pelo processo extrativo Soxhlet, hidromódulo 1:10 apresentou melhores resultados gerais – rendimento de 41,11%, 24,7 mg EAG/g e menor concentração fungicida frente *Candida albicans* - portanto escolhido, na forma de extrato seco à 5% para a produção do fitoterápico.

5.5 Caracterização dos óvulos vaginais

5.5.1 Aspecto físico

Em relação ao controle de qualidade ao qual foi submetido o produto, avaliou-se características como aspecto físico, quebra ao manuseio, peso médio, tempo de desintegração e pH ao decorrer de trinta dias. A tabela 10 resume as características físicas de cinco formulações testadas, nomeadas F1, F2, F3, F4 e F5, os quais foram preparados usando diferentes composições de base para o produto. Os óvulos foram formulados empregando extrato seco a 5%, glicerina e água, em diferentes proporções, acrescidos de agente gelificante, em proporções ou tipos variados.

Tabela 10. Composição dos óvulos testados e aparência final nos tempos 1, 2, 3 e 4 à temperatura ambiente (29° C).

Composição	T 1	T2	T3	T4
<i>F1</i> (6 % ágar)	Rígido, liso	Rígido, liso	Rígido, levemente ressecado	Rígido, pequenas ranhuras, ressecado
<i>F2</i> (1 % ágar)	Rompeu ao retirar do molde			
<i>F3</i> (6 % gelatina)	Firme, textura levemente grumosa, pouco maleável	Firme, textura levemente grumosa, pouco maleável	Pouco firme, textura levemente grumosa, pouco maleável	Pouco firme, quebradiço
<i>F4</i> (5 % gelatina + 1 % ágar)	Firme, liso, maleável	Firme, liso, maleável	Pouco firme, liso, pouco maleável	Quebradiço, liso, não maleável
<i>F5</i> (5 % gelatina + 1 % ágar + 1 % PEG 4000)	Firme, liso, maleável	Firme, liso, maleável	Firme, liso, maleável	Firme, liso, pouco maleável

Legenda: T1 - 24 horas; T2 - 10 dias; T3 - 20 dias; T4 - 30 dias.

Os óvulos da formulação F1 apresentaram bom aspecto, de aparência lisa e rígida, maciça ao toque (Figura 8), mantendo assim até o T4, com consistência ressecada e levemente quebradiça. A formulação F2 apresentou leve solidificação, mas rompeu-se ao retirar dos moldes, não sendo possível avaliação nas etapas seguintes e descartada, portanto, considerada inviável.

A textura e aparência dos óvulos da formulação F3 (Figura 9) apresentaram leve presença de grumos e pouca tolerância à manipulação. As formulações F4 e F5 apresentaram inicialmente perfil semelhante, firmeza, tolerância à manipulação e maleabilidade. Em T4, apenas F5 apresentou boa estabilidade sem grandes alterações à forma inicial.



Figura 8. Óvulos da formulação F1, à base de ágar, tamanhos médio e pequeno, durante T1 (24 horas). Fonte: Bezerra, 2019.



Figura 9. Óvulos da formulação F3, à base de gelatina e ágar, tamanho médio, durante T1 (24 horas). Fonte: Fonte: Bezerra, 2019.



Figura 10. Óvulos da formulação F5, à base de gelatina, ágar e polietilenoglicol, tamanho grande, durante T1 (24 horas). Fonte: Fonte: Bezerra, 2019.

5.5.2 Controle de qualidade

As amostras F1, F3, F4 e F5 apresentam faixa de fusão entre 37° a 50°. Todas as amostras foram submetidas às mesmas condições de desintegração em aparelho a 37° C, conforme preconizado pela Farmacopeia Brasileira, com duração total de 60 minutos. O pH das formulações encontra-se entre 5.4 a 6.3. Faixa de fusão, pH e tempos de desintegração estão descritos na tabela 11. O peso médio sofreu variação de 4%, portanto, aprovado segundo o parâmetro permitido pela Farmacopeia Brasileira (2019), que estabelece até 5% de variabilidade no peso total para óvulos e supositórios.

Tabela 11. Faixa de fusão, tempo de desintegração e pH das formulações F1 a F5.

Amostra	Faixa de fusão	Tempo de desintegração	pH
F1	45° - 55° C	<60 min	6.3
F3	38° - 42° C	25 min	6.3
F4	35° - 49° C	25 min	5.7
F5	35° - 39° C	15 min	5.4

6 DISCUSSÃO

Nesse estudo de padronização dos extratos das folhas de *Origanum vulgare* (orégano) obtidos por diferentes procedimentos extrativos (maceração, percolação e Soxhlet) e relações de hidromódulo 1:8, 1:10 e 1:12 foram avaliadas a influência dessas variáveis no rendimento e características químicas e físico-químicas.

Os resultados observados no *screening* fitoquímico tem caráter qualitativo e semi-quantitativo (MATOS, 2009) com caráter preditivo para os testes subsequentes. Rat et al. (2016) e Bennaoum et al. (2017) relataram a variedade de compostos presentes nas folhas de *Origanum vulgare*, principalmente taninos, fenóis, glicosídeos, esteróis, flavonoides e terpenos, semelhante ao encontrado no exemplar em estudo. A ocorrência de flavonoides, ácidos fenólicos e taninos são mais comuns, enquanto estilbenos e lignanas menos comuns (DAI; MUMPER, 2010).

Os compostos fenólicos compõem uma indispensável e ampla classe de metabólitos secundários, identificados pela presença de um ou mais anéis aromáticos associados a um ou mais grupos hidroxila (DAI; MUMPER, 2010); estruturalmente, podem variar de formas simples, como ácidos fenólicos, às mais complexas, como taninos (SANTOS-BUELGA et al., 2012), desempenhando atividades biológicas variadas.

Quideau et al. (2011) descreve as principais atividades relacionadas à presença de taninos, dentre ações bactericida e fungicida, antiviral, cicatrizante, citotóxica, antimutagênica e sequestradora de radicais livres, relacionadas principalmente ao seu potencial de ligação com íons metálicos e macromoléculas (SIMÕES et al., 2017).

Os flavonoides por sua vez, são metabólitos diretamente relacionados com o poder antioxidante do vegetal, sendo expressos quando há grande incidência de radiação solar, como forma de proteção contra os raios UV-B (GOBBO- NETO & LOPES, 2007), à insetos, bactérias, fungos e vírus (SIMÕES et al., 2017). Entre a ampla gama de atividades biológicas desta classe, incluem-se atividades antialérgicas, antidiabéticas, anti-inflamatórias, antivirais, antimutagênicas, antiproliferativas, antitrombóticas, hepatoprotetoras, anticarcinogênicas, estrogênicas e antioxidantes (ORHAN et al., 2010).

Avaliando o rendimento do extrato etanólico de *Origanum vulgare* realizado por Teixeira et al. (2013) em Portugal, através de maceração sem renovação de solvente durante 3 dias, obteve-se 6,75% de rendimento. Em experimentos de Król et al. (2019), comparando tamanhos diferentes do material vegetal (íntegro e rasurado) em metanol e hexano, obtiveram 12,37% e 22% para extração metanólica e 2% e 1,25% em extração hexânica. Ambos estudos relatam rendimentos inferiores ao obtido, o que pode ser considerado primeiramente pelo solvente escolhido, que permitiu melhor solubilidade dos compostos ao utilizar parte de água na extração (PANDEY; TRIPATHI, 2014), associado ao menor tamanho da partícula, que permitiu maior permeação de líquido e vazão ao longo do tempo, garantindo um rendimento

superior.

O tempo de contato entre material vegetal e líquido extrator, bem como a polaridade do solvente podem direcionar a obtenção de compostos de interesse e influenciar no resultado final (OLIVEIRA et al., 2016). O método extrativo por Soxhlet permitiu obtenção considerável de metabólitos, considerando a melhor média de rendimento entre os avaliados. Uma das vantagens neste método está na possibilidade de a amostra permanecer em contato com novas porções do solvente, repetidamente e sob aquecimento, com controle de temperatura, facilitando a extração (DE CASTRO; PRIEGO-CAPOTE, 2010).

Martins e colaboradores (2014), através de decocção das partes aéreas, obtiveram 75,25 mg / g de flavonoides e 98,05 mg / g em compostos fenólicos totais. Em contrapartida, Tusevski e colaboradores (2014) demonstraram que exemplares da Macedônia expressaram em média 38,46 mg / g de flavonoides e ambos apresentaram divergências dos resultados apresentados neste estudo, permitindo afirmar que o método extrativo bem como a localidade, condições ambientais onde o estudo foi realizado e idade do vegetal interferem diretamente nestes valores (KRÓL et al., 2019).

Diversos autores relatam a composição fenólica de *O. vulgare*, em diferentes localizações, empregando distintas metodologias de extração (SKOULA et al., 2008; GREVSEN et al., 2009; HOSSAIN et al., 2010; MIRON et al., 2011; AGIOMYRGIANAKI; DAIS, 2012).

Também é possível que o marcador químico, ácido rosmarínico, descrito em outras espécies de *Origanum* por Ozer; Goren et al. (2020) seja responsável pela ação antioxidante observada neste estudo, em conjunto com outros metabólitos. A caracterização química dos compostos presentes no extrato hidroetanólico de *Origanum vulgare* responsáveis pelas atividades biológicas neste trabalho apresentadas nas tabelas 7, 8 e 9 foram referidas anteriormente em estudo de Martins et al. (2014) com partes aéreas sob infusão e decocção.

O pico 4 apresentou um íon $[M-H]^-$ 593, fragmentos MS^2 m/z 473 e m/z 353, correspondendo à perda sugestiva de flavonas C-hexosil e aglicona apigenina com alguns resíduos de açúcar, segundo Ferreres, Silva et al., (2003), o que pode caracterizar o composto apigenina 6,8-di-C-glucosídeo, relatado como constituinte comum de *Origanum vulgare* por Grevsen et al. (2006).

O pico 9, composto abundante em todos os cromatogramas, um íon $[M-H]^-$ 359, liberou fragmento MS^2 m/z 161, corresponde ao ácido rosmarínico, um ácido fenólico. A

trimerização dessa molécula (junção de três moléculas idênticas), gera um novo íon, $[M-H]^-$ 1079, fragmentado em MS^2 m/z 719 e MS^2 m/z 359.

Essa característica do processo extrativo pode demonstrar influência direta na ação fungistática, cujas CFM ativas foram ligeiramente menores entre os hidromódulos do extrato obtido por Soxhlet. Em estudo de Król et al. (2019), em que foram avaliados extratos metanólico (EME) e hexânico (EHE) de *Origanum vulgare* frente cepas de *Candida krusei*, *C. albicans* e outros dermatófitos, os valores de CIM encontrados foram respectivamente 25 mg/ml (EME) e 75 mg/ml (EHE), para ambas espécies, valores superiores aos obtidos (Tabela 5) neste estudo, demonstrando possibilidade de emprego de concentrações menores e efetividade frente a sensibilização destes microrganismos. Alguns autores sugerem mecanismos de ação a partir de algumas classes, como taninos, flavonoides, saponinas e compostos terpênicos.

São sugeridas diversas formas de atuação dos metabólitos secundários, promovendo inibição ou morte fúngica. Descrito por Kursat et al. (2011), cepas de *Candida albicans* e *Candida glabrata* mostraram-se sensíveis aos extratos obtidos por extração com acetona e acetato de etila, sugerindo que o efeito se deva à presença dos flavonoides, que em vegetais atuam inibindo a germinação de esporos (SALAS et al., 2011) e possivelmente interagem com proteínas dispostas na parede fúngica, inibindo seu crescimento ou rompendo a membrana (ARIF et al., 2011).

Alguns autores relacionam que o mecanismo antifúngico atue principalmente na superfície do fungo, alterando sua homeostase. Vikrant et al. (2015) relaciona a presença de taninos ao aumento da possibilidade de ruptura da membrana fúngica através de precipitação de proteínas; semelhante proposto por Juven et al. (1994) cuja ligação entre compostos triterpenóides e hidroxilas (OH) com proteínas presentes nas membranas dos fungos, promovem uma alteração na permeabilidade das membranas e levam ao extravasamento do conteúdo celular. A presença de saponinas pode atuar sinergicamente a estes mecanismos citados, a partir da complexação com esteroides, promovendo ação antifúngica pela permeabilização da membrana (OSBOURN et al., 2011). Saleem et al. (2010) sugere que os esteroides também possam contribuir no rompimento da membrana, a partir da atividade observada por ele em estudos anteriores frente espécies de *Candida*. Metabólitos como os alcaloides, conhecidos por sua ação tóxica de defesa, podem intercalar-se à parede fúngica ou permear a membrana, se ligando ao DNA, gerando a destruição da célula (SILVA;

FERNANDES JÚNIOR, 2010; XIE et al., 2012)

A escolha do extrato para elaboração do produto levou em questão o rendimento final do processo extrativo, tempo de extração, quantidade de solvente empregada e atividade antifúngica do extrato bruto. Avaliando a combinação destes fatores, selecionou-se o extrato Soxhlet 1:10, preliminarmente incorporado à formulação que melhor comportou a quantidade de ativo, testado em 5 tipos de produtos, dos quais, F5 mostrou-se mais estável em contraste aos demais.

A diferença entre formulações está no acréscimo do polietilenoglicol (PEG) 4000, uma cadeia de polímeros que permite maior estabilidade à composição, conforto durante a aplicação pela textura, além de favorecer retenção de água para a formulação, não observado na formulação F1, visivelmente ressecada e quebradiça.

Apenas uma amostra (F1) não apresentou resultado satisfatório conforme requisito de desintegração da Farmacopeia Brasileira, pois seu tempo foi superior a 60 minutos, ultrapassando o limite especificado para óvulos com bases aquosas. O pH das formulações, situado entre 5.4 e 6.3 não o invalida para uso vaginal (pH 3,5 – 4,5), visto que não existem especificações para este produto e o polietilenoglicol é largamente empregado em preparações com esta finalidade (ALLEN Jr. et al., 2007; FERREIRA et al., 2013). Entretanto, alguns ajustes podem ser realizados, afim de melhorar o tempo de estabilidade do produto, abrindo possibilidades para trabalhos futuros, visto que este é o primeiro que utiliza uma preparação tecnicamente elaborada com extratos desta espécie vegetal.

O controle de qualidade e a padronização de fitoterápicos envolvem diversas etapas, contudo, a qualidade das matérias-primas vegetais tem grande importância na obtenção de produtos em que se necessita constância de composição e propriedades terapêuticas reprodutíveis (CALIXTO, 2000), observando as condições de cultivo do vegetal, variações climáticas, período de colheita, idade e desenvolvimento do vegetal, região de origem, presença de patógenos, entre outros fatores (GOBBO NETO; LOPES, 2007; LICINA et al., 2013), pois podem alterar ou comprometer a expressão dos compostos, além de induzir a atenção para continuação de estudos de padronização em âmbito nacional, para melhor aproveitamento da matéria-prima (LEITÃO, 2013).

7 CONCLUSÃO

Os testes fitoquímicos dos extratos hidroetanólicos das folhas de *Origanum vulgare* L. revelaram presença de polifenóis, sugerindo atividade antioxidante, confirmada por testes DPPH e FRAP, bem como taninos e alguns flavonoides que podem estar diretamente relacionados à atividade antifúngica e que também atuam como anti-inflamatório, aliviando o desconforto provocado pela candidíase. O extrato obtido por Soxhlet, hidromódulo 1:10 foi padronizado para elaboração do produto, devido à efetiva ação fungistática e presença de ácido rosmarínico, marcador analítico de *O. vulgare*. O óvulo com composição F5 manteve-se estável por 20 dias, com excelentes parâmetros de desintegração e pH, considerado assim o bioproduto mais adequado para uso. Podem ser desenvolvidos mais testes de estabilidade e segurança para a formulação proposta, visando a certificação de um produto seguro para as pacientes no tratamento da candidíase vaginal.

REFERÊNCIAS

AGIOMYRGIANAKI A & DAIS P. Simultaneous determination of phenolic compounds and triterpenic acids in oregano growing wild in Greece by ³¹P NMR spectroscopy. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 50; 739–748; 2012.

AGOSTINI-COSTA TS, BIZZO VRF, SILVEIRA HR, GIMENES D. Secondary Metabolites. In: Dhanarasu DS, editor. *Chromatography and its applications*. Brazil: In Tech; 2012.

AGUADO M, NUNEZ MB, DUDIK HN, BELA A, RAISMAN JS, & SANSBERRO, P. Diseño de comprimidos de extrato de *Aloysia polystachya* por compresión directa. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, 25(02): 225- 230; 2006.

AKRAYI H, SALIH R, HAMAD P. In vitro screening of antibacterial properties of rhus coriaria and *Origanum vulgare* against some pathogenic bacteria. *Sci. J. Koya Univ.*, 3; 35–41; 2015.

ALIMARDANI-THEUIL P, GAINVORS-CLAISSE A, DUCHIRON F. Yeasts: An attractive source of pectinases—From gene expression to potential applications: A review. *Process Biochemistry*, 46; 1525–1537; 2011.

ALMEIDA MVA. Anfotericina B e suas formulações lipídicas. Tese de Doutorado. [sn]; 2013.

ÁLVARES CA, SVIDZINSKI TIE, CONSOLARO MEL. Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 43:319-27; 2007.

AMARAL AD. Incidência de *Gardnerella vaginalis* nas Amostras de Secreção Vaginal em Mulheres Atendidas pelo Laboratório Municipal de Fraiburgo. *Rev. Ciênc. Farm. Básica. Apl.*, 33(3): 455-458; 2012.

ANDERSSON DI, HUGHES D. “Persistence of antibiotic resistance in bacterial populations,” *FEMS Microbiology Reviews*, 35(5):901–911; 2011.

ARNOLD TM, DOTSON E, SAROSI GA, HAGE CA. Traditional and emerging antifungal therapies. *Proc Am Thorac Soc.*,7(3):222-8; 2010.

BARAN R, NAKAMURA R. Doenças da unha: Do diagnóstico ao tratamento. Elsevier Brasil, 2018.

BARBEDO LS, SGARBI DBG. Candidíase. *J Bras Doenças Sex Transm*, 22(1):22-38; 2010.

BASMA R, BARADA G, OJAIMI N, KHALAF RA. Susceptibility of *Candida albicans* to common and novel antifungal drugs, and relationship between the mating type locus and resistance, in Lebanese hospital isolates. *Mycoses*, 52(2):141-148; 2009.

BASMACIYAN L, BON F, PARADIS T, LAPAQUETTE P & DALLE F. “*Candida albicans* Interactions With The Host: Crossing The Intestinal Epithelial Barrier”, *Tissue Barriers*, 2019. DOI: 10.1080/21688370.2019.1612661a019687.

BECKMAN J. Antimicrobial properties of pomegranate fruit. A Thesis, Willamette University, 77-95, 2007.

BENNAOUM Z, BENHASSAINI H, FALCONIERI D, PIRAS A, & PORCEDDA S. Chemical variability in essential oils from *Ruta* species among seasons, and its taxonomic and ecological significance. *Nat Prod Res* 31(19):2329–2334, 2017.

BENZIE IF, STRAIN J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239:70–76;1996.

BHARTI V, VASUDEVA N, KUMAR S. Anti-oxidant studies and anti- microbial effect of *Origanum vulgare* Linn in combination with standard antibiotics. *Ayu*, 35(1):71-78; 2014. doi:10.4103/0974-8520.141944

BORGES, AM, PEREIRA J, CARDOSO MG, ALVES JA, & LUCENA EMP. Determinação de óleos essenciais de alfavaca (*Ocimum gratissimum* L.), orégano (*Origanum vulgare* L.) e tomilho (*Thymus vulgaris* L.). *Rev. Bras. Plantas Med., Botucatu*, 14(4):656-665; 2012.

BRANCO PC, CASTILHO PC, ROSA MF, & FERREIRA J. Characterization of *Annona cherimola* Mill. seed oil from Madeira island: a possible biodiesel feedstock. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 87(4):429-436; 2010.

BRAND-WILLIAMS W, CUVELIER ME, BERST C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebens Wissen Technol*, 28: 25-30; 1995.

BRASIL. Universidade Federal da Paraíba. Pesquisadora da UFPB cria desinfetante à base de orégano. Ministério da Educação. 2020. Disponível em <<https://www.ufpb.br/ufpb/contents/noticias/pesquisadora-da-ufpb-cria-desinfetante-a-partir-do-oleo-de-oregano>>. Acesso em 20 Dez 2020

BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução – RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos. 1 ed. Brasília: ANVISA, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2006a. Decreto nº 5813 de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. DOU, 2006a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Relação Nacional de Medicamentos Essenciais : RENAME 2018 [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. – Brasília: Ministério da Saúde, 2018. 218 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Informações Sistematizadas da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS: *Lippia sidoides* Cham., Verbenaceae (Alecrim-pimenta) / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. – Brasília: Ministério da Saúde, 2018. 72 p.: il.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia nº04, de 08 de dezembro de 2015. Guia para obtenção do perfil de degradação, e identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos. Disponível em:

<<http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2738062/Perfil+e+produtos+de+degrada%C3%A7%C3%A3o+em+medicamentos.pdf/c18a4857-9a5c-4292-a1bf-07af6cad6902>> Acesso em 10 Dez 2020

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. Dermatologia na Atenção Básica / Ministério da Saúde, Secretaria de Políticas de Saúde.- 1ª edição. - Brasília: Ministério da Saúde, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Atenção Integral às Pessoas com Infecções Sexualmente Transmissíveis / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. – Brasília : Ministério da Saúde, 2015a. 120 p.: il.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 8. ed. rev., 1. reimpr. – Brasília : Ministério da Saúde, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Atenção Integral às Pessoas com Infecções Sexualmente Transmissíveis / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. – Brasília: Ministério da Saúde, 2015b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Identificação de caso de *Candida auris* no Brasil. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2020/identificacao-de-possivel-caso-de-candida-auris-no-brasil>>. Acesso em 10 Dez 2020

BRINGEL APV, DE FARIAS RODRIGUES MP, & VIDAL ECF. Análise dos laudos de Papanicolaou realizados em uma unidade Básica de saúde. *Cogitare Enferm.*, 17(4):745-751;2012.

BRITO MCA. Trade And Quality Control Of Medicinal Plants In Brazil. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 8(10):32-39; 2016.

BROWN AJ, BUDGE S, KALORITI D, TILLMANN A, JACOBSEN MD, YIN Z, ENE IV, BOHOVYCH I, SANDAI D, KASTORA S, POTRYKUS J, BALLOU ER, CHILDERS DS, SHAHANA S, LEACH MD. Stress adaptation in a pathogenic fungus. *J Exp Biol*, 217:144–155; 2014. <http://dx.doi.org/10.1242/jeb.088930>.

BRUNING MCR, MOSEGUI GBG, VIANA CMM. A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu-Paraná: a visão dos profissionais de saúde. *Ciência e Saúde coletiva*, 17(10):2.675-2.685; 2012.

CAIXETA ES. Aplicação de fungo em fermentação submersa como alternativa de biodegradação de resíduo de óleo de cozinha. 2019. 60 p. Dissertação (Mestrado em Qualidade Ambiental) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2019.

CALIXTO JB. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Braz. J. Med. Biol. Res.*,33: 179;2000.

CAMELE I. Cytotoxic activity of *Origanum vulgare* L. on hepatocellular carcinoma cell line HepG2 and evaluation of its biological activity. *Molecules*, 22: 1435;2017.

CASTRO M, PRETO M, VASCONCELOS V, URBATZKA R. Obesity: The Metabolic Disease, *Advances on Drug Discovery and Natural Product Research. Curr Top Med Chem*, 16:2577– 2604; 2016.

CASTRO IMN. Comparação da atividade de antifúngicos imidazólicos e triazólicos frente a *Candida albicans*. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*. 48: 216-238;2016.

CDC. Center for Disease Control and Prevention: Aflatoxins. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/nceh/hsb/chemicals/aflatoxin.htm>>. Acesso em 08 mar 2019.

CDC. Center for Disease Control and Prevention: ANTIBIOTIC RESISTANCE THREATS in the United States, 2013. Disponível em: < <https://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>>. Acesso em 18 fev 2019.

CDC. Center for Disease Control and Prevention: Tracking *Candida auris*, 2019a. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/fungal/candida-auris/tracking-c-auris.html>>. Acesso em 15 mai 2019.

CDC. Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019b. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, CDC; 2019. Disponível em <www.cdc.gov/DrugResistance/Biggest-Threats.html> Acesso em 20 Dez 2020.

CHANUSSOT C, ARENAS R. Infección micótica plantar e interdigital en pacientes con onicomicosis. *Rev Iberoam Micol*, 24: 118-121;2007.

CHIACCIO ND. Manual de Conduta nas Onicomicoses-Diagnóstico e tratamento. Sociedade

Brasileira de Dermatologia.(acedido em 15 de Agosto de 2018).

CINBILGEL I, & KURT Y. *Oregano* and/or *Marjoram*: Traditional Oil Production and Ethnomedical Utilization of *Origanum* Species in southern Turkey. *Journal of Herbal Medicine*, 100:257;2019.

CITRS. Centro de Informação Toxicológica do Rio Grande do Sul. Fungos tóxicos. Disponível em: http://www.cit.rs.gov.br/index.php?option=com_content&view=article&id=40&Itemid=34>. Acesso em 20 jul 2019.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement. CLSI document M100-S23. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2013.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. first ed. CLSI Supplement M60. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA; 2017.

COLOMBO AL, GUIMARÃES T, CAMARGO LFA, RICHTMANN R, QUEIROZ-TELLES F, SALLES MJC, CUNHA CAD, YASUDA MAS, MORETTI ML, & NUCCI M. Brazilian guidelines for the management of candidiasis - a joint meeting report of three medical societies: Sociedade Brasileira de Infectologia, Sociedade Paulista de Infectologia and Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. *Braz J Infect Dis*, Salvador, 17(3):283-312; 2013.

CORONADO-CASTELLOTE L, JIMENEZ-SORIANO Y. Clinical and microbiological diagnosis of oral candidiasis. *J Clin Exp Dent*, 5:279-86;2013.

CORREIA O, FAEGERMAN J, NONICKI R, RO BI. Clinical trial design-towards better practices. *Centro Dermatologia Epidermis, Portugal. J Eur Acad Dermatol Venereol.*, 19:1-17;2005.

COTA E, BADER O, WHEELER RT, GUTSMANN T, HUBE B, NAGLIK JR. Candidalysin is a fungal peptide toxin critical for mucosal infection. *Nature*, 532:64–68; 2016.

COUTO RO, VALGAS AB, BARA MTF, & PAULA JRD. Caracterização físico-química do pó das folhas de *Eugenia dysenterica* dc. (Myrtaceae). *Revista Eletrônica de Farmácia*, 6(3):59-69;2009.

COWEN LE, SANGLARD D, HOWARD SJ, ROGERS PD, & PERLIN DS. Mechanisms of antifungal drug resistance. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 5(7):a019752; 2015.

CRAWFORD F, HOLLIS S. Topical treatments for fungal infections of the skin and nails of the foot. *Cochrane Database Syst Rev.*, (3):1-157, 2007.

DĄBROWSKA M, SIENKIEWICZ M, KWIATKOWSKI P, & DĄBROWSKI M. Diagnosis and treatment of mucosa *Candida* spp. infections—a review article. In: *Annales Universitatis*

Mariae Curie-Sklodowska, sectio C–Biologia, 61-68;2019.

DADAR M. *Candida albicans* - Biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis and control – An update, *Microbial Pathogenesis*, 117:128-138;2018. ISSN 0882-4010, <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.02.028>.

DAI J, MUMPER RJ. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* 15, 7313–7352; 2010.

DAVOODI J, ABBASI-MALEKI S. Effect of *Origanum vulgare* Hydroalcoholic Extract on *Giardia lamblia* Cysts Compared with Metronidazole in Vitro. *Iran J Parasitol*, 13(3):486-492;2018.

DE CASTRO MDL, PRIEGO-CAPOTE F. Soxhlet extraction: Past and present panacea. *Journal of Chromatography A*, 1217(16):2383-2389; 2010.

DE OLIVEIRA HC, DA SILVA JF, SCORZONI L, MARCOS CM, ROSSI SA, DE PAULA E SILVA AC, ASSATO PA, DA SILVA RA, FUSCO-ALMEIDA AM, MENDES-GIANNINI MJ. Importance of adhesins in virulence of *Paracoccidioides* spp. *Front Microbiol* 6:303;2015.

DE VASCONCELOS AA JR, MENEZES EA, CUNHA F.A. Chromogenic medium for direct susceptibility testing of *Candida* spp. Isolated from urine. *Mycopathologia*. 172(2):125-30; 2011.

DUTRA RP, NOGUEIRA AMC, MARQUES RRO, COSTA MCP, RIBEIRO MNS. Avaliação farmacognóstica de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith (túba) em municípios da Baixada maranhense, Brasil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18(4):557-562; 2008.

ELSHAFIE HS, ARMENTANO MF, CARMOSINO M, BUFO AS, DE FEO V, CAMELE I. Cytotoxic activity of *Origanum vulgare* L. on hepatocellular carcinoma cell line HepG2 and evaluation of its biological activity. *Molecules*, 22, 1435;2017.

ESPINEL-INGROFF A, ARENDRUP M, CANTÓN E, CORDOBA S, DANNAOUI E, GARCÍA-RODRÍGUEZ J, GONZALEZ GM, GUARRO J, LAS-FLORD C, LACKHARD SL, MARTIN-MAZUELOS E, MEIS JF, OSTROVSKY-ZEICHNER L, PELAEZ T, ST-GERMAIN G, TURNIDGE J. Multicenter study of method-dependent epidemiological cutoff values for detection of resistance in *Candida* spp. and *Aspergillus* spp. to Amphotericin B and Echinocandins for the Etest agar diffusion method. *Antimicrob. Agents Chemother.* 61(1): e01792-16;2017.

FDA: Food & Drug Administration. FDA Drug Safety Communication: FDA warns that prescribing of Nizoral (ketoconazole) oral tablets for unapproved uses including skin and nail infections continues; linked to patient death. Disponível em: <<https://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/ucm500597.htm>> Acesso em 02 Mar 2018.

FEBRASGO - Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetrícia. Manual de

Orientação em Trato Genital Inferior e Colposcopia. Rio de Janeiro, 2010.

FLEMING-DUTRA KE, HERSH AL, SHAPIRO DJ, BARTOCES M, ENNS EA, FILE TM, ... & LYNFIELD R. Prevalence of inappropriate antibiotic prescriptions among US ambulatory care visits, 2010-2011. *Jama*, 315(17):1864-1873;2016.

FRANÇA JCB, RIBEIRO CEL, QUEIROZ-TELLES F. Candidemia em um hospital terciário brasileiro: incidência, frequência das diferentes espécies, fatores de risco e suscetibilidade aos antifúngicos. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Uberaba, v. 41, n. 1, p. 23-28, Feb. 2008.

FUKUDA EK, VASCONCELOS AFD, MATIAS AC, DE MELO BARBOSA A, DEKKER RFH, & DA SILVA MDLC. Fungal cell wall polysaccharides: purification and characterization. *Semina: Ciências Agrárias*, 30(1):117-134; 2009.

FUNARI CS, FERRO VO. Análise de própolis. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 26(1):171-178; 2006.

GÎRD CE, DUTU LE, COSTEA T, NENCU I, POPESCU ML, TUDOREL OO. Preliminary research concerning the obtaining of herbal extracts with potential neuroprotective activity note I. Obtaining and characterization of a selective *Origanum vulgare* L. dry extract. *Farmacia (Bucharest, Rom.)*, 64:680–687;2016.

GNOATTO SCB, BASSANI VL, COELHO GC, SCHENKEL EP. Influência do método de extração nos teores de metilxantinas em erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., Aquifoliaceae). *Química Nova*, 30(2):304-307;2007.

GOBBO-NETO L, LOPES NP. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química nova*, 30(2):374; 2007.

GOLDMAN L, SCHAFER AI. Goldman's cecil medicine E-book. Elsevier Health Sciences, 2015.

GONÇALVES B, FERREIRA C, ALVES CT, HENRIQUES M, AZEREDO J, E SILVA S. Candidíase vulvovaginal: Epidemiologia, microbiologia e fatores de risco. *Revisões Críticas em Microbiologia*, 42(6):905 – 927;2016.

GONCEARIUC M, BALMU SZ, BENE A, BARSAN V, SANDU T. Biochemical diversity of the *Origanum vulgare* ssp. vulgare L. and *Origanum vulgare* ssp. hirtum (link) ietswaart genotypes from Moldova. *J. ASM Life Sci.*, 2:92–100; 2015

GOW NA, VAN DE VEERDONK FL, BROWN AJ, NETEA MG. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nat Rev Microbiol*, 10:112–122;2012.

GRANINGER W, DIAB-ELSCHAHAWI M, & PRESTERL E. Antifungal Agents. *Clinically Relevant Mycoses*, 31–42;2018. doi:10.1007/978-3-319-92300-0_3

GREVSEN K, FRETTE XC, & CHRISTENSEN LP. Content and composition of volatile

terpenes, flavonoids and phenolic acids in Greek oregano (*Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum*) at different development stages during cultivation in cool temperate climate. *European Journal of Horticulture Science*, 74:193–203;2009.

GU W, LU Y, TAN Z, XU P, XIE K, LI X, & SUN L. Fungi diversity from different depths and times in chicken manure waste static aerobic composting. *Bioresource Technology*, 447-453;2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28538200>> Acesso em: jan. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.04.047>

GUNTHER LSA, MARTINS HPR, GIMENES F, ABREU ALP, CONSOLARO MEL, SVIDZINSKI TIE. Prevalence of *Candida albicans* and non-albicans isolates from vaginal secretions: comparative evaluation of colonization, vaginal candidiasis and recurrent vaginal candidiasis in diabetic and non-diabetic women. *São Paulo Med J* 132(2): 116–120;2014.

GUTIERREZ J, BARRY-RYAN C, BOURKE P. A eficácia antimicrobiana das combinações de óleo essencial da planta e as interações com os ingredientes alimentares. *Int J Food Microbiol.*, 124:91-7;2008.

GUTIÉRREZ-GRIJALVA EP, PICOS-SALAS MA, LEYVA-LÓPEZ N, CRIOLLO-GYLES C. “The growing problem of antimicrobial resistance,” *Canadian Veterinary Journal*, 52(8):817–820; 2011.

HARVEY AL, EDRADA-EBEL R, AND QUINN RJ. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. *Nature Reviews Drug Discovery*, 14(2):111-129;2015. doi: 10.1038/nrd4510.

HEERES J, MEERPOEL L, LEWI P. Conazoles. *Molecules*, 15:4129-88;2010.

HEIMARK L, SHIPKOVA P, GREENE J. Mechanism of azole antifungal activity as determined by liquid chromatographic/mass spectrometric monitoring of ergosterol biosynthesis. *J Mass Spectrom.*, 37(3):265–269;2002.

HITCHCOCK, CA. Cytochrome P-450-dependent 14 alpha-sterol demethylase of *Candida albicans* and its interaction with azole antifungals. *Biochem Soc Trans.*, 19(3):782– 787;1991.

HOLANDA AARD, FERNANDES ACS, BEZERRA CM, FERREIRA MAF, HOLANDA MRR, HOLANDA JCP. Candidíase vulvovaginal: sintomatologia, fatores de risco e colonização anal concomitante. *Rev Bras de Ginecol e Obst.*,29:3-9;2007.

HOSSAIN MB, RAI DK, BRUNTON NP, MARTIN-DIANA AB, & BARRY-RYAN C. Characterization of phenolic composition in Lamiaceae spices by LC-ESI-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 10576–10581, 2010.

JACOB L, JOHN M, KALDER M, & KOSTEV K. Prevalência de candidíase vulvovaginal em práticas ginecológicas na Alemanha: um estudo retrospectivo de 954.186 pacientes . *Current Mycology Medical*, 4 (1), 6 – 11;2018

JAMES WD, BERGER TG, ELSTON DM, ODOM RB. *Andrews' Diseases of the Skin:*

clinical Dermatology, 10th ed.; Saunders Elsevier: Philadelphia,308-311;2006.

JIMENEZ-LOPEZ C, COLLETTE JR, BROTHERS KM, SHEPARDSON KM, CRAMER RA. *Candida albicans* induces arginine biosynthetic genes in response to host-derived reactive oxygen species. *Eukaryot Cell* 12: 91–100;2013.

JOSEPH-HORNE T, HOLLOMON DW. Molecular mechanisms of azole resistance in fungi. *FEMS Microbiol Lett.*,149(2):141–149;1997.

JUVEN BJ, KANNER J, SCHVED F, WEISSLOWICZ H. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *J. Appl. Bacteriol.*, 76: 626-631; 1994.

KAURINOVIC B, POPOVIC M, VLAISAVLJEVIC S, & TRIVIC S. Antioxidant capacity of *Ocimum basilicum* L. and *Origanum vulgare* L. extracts. *Molecules*, 16: 7401–7414, 2011.

KÖHLER JR, HUBE B, PUCCIA R, CASADEVALL A, PERFECT JR. Fungi that infect humans. *Microbiol Spectrum* 5(3):FUNK-0014- 2016;2017.
doi:10.1128/microbiolspec.FUNK-0014-2016.

KHODDAMI A, WILKES MA, ROBERTS TH. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*,18(2):2328-75; 2013.

KRÓL B, KOŁODZIEJ B, KĘDZIA B, HOŁDERNA-KĘDZIA E, SUGIER D, & LUCHOWSKA K. Date of harvesting affects yields and quality of *Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2019.

KRYSAN DJ, SUTTERWALA FS, WELLINGTON M. Catching Fire: *Candida albicans*, macrophages, and pyroptosis. *PLoS Pathog* 10(6): e1004139;2014.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004139>

KUMAMOTO CA. Inflammation and gastrointestinal *Candida* colonization. *Curr. Opin. Microbiol.* 14(4): 386–391; 2011.

KURSAT M, EMRE I, YILMAZ Ö, & ERECEVIT P. Antioxidant and antimicrobial activity in the seeds of *Origanum vulgare* L. subsp. *gracile* (C. Koch) Ietswaart and *Origanum acutidens* (Hand.-Mazz.) Ietswaart from Turkey. *Grasas y Aceites*, 62: 410e417;2011.

LEMHADRI A, ZEGGWAGH NA, MAGHRANI M, JOUAD H, & EDDOUKS M. Antihyperglycaemic activity of the aqueous extract of *Origanum vulgare* growing wild in Tafilalet region. *J. Ethnopharmacol.*, 92(2-3):251-6;2004.

LEYVA-LÓPEZ N, GUTIÉRREZ-GRIJALVA EP, VAZQUEZ-OLIVO G, HEREDIA JB. Essential Oils of Oregano: Biological Activity beyond Their Antimicrobial Properties. *Molecules*, 22: E989;2017.

LICINA BZ, STEFANOVIC OD, VASIC SM. Biological activity of the extracts from wild growing *Origanum vulgare* L. *Food Control*, 33:498–504; 2013.

LIMA RK, CARDOSO MG. Lamiaceae Family: Important Essential Oils with Biological and Antioxidant Activity. *Revista Fitos*, 3(3):2007.

LOPES CMC, LIMA SMRR, VEIGA ECA, SOARES-JR JM, & BARACAT EC. Phytotherapeutic medicines: reality or myth? *Revista da Associação Médica Brasileira*, 65(3): 292-294;2019. Epub April 11, 2019. <https://dx.doi.org/10.1590/1806-9282.65.3.292>

LORENZI H, MATOS FJA. *Plantas Mediciniais no Brasil: nativas e exóticas*. Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda, 512p;2002.

LOUBET P, BURDET C, VINDRIOS W, GRALL N, WOLFF M, YAZDANPANAH Y, ... & LESCURE FX. Cefazolin versus anti-staphylococcal penicillins for treatment of methicillin- susceptible *Staphylococcus aureus* bacteraemia: a narrative review. *Clinical Microbiology and Infection*, 24(2):125-132;2018.

LUKAS B, SAMUEL R, MADER E, BASER KHC, NOVAK J. Complex evolutionary relationships in *Origanum* section Majorana (Lamiaceae). *Bot. J. Linn. Soc.*,171:667-686;2013.

MACHUCA M, BAENA MI, FAUS MJ. *Ind Dáder: Guía de Indicación Farmacéutica*. Universidade de Granada. Granada, 2005.

MAGNELLI PE, CIPOLLO JF, ROBBINS PW. Glucanase-driven fractionation allows redefinition of *Shizoccharomyces pombe* cell wall composition and structure:assignment of diglucan. *Analytical Biochemistry*, 336(2):202-212;2005.

MANOHAR V, INGRAM C, GRAY J, TALPUR NA, ECHARD BW, BAGCHI D, & PREUSS, H. G. et al. Antifungal activities of *Origanum* oil against *Candida albicans*. *Molecular and Cellular Biochemistry*,228(1-2,):111-7;2001.

MARIUTTI LRB, BRAGAGNOLO N. Review: Natural Antioxidants from the Lamiaceae Family - Application in Food Products. *Brazilian Journal of Food Technology*, 10: 96–103; 2007.

MARRELLI M, STATTI GA, CONFORTI F. *Origanum spp.*: an update of their chemical and biological profiles. *Phytochemistry reviews*, v. 17, n. 4, p. 873-888, 2018.

MARTINS N, BARROS L, SANTOS-BUELGA C, HENRIQUES M, SILVA S. & FERREIRA IC. Decocção, infusão e extrato hidroalcoólico de *Origanum vulgare* L.: Diferentes desempenhos quanto à bioatividade e compostos fenólicos. *Química alimentar*, 158 , 73-80, 2014.

MATOS FJA. *Introdução à fitoquímica experimental*. 3.ed. Fortaleza: Edições UFC, 2009. MBG. Missouri Botanical Garden. *Origanum vulgare* L. Disponível em <<http://www.missouribotanicalgarden.org/PlantFinder/PlantFinderDetails.aspx?taxonid=281411&isprofile=0&>>. Acesso em 10 mar 2019.

MENDLING W, BRASCH J, CORNELLY OA, EFFENDY I, FRIESE K, GINTER-HANSELMAYER G et al. Guideline: vulvovaginal candidosis (AWMF 015/072), S2k (excluding chronic mucocutaneous candidosis), 2015.

MENDOZA MS, VAZQUEZ-OLIVO G, HEREDIA JB. Flavonoids and phenolic acids from oregano: occurrence, biological activity and health benefits. *Plants*, 7(2);2017.

MENEZES E A, MARINHO JA, ANGELO MR, CUNHA MDAC, CUNHA FA, VASCONCELOS JÚNIOR AA. Isolation and antifungal susceptibility testing of *Trichosporon asahii* in Ceará, Brazil. *Rev Inst Med Trop.*, 54(1):1-3;2012.

MENICHETTI F. Anidulafungin, a new echinocandin: effectiveness and tolerability. *Drugs*, 69 Suppl. 1:95-7;2009.

MESQUITA LSSD, LUZ TRSA, MESQUITA JWCD, COUTINHO DF, AMARAL FMMD, RIBEIRO MNDS, & MALIK S. Exploring the anticancer properties of essential oils from family Lamiaceae. *Food Reviews International*, 35(2):105-131;2019.

MILLSOP JW, FAZEL N. Oral candidiasis. *Clinics in dermatology*, 34(4):487-494;2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC n.10, de 9 de março de 2010. Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e dá outras providências. Diário Oficial da União. Brasília (DF). Ministério da Saúde; 2010.

MIRON TL, PLAZA M, BAHRIM G, IBÁÑEZ E, & HERRERO M. Chemical composition of bioactive pressurized extracts of Romanian aromatic plants. *Journal of Chromatography A*, 1218:4918–4927;2011.

MOLINARO EM, CAPUTO LFG, AMENDOEIRA MRR. Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde, 4;2009.

MONTERO GD, MPEWO TJ, & VALLADARES MB. Inflammation Modulation With Methanol *Zea mays* Cob Husk On An Experimental Model In Albino Rats. *Revista Cubana de Investigaciones Biomedicas*, 38(1);2019.

MOYES DL, WILSON D, RICHARDSON JP, MOGAVERO S, TANG SX, WERNECKE J, HÖFS S, GRATACAP RL, ROBBINS J, RUNGLALL M, MURCIANO C, BLAGOJEVIC M, THAVARAJ S, FÖRSTER TM, HEBECKER B, KASPER L, VIZCAY G, IANCU SI, KICHIK N, HÄDER A, KURZAI O, LUO T, KRÜGER T, KNIEMEYER O, NAVES, P. L. F., SANTANA, D. P., RIBEIRO, E. L., & MENEZES, A. C. S. Novas abordagens sobre os fatores de virulência de *Candida albicans*. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, 12(2):229-233;2013.

NOBLE SM. *Candida albicans* specializations for iron homeostasis: from commensalism to

virulence. *Curr Opin Microbiol* 16:708–715;2013.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2013.09.006>.

OLIVEIRA JC. Tópicos em micologia médica. 4a ed. Rio de Janeiro: Jeferson Carvalhaes de Oliveira; 2014.

ORHAN DD, OZÇELIK B, OZGEN S, ERGUN F. Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of some flavonoids. *Microbiol Res.*,165(6):496-504;2010.

OSBOURN A, GOSS RJM, FIELD RA. The saponins-polar isoprenoids with important and diverse biological activities. *Nat Prod Rep.*, 28(7):1261-8;2011.

OSTROSKY EA, MIZUMOTO MK, LIMA ME, KANEKO TM, NISHIKAWA SO, & FREITAS BR. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Revista brasileira de Farmacognosia*, 18(2):301-307;2008.

ÖZER Z, GÖREN AC, KILIÇ T, ÖNCÜ M, ÇARIKÇI S, & DIRMENCI T. O conteúdo fenólico, atividade antioxidante e anticolinesterásica da seção *Amaracus* (Gled.) Vogel e *Anatolicon* Ietsw. de espécies de *Origanum* L.. *Arabian Journal of Chemistry* , 13 (4), 5027-5039, 2020.

PANDEY A, TRIPATHI S. Concept of stadardization, extraction and pre phytochemical screening strategies for herbal drug. *Journal of pharmacy phytochemistry*. v. 2, n. 5, p. 115-9, 2014.

PAPPAS PG, KAUFFMAN CA, ANDES D, BENJAMIN DK JR, CALANDRA TF, EDWARDS JE JR et al. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 48(5):503–535;2009.

PAPPAS PG, KAUFFMAN CA, ANDES DR, CLANCY CJ, MARR KA, OSTROSKY-ZEICHNER L, ... & ZAOUTIS TE. 2016 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, 62(4):e1-e50;2015.

PATIL S, RAO RS, MAJUMDAR B, ANIL S. Clinical appearance of oral *Candida* infection and therapeutic strategies. *Front Microbiol*. 6: 1391;2015. doi: 0.3389/fmicb.2015.01391. PMC 4681845. PMID 26733948

PATRIDGE E, GAREISS P, KINCH MS, & HOYER D. An analysis of FDA-approved drugs: natural products and their derivatives. *Drug discovery today*, 21(2):204-207;2016.

PATTERSON TF, THOMPSON GR, DENNING DW, FISHMAN JA, HADLEY S, HERBRECHT R. Practice guidelines for the diagnosis and management of aspergillosis: 2016 update by the infectious diseases society of America. *Clin Infect Dis*, 63(4): e1–e60;2016.

PEIXOTO JV, ROCHA MG, NASCIMENTO RTL, MOREIRA VV, & KASHIWABARA T GB. Candidíase: uma revisão de literatura. *Brazilian Journal of Surgery and Clinical*

Research, 8(2):75-82;2014.

PEZZANI R, VITALINI S, IRITI M. Bioactivities of *Origanum vulgare* L.: An update. *Phytochem. Rev.*, 16:1253–1268;2017.

PFALLER MA, MESSER SA, WOOSLEY LN, JONES RN, CASTANHEIRA M. Echinocandin and triazole antifungal susceptibility profiles for clinical opportunistic yeast and mold isolates collected from 2010 to 2011: application of new CLSI clinical breakpoints and epidemiological cut off values for characterization of geographic and temporal trends of antifungal resistance, *Journal of clinical microbiology*, 51(8), 2571-2581;2013.

PFALLER MA, RHOMBERG PR, MESSER SA, JONES RN & CASTANHEIRA M. Isavuconazole, micafungin, and 8 comparator antifungal agents' susceptibility profiles for common and uncommon opportunistic fungi collected in 2013: temporal analysis of antifungal drug resistance using CLSI species-specific clinical breakpoints and proposed epidemiological cutoff values. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 82(4):303-313;2015.

PFALLER MA, DIEKEMA DJ, GIBBS DL. Global Antifungal Surveillance Group. *Candida krusei*, a multidrug-resistant opportunistic fungal pathogen: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005. *J Clin Microbiol.*, 46(2):515–521;2008.

PIGNATTI S. *Flora d'Italia*. Ed. Edagricole, Bologna, Italy, 1982.

QUIDEAU S, DEFFIEUX D, DOUAT-CASASSUS C, POUYSÉGU L. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angew Chem Int Ed.*, 50(3):586-621;2011.

RAT MM, GAVARIC NS, KLADAR NV, ANDRIC AM, ANACKOV GT, & BOZIN BN. The phenolics of the *Ornithogalum umbellatum* L. (Hyacinthaceae): phytochemical and ecological characterization. *Chem Biodivers* 13:1551–1558, 2016.

RHEN TE, CIDLOWSKI JA. Ação antiinflamatória dos glicocorticoides - Novos mecanismos para drogas antigas . *The New England Journal of Medicine*, 353 (16), 1711 – 1723;2005.

RIBEIRO, A. D. Ocorrência de infecção nosocomial por *Candida* spp. no Hospital Universitário Cassiano Antonio de Moraes (hucam) e avaliação das drogas anfotericina be voriconazol na inibição de formação de biofilme pelas espécies isoladas. Disponível em <<http://repositorio.ufes.br/handle/10/5887>>

ROBBINS N, WRIGHT GD, COWEN LE. Drogas antifúngicas: O atual arsenal e desenvolvimento de novos agentes. *Espectro de Microbiol*, 4(5);2005. pmid: 27763259

ROBBINS N, CAPLAN T, COWEN LE. Evolução Molecular da Resistência aos Antifúngicos. *Annu Rev Microbiol*, 71:753 – 775;2017.

ROSA R, BARCELOS ALV, & BAMPI G. Investigação do uso de plantas medicinais no tratamento de indivíduos com diabetes melito na cidade de Herval D' Oeste - SC. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai.*, Botucatu, 14(2):306-310;2012.

RUFINO MDSM, ALVES RE, DE BRITO ES, DE MORAIS SM, SAMPAIO CDG, PÉREZ-JIMÉNEZ J, & SAURA-CALIXTO FD. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP). *Embrapa Agroindústria Tropical-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)*, 2006.

RUHNKE M. Clinical Syndromes: Candida and Candidosis. In: *Clinically Relevant Mycoses*. Springer, Cham, 45-75;2019.

SANGLARD D. Emerging threats in antifungal-resistant fungal pathogens. *Front Med*. 3: 1-10;2016.

SANGUINETTI M, POSTERARO B, LASS-FLÖRL C. Antifungal drug resistance among Candida species: mechanisms and clinical impact. *Mycoses*, 58:2-13;2015.

SANTIAGO MAMC. Estatinas: efeitos tóxicos e novas aplicações [tese][Internet]. *Porto: Universidade Fernando Pessoa*, 2011.

SBI – Sociedade Brasileira de Infectologia. Candidíase vulvovaginal. Disponível em: <<https://www.infectologia.org.br/pg/994/candidiase-vulvovaginal>>. Acesso em 07 mar 2019.

SCHER RK, RICH P, PARISER D, & ELEWSKI B. The epidemiology, etiology, and pathophysiology of onychomycosis. *Semin Cutan Med Surg.*, 32(2): 2-4;2013.

SHEA JM, DEL POETA M. Lipid signaling in pathogenic fungi. *Current opinion in microbiology*, 9(4):352-358;2006.

SHEPPARD DC, FILLER SG. Host cell invasion by medically important fungi. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 3;5(1):a019687;2014. doi:10.1101/cshperspect.

SHIELDS RK, NGUYEN MH, PRESS EG, CLANCY CJ. Abdominal candidiasis is a hidden reservoir of echinocandin resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 58: 7601–15;2014.

SHOR E, PERLIN DS. Coping with stress and the emergence of multidrug resistance in fungi. *PLoS Pathog*, 11(3):e1004668;2015.

SIMÕES CMO, SCHENKEL EP, DE MELLO JCP, MENTZ LA, & PETROVICK PR. *Farmacognosia: do produto natural ao medicamento*. Artmed Editora, 2017.

SINGH A, VERMA R, MURARI A, AGRAWAL A. Oral candidiasis: an overview. *J. Oral Maxillofac. Pathol*. 18 (Suppl. 1): 81–85;2014.

SINGLETARY K. Oregano: overview of the literature on health benefits. *Nutrition Today*, 45(3):129-138;2010.

SKOULA M, GRAYER RJ, KITE GC, & VEITCH N C. Exudate flavones and

flavanones in *Origanum* species and their interspecific variation. *Biochemical Systematics and Ecology*, 36: 646–654;2008.

SOBEL JD. Candidíase vulvovaginal recorrente. *Am J Obstet Gynecol* 214 : 15 – 21;2006.

SOUZA CRF. Produção de extratos secos padronizados de plantas medicinais brasileiras: estudo da viabilidade técnica e econômica do processo em leito de jorro. 2007. 219p. Tese. PPG-FCFRP/USP, Ribeirão Preto, SP, 2007.

SPIRIDON I, BODIRLAU R, & TEACA CA. Total phenolic content and antioxidant activity of plants used in traditional Romanian herbal medicine. *Central European Journal of Biology*, 6:388–396;2011.

STEIMBACH LM, TONIN FS, VIRTUOSO S, BORBA HH, SANCHES AC, WIENS A, ... & PONTAROLO R. Efficacy and safety of amphotericin B lipid-based formulations—A systematic review and meta-analysis. *Mycoses*, 60(3):146-154;2017.

SUBISSI A, MONTI D, TOGNI G, MAILLAND F. Ciclopirox: Recent nonclinical and clinical data relevant to its use as a topical antimycotic agent. *Drugs*, 70:2133-52;2010.

SUCHER AJ, CHAHINE EB, BALCER HE. Echinocandins: the newest class of antifungals. *Ann Pharmacother*. 43:1647-57;2009.

TAY ST, LOTFALIKHANI A, SABET NS, PONNAMPALAVANAR S, SULAIMAN S, NA SL, NG KP. Occurrence and characterization of *Candida nivariensis* from a culture collection of *Candida glabrata* clinical isolates in Malaysia. *Mycopathologia*, 178:307-314;2015.

TEIXEIRA B, MARQUES A, RAMOS C, SERRANO C, MATOS O, NENG NR, ... & NUNES ML. Chemical composition and bioactivity of different oregano (*Origanum vulgare*) extracts and essential oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(11)2707-2714;2013.

THE PLANT LIST (2013). Version 1.1. Published on the Internet; <http://www.theplantlist.org/> (acessado 10 Abr 2019).

THOMFORD NE, SENTHEBANE DA, ROWE A, MUNRO D, SEELE P, MAROYI A. Natural Products for Drug Discovery in the 21st Century: Innovations for Novel Drug Discovery. *Int J Mol Sci*, 19(6):1578;2018.

TOPCU G, KUSMAN T. Lamiaceae Family Plants as a Potential Anticholinesterase Source in the Treatment of Alzheimer's Disease. *Bezmialem Sci.*, 1, 1–25;2014.

TRABULSI LR & ALTERTHUM F. MICROBIOLOGIA - 6ª Edição, São Paulo, SP, Ed.Atheneu, 2015.

TRINDADE EL, GARCIA F, FERREIRA R, PASA MC. Lamiaceae- levantamento de dados das plantas medicinais recorrentes no estado de Mato Grosso presentes no herbário UFMT

campus de Cuiabá-MT. Biodiversidade – 15(2):183-190;2016.

VARJANI S, UPASANI V. Critical review on biosurfactant analysis, purification and characterization using rhamnolipid as a model biosurfactant. *Bioresource Technology*, Essex, 232:389-397;2017.

VIKRANT P, PRIYA J, NIRICHAN KB. Plants with anti-*Candida* activity and their mechanism of action: a review. *Journal of Environmental Research and Development*, 9(4):1189;2015.

WELLINGTON M, KOSELYN K, SUTTERWALA FS, KRYSAN DJ. *Candida albicans* Triggers LRP3-Mediated Pyroptosis in Macrophages. *Eukaryot Cell*, 13: 329–340;2014.

WHO. Global antimicrobial resistance surveillance system (GLASS) report: early implementation 2017-2018. Geneva: World Health Organization; 2018.

WORKOWSKI KA, BERMAN SM. Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2006. *MMWR Recomm Rep*. 55(RR-11):1-94;2006.

ZANARDI D, NUNES DH, PACHECO AS, TUBONE MQ, SOUZA FILHO JJ. Avaliação dos métodos diagnósticos para onicomicose. *An Bras Dermatol.*, 83(2):119-24;2008.

ZHANG XL, GUO YS, WANG CH, LI GQ, XU JJ, CHUNG HY, YE WC, LI YL, WANG GC. Phenolic compounds from *Origanum vulgare* and their antioxidant and antiviral activities. *Food Chem.*,152:300–306;2014.