



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO



FERNANDA DE MEDEIROS NÓBREGA

**Investigação da atividade antifúngica do alfa-pineno sobre  
cepas de *Rhizopus oryzae***

JOÃO PESSOA

2013

**FERNANDA DE MEDEIROS NÓBREGA**

**Investigação da atividade antifúngica do alfa-pineno sobre cepas de  
*Rhizopus oryzae***

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado publicamente à banca avaliadora, em cumprimento aos requisitos necessários para a obtenção do título de Bacharel em Farmácia, pelo Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, sob a orientação da Profa. Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima.

**Orientadora: Profa. Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima**

**JOÃO PESSOA**

**2013**

N754i Nóbrega, Fernanda de Medeiros.

Investigação da atividade antifúngica do alfa-pineno sobre cepas de *Rhizopus oryzae* / Fernanda de Medeiros Nobrega. -- João Pessoa: [s.n.], 2013.

65f.: il. -

Orientadora: Edeltrudes de Oliveira Lima.

Monografia (Graduação) – UFPB/CCS.

1. Mucormicose.      2. *Rhizopus* spp.      3. Efeito antifúngico.

BS/CCS/UFPB

CDU:547.9 (043.2)

FERNANDA DE MEDEIROS NÓBREGA

**Investigação da atividade antifúngica do alfa-pineno sobre  
cepas de *Rhizopus oryzae***

João Pessoa-PB, 08 de abril de 2013.

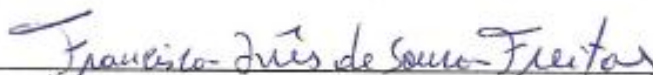
Resultado: APROVADO - A

BANCA EXAMINADORA



---

Profa. Dra. Edetrudes de Oliveira Lima  
Universidade Federal da Paraíba



---

Profa. Dra. Francisca Inês de Sousa Freitas  
Universidade Federal da Paraíba



---

Prof. Dr. Adalberto Coelho da Costa  
Universidade Federal da Paraíba

*“Apesar dos nossos defeitos, precisamos enxergar que somos pérolas únicas no teatro da vida e entender que não existem pessoas de sucesso e pessoas fracassadas. O que existem são pessoas que lutam pelos seus sonhos ou desistem deles.”*

Augusto Cury

## DEDICATÓRIA

As três joias da minha vida,  
pelo incentivo, cooperação  
e apoio dedicado a mim.

## AGRADECIMENTOS

❖ Esta parte da monografia, talvez seja a mais difícil de ser finalizada, pois muitas vezes não mencionamos nomes de pessoas que também contribuíram com este trabalho. Então, desde já, me desculpo se algum nome não for mencionado, não se sintam excluídos, vocês estão na minha história.

❖ Primeiramente, agradeço a Deus, que sempre me guiou e confortou...

❖ Aos meus pais, em especial a minha mãe, Elizabeth, agradeço pela educação, pelos bons exemplos de dignidade e perseverança, pelo incentivo, pelos sacrifícios, pelo apoio incondicional e pela confiança sempre a mim depositada.

❖ As minhas irmãs que sempre me apoiaram, me fizeram sorrir e me levantaram quando quis desistir...

❖ Ao namorado, Thiago Luiz, pelo amor, carinho, compreensão e paciência que sempre me depositou.

❖ À minha orientadora, Profa. Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima, pelas orientações, pelas críticas e sugestões feitas durante o trabalho e seu profissionalismo.

❖ Às Profa. Dra. Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz e a Profa. Dra. Maria de Fátima Vanderlei de Souza, muito obrigada pela oportunidade de conhecer o meio científico e poder contribuir com ele.

❖ À Dra. Igara Oliveira Lima, na qual tive a oportunidade de vivenciar por toda minha iniciação científica, sempre revelando caminhos e soluções, com extrema paciência me mostrou a simplicidade com que tudo pode ser realizado. Muito obrigada pelo tempo dispensado comigo!

❖ À Dra. Kelly Samara de Lira Mota, pela ajuda na parte experimental deste trabalho, sempre paciente, me ajudando em tudo o que foi possível. Obrigada!

❖ Aos professores de toda a graduação, obrigado pelo ensino, dedicação e atenção. Os ensinamentos adquiridos foram como peças fundamentais no quebra-cabeça da vida! O meu muito obrigada por tudo.

❖ Aos amigos da turma, que cresceram comigo nesta reta final, obrigada pelas lembranças boas que carrego, e pelas amizades que persistem. Juntos, lutamos e conseguimos!

❖ A Tia Jú, que sempre foi tão dedicada, sempre me ajudando a pegar livros em outra instituição de ensino superior, pagando minhas dívidas pelos atrasos, e sempre com um sorriso, dizendo que vale a pena. Obrigada titia!

❖ A todas as pessoas que passaram pela minha vida nesta jornada e que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

❖ Obrigada a todos pelo carinho, incentivo e confiança!

## RESUMO

A mucormicose é uma infecção fúngica oportunista, com maior incidência em pacientes imunocomprometidos como pacientes com cânceres, aqueles sob tratamento com quimioterápicos e drogas citotóxicas, corticoterapia e outras. Esta infecção é provocada principalmente por fungos de gênero *Rhizopus* spp., *Mucor* spp. e *Absidia* spp., porém o gênero *Rhizopus* spp. está envolvido em 70% dos casos diagnosticados. A mucormicose pode apresentar-se na forma disseminada, cutânea, pulmonar, gastrointestinal e rino-órbito-cerebral, esta última considerada a forma mais comum da patologia. Muitos pacientes que desenvolvem estas infecções fúngicas extremamente agressivas possuem altas taxas de mortalidade. Dessa forma, há uma necessidade de buscar possibilidades terapêuticas destinadas a introdução de novos fármacos, naturais ou sintéticos, para o tratamento da mucormicose. Assim sendo, foi objetivo deste trabalho investigar a atividade antifúngica do promissor fitoconstituente, o  $\alpha$ -pineno. Para isto, determinou-se a concentração inibitória mínima (CIM), na qual se utilizou cepas de *Rhizopus oryzae*, pertencentes ao Laboratório de Micologia, Universidade Federal da Paraíba (UFPB). A determinação da CIM foi realizada através do método de microdiluição nas concentrações de 1024 a 0,5 $\mu$ L/mL. Este resultado indica que o alfa-pineno não produziu efeito antifúngico significativo sobre as cepas de *R. oryzae*, pois, o valor da CIM foi superior a 1024 $\mu$ g/mL. Diante do exposto, propõe-se que estudos mais detalhados sejam realizados utilizando o  $\alpha$ -pineno com seus enantiômeros separadamente com o intuito de comprovar a atividade antifúngica deste monoterpeno.

Palavras-chave: Mucormicose, *Rhizopus* spp., Produtos naturais, Efeito antifúngico,  $\alpha$ -pineno.

## ABSTRACT

Mucormycosis is an opportunistic fungal infection, with higher incidence in immunocompromised patients such as patients with cancer, those undergoing treatment with chemotherapy and cytotoxic drugs, steroids and other. This infection is caused mainly by fungi of genus *Rhizopus* spp. *Mucor* spp. and *Absidia* spp., but the genus *Rhizopus* spp. is involved in 70% of cases diagnosed. Mucormycosis may present as disseminated, cutaneous, pulmonary, gastrointestinal and rhino-orbito-cerebral, the last one is the most common form of the disease. Moreover, since many patients who develop these aggressive fungal infections shows high mortality, there is a necessity for new therapeutic strategies aimed at introducing into new drugs, natural or synthetic, for the treatment of mucormycosis. Therefore, aim of this study was to investigate the antifungal activity of promising fitoconstituente, the  $\alpha$ -pinene. For this, we determined the minimum inhibitory concentration (MIC), which was used strains of *Rhizopus oryzae*, belong to the Mycology Laboratory, Federal University of Paraíba (UFPB). The MIC was determined by the microdilution method at concentrations from 1024 to 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . The result indicates that alpha-pinene did not show significant inhibition of growth against strains of *R. oryzae*, because the MIC value was higher than the 1024 $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Based on the above considerations, it is proposed that more detailed studies are performed using the  $\alpha$ -pinene with their enantiomers separately in order to prove the antifungal activity of this monoterpene.

Palavras-chave: Mucormycosis, *Rhizopus* spp., natural products Antifungal effect,  $\alpha$ -pinene.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquema demonstrando dos tipos de hifas .....	16
Figura 2 - Esquema do ciclo de reprodução dos fungos da classe Zigomicetos..	17
Figura 3 - Micromorfologia do fungo do gênero <i>Absidia</i> . e <i>Apophysomyces</i> .....	19
Figura 4 - Micromorfologia do fungo do gênero <i>Mucor</i> . e <i>Rhizomucor</i> .....	19
Figura 5 - Macromorfologia do fungo do gênero <i>Rhizopus</i> .....	19
Figura 6 - Micromorfologia do fungo do gênero <i>Rhizopus</i> .....	20
Figura 7 - Mecanismo normal de defesa .....	21
Figura 8 - Morfologia celular de <i>Rhizopus</i> durante o crescimento <i>in vivo</i> .....	28
Figura 9 - Paciente com proptose .....	30
Figura 10: Tomografia computadorizada com contraste .....	30
Figura 11 - Radiografia do tórax.....	31
Figura 12 - Biópsia com coloração na técnica de Grocott.....	32
Figura 13 - Mucormicose cutânea .....	33
Figura 14 – Exame direto de biópsia de palato, clarificado com KOH 20% .....	35
Figura 15 – Esquema da micromorfologia do gênero <i>Rhizopus</i> .....	36
Figura 16 – Abordagem combinada no tratamento da mucormicose .....	39
Figura 17 – Estrutura da Anfotericina B .....	40
Figura 18 – Mecanismo de ação da Anfotericina B.....	40
Figura 19 – Estrutura do Posaconazol .....	41
Figura 20 – Mecanismo de ação do posaconazol .....	42
Figura 21 – Estrutura da Micafungina .....	42
Figura 22 – Mecanismo de ação da Micafungina .....	43
Figura 23 – Compostos terpenóides .....	45
Figura 24 – Molécula do $\alpha$ -pineno .....	45
Figura 25 – Esquema representativo da microdiluição.....	51
Figura 26 – Fórmula estrutural dos enantiômeros do $\alpha$ -pineno e $\beta$ -pineno .....	54

## LISTA DE TABELAS

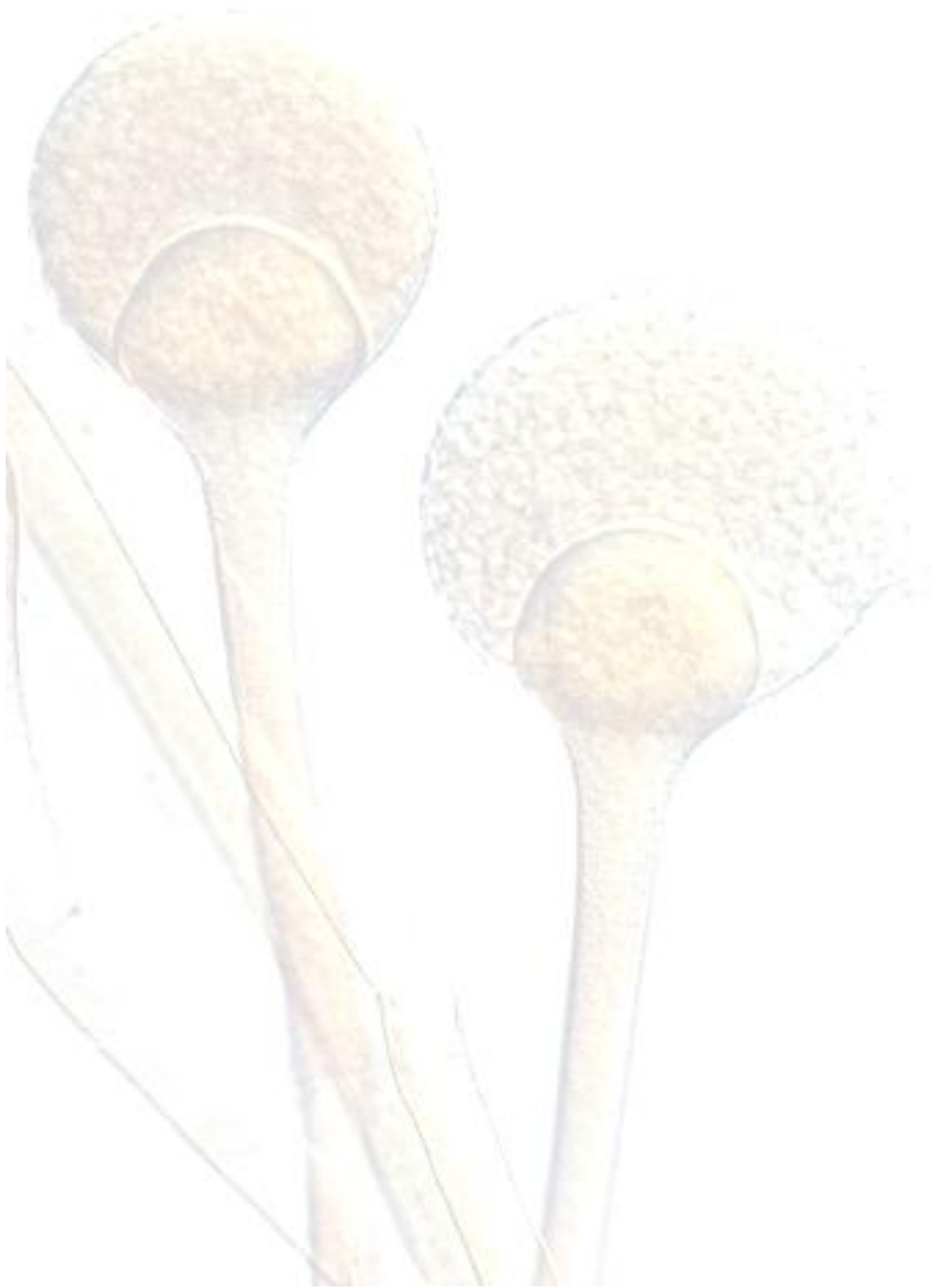
Tabela 1 - Os fungos da Classe Zigomicetos, ordem Mucorales da família <i>Mucoraceae</i> .....	18
Tabela 2 - Fatores de risco para as mucormicoses.....	24
Tabela 3 - Descrição dos fatores de virulências dos fungos da Ordem <i>Mucorales</i> da família <i>Mucoraceae</i> .....	24
Tabela 4 - Apresentação clínica e fatores predisponentes.....	26
Tabela 05: Características diferenciadoras das espécies de <i>Rhizopus</i> que causam doença em seres humanos .....	37
Tabela 6 - Resultado da CIM (Concentração inibitória mínima) (n=2) em µg/mL do α-pineno e da Anfotericina B frente as cepas de <i>Rhizopus oryzae</i> .....	53

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Fatores predisponentes de maior incidência .....	22
Gráfico 2 – Apresentações clínicas da mucormicose.....	23

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
2.1	Casse Zygomycetes .....	16
2.1.1	Patogênese .....	20
2.1.2	Mucormicose.....	22
2.1.2.1	Manifestações clínicas .....	26
2.1.2.1.1	Rino-orbito-cerebral.....	28
2.1.2.1.2	Pulmonar .....	31
2.1.2.1.3	Cutânea.....	32
2.1.2.1.4	Disseminada.....	33
2.1.2.1.5	Gastrointestinal.....	34
2.1.3	Diagnóstico .....	34
2.1.4	Tratamento.....	38
2.2	Produtos naturais.....	44
3	METODOLOGIAS	
3.1	Avaliação da atividade antifúngica.....	49
3.1.1	Local da Pesquisa.....	49
3.1.2	Produto sintético .....	49
3.1.3	Espécies Fúngicas .....	49
3.1.4	Meio de Cultura .....	49
3.1.5	Antifúngico-padrão .....	49
3.1.6	Inóculo.....	49
3.1.7	Determinação da Concentração Inibitória Mínima.....	50
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	53
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	56
	REFERÊNCIAS.....	57



# *Introdução*

## 1. INTRODUÇÃO

A incidência de infecções fúngicas oportunistas teve um aumento significativo nas décadas recentes. Isto se deve ao crescimento da população de pacientes imunocomprometidos como pacientes com o vírus HIV, com cânceres, aqueles sob tratamento com quimioterápicos e drogas citotóxicas (GARBER et al., 2001; NUCCI et al., 2010). E apesar da melhoria nos métodos de diagnóstico e a introdução de novos antifúngicos na última década, continuam a aumentar as infecções fúngicas invasivas (PEMÁN; SALAVERT; 2012).

Além disso, a indiscriminada utilização de antibióticos tem contribuído fortemente para o surgimento de doenças infecciosas, que estão cada vez mais difícil de controlar (LIMA et al., 2005), isso se deve ao fato, que os antibióticos criam um meio propício, ao inibirem o crescimento da microbiota normal bacteriana, facilitando a proliferação e desenvolvimento de quadros infecciosos fúngicos (CORDEIRO; BRILHANTE; SIDRIM, 1999).

Recentemente, novas descobertas tecnológicas e os avanços da medicina, proporcionaram uma maior sobrevivência de pacientes, em contrapartida, muitos destes tornaram-se altamente suscetíveis a infecções causadas por organismos que eram considerados de baixa virulência ou até mesmo não patogênicos (GARBER et al., 2001).

Os fungos são responsáveis por aproximadamente 8% das infecções hospitalares segundo Marciel e Cândido (2010), constituindo assim um problema de saúde pública, visto que nos últimos anos, estas infecções tiveram aumento progressivo e elevadas taxas de morbidade e mortalidade (PFALLER, 1996; COLOMBO, 2000).

As infecções fúngicas oportunistas mais frequentes são a aspergilose, a candidíase sistêmica e a mucormicose, esta terceira representa uma taxa de 8,3 a 13% de todas as infecções fúngicas encontradas nas autópsias em pacientes hematológicos (PRABHU; PATEL, 2004). Mucormicose é provocada por fungos de gênero *Rhizopus*, *Mucor* e *Absidia* (ESTEVES; CABRITA; NOBRE, 1990), porém o gênero *Rhizopus* esta envolvido em 70% dos casos diagnosticados (HABER et al., 2008).

A mucormicose, na maioria dos casos tem evolução fatal, causada principalmente pelo gênero *Rhizopus*, é uma infecção fúngica invasiva aguda que

pode apresentar-se na forma disseminada, cutânea, pulmonar, gastrointestinal e rino-órbito-cerebral, esta última considerada a forma mais comum da patologia (PRABHU; PATEL, 2004).

Neste aspecto, tem sido descrito na literatura, estudos que utilizam produtos naturais na perspectiva de investigar novos agentes com ação antifúngica, uma vez que, as plantas são utilizadas desde os primórdios da civilização no tratamento e cura de enfermidades sendo extensivamente empregadas na medicina popular por representarem uma alternativa econômica, de fácil obtenção e aplicabilidade para diversas patologias, além de ter aceitação no senso comum da comunidade. Assim, as plantas têm contribuído com a indústria farmacêutica, no que se refere ao isolamento de substâncias bioativas, cuja complexidade de muitas estruturas químicas inviabilizaria técnica e economicamente a síntese orgânica de tais substâncias (MACIEL et al, 2002).

O Brasil possui a maior diversidade genética vegetal do mundo, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas de um total estimado entre 350.000 a 550.000. Em contrapartida, apenas 8% das espécies vegetais da flora brasileira foram estudadas em busca de compostos bioativos e 1.100 espécies vegetais foram avaliadas em suas propriedades medicinais (HEINZMANN; BARROS, 2007).

As pesquisas de novos agentes antimicrobianos obtidos a partir de óleos essenciais extraídos de plantas se intensificaram devido ao arsenal relativamente pequeno de drogas disponíveis para o tratamento das micoses e principalmente para atender a problemática envolvendo cepas resistentes e a toxicidade dos medicamentos existentes (BARRETT, 2002).

Tendo em vista o potencial terapêutico apresentado pelos óleos essenciais e de seus fitoconstituintes foi objetivo deste estudo investigar a atividade antifúngica do  $\alpha$ -pineno sobre cepas de fungos do gênero *Rhizopus*, que tem se mostrado como um problema de saúde pública.



*Fundamentação Teórica*

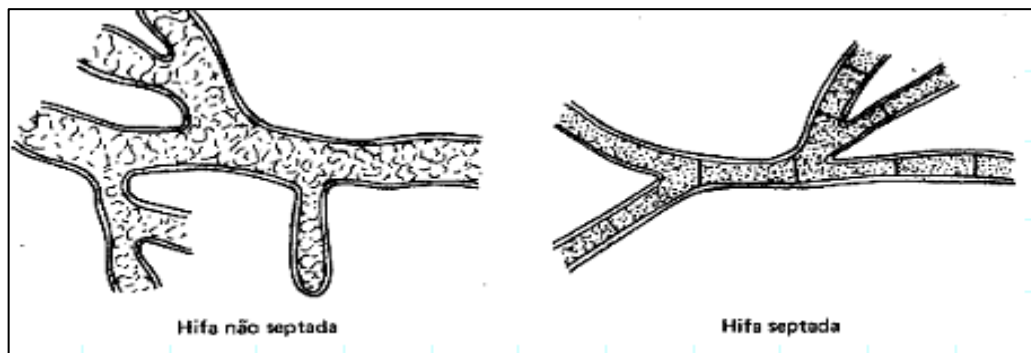
## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 Casse Zygomycetes

Zygomycetes do filo Zygomycota, considerado como grupo de fungos verdadeiros do reino Fungi, possui duas ordens de importância médica: *Mucorales* e *Entomophthorales*. A maioria dos casos descritos está ligada aos representantes da ordem *Mucorales* (CORDEIRO; BRILHANTE; SIDRIM, 1999; PRABHU; PATEL, 2004; SPELLBERG; EDWARDS; IBRAHIM, 2005).

Os fungos desta ordem apresentam hifas cenocíticas (não septada) hialinas e largas que variam de 4 a 20 $\mu$ m (Figura 01), tem crescimento extensivo, multinucleado e apresentam rizóides. O septo só é produzido quando as colônias envelhecem e apenas na delimitação dos órgãos de reprodução e dispersão (CORDEIRO; BRILHANTE; SIDRIM, 1999; LEITE, 2009).

Figura 1 - Esquema demonstrando os tipos de hifas.



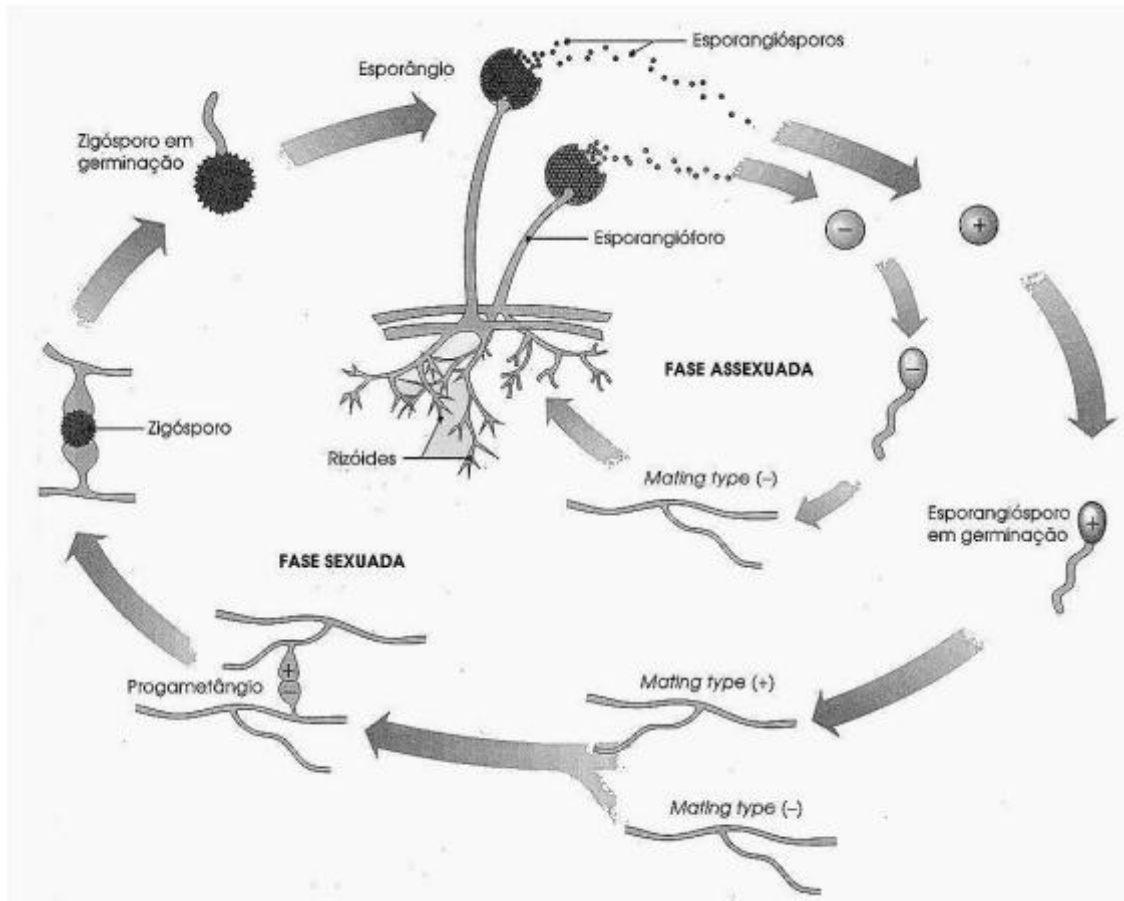
Fonte: GOMPERTZ, O. F. et al., 2009.

Nesta ordem, a reprodução assexuada ocorre pela liberação de esporangiósporos (esporos) que são produzidos em estruturas saculiformes denominadas esporângios (Figura 02). Diferentemente do processo de formação dos conídios, os esporangiósporos são resultados das clivagens do protoplasma contido nos esporângios (GOMPERTZ et al., 2009).

A reprodução sexuada dos zigomicetos é caracterizada pela formação zigósporos, após a atração de hifas sexuais (zigóforos) e consequente contato das estruturas compatíveis, ocorre a formação do progametângio em cada zigóforo, logo, estes se unem e formam o gametângio verdadeiro. Este último forma o

zigosporângio que abriga o zigósporos. Os esporos podem ser formados em um mesmo indivíduo (homotática) ou através da atração entre diferentes indivíduos (+ e -) para que haja a formação do zigósporos (heterotática) (CORDEIRO; BRILHANTE; SIDRIM, 1999; LEITE, 2009).

Figura 2 - Esquema do ciclo de reprodução dos fungos da classe Zigomicetos.



Fonte: BOSSOLAN, 2002.

Os fungos pertencentes à ordem *Mucorales* são saprófitos do solo e desenvolvem-se em matéria orgânica em decomposição, assim como em frutas, pães, matéria vegetal, solo e excreções de animais (GONZALEZ; RINALDI; SUGAR, 2002. KONTOYIANNIS; LEWIS, 2006). O homem, em condições especiais infecta-se através das vias aéreas por inalação dos esporangiósporos, não há relatos de transmissão pessoa-pessoa (ESTEVES; CABRITA; NOBRE, 1990; HABER et al., 2008). Embora a inalação seja a porta de entrada mais comum, as infecções cutâneas são particularmente importante em pacientes com traumas, queimaduras, cirurgia anterior ou neonatos com cuidados intensivos (WALSH et al., 2004).

A ordem Mucorales está dividida em seis famílias distintas (*Mucoraceae*, *Cunninghamellaceae*, *Mortierellaceae*, *Saksenacese*, *Syncephalastraceae* e *Thamnidaceae*), com representante de importância média e veterinária. A maioria das zigomicoses é causada pela Família *Mucoraceae* (tabela 1), representada pelos gêneros *Absidia* (Figura 3), *Apophysomyces* (Figura 3), *Mucor* (Figura 4), *Rhizomucor* (Figura 4) e *Rhizopus* (Figura 5).

Tabela 1 - Os fungos da Classe Zigomicetos, ordem Mucorales da família *Mucoraceae*.

---

Classe Zigomicoses

Ordem: *Mucorales*

Família: *Mucoraceae*

Gênero:

***Mucor***

*M. racemosus*,  
*M. circinelloides*  
*M. ramosissimus*  
*M. indicus*  
*M. hiemalis*

***Rhizopus***

*R. arrhizus* (*R. oryzae*)  
*R. rhizopodiformis*  
*R. azygosporus*  
*R. stolonifer*  
*R. schipperae*  
*R. microsporus* var. *microsporus*  
var. *rhizopodiformis*  
var. *oligosporus*

***Rhizomucor***

*R. pusillus*

***Absidia***

*A. corymbifera*

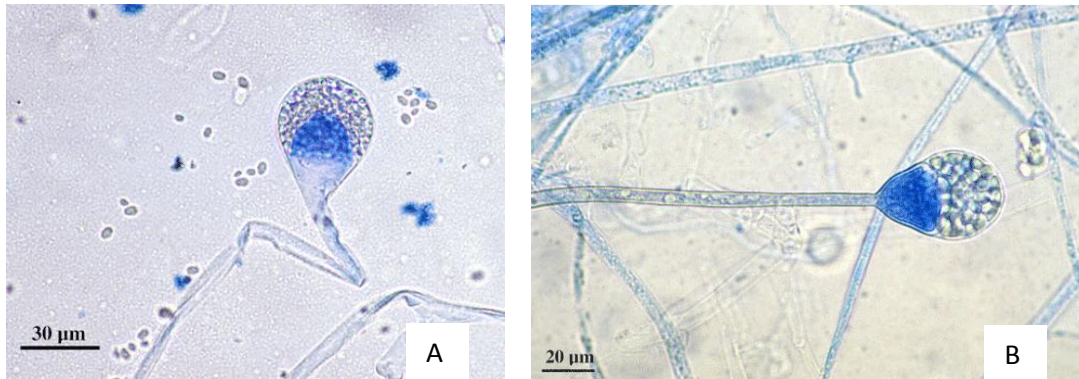
***Apophysomyces***

*A. elegans*

---

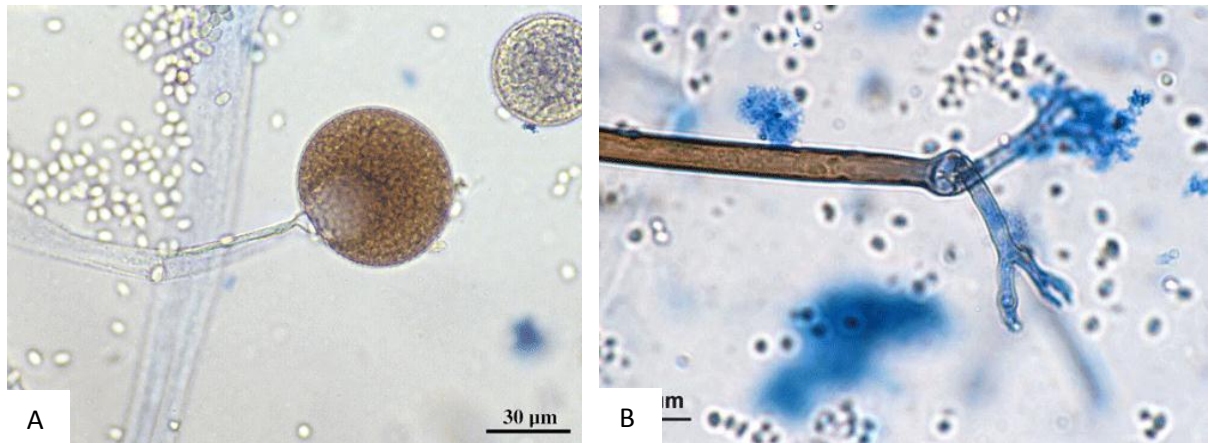
Fonte: Adaptação de PRABHU; PATEL, 2004.

Figura 3 - Micromorfologia do fungo do gênero *Absidia* e do *Apophysomyces*.



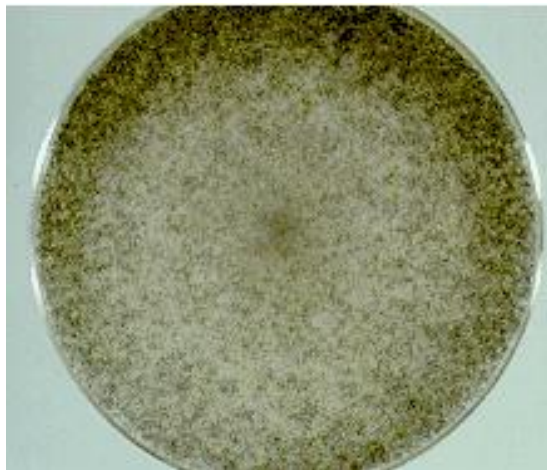
Legenda: A) *Absidia* spp e B) *Apophysomyces* spp. Fonte: Mycology Online da Universidade de Adelaide na Austrália, acessado em: 17/07/2012.

Figura 4 - Micromorfologia do fungo do gênero *Mucor* e *Rhizomucor*.



Legenda: A) *Mucor* spp.B) *Rhizomucor* spp. Fonte: Mycology Online da Universidade de Adelaide na Austrália, acessado em: 17/07/2012.

Figura 5 – Macromorfologia do fungo do gênero *Rhizopus*.



Fonte: Mycology Online da Universidade de Adelaide na Austrália, acessado em: 17/07/2012.

Figura 6 – Micromorfologia do fungo do gênero *Rhizopus*.



Fonte: Mycology Online da Universidade de Adelaide na Austrália, acessado em: 17/07/2012.

Os fungos da classe dos Zigomicetos e da ordem dos *Mucorales* e Família *Mucoraceae* estão entre os principais causadores da mucormicose. Na literatura é mais comum a associação da mucormicose com os fungos do gênero *Rhizopus*, *Mucor* e *Absidia* (ESTEVES; CABRITA; NOBRE, 1990), porém o gênero *Rhizopus* (Figura 06) está envolvido em 70% dos casos diagnosticados, por isto, iremos focá-lo neste trabalho (RIBES; VANOVER-SAMS; BAKER, 2000; GREENBERG et al., 2004; SPELLBERG; EDWARDS JR; IBRAHIM, 2005; RODEN; ZAOUTIS; BUCHANAN, 2005; HABER et al., 2008; HIBBET et al., 2007; HENRY, 2008).

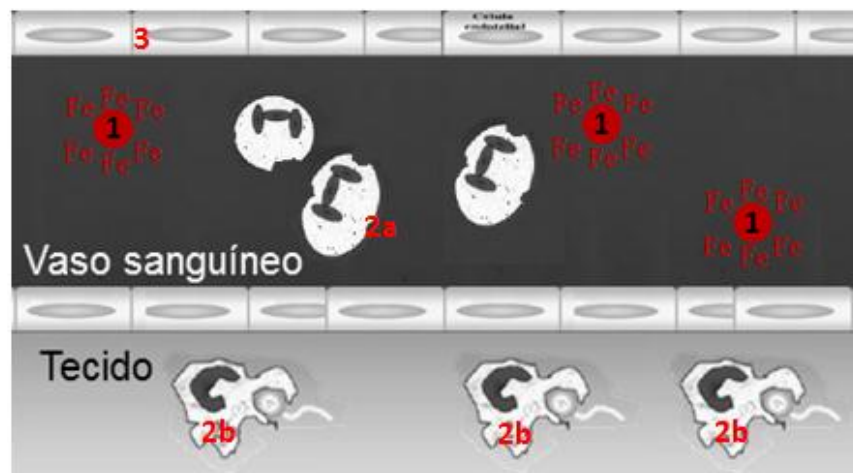
### 2.1.1 Patogênese

Na patogênese da zigomicose, mais especificamente as mucormicoses, tanto os macrófagos quanto os polimorfonucleados (monócitos e neutrófilos) de hospedeiros normais tem mecanismos que impedem a germinação dos fungos da ordem *Mucorales*, isso ocorre através da geração de metabólitos oxidativos (SPELLBERG; EDWARDS JR; IBRAHIM, 2005; ROGERS, 2008). Os macrófagos alveolares servem como a primeira linha de defesa contra os esporangiósporos, enquanto os neutrófilos medeiam à proteção contra as hifas (WALSH et al., 2004)

Os mecanismos pelos quais um hospedeiro saudável consegue debelar a infecção residem em estruturas de defesa do indivíduo, como por exemplo, o íon ferro ligado a proteínas especializadas, como a transferrina, torna o mesmo não disponível para o crescimento fúngico. A existência de neutrófilos circulantes e macrófagos nos

tecidos, em quantidade e funções normais, realizando a fagocitose e geração de metabólitos oxidativos, impedem a invasão. As células endoteliais intactas que regulam o tônus vascular e a permeabilidade, constituindo uma barreira mecânica a infecção fúngica. Em conjunto estes mecanismos impedem a invasão dos fungos da família *Mucoraceae*, como descrito na Figura 07 (SPELLBERG; EDWARDS JR; IBRAHIM, 2005).

Figura 7 - Mecanismo normal de defesa.



Legenda: 1- Ferro ligado a proteínas especializadas, 2a- neutrófilos circulantes, 2b- macrófagos nos tecidos, 3-células endoteliais intactas.

Fonte: Adaptado de SPELLBERG; EDWARDS JR; IBRAHIM, 2005.

Hospedeiros suscetíveis, ou seja, com os mecanismos de defesa anormais, tem maior susceptibilidade a desenvolver a mucormicose, como por exemplo, pacientes com cetoacidose diabética, o pH ácido causa dissociação do ferro das proteínas de transporte (especializadas), sendo este ferro livre utilizado para o crescimento fúngicos rápido. Defeitos na defesa fagocitária por deficiência no número, na função, por consequência de terapias específicas (corticoterapia) permitem a proliferação do fungo. Finalmente, a adesão e o dano às células endoteliais pelo fungo, permitem a invasão dos vasos sanguíneos, com posterior trombose e necrose tecidual, resultando na disseminação da infecção fúngica (SPELLBERG; EDWARDS JR; IBRAHIM, 2005).

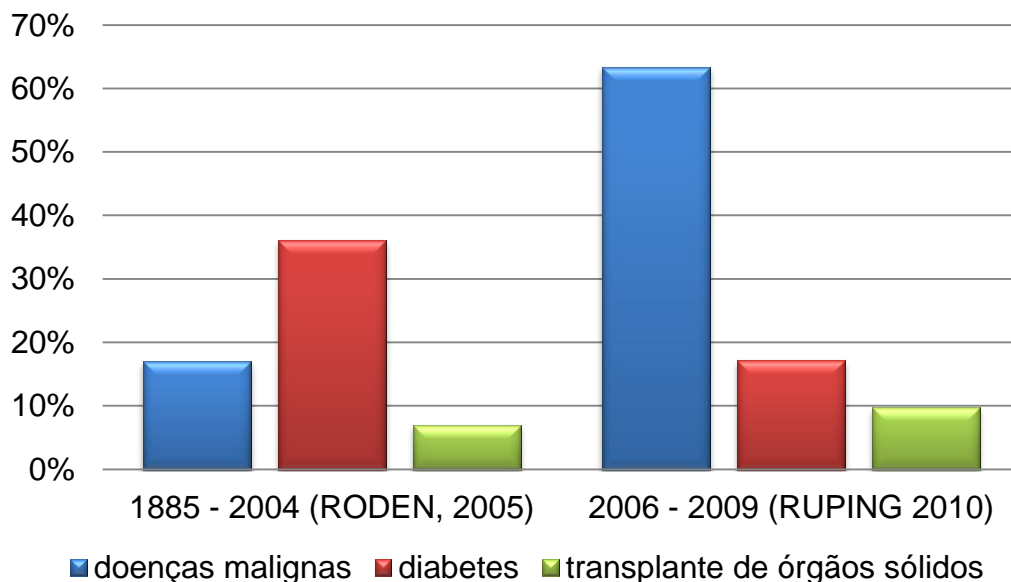
### 2.1.2 Mucormicose

A primeira descrição de mucormicose foi realizada por Paultauf em 1885 (CORDEIRO; BRILHANTE; SIDRIM, 1999; HABER et al., 2008). A mucormicose é uma infecção de progressão rápida, causada por fungos filamentosos oportunistas e na maioria das vezes, ocorre em indivíduos com imunidade comprometida.

A maior revisão bibliográfica de casos registrados de mucormicose foi realizada por Roden, 2005, na qual o mesmo compilou 929 casos entre 1885 a 2004 e constatou que há uma proporção crescente de pacientes imunocomprometidos com mucormicose. Sendo considerado como fatores predisponentes as doenças malignas (n = 154; 17%), diabetes mellitus (n = 337; 36%) e transplante de órgãos sólidos (n = 61; 7%) e outras de menor incidência (Gráfico 1).

Outro estudo global entre os anos de 2006 a 2009, realizado por Ruping e colaboradores (2010), constatou-se que 41 pacientes possuíam zigomicose invasiva, sendo consideradas como fatores predisponentes as doenças malignas (n = 26; 63,4%), diabetes mellitus (n = 7; 17,1%) e transplante de órgãos sólidos (n = 4, 9,8%) e outras de menor incidência (Gráfico 1).

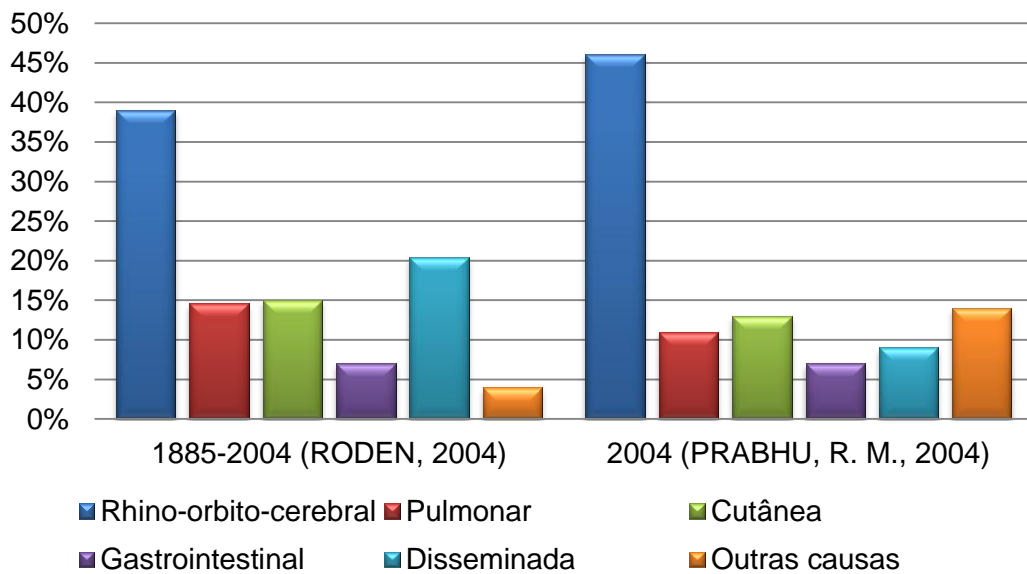
Gráfico 1 – Fatores predisponentes de maior incidência.



Fonte: Adaptação de dados de RODEN; ZAOUTIS; BUCHANAN, 2005 e RUPING et al., 2010.

A apresentação clínica da mucormicose é influenciada basicamente por dois fatores: a porta de entrada do agente etiológico e doença de base do hospedeiro, também denominado de fator predisponente. De forma geral, as casuísticas da mucormicose apontam a forma rino-orbito-cerebral como a forma de apresentação clínica mais comum, seguidas pela forma cutânea, pulmonar, disseminada e gastrointestinal, conforme representado no gráfico 2 (PRABHU; PATEL, 2004).

Gráfico 2 – Apresentações clínicas da mucormicose.



Fonte: Adaptação de dados de RODEN; ZAOUTIS; BUCHANAN, 2005 e PRABHU; PATEL, 2004

Antes da década de 60 a mucormicose era quase sempre fatal, mas com o advento da Anfotericina B e sua ampla utilização associada a procedimentos cirúrgicos, à taxa de mortalidade foi reduzida à cerca de 40%. Segundo Petrikkos e colaboradores (2012), a taxa de mortalidade da doença difere para cada local de infecção, sendo considerado em torno de 44% para diabéticos, 35% para pacientes sem condições subjacentes, e 66% para pacientes com neoplasias malignas.

A evolução potencialmente fatal se deve aos fatores predisponentes e as características específicas (os fatores de virulências) destes fungos. Um exemplo disto é o tropismo vascular, que inicialmente invade as artérias causando trombose e as lesões isquêmicas, posteriormente progride ocorrendo invasão de veias e de vasos linfáticos (HABER et al., 2008). Outros fatores predisponentes e fatores de virulências foram exemplificados nas tabelas 02 e 03.

Tabela 2 - Fatores de risco para as mucormicoses

<b>Fatores Predisponentes</b>	
Imunossupressão	Doenças hematológicas Terapia com corticoesteróides Quimioterapia Transplante de órgãos Infecção por HIV
Alterações Metabólicas	Cetoacidose diabética Terapia com deferoxamina Acidose metabólica
Alterações na Integridade da pele	Lesões por queimadura Inoculação traumática Feridas cirúrgicas
Outras	Uso de drogas injetáveis ilícitas Desnutrição

Fonte: Adaptação de PRABHU; PATEL, 2004.

Tabela 3 - Descrição dos fatores de virulências dos fungos da Ordem *Mucorales* da família *Mucoraceae*

<b>Fatores de Virulência</b>	
A maioria das espécies	São termotolerantes (36 a 43°C)
A maioria das espécies	São angioinvasivas.
A maioria das espécies	Produzem sideróforos (aumenta a captação de Fe <sup>3+</sup> no meio extracelular).
<i>Rhizopus</i> sp.	Sobrevivem a condições extremas de temperatura (83°C por até 72 horas)
<i>Rhizopus</i> sp.	Liberam para o meio, enzimas (lipases, proteases, enzimas glicosídicas) associadas a sua patogenicidade.

Fonte: Adaptação do CORDEIRO; BRILHANTE; SIDRIM, 1999 e RIBES; VANOVER-SAMS; BAKER, 2000.

As mucosas e as células endoteliais atuam como barreiras, ou seja, são defesas estruturais contra a invasão de tecidos pelos zigomicetos. O mecanismo de fixação e invasão da mucosa superficial usado por estes fungos ainda não está

totalmente elucidado. Sabe-se que os esporangiósporos são a forma infectante dos zigomicetos e a forma filamentosa é responsável pela invasão dos tecidos e progressão da doença (KONTOYIANNIS; LEWIS, 2006).

Há relatos na literatura, que sugerem que os esporangiósporos possuem algum componente, possivelmente uma protease, que pode ser diretamente tóxica para as células endoteliais na mucosa, facilitando sua germinação (KONTOYIANNIS; LEWIS, 2006).

Como os neutrófilos, monócitos e macrófagos são a principal defesa contra as zigomicoses. Logo, a redução ou problemas de função destas células pode resultar na doença invasiva, o que ocorre com os pacientes imunocomprometidos (GONZALEZ; RINALDI; SUGAR, 2002). Neste contexto, pacientes neutropênicos ou com disfunção de fagócitos estão mais propensos a desenvolver mucormicoses. Tratamento com corticosteroides também afeta a atividade dos macrófagos de evitar a germinação dos esporangiósporos. Os mecanismos exatos pelos quais esses fatores predisponentes prejudicam a função destes fagócitos permanecem desconhecidos (SPELLBERG; EDWARDS JR; IBRAHIM, 2005).

A cetoacidose é um fator predisponente para diabéticos a desenvolver a mucormicose, pelo fato da acidose metabólica complicar o curso da doença nos pacientes. A acidez do pH do plasma diminui a capacidade fagocítica e quimiotático de neutrófilos, enquanto que o plasma humano com pH normal impede o crescimento do cepas do gênero *Rhizopus* (GONZALEZ; RINALDI; SUGAR, 2002; WALSH et al., 2004).

Os fungos da família Mucorales produzem sideróforos, o que propicia o crescimento destes fungos em ambientes com baixa concentração deste íon. A função dos sideróforos envolve o transporte de ferro através da membrana celular, a entrada do ferro no citoplasma somente acontece depois que o ferro é reduzido e/ou desmembrado do seu ligante (FEDRIZZI, 2006).

Pacientes que fazem tratamento com a deferoxamina, utilizada como um quelante de alumínio ou de ferro, usada majoritariamente no combate a síndrome mielodisplásica,  $\beta$ -talassemia, anemia sideroblástica, anemia hemolítica autoimune, insuficiência renal, paciente em hemodiálise e outras patologias, tem desenvolvido mucormicoses (PRABHU; PATEL, 2004). A relação entre a utilização da deferoxamina e o desenvolvido de mucormicoses reside no fato de que

deferoxamina ligada ao ferro pode ser utilizado pelo fungo para aumentar o seu crescimento (GONZALEZ; RINALDI; SUGAR, 2002; WALSH et al., 2004).

Estudo feito por Boelaert e colaboradores (1993), ressalta a função de sideróforos em relação ao uso de deferoxamina na patogênese da mucormicose. A deferoxamina no soro permite uma absorção significativa de ferro por *Rhizopus* e promove o seu crescimento *in vitro*. Esta estimulação de crescimento é presente em concentrações baixas (0,01µM) do fármaco. Além disso, os autores afirmam que a disfunção renal permite que o fármaco em questão acumule-se, de modo que esta concentração é ultrapassada por vários dias após a administração, fato que explica a sensibilidade específica desta população ao desenvolvimento da mucormicose.

Dados recentes adquiridos a partir de modelos animais enfatizam a exigência excepcional de ferro na patogenicidade do *Rhizopus* spp., uma vez que a administração de deferoxamina ou suporte de ferro livre piora as taxas de sobrevivência de animais infectados com *Rhizopus* spp., porém o mesmo não foi visualizado quando os animais foram infectados com *Candida albicans*. Este mesmo estudo demonstrou que outros quelantes de ferro, não são utilizados como sideróforos pelo fungo, logo não exacerba a infecção da mucormicose (BOELAERT et al., 1994).

#### 2.1.2.1 Manifestações clínicas

Como as manifestações clínicas das mucormicoses correlacionam-se com condições predisponentes do hospedeiro, para o indivíduo apresentar a clínica da doença faz necessário apresentar pelo menos um dos fatores que o leva a ser considerado um imunocomprometido. Além disso, há uma relação entre as possíveis manifestações clínicas e o fator causador da imunodeficiência. Esta relação é exposta na tabela 04.

Tabela 4 - Apresentação clínica e fatores predisponentes

<b>Apresentação Clínica</b>	<b>Fatores Predisponentes</b>
Rino-órbito-cerebral	Cetoacidose diabética; uso intravenoso de drogas ilícitas; doenças hematológicas; transplantes de órgãos; e uso de deferoxamina.

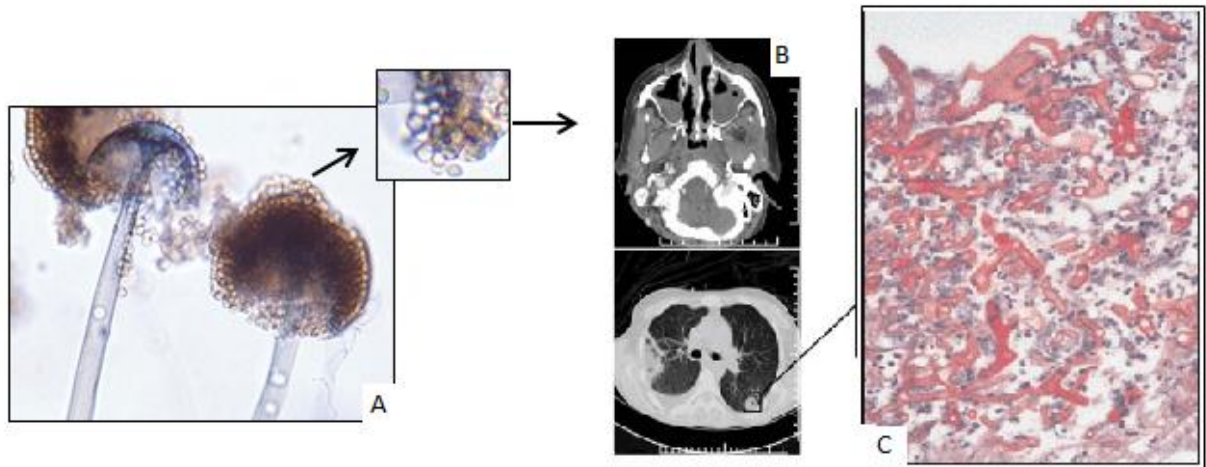
Pulmonar	Doenças hematológicas; quimioterapia anti-neoplásica; corticoterapia; diabetes; transplantes de órgãos; e uso de deferoxamina.
Gastrointestinal	Desnutrição severa; neonatos prematuros; e uso de deferoxamina.
Cutânea	Queimaduras graves; traumas cutâneos; e uso de deferoxamina.
Disseminada	Uso de deferoxamina; doenças hematológicas; diabetes; transplantes de órgãos; neonatos prematuros; e desnutrição severa.

Fonte: RIBES; VANOVER-SAMS; BAKER, 2000; GONZALEZ; RINALDI; SUGAR, 2002; PRABHU; PATEL, 2004; KONTOYIANNIS; LEWIS, 2006; HABER et al., 2008; SEVERO; GUAZZELLI; SEVERO, 2010; GORJON et al, 2010.

A mucormicose pode se apresentar na forma rino-órbito-cerebral, pulmonar, cutânea, disseminada e gastrointestinal, sendo a primeira à forma mais comum (PRABHU; PATEL, 2004; URIBE et al, 2005; RODEN; ZAOUTIS; BUCHANAN, 2005; HABER et al, 2008).

O modo de transmissão das manifestações clínicas citadas é por inalação nos casos de rino-órbito-cerebral e pulmonar, pois seus esporangiósporos medem 3 a 11µm e são facilmente aerossolizados, o que permite que estes se dispersem no ambiente (Figura 8) (KONTOYIANNIS; LEWIS, 2006). Nos casos de infecções do trato gastrointestinal são adquiridos, provavelmente, por ingestão de esporangiósporos em alimentos. As lesões cutânea resultam na inoculação deles em feridas abertas, ou por contaminação de esparadrapos, gazes, agulha, ainda há relatos lesões cutâneas após tatuagens (CORDEIRO; BRILHANTE; SIDRIM, 1999; RIBES; VANOVER-SAMS; BAKER, 2000; PRABHU; PATEL, 2004; KONTOYIANNIS; LEWIS, 2006).

Figura 8 - Morfologia celular de *Rhizopus* durante o crescimento *in vivo*.



A) Morfologia celular salientando os esporangiósporos, que são facilmente aerossolizados. B) Infecção rino-órbito-cerebral. C) Microscopia onde são observadas hifas não septadas, ramificadas hialina (Hematoxilina-eosina, 400x). Fonte: Adaptação de ÁLVAREZ-ÁLVAREZA et al., 2005, KONTOYIANNIS; LEWIS, 2006 e Mycology Online da Universidade de Adelaide na Austrália. Acessado em: 14/08/2012.

#### 2.1.2.1.1 Rino-orbito-cerebral

Mucormicose rino-orbito-cerebral continua a ser a forma mais comum de doença. Cerca de 70% dos casos rino-orbito-cerebral são encontrados em pacientes diabéticos, em cetoacidose, porém raramente estão associados a imunossupressão, como no caso de pacientes com neutropenia prolongada e em pacientes que receberam transplantes de órgãos e de células-tronco hematopoéticas (CORDEIRO; BRILHANTE; SIDRIM, 1999; RIBES; VANOVER-SAMS; BAKER, 2000; SPELLBERG; EDWARDS JR; IBRAHIM, 2005; RODEN; ZAOUTIS; BUCHANAN, 2005).

Esta manifestação clínica instala-se no hospedeiro infectado a partir de estágios bem definidos. Na primeira fase, o fungo é inalado e os esporos localizam-se nos seios paranasais (CORDEIRO; BRILHANTE; SIDRIM, 1999; GONZALEZ; RINALDI; SUGAR, 2002; PRABHU; PATEL, 2004). A partir desta localização, ocorre uma extensão ao tecido adjacente podendo progredir para a órbita, região de palato e ou sistema nervoso central (GONZALEZ; RINALDI; SUGAR, 2002; PRABHU; PATEL, 2004; PETRIKOS et al., 2012). Nesta forma clínica o gênero *Rhizopus* spp. é responsável por 70% das culturas positivas nos casos reportados na literatura

(RIBES; VANOVER-SAMS; BAKER, 2000; GREENBERG et al., 2004; SPELLBERG; EDWARDS JR; IBRAHIM, 2005; RODEN; ZAOUTIS; BUCHANAN, 2005; HABER et al., 2008; HIBBET et al., 2007; HENRY, 2008).

Os sintomas da mucormicose não são nem patognomônicos nem específicos suficientes para distinguirem patógenos de outras causas de rinosinusites (KONTOYIANNIS; LEWIS, 2006).

Na primeira fase da doença os sintomas incluem congestão nasal, rinorréia escura sanguinolenta ou epistaxe, cefaléia retro-orbitária, mal-estar e febre (GONZALEZ; RINALDI; SUGAR, 2002; PRABHU; PATEL, 2004; KONTOYIANNIS; LEWIS, 2006), esta última pode estar presente ou ausente em cerca de 50% dos casos (SPELLBERG; EDWARDS JR; IBRAHIM, 2005; PETRIKKOS et al., 2012).

Na segunda fase, os sintomas do comprometimento da órbita incluem edema facial e edema palpebral, escurecimento visual, lacrimejamento, quemose (edema da conjuntiva), dormência peri-orbitária, diplopia (visão dupla), proptose (deslocamento do globo ocular para baixo) (Figura 9) e perda da visão do olho afetado. Ainda nesta fase da doença, pode ocorrer disseminação para a cavidade oral, provocando uma úlcera necrótica escura e dolorosa no palato duro. No exame da cavidade nasal pode ser evidenciada hiposmia ou anosmia (perda da olfação), além de ulceração e placa enegrecida nas regiões dos septos ou cornetos, sintomas estes evidenciados em apenas 50% dos casos (GONZALEZ; RINALDI; SUGAR, 2002; PRABHU; PATEL, 2004; SPELLBERG; EDWARDS JR; IBRAHIM, 2005; KONTOYIANNIS; LEWIS, 2006; PETRIKKOS et al., 2012).

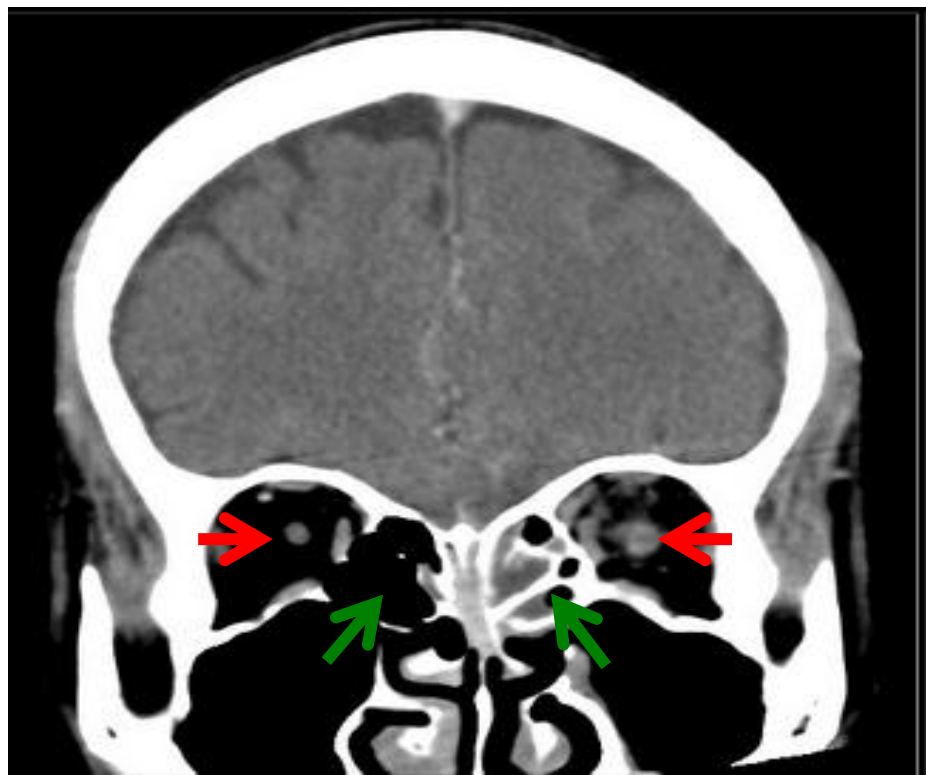
Na terceira fase da doença, a deterioração do status mental é um mal prognóstico que denuncia o envolvimento cerebral. A disseminação da doença para o sistema nervoso central ocorre através do nervo óptico ou pelas veias de drenagem dos seios paranasais para o seio cavernoso, levando a ocorrência de complicações representadas por sinais e sintomas de trombose. As manifestações de trombose do seio cavernoso incluem perda da visão, envolvimento do nervo óptico (Figura 10), oftalmoplegia (paralisia do músculo do olho) interna e externa, anestesia corneal e anidrose facial (ressecamento facial). Trombose da artéria carótida interna também pode ocorrer e causar hemiplegia contralateral (paralisia de um lado do corpo) (GONZALEZ; RINALDI; SUGAR, 2002)

Figura 9 - Paciente com proptose.



Legenda: Relatado em um estudo de caso com paciente imonocompetente com mucormicose rino-orbito-cerebral. Fonte: SANTANA et al, 2001.

Figura 10: Tomografia computadorizada com contraste.



Legenda: Seta vermelha: nervo óptico direito (normal) e nervo óptico esquerdo (espessado). Seta verde: células aéreas etmoidais à direita normais e exsudato ou muco nas células etmoidais à esquerda. Fonte: <http://anatpat.unicamp.br/rpgmucor1.html>. Acessado em: 29/08/2012.

### 2.1.2.1.2 Pulmonar

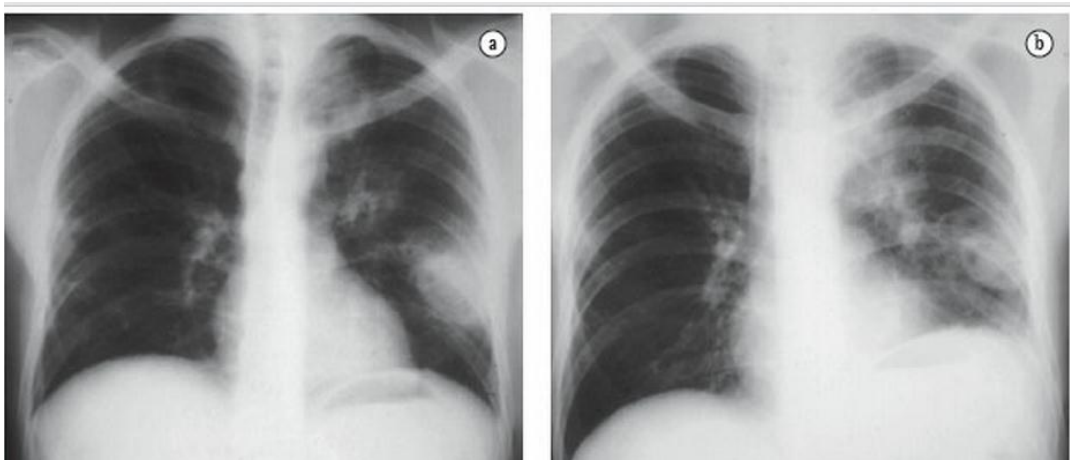
A maioria dos casos de mucormicose pulmonar tem ocorrido em pacientes profundamente neutropênicos (leucemias ou transplantes de medula óssea) e pacientes em quimioterapia. Pacientes diabéticos pode apresentar esta forma de manifestação, porém são casos menos frequentes e menos fulminantes (RIBES; VANOVER-SAMS; BAKER, 2000; SPELLBERG; EDWARDS JR; IBRAHIM, 2005).

A doença se assemelha a aspergilose pulmonar invasiva, inclusive nos exames radiográficos (Figura 11). Uma ampla variedade de manifestações pulmonares tem sido relatada, incluindo nódulos solitários, consolidação segmentar ou lobar, lesões cavitárias e lesões broncopneumônicas. Os pacientes podem apresentar tosse, febre, hemoptise e dor torácica. (RIBES; VANOVER-SAMS; BAKER, 2000; GONZALEZ; RINALDI; SUGAR, 2002; SPELLBERG; EDWARDS JR; IBRAHIM, 2005).

Casos de hemoptise fatais associados à erosão e invasão da artéria pulmonar (Figura 12) ou aorta pelos fungos, também foram descritos na literatura (RIBES; VANOVER-SAMS; BAKER, 2000; GONZALEZ; RINALDI; SUGAR, 2002; KONTOYIANNIS; LEWIS, 2006).

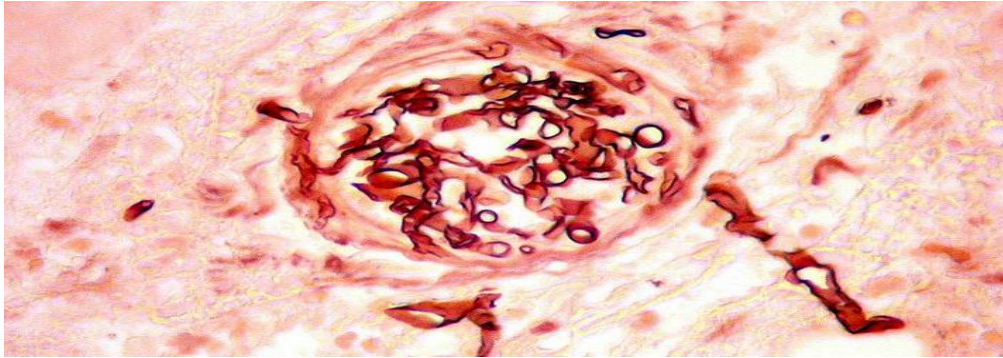
A mortalidade é elevada, atingindo 65 %, e as principais causas de morte são a sépsis, a insuficiência respiratória e as hemoptises maciças (GALVÃO et al., 2005).

Figura 11 - Radiografia do tórax.



Legenda: A: cavidades e B: consolidação pulmonar. Fonte: SEVERO, GUAZZELLI, SEVERO, 2010.

Figura 12 - Biópsia com coloração na técnica de Grocott.



Legenda: Invasão e proliferação de fungos causadores da mucormicose no interior de vasos. Fonte: <http://anatpat.unicamp.br/biinflmucor1b.html>. Acessado em: 29/08/2012

#### 2.1.2.1.3 Cutânea

A doença cutânea primária pode ser muito invasiva localmente, envolvendo não somente a pele e tecido subcutâneo como também o gorduroso, muscular, fáscia e o osso (RIBES; VANOVER-SAMS; BAKER, 2000; SPELLBERG; EDWARDS JR; IBRAHIM, 2005).

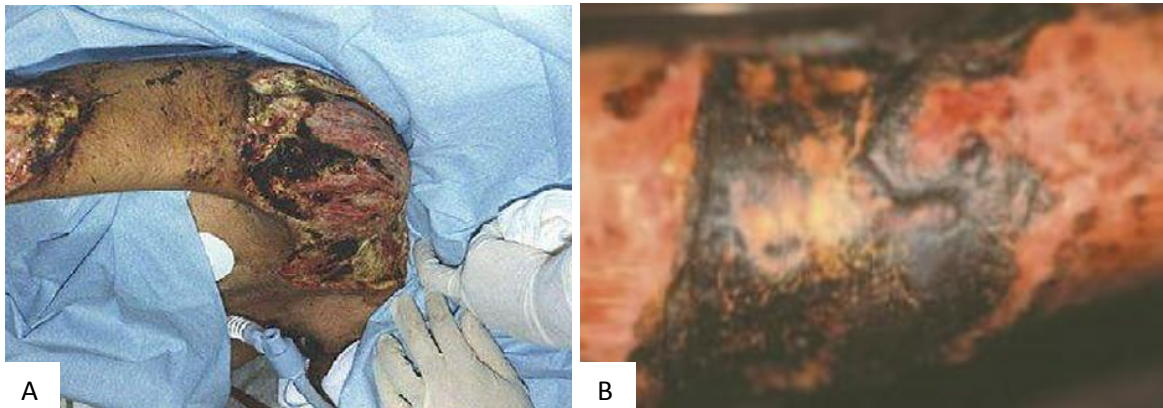
A mucormicose cutânea primária (Figura 13) pode desenvolver-se após ruptura da integridade da pele decorrente de procedimento cirúrgico, queimadura, trauma, acidentes com veículos motorizados, fraturas ósseas, cateteres intravenosos, trauma com espinhos vegetais, abrasões, lacerações, biopsias e curativos adesivos contaminados (SPELLBERG; EDWARDS JR; IBRAHIM, 2005). Além disso, o reverso (difusão dos órgãos internos para a pele) é bastante raro, porém já foi descrito por Roden (2005) (PETRIKKOS et al., 2012).

A invasão e crescimento do fungo em uma lesão pré-existente produz um processo inflamatório agudo, com formação de pus, abscesso em tecido de formação, edema e necrose. As lesões podem aparecer avermelhadas e endurecidas, mas muitas vezes pode progredir para formar escaras negras. O tecido necrosado pode se desprender e produzem grandes úlceras (RIBES; VANOVER-SAMS; BAKER, 2000; PETRIKKOS et al., 2012).

Também há relatos na literatura de fasciite necrosante, considerado um mal prognóstico para a doença (RIBES; VANOVER-SAMS; BAKER, 2000; KONTOYIANNIS; LEWIS, 2006). Por fim, ainda há relatos de mastite causada por

*Rhizopus* associado com implantes mamários de silicone (RIBES; VANOVER-SAMS; BAKER, 2000).

Figura 13 - Mucormicose cutânea



Fonte: A) PETRIKKOS et al., 2012; B) URIBE et al., 2005.

#### 2.1.2.1.4 Disseminada

A mucormicose disseminada é definida como o envolvimento de dois ou mais órgãos não adjacentes (PRABHU; PATEL, 2004). A doença é rara, mas ocorre em pacientes imunossuprimidos por idade (neonatos), terapia com drogas (deferoxamina) ou doenças graves como leucemia ou linfoma (GONZALEZ; RINALDI; SUGAR, 2002; KONTOYIANNIS; LEWIS, 2006; PETRIKKOS et al., 2012).

As manifestações clínicas são variadas, refletindo a invasão vascular e infarto de tecido em vários órgãos (KONTOYIANNIS; LEWIS, 2006). Os sintomas são inespecíficos, mas apontam envolvimento neurológico, gastrointestinal e pulmonar. Sendo este último, o órgão de maior acometimento associado à forma disseminada (RIBES; VANOVER-SAMS; BAKER, 2000; GONZALEZ; RINALDI; SUGAR, 2002; PETRIKKOS et al., 2012).

Os pacientes podem apresentar um início súbito de déficits neurológicos focais ou coma (SPELLBERG; EDWARDS JR; IBRAHIM, 2005). A taxa de mortalidade para a forma disseminada é próxima de 100% (RIBES; VANOVER-SAMS; BAKER, 2000; SPELLBERG; EDWARDS JR; IBRAHIM, 2005), visto que, a forma disseminada possui uma rápida evolução e sintomas inespecíficos, geralmente o diagnóstico é dado após a autópsia (CORDEIRO; BRILHANTE; SIDRIM, 1999).

#### 2.1.2.1.5 Gastrointestinal

Apenas 25% dos casos de mucormicose gastrointestinais são diagnosticados *in vivo*, e possui uma taxa de mortalidade próxima a 85% (PETRIKKOS et al., 2012). A doença gastrointestinal é relativamente incomum, mas todos os segmentos do trato gastrointestinal podem ser afetados (GONZALEZ; RINALDI; SUGAR, 2002).

Pacientes com extrema desnutrição, recém-nascidos prematuros são mais predispostos a desenvolver esta forma clínica (SPELLBERG; EDWARDS JR; IBRAHIM, 2005; KONTOYIANNIS; LEWIS, 2006; PETRIKKOS et al., 2012).

Os sinais e sintomas da mucormicose gastrointestinal são inespecíficos e dependem da extensão e localização da infecção, podendo incluir dor abdominal, distensão abdominal, náusea, vômito, diarreia, febre e hematêmese (PETRIKKOS et al., 2012). Ainda, há relatos na literatura de peritonite (GONZALEZ; RINALDI; SUGAR, 2002) e enterocolite necrosante em grande parte dos recém-nascidos prematuros (SPELLBERG; EDWARDS JR; IBRAHIM, 2005).

#### 2.1.3 Diagnóstico

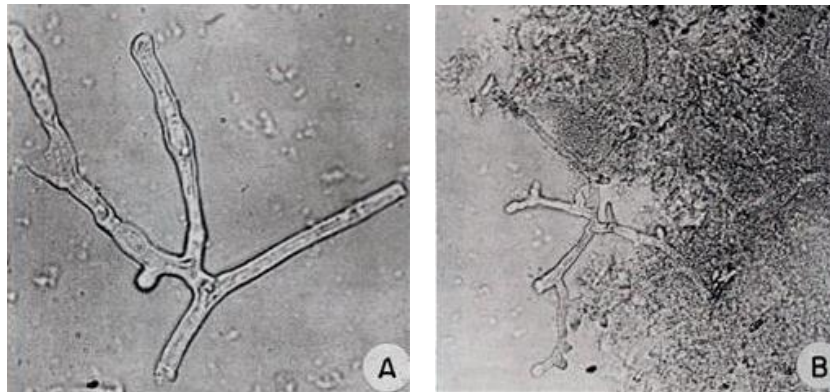
O diagnóstico precoce da mucormicose é importante para a intervenção terapêutica oportuna, aumento da sobrevivência e redução da morbidade. Como o gênero *Rhizopus* spp está mais envolvido e frequentemente diagnosticado neste tipo de doença, este tópico enfocará a identificação apenas do gênero mais prevalente.

O diagnóstico é feito através de uma correlação entre a clínica do paciente, os exames de imagem, laboratoriais e a utilização de um antifúngico de prevenção (WALSH et al., 2012).

A constatação da doença de base, como o diabetes, doenças hematológicas, corticoterapia e outras é o primeiro passo para o diagnóstico precoce. Em seguida os exames de imagem, a exemplo tomografia computadorizada e, em especial, a ressonância magnética, para identificar as áreas afetadas como seios da face, pulmão e sistema nervoso central. Pois, uma vez identificados os órgãos supostamente acometidos, é fundamental a obtenção de material biológico para processamento laboratorial, seja por meio da avaliação direta, do estudo das culturas e do histopatológico (padrão ouro) (SEVERO, GUAZZELLI; SEVERO, 2010; WALSH et al., 2012).

O exame micológico é realizado através do exame direto utilizando hidróxido de potássio (KOH) variando entre 10 a 30% para clarificar a amostra quando necessário. Neste exame quando positivo é possível detectar hifas largas, não septadas, de dimensões irregulares e com ramificações dispostas majoritariamente no ângulo de 90° (Figura 14) (CORDEIRO; BRILHANTE; SIDRIM, 1999; RIBES; VANOVER-SAMS; BAKER, 2000). Geralmente, as estruturas fúngicas não estão bem conservadas, podendo dificultar a identificação. As amostras que podem ser utilizada são: escarro, secreção de fluidos inflamatórios dos abscessos, secreção oriunda dos seios paranasais, do lavado broncoalveolar, biopsia de tecidos, dentre outros (CORDEIRO; BRILHANTE; SIDRIM, 1999; GONZALEZ; RINALDI; SUGAR, 2002). Muitas vezes no diagnóstico da mucormicose, o exame direto não comprova a infecção, mas o diagnóstico não pode ser descartado (GONZALEZ; RINALDI; SUGAR, 2002).

Figura 14 – Exame direto de biópsia de palato, clarificado com KOH 20%.

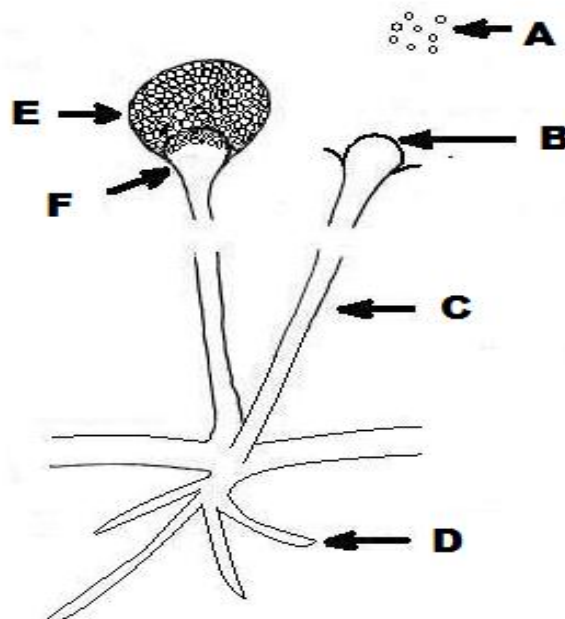


Legenda: Hifas cenóticas, largas, ramificadas e de contorno irregular. Fonte: PORTO et al, 1986.

A cultura é obtida após inoculação do espécime clínico em meio de cultura de rotina micológica (não acrescido de cicloeximida, pois os fungos da ordem *Mucorales* são sensíveis, porém, devem ser adicionados antibióticos para inibir o crescimento bacteriano). Os agentes em questão tem um crescimento rápido e satisfatório em 3 a 4 dias, após incubação a 37°C ou a temperatura ambiente. As colônias crescidas apresentam micélio aéreo com textura algodonosa e de coloração branca inicialmente, passando para cinza e recoberta por pontos negros, como mostrado na figura 08 (CORDEIRO; BRILHANTE; SIDRIM, 1999).

A micromorfologia do gênero *Rhizopus* feita a partir da cultura positiva apresenta hifas largas (6-15 $\mu$ m de diâmetro) e quase sem septos. Os esporangióforos são longos (mais de 4 $\mu$ m), geralmente não ramificados e encontram-se ligados por uma espécie de estolhos. Nos locais de união entre os esporangióforos e os estolhos, surgem hifas com aspecto de raízes – os rizóides. Na extremidade dos esporangióforos surgem esporângios redondos e escuros, com 40-350 $\mu$ m de diâmetro, que contêm, no seu interior, a columela (a pequena área em forma de cúpula) e numerosos esporos redondos, incolores ou castanhos (4-11 $\mu$ m). E por fim, apresenta uma discreta apófise (um bordo junto da extremidade do esporangióforo, abaixo da columela). Todas as estruturas citadas estão esquematizadas na figura 15 (PRATA, 2007).

Figura 15 – Esquema da micromorfologia do gênero *Rhizopus*.



Legenda: (A) Esporangiósporos, (B) Columela, (C) Esporangióforo, (D) Rizóide, (E) Esporângio e (F) Apófise. Fonte: Adaptado de RIBES; VANOVER-SAMS; BAKER, 2000.

A diferenciação do gênero *Rhizopus* dos gêneros *Mucor* e *Absidia*, que também podem causar mucormicose é feito analisando a micromorfologia, uma vez que, o *Rhizopus* se distingue do *Mucor* sp. pela presença de estolhos, rizóides, e esporangióforos geralmente não ramificados. E se difere da *Absidia* sp. pela

localização dos rizóides em relação aos esporangióforos e pela forma e tamanho do esporângio (PRATA, 2007).

A identificação da espécie dos fungos do gênero *Rhizopus* também é feita através da micromorfologia observando as diferenças entre a morfologia do esporângio, da columela, da apófise e por fim, dos esporangiósporos. Essas peculiaridades estão descritas na tabela 05 (RIBES; VANOVER-SAMS; BAKER, 2000).

Tabela 05: Características diferenciadoras das espécies de *Rhizopus* que causam doença em seres humanos.

<b>Espécie</b>	<b>Morfologia do esporângio</b>	<b>Morfologia da columela e apófise</b>	<b>Morfologia do esporangiósporos</b>
<i>R. stolonifer</i>	Globoso, preto; grande (até 275 $\mu\text{m}$ ).	Estão juntas, são ovais a subglobosa (70-120 $\mu\text{m}$ ); pálida a marrom; apófise é distinta.	Ovais, preto; estriadas.
<i>R. arrhizus</i>	Globoso, cinza a preto (100-200 $\mu\text{m}$ ).	Estão juntas, são globosas a ovais (40-75 por 60-130 $\mu\text{m}$ ); apófise é imperceptível, muitas vezes cai na esporulação.	Oval a elipsoide, 6-8 por 4,5-6 $\mu\text{m}$ ; estriado
<i>R. microsporus</i>	Globoso; pequeno (100 $\mu\text{m}$ ).	Forma e tamanho da columela são variáveis. Apófise é discreta.	Tamanho variável.
<i>R. azygosporus</i>	Globoso; pequeno (50-100 $\mu\text{m}$ ).	Columela oval.	Oval, levemente estriado, 4-6 $\mu\text{m}$ .
<i>R. schipperae</i>	Globoso; pequeno (< 80 $\mu\text{m}$ ).	Columela é subglobosa a cônica. Apófise distinta.	Oval, levemente estriado, 4-7 $\mu\text{m}$ .

Fonte: RIBES; VANOVER-SAMS; BAKER, 2000.

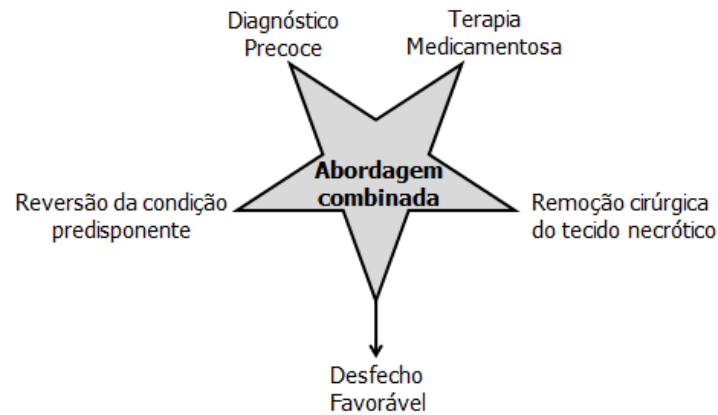
O diagnóstico definitivo da mucormicose quase sempre requer histopatológico das biopsias evidenciando a invasão de fungos nos tecido. Diferentes colorações podem ser úteis para observação das hifas dos *Rhizopus* como por exemplo, prata-metenamina (Grocott-Gomori), *coloração periodic-acid-Schiff* (PAS), calcofluor ou hematoxilina-eosina (HE). Neste exame além da observação das hifas, podem ser evidenciadas alterações teciduais, como infiltrado de neutrófilos, necrose e invasão de vasos sanguíneos, o que subsidia a conclusão do diagnóstico (CORDEIRO; BRILHANTE; SIDRIM, 1999; RIBES; VANOVER-SAMS; BAKER, 2000; KONTOYIANNIS; LEWIS, 2006).

Testes sorológicos para a detecção de mucormicose não são clinicamente úteis. Pelo fato, de que os fungos compartilham os mesmos determinantes antigênicos, o que impossibilita a detecção de anticorpos específicos. Outra forma de diagnóstico que poderia ser utilizada é a reação em cadeia de polimerase (PCR), na qual o gene 18S do DNA ribossômico é amplificado e assim, podem diferenciar uma infecção causada por *Rhizopus* spp. daquelas causadas por outros fungos, através da busca de uma determinada sequência de DNA (RIBES; VANOVER-SAMS; BAKER, 2000), porém esta e outros métodos como a imunohistoquímica, ainda estão em processo de otimização, padronização e validação, ou seja, técnicas mais específicas estão em desenvolvimento ativo (WALSH et al., 2012).

#### 2.1.4 Tratamento

O tratamento específico para a mucormicose ainda é incerto. Terapêutica bem sucedida para esta doença envolve uma abordagem combinada entre o diagnóstico precoce, remoção cirúrgica do tecido lesionado e/ou necrosado, uma vez que, a infecção tem a capacidade de espalhar-se rapidamente e disseminar mesmo em pacientes relativamente assintomáticos, reversão dos fatores predisponentes e terapia medicamentosa correta (Figura 16) (GONZALEZ; RINALDI; SUGAR, 2002; IBRAHIM et al., 2003; KONTOYIANNIS; LEWIS, 2006; ROGERS, 2008).

Figura 16 – Abordagem combinada no tratamento da mucormicose.



Fonte: Adaptado do GONZALEZ, C. E. et al., 2002.

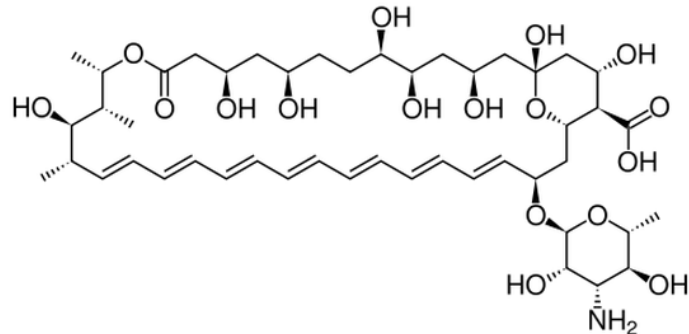
O tratamento cirúrgico deve incluir ressecção completa do tecido necrosado e drenagem adequada dos seios paranasais infectados. A retirada do tecido necrótico ou lesionado pode ser repetido quando necessário. A tomografia computadorizada (CT) ou a ressonância nuclear magnética (RNM) podem ajudar a determinar a extensão da ressecção, assim como monitorar a eficácia do tratamento (RIBES; VANOVER-SAMS; BAKER, 2000; KONTOYIANNIS; LEWIS, 2006).

A reversão da condição predisponente é de fundamental importância para um resultado satisfatório. É necessário controle da acidose e da hiperglicemia nos pacientes diabéticos, pois o descontrole destes fatores dificulta a resposta do hospedeiro à infecção e facilitam o crescimento do fungo nos tecidos infectados. Já em pacientes submetidos a tratamento com corticoides e de deferoxamina, a redução da dose do medicamento ou sua suspensão devem ser consideradas. Em pacientes com outras imunossupressões, o controle da doença de base é fundamental para o sucesso terapêutico (GONZALEZ; RINALDI; SUGAR, 2002).

Testes de sensibilidade à antifúngicos realizados em laboratórios de pesquisa tem revelado claramente que zigomicetos são relativamente resistentes à muitos antifúngicos, incluindo a flucitosina, cetoconazol, itraconazol, fluconazol, voriconazol e as equinocandinas. Apesar dos estudos nesta área serem limitados por um pequeno número de isolados testados (KONTOYIANNIS; LEWIS, 2006). A maioria dos isolados da ordem *Mucorales* parecem ser sensíveis à AMB (Figura 17), quando

testado utilizando métodos de microdiluição em caldo, com uma CIM 90 menor do que 0,5 µg/mL (DANNAOUI et al., 2003).

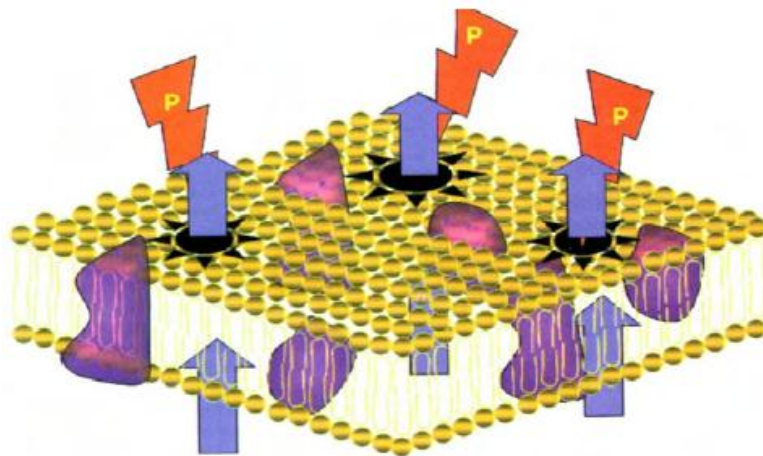
Figura 17 – Estrutura da Anfotericina B



Fonte: CRUZ, 2010. Acessado em: 27/11/2012.

A AMB atua ao se ligar ao ergosterol da membrana formando poros, alterando a permeabilidade, com perdas de pequenas moléculas, principalmente de potássio que leva a morte da célula fúngica. A figura 18 mostra o esquema do mecanismo de ação geral deste fármaco (GOLAN, 2009).

Figura 18 – Mecanismo de ação da Anfotericina B.



Legenda: A figura mostra os poros na membrana plasmática formado pela interação deste fármaco com o ergosterol. E as setas indicam o fluxo de saída das pequenas moléculas. Fonte: CORDEIRO; BRILHANTE; SIDRIM, 1999.

Atualmente a terapia recomendada é AMB desoxicolato na máxima dose tolerada, este é considerado o tratamento convencional para a mucormicose localizada ou disseminada (WALSH et al., 2004). Entretanto por recorrentes efeitos

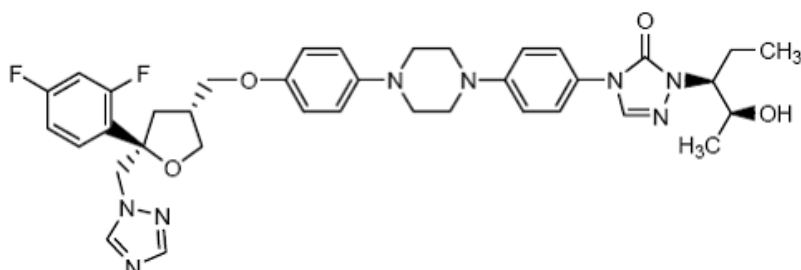
colaterais significativos como náuseas, vômito, febre, hiper/hipotensão, hipóxia, nefrotoxicidade, hipocalcemia, perda de magnésio. Outros efeitos como a anemia que foi identificada em 75% dos pacientes, acompanhada de trombocitopenia. Estes efeitos impossibilitam a utilização, em longo prazo, da dose máxima (LANIADO; CABRALES, 2009).

Uma alternativa a utilização da AMB desoxicolato, foi o uso da AMB liposômica, pois a mesma é menos nefrotóxica e mostra melhor penetração no sistema nervoso central em comparação com a AMB desoxicolato e outras formulações lipídicas (SPELLBERG et al., 2009).

O uso da AMB lipídica, também é uma opção, pois pode ser administrada em dose mais alta que AMB desoxicolato para melhorar a eficácia terapêutica. Fato este comprovado por estudos realizados por Perfect (2005), onde a AMB lipídica apresentou resultados semelhantes a AMB desoxicolato, embora com menos efeitos adversos. Porém, em função do alto custo, essa terapêutica só é utilizada em casos de pacientes refratários ou intolerantes ao tratamento convencional.

O arsenal terapêutico para o tratamento da mucormicose é limitada, além das medicações possuírem vários efeitos colaterais (MOTA et al., 2012). Atualmente, o posaconazol (figura 19), triazólico de segunda geração, em fase de desenvolvimento clínico, apresenta-se como droga promissora na terapêutica desta micose, visto que há relatos de boa atividade antifúngica em estudos *in vitro* e *in vivo* (DANNAOUI et al., 2003; WALSH et al., 2004; KOK et al., 2007).

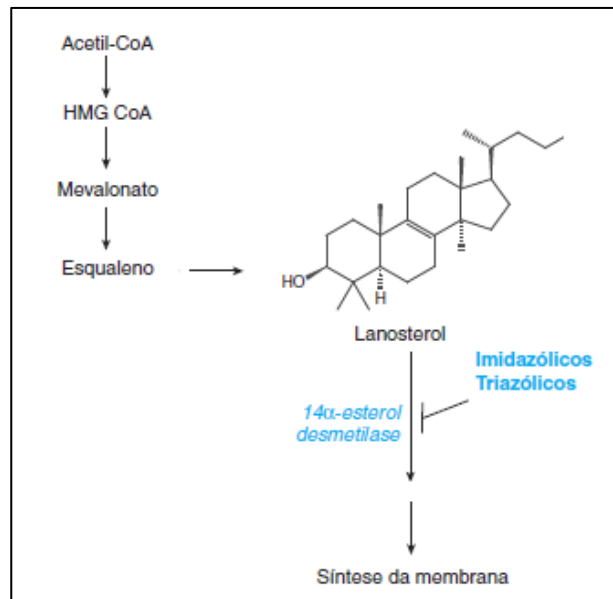
Figura 19 – Estrutura do Posaconazol.



Fonte: RxList: The Internet Drug Index. Acessado em: 28/11/2012.

O posaconazol age inibindo a enzima lanosterol 14 $\alpha$ -demetilase (CYP51), que bloqueia a síntese dos lipídios fúngicos, especialmente o ergosterol. Assim a inibição altera a permeabilidade de membrana, interferindo na ação enzimática associada à membrana, conforme na figura 20 (GOLAN, 2009).

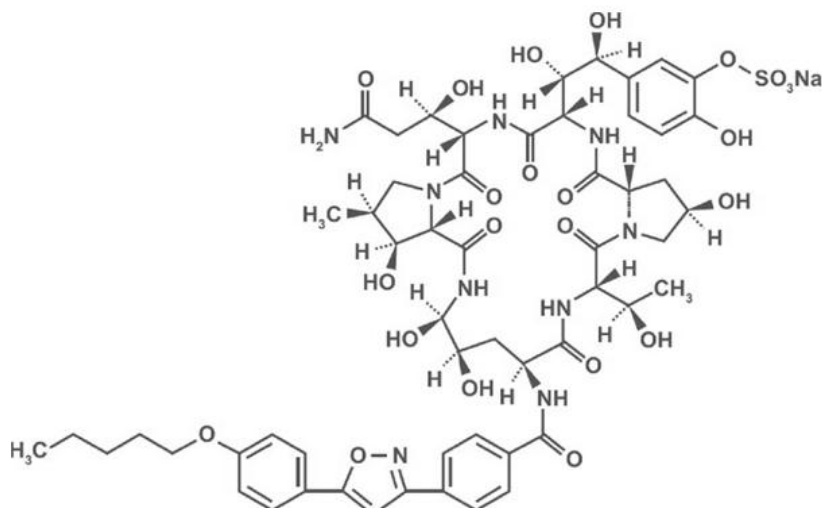
Figura 20 – Mecanismo de ação do posaconazol.



Legenda: O posaconazol é um triazólico, por isso, inibe a ação na enzima em destaque, culminando no efeito antifúngico. Fonte: Adaptação do GOLAN, 2009.

Uma nova tendência é a terapia combinada, uma vez que seu grande objetivo reside em aumentar o poder antifúngico e diminuir dos efeitos adversos. A combinação entre a AMB lipossomal e a micafungina (Figura 21) foi considerada eficaz contra o tratamento da mucormicose rino-orbital (OGAWA et al., 2012).

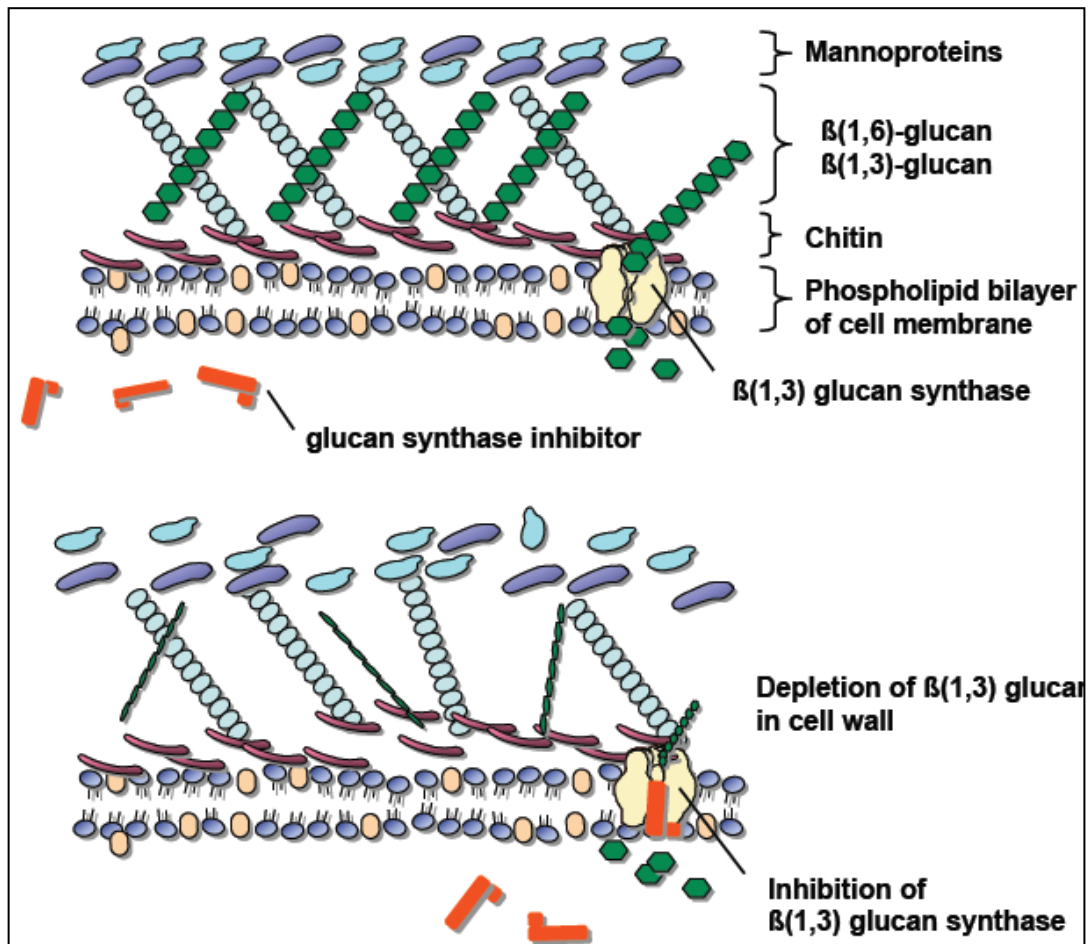
Figura 21 – Estrutura da Micafungina.



Fonte: DIOMEDI, 2004.

As equinocandinas, a exemplo da micafungina, atuam sobre a síntese da parede celular fúngica através da inibição não-competitiva da síntese de  $\beta$ -(1,3)-D-glicano. A ruptura da integridade da parede celular resulta em estresse osmótico, lise da célula fúngica e, por fim, morte do fungo (Figura 22) (GOLAN, 2009).

Figura 22 – Mecanismo de ação da Micafungina.



Legenda: A figura demonstra a inibição (em vermelho) da síntese de  $\beta$ -(1,3)-D-glicano, culminando na fragilidade da parede celular. Fonte: SAMPAYO, 2011.

Muitos pacientes que desenvolvem estas infecções fúngicas extremamente agressivas possuem altas taxas de mortalidade. Diante disso, há uma necessidade de novas estratégias terapêuticas, ou seja, de novos fármacos, naturais ou sintéticos, para o tratamento da mucormicose. Os produtos naturais têm sido considerados especialmente fontes de moléculas potencialmente bioativas, que podem ter um largo espectro de ações e menos efeitos colaterais (MOTA et al., 2012).

## 2.2 Produtos Naturais

Os produtos naturais são tradicionalmente usados para tratar doenças e seu uso pode ser identificado em diversas civilizações há mais de cinco milhões de anos. Atualmente, embora grandes avanços sejam observados na medicina moderna, os produtos naturais continuam contribuindo de maneira considerável nos cuidados com a saúde (CRAGG; NEWMAN; SNADER, 1997; SHU, 1998; KAMBOJ, 2000).

Os produtos naturais apresentam importância tanto na medicina popular, sendo utilizado de forma abundante em países desenvolvidos e em desenvolvimento, como na indústria farmacêutica, onde se estima que 25 % de todos os fármacos modernos são, direta ou indiretamente, derivados de plantas (CRAGG; NEWMAN; SNADER, 1997; SHU, 1998).

Dentre os agentes terapêuticos provenientes de plantas com uso medicinal popular e científico, destacam-se os óleos essenciais. A International Standard Organization (ISO) define óleos essenciais como produtos obtidos de partes de plantas através de destilação por arraste com vapor d'água, bem como os produtos obtidos por compressão dos pericarpos de frutos cítricos (COSTA et al., 2008).

Os óleos essenciais possuem diversas propriedades farmacológicas descritas na literatura e suas aplicações são variadas, desde o tratamento do câncer, através da supressão tumoral; em doenças cardiovasculares, no tratamento e na prevenção da arteriosclerose; no combate a microrganismos, através da atividade antibacteriana e antifúngica; como também sendo adjuvante no combate a diabetes, através da atividade hipoglicemiante (EDRIS, 2007; BANSOD; RAI, 2008; PEREIRA, 2011).

Segundo a literatura, vários óleos essenciais apresentam atividade antifúngica (CHAMI et al., 2004; DUARTE et al., 2005; LIMA et al., 2006; BANSOD; RAI, 2008; PEREIRA, 2009; CASTRO; LIMA, 2010).

Quimicamente, a maioria dos óleos essenciais é constituída de mais de 60 constituintes individuais (LIMA et al., 2006), e isto interfere diretamente sobre sua atividade. Os óleos possuem constituintes que são derivados fenilpropanóides ou de terpenóides, sendo estes amplamente distribuídos na natureza (SPITZER, 2004).

Os compostos terpenóides têm sua origem biossintética das unidades do isopreno, que por sua vez é originado a partir do ácido mevalônico (SPITZER, 2004).

Os compostos terpênicos são divididos, de acordo com o número de carbono (C) em suas moléculas, em isoprenos (5C), monoterpenos (10C), sesquiterpenos (15C); diterpenos (20C); sesterpenos (25C); triterpenos (30C); tetraterpenos (40C) e polisoprenóides (nC) (Figura 23) (SPITZER, 2004).

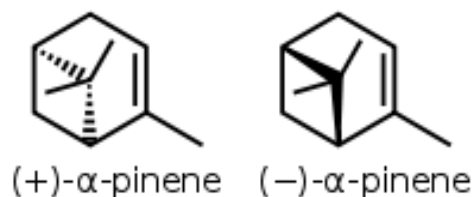
Figura 23 – Compostos terpênoides.

Nº de Unid.	Número de átomos de carbono	Nome ou classe
1	5	isopreno
2	10	monoterpenóides
3	15	sesquiterpenóides
4	20	diterpenóides
5	25	sesterpenos
6	30	triterpenóides
8	40	tetraterpenóides
n	n	polisoprenóides

Fonte: SPITZER, 2004.

O alfa-pineno (Figura 24) é um terpeno (BAKKALI et al., 2008), constituinte de vários óleos essenciais, e em alguns casos, correspondem ao constituinte majoritário.

Figura 24 – Molécula do  $\alpha$ -pineno



Fonte: SILVA, A. C. R., et al., 2012.

Celedonio (2008) comprovou a atividade antiedematogênica e efeito antinociceptivo periférico do alfa-pineno e do óleo essencial de *Croton argyrophylloides*, o qual é um dos constituintes majoritários. Fortes e colaboradores (2006) comprovaram a ação antimicrobiana do óleo essencial de *Croton argyrophylloides* em cepas de *Streptococcus* sp., *Serratia* sp., *Staphylococcus* sp., *Proteus mirabilis*, *Enterobacter* sp. e *Pseudomonas aeruginosa*.

A literatura ainda relata o alfa-pineno como constituinte majoritário no óleo essencial de *Croton glutinosus*, mostrando atividade antimicrobiana moderada em cepas de bactérias Gram positivas (*S. aureus* e *B. subtilis*) (GOMES, 2010).

Segundo Martins e colaboradores (2003), o óleo essencial da casca de *Santiria trimera* é usada na medicina tradicional por curandeiros na cicatrização de feridas, tem como constituinte majoritário o alfa-pinene (66,6%). Este óleo foi analisado frente a cepas de *Echerichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Cladosporium cladosporioides*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus fumigatus* e possuiu comprovada atividade antimicrobiana, exceto contra cepas de *Staphylococcus epidermidis* e *Aspergillus niger*. Neste mesmo estudo, foi avaliada a atividade antimicrobiana do alfa-pineno isoladamente, e este produziu inibição do crescimento microbiano nas cepas testadas, exceto em *Enterococcus faecalis* e *Aspergillus niger*.

Lima e colaboradores (2005) avaliaram a ação dos monoterpenos  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -pineno, mostrando uma atividade antifúngica satisfatória frente às espécies de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. stellatoidea*, *C. guilhermondii*, *C. krusei* e *Cryptococcus neoformans*.

De acordo com Gundidza e colaboradores (2008), um dos constituintes majoritários do óleo essencial das folhas de *Rhus lancea* L. F é o alfa-pineno (86,95%). Neste estudo comprovaram a ação antimicrobiana deste óleo sobre *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* e *Aspergillus flavus*, e os autores associam a atividade antimicrobiana a elevada concentração do monoterpeno.

Garcia e colaboradores (2008) avaliaram a ação dos monoterpenos  $\alpha$ -pineno e o citral, no qual obtiveram como resultados uma ótima atividade fungicida quando colocados frente aos fungos *Colletotrichum musae*, *Colletotrichum gloeosporioides* e *Fusarium subglutinans* f.sp ananás.

Yang Jiang e colaboradores (2011) avaliaram o óleo essencial de *Rosmarinus officinalis*, popularmente conhecido como alecrim, e seus constituintes majoritários, o 1,8-Cineol (26,54%) e o alfa-pineno (20,14%). E concluíram sua atividade antimicrobiana sobre cepas de *S. epidermidis*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *P. vulgaris*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *C. albicans* e *A. niger*.

As atividades antimicrobianas do  $\alpha$ -pineno isolado ou contido nos óleos essenciais têm sido estudadas e comprovadas por pesquisadores. Entretanto, não

existem pesquisas que comprovem sua atividade frente a cepas de *Rhizopus* sp., que é o principal agente etiológico das mucormicoses, considerada a terceira infecções fúngicas oportunistas mais frequentes (PRABHU; PATEL, 2004).



*Metodologia*

### 3 METODOLOGIAS

#### 3.1 Avaliação da atividade antifúngica

##### 3.1.1 Local da pesquisa

As atividades desta pesquisa foram realizadas no Laboratório de Micologia DCF/CCS/UFPB.

##### 3.1.2 Produtos sintéticos

O produto  $\alpha$ -pineno (Sigma-Aldrich) foi obtido comercialmente.

##### 3.1.3 Espécies fúngicas

Foram utilizadas cepas LM-03, LM-04, LM-25, LM-28, LM-29, LM-508, LM-766 e LM-810 de fungos filamentosos do gênero *Rhizopus* pertencentes à Coleção do Laboratório de Micologia da Universidade Federal da Paraíba-UFPB.

##### 3.1.4 Meio de cultura

Os meios de cultura utilizados nos ensaios para avaliação da atividade antifúngica foram o meio sólido ágar Sabouraud dextrose (ASD) e o meio líquido caldo Sabouraud dextrose (CSD) adquiridos da Difco<sup>®</sup>, preparado de acordo com as instruções do fabricante. Para conservação das cepas e preparação do inóculo foi utilizado o ágar batata, também adquirido da Difco<sup>®</sup>. Os meios foram solubilizados com água destilada e esterilizados em autoclave, a 121°C por 15 minutos.

##### 3.1.5 Antifúngico-padrão

Para o controle positivo da atividade antifúngica do  $\alpha$ -pineno testado, foi utilizada a anfotericina B (AMB) obtida do Centro de Controle e Produtos para Diagnósticos LTDA (CECON/SP).

##### 3.1.6 Inóculo

Na preparação do inóculo dos fungos, primeiramente as cepas isoladas foram cultivadas em meio ágar Batata a 28°C por 5 dias, para atingirem um bom crescimento. As recentes colônias fúngicas ficaram devidamente cobertas com 5 mL de solução salina estéril (NaCl 0,85 % p/v). A mistura resultante de conídios e

fragmentos de hifas foi retirada e transferida para tubos de ensaio esterilizados. Em seguida, essas suspensões foram agitadas por 2 minutos com auxílio do aparelho Vortex. Após agitação, cada suspensão terá sua turbidez comparada e ajustada àquela apresentada pela suspensão de sulfato de bário do tubo 0,5 da escala McFarland, a qual corresponde a um inóculo de aproximadamente  $10^6$  unidades formadoras de colônias/mL (UFC/mL) (CLEELAND; SQUIRES, 1991; HADACEK; GREGER, 2000). A quantificação do inóculo foi confirmada por meio do plaqueamento de 0,01 mL das suspensões em ASD. As placas foram incubadas a 28°C e examinadas diariamente para a contagem das colônias nas placas, determinando as UFC em 1 mL.

### 3.1.7 Determinação da Concentração Inibitória Mínima

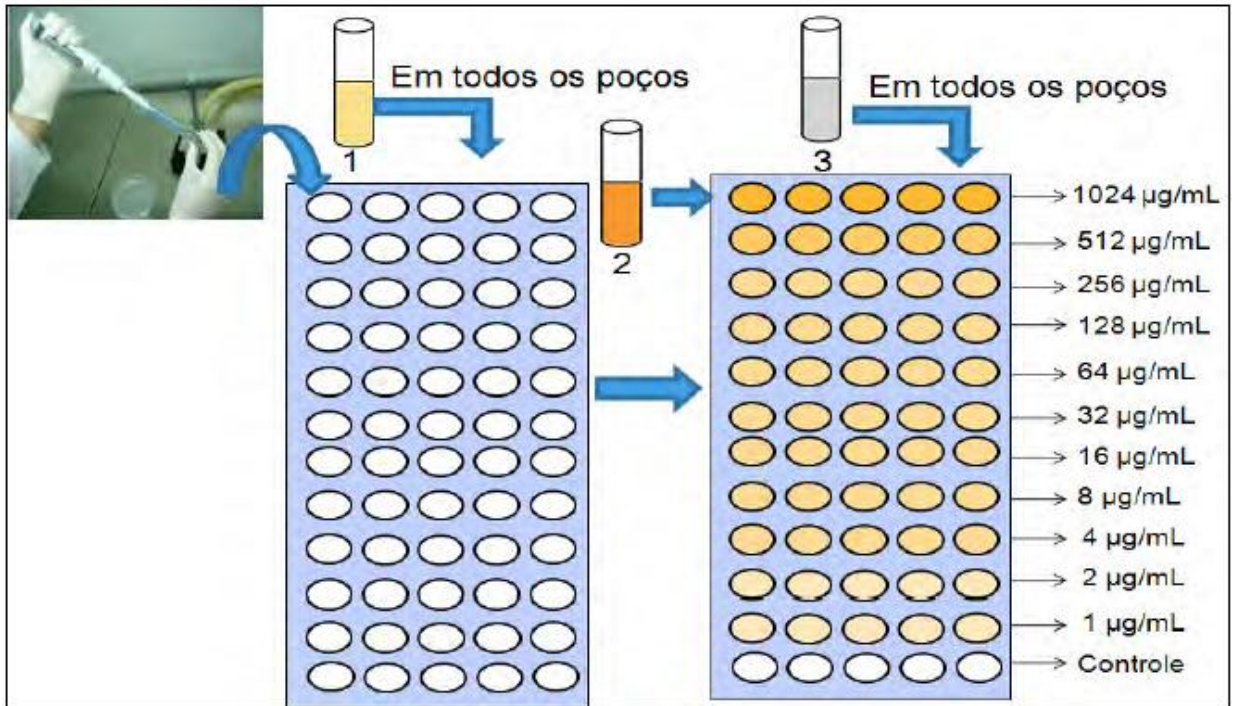
A determinação da CIM do fitoconstituente selecionado e da AMB foi realizada através da técnica da microdiluição em placas de 96 orifícios e fundo em “U”, conforme apresentado na figura 25 (ELLOF, 1998; SOUZA et al., 2007). Em cada orifício da placa, foi adicionado 100µL do meio líquido CSD duplamente concentrado. Em seguida, 100µL do fitoconstituente, também duplamente concentrado, este foi dispensado nas cavidades da primeira linha da placa e posteriormente foram diluídos seriadamente, à partir da retirada de uma alíquota de 100µL da cavidade mais concentrada para a cavidade sucessora, onde foram obtidas as concentrações de 1024 a 1 µL/mL, de modo que a primeira linha se encontra a maior concentração e na última, a menor concentração. Por fim, foi adicionado 10µL do inóculo das espécies (fungo a 0,5 McFarland) em cada uma das cavidades, onde as colunas representam diferentes cepas fúngicas.

O ensaio foi realizado em duplicata e incubado a 28°C durante 48 horas quando foi realizada a primeira leitura, a segunda leitura foi realizada com 72 horas após o início do experimento. A leitura foi procedida, visualmente, pela ausência ou presença de crescimento do microrganismo.

O controle de microrganismo foi realizado colocando-se nas cavidades 100µL do mesmo CSD duplamente concentrado, 100µL de água destilada estéril e 10µL do inóculo de cada cepa, para verificar a viabilidade das cepas.

Portanto, foi determinada como CIM, a menor concentração do produto capaz de inibir o crescimento do microrganismo ensaiado.

Figura 25 - Esquema representativo da microdiluição.



Legenda: 01) CSD; 02)  $\alpha$ -pineno ou AMB; 03) Inóculo. Fonte: MENDES, 2011.



*Resultados e discussão*

#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo, a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do fitoconstituente alfa-pineno frente a cepas de *Rhizopus oryzae*, não foi possível ser definida, como descrito na Tabela 1, pois mesmo na maior concentração preconizada pelos estudos *in vitro*, houve crescimento fúngico. O maior valor da CIM detectado pela metodologia utilizada é de 1024 µg/mL.

A anfotericina B foi utilizada na determinação da CIM como controle positivo e o valor de sua CIM foi de 4,0µg/mL (Tabela 6).

Tabela 6 - Resultado da CIM (Concentração inibitória mínima) (n=2) em µg/mL do α-pineno e da Anfotericina B frente as cepas de *Rhizopus oryzae*.

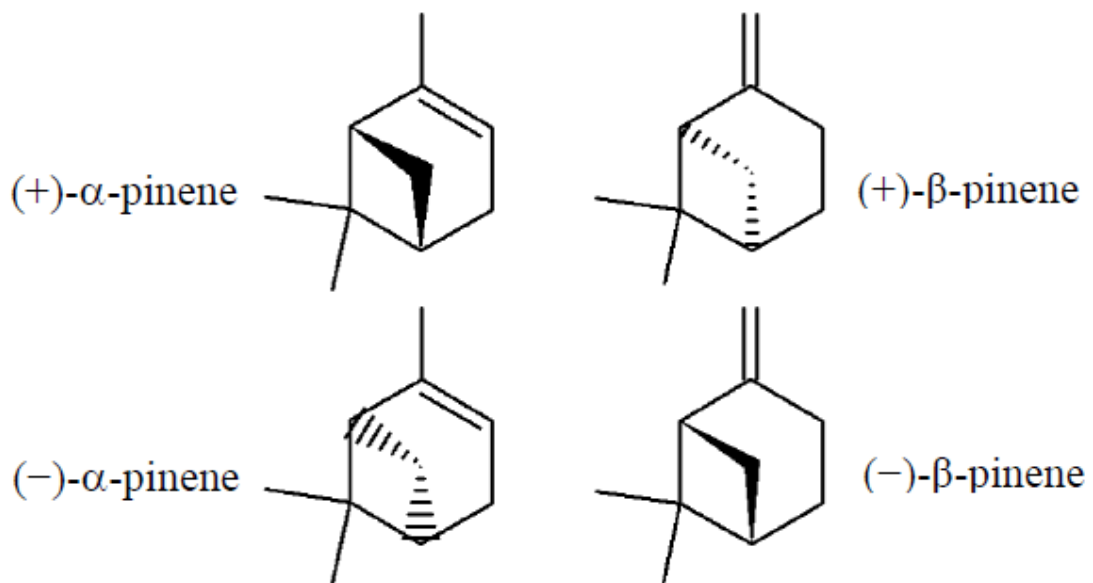
Cepas	Controle (Microrganismo)	Anfotericina B	Alfa-pineno
LM-03	+	4 µg/mL	+
LM-04	+	4 µg/mL	+
LM-25	+	4 µg/mL	+
LM-28	+	4 µg/mL	+
LM-29	+	4 µg/mL	+
LM-508	+	4 µg/mL	+
LM-766	+	4 µg/mL	+
LM-810	+	4 µg/mL	+

+: Houve crescimento do microrganismo em todas as concentrações testadas.

Segundo o estudo realizado por Motta e colaboradores (2012) que avaliaram o timol e o p-cimeno frente às mesmas cepas de *Rhizopus oryzae* utilizado no presente estudo. Constataram a eficiência do timol sobre as cepas testadas e a ineficiência do p-cimeno que obteve uma CIM superior a 1024µg/mL. A partir disto, consegue-se sugerir que o alfa-pineno também não produziu efeito antifúngico significativo sobre as cepas testadas.

Silva e colaboradores (2012) avaliaram a atividade do alfa-pineno e do beta-pineno sobre cepas de *C. albicans*, *C. neoformans*, *R. oryzae* e *S. aureus* resistente a metilina (MRSA), porém, os mesmos avaliaram os enantiômeros separadamente, ou seja, avaliaram a ação do (+)- $\alpha$ -pineno, (-)- $\alpha$ -pineno, (+)- $\beta$ -pineno e o (-)- $\beta$ -pineno (Figura 26) e concluíram que apenas os enantiômeros positivos do alfa-pineno e beta-pineno possuíam atividade antimicrobiana e os enantiômeros negativos não mostraram atividade até o valor de 20mg/mL.

Figura 26 – Fórmula estrutural dos enantiômeros do  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -pineno.



Fonte: Silva, A. C. R. et al., 2012.

Dessa forma, pode-se sugerir que a ausência de atividade antifúngica do alfa-pineno no presente estudo, mostrada através da técnica de microdiluição seriada, ocorreu em função da substância adquirida pela Sigma-Adrich ser uma mistura racêmica, ou seja, não há separação dos enantiômeros. Como apenas o enantiômero positivo é ativo, a combinação de ambos, produziu uma mistura com baixa atividade antifúngica.



*Considerações Finais*

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A mucormicose tem tido um grande destaque nas pesquisas científicas. Fato este explicado, pelo aumento da população com várias formas de imunossupressão crônicas e/ou graves, aumentando assim de forma significativa o número de casos dessa doença. A explosão de artigos publicados nesta temática teve um aumento vertiginoso.

A necessidade de novas estratégias terapêuticas, também estimulou a busca de produtos naturais, sejam eles óleos essenciais ou fitoconstituente, com atividade antifúngica, em especial contra ao gênero *Rhizopus* spp., por ser conhecidamente o gênero responsável pelo maior número de casos registrados da mucormicose.

Neste estudo, o alfa-pineno não produziu o efeito antifúngico esperado, então, sugere-se que estudos mais detalhados sejam realizados utilizando o  $\alpha$ -pineno com seus enantiômeros separadamente em busca da comprovação da atividade antifúngica deste monoterpeneo.

## REFERÊNCIAS

ÁLVAREZ-ÁLVAREZA, C. et al. Mucormicosis por *Rhizopus oryzae* en paciente con diabetes atípica. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica** v. 23, n. 9, p. 573-577, 2005.

BANSOD, S.; RAI, M. Antifungal activity of essential oils from Indian Medicinal plants against human pathogenic *Aspergillus fumigatus* and *A. niger*. **World Journal of Medical Sciences**, v. 3, n. 2, p. 81-88, 2008.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.

BARRETT, D.; From natural products to clinically useful antifungals. **Biochim Biophys Acta**, v. 1587, p. 224-233, 2002

BOELAERT, J. R. et al. Deferoxamine augments growth and pathogenicity of *Rhizopus*, while hydroxypyridinone chelators have no effect. **Kidney International**, v. 45, p. 667–671, 1994.

BOSSOLAN, N. R. S. **Introdução à microbiologia**, 2002. Disponível em: <http://biologia.ifsc.usp.br/bio4/outros/apostila.pdf> Acesso em: 21/03/2012

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

CELEDONIO, N. R. **Estudo do mecanismo de ação antinociceptivo e antiedematogênico do óleo essencial de *Croton argyrophyloides* e seus constituintes**: alfa-pineno e trans-cariofileno. 2008. 141f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas)-Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza.

CLEELAND, R.; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials "in vitro" and in experimental animal infections. In: LORIAN, V. M. D. **Antibiotics in Laboratory Medicine**. 3. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1991, p. 739-788.

CHAMI, N. et al. Antifungal treatment with carvacrol and eugenol of oral candidiasis in immunosuppressed rats. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 8, p. 217-226, 2004.

COLOMBO, A. L. Epidemiology and treatment of hematogenous candidiasis: a Brazilian perspective. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 4, p. 113-118, 2000.

CORDEIRO, R. A.; BRILHANTE, R. S. N.; SIDRIM, J. J. C.; Zigomicose e Hialo-Hifomicose. *In*: SIDRIM, J. J. C.; MOREIRA, J. L. B.; **Fundamentos clínico-laboratoriais da micologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 166-170, 1999.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J.; SNADER, K.M. Natural Products in Drug Discovery and Development. **Journal of Natural Products**, v. 60, p. 52-60, 1997.

COSTA, M. A. C.; JESUS, J. G.; FARIAS, J. G.; NOGUEIRA, J. C. M.; OLIVEIRA, A. L. R.; FERRI, P. H. Variação estacional do óleo essencial em arnica (*Lychnofora ericoides* Mart.). **Revista de Biologia Neotropical**, v. 5, p. 56-65, 2008.

DANNAOUI, E. et al. Activity of posaconazole in treatment of experimental disseminated zygomycosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, p. 3647–50, 2003.

DIOMEDI, A. P. Nuevos antifúngicos: Las equinocandinas. **Revista Chilena de Infectología** v. 21, n. 2, p. 89-101, 2004.

DUARTE, M. C. et al. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 305-311, 2005.

EDRIS, A. E. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 308-323, 2007

ELLOF, J. N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plants extracts for bacteria. **Planta Medica**, v. 64, p. 771-713, 1998.

ESTEVEZ, J.A., CABRITA, J. D.; NOBRE, G. N. **Micologia Médica**. 2.ed. Porto: Fundação Calouste Gulbenkian, 1990.

FEDRIZZI, S. M. G. **Produção de metabólitos antimicrobianos e sideróforos de isolados provenientes de Terra Preta Antropogênica da Amazônia Oriental**. 2006. 177f. Dissertação (Doutorado em Ciências). Universidade de São Paulo, Piracicaba..

FORTES, J. C.; GUEDES, M. I. F. atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Croton argyrophyloides* muell arg e de frações isoladas dos extratos de *Astronium urundeuva* (Allemão) Engl. In: **Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência**, 58. 2006. Florianópolis. Anais... Florianópolis: SBPC, 2006.

GALVÃO, A. et al. Mucormicose pulmonar num doente transplantado renal. **Revista Portuguesa de Nefrologia e Hipertensão**, v. 19, n. 4, p. 225-231, 2005.

GARBER G. An overview of fungal infections. **Drugs**, v. 61, p. 1-12, 2001.

GARCIA, R. et al. Antimicrobial activity and potential use of monoterpenes as tropical fruits preservatives. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p.163-168, 2008.

GOMES, C. L. **Estudo Químico de *Croton muscicarpa* e *Croton glutinosus* Müll. Arg (Euphorbiaceae)**. 2010. 101f. Dissertação (Mestrado em Química – Concentração Química Orgânica)- Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

GOMPERTZ, O. F. et al. Biologia dos Fungos. In: **Diagnóstico Laboratorial em Micologia Médica**. Guanabara Koogan: São Paulo, 2009.

GONZALEZ, C. E; RINALDI, M. G.; SUGAR, A, M; Zygomycosis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v.16, p. 895-914, 2002.

GORJON, P. S. et al. Rhino-orbito-cerebral mucormycosis, a retrospective study of 7 cases. **Acta Otorrinolaringológica Española**, v. 61, n. 1, p. 48-53, 2010.

GREENBERG, R.N. et al. Zygomycosis (mucormycosis): Emerging clinical importance and new treatments. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 17, p. 517–525, 2004.

GOLAN, D. E. **Princípios de farmacologia: A Base Fisiopatológica da Farmacoterapia**. 2.ed. Guanabara Koogan, 2009.

GUNDIDZA, M. et al. Phytoconstituents and biological activities of essential Oil from *Rhus lancea* L. F. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 16, p. 2787-2789, 2008.

HABER, D. M. et al. Mucormicose Rino-Órbito-Cerebral Associada com Trombose do Seio Caveroso: Relato de Caso. **International Archives of Otorhinolaryngology**, v. 12, n. 4, p. 574-578, 2008.

HADACEK, F.; GREGER, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparatibility of results and assay choice. **Phytochemical Analysis**, v. 11, p. 137-147, 2000.

HEINZMANN, B. M.; BARROS, F. M. C. Potencial das plantas nativas brasileiras para o desenvolvimento de Fitomedicamentos tendo como exemplo lippia alba (mill.) N. E. Brown (verbenaceae). **Saúde, Santa Maria**, v. 33, n.1, p 43-48, 2007.

HENRY, J. B. **Diagnóstico clínico e tratamento por métodos laboratoriais**. 20.ed. Manole: São Paulo, 2008.

HIBBETT, D.S. et al. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycological Research**, v. 111, p. 509–47, 2007.

IBRAHIM, A. S. et al. Liposomal amphotericin B, and not amphotericin B deoxycholate, improves survival of diabetic mice infected with *Rhizopus oryzae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, p. 3343–3344, 2003.

IBRAHIM A. S. et al. Pathogenesis of mucormycosis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 54, n. 1, p. 16–22, 2012.

KAMBOJ, V. P. Herbal medicine. **Current Science**, v. 78, p. 35-39, 2000.

KAUFFMAN, C. A. Fungal Infections. **Proceedings of the American Thoracic Society**, v. 3, p. 35–40, 2006.

KONTOYIANNIS, D. P.; LEWIS, R. E. L. Invasive Zygomycosis: Update on Pathogenesis, Clinical Manifestations, and Management. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 20 p. 581–607, 2006.

KONTOYIANNIS, D. P. et al. Future Directions in Mucormycosis Research. **Clinical Infectious Diseases**, v. 54, n. 1, p. 79–85, 2012.

KOK, J. et al. Early use of posaconazole in the successful treatment of rhino-orbital mucormycosis caused by *Rhizopus oryzae*. **Journal of Infection**, v. 55, p. 33-36, 2007.

LANIADO, L. R.; CABRALES, V. M. N. Amphotericin B: side effects and toxicity. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 26, p. 223-227, 2009.

LEITE, M. V. **Fungos Filamentosos do lodo de esgoto: Impacto na microbiota fúngicas e potencial enzimático**. 2009. 65f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais)- Universidade Católica de Pernambuco, Recife.

LIMA, I. O. et al. Inhibitory effect of some phytochemicals in the growth of yeasts potentially causing opportunistic infections. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, n. 2, p. 199-203, 2005.

LIMA, I. O. et al. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 16 n. 2, p. 197-201, 2006.

MACIEL, A. A. M. et al. Medicinal plants: the need for multidisciplinary scientific studies. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MARCIEL, C. C. S.; CÂNDIDO, H. R. L. F. Infecção Hospitalar: Principais Agentes e Drogas Administradas. **Revista Eletrônica de Ciências - Veredas Favip**, v. 3, n. 1, 2010.

MARTINS, A. P. et al. Essential Oil Composition and Antimicrobial Activity of *Santiria trimera* Bark. **Planta Medica** v. 69, n. 1, p. 77-79, 2003.

MENDES, J. M. **Investigação da atividade antifúngica do óleo essencial de Eugenia caryophyllata Thunb. Sobre cepas de Cândida Tropicalis**. 2011. 74f. Dissertação (Mestrado em Produtos naturais e Sintéticos Bioativos – Concentração: Farmacologia) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

MOTA, K. S. L. et al. Antifungal Activity of *Thymus vulgaris* L. Essential Oil and Its Constituent Phytochemicals against *Rhizopus oryzae*: Interaction with Ergosterol. **Molecules** v. 17, p. 14418-14433, 2012.

MYCOLOGY ONLINE DA UNIVERSIDADE DE ADELAIDE NA AUSTRÁLIA. Disponível em: <<http://www.mycology.adelaide.edu.au/gallery/zygomycetes/>> Acesso em: 17/07/2012.

NUCCI, M. et al. Epidemiology of Opportunistic Fungal Infections in Latin America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 51, n. 5, p. 561–570, 2010.

OGAWA, T. et al. Successful treatment of rhino-orbital mucormycosis by a new combination therapy with liposomal amphotericin B and micafungin. **Auris Nasus Larynx**, v. 39, p. 224–228, 2012.

PEREIRA, F. O. **Atividade antifúngica do óleo essencial de *Cymbopogon wintwrianus* Jowitt ex Bor sobre dermatófitos do gênero *Trichophyton***. 2009. 117f. Dissertação (Mestrado em Produtos naturais e Sintéticos Bioativos – Concentração: Farmacologia) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

PEREIRA, F. O. et al. Effects of *Cymbopogon wintwrianus* Jowitt ex Bor essential oil on the growth and morphogenesis of *Trichophyton mentagrophytes*. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, p. 154-153, 2011.

PERFECT, J. R. Treatment of non-Aspergillus moulds in immunocompromised patients, with amphotericin B lipid complex. **Clinical Infectious Diseases**, v. 40, n. 6 p. 401–408, 2005.

PFALLER, M. A. Nosocomial candidiasis: emerging species, reservoirs, and modes of transmission. **Clinical Infectious Diseases**, v. 22, n. 2, p. 89-94, 1996.

PRABHU, R. M.; PATEL, R. Mucormycosis and entomophthoromycosis: a review of the clinical manifestations, diagnosis and treatment. **Clinical Microbiology and Infection** v. 10, p. 31–47, 2004.

PEMÁN, J.; SALAVERT, M. Epidemiología general de la enfermedad fúngica invasora. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 30, n. 2, p. 90–98, 2012.

PETRIKKOS G. et al. Epidemiology and clinical manifestations of mucormycosis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 54, n.1, p. 23–34, 2012.

PORTO, E. et al. Zígomose sistêmica (mucormicose) provocada por *Rhizopus Oryzae* - Registro de um caso em paciente diabético. **Anais brasileiros de Dermatologia**, v. 61, n. 2, p. 97-102, 1986.

PRATA, A. C. B. **Diagnóstico Laboratorial de Micoses Humanas – Métodos Convencionais vs Métodos Moleculares**. 2007. 244f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade de Aveiro, Portugal, Aveiro.

RIBES, J. A.; VANOVER-SAMS, C. L.; BAKER, D. J. Zygomycetes in Human Disease. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n.2, p. 236, 2000.

RODEN, M.M. et al. Epidemiology and outcome of zygomycosis: a review of 929 reported cases. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, p. 634–653, 2005.

ROGERS, T. R. Treatment of mucormycosis: current and new options. **Journal Antimicrobial Chemother**, v. 61, n. 1, p 35–39, 2008.

RÜPING, M. J. et al. Forty-one recent cases of invasive zygomycosis from a global clinical registry. **Journal Antimicrobial Chemother**, v. 65, p. 296–302, 2010.

RXLIST: the internet drug index. Disponível em: <<http://www.rxlist.com/noxafil-drug.htm>> Acesso em: 28/11/2012.

SAMPAYO, C. **Fármacos antifúngicos**. Disponível em: <[http://xa.yimg.com/kq/groups/23319928/1355357798/name/Anti\\_Fungos\\_Parasitasf.pdf](http://xa.yimg.com/kq/groups/23319928/1355357798/name/Anti_Fungos_Parasitasf.pdf)> Acessado em: 28/11/2012

SANTANA, N. O. R. et al. Mucormicose de seios paranasais e órbitas em paciente imunocompetente: relato de caso e revisão de literatura. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 67, n. 5, 2001.

SEVERO, C. B.; GUAZZELLI, L. S.; SEVERO, L. C. Zigomicose: Capítulo 7. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 36 n. 1, p. 134-141, 2010.

SILVA, A. C. R. et al. Biological Activities of  $\alpha$ -pinene and  $\beta$ -pinene Enantiomers. **Molecules**, 17, p. 6305-6316, 2012.

SHU, Y. Z. Recent Natural Products Based Drug Development: A Pharmaceutical Industry Perspective. **Nature Products**, v. 61, p. 1053-1071, 1998.

SOUZA, E. L. et al. Effectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. **Food Control**, v. 18 p. 409-413, 2007.

SPELLBERG, B.; EDWARDS JR, J.; IBRAHIM, A. Novel perspectives on Mucormycosis: Pathophysiology, Presentation and Management. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, n. 3, p. 556-569, 2005.

SPERLLBERG, B. et al. Recent Advances in the management of mucormycosis: from bench to bedside. **Clinical Infectious Diseases**, 48 p. 1743-1751, 2009.

SPITZER, C. M. O. S. V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS, 2004, p. 467-495.

URIBE, A. P. et al. Mucormicosis cutánea primaria em un paciente con virus de la inmunodeficiencia humana. **Revista Iberoamericana Micología**; v. 22, p. 118-121, 2005.

YANG JIANG. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. **Environmental Toxicology and Pharmacology** , v. 32, n. 1, p. 63–68, 2011.

WALSH, T. J. et al. Infections due to emerging and uncommon medically important fungal pathogens. **Clinical Microbiology and Infection**, v.10, n. 1, p. 48–66, 2004.

WALSH, T. J. et al. Early Clinical and Laboratory Diagnosis of Invasive Pulmonary, Extrapulmonary, and Disseminated Mucormycosis (Zygomycosis) **Clinical Infectious Diseases**, v. 54, n. 1, p. 55–60, 2012.