

Universidade Federal da Paraíba
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos

KELLY SAMARA DE LIRA MOTA

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Thymus vulgaris* L. E
FITOCONSTITUINTES CONTRA *Rhizopus oryzae* e *Rhizopus microsporus*:
INTERAÇÃO COM ERGOSTEROL**

João Pessoa - PB

Março de 2013

KELLY SAMARA DE LIRA MOTA

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Thymus vulgaris* L. E
FITOCONSTITUINTES CONTRA *Rhizopus oryzae* e *Rhizopus microsporus*:
INTERAÇÃO COM ERGOSTEROL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento aos requisitos necessários para a obtenção do título de DOUTOR EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS. Área de concentração: FARMACOLOGIA.

Orientadora:

Profa. Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima

João Pessoa - PB

Março de 2013

M917a Mota, Kelly Samara de Lira.

Atividade antifúngica do óleo essencial de Thymus vulgaris L. e fitoconstituintes contra Rhizopus oryzae e Rhizopus microsporus: interação com ergosterol / Kelly Samara de Lira Mota.-- João Pessoa, 2013.

128f. : Il.

Orientadora: Edeltrudes de Oliveira Lima

Tese (Doutorado) – UFPB/CCS

KELLY SAMARA DE LIRA MOTA

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Thymus vulgaris* L. E
FITOCONSTITUINTES CONTRA *Rhizopus oryzae* e *Rhizopus microsporus*:
INTERAÇÃO COM ERGOSTEROL**

APROVADA EM 11/03/2013

BANCA EXAMINADORA:

**Profa. Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima
(Universidade Federal da Paraíba)
Orientadora**

**Prof. Dr. Henrique Douglas Melo
(Universidade Regional do Cariri)
Examinador Externo**

**Prof. Dr. Fábio Correia Sampaio
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinador Externo**

**Profa. Dra. Marianna Vieira Sobral
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinadora Interna**

**Profa. Dra. Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinadora Interna**

“Agradece à família em que nasceste; ela é valiosa seção do grande educandário da Terra, em que a Providência Divina te matriculou para estágio transitório no serviço de teu próprio aperfeiçoamento.”

João Augusto Chaves

Dedico este trabalho...

À minha mãe, companheira e amiga, dedico por todo o amor, carinho e compreensão, pelo apoio incondicional em todas as minhas decisões, por sempre me mostrar a importância dos estudos e por tudo que representa em minha vida.

...À minha família, alicerce que me ampara em todos os momentos da minha vida, que mesmo à distância, no decorrer desta caminhada, se fazem presentes, pelo amor, dedicação e incentivo.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima pela orientação e confiança, pelos ensinamentos e conselhos imprescindíveis na realização deste trabalho, um exemplo de professora e orientadora a ser seguido, pela dedicação ao ensino, à pesquisa e aos seus alunos.

Aos professores que participaram da banca de qualificação e defesa Profa. Dra. Hilzeth de Luna Freire Pessôa, Profa. Dra. Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz, Prof. Dr. Fábio Correia Sampaio, Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida, Profa. Dra. Marianna Vieira Sobral Castello Branco, Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho, Profa. Dra. Maria de Fátima Vanderlei de Souza e Prof. Dr. Fábio Santos de Souza não somente por terem aceito o nosso convite, mas principalmente pelas valiosas contribuições e orientações.

A Profa. Dra. Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz e Profa. Dra. Marianna Vieira Sobral Castello Branco, bem como todos que participam do LABETOX, por terem cedido o ambiente de trabalho para que fosse possível a execução da toxicidade aguda.

A toda a equipe do Laboratório de Micologia, especialmente a Profa. Dra. Zélia B. V. S. Pontes e Maria de Fátima F. P. Carvalho pelo espaço no Laboratório, pelo auxílio e orientações.

Aos amigos e companheiros de bancada Juliana Moura Mendes, Igara O. Lima, Wylly A. Oliveira e Guilherme Eduardo Nunes Dias. Agradeço pela dedicação e ajuda nos experimentos, mas acima de tudo, pelo apoio constante, amizade e pelos momentos de descontração e alegria.

Agradeço em especial ao grande amigo e companheiro, Fillipe de Oliveira Pereira pela dedicação e orientação constantes em todas as etapas da realização deste trabalho, mas acima de tudo, pelo ombro amigo sempre disposto a escutar e apoiar em todos os momentos, um companheiro de longas datas.

À minha turma de doutorado, agradeço pela qualidade das discussões nas aulas, orientações, pelo companheirismo e apoio.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, agradeço pela imensa capacidade intelectual e qualidade das aulas, que contribuíram para minha formação profissional e pessoal.

Não poderia me esquecer de meus amigos de graduação e de infância que mesmo de longe me acompanharam e estão comigo até hoje. Agradeço por ser o meu refúgio, minha força, pelo companheirismo e incentivo, essenciais, principalmente nas horas mais difíceis.

À Secretaria e Coordenação do PgPNSB, pela pronta disponibilidade em auxiliar e orientar os alunos sempre que precisaram.

Ao apoio técnico de Luís Cordeiro, Adriano Cordeiro, em especial a José Crispim Duarte, pela amizade e por ensinar a melhor forma a manusear os animais, indispensável para realização deste trabalho.

À Universidade Federal da Paraíba, ao PgPNSB, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pelo apoio financeiro, pela grande capacidade de formar recursos humanos e pelo suporte técnico-científico através da manutenção do periódico CAPES.

Não é no silêncio que os homens se fazem, mas na palavra, no trabalho, na ação-reflexão

Paulo Freire

Atividade antifúngica do óleo essencial de *Thymus vulgaris* L. e fitoconstituintes contra *Rhizopus oryzae* e *Rhizopus microsporus*: interação com ergosterol. MOTA, K. S. L. 2013. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, área de concentração: Farmacologia) - CCS/ UFPB, João Pessoa.

RESUMO

As mucormicoses são infecções que possuem elevadas taxas de morbidade e mortalidade, limitado arsenal terapêutico, devido a resistência aos antifúngicos. Portanto, existe uma significativa necessidade de priorizar, testar e aplicar melhorias terapêuticas para o tratamento das mucormicoses. É nesse contexto, que os óleos essenciais e fitoconstituintes vem se destacando como uma nova abordagem terapêutica. O objetivo deste trabalho foi investigar a atividade antifúngica *in vitro* do óleo essencial (OE) de *Thymus vulgaris* L. e de seus componentes majoritários (timol e *p*-cimeno) contra *Rhizopus oryzae* e *Rhizopus microsporus*, através da triagem microbiológica, da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e fungicida mínima (CFM), avaliação dos efeitos dos fitoconstituintes no crescimento micelial, na germinação dos esporos fúngicos, na morfologia fúngica e interação com ergosterol. Também foi avaliada a toxicidade pré-clínica aguda em camundongos. Na triagem microbiológica o óleo essencial de *T. vulgaris* apresentou um dos melhores perfis antifúngicos contra cepas resistentes de *R. oryzae*. A CIM dos produtos variou entre 128-512 µg/mL, já as CFMs do óleo essencial e timol variaram entre 512-1024 µg/mL e 128-1024 µg/mL, respectivamente. Os resultados também mostraram que tanto o OE como o timol inibiram significativamente o desenvolvimento micelial e a germinação de esporos de ambas as espécies de *Rhizopus*. Em seguida foi mostrado que os produtos testados alteram a morfologia de *R. oryzae* e *R. microsporus*. Na investigação do mecanismo de ação antifúngica foi evidenciado que o OE e o timol interagem com o ergosterol, esterol presente na membrana dos fungos. No ensaio toxicológico pré-clínica agudo, as doses de 125, 250, 500 e 1000 mg/kg via intraperitoneal (i.p.) apresentaram atividade depressora do sistema nervoso central (SNC). Adicionalmente a estes parâmetros foi evidenciado que o OE e o timol nas doses de 125 e 250 mg/kg não promoveram alterações significativas na evolução ponderal e peso dos órgãos dos camundongos. Entretanto, ambas as doses das drogas-teste alteram alguns parâmetros hematológicos dos camundongos. Após 72 h de observação o OE apresentou DL₅₀ estimada em 250 mg/kg para camundongos machos e 459,6 mg/kg para as fêmeas. Já o timol apresentou DL₅₀ estimada em 222,3 mg/kg para os machos e 1551 mg/kg para as fêmeas. Estes dados indicam que o óleo essencial de *T. vulgaris* e timol, apresentam forte atividade antifúngica, que pode estar relacionada com a interação com ergosterol e consequentemente lise de membrana.

Palavras-chave: Lamiaceae, *Thymus vulgaris*, timol, *Rhizopus*, atividade antifúngica e óleos essenciais.

Antifungal activity of *Thymus vulgaris* L. essential oil and phytoconstituents against *Rhizopus oryzae* e *Rhizopus microsporus*: interaction with ergosterol. MOTA, K. S. L. 2013. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, área de concentração: Farmacologia) - CCS/UFPB, João Pessoa.

ABSTRACT

Mucormycoses are infections that have high rates of morbidity and mortality. They show high resistance to antifungal agents, and there is a limited therapeutic arsenal currently available, therefore, there is a great need to give priority to testing therapeutic agents for the treatment of mucormycosis. Along this line, the use of essential oils and phytoconstituents has been emphasized as a new therapeutic approach. The objective of this work was to investigate the antifungal activity of the essential oil (EO) of *Thymus vulgaris*, and its constituents thymol and *p*-cymene against *Rhizopus oryzae* and *Rhizopus microsporus*, through microbiological screening, determination of minimal inhibitory concentration (MICs) and minimal fungicidal concentration (MFCs), effects on mycelial growth and germination of sporangiospores, fungal morphology and interaction with ergosterol. Also was evaluated the preclinical acute toxicity in mice. In microbiological screening the *T. vulgaris* essential oil showed antifungal potential against resistant strains of *R. oryzae*. The MIC of EO and thymol varied 128–512 µg/mL, but the MFC of EO and thymol varied 512–1024 µg/mL and 128–1024 µg/mL, respectively. The results also showed that EO and thymol significantly inhibited mycelial development and germination of sporangiospores of both species of *Rhizopus*. Investigation of the mechanism of antifungal action showed that EO and thymol interact with ergosterol. These data indicate that EO of *T. vulgaris* and thymol possess strong antifungal activity, which can be related to their interaction with ergosterol, supporting the possible use of these products in the treatment of mucormycosis. In preclinical acute toxicology the doses of 125, 250, 500 and 1000 mg/kg intraperitoneally (i.p.) showed depressive activity on the central nervous system (CNS). In addition to these parameters was observed that the doses of 125 and 250 mg/kg did not change the body and organs weight of the animals, but it was observed change some of the hematological parameters of the mice. The EO showed DL₅₀ of 250 mg/kg for male and 459.6 mg/kg for female; however the thymol showed DL₅₀ of 222.3 mg/kg for male and 1551 mg/kg for female. These data indicate that EO of *T. vulgaris* and thymol possess strong antifungal activity, which can be related to their interaction with ergosterol.

Keywords: Lamiaceae, *Thymus vulgaris*, thymol, *Rhizopus*, antifungal activity, essential oils.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Manifestações clínicas das mucormicoses A) rinocerebral, B) cutânea e C) gastrintestinal.....	24
Figura 2 - Características macromorfológicas de <i>R. oryzae</i> em Ágar batata. A) Micélio aéreo e B) micélio vegetativo.....	26
Figura 3 - Desenho esquemático demonstrando as características micromorfológicas de <i>Rhizopus spp.</i>	26
Figura 4 - Fotomicrografia demonstrando as características micromorfológicas de <i>R. oryzae</i> (A e B).....	27
Figura 5 - Fotomicrografia demonstrando as características micromorfológicas de <i>R. microsporus</i> (A e B).....	27
Figura 6 - Alvos terapêuticos para o tratamento das mucormicoses.....	29
Figura 7 - Mapa mostrando a distribuição mundial da família Lamiaceae.....	39
Figura 8 - Fotos de <i>Thymus vulgaris</i> L. A) planta inteira, B) detalhes das flores e C) folhas e flores.....	40
Figura 9 - Estruturas químicas dos fitoconstituintes majoritários de <i>T. vulgaris</i> A) timol e B) <i>p</i> -cimeno.	42
Figura 10 - Determinação da CIM do timol em µg/mL.....	50
Figura 11 - Avaliação do óleo essencial de <i>T. vulgaris</i> , timol e anfotericina B sobre o crescimento radial de <i>R. oryzae</i> e <i>R. microsporus</i>	52
Figura 12 - Teste de suscetibilidade de cepas de <i>R. oryzae</i> RO-4557 (A) e <i>R. microsporus</i> RM-5266 (B) frente aos antifúngicos padrão.....	58
Figura 13 - Efeito do óleo essencial de <i>T. vulgaris</i> , timol e anfotericina B sobre a produção micelial de <i>R. oryzae</i> RO-4557 (A) e <i>R. microsporus</i> RM-5266 (B)....	68

Figura 14 - Crescimento de <i>R. oryzae</i> no período de 8 horas (A), 16 horas (B), 24 horas (C) e 48 horas (D).....	69
Figura 15 - Crescimento de <i>R. microsporus</i> no período de 8 horas (A), 16 horas (B), 24 horas (C) e 48 horas (D).....	69
Figura 16 – Efeito do óleo essencial de <i>T. vulgaris</i> (A), timol (B) e anfotericina B (C) sobre a cinética do crescimento micelial de <i>R. oryzae</i> (RO-4557).....	71
Figura 17 – Efeito do óleo essencial de <i>T. vulgaris</i> (A), timol (B) e anfotericina B (C) sobre a cinética do crescimento micelial de <i>R. microsporus</i> (RM-5266).....	72
Figura 18 - Efeito do óleo essencial de <i>T. vulgaris</i> , timol e anfotericina B sobre a germinação dos esporangiósporos de <i>Rhizopus oryzae</i> RO-4557 (A) e <i>Rhizopus microsporus</i> RM-5266 (B).	74
Figura 19 - Efeito do óleo essencial de <i>T. vulgaris</i> , timol e anfotericina B sobre a micromorfologia de <i>R. oryzae</i> (RO-4557).....	76
Figura 20 - Efeito do óleo essencial de <i>T. vulgaris</i> , timol e anfotericina B sobre a micromorfologia de <i>R. microsporus</i> (RM-5266).....	77
Figura 21 - Presença de clamidoconídios em <i>R. microsporus</i> (RM-5266) na presença de A) 128 µg/mL do óleo essencial, B) 128 µg/mL do timol, C) 1 µg/mL e D) 2 µg/mL de anfotericina B.....	78

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Agentes etiológicos das zigomicoses.....	21
Quadro 2 - Fatores predisponentes para os pacientes desenvolverem zigomicoses.....	22
Quadro 3 - Antifúngicos de primeira linha para o tratamento das mucormincoses.....	33
Quadro 4 - Terapia combinada com antifúngicos de primeira linha para o tratamento das mucormincoses.....	34
Quadro 5 - Perfil fitoquímico do óleo essencial de <i>T. vulgaris</i>	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Suscetibilidade de cepas de <i>R. oryzae</i> e <i>R. microsporus</i> frente a cinco antifúngicos padrão.....	59
Tabela 2 - Atividade antifúngica de óleos essenciais frente cepas de <i>R.oryzae</i>	60
Tabela 3 - Efeito da atividade fungicida e fungistática em µg/mL do óleo essencial de <i>T. vulgaris</i> , timol e <i>p</i> -cimeno frente cepas de <i>R. oryzae</i> e <i>R. microsporus</i>	63
Tabela 4 - Efeito da anfotericina B, do óleo essencial de <i>T. vulgaris</i> e timol frente cepas de <i>R. oryzae</i> e <i>R. microsporus</i> na ausência e na presença de esteróis.....	80
Tabela 5 - Efeito da administração intraperitoneal de 125 mg/kg do óleo essencial de <i>T. vulgaris</i> e timol na evolução ponderal e peso dos órgãos, em camundongos.....	86
Tabela 6 - Efeito da administração intraperitoneal de 250 mg/kg do óleo essencial de <i>T. vulgaris</i> e timol na evolução ponderal e peso dos órgãos em camundongos.....	87
Tabela 7 - Efeito administração intraperitoneal de 125 mg/kg do óleo essencial de <i>T. vulgaris</i> e timol frente aos parâmetros hematológicos dos camundongos.....	88
Tabela 8 - Efeito administração intraperitoneal de 250 mg/kg do óleo essencial de <i>T. vulgaris</i> e timol frente aos parâmetros hematológicos dos camundongos.....	89

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ABD	Ágar batata dextrose
ASD	Ágar Sabouraud dextrose
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ANOVA	Análise de Variância
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CSD	Caldo Sabouraud Dextrose
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
DL ₅₀	Dose Letal 50%
DMSO	Dimetilsulfóxido
e.p.m.	Erro padrão da média
i.p.	intraperitoneal
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>
KOH	Hidróxido de potássio
LM	Laboratório de Micologia
n	Número de animais
pH	Potencial hidrogeniônico
PM	Peso molecular
RM	<i>Rhizopus microsporus</i>
RO	<i>Rhizopus oryzae</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
UFC	Unidades formadoras de colônias
UFC/mL	Unidades formadoras de colônias por mililitro
LogUFC/mL	Logarítmo de unidades formadoras de colônias por mililitro
Tween 80	Polioxetileno Sorbitano Monoleato
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
g	Gramas
h	Hora
µg	Micrograma

$\mu\text{g/mL}$	Micrograma por mililitro
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
mg/kg	Miligrama por quilograma
mL	Mililitro
mm	Milímetro
NaCl	Cloreto de sódio
$\%$	Percentual
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
p	Para

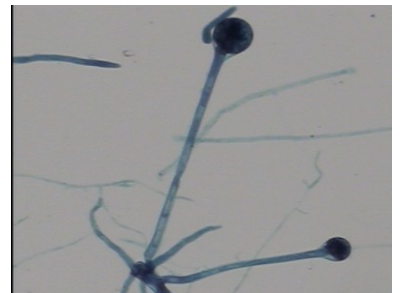
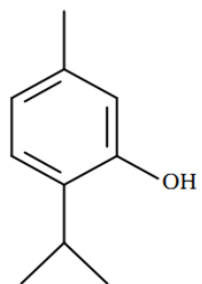
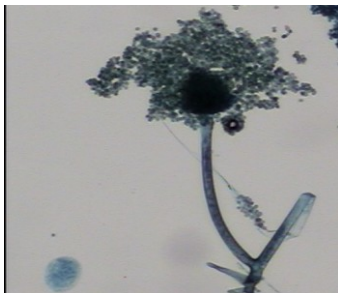
OBS.: As abreviaturas e os símbolos utilizados neste trabalho e que não constam nesta relação, encontram-se descritas no texto ou são convenções adotadas universalmente.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
1.1 Zigomicoses.....	19
1.2 <i>Rhizopus</i>	25
1.3 Tratamento das mucormicoses.....	28
1.4 Considerações gerais sobre plantas medicinais.....	37
1.5 Família Lamiaceae e <i>Thymus vulgaris</i> L.....	38
1.6 Fitoconstituintes do óleo essencial de <i>Thymus vulgaris</i>	41
 2 OBJETIVOS.....	 44
3.1 Objetivos gerais.....	44
3.2 Objetivos específicos.....	44
 3 MATERIAL E MÉTODOS.....	 46
3.1 MATERIAL.....	46
3.1.1 Local da pesquisa.....	46
3.1.2 Óleo essencial e fitoconstituintes.....	46
3.1.3 Antifúngico padrão.....	47
3.1.4 Meios de cultura.....	47
3.1.5 Microrganismos.....	47
3.1.6 Inóculo.....	48
3.1.7 Animais.....	48
3.2 MÉTODOS.....	49
3.2.1 Ensaio de atividade antifúngica.....	49
3.2.1.1 Teste de suscetibilidade antifúngica (triagem microbiológica).....	49
3.2.1.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM).....	49
3.2.1.3 Efeitos sobre o crescimento micelial.....	51
3.2.1.4 Crescimento radial.....	51
3.2.1.5 Efeitos sobre a germinação dos esporangiósporos fúngicos.....	52
3.2.1.6 Efeitos sobre a morfogênese.....	53
3.2.1.7 Interação com ergosterol e colesterol.....	54

3.2.2 AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA.....	54
3.2.2.1 Ensaio toxicológico pré-clínico agudo.....	54
3.3 Análise estatística.....	55
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
5 CONCLUSÕES.....	92
REFERÊNCIAS.....	94
ANEXOS.....	109
Anexo 1.....	110
Anexo 2.....	111
Anexo 3.....	112
Anexo 4.....	113

INTRODUÇÃO



1 INTRODUÇÃO

1.1 Zigomicoses

Os fungos são cada vez mais reconhecidos como patógenos importantes em pacientes criticamente enfermos. Durante a última década, as infecções fúngicas, principalmente as causadas por microrganismos oportunistas vem adquirindo importância clínica cada vez maior. Várias razões têm sido propostas para o aumento das infecções fúngicas invasivas, incluindo o uso de agentes antineoplásicos e imunossupressores, antibióticos de largo espectro, enxertos, cirurgias mais invasivas, pacientes com queimaduras, neutropenia, infecção por HIV e pancreatite (KAUFFMAN, 2006; ENOCH; LUDLAM; BROWN, 2006; CRUZ et al., 2007).

Na literatura, a incidência de infecções oportunistas em ambientes hospitalares está relacionada com fungos pertencentes aos gêneros *Candida*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Cryptococcus*, entre outros (HENNEQUIN, 1996; SINGH, 2003). Espécies do gênero *Candida* e *Cryptococcus* são as leveduras mais frequentemente isoladas na prática clínica. Já *Aspergillus* continuam sendo os fungos mais comuns que causam infecção invasiva, entretanto, tem havido um aumento significativo das infecções, devido a outros fungos ambientais, tais como *Scedosporium*, *Fusarium* e diversos zigomicetos, incluindo os fungos do gênero *Mucor* e, especialmente, *Rhizopus* (KAUFFMAN, 2006; ENOCH; LUDLAM; BROWN, 2006).

As zigomicoses são infecções causadas por fungos da classe Zygomycetes. Estes são fungos filamentosos pertencentes à duas ordens de importância clínica que causam infecções em humanos: a ordem Mucorales e Entomophthorales (Quadro 1) (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992; RIBES; VANOVER-SAMS; BAKER, 2000; PRABHU; PATEL, 2004). As características compartilhadas destes organismos incluem termotolerância e presença em habitats como solo e poeira. Os propágulos infecciosos (esporangiósporos) são inalados e, inicialmente, pode estabelecer uma infecção nos seios paranasais. Outras rotas de contaminação menos comuns incluem o trato intestinal após a ingestão dos esporos ou alimentos contaminados, bem como por inoculação através de incisões ou ferimentos penetrantes na pele (ROGERS, 2008).

A maioria das zigomicoses é causada pelos fungos da ordem Mucorales, cuja infecção é denominada como mucormicose. Cada vez mais os membros dessa ordem têm sido capazes de causar infecções oportunistas progressivas, necróticas e geralmente fatais, em uma variedade de hospedeiros imunocomprometidos, tais como pacientes com doenças hematológicas, com neutropenia, que fazem uso de corticosteroides, pacientes com diabetes mellitus, com ou sem cetoacidose, transplantados e pacientes com níveis elevados de ferro no soro (Quadro 2). Estes patógenos raramente causam infecções em pacientes imunocompetentes (RIBES; VANOVER-SAMS; BAKER, 2000; IBRAHIM; EDWARDS; FILLER, 2003; PRABHU; PATEL, 2004), visto que, em um indivíduo saudável, a imunidade inata pode impedir a germinação dos esporos fúngicos e o desenvolvimento da doença (CHAYAKULKEEREE; GHANNOUM; PERFECT, 2006).

Os gêneros da ordem Entomophthorales produzem uma infecção crônica denominada entomofthoromicose subcutânea, que acomete pacientes imunocompetentes, ocorrendo predominantemente em climas tropicais e subtropicais. Ao contrário de Mucorales, Entomophthorales não causam a infecção angioinvasiva (RIBES; VANOVER-SAMS; BAKER, 2000; PRABHU; PATEL, 2004).

A incidência das mucormicoses vem aumentando nos últimos anos, representando a terceira infecção fúngica invasiva mais comum, depois das candidíases e aspergiloses. No entanto, é a segunda mais comum infecção invasiva (após aspergilose) diagnosticada entre os pacientes que se submetem a transplante de células tronco nos Estados Unidos. Ela representa 8,3-13% de todas as infecções fúngicas de pacientes com problemas hematológicos (RODEN et al., 2005; LEWIS et al., 2012).

Durante a última década, os avanços nos métodos de diagnóstico e a introdução de novos agentes antifúngicos melhorou significativamente o prognóstico de pacientes que desenvolvem infecções fúngicas invasivas. Entretanto, as mucormicoses são infecções cada vez mais emergentes e potencialmente fatais, devido às elevadas taxas de morbidade e mortalidade (WALSH et al., 2004; KAUFFMAN, 2006; LEWIS et al., 2012). A mortalidade varia de acordo com a manifestação clínica da doença, representando 96% para a forma disseminada, 85% para infecção gastrointestinal e 76% para a pulmonar (RODEN et al., 2005).

Quadro 1 - Agentes etiológicos das zigomicoses.

Zygomycetes			
Ordem	Mucorales		Entomophthorales
Gênero	<i>Mucor</i>	Gênero	<i>Basidiobolus</i>
	Espécie <i>M. racemosus</i> , <i>M. circinelloides</i> <i>M. ramosissimus</i> <i>M. indicus</i> <i>M. hiemalis</i>	Espécie <i>B. ranarum</i>	
Gênero	<i>Rhizopus</i>	Gênero	<i>Conidiobolus</i>
	Espécie <i>R. arrhizus</i> (<i>R. oryzae</i>) <i>R. rhizopodiformis</i> <i>R. azygosporus</i> <i>R. stolonifer</i> <i>R. schipperae</i> <i>R. microsporus</i> var. <i>microsporus</i> <i>R. microsporus</i> var. <i>rhizopodiformis</i> <i>R. microsporus</i> var. <i>oligosporus</i>	Espécie <i>C. coronatus</i> <i>C. incongruus</i>	
Gênero	<i>Rhizomucor</i>		
Espécie	<i>R. pusillus</i>		
Gênero	<i>Absidia</i>		
Espécie	<i>A. corymbifera</i> <i>A. pophysomyces</i> <i>A. elegans</i>		
Gênero	<i>Cunninghamella</i>		
Espécie	<i>C. bertholletiae</i>		
Gênero	<i>Saksenaea</i>		
Espécie	<i>S. vasiformis</i>		
Gênero	<i>Cokeromyces</i>		
Espécie	<i>C. recurvatus</i>		

Fonte: Adaptado de Prabhu; Patel, (2004).

Quadro 2 - Fatores predisponentes para os pacientes desenvolverem zigomicoses.

Fatores de risco
Diabetes mellitus (tipo I e tipo II) com ou sem cetoacidose diabética
terapia com deferoxamina
Sobrecarga de ferro
Acidose metabólica crônica Envenenamento crônico por salicilatos Insuficiência renal
Pacientes imunodeficientes Neutropenia Transplante de órgãos ou de células hematopoiéticas Infecção pelo HIV
Imunossupressão farmacológica Quimioterapia antineoplásica Corticoterapia Terapia anti-rejeição
Doença hematológica maligna Leucemia Linfoma Mieloma múltiplo
Pele ou avaria dos tecidos moles Queimaduras Traumas Feridas cirúrgicas
Diverso Uso de drogas injetáveis ilícitas Desnutrição O uso prolongado de agentes antimicrobiano de amplo espectro

Fonte: Adaptado de Gonzalez; Rinaldi; Sugar, (2002) e Prabhu; Patel, (2004).

As principais formas de manifestações clínicas das zigomicoses (mucormicoses) incluem a rinocerebral, pulmonar, cutânea, gastrointestinal e disseminada ou sistêmica (ROGERS, 2008).

A mucormicose rinocerebral (Figura 1A) é uma infecção que se origina nos seios paranasais e se estende até o cérebro. Representa a manifestação clínica mais comum desta doença, pois ocorre em quase metade dos casos das mucormicoses relatados na literatura. *R. oryzae* é o principal agente etiológico para esta doença. Os primeiros sinais e sintomas podem incluir febre, mal estar, congestão nasal ou dor, corrimento nasal serosanguinolento, dor facial unilateral ou inchaço e dor de cabeça (CHAYAKULKEEREE; GHANNOUM; PERFECT, 2006). A taxa de mortalidade global é cerca de 62% e 16% nas infecções dos seios paranasais sem o envolvimento cerebral (RODEN et al., 2005).

A mucormicose pulmonar é mais frequentemente vista em pacientes com neoplasias hematológicas e neutropenia grave (SPELLPERG; EDWARDS; IBRAHIM, 2005). A doença pulmonar é a segunda manifestação mais comum, sendo que, cerca de 47% dos casos envolvem a infecção disseminada (TEDDER et al., 1994; RIBES; VANOVER-SAMS; BAKER, 2000). As manifestações clínicas da mucormicose pulmonar não podem ser facilmente distinguidas das apresentadas nos casos de aspergilose pulmonar. Os pacientes podem apresentar febre, dispnéia, tosse e dor no peito. A taxa de mortalidade global é de 76%, mas, é maior em pacientes severamente imunossuprimidos (SPELLPERG; EDWARDS; IBRAHIM, 2005; CHAYAKULKEEREE; GHANNOUM; PERFECT, 2006).

Os pacientes com elevado risco de desenvolver mucormicoses cutâneas (Figura 1B) são aqueles com ruptura da barreira cutânea normal de proteção. Os agentes etiológicos da mucormicose são tipicamente incapazes de penetrar a pele intacta. No entanto, queimaduras e ruptura traumática da pele, permitem que os fungos penetrem nos tecidos mais profundos (CHAYAKULKEEREE; GHANNOUM; PERFECT, 2006). Embora esta infecção seja frequente em pacientes com diabetes, leucemia e transplantados, é também a forma mais comum observada em hospedeiros normais e está associada com a menor taxa de mortalidade que é de 10% (RODEN et al., 2005). Entretanto, a doença cutânea e subcutânea pode levar a fascite necrotizante, com uma mortalidade aproximada de 80% (SPELLPERG; EDWARDS; IBRAHIM, 2005).

A mucormicose gastrointestinal (Figura 1C) afeta comumente o estômago, o cólon e o íleo. Casos de mucormicose hepática também têm sido associados com a ingestão de remédios fitoterápicos à base de plantas contaminadas (OLIVER et al., 1996). Os sintomas são variados e dependem do local afetado. Dor abdominal inespecífica e distensão associada a náuseas e vômitos são os sinais e sintomas mais comuns (SPELLPERG; EDWARDS; IBRAHIM, 2005). Embora rara, esta infecção é geralmente fatal, com mortalidade de cerca de 85% (RODEN et al., 2005).

Figura 1 - Manifestações clínicas das mucormicoses A) rinocerebral, B) cutânea e C) gastrointestinal.



Fontes: A) Cheema; Amin, (2007); B) Nouri-Majalan; Moghimi, (2008) e C) Mohta; Neogi; Das (2011).

Das formas de manifestações clínicas das mucormicoses induzidas por *Rhizopus spp*, a doença disseminada ou sistêmica é uma das mais comuns e extremamente fatal, com índice de mortalidade em torno de 96%, podendo envolver praticamente qualquer órgão do corpo, como a pele, sistema nervoso central, fígado, baço e rins. A maioria dos casos da doença disseminada envolve o pulmão ou sítios

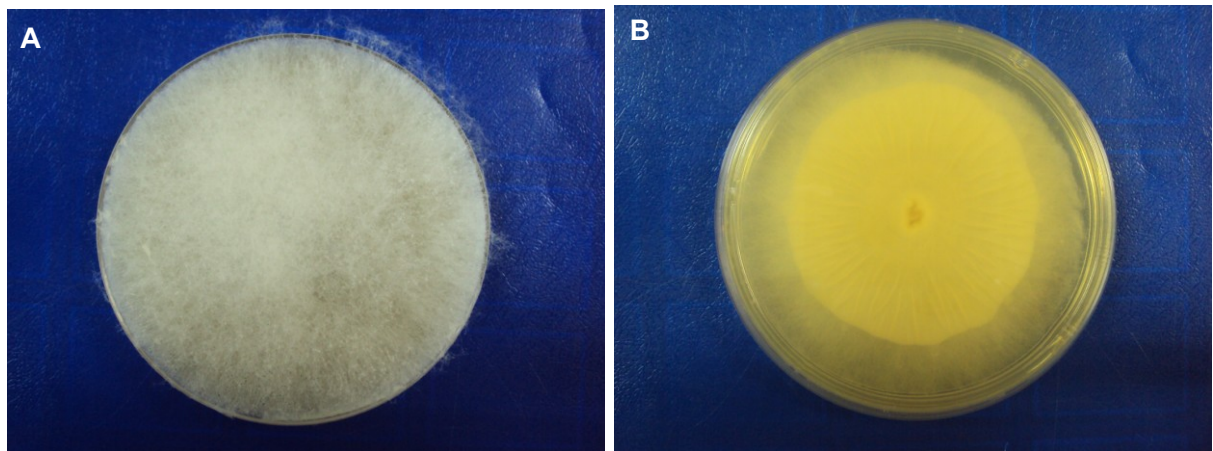
cutâneo e/ou subcutâneo como prováveis fontes primárias (TEDDER et al., 1994; RIBES; VANOVER-SAMS; BAKER, 2000).

1.2 *Rhizopus*

Os organismos mais comuns que causam mucormicoses em humanos são dos gêneros *Rhizopus*, *Mucor*, *Rhizomucor* e *Absidia*. Dentre tais gêneros destaca-se o *Rhizopus*, visto que, muitas de suas espécies causam mais de 70% das infecções por Zygomycetes (RIBES; VANOVER-SAMS; BAKER, 2000; GREENBERG et al., 2004). As espécies mais comuns que causam a mucormicose pulmonar angioinvasiva é *Rhizopus arrhizus* (*Rhizopus oryzae*), seguido por *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis* e *Rhizomucor pusillus*. *R. oryzae* é a causa mais frequente da forma rinocerebral desta infecção, enquanto *R. microsporus* var. *rhizopodiformis* produz principalmente as formas cutânea e gastrointestinal das zigomicoses (CHAYAKULKEEREE; GHANNOUM; PERFECT, 2006).

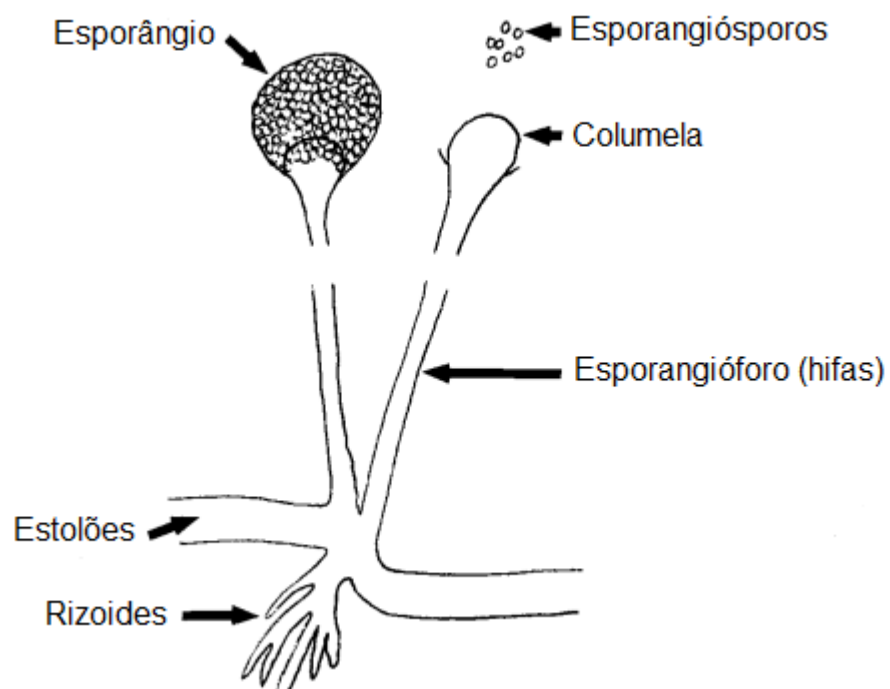
Rhizopus spp. são fungos que crescem rapidamente, em torno de 4 dias a temperatura de 37°C. Normalmente produzem uma colônia muito alta e fibrosa, que cresce rapidamente e encobre toda a superfície do Ágar. Tais colônias são de textura algodonosa, primeiramente brancas e com o decorrer do crescimento tornam-se acinzentadas ou amarronzadas, com abundantes esporângios pigmentados, que são vistos como as áreas escuras salpicando o micélio da outra forma pálida (Figura 2 A e 2 B). Já o aspecto microscópico de espécies deste gênero é de hifas largas (6-15 micrometros em diâmetro) não apresentando septos, ou muito poucos. Numerosos estolões são encontrados no micélio, conectando grupos de longos esporangióforos que geralmente não são ramificados. No ponto de encontro dos estolões e esporangióforos, os rizoides são produzidos. Os esporangióforos são longos e terminam em um escuro e redondo esporângio contendo uma columela e muitos esporangiósporos ovais, incolores ou amarronzados, como podem ser evidenciados nas Figuras 3, 4 e 5 (LARONE, 1995; RIBES; VANOVER-SAMS; BAKER, 2000).

Figura 2 - Características macromorfológicas de *R. oryzae* em Ágar batata. A) Micélio aéreo e B) micélio vegetativo.



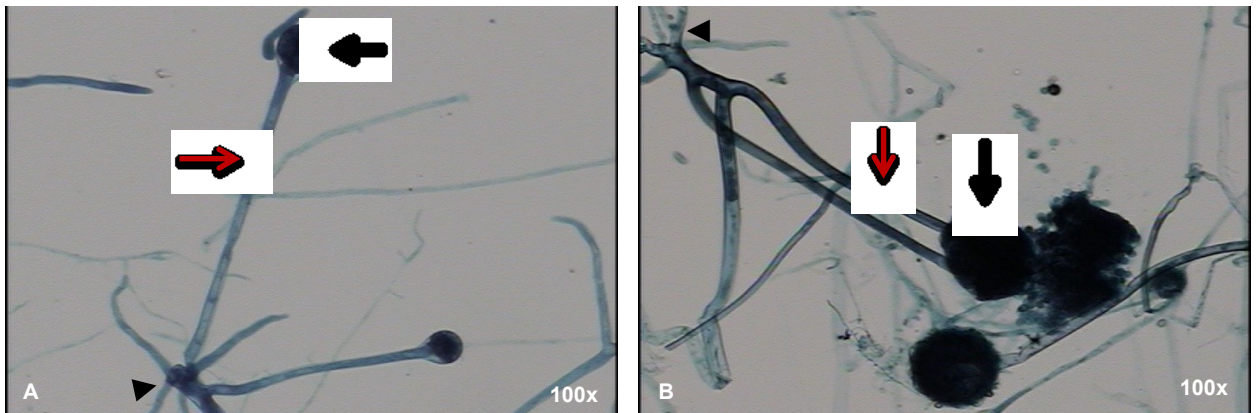
Fonte: Kelly Samara de Lira Mota, 2012.

Figura 3 - Desenho esquemático demonstrando as características micromorfológicas de *Rhizopus spp.*



Fonte: Ribes; Vanover-Sams; Baker, 2000.

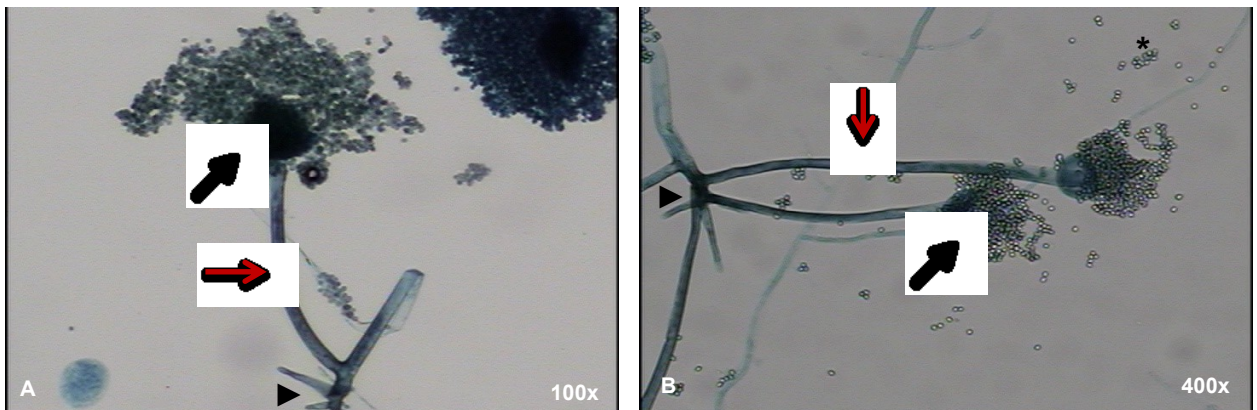
Figura 4 - Fotomicrografia demonstrando as características micromorfológicas de *R. oryzae* (A e B).



→ Esporângio característico, → esporangióforo e ► rizoide.

Fonte: Mota, (2011).

Figura 5 - Fotomicrografia demonstrando as características micromorfológicas de *R. microsporus* (A e B).



→ Esporângio característico, → esporangióforo, ► rizoide e * esporangiósporos.

Fonte: Kelly Samara de Lira Mota, 2011.

As várias espécies do gênero *Rhizopus* têm distribuição mundial, sendo que, *Rhizopus oryzae* é a mais comum das espécies. Os esporangiósporos de *Rhizopus* são frequentemente isolados de amostras de ar. No ambiente doméstico, o uso de ar condicionado, tapetes, almofadas e cortinas de pano e outros móveis de madeira proporciona ambientes propícios para a proliferação e fixação de esporangiósporos

destes fungos. As principais formas de transmissão das mucormicose induzidas por *Rhizopus spp.* em humanos incluem a inalação, ingestão e exposição cutânea. A maioria das infecções causadas por *Rhizopus* envolve os sítios rinocerebral e pulmonar. Ocorrendo secundariamente devido à inalação de esporangiósporos nos pulmões ou nos seios paranasais. A ingestão de tais fungos é geralmente a causa da zigomicose gastrointestinal (RIBES; VANOVER-SAMS; BAKER, 2000; CHAYAKULKEEREE; GHANNOUM; PERFECT, 2006).

1.3 Tratamento das mucormicose

Quatro fatores são fundamentais para tratar a mucormicose: rapidez no diagnóstico, reversão dos fatores subjacentes que predisõem, desbridamento cirúrgico adequado do tecido infectado e terapêutica antifúngica apropriada (IBRAHIM; EDWARDS; FILLER, 2003; ROGERS, 2008).

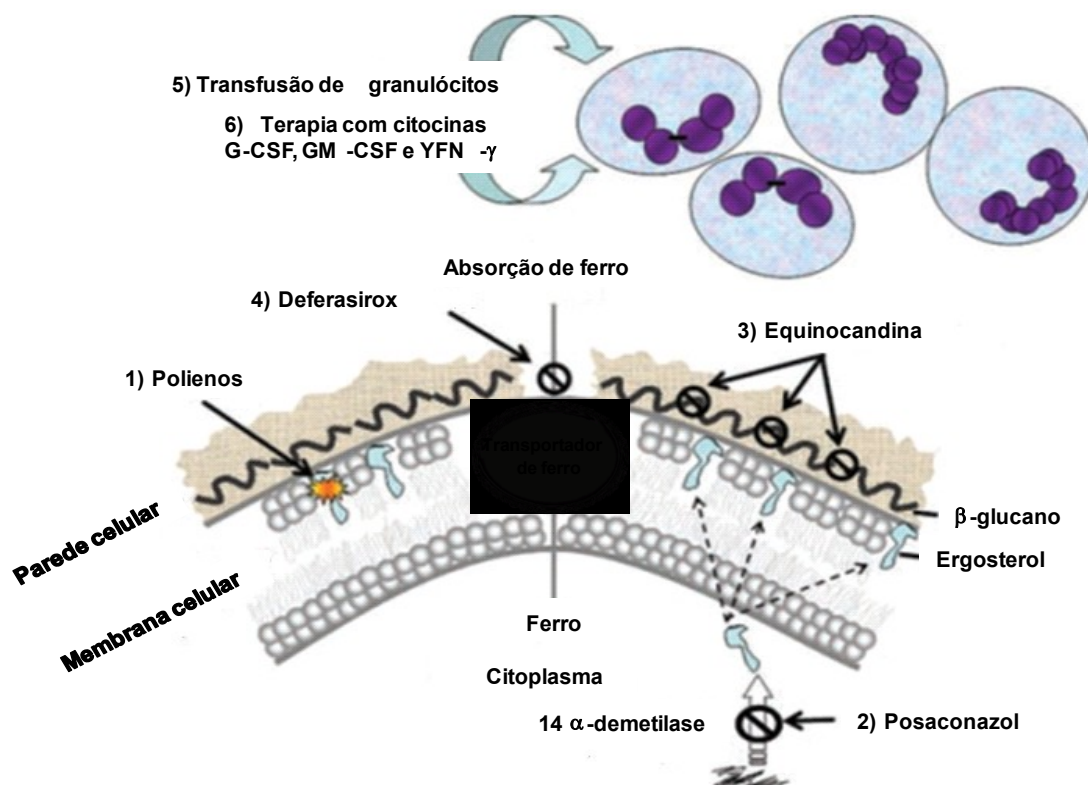
O ponto de partida para o sucesso do tratamento da mucormicose é reconhecer os pacientes com maior risco e sinais precoces da infecção. O diagnóstico precoce é importante, porque, pequenas lesões focais muitas vezes podem ser retiradas cirurgicamente antes de disseminar e afetar órgãos vitais, já que a maioria dos fungos da ordem Mucorales, a exemplo de *R. oryzae*, possuem rápida taxa de crescimento. Entretanto, não existem testes sorológicos ou baseados em PCR (reação de polimerase em cadeia) para permitir um diagnóstico rápido, e, portanto, cerca de metade dos casos de mucormicose são diagnosticados após a morte. Dessa forma, ressalta-se assim a necessidade fundamental de fazer biópsias ou cultura do organismo causador em todas as suspeitas clínicas da infecção (SPELLPERG; EDWARDS; IBRAHIM, 2005; ROGERS, 2008).

Além do diagnóstico precoce, também é essencial corrigir ou controlar quaisquer fatores reversíveis predisponentes para melhorar o resultado do tratamento. Por exemplo, em pacientes diabéticos com cetoacidose, a hiperglicemia e acidemia devem ser controladas. Deve ser fortemente considerada a descontinuação da terapia imunossupressora ou deferoxamina, especialmente esteróides, quando é diagnosticado mucormicose (SPELLPERG; EDWARDS; IBRAHIM, 2005; ROGERS, 2008).

O desbridamento cirúrgico do tecido infectado e necrótico deve ser realizado em caráter de urgência, visto que, a mucormicose frequentemente é uma infecção que progride rapidamente e o tratamento antifúngico sozinho, muitas vezes é insuficiente para controlar a infecção. Além disso, esta doença é marcada por angioinvasão, trombose e necrose do tecido, resultando em fraca penetração dos agentes antinfeciosos para o local da infecção (IBRAHIM et al., 2005a).

Os antifúngicos atualmente disponíveis no mercado farmacêutico atacam quatro alvos bioquímicos diferentes dos fungos pertencentes à ordem Mucorales. Estes agentes incluem: 1) polienos, 2) posaconazol, 3) equinocandinas e 4) deferasirox (quelante de ferro). Além disso, terapias adjuvantes que reforçam a imunidade dos hospedeiros são novas estratégias terapêuticas, tais como 5) transfusão de granulócitos e 6) terapia com citocinas (G-CSF, GM-CSF e YFN- γ) (SPELLBERG et al., 2009).

Figura 6 - Alvos terapêuticos para o tratamento das mucormicoses.



Fonte: Adaptado de Spellberg et al (2009).

Na maioria dos casos, a terapia antifúngica primária para mucormicose deve ser baseada em um polieno. Regimes baseados em não polienos podem ser

apropriados para pacientes que não respondem a terapia com polieno ou para os pacientes imunocompetentes com infecção relativamente leve, que pode ser cirurgicamente erradicada (por exemplo, infecção cutânea suprafascial isolada) (Quadros 3 e 4) (SPELLBERG et al., 2009). Os polienos, cujo principal representante da classe é a anfotericina B, ligam-se ao ergosterol, o principal esterol presente na membrana celular de todas as células fúngicas, resultando na criação de poros na membrana, alterando a permeabilidade celular, causando o extravazamento dos componentes celulares, resultando em morte dos fungos (ODDS; BROWN; GOW, 2003; BAGINSKI et al., 2005; LEMKE et al., 2005; SPELLBERG et al., 2009).

Tradicionalmente, a anfotericina B, um antibiótico macrolídeo derivado dos actinomicetes *Streptomyces nodosus*, é o agente de primeira linha para o tratamento da mucormicose (CHAYAKULKEERCE; GHANNOUM; PERFECT, 2006; SPELLBERG et al., 2009). Entretanto, são muitos os efeitos tóxicos da anfotericina B, especialmente nefrotoxicidade, além de náusea, vômitos, febre, hipertensão, hipotensão e hipóxia. Outros efeitos indesejados como a anemia acompanhada de trombocitopenia, tem sido outro fator preocupante na terapêutica antifúngica com anfotericina B (LANIADO-LABORÍN; CABRALES-VARGAS, 2009).

As formulações lipídicas da anfotericina B, especificamente, a anfotericina B lipossomal também são os agentes de primeira linha para o tratamento da mucormicose. A anfotericina B lipossomal é menos nefrotóxica e pode ser administrada com segurança em doses mais elevadas e por um longo período de tempo, quando comparada a anfotericina B. Além disso, a anfotericina B lipossomal possui melhor penetração no sistema nervoso central do que a anfotericina B e outras formulações lipídicas (Quadro 3) (SPELLBERG et al., 2009).

Os antifúngicos azólicos são classificados em imidazólicos e triazólicos. Esses fármacos atuam inibindo a biossíntese do ergosterol, por inibição da enzima 14- α -desmetilase, que catalisa a remoção oxidativa do grupo 14- α -metil do lanosterol durante a síntese do ergosterol, resultando em diminuição da concentração do ergosterol, com consequente alteração da fluidez da membrana e inibição do crescimento fúngico (ODDS; BROWN; GOW, 2003; DENNING; HOPE, 2010).

Fluconazol e voriconazol não tem atividade contra os agentes causadores da mucormicose, já o itraconazol possui atividade limitada com as espécies de *Absidia* (DANNAOUI et al., 2003; SABATELLI et al., 2006). Portanto, o itraconazol não deve

ser considerado como um agente de primeira linha contra mucormicose, mas, a sua utilização pode ser considerada como terapia adjuvante, em situações cujos fungos são altamente sensíveis (SPELLPERG; EDWARDS; IBRAHIM, 2005).

O posaconazol, um novo triazol, é o primeiro membro desta classe a ter atividade fungicida *in vitro* comparável à anfotericina B contra a maioria dos zigomicetos (KWON; MYLONAKIS, 2007; ROGERS, 2008). No entanto, a monoterapia com posaconazol não pode ser recomendada como tratamento primário para mucormicose. Alguns dados clínicos disponíveis sugerem que o posaconazol é uma opção razoável para pacientes com mucormicose que são refratários ou intolerantes aos polienos (SPELLBERG et al., 2009). Além disso, uma vez que a infecção se estabilize, maior ênfase pode ser dada a terapia oral, usando drogas com melhores perfis de segurança, como posaconazol, cuja variabilidade farmacocinética pode ser otimizada por meio da avaliação clínica cuidadosa dos distúrbios gastrintestinais, otimização da dieta e monitoramento farmacoterapêutico. No entanto, a utilização de posaconazol para tratamento primário da mucormicose permanece sob investigação e deve ser feito com extrema cautela, devido à atividade inconsistente em diversos estudos experimentais da mucormicose disseminada (SAOULIDIS et al., 2011; LEWIS et al., 2012). São necessários dados adicionais para determinar se o posaconazol, sozinho ou em combinação com anfotericina B, pode ser útil para o tratamento da mucormicose.

Outra classe de antifúngico em estudo para o tratamento da mucormicose são as equinocandinas, cujo mecanismo de ação é a inibição da síntese do 1,3- β -D-glucano, principal componente da parede celular fúngica (BERGOLD; GEORGIADIS, 2004; SPELLBERG et al., 2009). Foi evidenciado que *R. oryzae* expressa a enzima alvo das equinocandinas (IBRAHIM et al., 2005b). Estudos mostraram que esses agentes em combinação com anfotericina B lipossomal ou com complexo lipídico da anfotericina B são eficazes nas mucormicoses induzidas em camundongos (Quadro 4) (SPELLPERG et al., 2005; IBRAHIM et al., 2008).

Além dos estudos em modelos animais, um pequeno estudo retrospectivo mostrou que a terapia de combinação da anfotericina B lipossomal e caspofungina significativamente apresentaram melhores resultados para mucormicose rino-órbito-cerebral entre os pacientes com diabetes, em comparação com a monoterapia com polieno (REED et al., 2008). Portanto, as equinocandinas podem

ser segundo agente, em especial em combinação com um polieno, para o tratamento dos casos graves de mucormicose (SPELLPERG; EDWARDS; IBRAHIM, 2005; SPELLPERG et al., 2009). Porém, ainda são necessários mais estudos que comprovem a sua eficácia e segurança clínica.

O papel central do metabolismo do ferro na patogênese da mucormicose sugere a possibilidade de utilização eficaz de quelantes de ferro como terapia antifúngica adjuvante (MA et al.; 2008). Novos inibidores da absorção de ferro em *R. oryzae*, podem prejudicar a capacidade angiointensiva de crescimento do fungo. Sendo assim, o papel crítico de captação de ferro durante a infecção por *R. oryzae* também reforça a promessa de usar quelantes inéditos, a exemplo do deferasirox e deferiprona, como uma nova alternativa terapêutica no tratamento da mucormicose (LEWIS et al., 2012).

Semelhante ao posaconazol, o deferasirox está disponível apenas na formulação oral e também é uma boa opção no tratamento de pacientes com mucormicose refratários ou intolerantes ao polieno (Quadro 4). No entanto, os pacientes que não são suscetíveis de absorver adequadamente os medicamentos via enteral (por exemplo, pacientes que se submeteram à cirurgia intestinal) não devem ser tratados com deferasirox (SPELLBERG et al. 2009). O potencial antifúngico desse quelante de ferro como terapia adjuvante em combinação com outros agentes antifúngicos está sob intensa investigação, visto que, muitas questões permanecem incertas, como por exemplo, com qual droga deve ser associada, bem como o momento ideal, a dose e a duração dessas novas terapias para mucormicose (LEWIS et al., 2012).

Além da terapia antifúngica, várias medidas adjuvantes foram propostas para reforçar a imunidade do hospedeiro, incluindo o uso de fator estimulante de colônias de granulócitos-macrófagos ou fator estimulador de colônias, transfusões de leucócitos, o uso de interferon- γ e tratamento com oxigênio hiperbárico (CHAYAKULKEERCE; GHANNOUM; PERFECT, 2006).

Quadro 3 - Antifúngicos de primeira linha para o tratamento das mucormicoses.

Antifúngicos	Dose recomendada	Vantagens	Desvantagens
Terapia antifúngica primária			
Anfotericina B (AB)	1,0-1,5 mg/kg/dia	Mais de 5 décadas de experiências clínicas, baixo custo, é o único agente antifúngico licenciado para o tratamento da mucormicose.	Altamente tóxico (especialmente nefrotoxicidade) e pouca penetração no sistema nervoso central (SNC).
Formulações lipídicas de anfotericina B (FLAB)	5-10 mg/kg/dia	Menos nefrotóxico do que AB; melhor penetração no SNC do que AB e CLAB.	Custo elevado
Complexo lipídico de anfotericina B (CLAB)	5-7,5 mg/kg/dia	Menos nefrotóxico do que AB e dados clínicos retrospectivos sugerem benefício em combinação com equinocandinas.	Mais nefrotóxico do que FLAB, possivelmente menos eficaz do que outras monoterapias, especialmente para infecção do SNC.

Fonte: Adaptado de Spellberg et al (2009).

Quadro 4 - Terapia combinada com antifúngicos de primeira linha para o tratamento das mucormincoses.

Antifúngicos	Dose recomendada	Vantagens	Desvantagens
Terapia primária combinada			
Caspofungina mais polieno lipídico	70 mg i.v., depois 50 mg/dia por $\geq$ duas semanas; para crianças 50 mg/m ² i.v.	Perfil de toxicidade favorável; dados clínicos retrospectivos sugerem resultados melhores para mucormicose rino-órbito-cerebral	Os dados clínicos da terapia de combinação são muito limitados.
Micafungina ou anidulafungina mais polieno lipídico	100 mg/dia $\geq$ 2 semanas; micafungina 4 mg/kg/dia para crianças; micafungina 10 mg/kg/dia para recém nascidos de baixo peso; anidulafungina 1,5 mg/kg/dia para crianças.	O perfil de toxicidade favorável; sinérgica com FLAB em modelo murino de mucormicose disseminada.	Não existem dados clínicos.
Deferasirox mais polieno lipídico	20 mg/kg via oral diariamente durante 2-4 semanas.	Altamente fungicida para Mucorales <i>in vitro</i> ; sinérgica com FLAB em modelo murino de mucormicose disseminada.	Apenas disponível para administração enteral; não existem dados clínicos.

Fonte: Adaptado de Spellberg et al (2009).

Citocinas pró-inflamatórias, tais como o interferon- γ e fator estimulante de colônias de granulócitos-macrófagos, aumentam a capacidade dos granulócitos para matar os agentes causadores da mucormicose (GIL-LAMAINERE et al., 2005). Essa nova terapia têm sido cada vez mais utilizada para micoses refratárias, incluindo mucormicose (SLAVIN et al., 2002; GRIGULL et al., 2006), podendo assim, fornecer suporte adicional para pacientes neutropênicos persistentemente até a recuperação da neutropenia. Além disso, a administração de fator estimulante de colônias de granulócitos-macrófagos ou interferon- γ pode aumentar ainda mais a resposta do hospedeiro e o efeito antifúngico em pacientes não neutropênicos com infecção refratária (SPELLBERG et al. 2009).

Supõe-se que o oxigênio hiperbárico pode ser útil para o tratamento da mucormicose em conjunto com a terapia convencional, porque a pressão mais elevada de oxigênio melhora a capacidade dos neutrófilos para matar o microrganismo (COUCH; THEILEN; MADER, 1988). Apesar de limitados, os dados indicam que o oxigênio hiperbárico também pode ser útil em centros de saúde com a devida capacidade técnica e instalações adequadas (JOHN; CHAMILOS; KONTOYIANNIS, 2005). Entretanto, esse tratamento não pode ser recomendado rotineiramente, visto que, não tem sido estudada vigorosamente a sua eficácia e segurança.

Diante dos dados expostos, pode-se observar que atualmente o arsenal terapêutico para o tratamento das mucormicoses é limitado. Um dos grandes obstáculos para o tratamento farmacológico adequado desta infecção fúngica invasiva é a falta de ensaios clínicos comparativos dos diferentes agentes antifúngicos sistêmicos, pois tais estudos levariam dezenas de anos para obter pacientes suficientes para um estudo clínico padrão de fase III e sem dúvida, teriam um custo elevado. Mesmo assim, a escolha da terapia é feita com base nas experiências, complementadas por informações adquiridas a partir de estudos em modelos animais e em dados de suscetibilidade *in vitro* (SPELLPERG; EDWARDS; IBRAHIM, 2005; ROGERS, 2008).

Outro fator limitante da terapêutica da mucormicose é a resistência às drogas antifúngicas, acarretando graves consequências na clínica médica, devido à falha no tratamento, além de prejuízos econômicos para os sistemas de saúde.

A resistência microbiana pode ser classificada em primária (intrínseca) e secundária (adquirida). A resistência primária é encontrada naturalmente entre

certos fungos, sem exposição prévia ao fármaco, enfatizando a importância da identificação de espécies fúngicas resistentes a partir de amostras clínicas. Já a resistência secundária se desenvolve entre as cepas anteriormente suscetíveis, após a exposição ao agente antifúngico, e é geralmente dependente da expressão genética alterada (KANAFANI; PERFECT, 2008).

A resistência clínica é definida como a incapacidade de erradicar uma infecção fúngica, apesar da administração de um agente antifúngico com atividade *in vitro* contra o agente microbiano. Tais falhas podem ser atribuídas a uma combinação de fatores relacionados com o hospedeiro, o agente antifúngico, ou o agente patogênico. No entanto, nem sempre a resistência clínica pode ser prevista, realçando a importância de individualizar as estratégias de tratamento com base na situação clínica (KANAFANI; PERFECT, 2008).

A maioria dos pacientes com micoses invasivas experimenta falha do tratamento em virtude da resistência clínica. O que tem sido um fato preocupante e vêm conquistando grande importância clínica, visto que, muitos dos zigomicetos são resistentes à maioria dos antifúngicos utilizados para tratar micoses sistêmicas, incluindo 5-flucitosina (5-FC), cetoconazol, fluconazol, voriconazol, e as equinocandinas (ESPINEL-INGROFF, 2003; DANNAOUI et al., 2003; SABATELLI et al., 2006).

Neste contexto, a terapêutica com antifúngicos tem sido motivo de grandes preocupações e de numerosos estudos para pesquisadores, tornando-se mais evidente ao considerar espécies fúngicas resistentes, especialmente decorrentes do uso indiscriminado e mal orientado dos antifúngicos disponíveis no mercado farmacêutico. Por estas razões, existe uma significativa necessidade de priorizar, testar e aplicar de forma mais eficiente, melhorias terapêuticas para o tratamento das mucormicoses. E é nesse cenário, que as plantas medicinais vem se destacando como uma nova abordagem para o tratamento dessas doenças. Assim, muitos grupos de pesquisadores em todo mundo vem dando atenção para validação de plantas medicinais e o isolamento de seus metabólitos secundários que podem vir a ser fonte de substâncias bioativas semelhantes aos antimicrobianos presentes atualmente no mercado farmacêutico (ARAÚJO; LEON, 2001; GOTTLIEB; BORIN, 2002; CIMANGA et al., 2002; DUARTE et al., 2005).

1.4 Considerações gerais sobre plantas medicinais

A utilização de plantas com fins medicinais é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade. Na América do Sul, o uso dessas plantas contribui de forma significativa no cuidado primário a saúde. Muitas delas são utilizadas no Brasil sob a forma de extratos brutos, infusões, pastas ou outras formas de preparados para o tratamento de infecções (HOLETZ et al., 2002).

É inegável a importância dos produtos naturais no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas e/ou ferramentas farmacológicas. Neste ponto, as plantas medicinais e os produtos derivados delas, são reconhecidamente importantes para a pesquisa farmacológica e o desenvolvimento de drogas, tanto porque podem ser utilizados diretamente como agentes terapêuticos, como também de fonte de matéria-prima para a síntese, ou ainda podem servir de protótipos para novos modelos farmacologicamente ativos (BRASIL, 2006).

Entre as plantas empregadas com finalidades medicinais em todo o mundo, as plantas aromáticas constituem um grupo de vegetais proeminentes principalmente pelos óleos essenciais (NUNES et al., 2006), que são misturas complexas, ricos em terpenos com diferentes graus de lipofilicidade e relativa hidrofiliabilidade (GRIFFIN et al. 1999), caracterizados pelo odor forte e encontrados em suas folhas, resinas, frutos, flores, troncos e outras partes (BURT, 2004). Tais compostos podem alterar a permeabilidade celular, inserindo-se entre as cadeias de ácidos graxos que compõem as bicamadas lipídicas das membranas, portanto, interrompendo empacotamento lipídico, causando alterações nas propriedades e funções da membrana, por aumentar a fluidez e alterar a permeabilidade da membrana (SANCHEZ et al., 2004; BRAGA et al., 2007). São, portanto, amplamente usados pelas suas ações bactericidas, fungicidas, parasiticidas, inseticidas e virucidas além de outras propriedades medicinais, especialmente utilizadas pelas indústrias farmacêuticas, sanitárias, cosmética, agricultura e de alimentos (BAKKALI et al., 2008).

Os óleos essenciais e fitoconstituintes têm mostrado promissora atividade antifúngica *in vitro* e *in vivo* contra fungos potencialmente patogênicos ou oportunistas. São bastante estudada as atividades terapêuticas destes produtos contra *Candida spp.*, *Trichophyton spp.* e *Aspergillus spp.* (MONDELLO et al., 2003;

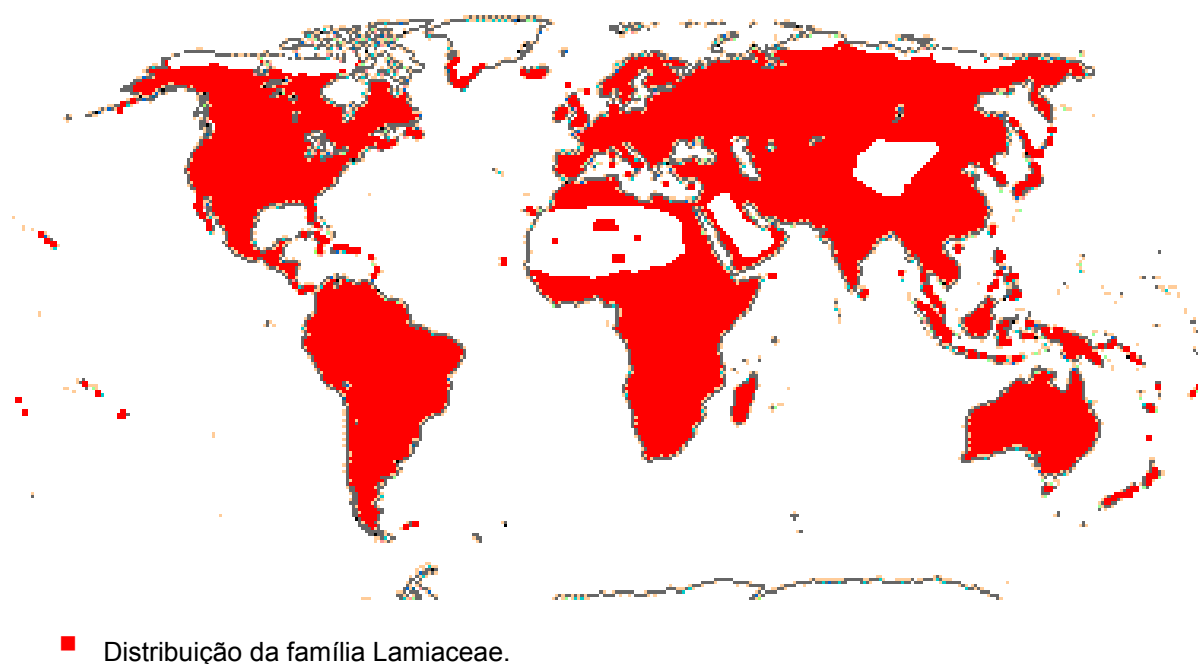
LIMA et al., 2006; BANSOD; RAI, 2008; PINTO et al., 2009; AMBER et al., 2010; PEREIRA et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2011; SAJJAD; KHAN; AHMAD, 2011). Entretanto, são escassos os estudos, de óleos essenciais e seus compostos sobre a atividade antifúngica contra espécies de *Rhizopus*, o principal responsável pela indução da maioria das mucormicose, fator de significativo estímulo para a realização desta proposta de trabalho.

1.5 Família Lamiaceae e *Thymus vulgaris* L.

Levando em consideração a importância das plantas medicinais no cenário atual passou-se a investigar as propriedades farmacológicas de *Thymus vulgaris* L., espécie pertencente à família Lamiaceae, uma grande família de ervas aromáticas, arbustos ou árvores, com cerca de 236 gêneros e 7.173 espécies, com distribuição mundial (Figura 7) (STEVENS, 2001). Muitas destas espécies introduzidas no Brasil são plantas medicinais produtoras de óleos essenciais, sendo utilizadas como flores ornamentais ou condimentos, destacando-se as espécies: *Mentha piperita* L. (hortelã pimenta), *Ocimum basilicum* L. (manjeriço), *Origanum vulgare* L. (orégano), *Origanum majorana* L. (manjerona), *Thymus vulgaris* (tomilho) entre outras, que são usadas como condimentos (PORTE; GODOY, 2001). A família Lamiaceae possui grande importância, principalmente medicinal e condimentar. Uma vasta gama de compostos, tais como terpenoides, iridoides, compostos fenólicos e flavonoides têm sido relatados nesta família (NAGHIBI et al., 2005).

O gênero *Thymus*, amplamente distribuído na Península Ibérica (Figura 7), é um grupo taxonomicamente complexo devido ao seu polimorfismo químico (PINA-VAZ et al., 2004). A palavra tomilho é um nome genérico para mais de trezentas espécies de *Thymus*, híbridos, variedades e ecótipos, empregadas como condimentos alimentares, plantas aromáticas, ornamentais e largamente utilizadas na medicina popular (ZARZUELO; CRESPO, 2002; PINA-VAZ et al., 2004; FIGUEIREDO et al., 2008).

Figura 7 - Mapa mostrando a distribuição mundial da família Lamiaceae.



Fonte: <http://www.mobot.org>

Os chás de várias espécies de tomilho são usados tradicionalmente para tratar problemas gastrintestinais e os óleos essenciais já foram utilizados para expulsar parasitas intestinais, especialmente ancilostomídeos. Óleos essenciais de tomilho também possuem propriedades antiespasmódicas, além de ser eficaz para as dores de garganta, tosse e bronquite irritável. Colutórios de tomilho também são usados no tratamento das gengivites e periodontites. Externamente esta mistura complexa é aplicada para limpar a pele contra a acne. Dada à importância medicinal das espécies de *Thymus*, muitas vezes são utilizados como constituintes ativos e/ou como aromatizantes em alguns medicamentos especializados, quer sob a forma de extratos quer sob a forma de óleos essenciais, possuindo assim uma enorme importância econômica (FIGUEIREDO et al., 2008).

Algumas espécies de *Thymus*, particularmente *T. vulgaris* e os seus componentes fenólicos têm sido investigadas e comprovadas experimentalmente as suas propriedades farmacológicas antiespasmódicas (ENGELBERTZ et al., 2012), antioxidantes (HUDAIB et al., 2002), antimicrobianas contra certas bactérias (SIENKIEWICZ et al., 2012), protozoários (SANTORO et al., 2007) e fungos

(PINA-VAZ et al., 2004; RASOOLI; ABAYNEH, 2004; TULIO et al., 2007; KLARIC et al., 2007).

Thymus vulgaris L. (Figura 8), é uma planta exótica originária dos países mediterrânicos e dos países vizinhos, norte da África e partes da Ásia. É um arbusto que cresce até 50 cm de altura e suas flores são brancas ou roxas. O odor é aromático e o sabor ligeiramente amargo semelhante à cânfora. É conhecida popularmente como tomilho e tomilho comum, sendo suas folhas e os botões florais amplamente utilizadas na medicina popular. A infusão das flores ou da planta seca é usada internamente como tônico, emenagogo, estomáquico e antiespasmódico, e externamente como antisséptico e parasiticida (em banhos, loções e atritos). O pó da planta seca foi usado contra hemorragia nasal, e em uma mistura com mel contra a tosse forte. A infusão da planta inteira também foi relatada como um indutor do sono, o chá para aliviar dor de cabeça, e banhos como estimulante uterino durante o parto (NAGHIBI et al., 2005; FIGUEIREDO et al., 2008).

Figura 8 - Fotos de *Thymus vulgaris* L. A) planta inteira, B) detalhes das flores e C) folhas e flores.



Fonte: Herbário Virtual de Ateca. Jesús Martin.

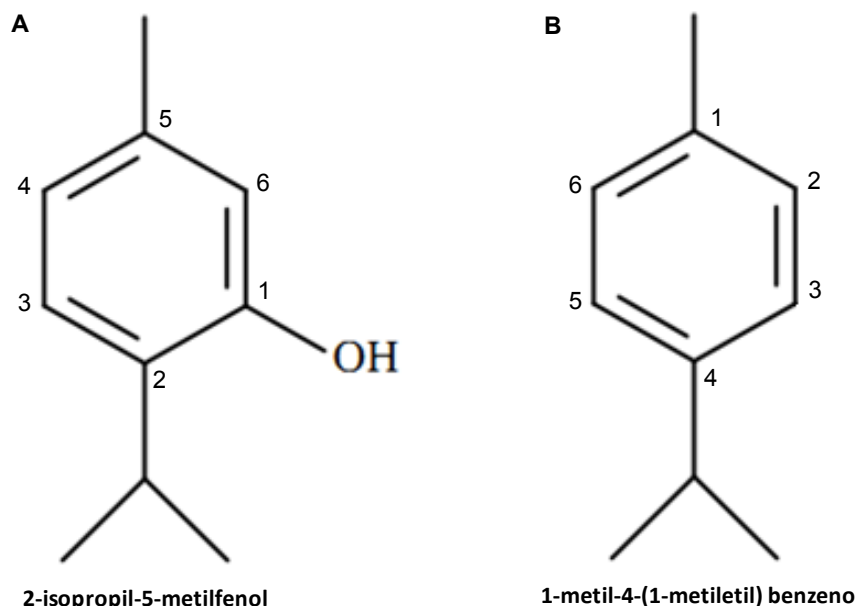
1.6 Fitoconstituintes do óleo essencial de *Thymus vulgaris*

T. vulgaris tem um polimorfismo determinado geneticamente para a produção de monoterpenos que constituem o principal componente do seu óleo essencial. Os principais fitoconstituintes presentes em seu óleo essencial são timol, *p*-cimeno, carvacrol, 1,8-cineol, borneol e linalol. Dentre estes, destacam-se os compostos fenólicos, como o timol, que possui um amplo espectro de ação antifúngica (GIORDANI et al., 2004; PINA-VAZ et al., 2004; KLARIC et al., 2007).

O timol (2-isopropil-5-metilfenol - Figura 9A), também conhecido como ácido tímico, é um monoterpeno fenólico encontrado majoritariamente em diversas espécies de *Thymus*, como *T. eriocalyx*, *T. x-porlock* (RASOOLI; ABAYNEH, 2004), *T. zygis* (PINA-VAZ et al., 2004) e particularmente *T. vulgaris* (GIORDANI et al., 2004; TULIO et al., 2007; SOKOVIĆ et al., 2009). Apresenta-se sob a forma de cristais incolores grandes ou pó cristalino branco com aroma irritante, lembrando tomilho (BOTELHO et al., 2007). Timol é o mais potente dos fenóis, possuindo uma série de propriedades farmacológicas, inclusive antibacteriana e antifúngica (BRAGA et al., 2007; AHMAD et al., 2011; SIENKIEWICZ et al., 2012). O timol é usado principalmente como antisséptico bucal, associado à glicerina, em três vezes o seu volume, em água morna. Também tem sido usado topicamente no tratamento de enfermidades da pele e por inalação, associado a outras substâncias voláteis, para tratar enfermidades respiratórias (KORDALI et al., 2008).

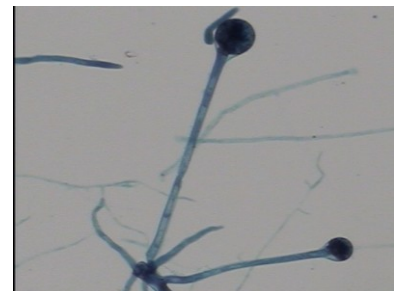
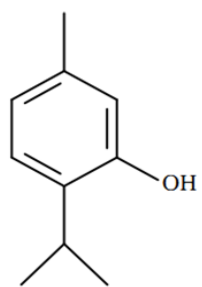
O *p*-cimeno (1-metil-4-(1-metiletil) benzeno - Figura 9B) é constituído por um anel benzeno com um grupo metil e outro isopropil para substituídos. É um dos principais fitoconstituintes do óleo essencial de *T. vulgaris* (KLARIC et al., 2007; TULIO, et al., 2007; SOKOVIĆ et al., 2009). Entretanto, são poucos os estudos reportando o seu potencial antimicrobiano. Foi observado que este componente não fenólico possui baixa atividade antifúngica (HAMMER; CARSON; RILEY, 2003; FIGUEIREDO et al., 2008).

Figura 9 - Estruturas químicas dos fitoconstituintes majoritários de *T. vulgaris*
A) timol e B) *p*-cimeno.



Considerando a importância das infecções fúngicas invasivas, especialmente as mucormicose, e as dificuldades encontradas no seu tratamento, bem como o aumento da resistência aos antifúngicos, torna-se necessário os estudos de novos fármacos naturais e/ou sintéticos com propriedades antifúngicas. Portanto, o presente estudo se mostra de grande relevância, uma vez que pretende investigar novas alternativas terapêuticas para o tratamento destas doenças fúngicas, com amplo espectro de ação, pouco tempo de uso e mínimos efeitos adversos sobre o hospedeiro.

OBJETIVOS



2 OBJETIVOS

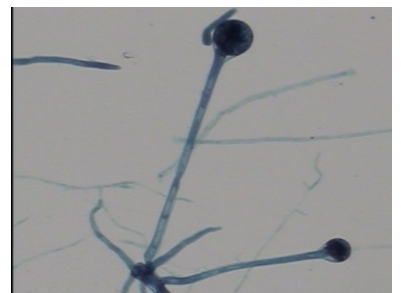
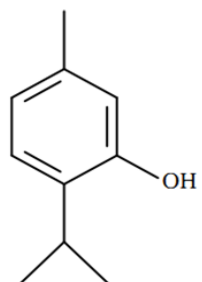
2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a atividade antifúngica *in vitro* do óleo essencial obtido de *Thymus vulgaris* L. e dos fitoconstituintes timol e *p*-cimeno, frente a cepas de *Rhizopus oryzae* e *Rhizopus microsporus*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a suscetibilidade de cepas de *R. oryzae* e *R. microsporus* frente a diferentes antifúngicos;
- Realizar triagem antifúngica de 10 óleos essenciais de diversas espécies de plantas aromáticas, escolhendo dentre estes, o que apresentar melhor perfil antifúngico para aprofundar os seus estudos;
- Determinar a concentração inibitória mínima do óleo essencial de *T. vulgaris* e dos fitoconstituintes timol e *p*-cimeno;
- Determinar a concentração fungicida mínima do óleo essencial de *T. vulgaris* e do timol;
- Avaliar o efeito antifúngico do óleo essencial de *T. vulgaris* e do timol sobre o crescimento micelial, na germinação dos esporangiósporos e sobre a morfologia das espécies fúngicas em estudo;
- Analisar a ação do óleo essencial de *T. vulgaris* e do timol sobre a membrana celular fúngica, a partir da interação com o ergosterol;
- Investigar a toxicidade aguda *in vivo* do óleo essencial *T. vulgaris* e do timol.

MATERIAL E MÉTODOS



MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Local da pesquisa

O trabalho foi realizado no Laboratório de Micologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas, do Centro de Ciências da Saúde (CCS), da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) e parcerias, para apoio no desenvolvimento da toxicidade aguda foram efetuadas com o Laboratório de Ensaio Toxicológicos (LABETOX), do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PgPNSB), do CCS, UFPB.

3.1.2 Óleos essenciais e fitoconstituintes

Os óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf (capim santo), *Cinnamomum zeylanicum* Blume (canela), *Coriandrum sativum* L. (coentro), *Origanum majorana* L. (manjerona) e *Origanum vulgare* L. (oregano) foram obtidos da Ferquima Industria e Comercio Ltda. (Vargem Grande Paulista, São Paulo, Brasil); os óleos essenciais de *Cymbopogon martini* (palmorosa), *Ocimum basilicum* L. (manjerição) e *Thymus vulgaris* L. (tomilho) foram obtidos da Laszlo Aromaterapia Ltda. (Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil); os óleos essenciais de *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor (citronela) e *Hyptis suaveolens* L. (alfazema brava) foram obtidos do Departamento de Agricultura, Centro de Formação de Tecnólogos, da Universidade Federal da Paraíba, Bananeiras, Brasil. Já os fitoconstituintes, timol e *p*-cimeno foram adquiridos da Sigma-Aldrich® (São Paulo, Brasil). Os óleos essenciais *in natura* foram armazenados em frascos âmbar e foram mantidos sob refrigeração a 4°C no Laboratório de Micologia. As emulsões dos óleos essenciais e fitoconstituintes foram preparadas no momento de execução dos ensaios, solubilizando-os em Tween 80 (INLAB, São Paulo, Brasil) a 2%, concentração, não interferindo no crescimento fúngico.

3.1.3 Antifúngico padrão

O produto utilizado como controle positivo na execução das metodologias foi anfotericina B, fármaco comumente utilizado como produto de escolha para o tratamento de mucormicoses. O antifúngico foi adquirido da Sigma-Aldrich® (São Paulo, Brasil) e a solução foi preparada no momento de execução dos testes, dissolvendo-o inicialmente em dimetilsulfóxido (DMSO) a 1%, até atingir a concentração desejada nos testes de sensibilidade.

3.1.4 Meios de cultura

Os meios de cultura utilizados foram os meios sólidos ágar Sabouraud dextrose (ASD) e ágar batata (AB) e o meio líquido caldo Sabouraud dextrose (CSD), todos adquiridos da Difco® (Detroit, USA) e preparados de acordo com as instruções do fabricante.

3.1.5 Microrganismos

Para os ensaios de atividade antifúngica foram selecionadas um total de 16 cepas, incluindo oito cepas de *Rhizopus oryzae*, isoladas e identificadas pelo Laboratório de Micologia da UFPB, codificadas como LM-03, LM-04, LM-25, LM-28, LM-29, LM-508, LM-766 e LM-810. As demais cepas foram obtidas da Coleção de Culturas - Micoteca URM, Departamento de Micologia, da Universidade Federal de Pernambuco, sendo quatro da espécie *Rhizopus oryzae*, codificadas como RO-4557, RO-4565, RO-4692 e RO-5786 e quatro cepas de *Rhizopus microsporus*, codificadas como RM-4568, RM-5266, RM-5926 e RM-5966. As cepas foram estocadas em tubos de ensaio contendo AB inclinado, sob refrigeração a 4°C.

3.1.6 Inóculo

Os fungos foram cultivados em meio ASD inclinado a 28°C por um período de cinco dias, para atingirem um bom crescimento e formarem um maior número de esporangiósporos. As recentes colônias fúngicas foram devidamente cobertas com 5 mL de solução salina estéril (NaCl 0,85 % p/v), depois foram agitadas durante 5 minutos. A mistura resultante de esporangiósporos e fragmentos de hifas foi mantida em repouso por cinco minutos, em seguida o sobrenadante foi retirado e transferido para tubos de ensaio esterilizados e agitados por 2 minutos com auxílio do aparelho Vortex. Após agitação, os esporangiósporos foram contados utilizando-se hemocitômetro e ajustados para 10^6 esporangiósporos/mL e comparados com a escala McFarland (CLEELAND; SQUIRES, 1991; HADACEK; GREGER, 2000; ESPINEL-INGROFF et al., 1997; DANNAOUI et al., 2003).

3.1.7 Animais

Para a realização do modelo experimental, foram utilizados camundongos *Mus musculus* albinos machos e fêmeas, linhagem Swiss pesando entre 25-35 g, todos procedentes do Biotério Prof. Thomas George do CBiotec-UFPB. Os animais foram aclimatados a 21 ± 2 °C, com ciclos claro-escuro controlado de 12 horas e foram alimentados com ração e água *ad libitum*, sendo distribuídos nos diferentes grupos experimentais, ao acaso. Os experimentos realizados com animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso Animal da UFPB com o número CEUA 0107/11 (anexo 1).

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Ensaios de atividade antifúngica

3.2.1.1 Teste de suscetibilidade antifúngica (triagem microbiológica)

Foi realizado o ensaio de difusão em meio sólido com discos de papel de filtro para avaliar a suscetibilidade dos óleos essenciais e antifúngicos sintéticos frente a cepas de *R. oryzae* e *R. microsporus* (KONEMAN et al., 1993; HADACEK; GREGER, 2000). Em placas de Petri (90 x 15 mm) descartáveis e estéreis, foi colocado 1 mL da suspensão do microrganismo (10^6 esporangiósporos/mL). Em seguida, adicionou-se cerca de 20 mL do meio ASD fundido a 50°C e todo o sistema foi homogeneizado. Após solidificação do meio, discos de papel de filtro (Sensiobiodisc do Centro de Controle e Produtos para Diagnósticos Ltda – CECON/SP) embebido com 10 µL de cada um dos 10 óleos essenciais e discos com antifúngicos (Sensifungidiscos-CECON/SP) foram depositados na superfície do meio de cultura.

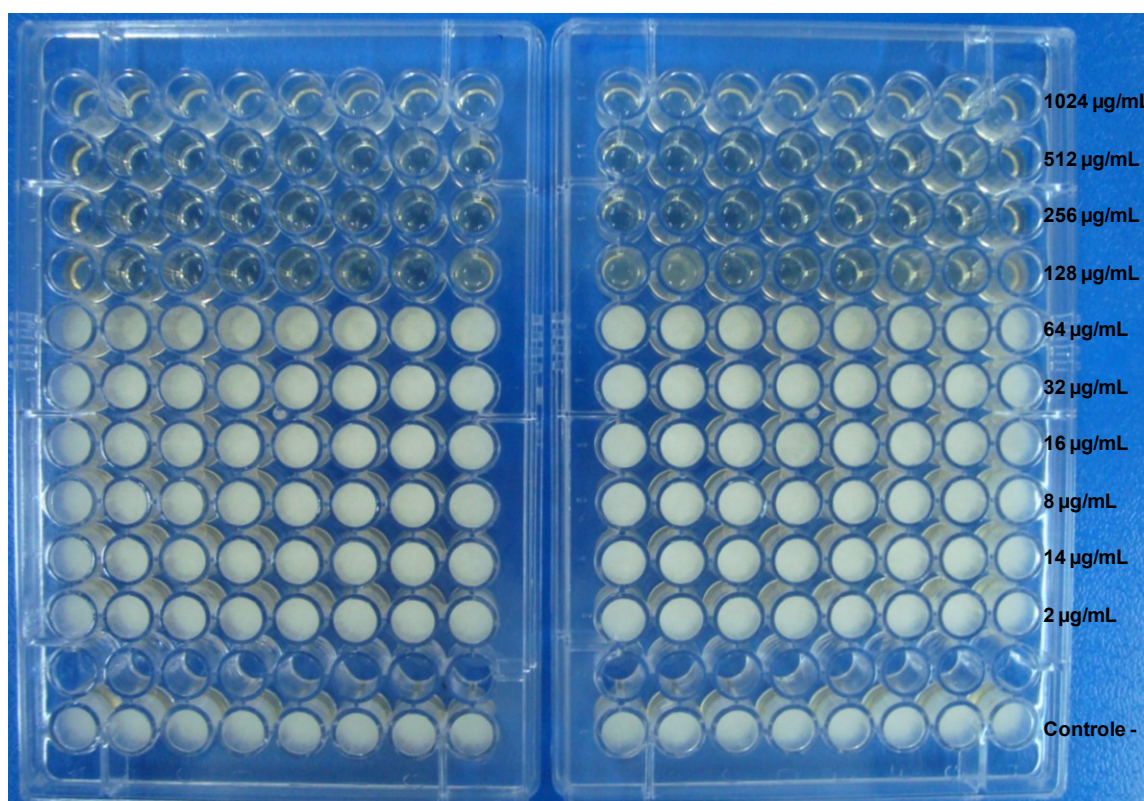
Todo o sistema foi incubado a 28°C e após 48 horas foram determinados os diâmetros dos halos de inibição. Os ensaios foram realizados em duplicata e a atividade antifúngica dos produtos foi considerada positiva quando a média aritmética foi superior ou igual a 10 mm em pelo menos 50% do total de cepas testadas (LIMA et al., 1993). O óleo essencial que apresentou o melhor perfil antifúngico foi escolhido para caracterização da atividade antifúngica *in vitro*.

3.2.1.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM)

A determinação da CIM do óleo essencial de *T. vulgaris*, timol, *p*-cimenol e anfotericina B foi realizada pela técnica de microdiluição, utilizando microplacas estéreis de 96 cavidades com fundo chato (ESPINEL-INGROFF et al., 1997; DANNAOUI et al., 2003). Em cada orifício da placa, foi adicionado 100 µL do meio líquido CSD duplamente concentrado. Posteriormente, 100 µL da solução dos

produtos, também duplamente concentrado, foram dispensados nas cavidades da primeira linha da placa. Por meio de uma diluição seriada a uma razão de dois, foram obtidas concentrações de 1.024 $\mu\text{g/mL}$ até 2,0 $\mu\text{g/mL}$ para o óleo essencial e fitoconstituintes e 0,5 $\mu\text{g/mL}$ para anfotericina B. Em seguida foi adicionado nas cavidades 10 μL do inóculo das espécies fúngicas. As microplacas foram seladas e incubadas a 28 °C durante 48 horas (Figura 10). A CIM foi determinada como a menor concentração da droga capaz de inibir visualmente o completo crescimento fúngico (100% de inibição). Um controle negativo, sem os produtos foi realizado para confirmar a viabilidade dos esporangiósporos. Os ensaios foram realizados em duplicata de dois experimentos independentes em diferentes ocasiões.

Figura 10 - Determinação da CIM do timol em $\mu\text{g/mL}$.



Fonte: Kelly Samara de Lira Mota, 2011.

Após a determinação da CIM uma alíquota de 10 µL de cada cavidade onde não houve crescimento fúngico foi subcultivada em uma placa com ASD, que foi incubada a 28 °C por 24 horas. A CFM foi considerada como a menor concentração dos produtos capaz de inibir visualmente o completo crescimento fúngico ou em que houve crescimento de até três UFC, para obter 99-99,5% de morte. Os ensaios foram realizados em duplicata (ESPINEL-INGROFF et al., 1997; KLEPSE et al., 1998; DANNAOUI et al., 2003).

3.2.1.3 Efeitos sobre o crescimento micelial

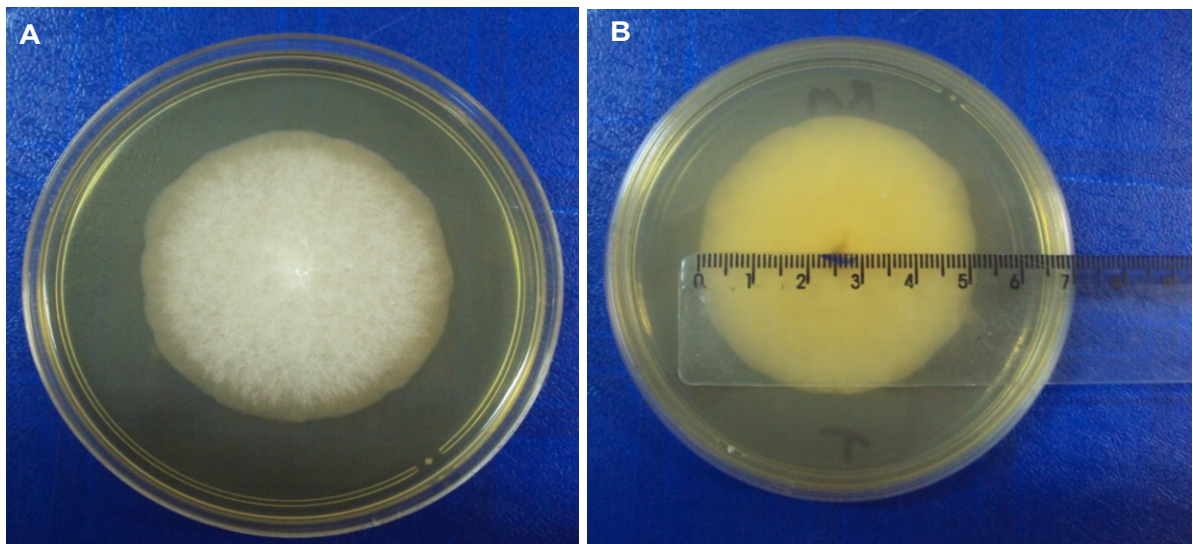
A análise do óleo essencial de *T. vulgaris*, timol e anfotericina B sobre o crescimento micelial foi realizada pela determinação da massa micelial seca dos fungos em estudo, utilizando-se a técnica de diluição em caldo. Em um tubo de ensaio esterilizado foram adicionados o óleo essencial, timol e anfotericina B em diferentes concentrações (CIM e 2 × CIM) em 4,5 mL de CSD, em seguida foi adicionado 0,5 mL do inóculo de 10⁶ esporangiósporos/mL de *R. oryzae* (RO-4557) ou *R. microsporus* (RM-5266). No tubo controle correspondente, foi adicionado água destilada na mesma proporção dos produtos. Todo o sistema foi incubado a 28°C e após 5 dias foi determinado o peso da massa micelial seca. Para isto, as culturas foram filtradas utilizando papel de filtro estéril (retenção de partículas: 11 µm) e lavadas com água destilada estéril. O micélio retido no papel de filtro foi submetido à secagem em estufa a 60°C por 10 minutos. Ao término, o papel de filtro contendo o micélio seco foi pesado e a massa micelial seca produzida foi expressa em gramas. Os ensaios foram realizados em três experimentos independentes em diferentes ocasiões (RASOOLI; REZAEI; ALLAMEH, 2006; SHARMA; TRIPATHI, 2006).

3.2.1.4 Crescimento radial

A inibição do crescimento radial fúngico de *R. oryzae* (RO-4557) ou *R. microsporus* (RM-5266) foi determinada através da medida do crescimento radial do micélio em meio ASD adicionados do óleo essencial de *T. vulgaris*, timol e anfotericina B nas concentrações CIM/2, CIM e 2 × CIM e 4 × CIM. Para isso, um

micélio de 2 mm de diâmetro foi retirado de uma cultura recente e colocado no centro das placas de Petri com meio ASD contendo os produtos testados. O sistema foi incubado a 28°C. Durante os intervalos 0, 8, 16, 24 e 48 horas foram medidas com uma régua o crescimento micelial radial (mm) e comparados com o controle na ausência dos produtos (Figura 11). Foram realizados três experimentos independentes em diferentes ocasiões (DAFERERA; ZIOGAS; POLISSIOUA, 2003).

Figura 11 - Avaliação do óleo essencial de *T. vulgaris*, timol e anfotericina B sobre o crescimento radial de *R. oryzae* e *R. microsporus*, A) verso e B) reverso.



Fonte: Kelly Samara de Lira Mota, 2012.

3.2.1.5 Efeitos sobre a germinação dos esporangiósporos fúngicos

Para avaliar a interferência do óleo essencial de *T. vulgaris*, timol e anfotericina B sobre a germinação de esporangiósporos, diferentes concentrações do óleo essencial, timol e anfotericina B correspondentes a CIM e 2 x CIM foram adicionados em ependorf estéreis contendo 500 µL de CSD duplamente concentrado, em seguida foram homogeneamente misturadas com 500 µL da suspensão dos esporangiósporos fúngicos determinado em câmara de Neubauer e

ajustado a 10^6 esporangiósporos/mL. Foi utilizado um controle de microrganismos apenas com água destilada. As amostras foram incubadas 28°C e após 24 h o número de esporangiósporos germinados e não germinados foi determinado em câmara de Neubauer e o percentual de inibição da germinação dos esporangiósporos foi calculado (SURENDER et al., 1987; RANA et al., 1997; SHARMA; TRIPARTHI, 2006).

3.2.1.6 Efeitos sobre a morfogênese

A análise dos efeitos provocados pelos produtos na morfogênese dos fungos *R. oryzae* (4557) e *R. microsporus* (5266) foram realizadas com base na técnica de preparação de microcultivos. Para o cultivo dos fungos em lâminas, placas de Petri de vidro foram forradas com papel de filtro e, em seguida, foi introduzido um suporte (duas lâminas de vidro unidas), uma lâmina e uma lamínula. Posteriormente, todo o sistema foi esterilizado por calor seco em estufa de secagem e esterilização a 170°C por 2 horas. Em placas de Petri descartáveis e estéreis, foram vertidos cerca de 20 mL do meio de cultura ASD fundidos acrescido dos produtos nas concentrações CIM/2 e CIM. Após solidificação do meio, cavidades foram feitas no ASD utilizando cânulas de vidro estéreis. Com o auxílio de uma alça de platina, foram transferidas porções desse meio de cultivo para a superfície central da lâmina de microscopia, disposta sobre o suporte. Em seguida, dois fragmentos do micélio das cepas em estudo foram dispostos nas extremidades do meio de cultivo, cobrindo-o com lamínulas esterilizadas. Para evitar o ressecamento do meio, o papel de filtro foi umedecido com 1,5 mL de água destilada e as placas incubadas a temperatura ambiente (28°C) por 48 horas. Após o período de incubação, a lamínula foi retirada assim como a porção do meio de cultura com o auxílio da alça de platina. Foi adicionada uma gota do corante azul de lactofenol algodão no centro de uma lâmina e coberta com a lamínula, em seguida foram examinadas ao microscópio óptico comum (Zeiss® model Primo Star). As alterações estruturais observadas nos ensaios testes foram registradas e comparadas com o crescimento normal encontrado nos experimentos controle na ausência dos produtos (GUNJI et al., 1983).

3.2.1.7 Interação com ergosterol e colesterol

Para determinar se o óleo essencial de *T. vulgaris* e o timol interagem com esteróis de membrana, foi determinada a CIM pelo método de microdiluição descrito anteriormente, na presença e ausência de diferentes concentrações de ergosterol ou colesterol (200 a 400 µg/mL). Este ensaio foi realizado em duplicata e a média geométrica foi calculada. A anfotericina B foi usada como controle positivo (ESCALANTE et al., 2008).

3.2.2 Avaliação toxicológica

3.2.2.1 Ensaio toxicológico pré-clínico agudo

O óleo essencial e o fitoconstituente majoritário, timol foram submetidos ao ensaio toxicológico agudo com o objetivo de avaliar as alterações comportamentais frente ao SNC e ao Sistema Nervoso Autônomo (anexo 2), investigar os órgãos alvos e o índice de letalidade, de acordo com a RE 90/2004 com modificações (BRASIL, 2004) e ALMEIDA et al (1999).

Foram utilizados camundongos machos (n = 6) e fêmeas (n = 6), agrupados separadamente em caixas de polietileno, os quais receberam por via intraperitoneal (i.p.) as doses de 125, 250, 500 ou 1000 mg/kg do óleo essencial de *T. vulgaris* ou do timol. Após o tratamento, foram observados os efeitos gerais apresentados pelos animais nos intervalos de 30, 60, 90, 120, 180 e 240 minutos no primeiro dia e comparado ao respectivo grupo controle (Tween 80). Após 72 horas de observação foi determinado a DL₅₀, que possibilita investigar os possíveis efeitos tóxicos de substâncias e extratos, permitindo a realização dos testes farmacológicos utilizando doses seguras (GRACIOSO et al., 1998)

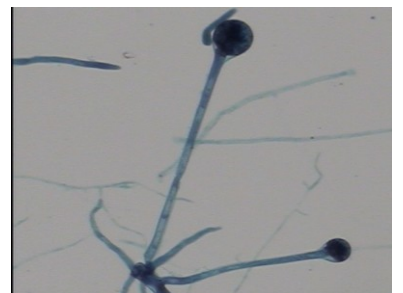
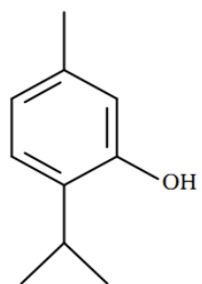
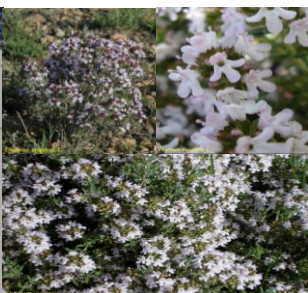
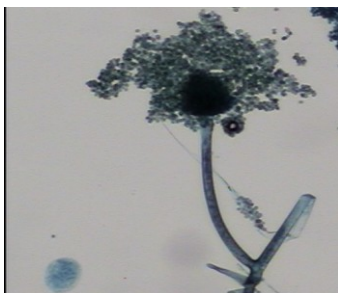
Em adição a estes parâmetros, foi investigado o efeito do óleo essencial de *T. vulgaris* e timol nas doses de 125 e 250 mg/kg sobre o peso corporal, massa relativa dos órgãos, alterações macroscópicas das vísceras e parâmetros hematológicos dos camundongos. A pesagem dos camundongos foi realizada antes da administração dos produtos e no 14º dia após o tratamento. Após esse período o sangue dos animais foi coletado através do plexo braquial para realizar os exames

de avaliação dos parâmetros hematológicos. Em seguida, os animais foram eutanasiados, suas vísceras (coração, pulmão, fígado, rins e baço) pesadas e examinadas macroscopicamente no LABETOX, do PgPNSB, do CCS, UFPB.

3.3 Análise estatística

Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média (e.p.m.). A avaliação estatística dos resultados foi realizada empregando-se o teste “t” de Student ou Mann Whitney quando apropriado de acordo com a normalidade dos dados. Também foi realizado o teste de Fischer para a porcentagem de germinação de esporangiósporos fúngicos e Análise de Variância (ANOVA) de duas vias, seguido do pós-teste de Bonferroni para a cinética de crescimento micelial. A determinação da Dose Letal 50% (DL₅₀) foi calculada por regressão não-linear. Os resultados foram considerados significantes quando $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO



4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante a última década, avanços nos métodos de diagnóstico e a introdução de novos agentes antifúngicos melhorou significativamente o prognóstico de pacientes que desenvolvem infecções fúngicas invasivas, principalmente os imunocomprometidos. Porém, as taxas de morbidade e mortalidade permanecem relativamente altas para as mucormicoses, a terceira infecção fúngica invasiva mais comum, depois das candidíases e aspergiloses (WALSH et al., 2004; KAUFFMAN, 2006; CHAYAKULKEEREE; GHANNOUM; PERFECT, 2006; LEWIS et al., 2012).

Devido ao limitado arsenal terapêutico para tratamento das mucormicoses, além dos diversos efeitos colaterais associados com o uso destes agentes antifúngicos, aliado ao fato de que muitos pacientes que desenvolvem estas agressivas infecções fúngicas apresentam elevado índice de mortalidade, há uma enorme necessidade de novas estratégias terapêuticas, com o intuito de inserir no mercado farmacêutico novos produtos, quer sejam naturais ou sintéticos para o tratamento das mucormicoses. Nesta perspectiva, os produtos naturais vêm se destacando, por serem fontes de moléculas potencialmente bioativas, podendo apresentar um amplo espectro de ações.

Dentre os produtos naturais que tem despertado grande interesse na comunidade científica, destacam-se os óleos essenciais e seus fitoconstituintes, pois têm mostrado promissora atividade antifúngica *in vitro* e *in vivo*. Sendo bastante estudada as atividades terapêuticas de óleos essenciais contra *Candida spp.*, *Trichophyton spp.* e *Aspergillus spp.* (MONDELLO et al., 2003; BANSOD; RAI, 2008; PINTO et al., 2009; AMBER et al., 2010; PEREIRA et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2011; SAJJAD; KHAN; AHMAD, 2011). Entretanto, são escassos os estudos de óleos essenciais e seus compostos sobre a atividade antifúngica contra espécies de *Rhizopus*, o principal responsável pela indução da maioria das mucormicoses.

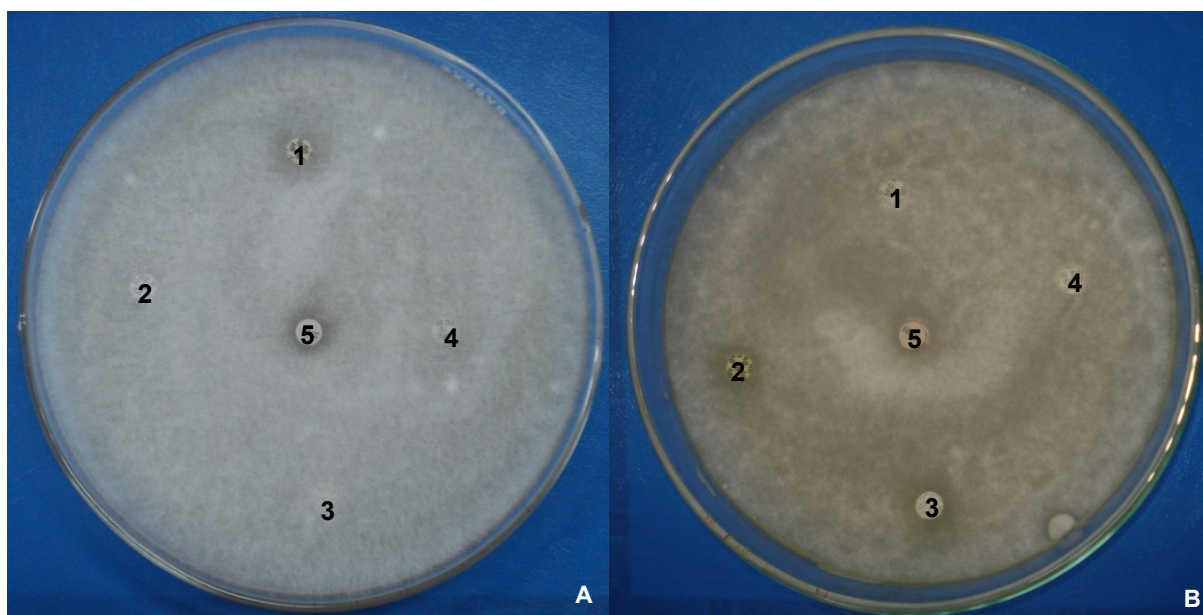
Diante dessas considerações, o presente trabalho foi realizado com o intuito de investigar a atividade antifúngica de 10 óleos essenciais, escolhendo dentre estes, o que apresentar melhor perfil antifúngico para aprofundar os seus estudos.

A resistência dos microrganismos tem sido um fato preocupante e vêm conquistando grande importância clínica, uma vez que, muitos dos zigomicetos são resistentes à maioria dos antifúngicos que são utilizados para tratar micoses

sistêmicas, incluindo 5-flucitosina (5-FC), cetoconazol, fluconazol, voriconazol, e as equinocandinas. Além destes, os zigomicetos possuem sensibilidade variável para itraconazol e terbinafina. Já a maioria destes fungos patogênicos são sensíveis a anfotericina B e posaconazol, um antifúngico triazol (ESPINEL-INGROFF, 2003; DANNAOUI et al., 2003; SABATELLI et al., 2006).

Nesta perspectiva foi realizado o ensaio de difusão em meio sólido para avaliar a sensibilidade de *R. oryzae* e *R. microsporus* frente alguns antifúngicos existentes atualmente no mercado farmacêutico. Foi observado que todas as cepas testadas foram resistentes as cinco drogas antifúngicas avaliadas, anfotericina B, itraconazol, fluconazol, 5-fluorocitosina e miconazol, uma vez que, não apresentaram zona de inibição ou estas tiveram os diâmetros ≤ 10 mm (Figura 12 e Tabela 1).

Figura 12 - Teste de suscetibilidade de cepas de *R. oryzae* RO-4557 (A) e *R. microsporus* RM-5266 (B) frente aos antifúngicos padrão.



1 - Anfotericina B (100 μ g), 2 - itraconazol (10 μ g), 3 - fluconazol (25 μ g), 4 - 5-flucitosina (10 μ g), 5 - miconazol (50 μ g).

Tabela 1 - Suscetibilidade de cepas de *R. oryzae* e *R. microsporus* frente a cinco antifúngicos padrão.

Cepas	Diâmetro da zona de inibição em mm				
	AB	ICZ	FLU	5-FC	MCZ
LM-03	0	0	0	0	0
LM-04	10	0	0	0	0
LM-25	7	0	0	0	0
LM-29	0	0	0	0	0
LM-508	10	0	0	0	0
LM-766	0	0	0	0	0
LM-810	0	0	0	0	0
RO-5786	0	0	0	0	0
RO-4692	0	0	0	0	0
RO-4565	0	0	0	0	0
RO-4557	0	0	0	0	0
RM-4568	0	0	0	0	0
RM-5266	0	0	0	0	0
RM-5926	0	0	0	0	0
RM-5966	0	0	0	0	0

Todos os experimentos foram realizados em duplicata. Anfotericina B (AB), itraconazol (ICZ), fluconazol (FLU), 5-Fluorocitosina (5-FC) e miconazol (MCZ).

Os resultados obtidos reforçam a importância e a necessidade de pesquisas sobre o uso potencial de óleos essenciais no tratamento de infecções fúngicas, devido à resistência emergente, principalmente relacionada aos zigomicetos. Esse fato nos motivou a investigar os óleos essenciais como esta nova alternativa terapêutica.

Diante dessas considerações foi realizada a triagem microbiológica através do ensaio de difusão em meio sólido. Esse método de investigação preliminar fornece apenas informações qualitativas, mas se apresenta bastante útil para estabelecer a suscetibilidade de microrganismos aos óleos essenciais, e de acordo com os

resultados obtidos pode-se elaborar uma sequência de estudos na perspectiva de aprofundar a investigação da atividade antifúngica (HSIEH; MAU; HUANG, 2001).

Neste contexto foi avaliado o perfil antifúngico de 10 óleos essenciais, incluindo *Coriandrum sativum*, *Hyptis suaveolens*, *Origanum majorana*, *Ocimum basilicum*, *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon martini*, *Cymbopogon winterianus*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Origanum vulgare* e *T. vulgaris* contra diferentes cepas de *R. oryzae* resistentes aos antifúngicos utilizados neste ensaio.

Como pode ser observado os óleos essenciais *in natura* de *C. sativum*, *H. suaveolens*, *O. basilicum* e *O. majorana* não apresentaram atividade antifúngica, visto que os diâmetros das zonas de inibição foram ≤ 10 mm (Tabela 2). Já os óleos essenciais de *C. citratus*, *C. martini*, *C. winterianus*, *C. zeylanicum*, *T. vulgaris* e *O. vulgare* apresentaram forte e amplo espectro de ação antifúngica, com os diâmetros médios das zonas de inibição variando de 15-32 mm (Tabela 2). As melhores atividades foram de *T. vulgaris* e *O. vulgare*, ambos com zonas de inibição médias de 32 mm (Tabela 2).

Tabela 2 - Atividade antifúngica de óleos essenciais frente cepas de *R. oryzae*.

Óleos essenciais	Diâmetro da zona de inibição em mm						
	LM-03	LM-04	LM-28	LM-29	LM-508	LM-766	LM-810
<i>C. citratus</i>	25	18	28	23	24	0	24
<i>C. martini</i>	17	16	17	16	18	20	0
<i>C. winterianus</i>	16	17	18	16	22	20	24
<i>T. vulgaris</i>	29	32	28	28	31	38	36
<i>C. zeylanicum</i>	24	23	23	26	25	26	27
<i>O. vulgare</i>	33	33	31	31	30	38	30
<i>O. basilicum</i>	15	16	13	0	0	0	0
<i>C. sativum</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>H. suaveolens</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>O. majorana</i>	0	0	0	0	0	0	0

Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

Os resultados obtidos corroboram com os estudos prévios, que mostraram que os óleos essenciais de *Carum copticum*, *C. verum*, *Syzygium aromaticum*, *Cymbopogon martini*, e *T. vulgaris* mostraram forte atividade antifúngica contra fungos filamentosos resistentes a fluconazol, itraconazol, cetoconazol, clotrimazol, nistatina e anfotericina B (SAJJAD; KHAN; AHMAD, 2011). Os óleos essenciais de *T. eriocalyx* e *T. x-porlock* exibiram propriedades antifúngicas através do teste de difusão em disco, usado como triagem (RASOOLI; ABAYNEH, 2004). Nos últimos anos, um grande número de óleos essenciais, especialmente os de algumas espécies de *Thymus* e os seus componentes fenólicos têm sido investigados por suas propriedades antimicrobianas contra certas bactérias (SIENKIEWICZ et al., 2012), protozoários (SANTORO et al., 2006) e fungos (PINA-VAZ et al., 2004; RASOOLI; ABAYNEH, 2004; TULIO et al., 2007; KLARIC et al., 2007).

Considerando o importante potencial antimicrobiano do gênero *Thymus*, aliado ao resultado evidenciado de que o óleo essencial de *T. vulgaris* apresentou um dos melhores perfis antifúngico no teste de suscetibilidade fúngica, através do ensaio de difusão em meio sólido, o mesmo foi escolhido para dar continuidade ao presente estudo com o intuito de aprofundar a investigação sobre os seus modos de ação antifúngica.

As próximas etapas deste estudo foram as investigações das atividades fungistática e/ou fungicida do óleo essencial de *T. vulgaris* e dos seus fitoconstituintes majoritários (timol e *p*-cimeno) frente 16 cepas de *R. oryzae* e *R. microsporus* através das determinações da CIM e CFM pelo método de microdiluição, que é um método simples e econômico de avaliar a atividade antimicrobiana de produtos naturais, pois requer pouca quantidade de amostra e meio de cultura, podendo ser usado para grande número de produtos. Além disso, possui grande reprodutibilidade, sendo trinta vezes mais sensível que outros métodos usados na literatura (SCORZONI et al., 2007b; OSTROSKY, et al., 2008). Este método tem a vantagem de poder ser utilizado tanto para produtos solúveis em água, como aqueles lipossolúveis e ainda pode ser estendido para fornecer informações sobre a CFM (SCORZONI et al., 2007a).

Na tabela 3 estão sumarizados os valores da CIM e CFM dos produtos testados. Pode-se observar que a CIM do óleo essencial foi de 256 µg/mL para 81,25% das cepas avaliadas. Já para os fitoconstituintes majoritários, timol e *p*-cimeno, as CIMs foram de 128 µg/mL (85,71% das cepas) e maior que 1024 µg/mL (100% das cepas), respectivamente. Os valores de CIM para a anfotericina B, controle positivo, variou entre 2-4 µg/mL. Todas as cepas fúngicas foram capazes de crescer em CSD na ausência dos produtos, o que caracteriza sua viabilidade (controle de microrganismo). Além disso, os controles realizados mostraram ausência de inibição do crescimento fúngico por Tween 80 ou DMSO, confirmando que o impedimento do crescimento foi devido à presença das drogas antifúngicas em estudo.

Estes resultados indicam que o *p*-cimeno não mostrou inibição do crescimento contra *R. oryzae* e *R. microsporus*. Entretanto, o óleo essencial de *T. vulgaris* e timol apresentaram forte atividade antifúngica, sendo o timol duas vezes mais potente, quando comparado a esta mistura complexa, confirmando assim, o seu potencial antifúngico, visto que, óleos essenciais com CIM entre 50 e 500 µg/mL são considerados com forte atividade antimicrobiana, com CIM entre 600 e 1500 µg/mL possuem moderada atividade e CIM acima de 1500 µg/mL é considerado com fraca atividade (SARTORATTO et al., 2004).

Após a determinação da CIM, o presente estudo continuou apenas com o óleo essencial de *T. vulgaris* e o timol, que apresentaram os melhores perfis antifúngicos. Foi investigado o efeito fungicida dessas drogas e pôde-se observar que os valores das CFMs do óleo essencial e timol variaram entre 512-1024 µg/mL e 128-1024 µg/mL, respectivamente (Tabela 3). Sendo que, para a maioria das cepas de *R. oryzae*, os valores das CFMs correspondem a 2 × CIM ou 4 × CIM do óleo. No entanto, o óleo essencial de *T. vulgaris* não apresentou significativa atividade fungicida para *R. microsporus*, pois os valores das CFMs foram > 1024 µg/mL para a maioria das cepas testadas. Para 81,81% das cepas de *R. oryzae* os valores das CFMs são os mesmos ou correspondem a 2 × CIM do timol (Tabela 3).

Já para *R. microsporus* a CFM foi quatro vezes maior que a CIM do timol. Pode-se observar que o óleo essencial apresentou atividade fungicida apenas para *R. oryzae*. Entretanto, o timol apresentou atividade fungicida para ambas as espécies de *Rhizopus* investigadas. Comparando os valores de CFM da maioria das

cepas testadas, o timol exibiu aproximadamente duas a quatro vezes mais potente atividade fungicida do que o óleo essencial de *T. vulgaris*.

Tabela 3 - Efeito da atividade fungicida e fungistática em µg/mL do óleo essencial de *T. vulgaris*, timol e *p*-cimeno frente cepas de *R. oryzae* e *R. microsporus*.

Cepas	Óleo essencial		Timol		<i>p</i> -cimeno	Anfotericina B
	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CIM
LM-03	256	512	128	128	> 1024	4
LM-04	256	ND	128	ND	> 1024	4
LM-25	256	1024	128	256	> 1024	4
LM-28	256	1024	128	256	> 1024	4
LM-29	256	1024	128	256	> 1024	4
LM-508	256	>1024	128	128	> 1024	4
LM-766	256	512	128	256	> 1024	4
LM-810	256	1024	128	256	> 1024	4
RO-5786	512	1024	256	256	> 1024	4
RO-4692	512	1024	256	1024	> 1024	4
RO-4565	256	>1024	128	512	> 1024	2
RO-4557	256	1024	128	256	> 1024	4
RM-4568	512	>1024	128	512	> 1024	4
RM-5266	256	>1024	128	512	> 1024	2
RM-5926	256	>1024	128	512	> 1024	2
RM-5966	256	1024	128	512	> 1024	2

Todos os experimentos foram realizados em duplicata e os dados estão expressos como média geométrica. ND, não determinado.

Estudos anteriores demonstraram que os óleos essenciais de *Thymus spp.*, apresentam amplo espectro de ação fungicida e/ou fungistática. Os óleos essenciais de *T. eriocalyx* e *T. x-porlock*, cujo fitoconstituente majoritário é o timol (64,3 e 30,7%, respectivamente) exibiram fortes atividades fungistática e fungicida

contra *Aspergillus parasiticus* (RASOOLI; ABAYNEH, 2004). Além disso, o óleo essencial de *Thymus spathulifolius*, cujo percentual de timol é 36,5%, inibiu o crescimento de *Trichophyton spp.*, *Fusarium spp.*, *Penicillium spp.*, *Rhizopus spp.*, *Alternaria spp.* e *Aspergillus spp.*, com CIMs variando entre 31 e 250 µg/mL (SOKEMAN et al. 2004). Os óleos essenciais de *Thymus spp.*, particularmente *T. vulgaris* quimiotipo carvacrol (70,3%) e *T. zygis* (39,6% de timol e 21,2% de *p*-cimeno), bem como seus fitoconstituintes, mostraram uma acentuada atividade fungicida contra *C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* resistentes a fluconazol e anfotericina B (PINA-VAZ et al., 2004).

Giordani et al (2004) realizaram um estudo sobre potencial antifúngico dos óleos essenciais de vários quimiotipos de *T. vulgaris* contra *Candida albicans*. Foi evidenciado que *T. vulgaris* quimiotipo geraniol (conhecido como menos ativo do que os álcoois fenólicos), *T. vulgaris* quimiotipo linalol (antiséptico, porém, conhecido como menos ativo do que os álcoois fenólicos) e *T. vulgaris* quimiotipo tujanol-4/terpineol-4 que não contêm timol e carvacrol apresentaram fracas atividades, já *T. vulgaris* quimiotipo borneol (33,9% de borneol e 7,1% de timol) mostrou moderada atividade antifúngica. Entretanto, o óleo essencial de *T. vulgaris* quimiotipo timol foi o mais potente com CIM_{80%} de 0,016 µL/mL, a eficácia é devido principalmente ao elevado teor de timol, 63,2%.

Os efeitos potenciais antifúngicos dos óleos essenciais de *T. tosevii* e *T. vulgaris* (48,9% de timol e 19,0% de *p*-cimeno), bem como seus componentes, timol e carvacrol foram investigados contra 17 micromicetos intoxicantes alimentar, animal, vegetal e patógenos humanos. Ambas as espécies de *Thymus* apresentaram forte atividade antifúngica, no entanto, o óleo essencial de *T. vulgaris* foi mais potente que o óleo de *T. tosevii*. Tal efeito é devido principalmente ao timol, componente majoritário do óleo essencial de *T. vulgaris* e que apresenta menor quantidade em *T. tosevii*, além de apresentar o mesmo perfil de atividade isoladamente (SOKOVIĆ et al., 2009).

De acordo com Klaric et al (2007) tanto o timol como o óleo de essencial *T. vulgaris*, cujos principais componentes são *p*-cimeno (36,5%) e timol (33,0%) apresentaram fortes atividades fungicida e/ou fungistática contra *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Trichoderma*, *Mucor* e *Rhizopus*. Timol apresentou inibição significativamente três vezes mais forte quando comparado com o óleo essencial de *T. vulgaris*.

Muitos pesquisadores tem demonstrado o potencial antifúngico de timol contra espécies de leveduras e fungos filamentosos. Timol inibiu o crescimento de espécies de *Candida* sensíveis e resistentes (isolados clínicos) a azóis e anfotericina B (PINA-VAZ et al., 2004; AHMAD et al. 2010; 2011), bem como interfere com formação e viabilidade de hifas de *C. albicans* (BRAGA et al., 2007). Resultados semelhantes foram relatados para *A. fumigatus*, *T. rubrum* resistentes a azóis e anfotericina B (SAJJAD; KHAN; AHMAD, 2011). Entretanto, são poucos os estudos sobre a atividade antifúngica de *p*-cimeno. Foi evidenciado que o *p*-cimeno e 1,8-cineol foram muito menos eficazes contra *Aspergillus spp.* e *Penicillium spp.* (valores de CIM foram ≥ 4 ou 8% v/v), quando comparado com o timol (HAMMER; CARSON; RILEY, 2003). Mas, para leveduras oportunistas, tanto o timol como o *p*-cimeno, isolados ou em associação exibiram forte atividade antifúngica contra *Candida spp.* (PINA-VAZ et al., 2004).

Comparando o perfil fitoquímico dos óleos essenciais das várias espécies de *Thymus*, especialmente dos quimiotipos timol de *T. vulgaris*, apresentados em estudos anteriores com a composição química do óleo essencial de *T. vulgaris* do presente trabalho, cujos fitoconstituintes majoritários são timol com 46,6% e *p*-cimeno com 38,9% (quadro 5 e anexo 3), pode-se observar que os principais componentes da maioria das espécies de *Thymus* são *p*-cimeno e timol, corroborando aos resultados obtidos.

De acordo com Kalembe e Kunicka (2003) tanto o caráter lipofílico do esqueleto de hidrocarboneto dos constituintes dos óleos essenciais, bem como o caráter hidrófilo dos seus grupos funcionais são de grande importância na ação antimicrobiana dos óleos essenciais. Sendo a atividade antifúngica classificada na seguinte ordem decrescente fenóis > aldeídos > cetonas > alcoóis > ésteres > hidrocarbonetos. Portanto, de acordo com estas observações torna-se evidente que existe uma grande relação entre a forte atividade dos óleos essenciais de *Thymus* com a elevada porcentagem de componentes fenólicos, como timol.

Correlacionando a estrutura com atividade pode-se especular que a atividade fungicida e/ou fungistática do óleo essencial de *T. vulgaris* pode ser atribuída ao timol, seu principal constituinte, especialmente a hidroxila presente neste composto, uma vez que o *p*-cimeno (benzeno), segundo componente majoritário não apresentou significativa atividade antifúngica, o que justifica a menor potência do óleo quando comparada ao timol. Isso suporta a ideia de que a eficácia dos óleos

essenciais depende da sua composição química, principalmente a presença dos componentes fenólicos. Estes resultados são de grande relevância, pois facilitam a utilização de componentes individuais, em vez de uma mistura, dando mais previsibilidade e provavelmente menos efeitos colaterais.

Quadro 5 - Perfil fitoquímico do óleo essencial de *T. vulgaris*.

Constiuintes	%
Timol	46,6
<i>p</i> -cimeno	38,9
Linalol	3,8
α -pineno	3,3
Mirceno	1,7
1,8-cineol	1,2
Canfeno	1,0
Limoneno	0,8
β -pineno	0,6
γ -terpineno	0,3

Picos menores que 0,1% foram excluídos.

Fonte: Vany Ferraz, (2010).

A pesquisa de macromoléculas cuja funcionalidade esteja relacionada ao crescimento, sobrevivência, virulência ou morfogênese celular são apontadas como promissores alvos para novos agentes antifúngicos (ODDS; BROWN; GOW, 2003). Portanto, levando em consideração a fraca atividade do *p*-cimeno e a promissora atividade antifúngica do óleo essencial de *T. vulgaris* e do seu fitoconstituente majoritário, timol, as próximas etapas do estudo foram avaliar se o óleo essencial e o timol interferem no crescimento micelial, na germinação dos esporangiósporos fúngicos e na micromorfologia de cepas de *R. oryzae* e *R. microsporus*.

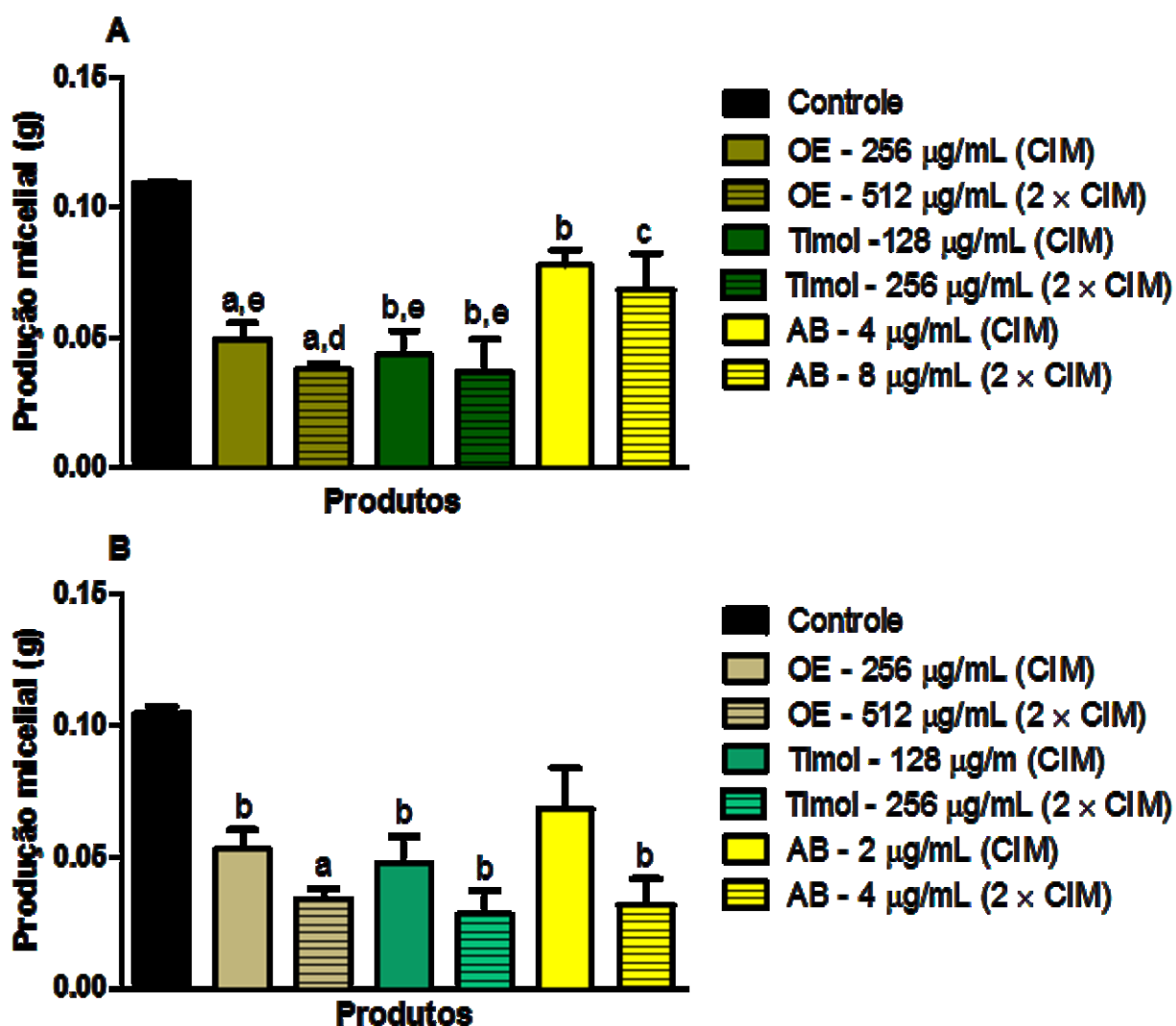
Os fungos da ordem Mucorales, incluindo as espécies de *Rhizopus*, são caracterizados por um micélio aéreo ereto, descrito como fibras ou de

"algodão-doce", que crescem bem e rapidamente (RIBES; VANOVER-SAMS; BAKER, 2000). Estes fungos promovem extensiva angioinvasão, uma característica marcante das mucormicoses, infiltrando-se através dos vasos sanguíneos, resultando em trombose dos vasos e necrose do tecido (SPELLBERG; EDWARDS, IBRAHIM, 2005; KAUFFMAN, 2005). Devido a grande importância do crescimento micelial no desenvolvimento destas micoses, passou-se a investigar o efeito de diferentes concentrações do óleo essencial de *T. vulgaris*, timol e anfotericina B sobre o crescimento micelial através da quantificação da massa micelial seca em gramas de *R. oryzae* RO-4557 e *R. microsporus* RM-5266. Adicionalmente foi avaliada a cinética do crescimento micelial, através do crescimento radial em meio sólido.

Os resultados obtidos demonstraram que o óleo essencial, timol e anfotericina B nas concentrações referentes a CIM e 2 × CIM reduziram significativamente a massa micelial seca de *R. oryzae* (Figuras 13 A), com as seguintes porcentagens de inibição de $55,2 \pm 6,0\%$ (CIM do OE), $65,6 \pm 1,9\%$ (2 × CIM do OE), $60,7 \pm 8,6\%$ (CIM do timol), $66,6 \pm 11,6\%$ (2 × CIM do timol), $29,0 \pm 5,4\%$ (CIM da AB) e $37,3 \pm 12,9\%$ (2 × CIM da AB), quando comparados com o controle normal de *R. oryzae* RO-4557. Estes resultados sugerem que os produtos avaliados inibiram o desenvolvimento micelial normal de *R. oryzae* em todas as concentrações testadas.

Resultados semelhantes foram observados com *R. microsporus* RM-5266 (Figura 13 B). Tanto o óleo essencial como o timol, nas diferentes concentrações testadas inibiram o desenvolvimento micelial normal de *R. microsporus*, o que pode ser evidenciando com as respectivas porcentagens de inibição de $49,6 \pm 6,2\%$ (CIM do OE), $67,6 \pm 4,5\%$ (2 × CIM do OE), $54,8 \pm 9,1\%$ (CIM do timol), $73,1 \pm 5,8\%$ (2 × CIM do timol) quando comparados com o controle. No entanto, a anfotericina B na concentração de 2 µg/mL (CIM) não inibiu significativamente crescimento micelial, ocorrendo inibição de $69,5 \pm 9,8\%$ apenas na concentração de 4 µg/mL (2 × CIM).

Figura 13 - Efeito do óleo essencial de *T. vulgaris*, timol e anfotericina B sobre a produção micelial de *R. oryzae* RO-4557 (A) e *R. microsporus* RM-5266 (B).



Os resultados estão expressos em média $\pm$ e.p.m. de três experimentos. Teste t de Student, ^a $p < 0,0001$, ^b $p < 0,001$ quando ^c $p < 0,05$ comparado com o controle; ^d $p < 0,001$ e ^e $p < 0,05$ comparado com o com AB (2 µg/mL).

Na avaliação da cinética do crescimento micelial pode-se observar que ambas as espécies fúngicas na ausência das drogas testes apresentaram rápido crescimento, o qual foi detectado com 8 h e tomou conta da placa de Petri em aproximadamente 24 h para *R. oryzae* e 48 h para *R. microsporus* (Figuras 14 e 15). No entanto, na presença de diferentes concentrações do óleo essencial de *T. vulgaris*, timol e anfotericina B (CIM/2, CIM, 2 × CIM e 4 × CIM) foi evidenciado de maneira dose dependente significativa redução do crescimento micelial de ambas as

espécies, nos intervalos de 8, 16, 24, e 48 horas (Figura 16 e 17). Entretanto, de modo geral, o crescimento micelial aumentou em função do tempo.

Figura 14 - Crescimento de *R. oryzae* no período de 8 horas (A), 16 horas (B), 24 horas (C) e 48 horas (D).

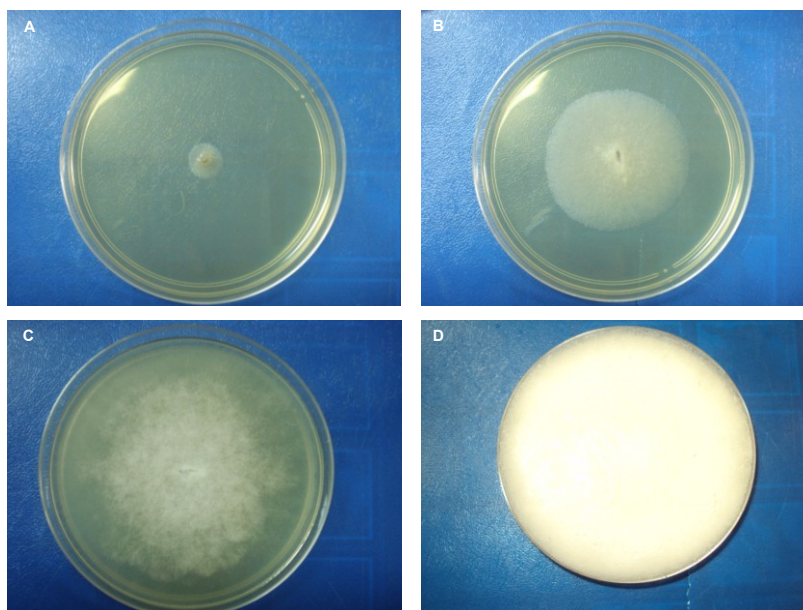
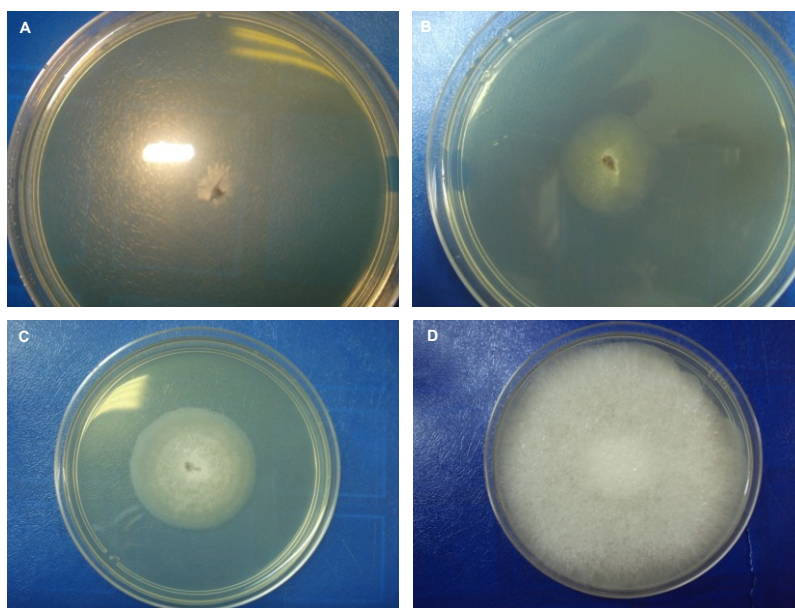


Figura 15 - Crescimento de *R. microsporus* no período de 8 horas (A), 16 horas (B), 24 horas (C) e 48 horas (D).



Para *R. oryzae* a porcentagem de inibição variou de 49-100%, após 24 h de incubação com o óleo essencial, ocorrendo 97% e 100% de inibição do crescimento micelial com as concentrações equivalentes a 2 × CIM e 4 × CIM, respectivamente (Figura 16 A). No entanto, no mesmo intervalo de tempo foi observado 100% de inibição com todas as concentrações do timol (Figura 16 B). Já para *R. microsporus* a porcentagem de inibição variou de 45-100%, ocorrendo a completa inibição do crescimento micelial com 2 × CIM e 4 × CIM do óleo essencial, após 48 h de incubação (Figura 17 A). Resultado semelhante foi observado com o timol, cuja porcentagem de inibição variou de 57-100%, sendo o crescimento micelial de *R. microsporus* completamente abolido com as concentrações de 2 × CIM e 4 × CIM (Figura 17 B).

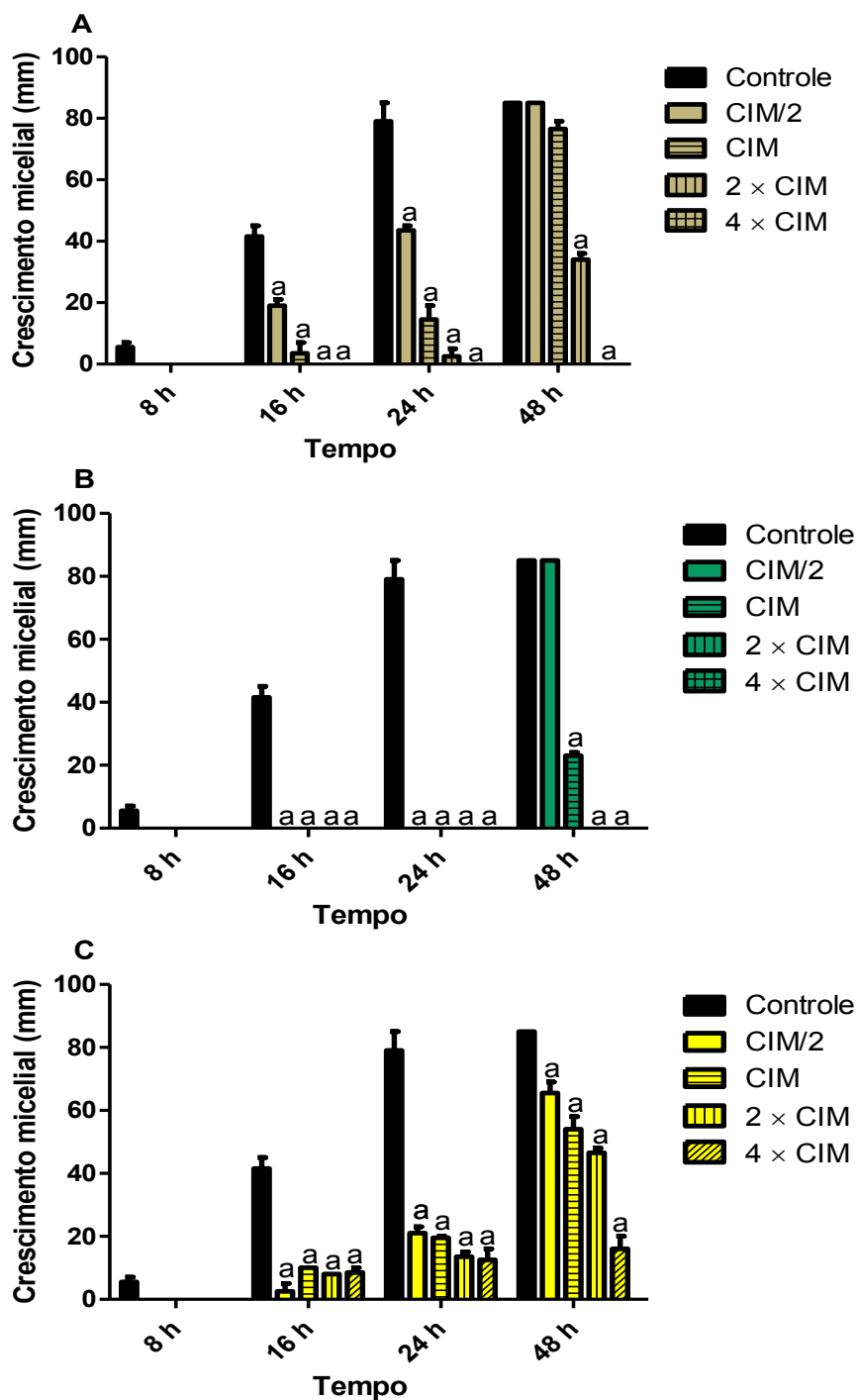
Nos intervalos de 16, 24 e 48 h, a anfotericina B, em todas as concentrações avaliadas não inibiu completamente o crescimento micelial de *R. oryzae* e *R. microsporus* (Figuras 16 C e 17 C). Portanto, o melhor efeito inibitório para ambas as espécies foi evidenciado para o timol, confirmando mais uma vez, que o efeito antifúngico do óleo essencial de *T. vulgaris* é atribuído ao seu fitoconstituente majoritário.

Os resultados encontrados até o momento podem ser considerados de grande relevância para o estudo, pois foi constatado que o óleo essencial de *T. vulgaris* assim como o timol inibem fortemente o crescimento dos fungos analisados neste trabalho. Este achado corrobora aos dados obtidos por alguns pesquisadores, que vêm investigando o potencial antifúngico dos óleos essenciais em inibir crescimento micelial de fungos patogênicos e não patogênicos (REDDY et al., 1998; DAFERERA; ZIOGAS; POLISSIOUA, 2003; RASOOLI; ABYANEH, 2004; ALIZADEH-SALTEH et al., 2010; PEREIRA et al., 2011).

Os óleos essenciais de *Origanum vulgare* (orégano), *Thymus capitatus* (tomilho), *Origanum dictamnus*, *Origanum majorana* (manjerona), inibiram completamente o crescimento de *Botrytis cinerea* e *Fusarium solani* var. *coeruleum* (DAFERERA; ZIOGAS; POLISSIOUA, 2003). Os óleos essenciais de duas variedades de tomilho, *Thymus eriocalyx* e *Thymus x-porlock* inibiram o crescimento micelial de *Aspergillus parasiticus* (RASOOLI; ABYANEH, 2004). Também foram relatado significativo efeito inibidor de alguns óleos essenciais sobre o crescimento de *R. stolonifer*, a exemplo dos óleos essenciais de *Salvia officinalis*, *Satureja hortensis* e *Zataria multiflora* (ALIZADEH-SALTEH et al., 2010) e óleo

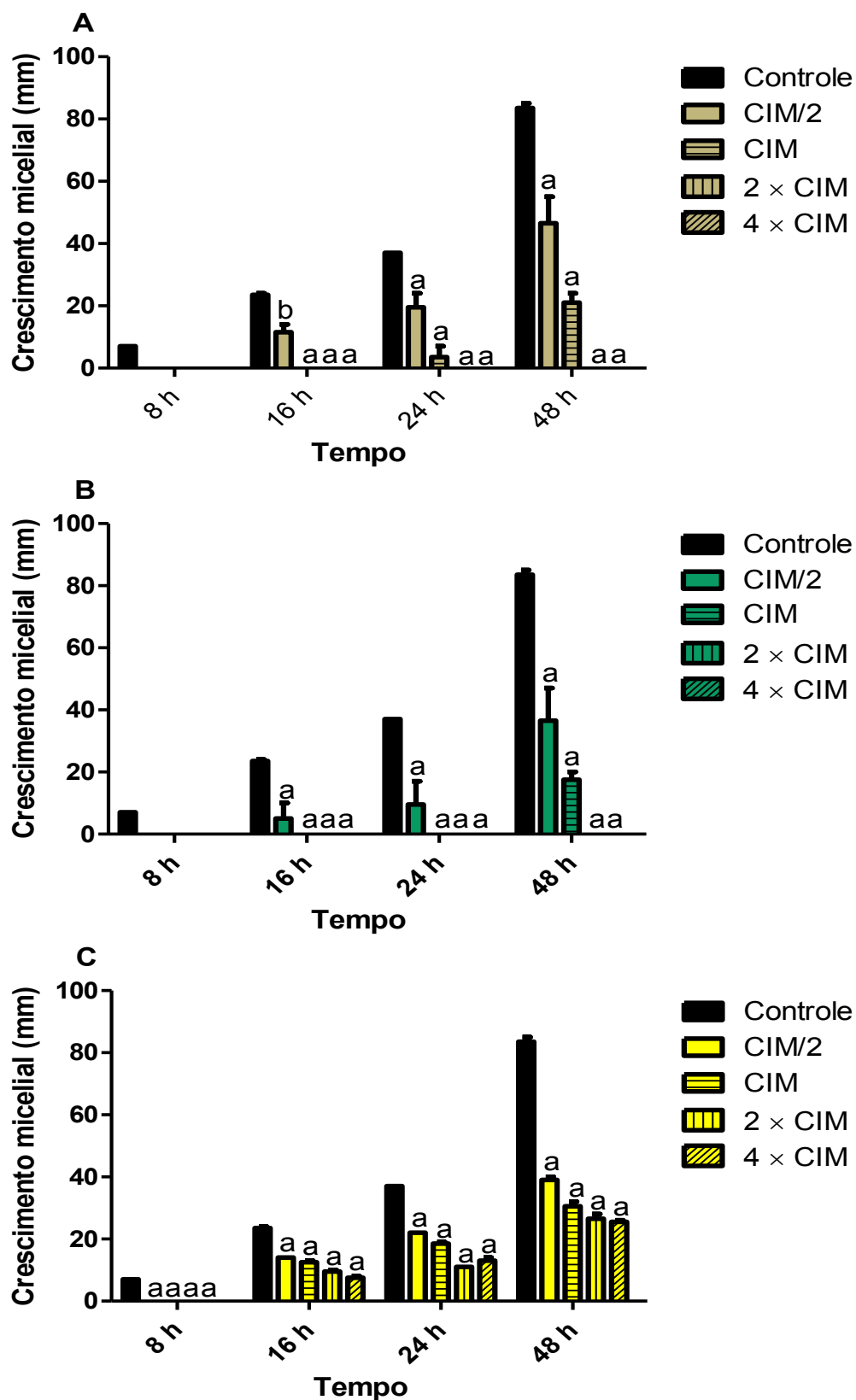
essencial de *T. vulgaris* (REDDY et al., 1998). Recentemente nosso grupo de pesquisa mostrou que o óleo essencial de *C. winterianus* inibiu o desenvolvimento micelial de *Trichophyton rubrum* (PEREIRA et al., 2011).

Figura 16 – Efeito do óleo essencial de *T. vulgaris* (A), timol (B) e anfotericina B (C) sobre a cinética do crescimento micelial de *R. oryzae* (RO-4557).



Os resultados estão expressos em média $\pm$ e.p.m. de três experimentos. ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni, ^a $p < 0,0001$ quando comparado ao controle.

Figura 17 – Efeito do óleo essencial de *T. vulgaris* (A), timol (B) e anfotericina B (C) sobre a cinética do crescimento micelial de *R. microsporus* (RM-5266).



Os resultados estão expressos em média $\pm$ e.p.m. de três experimentos. ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni, ^a $p < 0,0001$ e ^b $p < 0,001$ quando comparado ao controle.

Os esporos resultantes da reprodução assexuada, também denominados de conídios, são críticos no ciclo de vida de muitos fungos, porque é o principal meio de dispersão e serve como um “ambiente seguro” para o genoma de fungos em condições ambientais adversas. As mucormicoses, infecções fúngicas frequentemente fatais, são iniciadas por contato do hospedeiro com os esporangiósporos aéreos, que inicia o processo infeccioso submetendo-se a germinação dos esporangiósporos e formação de micélio. Portanto, o estudo de germinação de esporangiósporos tem grandes implicações na prática clínica, visto que, pode ser possível desenvolver novas abordagens terapêuticas que bloqueiam a infecção no seu início (OSHEROV; MAY, 2001).

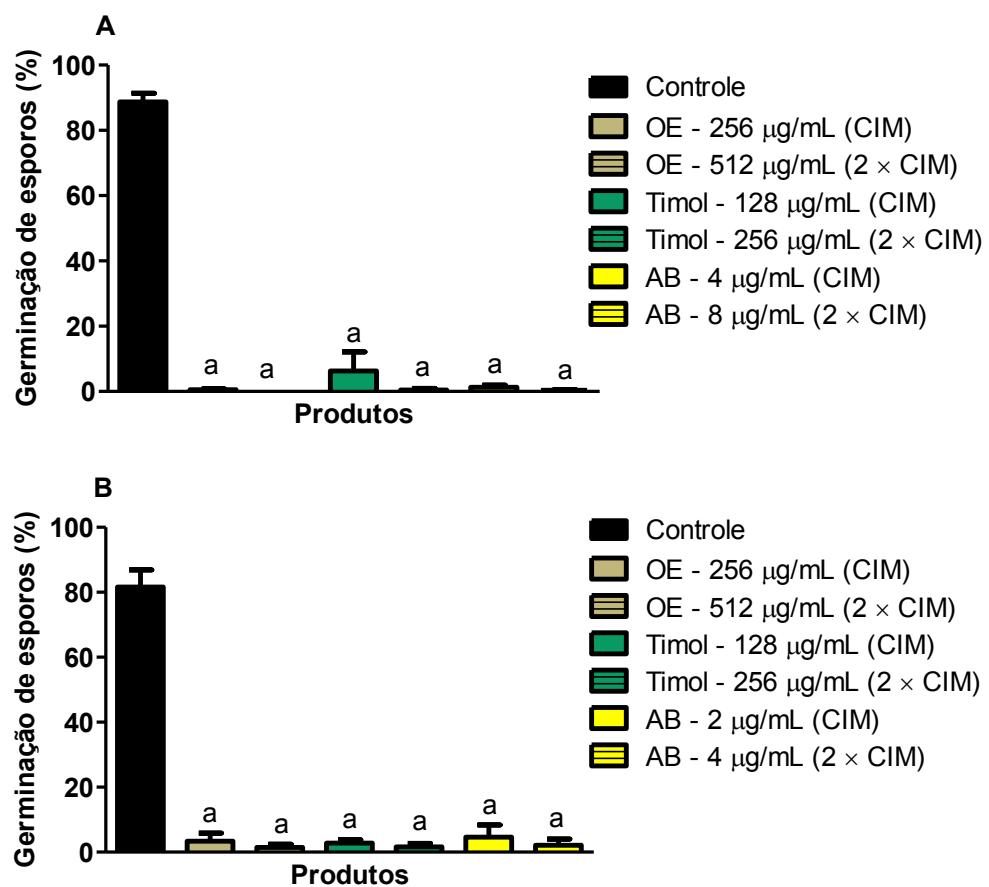
Nesta perspectiva foi investigado se o óleo essencial de *T. vulgaris* e seu principal componente fenólico interferem no processo de germinação de esporangiósporos de *R. oryzae* RO-4557 e *R. microsporus* RM-5266. Como pode ser observado na figura 18, em todas as concentrações avaliadas (CIM e 2 × CIM), o óleo essencial, timol e anfotericina B exerceram forte poder inibitório sobre o processo germinativo dos esporangiósporos de ambas as espécies testadas, visto que reduziram significativamente a germinação de esporangiósporos, com as porcentagens de inibição variando entre 93,7-100% e 95,4-98,6% frente às cepas de *R. oryzae* e *R. microsporus*, respectivamente.

Diante da importância do processo de germinação dos esporangiósporos de *Rhizopus*, como causa primária na indução das mucormicoses, os resultados apresentados são de grande relevância, revelando assim, o potencial antifúngico do óleo essencial e do timol em bloquear, logo no início, a infecção induzida por *R. oryzae* e *R. microsporus*, visto que, inibem significativamente os esporangiósporos, estruturas que se apresentam como um alvo de grande importância terapêutica. Além disso, o óleo essencial de *T. vulgaris* e o seu componente majoritário apresentaram resultados semelhantes aos da anfotericina B, fármaco de primeira linha no tratamento dessas infecções.

O potencial antifúngico dos óleos essenciais em inibir a germinação de esporangiósporos vem sendo bastante estudado. Foi reportado que o óleo essencial de *C. winterianus* mostrou forte poder inibitório da germinação de conídios de *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* (PEREIRA, 2009; PEREIRA et al., 2011). Óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* inibiu germinação de conídios de *A. fumigatus*, *A. flavus* e *A. niger* (CARMO et al. 2008). Além disso, considerando a

importância da germinação de esporangiósporos de *Rhizopus* na patogênese das mucormicoses, algumas pesquisas relatam o efeito inibitório de certas drogas neste processo. Lovastatina promoveu significativo atraso na germinação de esporangiósporos de *Rhizomucor pusillus* (LUKÁCS et al., 2004). Adicionalmente foi relatado que estatinas (lovastatina, sinvastatina, rosuvastatina e atorvastatina) inibiram a germinação de esporangiósporos de fungos da classe dos zigomicetos (GALGÓCZY et al., 2007). Foi evidenciado que N-acetil-cisteína e seus derivados inibem a germinação de esporangiósporos de diferentes zigomicetos, especialmente *R. oryzae* (GALGÓCZY et al., 2009).

Figura 18 - Efeito do óleo essencial de *T. vulgaris*, timol e anfotericina B sobre a germinação dos esporangiósporos de *Rhizopus oryzae* RO-4557 (A) e *Rhizopus microsporus* RM-5266 (B).



Os resultados estão expressos em média $\pm$ e.p.m. de três experimentos. ^a $p < 0,0001$ quando comparado ao controle (teste Fischer).

A germinação de esporangiósporos e a formação micelial dependem da morfogênese normal do fungo. Portanto, uma vez determinado o potencial antifúngico do óleo essencial de *T. vulgaris* e do timol em inibir o desenvolvimento micelial e a germinação de esporangiósporos de *R. oryzae* e *R. microsporus*, passou-se a investigar a ação destes produtos na morfologia de ambas as espécies de *Rhizopus* em estudo, por meio da técnica de micromorfologia, que permite demonstrar através da microscopia óptica a morfologia dos fungos e suas alterações provocadas por diferentes concentrações das drogas-teste.

Ao examinar as lâminas de *R. oryzae* e *R. microsporus* no microscópio óptico comum, pode-se observar que diferentes concentrações (CMI/2 e CIM) do óleo essencial, timol e anfotericina B promoveram alterações no padrão morfológico de ambas as espécies de *Rhizopus* (Figuras 19 e 20). O processo de esporangiogênese foi bastante afetado, sendo observado poucos esporângios e esporangiósporos, e, em algumas lâminas foram observadas a completa inibição da esporangiogênese com a ausência de esporângios, em comparação ao controle.

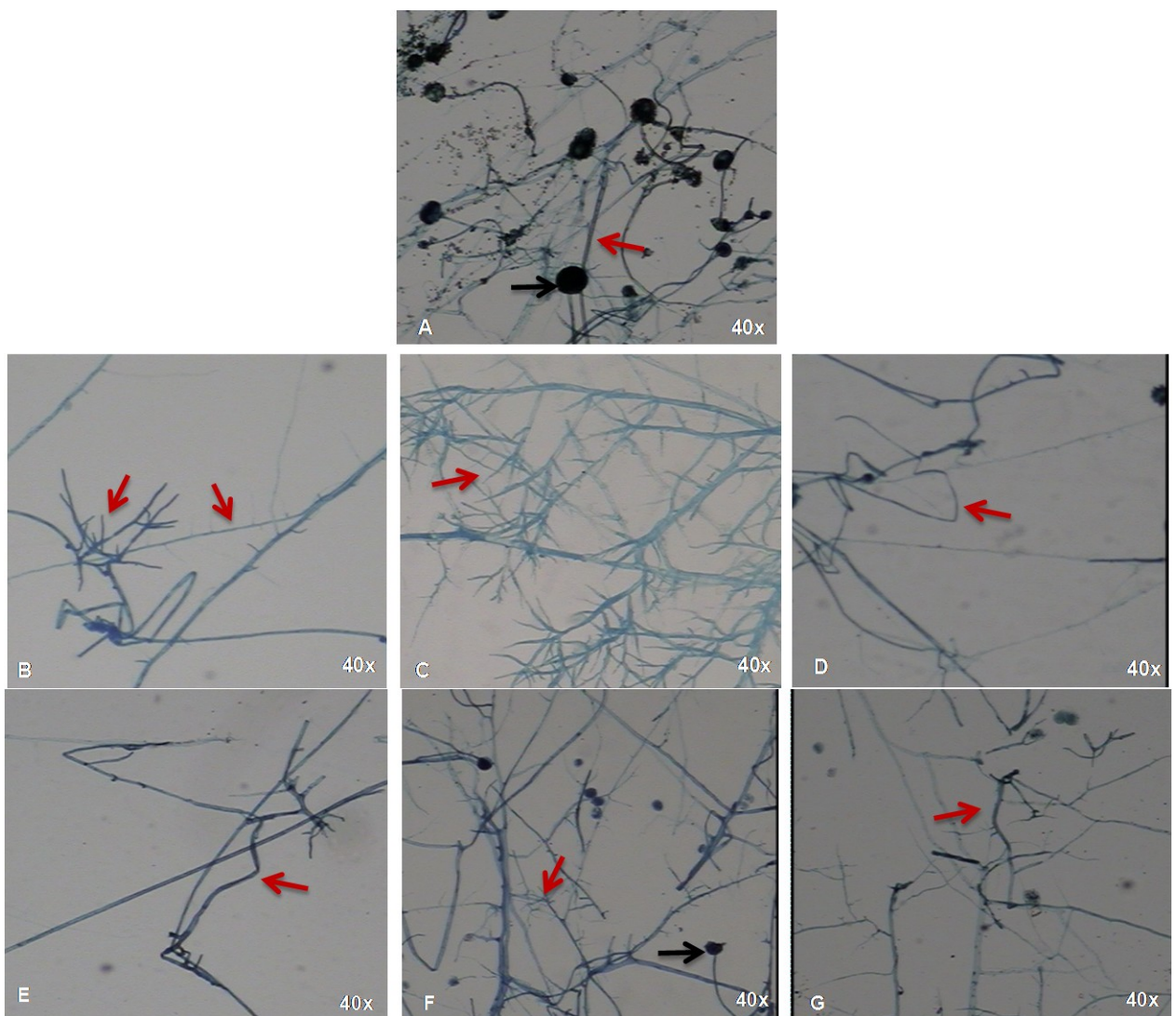
Todos os produtos promoveram alterações marcantes na formação normal das hifas de *R. oryzae* e *R. microsporus*, visto que as hifas se apresentaram curtas, tortuosas e com alguns vacúolos, quando comparados com o controle, o qual apresentou o padrão característico do gênero, com hifas hialinas largas (6-15 micrometros em diâmetro), não apresentando septos, ou muito poucos (RIBES; VANOVER-SAMS; BAKER, 2000). As hifas são identificadas em tecidos humanos infectados, tendo grande importância clínica na disseminação da mucormicose (NOURI-MAJALAN; MOGHIMI, 2008; HEMASHETTAR et al., 2011).

Resultado interessante foi a formação de clamidoconídios em *R. microsporus* na presença do óleo essencial, timol e anfotericina B (Figura 21). Estas estruturas reprodutivas assexuais são derivadas das hifas vegetativas de certas espécies de Mucorales, que se apresentam normalmente como células vegetativas de formato grande e citoplasma condensado, com paredes espessas e com variadas formas. Os clamidosporos podem ser formados intercalado com o micélio (formação endógena) (RIBES; VANOVER-SAMS; BAKER, 2000; LACAZ et al., 2002). São considerados estruturas de resistência, desenvolvidas em resposta a estímulos ambientais adversos, a exemplo de variações na osmolaridade, pH, temperatura, a luz e exposição a certas drogas antifúngicas (COLE et al., 1991; GOMPERTZ, et al.,

2000; OHARA; TSUGE, 2004), justificando assim, a sua produção na presença dos produtos investigados neste estudo.

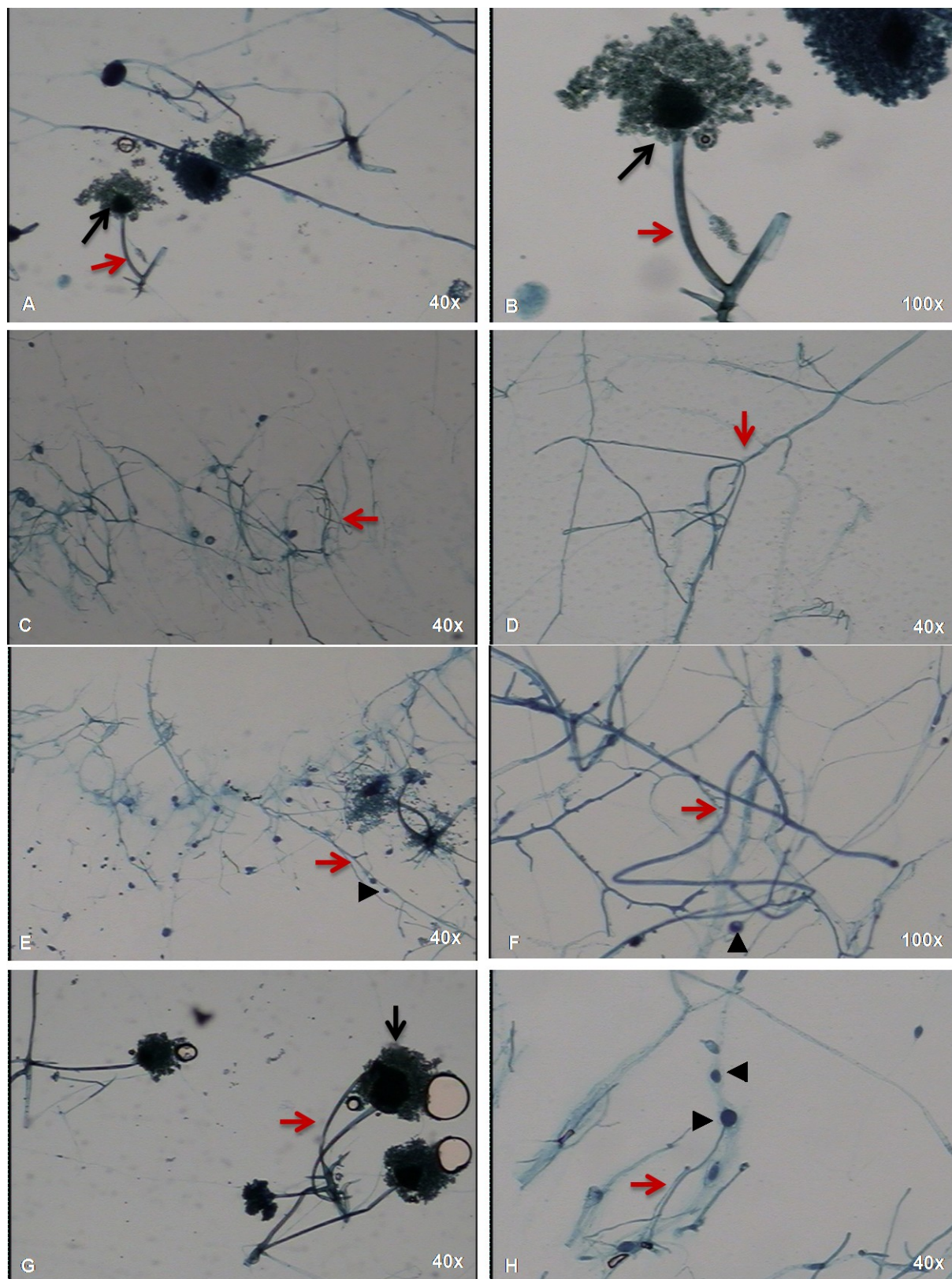
Os resultados corroboram aos apresentados anteriormente e enfatizam o potencial antifúngico do óleo essencial de *T. vulgaris* e seu principal constituinte, timol, no tratamento das mucormicoses.

Figura 19 - Efeito do óleo essencial de *T. vulgaris*, timol e anfotericina B sobre a micromorfologia de *R. oryzae* (RO-4557).



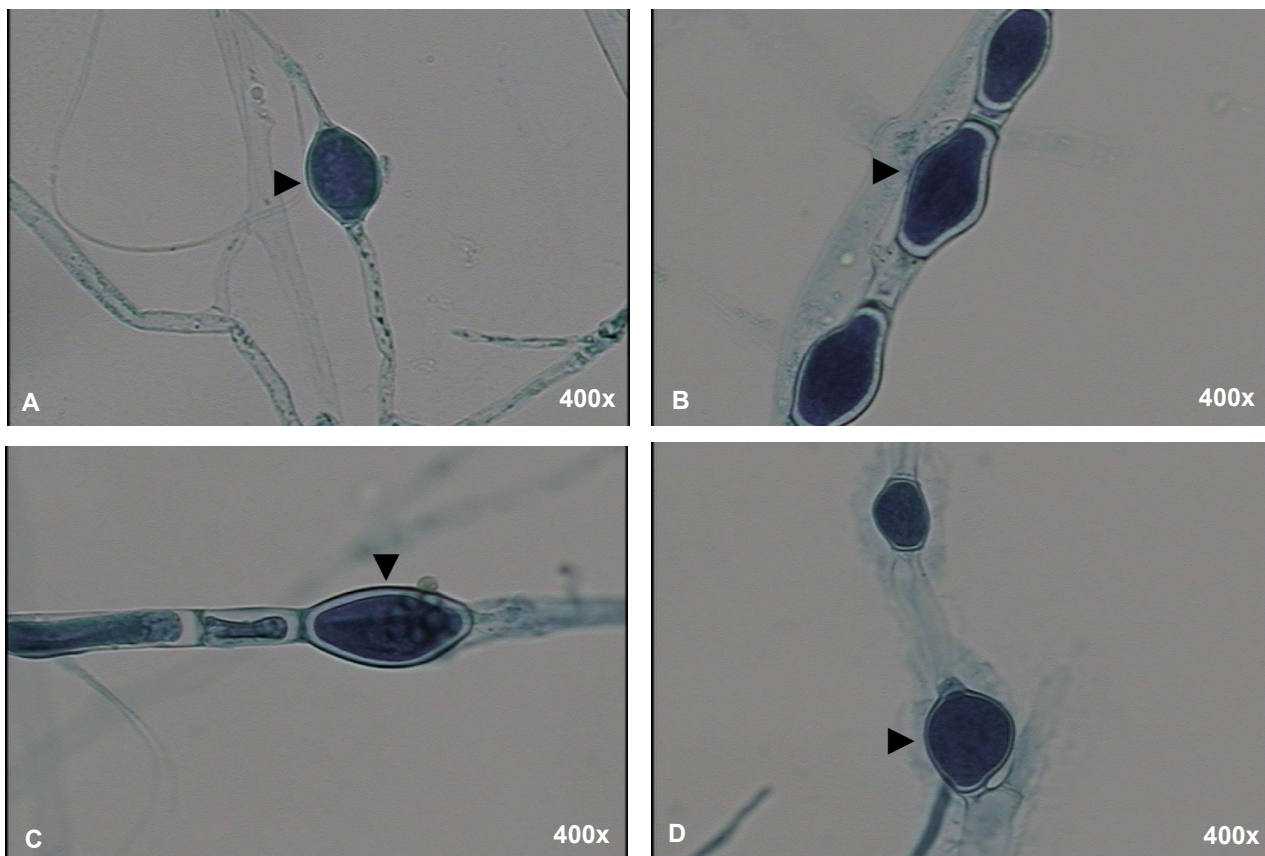
Controle (A); óleo essencial 128 µg/mL (B) e 256 µg/mL (C); timol 64 µg/mL (D) e 128 µg/mL (E); anfotericina B 2 µg/mL (F) e 4 µg/mL (G). → Esporângio e → esporangióforo.

Figura 20 - Efeito do óleo essencial de *T. vulgaris*, timol e anfotericina B sobre a micromorfologia de *R. microsporus* (RM-5266).



Controle (A e B); óleo essencial 128 µg/mL (C) e 256 µg/mL (D); timol 64 µg/mL (E) e 128 µg/mL (F); anfotericina B 2 µg/mL (G) e 4 µg/mL (H). → Esporângio, → esporangióforo e ► clamidoconídio.

Figura 21 - Presença de clamidoconídios em *R. microsporus* (RM-5266) na presença de A) 128 $\mu\text{g/mL}$ do óleo essencial, B) 128 $\mu\text{g/mL}$ do timol, C) 1 $\mu\text{g/mL}$ e D) 2 $\mu\text{g/mL}$ de anfotericina B.



► Clamidoconídios.

Considerando o caráter lipofílico dos óleos essenciais e dos seus componentes fenólicos, bem como a possibilidade destes produtos de interagir com as membranas biológicas, passou-se a investigar a participação de esteróis de membrana no efeito antifúngico promovido pelo óleo essencial de *T. vulgaris* e timol.

Ergosterol é o principal esterol presente em leveduras e fungos filamentosos, sendo necessário para o crescimento e função normal da membrana das células fúngicas. Além de servir como um regulador da fluidez, assimetria e integridade da membrana, o ergosterol contribui para o bom funcionamento de enzimas ligadas à membrana (LUPETTI et al., 2002). A maioria dos fármacos existentes para o tratamento de infecções fúngicas, tem como alvos farmacológicos direta ou

indiretamente a parede e a membrana plasmática, particularmente, o esterol de membrana fúngica, ergosterol, e a sua biossíntese (LUPETTI et al., 2002; ODDS; BROWN; GOW, 2003).

Nesta perspectiva foi realizado o ensaio com o ergosterol, presente apenas em membranas fúngicas e colesterol, presente na membrana de células de mamíferos. Este método baseia-se na oferta exógena de esteróis a um composto, que possuindo afinidade por esteróis irá formar rapidamente um complexo, impedindo assim a complexação com os esteróis da membrana. Isso resulta em aumento da CIM (ESCALANTE et al., 2008).

As CIMs do óleo essencial e do timol para *R. oryzae* aumentaram em quatro e oito vezes, na presença de 200 e 400 µg/mL de ergosterol, respectivamente. Já para o colesterol as CIMs dos produtos aumentaram em quatro vezes para ambas as concentrações. A anfotericina B, controle positivo que possui conhecida interação com ergosterol apresentou CIM aumentada em até 256 vezes na presença deste esterol. Semelhante interação foi evidenciada na presença do colesterol (Tabela 4).

Para *R. microsporus* as CIMs do óleo essencial aumentaram em quatro vezes para ambas as concentrações testadas (Tabela 4). Resultado semelhante foi evidenciado na presença do colesterol. Já as CIMs do timol aumentaram para 512 µg/mL (4 × CIM) e 1024 µg/mL (8 × CIM), na presença de 200 e 400 µg/mL de ergosterol, respectivamente. Na presença do colesterol as CIMs aumentaram para 512 µg/mL (4 × CIM) em ambas as concentrações. A anfotericina B apresentou CIM aumentada em até 256 vezes na presença do ergosterol para ambas as concentrações. No entanto, na presença do colesterol, a CIM aumentou em até 256 e 512 vezes, nas concentrações de 200 e 400 µg/mL, respectivamente (Tabela 4).

Vem sendo bastante estudada a ação dos óleos essenciais e seus componentes fenólicos sobre a membrana. Os óleos essenciais de *Thymus spp.*, especialmente *T. zygis* e *T. vulgaris* e seus componentes, como carvacrol, timol e *p*-cimeno apresentaram uma potente atividade fungicida contra *Candida spp.*, resultante principalmente de uma extensa lesão da membrana celular (PINA-VAZ et al., 2004). Os óleos essenciais de *Thymus eriocalyx* e *Thymus x-porlock* provocaram danos irreversíveis na parede, organelas e membrana celular de *A. parasiticus* (RASOOLI; OWLIA 2005).

Tabela 4 - Efeito da anfotericina B, do óleo essencial de *T. vulgaris* e timol frente cepas de *R. oryzae* e *R. microsporus* na ausência e na presença de esteróis.

Cepas	Produtos	CIM (µg/mL)				
		Ausência	Presença de ergosterol		Presença de colesterol	
		de esteróis	200	400	200	400
RO-4557	OE	256	1024	2048	1024	1024
	Timol	128	512	1024	512	512
	AB	4	1024	1024	512	1024
RM-5266	OE	256	1024	1024	1024	1024
	Timol	128	512	1024	512	512
	AB	2	512	512	512	1024

Todos os experimentos foram realizados em duplicata e os dados estão expressos como média geométrica.

Braga et al (2007) relataram que o timol interfere com a formação e a viabilidade das hifas *Candida albicans*, o que pode ser atribuído às características anfipáticas do timol em perturbar as membranas celulares. Adicionalmente foi evidenciado que a forte atividade fungicida promovida por carvacrol e timol contra todos os isolados de *Candida* pode se devido à inibição da biossíntese de ergosterol e a ruptura da integridade da membrana (AHMAD et al., 2011).

São poucos os estudos sobre a interação direta dos óleos essenciais e seus fitoconstituintes com o ergosterol da membrana. Apesar de haver uma grande variedade de compostos biologicamente ativos, como os polienos, cujo principal representante é a anfotericina B, que se ligam diretamente ao ergosterol, formando poros que desestabilizam a membrana, levando a perda do material intracelular, resultando na lise celular (ODDS; BROWN; GOW, 2003; BAGINSKI et al., 2005; LEMKE et al., 2005; SPELLBERG et al., 2009).

Diante do exposto, pode-se sugerir que o mecanismo antifúngico promovido pelo óleo essencial e timol envolve a interação direta com o ergosterol, o que conduz ao rompimento da membrana fúngica e perda do conteúdo intracelular. Entretanto, tal ação não é seletiva, visto que, há também interação dos produtos com o colesterol. Semelhante ao que ocorre com a anfotericina B, que tem caráter

anfipático, possuindo assim, capacidade de se ligar a ambos os esteróis, ergosterol e colesterol incorporados nas membranas celulares, sendo tóxico para as células de mamíferos, particularmente causando nefrotoxicidade (ODDS; BROWN; GOW, 2003. BAGINSKI et al., 2005; BARAN; BOROWSKI; MAZERSKI, 2009).

Deve ser lembrado que os óleos essenciais e seus fitoconstituintes podem causar danos às membranas biológicas, devido às suas propriedades lipofílicas (KNOBLOCH et al., 1989). Por isso, a aplicação clínica destes produtos é muitas vezes desencorajada por causa de seus potenciais efeitos tóxicos quando usado em altas concentrações (INOUE et al. 2000). Além disso, como o óleo essencial de *T. vulgaris* e o timol apresentaram afinidade com o colesterol, esterol presente na membrana de mamíferos, e neste caso, tal resultado constitui um indício de que os compostos possuem toxicidade frente às células humanas. Nesta perspectiva foram realizados estudos de toxicidade *in vivo* com a finalidade de avaliar o potencial toxicológico do óleo essencial e seu fitoconstituinte majoritário, timol, para estabelecer se podem ser utilizados com segurança como agentes antifúngicos contra *R. oryzae* e *R. microsporus*.

A toxicidade aguda é utilizada para avaliar fitoterápicos de acordo com o seu potencial de letalidade ou sinais tóxicos como estabelecido pela RE 90/2004 (BRASIL, 2004), podendo também ser determinadas as espécies animais mais suscetíveis à ação das drogas avaliadas, identificar órgãos alvos e selecionar doses para estudos posteriores (CHAN; HAYES, 1994).

O estudo foi iniciado com a triagem farmacológica comportamental utilizando a metodologia padronizada por Almeida et al (1999) com o objetivo de identificar alterações em nível do SNC e SNA produzidas pelo óleo essencial de *T. vulgaris* e timol nas doses de 125, 250, 500 e 1000 mg/kg, administradas por via intraperitoneal em camundongos. Assim, esse modelo permite avaliar se determinadas drogas apresentam toxicidade, possibilitando o estudo farmacológico de plantas e/ou fitoconstituintes com uma determinada margem de segurança (ALMEIDA; OLIVEIRA, 2006).

Na dose de 125 mg/kg, via i.p. tanto o óleo essencial como o timol apresentaram efeito imediato, sendo observado nos animais diminuição da ambulação, sedação, resposta ao toque diminuído, ptose palpebral e diminuição da força para agarrar, entretanto, o efeito durou menos de 30 minutos para o óleo essencial e menos de uma hora para o timol.

Nas doses de 250, 500 e 1000 mg/kg, via intraperitoneal foi observado que ambos, o óleo essencial e o timol, promoveram alterações comportamentais nos camundongos, sendo tal efeito iniciado minutos após a sua administração. Os animais apresentaram ptose palpebral, sedação, diminuição do reflexo de endireitamento, analgesia, resposta ao toque diminuído, perda do reflexo corneal e auricular. Além destes efeitos depressores, os camundongos apresentaram os movimentos de ambulação, levantar e escalar diminuídos, bem como diminuição do tônus muscular, da força para agarrar e respiração forçada. Os efeitos foram diminuindo ao longo do período de duas horas, sendo quase todos os efeitos revertidos três horas após a administração das drogas-teste na dose de 250 mg/kg, porém, com as doses de 500 e 1000 mg/kg os efeitos persistiram durante as quatro horas de avaliação, com exceção do tônus muscular e força para agarrar que foram revertidos em duas horas.

Os resultados sugerem que nas doses avaliadas o óleo essencial e o timol possuem atividade depressora ou sedativa do SNC. A ambulação diminuída em camundongos é talvez a forma mais comum de verificar se uma substância analisada apresenta efeito depressor do SNC. Além disso, a demora de reação do camundongo em resposta a um toque e presença de quadro sedativo, representado por sonolência, relaxamento e diminuição da atividade motora sem perda da consciência, pode indicar efeito depressor do SNC em animais (ALMEIDA; OLIVEIRA, 2006).

Não se pode inferir toxicidade apenas com alterações desses parâmetros, uma vez que o óleo essencial e timol não induziram nos animais contorções abdominais, tremores, convulsões, comportamentos estereotipados, catalepsia e ataxia. Além disso, várias espécies da família Lamiaceae são usadas na medicina popular por suas propriedades em nível do sistema nervoso central, como atividades sedativas e analgésicas (NAGHIBI et al., 2005). Especialmente *T. vulgaris* que é usada na medicina popular como um indutor do sono (FIGUEIREDO et al., 2008) e sedativa (RUSTAIYAN et al., 2000), além de apresentar experimentalmente atividade analgésica central (MOHSIN, 1989).

Muitos óleos essenciais e derivados monoterpênicos têm demonstrado, em modelos experimentais, atividades sobre o SNC, incluindo ações sedativa, antinociceptiva e antidepressiva (OLIVEIRA et al., 2009; PASSOS et al., 2009; ANGELES-LOPEZ et al., 2010; MOTA, 2011). O óleo essencial de

Lippia microphylla, e seu componente majoritário, timol, quando administrados via i.p. induziram alterações comportamentais sugestivas de droga psicoléptica, ou seja, depressora do SNC, bem como foi evidenciado, além de características de drogas sedativas, possível potencial ansiolítico em camundongos (MOTA, 2011). Esses dados corroboram, em parte, com os dados obtidos neste estudo.

Após 72 horas de observação, registrou-se que a dose de 125 mg/kg do óleo essencial não provocou a morte dos camundongos de ambos os sexos, entretanto, as doses de 250 e 500 mg/kg mataram 50% e 100% dos camundongos machos, respectivamente. Já para as fêmeas as doses de 250, 500 e 1000 mg/kg do óleo essencial provocaram 50%, 25% e 100% de mortes, respectivamente. Assim, foi possível calcular por regressão não-linear a DL_{50} via i.p., sendo essa estimada em 250 mg/kg para os machos e 459,6 mg/kg para as fêmeas.

O timol na dose de 125 mg/kg (i.p.) não provocou a morte dos animais de ambos os sexos. No entanto, nas doses de 250 e 500 mg/kg (i.p.) mataram 66,7% e 80% dos machos, respectivamente. A administração de 250, 500 e 1000 mg/kg (i.p.) do óleo essencial provocou a morte de 16,7%, 40% e 33,3% das fêmeas, respectivamente. Baseado nesses dados a DL_{50} foi estimada em 222,3 mg/kg para camundongos machos e 1551 mg/kg para as fêmeas.

Foi realizado uma extrapolação das CIMs do óleo essencial (256 µg/mL) e do timol (128 µg/mL), para as doses em mg/kg a serem administradas em camundongos de aproximadamente 40 g, baseado nos dados apresentados por Houghton et al (2007) em humanos. A dose equivalente a CIM do óleo essencial foi aproximadamente 20 mg/kg, o que corresponde as doses 12,5 e 23 vezes inferior a DL_{50} do óleo essencial para os machos e fêmeas, respectivamente. Já para o timol a dose equivalente a CIM foi 10 mg/kg, o que correspondem as doses 22 e 155 vezes inferior a DL_{50} do timol para os machos e fêmeas, respectivamente. Portanto, apesar das drogas-teste apresentarem toxicidade para os camundongos machos nas condições avaliadas, com baixos valores de DL_{50} , elas demonstraram segurança para estudos futuros de tratamento pré-clínico de mucormicoses induzidas em camundongos nas mesmas condições.

Resultados têm demonstrado que o óleo essencial de *T. vulgaris* e o timol são seguros quando administrados oralmente, pois apresentam baixa toxicidade. Em um estudo de toxicidade aguda o óleo essencial *T. vulgaris* apresentou DL_{50} de 4000 mg/kg via oral em camundongos. No ensaio toxicológico agudo pré-clínico

realizado por Souza; Matos (1991) ficou demonstrada baixa toxicidade do timol, destacando DL_{50} de 1,8 g/kg via oral em ratos e uma DL_{50} de $0,92 \pm 0,10$ mL/kg em camundongos. No entanto, por via parenteral, a exemplo da i.p. as drogas-teste apresentaram considerável toxicidade para os camundongos machos e baixa toxicidade para as fêmeas.

Em adição a estes parâmetros, foi investigado o efeito do óleo essencial de *T. vulgaris* e timol nas doses de 125 e 250 mg/kg sobre o peso corporal, massa relativa dos órgãos, alterações macroscópicas das vísceras e parâmetros hematológicos dos camundongos. Variação no peso corporal é considerado um indicador de efeitos adversos, ou seja, os animais que sobrevivem não podem perder mais que 10% do peso inicial (RAZA et al., 2002; TEO et al., 2002). Foi avaliado o peso corporal dos animais no primeiro e último dia de experimento. Pode-se observar que o óleo essencial e o timol nas doses testadas não promoveram alterações significativas no peso dos camundongos, ocorrendo variação apenas nos limites pré-estabelecidos (Tabela 5).

De acordo com Dallegrave (2003) alterações na massa relativa dos órgãos possuem uma relação direta com sinais de toxicidade. Com o intuito de investigar esta hipótese, após os 14 dias de avaliação, os animais que sobreviveram foram eutanasiados, tiveram os órgãos retirados e pesados. Pode-se observar que em ambas as doses, o óleo essencial e o timol não promoveram alterações significativas no peso do coração, fígado, rins e baço dos camundongos (Tabela 5 e 6).

Adicionalmente foram avaliadas as alterações macroscópicas nestes órgãos. Nenhuma alteração foi observada nos órgãos dos animais com a dose de 125 mg/kg (i.p.) do óleo essencial de *T. vulgaris*. Entretanto, a dose de 250 mg/kg (i.p.) do óleo essencial alterou as características morfológicas do fígado de uma fêmea, com a presença de manchas esbranquiçadas. No grupo dos camundongos machos o óleo essencial induziu a formação de uma massa branca nos rins. Em outro animal foi evidenciado que os órgãos, baço e fígado estavam colabados com estômago e o intestino. Além disso, os lobos do pulmão estavam colabados.

O timol na dose de 125 mg/kg induziu alterações morfológicas em vários órgãos dos camundongos machos. Em um animal o fígado estava repleto de tumores e o baço com um tamanho bem superior ao normal. O pulmão de outro camundongo apresentou estrias esbranquiçadas com aspecto fibroso nos dois lobos. Também foi evidenciado tumor no fígado e um pequeno tumor no rim de outro

animal. Já a dose de 250 mg/kg, via i.p. promoveu alteração no fígado, com aparecimento de uma massa esbranquiçada. No entanto, são necessários estudos histopatológicos complementares, para avaliar o nível dos danos teciduais nestes órgãos alterados pela administração intraperitoneal de 125 e 250 mg/kg do óleo essencial e do timol.

Ao final do experimento de toxicidade aguda foi coletado sangue dos animais para avaliação dos parâmetros hematológicos. A dose de 125 mg/kg do óleo essencial de *T. vulgaris* promoveu aumento significativo nos níveis dos segmentados e monócitos e diminuição dos linfócitos das fêmeas, quando comparados ao controle. Para os camundongos machos ocorreram aumentos significativos nas quantidades de hemácias, hemoglobina e hematócrito, comparados ao controle (Tabela 7). No entanto, na dose de 250 mg/kg (i.p.) o óleo essencial de *T. vulgaris* induziu alterações significativas

dos parâmetros hematológicos apenas dos camundongos machos quando comparados ao controle, sendo evidenciado diminuição das quantidades de HCM e leucócitos, também foi observado aumento nos níveis da plaquetas (Tabela 8).

O timol nas doses de 125 e 250 mg/kg não promoveu alterações significativas dos parâmetros hematológicos dos animais, quando comparados ao controle (Tabelas 7 e 8). Devido ao número pequeno de camundongos machos que sobreviveram não foi possível determinar alterações estatisticamente significativas.

Diante destes resultados, sugere-se que o óleo essencial de *T.vulgaris* e o timol nas doses e condições avaliadas, apresentou toxicidade para os camundongos machos e baixa toxicidade para as fêmeas. No entanto, são necessários estudos complementares, com a finalidade de comprovar ou refutar esta hipótese.

Tabela 5 - Efeito da administração intraperitoneal de 125 mg/kg do óleo essencial de *T. vulgaris* e timol na evolução ponderal e peso dos órgãos, em camundongos.

Parâmetros	Sexo	Tratamentos		
Evolução ponderal (g)		Controle	Óleo essencial	Timol
Fêmeas				
Inicial		33,83 ± 1,18	34,17 ± 1,06	31,07 ± 0,47
Final		33,43 ± 1,06	33,50 ± 1,20	30,15 ± 0,37
Machos				
Inicial		36,23 ± 0,79	39,13 ± 0,27	36,08 ± 2,21
Final		37,42 ± 0,96	35,75 ± 0,90	33,73 ± 1,87
Peso dos órgãos (g)				
Fêmeas				
Coração		0,15 ± 0,004	0,15 ± 0,002	0,14 ± 0,006
Fígado		1,67 ± 0,08	2,00 ± 0,14	1,68 ± 0,08
Rins		0,43 ± 0,02	0,46 ± 0,03	0,41 ± 0,02
Baço		0,19 ± 0,01	0,22 ± 0,02	0,17 ± 0,01
Machos				
Coração		0,17 ± 0,006	0,17 ± 0,009	0,15 ± 0,01
Fígado		2,12 ± 0,07	2,11 ± 0,11	2,46 ± 0,32
Rins		0,53 ± 0,03	0,56 ± 0,02	0,52 ± 0,03
Baço		0,30 ± 0,05	0,25 ± 0,01	0,25 ± 0,06

Os dados estão expressos como média ± e.p.m. (n = 6). Teste “t” de Student ou Mann Whitney, $p > 0,05$ comparados ao controle.

Tabela 6 - Efeito da administração intraperitoneal de 250 mg/kg do óleo essencial de *T. vulgaris* e timol na evolução ponderal e peso dos órgãos em camundongos.

Parâmetros	Sexo	Tratamentos		
Evolução ponderal (g)		Controle	Óleo essencial	Timol
Fêmeas				
Inicial		31,87 ± 0,81	30,60 ± 1,15	31,77 ± 1,24
Final		35,34 ± 0,38	35,80 ± 1,17	34,32 ± 0,56
Aumento (%)		11,92 ± 1,46	13,68 ± 4,30	9,82 ± 1,79
Machos				
Inicial		35,30 ± 1,22	35,77 ± 0,51	34,20 ± 1,44
Final		42,62 ± 1,01	41,00 ± 0,44	40,10 ± 1,20
Aumento (%)		17,31 ± 1,95	13,85 ± 1,11	20,95 ± 0,13
Peso dos órgãos (g)		Controle	Óleo essencial	Timol
Fêmeas				
Coração		0,15 ± 0,005	0,16 ± 0,005	0,14 ± 0,006
Fígado		1,83 ± 0,32	1,83 ± 0,09	1,91 ± 0,07
Rins		0,42 ± 0,016	0,44 ± 0,03	0,42 ± 0,02
Baço		0,18 ± 0,01	0,21 ± 0,01	0,20 ± 0,01
Machos				
Coração		0,18 ± 0,007	0,16 ± 0,003	ND
Fígado		2,28 ± 0,09	2,49 ± 0,16	ND
Rins		0,60 ± 0,009	0,61 ± 0,05	ND
Baço		0,26 ± 0,04	0,19 ± 0,006	ND

Os dados estão expressos como média ± e.p.m. (n=3-6). Teste "t" de Student ou Mann Whitney, p>0,05 comparados ao controle. ND - não determinado.

Tabela 7 - Efeito da administração intraperitoneal de 125 mg/kg do óleo essencial de *T. vulgaris* e timol frente aos parâmetros hematológicos dos camundongos.

Parâmetros	Fêmeas			Machos		
Hematológicos	Controle	Óleo essencial	Timol	Controle	Óleo essencial	Timol
Hemácias ($10^6/\text{mm}^3$)	9,61 $\pm$ 0,09	9,85 $\pm$ 0,25	9,60 $\pm$ 0,31	7,88 $\pm$ 0,26	8,99 $\pm$ 0,13 ^b	8,90 $\pm$ 0,47
Hemoglobina (g/dL)	11,52 $\pm$ 0,26	12,10 $\pm$ 0,35	11,78 $\pm$ 0,66	9,28 $\pm$ 0,48	11,17 $\pm$ 0,29 ^b	10,13 $\pm$ 0,66
Hematócrito (%)	45,47 $\pm$ 1,02	46,98 $\pm$ 1,08	45,46 $\pm$ 3,02	36,12 $\pm$ 1,56	43,37 $\pm$ 1,24 ^c	39,08 $\pm$ 2,35
VCM (μ^3)	47,50 $\pm$ 1,26	47,60 $\pm$ 1,03	47,00 $\pm$ 1,76	45,67 $\pm$ 1,31	48,17 $\pm$ 1,20	43,83 $\pm$ 0,79
HCM (μg)	12,03 $\pm$ 0,28	12,28 $\pm$ 0,14	12,26 $\pm$ 0,37	11,77 $\pm$ 0,41	12,42 $\pm$ 0,20	11,37 $\pm$ 0,31
CHCM (%)	25,47 $\pm$ 0,35	25,74 $\pm$ 0,31	26,02 $\pm$ 0,37	25,60 $\pm$ 0,39	25,80 $\pm$ 0,34	25,88 $\pm$ 0,42
Leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	2,78 $\pm$ 0,33	2,54 $\pm$ 0,45	4,36 $\pm$ 0,70	10,43 $\pm$ 3,46	4,17 $\pm$ 1,03	8,53 $\pm$ 3,32
Segmentados (%)	21,17 $\pm$ 2,86	34,60 $\pm$ 4,09 ^a	26,60 $\pm$ 2,40	41,50 $\pm$ 6,97	38,33 $\pm$ 3,77	45,17 $\pm$ 6,76
Linfócitos (%)	69,00 $\pm$ 1,83	56,20 $\pm$ 3,29 ^b	67,60 $\pm$ 1,94	51,00 $\pm$ 6,04	54,50 $\pm$ 4,35	47,67 $\pm$ 5,69
Monócitos (%)	8,17 $\pm$ 1,70	9,00 $\pm$ 2,00 ^a	5,80 $\pm$ 1,36	7,33 $\pm$ 1,76	8,60 $\pm$ 0,75	6,83 $\pm$ 2,23
Plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$)	617,7 $\pm$ 49,92	417,6 $\pm$ 137,8	671,2 $\pm$ 161,4	700,7 $\pm$ 81,81	791,5 $\pm$ 77,81	704,5 $\pm$ 107,9

Os dados estão expressos como média $\pm$ e.p.m. (n = 5-6). Teste de Teste “t” de Student para ^ap<0,05 e ^bp<0,01 comparados ao controle; Mann Whitney para ^cp<0,05 comparados ao controle.

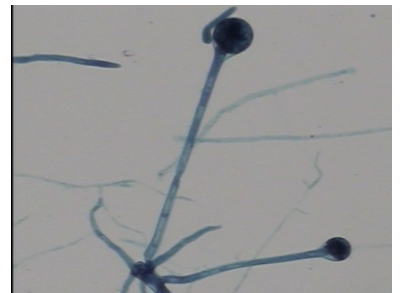
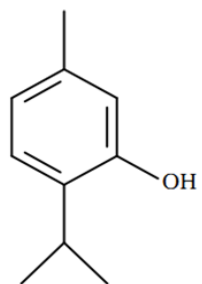
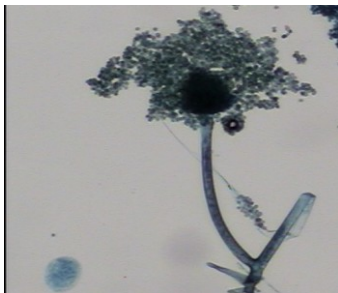
Tabela 8 - Efeito da administração intraperitoneal de 250 mg/kg do óleo essencial de *T. vulgaris* e timol frente aos parâmetros hematológicos dos camundongos.

Parâmetros	Fêmeas			Machos		
Hematológicos	Controle	Óleo essencial	Timol	Controle	Óleo essencial	Timol
Hemácias ($10^6/\text{mm}^3$)	9,11 $\pm$ 0,18	8,01 $\pm$ 0,53	9,04 $\pm$ 0,43	8,62 $\pm$ 0,28	9,16 $\pm$ 0,62	ND
Hemoglobina (g/dL)	12,13 $\pm$ 0,16	10,87 $\pm$ 0,58	12,14 $\pm$ 0,42	11,22 $\pm$ 0,27	11,30 $\pm$ 0,81	ND
Hematócrito (%)	46,45 $\pm$ 0,95	42,60 $\pm$ 2,35	46,80 $\pm$ 1,68	43,77 $\pm$ 1,00	44,47 $\pm$ 2,84	ND
VCM (μ^3)	51,17 $\pm$ 1,25	53,00 $\pm$ 0,58	52,20 $\pm$ 1,02	51,17 $\pm$ 1,68	48,67 $\pm$ 1,45	ND
HCM (μg)	13,32 $\pm$ 0,23	13,57 $\pm$ 0,15	13,46 $\pm$ 0,19	13,03 $\pm$ 0,18	12,30 $\pm$ 0,06 ^a	ND
CHCM (%)	26,18 $\pm$ 0,38	25,53 $\pm$ 0,03	25,90 $\pm$ 0,37	25,63 $\pm$ 0,50	25,33 $\pm$ 0,67	ND
Leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	4,38 $\pm$ 0,87	6,90 $\pm$ 0,83	4,62 $\pm$ 0,52	7,83 $\pm$ 0,75	3,77 $\pm$ 0,98 ^a	ND
Segmentados (%)	23,33 $\pm$ 4,40	32,00 $\pm$ 5,29	24,80 $\pm$ 4,50	44,00 $\pm$ 6,30	35,67 $\pm$ 9,21	ND
Linfócitos (%)	65,83 $\pm$ 4,68	58,33 $\pm$ 6,84	66,80 $\pm$ 5,57	44,33 $\pm$ 5,85	49,33 $\pm$ 8,35	ND
Monócitos (%)	8,80 $\pm$ 1,45	9,67 $\pm$ 4,26	8,50 $\pm$ 2,06	11,67 $\pm$ 3,02	8,00 $\pm$ 2,00	ND
Plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$)	611,2 $\pm$ 63,23	769,0 $\pm$ 207,7	649,8 $\pm$ 149,5	631,3 $\pm$ 105,9	1101 $\pm$ 108,0 ^a	ND

Os dados estão expressos como média $\pm$ e.p.m. (n = 3-6). Teste “t” de Student, ^ap<0,05 comparados ao controle. ND – não determinado.

Com base nos dados apresentados, pode-se sugerir que o óleo essencial de *T. vulgaris* e seu componente fenólico, timol possuem promissora atividade fungicida e/ou fungistática, podendo inibir a infecção logo no seu início. Tais atividades podem estar relacionadas à interação com o ergosterol, esteroide presente na membrana de *R. oryzae* e *R. microsporus* e que desempenha importante papel no crescimento e função normal da membrana destes fungos. Portanto, estes produtos, especialmente o timol se apresentam como uma nova alternativa terapêutica no tratamento das mucormicoses. Entretanto, são necessários mais estudos, visando correlacionar a potente atividade antifúngica *in vitro* e *in vivo* e comprovar a sua segurança, para uma possível aplicação clínica.

CONCLUSÕES

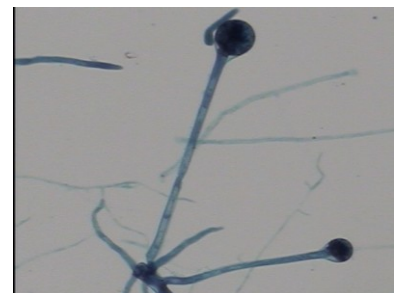
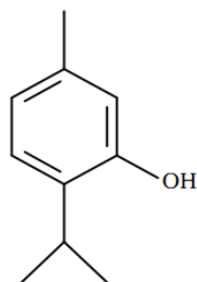


5 CONCLUSÕES

Diante dos dados analisados é possível concluir que:

- Todas as cepas de *R. oryzae* e *R. microsporus* foram resistentes aos cinco antifúngicos padrão utilizados neste trabalho;
- O óleo essencial de *T. vulgaris* apresentou potencial antifúngico contra cepas resistentes de *R. oryzae* na triagem microbiológica;
- O óleo essencial de *T. vulgaris* e o timol apresentaram forte atividade fungicida e/ou fungistática frente *R. oryzae* e *R. microsporus*;
- O óleo essencial de *T. vulgaris* bem como o seu componente fenólico, timol, inibiram o crescimento micelial e germinação dos esporos de *R. oryzae* e *R. microsporus*;
- O óleo essencial e o timol alteraram morfologia de *R. oryzae* e *R. microsporus*;
- O mecanismo pelo qual o óleo essencial e o timol promovem atividade antifúngica envolve provavelmente a sua interação com ergosterol presente na membrana fúngica;
- O óleo essencial de *T. vulgaris* e o timol nas condições e parâmetros avaliados apresentou moderada toxicidade para os camundongos machos e baixa toxicidade para as fêmeas.

REFERÊNCIAS



REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy**. Carol Stream: Allured Publishing Corporation, 1995.
- AHMAD, A.; KHAN, A.; YOUSUF, S.; KHAN, L. A.; MANZOOR, N. Proton translocating ATPase mediated fungicidal activity of eugenol and thymol. **Fitoterapia**, v. 81, p. 1157-62, 2010.
- AHMAD, A.; KHAN, A.; AKHTAR, F.; YOUSUF, S.; XESS, I.; KHAN, L.A.; MANZOOR, N. Fungicidal activity of thymol and carvacrol by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 30, p. 41-50, 2011.
- ALIZADEH-SALTEH, S.; ARZANI, K.; OMIDBEIGI, R.; SAFAIE, N. Essential Oils Inhibit Mycelial Growth of *Rhizopus stolonifer*. **European Journal Horticulture Science**, v.75, p. 278–282, 2010.
- ALMEIDA, R. N.; FALCÃO, A. C. G. M.; DINIZ, R. S. T.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; POLARI, R. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; AGRA, M. F.; DUARTE, J. C.; FERREIRA, C. D.; ANTONIOLLI, A. R.; ARAÚJO, C. C. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no Sistema Nervoso Central e alguns dados experimentais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.80, p.72-76, 1999.
- ALMEIDA, R. N.; OLIVEIRA, T. M. L. Triagem Farmacológica Comportamental. Em: ALMEIDA, R. N. **Psicofarmacologia – Fundamentos Práticos**, Editora Guanabara Koogan S. A., Rio de Janeiro, 2006, p. 131-137.
- AMBER, K.; AIJAZ, A.; IMMACULATA, X.; LUQMAN, K. A.; NIKHAT M. Anticandidal effect of *Ocimum sanctum* essential oil and its synergy with fluconazole and ketoconazole. **Phytomedicine**, v. 17, p. 921–925, 2010.
- ANGELES-LOPEZ, G.; PEREZ-VASQUEZ, A.; HERNANDEZ-LUIS, F.; DECIGA-CAMPOS, M.; BYE, R.; LINARES, E.; MATA, R. Antinociceptive effect of extracts and compounds from *Hofmeisteria schaffneri*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, p. 425-432, 2010.
- ARAÚJO, C. A. C.; LEON, L. L. Biological activities of *Curcuma longa* L. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.96, p. 723-728, 2001.

BAGINSKI, M.; STERNAL, K.; CZUB, J.; BOROWSKI, E. Molecular modelling of membrane activity of amphotericin B, a polyene macrolide antifungal antibiotic. **Acta Biochimica Polonica**, v. 52, p. 655–658, 2005.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – a review. **Food and Chemical toxicology**, v. 46, p. 446–475, 2008.

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, p. 81–88, 2008.

BARAN, M.; BOROWSKI, E.; MAZERSKI, J. Molecular modeling of amphotericin B – ergosterol primary complex in water II. **Biophysical Chemistry**, v. 141, p. 162–168, 2009.

BOTELHO, M. A.; BASTOS, G. M.; FONSECA, S. G. C.; MATOS, F. J. A.; MONTENEGRO, D.; RAO, V. S.; BRITO, G. A. C. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. **Brazilian Journal Medical Biology Research**, v. 40, p. 349–356, 2007.

BRAGA, P. C.; ALFIERI, M.; CULICI, M.; DAL SASSO M. Inhibitory activity of thymol against the formation and viability of *Candida albicans* hyphae. **Mycoses**, v. 50, p. 502–506, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília, DF, 2006.

BRASIL, **RESOLUÇÃO RE 90, de 16 de março de 2004**. Acesso em <<http://www.saude.rj.gov.br/Docs/Proplam/RE90.pdf>>, 30 de julho de 2012.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 223–25, 2004.

CARMO, E. S.; LIMA, E. O.; SOUZA, E. L.; SOUSA, F. B. Effect of *Cinnamomum zeylanicum* Blume essential oil on the growth and morphogenesis of some potentially pathogenic *Aspergillus* species. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 91–97, 2008.

CHAN, P. K.; HAYES, A. W. Acute toxicity and eye irritancy. In: HAYES, A.W. (ed.). Principles and methods of toxicology. 3. ed. **New York: Raven Press**, p. 579-647, 1994.

CHAYAKULKEEREE, M.; GHANNOUM, M. A.; PERFECT, J. R. Zygomycosis: the re-emerging fungal infection. **European Journal Clinical Microbiology Infectious Diseases**, v. 25, p. 215–229, 2006.

CIMANGA, K.; KAMBU, K.; TONA, L.; APERS, S.; BRUYNE, T.; HERMANS, N.; TOTTE, J.; PIETERS, L.; VLIETINOK, A. J. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, p. 213-220, 2002.

CLEELAND, R.; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials *in vitro* and in experimental animal infection. In: **Antibiotics in Laboratory Medicine**. New York: Williams & Wilkins, 1991. p. 739-787.

COLE, G. T.; SESHAN, K. R.; PHANEUF, M.; LYNN, K. T. Chlamydospore-like cells of *Candida albicans* in the gastrointestinal tract of infected, immunocompromised mice. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 637–646, 1991.

COUCH, L.; THEILEN, F.; MADER, J. T. Rhinocerebral mucormycosis with cerebral extension successfully treated with adjunctive hyperbaric oxygen therapy. **Archives Otolaryngology Head & Neck Surgery**, v. 114, p. 791–794, 1988.

CRUZ, M. C. S.; SANTOS, P. O.; BARBOSA Jr, A. M.; MÉLO, D. L. F. M.; ALVIANO, C. S.; ANTONIOLLI, A. R.; ALVIANO, D. S.; TRINDADE, R. C. Antifungal activity of Brazilian medicinal plants involved in popular treatment of mycoses. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 409-412, 2007.

DAFERERA, D. J.; ZIOGAS, B. N.; POLISSIOU, M. G.; The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium sp* and *Clavibacter michiganensis*. **Crop Protection**, v. 22, p. 39-44, 2003.

DALLEGRAVE, E. Toxicidade reprodutiva do herbicida glifosato - Roundup em ratos Wistar. 225 f. **Tese** (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2003.

DANNAOUI, E.; MELETIADIS, J.; MOUTON, J. W.; MEIS, J. F.; VERWEIJ, P. E. *In vitro* susceptibilities of zygomycetes to conventional and new antifungals. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, p. 45–52, 2003.

DENNING, D. W.; HOPE, W. W. Therapy for fungal diseases: opportunities and priorities. **Trends in Microbiology**, v. 18, p. 195-204, 2010.

DUARTE, M. C. T.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V. L. G.; DELARMELINA, C. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 305-311, 2005.

ENGELBERTZ, J.; LECHTENBERG, M.; STUDT, L.; HENSEL, A.; VERSPOHL, E. J. Bioassay-guided fractionation of a thymol-deprived hydrophilic thyme extract and its antispasmodic effect. **Journal of Ethnopharmacology**, v.141, p. 848-853, 2012.

ENOCH, D. A.; LUDLAM, H. A.; BROWN, N. M. Invasive fungal infections: a review of epidemiology and management options. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, p. 809–818, 2006.

ESCALANTE, A.; GATTUSO, M.; PÉREZ, P.; ZACCHINO, S. Evidence for the mechanism of action of the antifungal phytolaccoside B isolated from *Phytolacca tetramera* Hauman. **Journal Natural Products**, v. 71, p. 1720-1725, 2008.

ESPINEL-INGROFF, A.; BARTLETT, M.; BOWDEN, R.; CHIN, N. X.; COOPER, C. JR.; FOTHERGILL, A.; MCGINNIS, M. R.; MENEZES, P.; MESSER, S. A.; NELSON, P. W.; ODDS, F. C.; PASARELL, L.; PETER, J.; PFALLER, M. A.; REX, J. H.; RINALDI, M. G.; SHANKLAND, G. S.; WALSH, T. J.; WEITZMAN, I. Multicenter Evaluation of Proposed Standardized Procedure for Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 15, p. 139-143,1997.

ESPINEL-INGROFF, A. In vitro antifungal activities of anidulafungin and micafungin, licensed agents and the investigational triazole posaconazole as determined by NCCLS methods for 12,052 fungal isolates: review of the literature. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 20, p.121–136, 2003.

FACHINI-QUEIROZ, F. C.; KUMMER, R.; ESTEVÃO-SILVA, C. F.; CARVALHO, M. D. B.; CUNHA J. M.; GRESPAN, R.; BERSANI-AMADO, C. A.; CUMAN, R. K. N. Effects of Thymol and Carvacrol, Constituents of *Thymus vulgaris* L. Essential Oil, on the Inflammatory Response. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 1-10, 2012.

FIGUEIREDO, A. C.; BARROSO, J. G.; PEDRO, L. G.; SALGUEIRO, L.; MIGUEL, M. G.; FALEIRO, M. L.. Portuguese *Thymbra* and *Thymus* species volatiles: chemical composition and biological activities. **Current Pharmaceutical Design**, v. 14, p. 3120-3140, 2008.

GALGÓCZY, L.; PAPP, T.; KOVÁCS, L.; LEITER, E.; PÓCSI, I.; VÁGVOLGYI, C. Interactions between statins and *Penicillium chrysogenum* antifungal protein(PAF) to inhibit the germination of sporangiospores of different sensitive Zygomycetes. **Fems Microbiology Letters**, v. 270, p.109-115, 2007.

GALGÓCZY, L.; KOVÁCS, L.; KRIZSA, K.; PAPP, T.; VÁGVOLGYI, C. Inhibitory Effects of Cysteine and Cysteine Derivatives on Germination of Sporangiospores and Hyphal Growth of Different Zygomycetes. **Mycopathologia**, v. 168, p.125-134, 2009.

GOMPERTZ, O. F.; GAMBALE, W.; PAULA, C. R.; CÔRREA, B. Biologia de fungos. In: **Microbiologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2000.

GIL-LAMAINERE, C.; SIMITSOPOULOU, M.; ROILIDES, E.; MALOUKOU, A.; WINN, R. M.; WALSH, T. J. Interferon-g and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor augment the activity of polymorphonuclear leukocytes against medically important zygomycetes. **Journal Infectious Diseases**, v. 191, p. 1180–7, 2005.

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

GONZALEZ, C. E.; RINALDI, M. G.; SUGAR, A. M. Zygomycosis. **Infectious Diseases Clinical North America**, v. 16, p. 895–914, 2002.

GOTTLIEB, O. R.; BORIN, M. R. Quantitative Chemobiology: a guide into the understanding of Plant Bioactivity. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 13, p. 772-776, 2002.

GRACIOSO, J. S.; PAULO, M. Q.; LIMA, C. A. H.; BRITO, A. R. M. Antinociceptive effect in mice of a hydroalcoholic extract of *Neurolaena lobata* (L.) and its organic fractions. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 50, p. 1425-1429, 1998.

GREENBERG, R. N. SCOTT, L. J.; VAUGHN, H. H.; RIBES, J. A. Zygomycosis (mucormycosis): emerging clinical importance and new treatments. **Current Opinion Infectious Diseases**, v. 17, p. 517–525, 2004.

GRIFFIN, S. G.; WYLLIE, S. G.; MARKHAM, J. L.; LEACH, D. The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 14, p. 322–332, 1999.

GRIGULL, L.; BEILKEN, A.; SCHMID, H.; KIRSCHNER, P.; SYKORA, K. W.; LINDERKAMP, C.; DONNERSTAG, F.; GOUDEVA, L.; HEUFT, H. G.; WELTE, K. Secondary prophylaxis of invasive fungal infections with combination antifungal therapy and G-CSF–mobilized granulocyte transfusions in three children with hematological malignancies. **Supportive Care in Cancer**, v. 14, p. 783–6, 2006.

GUNJI, S.; ARIMA, K.; BEPPU, T. Screening of antifungal antibiotics according to activities inducing morphological abnormalities. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 47, p. 2061-2069, 1983.

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

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

HEMASHETTAR, B. M.; PATIL, R. N.; O'DONNELL, K.; CHATURVEDI, V.; REN, P.; PADHYE, A. A. Chronic Rhinofacial Mucormycosis Caused by *Mucor irregularis* (*Rhizomucor variabilis*) in India. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, p. 2372-2375, 2011.

HENNEQUIN, C. Épidémiologie des mycoses invasives. L'expérience du centre hospitalo-universitaire parisien. **Revue Médicine Interne**, v. 17, p. 754-60, 1996.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. Screening of some plants used in Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 1027-1031, 2002.

HOUGHTON, P. J.; HOWES, M. J.; LEE, C. C.; STEVENTON, G. Uses and abuses of *in vitro* tests in ethnopharmacology: Visualizing an elephant. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, p. 391–400, 2007.

HSIEH, P. C.; MAU, J. L.; HUANG, S. H.; Antimicrobial effect of various combinations of plant extracts. **Food Microbiology**, v. 18, p. 35–43, 2001.

HUDAIB, M.; SPERONI, E.; DI PIETRA, A. M.; CAVRINI, V. GC/MS evaluation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil composition and variations during the vegetative cycle. **Journal Pharmaceutical Biochemical Analysis**, v. 29, p. 691–700, 2002.

HUSSAIN, S.; SALAHUDDIN, N.; AHMAD, I.; SALAHUDDIN, I.; JOOMA, R. Rhinocerebral invasive mycosis: occurrence in immunocompetent individuals. **European Journal Radiology**, v. 20, p. 151–155, 1995.

IBRAHIM, A. S.; EDWARDS, J. E. Jr.; FILLER, S. G. Zygomycosis, In W. E. Dismukes, P. G. Pappas, and J. D. Sobel (ed.), **Clinical Mycology**. Oxford University Press, New York, N.Y, p. 241–251, 2003.

IBRAHIM, A. S.; SPELLBERG, B. AVANESSIAN, V; FU, Y; EDWARDS, J. E. *Rhizopus oryzae* adheres to, is phagocytosed by, and damages endothelial cells in vitro. **Infections and Immunity**. v. 73, p. 778–783, 2005a.

IBRAHIM, A. S; BOWMAN, J. C.; AVANESSIAN, V.; SPELLBERG, B.; EDWARDS, J. E. Jr.; DOUGLAS, C. M. Caspofungin inhibits *Rhizopus oryzae* 1,3-b-D-glucan synthase, lowers burden in brain measured by quantitative PCR, and improves survival at a low but not a high dose during murine disseminated zygomycosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, p. 721–7, 2005b.

IBRAHIM, A. S; GEBREMARIAM, T.; FU, Y.; EDWARDS, J. E JR; SPELLBERG, B. Combination echinocandin-polyene treatment of murine mucormycosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, p. 1556–8, 2008.

INOUE, S.; TSURUOKA, T.; WATANABE, M.; TAKEO, K.; AKAO, M.; NISHIYAMA, Y.; YAMAGUCHI, H. Inhibitory effect of essential oils on apical growth of *Aspergillus fumigatus* by vapour contact. **Mycoses**, v. 43, p. 17–23, 2000.

JOHN, B. V.; CHAMILOS, G.; KONTOYIANNIS, D. P. Hyperbaric oxygen as an adjunctive treatment for zygomycosis. **Clinical Microbiology Infectious**, v. 11, p. 515–7, 2005.

KANAFANI, Z. A.; PERFECT, J. R. Resistance to Antifungal Agents: Mechanisms and Clinical Impact. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, p. 120–8, 2008.

KALEMBA, D.; KUNICKA, A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. **Current Medical Chemical**, v. 10, p. 813-29, 2003.

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

KLARIC, M. S.; KOSALEC, I.; MASTELIC, J.; PIECKOVA, E.; PEPELJNAK, S. Antifungal activity of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil and thymol against moulds from damp dwellings. **Letters in Applied Microbiology**, v. 44, p. 36-42, 2007.

KLEPSE, M. E.; ERNST, E. J.; ERNST, M. E.; MESSER, S. A.; PFALLER, M. A. Evaluation of endpoints for antifungal susceptibility determinations with LY303366. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.42, p.1387-1391, 1998.

KNOBLOCH, K.; PAULI, A.; IBERL, B.; WEIGAND, H.; WEIS, N. Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. **Journal Essential Oil Research**, v. 1, p. 119–128, 1989.

KONEMAN E. W.; ALLEN, S. D.; DOWEL-JÚNIOR, V. R.; SAMERS, H. M.; **Diagnóstico Microbiológico**, Texto Atlas. Editora Médica Panamericana. 2. ed. 1993. p. 452-485.

KORDALI, S.; ÇAKIR, A.; ÖZER, H.; ÇAKMAKCI, R.; KESDEK, M.; METE, E. Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish *Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and p-cymene. **Bioresource Technology**, doi: 10.1016/j.biortech.2008.04.048, 2008.

KWON-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E. **Medical mycology**, Philadelphia, Pa: Lea & Febiger; p. 3–34, 1992.

KWON, D. S.; MYLONAKIS, E. Posaconazole: a new broad-spectrum antifungal agent. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 8, p. 1167–78, 2007.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C. HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N. T. **Tratado de micologia médica**. 9ª ed. São Paulo: Sarvier; 2002.

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

LARONE, D. H. **Medically important fungi: a guide to identification**. 3. ed. Washington, D.C.: ASM Press, 1995.

LEMKE, A., KIDERLEN, A. F.; KAYSER, O. Amphotericin B. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 68, p. 151-162, 2005.

LEWIS, R. E.; LORTHOLARY, O.; SPELLBERG, B.; ROILIDES, E.; KONTOYIANNIS, D. P.; WALSH, T. J. How Does Antifungal Pharmacology Differ for Mucormycosis Versus Aspergillosis? **Clinical Infectious Diseases**, v. 54, p. S67–72, 2012.

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

LUKÁCS G.Y.; PAPP, T.; NYILASI, I.; NAGY, E.; VÁGVOLGYI, C. S. Differentiation of *Rhizomucor* species on the basis of their different sensitivities to lovastatin. **Journal Clinical Microbiology**, v. 42, p. 5400–5402, 2004.

LUPETTI, A.; DANESI, R.; CAMPA, M.; DEL TACCA, M.; KELLY, S. Molecular basis of resistance to azole antifungals. **Trends in Molecular Medicine**, v.8, p. 76-81, 2002.

MOHSIN, A.; SHAH, A. H.; AL-YAHYA, M. A.; TARIQ, M.; TANIRA, M. O. M.; AGEEL, A. M. Analgesic, antipyretic activity and phytochemical screening of some plants used in traditional Arab system of medicine. **Fitoterapia**, v. 60, p. 174-177, 1989.

MONDELLO, F.; DE BERNARDIS, F.; GIROLAMO, A.; SALVATORE, G.; CASSONE, A. In vitro and in vivo activity of tea tree oil against azole-susceptible and resistant human pathogenic yeasts. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51 p. 1223–1229, 2003.

MOTA, V. G. PEREIRA, F. O. Efeitos antinociceptivos do óleo essencial de *Lippia microphylla* Cham. (Verbenaceae) e do timol em camundongos. **Tese de doutorado**. Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2011.

NAGHIBI, F.; MOSADDEGH, M.; MOTAMED, S. M.; GHORBANI, A. Labiatae Family in folk Medicine in Iran: from Ethnobotany to pharmacology. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 2, p. 63-79, 2005.

NOURI-MAJALAN, N.; MOGHIMI, M. Skin mucormycosis presenting as an erythema-nodosum-like rash in a renal transplant recipient: a case report. **Journal of Medical Case Reports**, v. 2, p. 1-4, 2008.

NUNES, X. P.; MAIA, G. L. A.; ALMEIDA, J. R. G. S.; PEREIRA, F. O.; LIMA, E. O. Antimicrobial activity of the essential oil of *Sida cordifolia* L. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 16, p. 642-644, 2006.

ODDS, F. C.; BROWN, A. J. P.; GOW, N. A. R. Antifungal agents: mechanisms of action. **Trends in Microbiology**, v. 11, p. 272-279, 2003.

OHARA, T.; TSUGE, T. FoSTUA, encoding a basic helix-loop-helix protein, differentially regulates development of three kinds of asexual spores, macroconidia, microconidia, and chlamydospores, in the fungal plant pathogen *Fusarium oxysporum*. **Eukaryotic Cell**, v. 3, p. 1412-1422, 2004.

OLIVEIRA, W. A.; PEREIRA, F. O.; LUNA, G. C. D. G.; LIMA, I. O.; WANDERLEY, P. A.; LIMA, R. B.; LIMA, E. O. Antifungal activity of *Cymbopogon winterianus* Jowitt Ex Bor against *Candida albicans*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 433-441, 2011.

OLIVER, M. R.; VAN VOORHIS, W. C.; BOECKH, M.; MATTSON, D.; BOWDEN, R. A. Hepatic mucormycosis in a bone marrow transplant recipient who ingested naturopathic medicine. **Clinical Infectious Diseases**, v. 22, p. 521-524, 1996.

OSHEROV, N.; MAY, G. S. The molecular mechanisms of conidial germination. **Fems Microbiology Letters**, v. 199, p. 153-160, 2001.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana de determinação da concentração mínima inibitória (CIM) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 301-307, 2008.

PASSOS, C. S.; ARBO, M. D.; RATES, S. M. K.; VON POSER, J. L. Terpenóides com atividade sobre o Sistema Nervoso Central (SNC). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 140-149, 2009.

PEREIRA, F. O. Atividade antifúngica do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor em dermatófitos do gênero *Trichophyton*. **Dissertação de mestrado**. Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2009.

PEREIRA, F. O.; WANDERLEY, P. A.; VIANA, F. A. C.; LIMA, R. B.; SOUSA, F. B. SANTOS, S. G.; LIMA, E. O. Effects of *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor essential oil on the growth and morphogenesis of *Trichophyton mentagrophytes*. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, p. 145-153, 2011.

PINA-VAZ, C.; RODRIGUES, A. G.; PINTO, E.; COSTA-DE-OLIVEIRA, S.; TAVARES, C.; SALGUEIRO, L.; CAVALEIRO, C.; GONÇALVES, M. J.; MARTINEZ-DE-OLIVEIRA, J. Antifungal activity of *Thymus* oils and their major compounds. **Journal European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 18, p. 73–78, 2004.

PINTO, E.; VALE-SILVA, L.; CAVALEIRO, C.; SALGUEIRO, L. Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* (*Eugenia caryophyllus*) on *Candida*, *Aspergillus* and *dermatophyte* species. **Journal Medical Microbiology**, v. 58, p. 1454, 2009.

PORTE, A.; GODOY, R. L. O. Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.): propriedades antimicrobiana e química do óleo essencial. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 19, p. 193-210, 2001.

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

RANA, B. K.; SINGH, U. P.; TANEJA, V. Antifungal activity and kinetics of inhibition by essential oil isolated from leaves of *Aegles marmelos*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 57, p. 29-34, 1997.

RASOOLI, I.; ABYANEH, M. R. Inhibitory effects of Thyme oils on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. **Food Control**, v. 15, p. 479-483, 2004.

RASOOLI, I.; OWLIA, P. Chemoprevention by thyme oils of *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin production. **Phytochemistry**, v. 66, p. 2851-2856, 2005.

RASOOLI, I.; REZAEI, M. B.; ALLAMEH, A. Growth inhibition and morphological alterations of *Aspergillus niger* by essential oils from *Thymus eriocalyx* and *Thymus x-porlock*. **Food Control**, v. 17, p. 359–364, 2006.

RAZA, M.; AL-SHABANAH, O. A.; EL-HADIYAH, T. M.; AL-MAJED, A. A Effect of prolonged vigabatrin treatment on hematological and biochemical parameters in plasma, liver and kidney of Swiss albino mice. **Scientia Pharmaceutica**, v. 70, p. 135–145, 2002.

REDDY, M. V. B.; ANGERS, P.; GOSSELIN, A.; ARUL, J. Characterization and use of essential oil from *Thymus vulgaris* against *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer* in strawberry fruits. **Phytochemistry**, v. 47, p. 1515-1520, 1998.

REED, C.; BRYANT, R.; IBRAHIM, A. S.; EDWARDS, J. Jr, FILLER, S. G.; GOLDBERG, R.; SPELLBERG, B. Combination polyene-caspofungin treatment of rhino-orbital-cerebral mucormycosis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 47, p. 364–71, 2008.

RIBES, J. A.; VANOVER-SAMS, C. L.; BAKER, D. J. Zygomycetes in human disease. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, p. 236–301, 2000.

RODEN, M. M.; ZAOUTIS, T. E.; BUCHANAN, W. L.; KNUDSEN, T. A.; SARKISOVA, T. A.; SCHAUFLE, R. L.; SEIN, M.; SEIN, T.; CHIOU, C. C.; CHU, J. H.; KONTOYIANNIS, D. P.; WALSH, T. J. Epidemiology and Outcome of Zygomycosis: A Review of 929 Reported Cases. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, p. 634–53, 2005.

ROGERS, T. R. Treatment of zygomycosis: current and new options. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, p. 35-39, 2008.

RUSTAIYAN, A.; MASOUDI, S.; MONFARED, A.; KAMALINEJAD, M.; LAJEVARDI, T.; SEDAGHAT, S.; YARI, M.; Volatile constituents of three *Thymus* species grown wild in Iran. **Planta Medica**, v. 66, p. 197–198, 2000.

SABATELLI, F.; PATEL, R.; MANN, P. A.; MENDRICK, C. A.; NORRIS, C. C.; HARE, R.; LOEBENBERG, D.; BLACK, T. A.; MCNICHOLAS, P. M. *In Vitro* Activities of Posaconazole, Fluconazole, Itraconazole, Voriconazole, and Amphotericin B against a Large Collection of Clinically Important Molds and Yeasts. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, p. 2009–2015, 2006.

SAJJAD, M.; KHAN, A.; AHMAD, I. Antifungal activity of essential oils and their synergy with fluconazole against drug-resistant strains of *Aspergillus fumigatus* and

Tricophyton rubrum. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 90, p. 1083-1094, 2011.

SANCHEZ, M. E.; TURINA, A.; GARCIA, D. A.; VERONICA NOLAN, M.; PERILLO, M. A. Surface activity of thymol: implications for an eventual pharmacological activity. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 34, p. 77-86, 2004.

SANTORO, G. F.; CARDOSO, M. G.; GUIMARÃES, L. G. L.; SALGADO, A. P. S. P.; MENNA-BARRETO, R. F. S.; SOARES, M. J. Effect of oregano (*Origanum vulgare* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oils on *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida) growth and ultrastructure. **Parasitological Research**, v. 100, p. 783–790, 2006.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A. L. M.; DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, M. C. T.; REHDER, V. L. G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 275-280, 2004.

SAOULIDIS, S.; SIMITSOPOULOU, M.; DALAKIOURIDOU, M.; WALSH, T. J.; WHEAT, L. J.; PAPAIOANNIDOU, P.; ROILIDES, E. Antifungal activity of posaconazole and granulocyte colony-stimulating factor in the treatment of disseminated zygomycosis (mucormycosis) in a neutropaenic murine model. **Mycoses**, v. 54, p. 486–92, 2011.

SCORZONI, L.; BENADUCCI, T.; ALMEIDA, A. M. F.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; MENDES-GIANNINI, M. J. S. Comparative study of disk diffusion and microdilution methods for evaluation of antifungal activity of natural compounds against medical yeasts *Candida spp.* and *Cryptococcus spp.* **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, p. 25-34, 2007a.

SCORZONI, L.; BENADUCCI, T.; ALMEIDA, A. M. F.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; GIANINNI, M. J. S. M. The Use of Standard Methodology for Determination of Antifungal Activity of Natural Products Against Medical Yeasts *Candida spp.* and *Cryptococcus spp.* **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 391-397, 2007b.

SHARMA, N.; TRIPATHI, A. Effects of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem. **Microbiological Research**, v. 163, p. 337-344, 2008.

SIENKIEWICZ, M.; LYSAKOWSKA, M.; DENYS, P.; KOWALCZYK, E. The Antimicrobial Activity of Thyme Essential Oil Against Multidrug Resistant Clinical Bacterial Strains. **Microbial Drug Resistance**, v. 18, p. 137-148, 2012.

SINGH, N. Impact of current transplantation practices on the changing epidemiology of infections in transplant recipients. **The Lancet Infectious Diseases**, v.3, p. 156-161, 2003.

SLAVIN, M. A.; KANNAN, K.; BUCHANAN, M. R.; SASADEUSZ, J.; ROBERTS, A. W. Successful allogeneic stem cell transplant after invasive pulmonary zygomycosis. **Leuk Lymphoma**, v. 43, p. 437–9, 2002.

SOKEMAN, A.; GULLUCE, M.; AKPULAT, H. A.; DAFERERA, D.; TEPE, B.; POLISSIOU, M.; SOKMEN, M.; SAHIN, F. The in vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius*. **Food Control**, v. 15, p. 627–634, 2004.

SOKOVIĆ, M. D.; VUKOJEVIĆ, J.; MARIN, P. D.; BRKIĆ, D. D.; VAJS, V.; VAN GRIENSVEN, L. J. L. D. Chemical Composition of Essential Oils of *Thymus* and *Mentha* Species and Their Antifungal Activities. **Molecules**, v. 14, p. 238-249, 2009.

SOUZA, M. P.; MATOS, A. A. **Constituintes químicos ativos de plantas medicinais brasileiras**. Fortaleza: Edições UFC, 1991.

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

SPELLBERG, B.; FU, Y.; EDWARDS, J. E. Jr.; IBRAHIM, A. S. Combination therapy with amphotericin B lipid complex and caspofungin acetate of disseminated zygomycosis in diabetic ketoacidotic mice. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, p. 830–2, 2005.

SPELLBERG, B.; WALSH, T. J.; KONTOYIANNIS, D. P.; EDWARDS-Jr., J. E.; IBRAHIM, A. S. Recent advances in the management of mucormycosis: from bench to bedside. **Clinical Infectious Diseases**, v. 48, p. 1743–1751, 2009.

STEVENS, P. F., 2001. **Angiosperm Phylogeny Website. Version 7**. Disponível em: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>. Acesso em Maio de 2012.

SUGAR, A. M. Agent of mucormycosis and related specie,. In G. MANDELL, J. BENNETT, R. DOLIN (ed.), **Principles and practices of infectious diseases**, 4th ed. Churchill Livingstone, New York, N.Y, p. 2311–232, 1995.

SURENDER, P.; JANALAH, C.; REDDY, V. K.; REDDY, S. M. Antifungal activity of secretions of scent glands from *Heteroptera* bugs. **Indian Journal Experimental Biology**, v. 25, p. 233-234, 1987.

TEDDER, M.; SPRATT, J. A.; ANSTADT, M. P.; HEGDE, S. S.; TEDDER, S. D.; LOWE, J. E. Pulmonary Mucormycosis: Results of medical and surgical therapy. **The Annals of Thoracic Surgery**, v. 57, p. 1044-1050, 1994.

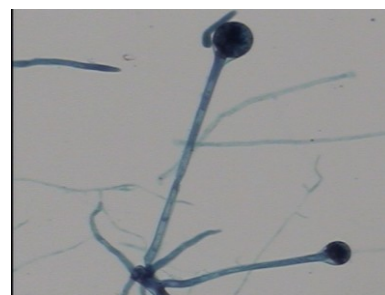
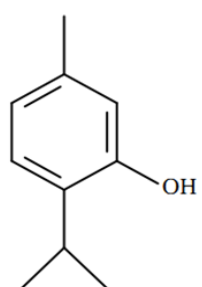
TEO, S.; STIRLING, D.; THOMAS, S.; HOBERMAN, A.; KIORPES, A.; KHETANI, V. A 90-day oral gavage toxicity study of d-methylphenidate and d,l-methylphenidate in Sprague Dawley rats. **Toxicology**, v. 179, p. 183–196, 2002.

TULLIO, V.; NOSTRO, A.; MANDRAS, N.; DUGO, P.; BANCHE, G.; CANNATELLI, M. A.; CUFFINI, A. M.; ALONZO, V.; CARLONE, N. A. Antifungal activity of essential oils against filamentous fungi determined by broth microdilution and vapour contact methods. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, p. 1544–1550, 2007.

WALSH, T. J.; GROLL, A.; HIEMENZ, J.; FLEMING, R.; ROILIDES, E.; ANAISSIE, E. Infections due to emerging and uncommon medically important fungal pathogens. **Clinical Microbiology Infectious**, v. 10, p. 48–66, 2004.

ZARZUELO, A.; CRESPO, E. The medicinal and non-medicinal uses of thyme. In: Stahl-Biskup E, Sáez F, Eds. **Medicinal and Aromatic Plants – Industrial Profiles**, Taylor; Francis, London, v. 17, p. 263-92, 2002.

ANEXOS



**PgPNSB**Pós Graduação em Produtos Naturais
e Sintéticos Bioativos**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL
CERTIDÃO**

João Pessoa, 05 de outubro de 2011

CEPA N° 0107/11

Ilmo(a). Sr(a).

Pesquisador(a): Prof(a). Dr(a). EDELTRUDES DE OLIVEIRA LIMA

Orientando(a) :KELLY SAMARA DE LIRA MOTA

Departamento/Setor: LTF

**Ref.: AVALIAÇÃO DA CORRELAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFUNGICA IN VITRO E
IN VIVO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Thymus vulgaris* L. E. FITOCONSTITUINTES
CONTRA *Rhizopus spp.***

O Comitê de Ética em Pesquisa Animal do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba, em reunião, **ANALISOU e APROVOU** a execução do projeto acima.

Número de animais:128 Camundongos swiss ♀.

Período: 07/2011 a 12/2012.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Sandra Rodrigues Mascarenhas

Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa Animal do LTF/UFPB

Protocolo utilizado na Triagem Farmacológica

ATIVIDADE FARMACOLÓGICA	Quantificação dos efeitos (0) sem efeito, (-) efeito diminuído, (+) efeito presente, (++) efeito intenso				
	até 30'	1h	2h	3h	4h
1 – SNC					
a – Estimulante					
Hiperatividade					
Irritabilidade					
Agressividade					
Tremores					
Convulsões					
Piloereção					
Movimento intenso das vibrissas					
Outras _____					
b – Depressora					
Hipnose					
Ptose					
Sedação					
Anestesia					
Ataxia					
Reflexo do endireitamento					
Catatonía					
Analgesia					
Resposta ao toque diminuído					
Perda do reflexo corneal					
Perda do reflexo auricular					
c – Outros comportamentos					
Ambulação					
Bocejo excessivo					
Limpeza					
Levantar					
Escalar					
Vocalizar					
Sacudir a cabeça					
Contorções abdominais					
Abdução das patas do trem posterior					
Pedalar					
Estereotípia					
2 - SN AUTÔNOMO					
Diarréia					
Constipação					
Defecação aumentada					
Respiração forçada					
Lacrimajamento					
Micção					
Salivação					
Cianose					
Tono muscular					
Força para agarrar					
3 – MORTE					

Observações complementares.: _____

Responsável Técnico



Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Exatas
Departamento de Química / Colegiado de Extensão
Telefax : (31) 3409-5724 – e-mail: núcleo@qui.ufmg.br

UFMG

CERTIFICADO DE ANÁLISE QUÍMICA

Solicitante: LASZLO AROMATERAPIA LTDA. CNPJ: 07.997.093/0001-10

ÓLEO ESSENCIAL DE TOMILHO

Nome comercial: Tomilho Branco QT timol.

Lote: sz32787

Nomenclatura botânica: Thymus vulgaris.

Extração: Destilação por arraste a vapor.

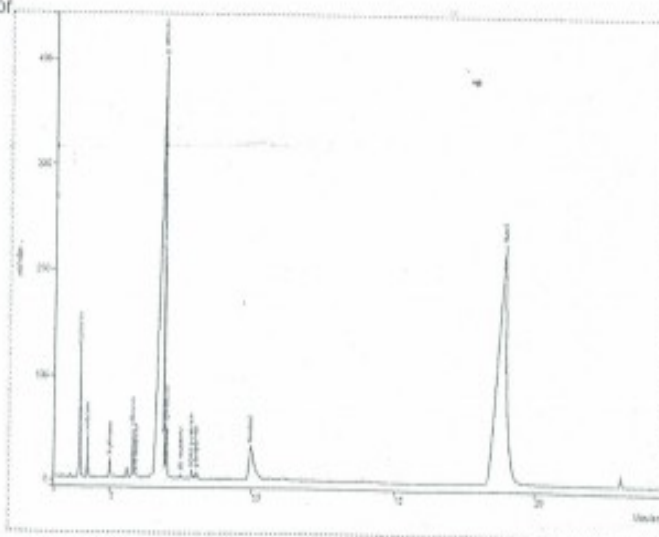
Método de cultivo: convencional.

Parte da planta: folhas.

Origem: Hungria.

Composição Química:

Pico	Constituinte ID	%
1	α -pineno	3,3
2	camfeno	1,0
3	β -pineno	0,6
5	mirreno	1,7
6	p-cimeno	38,9
7	limoneno	0,8
8	1,8-cineol	1,2
11	γ -terpineno	0,3
12	linalol	3,8
16	timol	46,6



Método de análise:

Cromatografia Gasosa de Alta Resolução

Coluna: HP1 25m x 0,25mm (HP). Temperaturas: Coluna: 40°C (3min), 3°C/min, até 150°C.

Injetor: 250°C Split: 1/200. Detetor FID: 250°C. V. volume de injeção: 1 μ l (conc 0,5% em hexano)

Obs: Picos menores que 0,1% foram excluídos

Dra. Vany Ferraz
Laboratório de Cromatografia
Departamento de Química – UFMG
vanyferraz@ufmg.br
Belo Horizonte, 06/10/2008

Molecules 2012, 17, 14418–14433; doi:10.3390/molecules171214418

OPEN ACCESS

molecules

ISSN 1420-3049

www.mdpi.com/journal/molecules

Article

Antifungal Activity of *Thymus vulgaris* L. Essential Oil and Its Constituent Phytochemicals against *Rhizopus oryzae*: Interaction with Ergosterol

Kelly Samara de Lira Mota ^{1,*}, Fillipe de Oliveira Pereira ², Wylly Araújo de Oliveira ², Igara Oliveira Lima ¹ and Edeltrudes de Oliveira Lima ¹

¹ Laboratory of Mycology, Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Paraíba, João Pessoa, 58051-970, Brazil; E-Mails: igaralima@yahoo.com.br (I.O.L.); edelolima@lbf.ufpb.br (E.O.L.)

² Center of Education and Health, Federal University of Campina Grande, Cuité, 58175-000, Brazil; E-Mails: fillipeopereira@ufcg.edu.br (F.O.P.); wyllybr@yahoo.com.br (W.A.O.)

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: kellylira@gmail.com; Tel.: +55-83-8787-7129/+55-83-3522-4876.

Received: 19 October 2012; in revised form: 31 October 2012 / Accepted: 20 November 2012 / Published: 5 December 2012

Abstract: Mucormycoses are emerging infections that have high rates of morbidity and mortality. They show high resistance to antifungal agents, and there is a limited therapeutic arsenal currently available, therefore, there is a great need to give priority to testing therapeutic agents for the treatment of mucormycosis. Along this line, the use of essential oils and phytoconstituents has been emphasized as a new therapeutic approach. The objective of this work was to investigate the antifungal activity of the essential oil (EO) of *Thymus vulgaris*, and its constituents thymol and *p*-cymene against *Rhizopus oryzae*, through microbiological screening, determination of minimal inhibitory concentration (MICs) and minimal fungicidal concentration (MFCs), effects on mycelial growth and germination of sporangiospores and interaction with ergosterol. The MIC of EO and thymol varied 128–512 µg/mL, but the MFC of EO and thymol varied 512–1024 µg/mL and 128–1024 µg/mL, respectively. The results also showed that EO and thymol significantly inhibited mycelial development and germination of sporangiospores. Investigation of the mechanism of antifungal action showed that EO and thymol interact with ergosterol. These data indicate that EO of *T. vulgaris* and thymol possess strong antifungal activity, which can be related to their interaction with ergosterol, supporting the possible use of these products in the treatment of mucormycosis.

Keywords: *Thymus vulgaris*; thymol; *Rhizopus oryzae*; antifungal activity; essential oils

1. Introduction

Fungi have become increasingly recognized as important pathogens in critically ill patients. During the last decade, fungal infections, mainly those caused by opportunistic microorganisms, have been a problem of growing clinical importance [1–3]. In the literature, the incidence of opportunistic infections in hospital environments or nosocomial infections is related to the fungi belonging to the genera *Candida*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Fusarium* and *Cryptococcus*, among others [4,5]. There has been a significant increase in infections due to emerging fungi, such as *Scedosporium*, *Fusarium* and various zygomycetes, including *Mucor* and especially *Rhizopus* [1,2].

Zygomycoses are infections caused by fungi of the class Zygomycetes, particularly the filamentous fungi belonging to two orders of clinical importance, which cause infections in humans, *i.e.*, the Mucorales and Entomophthorales [6]. However, the majority of human diseases are caused by the order Mucorales, and are thus known as mucormycoses. Members of this order have been increasingly capable of causing opportunistic infections that are progressive, necrotic and generally fatal, in a variety of immunocompromised hosts, such as patients with hematological diseases, with neutropenia, on corticosteroids, with diabetes mellitus with or without ketoacidosis, or with solid organ transplants, and patients with high levels of serum iron. These pathogens rarely cause infections in immunocompetent patients [6–8].

The incidence of mucormycosis has increased in the last years, representing the third most common invasive fungal infection, after candidiasis and aspergillosis [9,10]. It is considered an increasingly emerging and potentially fatal infection, due to its high levels of morbidity and mortality [1,10,11]. The major forms of clinical manifestations of zygomycosis (mucormycosis) include rhinocerebral, pulmonary, cutaneous, gastrointestinal and disseminated or systemic symptoms [12]. The most common organisms that cause zygomycosis in humans are of the genera *Rhizopus*, *Mucor*, *Rhizomucor* and *Absidia*. *Rhizopus* stands out the most because many of its species cause more than 70% of infections by Zygomycetes, where *R. oryzae* is the most common etiological agent [7,13].

The standard therapy for invasive zygomycosis consists in the reversal of underlying predisposing factors, surgical intervention such as aggressive debridement or amputation and drug treatment [8,12]. Traditionally, amphotericin B and more recently its lipid formulations comprise the first line treatment of zygomycosis [14]. Specifically, liposomal amphotericin B is less nephrotoxic and shows better penetration of the central nervous system compared to amphotericin B and other lipid formulations [15]. The therapeutic arsenal for the treatment of mucormycosis is limited, plus there are various side effects associated with the use of these antifungal agents. Moreover, since many patients who develop these aggressive fungal infections show high mortality rates, there is a tremendous necessity for new therapeutic strategies aimed at introducing into the pharmaceutical market new products, natural or synthetic, for the treatment of mucormycosis. Natural products have been especially considered as sources of potentially bioactive molecules, which may have a wide spectrum of actions and fewer collateral effects.

The natural products that have stirred great interest in the scientific community are essential oils, which are complex mixtures rich in terpenes with different degrees of lipophilicity and relative hydrophilicity [16]. Such compounds can alter cell permeability by their insertion between the fatty acid chains that compose the lipid bilayers of membranes, thereby interrupting lipid packing, causing alterations in the properties and functions of the cell membrane by increasing its fluidity and permeability [17,18]. Essential oils and their phytoconstituents have shown promising antifungal activity *in vitro* and *in vivo*, where they have been extensively studied against *Candida* spp., *Trichophyton* spp. and *Aspergillus* spp. [18,19–27]. However, studies on the antifungal activity of essential oils and their components against species of *Rhizopus*, the main genus responsible for causing the majority of mucormycosis, are scarce.

In view of these considerations, the aim of the present work was to investigate the antifungal activity of 10 essential oils, choosing among them that which showed the best antifungal profile for an in-depth study of its fungicidal and/or fungistatic effects against *R. oryzae* strains, of its effects on mycelial growth and germination of sporangiospores, *R. oryzae* and of its mechanism of action as well.

2. Results and Discussion

During the last decade, advances in diagnostic systems and the introduction of new antifungal agents significantly improved the prognosis of patients who develop invasive fungal infections, mainly those who are immunocompromised. However, morbidity and mortality rates remain relatively high for mucormycosis, the third most common invasive fungal infection after candidiasis and aspergillosis [1,10,11,14]. The resistance of causative microorganisms has been a concern and has gained great clinical importance, since many zygomycetes are resistant to the majority of antifungals that are utilized to treat systemic mycosis, including flucytosine or 5-fluorocytosine (5-FC), ketoconazole, fluconazole, voriconazole, and the echinocandins. Furthermore, zygomycetes have variable sensitivity to itraconazole and terbinafine. However, the majority of these pathogenic fungi are sensitive to amphotericin B and pasiconazole, a new triazole antifungal [28–30]. Accordingly, a disk diffusion assay in solid medium was carried out to evaluate the sensitivity of *R. oryzae* to some antifungals currently on the pharmaceutical market. All strains tested were found to be resistant to the five antifungal drugs evaluated, namely amphotericin B, itraconazole, fluconazole, 5-fluorocytosine and miconazole, since they showed no inhibition zone or one with a diameter ≤ 10 mm (Table 1).

The results obtained reinforce the importance and necessity of research on the potential use of essential oils as a new therapeutic alternative in the treatment of fungal infections, due to emerging drug resistance, mainly related to zygomycetes. These findings prompted the investigation of the antifungal profile of 10 essential oils against different resistant strains of *R. oryzae* by microbiological screening. The crude essential oils of *Coriandrum sativum*, *Hyptis suaveolens* and *Origanum majorana*, did not show antifungal activity, since the diameters of the inhibition zones were ≤ 10 mm. However, the essential oils of *Ocimum basilicum*, *Cymbopogon citratus*, *C. martini*, *C. winterianus*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Thymus vulgaris* and *Origanum vulgare* showed a strong and wide spectrum of antifungal action, with mean inhibition zones of 13–32 mm. *O. vulgare* and *T. vulgaris* displayed the best activity, both with mean inhibition zones of 32 mm (Table 2). In the last years, a large number of essential oils, especially those of some species of *Thymus* and their phenolic components have been investigated for their antimicrobial properties against certain bacteria [31], protozoans [32] and

fungi [33–36], although there still exist a little information in the literature about the possible mechanisms of action of *T. vulgaris* essential oil and its components. Therefore, considering the important antimicrobial potential of the genus *Thymus*, together with evidence that the essential oil of *T. vulgaris* shows one of the best antifungal profiles in fungal susceptibility tests using the disk diffusion assay in solid medium, this essential oil was chosen for further study with the aim of elucidating its antifungal mode of action.

Table 1. Susceptibility of *R. oryzae* strains to antifungal drugs.

Fungal strain	Sensitivity to antifungal drugs (diameter of inhibition zone in mm)				
	AMB	ICZ	FLU	5-FC	MCZ
LM-03	0	0	0	0	0
LM-04	10	0	0	0	0
LM-25	7	0	0	0	0
LM-29	0	0	0	0	0
LM-508	10	0	0	0	0
LM-766	0	0	0	0	0
LM-810	0	0	0	0	0
RO-5786	0	0	0	0	0
RO-4692	0	0	0	0	0
RO-4565	0	0	0	0	0
RO-4557	0	0	0	0	0

All experiments were performed in duplicate. Amphotericin B (AMB—100 µg disk⁻¹), itraconazole (ICZ—10 µg disk⁻¹), fluconazole (FLU—25 µg disk⁻¹), 5 fluorocytosine (5-FC—10 µg disk⁻¹) and miconazole (MCZ—50 µg disk⁻¹).

Table 2. Antifungal activity of essential oils against strains of *R. oryzae*.

Essential oil	Sensitivity to essential oils (diameter of inhibition zone in mm)						
	LM-03	LM-04	LM-28	LM-29	LM-508	LM-766	LM-810
<i>C. citratus</i>	25	18	28	23	24	0	24
<i>C. martini</i>	17	16	17	16	18	20	0
<i>C. winterianus</i>	16	17	18	16	22	20	24
<i>T. vulgaris</i>	29	32	28	28	31	38	36
<i>C. zeylanicum</i>	24	23	23	26	25	26	27
<i>O. vulgare</i>	33	33	31	31	30	38	30
<i>O. basilicum</i>	15	16	13	0	0	0	0
<i>C. sativum</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>H. suaveolens</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>O. majorana</i>	0	0	0	0	0	0	0

All experiments were performed in duplicate. Each disk contained 10 µL of essential oils.

Table 3 summarizes the minimum inhibitory concentrations (MICs) and minimum fungicidal concentrations (MFCs) of the drugs tested. The MIC of the essential oil was 256 µg/mL for 83% of the strains evaluated. However, for the main phytoconstituents, thymol and *p*-cymene, the MICs were 128 µg/mL (83% of strains) and >1,024 µg/mL (100% of strains), respectively. The MIC for the positive control amphotericin B was 4 µg/mL for 92% of the strains investigated. All fungal strains were capable of growing in the absence of the products, which demonstrated their viability

(microorganism control). These results indicate that *p*-cymene did not show significant inhibition of growth against strains of *R. oryzae*. Meanwhile, the essential oil of *T. vulgaris* and thymol displayed strong antifungal activity, where thymol was twice as potent, when compared to this complex mixture, thus confirming its antifungal potential, since essential oils with a MIC between 50 and 500 µg/mL are considered to have strong antimicrobial activity, while MICs between 600 and 1,500 µg/mL and over 1,500 µg/mL indicate moderate and weak activity, respectively [37]. These are important results, confirmed in the Table 4 which shows that the essential oil of *T. vulgaris* contain 46.6% of thymol. This indicates that the antifungal effect is probably the result of thymol only.

After determination of the MIC, the fungicidal effect of the products was investigated. The MFC values of the essential oil and thymol varied 512–1024 µg/mL and 128–1,024 µg/mL, respectively (Table 3), where the MFCs of the essential oil corresponded to 2 × MIC or 4 × MIC for the majority of the *R. oryzae* strains. MFC of thymol was equal to MIC or 2 × MIC for majority of the *R. oryzae* strains *R. oryzae*. Comparing the MFC values of the majority of strains tested, thymol exhibited approximately two to four times more potent fungicidal activity compared to the essential oil of *T. vulgaris*.

Table 3. Minimal inhibitory concentrations (MIC) and minimum fungicidal concentrations (MFC).

<i>R. oryzae</i>	Essential oil (µg/mL)		Thymol (µg/mL)		<i>p</i> -Cymene (µg/mL)	AMB (µg/mL)
	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MIC
LM-03	256	512	128	128	>1024	4
LM-04	256	ND	128	ND	>1024	4
LM-25	256	1024	128	256	>1024	4
LM-28	256	1024	128	256	>1024	4
LM-29	256	1024	128	256	>1024	4
LM-508	256	>1024	128	128	>1024	4
LM-766	256	512	128	256	>1024	4
LM-810	256	1024	128	256	>1024	4
RO-5786	512	1024	256	256	>1024	4
RO-4692	512	1024	256	1024	>1024	4
RO-4565	256	>1024	128	512	>1024	2
RO-4557	256	1024	128	256	>1024	4

Earlier studies demonstrated that the essential oils of *Thymus spp.* display a wide spectrum of fungicidal and/or fungistatic activity. The essential oils of *T. eriocalyx* and *T. x-porlock*, whose major phytoconstituent is thymol (64.3 and 30.7%, respectively) exhibited strong fungistatic and fungicidal activities against *Aspergillus parasiticus* [34]. In addition, the essential oil of *T. spathulifolius*, whose thymol content is 36.5%, inhibited the growth of *Trichophyton spp.*, *Fusarium spp.*, *Penicillium spp.*, *Rhizopus spp.*, *Alternaria spp.* and *Aspergillus spp.*, with MICs varying between 31 and 250 µg/mL [38]. Giordani *et al.* [39] carried out a study on the antifungal potential of essential oils of various chemotypes of *T. vulgaris* against *Candida albicans*. The essential oil of the thymol chemotype of *T. vulgaris* was the most potent, with a MIC_{80%} of 0.016 µL/mL, where the efficacy was mainly due to the high level of thymol (63.2%). According to Klaric *et al.* [36], both thymol and the essential oil of *T. vulgaris*, whose main components are *p*-cymene (36.5%) and thymol (33.0%) showed strong fungicidal and/or fungistatic activities against *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Trichoderma*, *Mucor* and *Rhizopus*. Thymol exhibited three times greater inhibition compared with the essential oil of *T. vulgaris*.

Many investigators have demonstrated the antifungal potential of thymol against species of yeasts and filamentous fungi. Thymol inhibits the growth of *Candida* species sensitive and resistant (clinical isolates) to azoles and amphotericin B [27,33,40], and interferes with the formation and viability of hyphae of *C. albicans* [18]. Similar results were reported for *Aspergillus fumigatus* and *Trichophyton rubrum* resistant to azoles and amphotericin B [26]. However, there are few studies on the antifungal activity of *p*-cymene. *p*-Cymene and 1,8-cineol have been found to be much less effective against *Aspergillus spp.* and *Penicillium spp.*, (MIC $\geq$ 4 or 8%, v/v), when compared with thymol [41]. However, with regard to opportunistic yeasts, thymol and *p*-cymene, alone or in combination, exhibit strong antifungal activity against *Candida spp.* [33].

Comparing the phytochemical profiles of the essential oils of various species of *Thymus* with that of the thymol chemotype of *T. vulgaris* used in the present study (Table 4), shows that the principal components of the majority of *Thymus* species are *p*-cymene and thymol.

Table 4. Chemical composition of *T. vulgaris* essential oil.

Constituent	%
α -Pinene	3.3
Camphene	1.0
β -Pinene	0.6
Myrcene	1.7
<i>p</i> -Cymene	38.9
Limonene	0.8
1,8-Cineole	1.2
γ -Terpinene	0.3
Linalool	3.8
Thymol	46.6

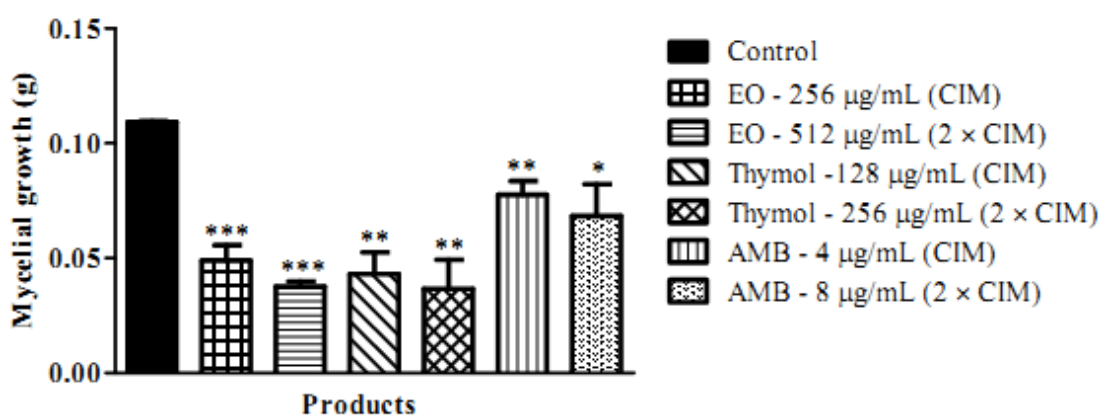
Peaks less than 0.1% were excluded.

According to Kalembe and Kunicka [42], antifungal activity can be classified in the following decreasing order: phenols > aldehydes > ketones > alcohols > esters > hydrocarbons. Therefore, in agreement with these observations, it is evident that there is a relation between the strong activity of *Thymus* essential oil and the high percentage of phenolic components, such as thymol. Correlating structure with activity, it can be speculated that the fungicidal and/or fungistatic activity of the essential oil of *T. vulgaris* can be attributed to thymol, its principal constituent, especially the hydroxyl group of this compound, since *p*-cymene (benzene), the second major component, does not possess substantial antifungal activity. This would explain the lower potency of the oil when compared to thymol, supporting the idea that the efficacy of essential oils depends on its chemical composition, mainly phenolic components. These results are of great importance, because they facilitate the utilization of individual components, instead of a mixture, giving more predictability and probably less collateral effects.

Macromolecules whose functionality is related to growth, survival, virulence or cellular morphogenesis are pointed out as promising targets for new antifungal agents [43]. Thus, taking into consideration the promising antifungal activity of the oil essential of *T. vulgaris* and of its major phytoconstituent, thymol, the effect of different concentrations of these substances on mycelial growth

and the germination of sporangiospores of *R. oryzae* (RO-4557) was investigated. The results obtained demonstrated that the essential oil, thymol and amphotericin B at concentrations equal to MIC and $2 \times$ MIC significantly reduced the dry mycelial mass of *R. oryzae* (Figure 1), with the following percentages of inhibition: $55 \pm 6\%$ (MIC of EO), $66 \pm 2\%$ ($2 \times$ MIC of EO), $61 \pm 9\%$ (MIC of thymol), $67 \pm 12\%$ ($2 \times$ MIC of thymol), $29 \pm 5\%$ (MIC of amphotericin B) and $37 \pm 13\%$ ($2 \times$ MIC of amphotericin B) when compared with the normal control of RO-4557. These results suggested that the substances evaluated inhibited normal mycelial development of *R. oryzae* at all concentrations tested. These results corroborate the data obtained by some researchers who have investigated the antifungal potential of essential oils in inhibiting the mycelial growth of pathogenic and non-pathogenic fungi [24,34]. The essential oils of two varieties of thyme, *Thymus eriocalyx* and *Thymus x-parlock*, inhibited the mycelial growth of *Aspergillus parasiticus* [34]. Recently, our research group showed that the essential oil of *C. winterianus* inhibited the mycelial development of *Trichophyton mentagrophytes* [24].

Figure 1. Effect of *T. vulgaris* essential oil, thymol and amphotericin B on mycelial growth of RO-4557.

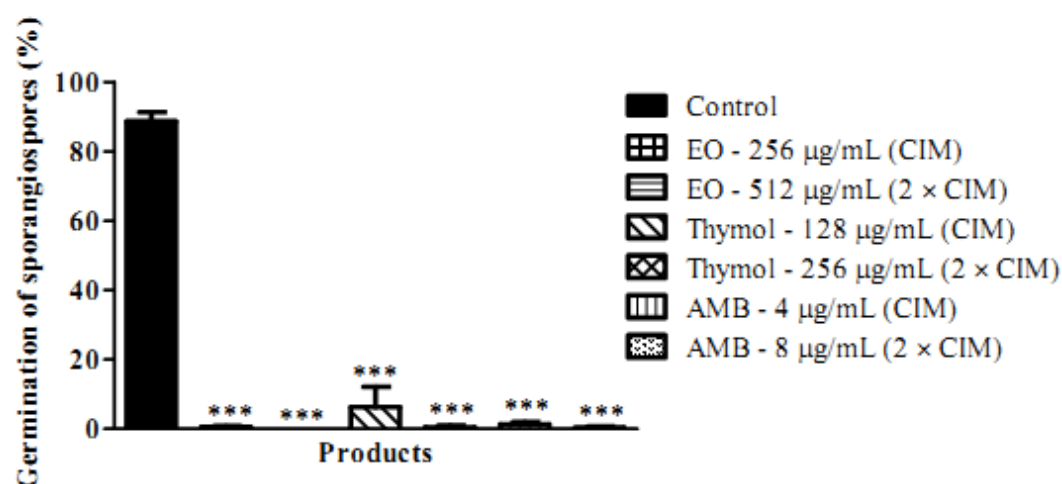


Results are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (S.E.M.) of three experiments. *** $p < 0.0001$, ** $p < 0.001$ and * $p < 0.05$ compared with control group (Student's *t*-test).

The results reported to date can be considered of great relevance, due to the importance of mycelial growth in the development of mucormycosis, since the fungi of the order Mucorales, including the species of *Rhizopus*, the main causative agent of these infections, are characterized by an erect aerial mycelium, described as fibers or "cotton candy", which grow well and rapidly [7]. These fungi cause extensive angioinvasion, which is a striking characteristic, infiltrating through the blood vessels, resulting in thrombosis of the vessels and tissue necrosis [1,44]. Mucormycosis, fungal infections that are often fatal, begin by contact with the host through aerial sporangiospores, which initiate the infectious process with the germination of sporangiospores and formation of mycelium. Thus, the study of the germination of sporangiospores has great implications in clinical practice, because it is possible to develop new therapeutic approaches that block the infection at its onset [45]. In this perspective, the effect of the essential oil of *T. vulgaris* and its principal phenolic component on the germination of the sporangiospores of RO-4557 was investigated. The effects of different concentrations (MIC and $2 \times$ MIC) of *T. vulgaris* essential oil, thymol and amphotericin B on the germination of sporangiospores are shown in Figure 2. At all concentrations tested, the essential oil,

thymol and amphotericin B exerted a strong inhibitory effect on the germination process of the sporangiospores of *R. oryzae*, where the percentage of inhibition varied between 94 and 100%.

Figure 2. Effect of *T. vulgaris* essential oil, thymol and amphotericin B on the germination of sporangiospores of RO-4557.



Results are expressed as mean $\pm$ S.E.M. of three experiments. *** $p < 0.0001$, compared with control group (Fisher's exact test).

The antifungal potential of essential oils in inhibiting the germination of sporangiospores has been extensively studied. It has been reported that the essential oil of *C. winterianus* has a strong inhibitory effect on the germination of conidia of *T. mentagrophytes* [24]. The essential oil of *C. zeylanicum* was shown to inhibit the germination of the conidia of *A. fumigatus*, *A. flavus* and *A. niger* [46]. Also, in view of the importance of the germination of sporangiospores of *Rhizopus* as the primary cause of zygomycosis, some studies have reported on the inhibitory effect of certain drugs on this process. Lovastatin produces a significant delay in the germination of sporangiospores of *Rhizomucor pusillus* [47]. Additionally, statins (lovastatin, simvastatin, rosuvastatin and atorvastatin) were reported to inhibit the germination of sporangiospores of fungi of the class of zygomycetes [48]. It has been found that *N*-acetyl-cysteine and its derivatives inhibit the germination of sporangiospores of different zygomycetes, especially *R. oryzae* [49]. The results obtained in this study corroborate those observed in previous studies, thus revealing the antifungal potential of the essential oil and thymol in blocking the infection induced by *R. oryzae* soon after onset, since they significantly inhibit the germination of sporangiospores.

Considering the lipophilic nature of essential oils and of their phenolic components, as well as the interaction of these products with biological membranes, it was decided to investigate the participation of membrane sterols in the antifungal effect exerted by the essential oil of *T. vulgaris* and thymol. Ergosterol is the principal sterol present in yeasts and filamentous fungi, where it is necessary for the growth and normal function of the fungal cell membrane. Besides controlling the fluidity, asymmetry and integrity of the membrane, ergosterol contributes to the proper functioning of enzymes bound to the membrane [50]. The majority of existing drugs for the treatment of fungal infections target the cell wall or plasma membrane directly or indirectly, particularly ergosterol and its biosynthesis [43,50]. Therefore, an interaction assay was performed with ergosterol, present only in fungal membranes, and

cholesterol, present in the cell membrane of mammals. This method is based on the exposure of a test compound to exogenous sterols, where an affinity for sterols will lead to the rapid formation of a complex, thereby impeding complexation with sterols of the membrane and resulting in an increase in MIC [51]. The MICs of the essential oil and thymol against *R. oryzae* increased four and eight times in the presence of 200 and 400 µg/mL ergosterol, respectively. With cholesterol, the MICs of the drugs increased fourfold for both concentrations. Amphotericin B, the positive control that has a known interaction with ergosterol, showed a 256-fold higher MIC in the presence of this sterol. A similar interaction was seen in the presence of cholesterol (Table 5).

Table 5. Effect of EO of *T. vulgaris*, thymol and amphotericin B against *R. oryzae* (RO-4557) in absence and presence of sterols.

Drug	MIC (µg/mL)				
	Absence of sterols	Presence of ergosterol		Presence of cholesterol	
		200 µg/mL	400 µg/mL	200 µg/mL	400 µg/mL
EO	256	1024	2048	1024	1024
Thymol	128	512	1024	512	512
AMB	4	1024	1024	512	1024

All experiments were performed in triplicate.

The action of essential oils and their phenolic components on the cell membrane has been widely studied. The essential oils of *Thymus spp.*, especially *T. zygis* and *T. vulgaris* and their components, such as carvacrol, thymol and *p*-cymene, have displayed potent fungicidal activity against *Candida spp.*, resulting mainly in extensive damage to the cell membrane [33]. The essential oils of *T. eriocalyx* and *T. x-porlock* have been shown to cause irreversible damage to the cell wall, organelles and cell membrane of *A. parasiticus* [52]. There are few studies on the direct interaction of essential oils and their phytoconstituents with ergosterol of the membrane, although there is a large variety of biologically active compounds, such as polyenes, whose main representative is amphotericin B, which binds directly to ergosterol and forms pores that destabilize the membrane, resulting in eventual loss of intracellular material and cell lysis [43,53].

The results obtained suggest that the mechanism of the antifungal action of the essential oil and thymol involves a direct interaction with ergosterol, which leads to the disruption of the fungal membrane and loss of intracellular contents. However, such action is not selective, since there is also an interaction between the study products and cholesterol. This also holds true for amphotericin B, which has an amphipathic character, thus possessing the capacity to bind to both sterols incorporated in cell membranes, ergosterol and cholesterol, resulting in toxicity to mammalian cells and particularly causing nephrotoxicity [43,53,54].

3. Experimental

3.1. Plant Essential Oil and Drugs

Plant essential oils of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf (capim santo), *Cinnamomum zeylanicum* Blume (canela), *Coriandrum sativum* L. (coentro), *Origanum majorana* L. (manjerona) and

Origanum vulgare L. (oregano) were obtained from Ferquima Industria e Comercio Ltda. (Vargem Grande Paulista, São Paulo, Brazil); essential oils of *Cymbopogon martini* (palmorosa), *Ocimum basilicum* (manjerição) and *Thymus vulgaris* L. (tomilho) were obtained from Laszlo Aromaterapia Ltda. (Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil); *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor (citronela) and *Hyptis suaveolens* L. (alfazema brava) were obtained from the Experimental Plant Collection, Department of Agriculture, Center of Technologist Training, Federal University of Paraíba, Bananeiras, Brazil. The purity of oils was determined by percent composition of major active compounds as revealed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) (data not shown). The major compounds of *T. vulgaris*, thymol and *p*-cymene, and amphotericin B (positive control) were acquired from Sigma-Aldrich® (São Paulo, SP, Brazil). The essential oil of *T. vulgaris* and its phytoconstituents were dissolved in 2% Tween 80 (INLAB/Industria Brasileira, São Paulo, SP, Brazil) and amphotericin B in 1% dimethyl sulfoxide (DMSO) in sterile distilled water to obtain 1,024 µg/mL solutions.

3.2. Essential Oil Analysis

The composition of essential oils was analyzed using GC-MS on a Shimadzu GC-17A/MS QP5050A (GC/MS system) apparatus equipped with a HP-1 column (30 m × 0.25 mm id, 0.25 µm film thickness). Helium was employed as the carrier gas at a flow rate of 1.0 mL/min; column inlet pressure was 48.7 kPa; linear velocity = 36.0 cm/s; total flow rate was 50 mL/min; carrier flow rate was 24 mL/min; injector temperature was 250 °C; detector temperature was 250 °C; column temperature was 40 (3 min)–150 °C (1 min) at 3 °C/min, then 150–250 °C at 10 °C/min (10 min). For GC-MS detection an electron ionization system was used with ionization energy of 70 eV. Samples were diluted 1/1000 (v/v) in hexane and 1.0 µL were injected in the splitless mode [55]. The compounds were identified by comparing their fragmentation patterns detected in the mass spectra with those in the NIST 98 mass spectrometry library (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA) and with reports from the literature. The quantification of the components was based on the percentage of peak area of each component in relation to the total area of all standardized peaks in the chromatogram.

3.3. Mold Strains

In the antifungal tests, we used eight strains of *R. oryzae* (LM-03, LM-04, LM-25, LM-28, LM-29, LM-508, LM-766 and LM-810), which were isolated, identified and stored in the Mycology Laboratory of the Department of Pharmaceutical Sciences, Center of Health Sciences, Federal University of Paraíba, and four strains of *R. oryzae* (RO-4557, RO-4565, RO-4692 and RO-5786) obtained from the Culture Collection—URM, of the Department of Mycology, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil. The fungi were stored on potato dextrose agar (PDA—Difco Laboratory, Detroit, MI, USA) at 4 °C until used in tests.

3.4. Inoculum

The inoculum preparation was adapted from Dannaoui *et al.* [29] and Espinel-Ingroff *et al.* [56]. The fungi were grown at 28 °C on Sabouraud dextrose agar (SDA) (Difco) until they were judged to have formed maximal numbers of sporangiospores (5 days). The stock sporangiospore suspensions

were prepared by washing the surface of the slants with 5 mL of sterile saline and shaking suspensions for 5 min. The resulting mixture of sporangiospores and hyphal fragments was withdrawn and transferred to a sterile tube. After heavy particles were allowed to settle for 3 to 5 min, the upper homogeneous suspension was collected and vortexed for 15 s. The resulting sporangiospore suspension was counted with a hemocytometer, where it was adjusted to 10^6 sporangiospores/mL.

3.5. Disk Diffusion Assay

The disk diffusion assay was performed to determine the sensitivity of fungal strains to the antifungal drugs and essential oils [57,58]. Briefly, 1 mL of spore suspension (10^6 sporangiospores/mL) was spread onto SDA plates and filter paper discs (Sensibiodisc, CECON/SP) impregnated with 10 μ L of essential oils, whereas for drug sensitivity, antifungal drug disks (10–100 μ g/disk, CECON/SP), were mounted on the agar surface and the plates were incubated at 28 ± 2 °C for 2 days. Each experiment was conducted in duplicate and average zone size was measured. The antifungal activity of the products was considered positive when the arithmetic mean was greater than or equal to 10 mm of at least 50% of all strains tested. The essential oil with the best antifungal profile was chosen to characterize the antifungal activity *in vitro*.

3.6. Determination of MIC and MFC

The broth microdilution assay with some modifications as adapted by Dannaoui *et al.* [29] and Espinel-Ingroff *et al.* [56] was performed to determine the MIC of *T. vulgaris* essential oil, thymol, *p*-cymene and amphotericin B against *R. oryzae*. On the day of the test, sterile 96-U-shaped-well microplates were used and each well of the plates contained 100 μ L of Sabouraud dextrose broth (SDB) (Difco Lab.). Afterwards, 100 μ L of the products (1,024 μ g/mL) were added to the first wells. Next, serial twofold dilutions in culture medium were prepared to obtain concentrations ranging from 0.25 to 1,024 μ g/mL. Finally, 10 μ L of fungal inoculum were added to all wells. The microplates were incubated at 28 °C and MICs were determined visually after 48 h incubation. The MIC was determined from three independent experiments and was defined as the lowest drug concentration that showed absence of growth or complete fungal growth inhibition (100% inhibition). Negative control (without drugs) was performed to confirm the viability of the sporangiospores. Sensitivity control for Tween 80 and DMSO was also performed. The MFC was determined for the drugs that showed strong antifungal activity. After determining the MIC, 10 μ L were subcultured from each well that showed complete inhibition (100% or an optically clear well) on SDA plates. The plates were incubated at 28 °C for 24 h, and the MFC was the lowest thyme and thymol concentration that showed either no growth or fewer than three colonies to obtain approximately 99 to 99.5% killing activity. The MFC was determined from three independent experiments on different occasions.

3.7. Effects on Mycelial Growth

The analysis of the interference of *T. vulgaris* essential oil, thymol and amphotericin B on mycelial growth was performed by determining the dry mycelial weight of *R. oryzae* 4557 [59,60]. Sterile tubes containing 4.5 mL of the drugs at concentrations corresponding to the MIC and $2 \times$ MIC in SDB, were

inoculated with 0.5 mL of a suspension of 10^6 sporangiospores/mL. A control experiment was performed with sterile distilled water instead of the drugs. The tubes were incubated at 28 °C for five days. Cultures were filtered through sterile filter paper (retention of particles: 11 µm). The mycelia were dried at 60 °C for 10 min. The filter paper containing dry mycelium was weighed and the dry mycelium weight was expressed in grams for three independent experiments.

3.8. Sporangiospore Germination Assay

Sporangiospore germination was performed according to Sharma and Tripathi [60] and Shiosaki *et al.* [61] with some modifications. The essential oil, thymol and amphotericin B (positive control) were tested to evaluate the effectiveness of these products on inhibiting the germination of *R. oryzae* (RO-4557). A negative control was performed. Doubly concentrated SDB (500 µL) containing the drugs at concentrations corresponding to the MIC and $2 \times$ MIC was added to sterile tubes. They were mixed with 500 µL of fungal suspension of 10^6 sporangiospores/mL and immediately incubated at 28 °C. Samples were taken at 24 h for analysis. The number of germinated and ungerminated sporangiospores was determined in a hemocytometer and the percentage of sporangiospores germinated was determined. The test was performed in three independent experiments.

3.9. Membrane Sterols Assay

To determine if *T. vulgaris* L. essential oil and thymol interacts with ergosterol, the MIC of the products against *R. oryzae* (RO-4557) was determined by the microdilution method previously described, in the presence and absence of different concentrations (200 and 400 µg/mL) of ergosterol and cholesterol (Sigma-Aldrich®, São Paulo, SP, Brazil). Amphotericin B was used as the control drug for ergosterol tests. MIC was determined after 5 days. This assay was performed in triplicate [51].

3.10. Statistical Analysis

The results are expressed as mean $\pm$ S.E.M. Differences between the means were statistically compared using Student's t-test or Fisher's exact test. The values were considered significantly different when $p < 0.05$.

4. Conclusions

On the basis of the data presented, the essential oil of *T. vulgaris* and its phenolic component, thymol, have promising fungicidal and/or fungistatic activity, whereby they are capable of inhibiting an infection at its onset. Such activities can be related to an interaction with ergosterol, a sterol present in the cell membrane of *R. oryzae*, which plays an important role in the growth and normal function of the cell membrane of these fungi. Therefore, these thyme products, especially thymol, may represent new alternative therapeutic agents in the treatment of mucormycosis. However, there is a need for more studies aimed at correlating their potent antifungal activity *in vitro* and *in vivo* and proving their safety for clinical application.

Acknowledgments

The authors are grateful to CNPq for financial support and Paraíba Federal University. A. Leyva helped with English editing of the manuscript.

References

1. Kauffman, C.A. Fungal Infections. *Proc. Am. Thorac. Soc.* **2006**, *3*, 35–40.
2. Enoch, D.A.; Ludlam, H.A.; Brown, N.M. Invasive fungal infections: A review of epidemiology and management options. *J. Med. Microbiol.* **2006**, *55*, 809–818.
3. Cruz, M.C.S.; Santos, P.O.; Barbosa, A.M., Jr.; Mélo, D.L.F.M.; Alviano, C.S.; Antonioli, A.R.; Alviano, D.S.; Trindade, R.C. Antifungal activity of Brazilian medicinal plants involved in popular treatment of mycoses. *J. Ethnopharmacol.* **2007**, *111*, 409–412.
4. Hennequin, C. Épidémiologie des mycoses invasives. L'expérience d'un centre hospitalo-universitaire parisien. *Rev. Med. Interne* **1996**, *17*, 754–760.
5. Singh, N. Impact of current transplantation practices on the changing epidemiology of infections in transplant recipients. *Lancet Infect. Dis.* **2003**, *3*, 156–161.
6. Prabhu, R.M.; Patel, R. Mucormycosis and entomophthoromycosis: A review of the clinical manifestations, diagnosis and treatment. *Clin. Microbiol. Infect.* **2004**, *10*, 31–47.
7. Ribes, J.A.; Vanover-Sams, C.L.; Baker, D.J. Zygomycetes in human disease. *Clin. Microbiol. Rev.* **2000**, *13*, 236–301.
8. Ibrahim, A.S.; Edwards, J.E.J.; Filler, S.G. Zygomycosis. In *Clinical Mycology*; Dismukes, W.E., Pappas, P.G., Sobel, J.D., Eds.; Oxford University Press: New York, NY, USA, 2003; pp. 241–251.
9. Roden, M.M.; Zaoutis, T.E.; Buchanan, W.L.; Knudsen, T.A.; Sarkisova, T.A.; Schaufele, R.L.; Sein, M.; Sein, T.; Chiou, C.C.; Chu, J.H.; et al. Epidemiology and Outcome of Zygomycosis: A Review of 929 Reported Cases. *Clin. Infect. Dis.* **2005**, *41*, 634–653.
10. Lewis, R.E.; Lortholary, O.; Spellberg, B.; Roilides, E.; Kontoyiannis, D.P.; Walsh, T.J. How Does Antifungal Pharmacology Differ for Mucormycosis Versus Aspergillosis? *Clin. Infect. Dis.* **2012**, *54*, S67–S72.
11. Walsh, T.J.; Groll, A.; Hiemenz, J.; Fleming, R.; Roilides, E.; Anaissie, E. Infections due to emerging and uncommon medically important fungal pathogens. *Clin. Microbiol. Infect.* **2004**, *10*, 48–66.
12. Rogers, T.R. Treatment of zygomycosis: current and new options. *J. Antimicrob. Chemother.* **2008**, *61*, 35–39.
13. Greenberg, R.N.; Scott, L.J.; Vaughn, H.H.; Ribes, J.A. Zygomycosis (mucormycosis): Emerging clinical importance and new treatments. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **2004**, *17*, 517–525.
14. Chayakulkeeree, M.; Ghannoum, M.A.; Perfect, J.R. Zygomycosis: the Re-emerging fungal infection. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2006**, *25*, 215–229.
15. Spellberg, B.; Walsh, T.J.; Kontoyiannis, D.P.; Edwards, J.R., Jr.; Ibrahim, A.S. Recent advances in the management of mucormycosis: from bench to bedside. *Clin. Infect. Dis.* **2009**, *48*, 1743–1751.
16. Griffin, S.G.; Wyllie, S.G.; Markham, J.L.; Leach, D. The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. *Flavour Frag. J.* **1999**, *14*, 322–332.

17. Sanchez, M.E.; Turina, A.; Garcia, D.A.; Veronica -Nolan, M.; Perillo, M.A. Surface activity of thymol: Implications for an eventual pharmacological activity. *Colloids Sur. B Biointerfaces* **2004**, *34*, 77–86.
18. Braga, P.C.; Alfieri, M.; Culici, M.; Dal Sasso, M. Inhibitory activity of thymol against the formation and viability of *Candida albicans* hyphae. *Mycoses* **2007**, *50*, 502–506.
19. Mondello, F.; Bernardis, F.; Girolamo, A.; Salvatore, G.; Cassone, A. *In vitro* and *in vivo* activity of tea tree oil against azole-susceptible and resistant human pathogenic yeasts. *J. Antimicrob. Chemother.* **2003**, *51*, 1223–1229.
20. Lima, I.O.; Oliveira, R.A.G.; Lima, E.O.; Farias, N.M.P.; Souza, E.L. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2006**, *16*, 197–201.
21. Bansod, S.; Rai, M. Antifungal Activity of Essential Oils from Indian Medicinal Plants Against Human Pathogenic *Aspergillus fumigatus* and *A. niger*. *World J. Med. Sci.* **2008**, *3*, 81–88.
22. Pinto, E.; Vale-Silva, L.; Cavaleiro, C.; Salgueiro, L. Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* (*Eugenia caryophyllus*) on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *J. Med. Microbiol.* **2009**, *58*, 1454–1462.
23. Amber, K.; Aijaz, A.; Immaculata, X.; Luqman, K.A.; Nikhat, M. Anticandidal effect of *Ocimum sanctum* essential oil and its synergy with fluconazole and ketoconazole. *Phytomedicine* **2010**, *17*, 921–925.
24. Pereira, F.O.; Wanderley, P.A.; Viana, F.A.C.; Lima, R.B.; Sousa, F.B.; Santos, S.G.; Lima, E.O. Effects of *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor essential oil on the growth and morphogenesis of *Trichophyton mentagrophytes*. *Braz. J. Pharm. Sci.* **2011**, *47*, 145–153.
25. Oliveira, W.A.; Pereira, F.O.; Luna, G.C.D.G.; Lima, I.O.; Wanderley, P.A.; Lima, R.B.; Lima, E.O. Antifungal activity of *Cymbopogon winterianus* Jowitt Ex Bor against *Candida albicans*. *Braz. J. Microbiol.* **2011**, *42*, 433–441.
26. Sajjad, M.; Khan, A.; Ahmad, I. Antifungal activity of essential oils and their synergy with fluconazole against drug-resistant strains of *Aspergillus fumigatus* and *Tricophyton rubrum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *90*, 1083–1094.
27. Ahmad, A.; Khan, A.; Akhtar, F.; Yousuf, S.; Xess, I.; Khan, L.A.; Manzoor, N. Fungicidal activity of thymol and carvacrol by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2011**, *30*, 41–50.
28. Espinel-Ingroff, A. *In vitro* antifungal activities of anidulafungin and micafungin, Licensed agents and the investigational triazole posaconazole as determined by NCCLS methods for 12,052 fungal isolates: Review of the literature. *Rev. Iberoam. Micology* **2003**, *20*, 121–136.
29. Dannaoui, E.; Meletiadis, J.; Mouton, J.W.; Meis, J.F.; Verweij, P.E. *In vitro* susceptibilities of zygomycetes to conventional and new antifungals. *J. Antimicrob. Chemother.* **2003**, *51*, 45–52.
30. Sabatelli, F.; Patel, R.; Mann, P.A.; Mendrick, C.A.; Norris, C.C.; Hare, R.; Loebenberg, D.; Black, T.A.; Monicholas, P.M. *In Vitro* Activities of Posaconazole, Fluconazole, Itraconazole, Voriconazole, and Amphotericin B against a Large Collection of Clinically Important Molds and Yeasts. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**, *50*, 2009–2015.
31. Sienkiewicz, M.; Lysakowska, M.; Denys, P.; Kowalczyk, E. The Antimicrobial activity of thyme essential oil against multidrug resistant clinical bacterial strains. *Microb. Drug Resis.* **2012**, *18*, 137–148.

32. Santoro, G.F.; Cardoso, M.G.; Guimarães, L.G.L.; Salgado, A.P.S.P.; Menna-Barreto, R.F.S.; Soares, M.J. Effect of oregano (*Origanum vulgare* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oils on *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida) growth and ultrastructure. *Parasitol. Res.* **2007**, *100*, 783–790.
33. Pina-Vaz, C.; Rodrigues, A.G.; Pinto, E.; Costa-de-Oliveira, S.; Tavares, C.; Salgueiro, L.; Cavaleiro, C.; Gonçalves, M.J.; Martinez-de-Oliveira, J. Antifungal activity of *Thymus* oils and their major compounds. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **2004**, *18*, 73–78.
34. Rasooli, I.; Abyaneh, M.R. Inhibitory effects of Thyme oils on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Food Control* **2004**, *15*, 479–483.
35. Tullio, V.; Nostro, A.; Mandras, N.; Dugo, P.; Banche, G.; Cannatelli, M.A.; Cuffini, A.M.; Alonzo, V.; Carlone, N.A. Antifungal activity of essential oils against filamentous fungi determined by broth microdilution and vapour contact methods. *J. Appl. Microbiol.* **2007**, *102*, 1544–1550.
36. Klaric, M.S.; Kosalec, I.; Mastelic, J.; Pieckova, E.; Pepelnjak, S. Antifungal activity of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil and thymol against moulds from damp dwellings. *Lett. Appl. Microbiol.* **2007**, *44*, 36–42.
37. Sartoratto, A.; Machado, A.L.M.; Delarmelina, C.; Figueira, G.M.; Duarte, M.C.T.; Rehder, V.L.G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Braz. J. Microbiol.* **2004**, *35*, 275–280.
38. Sokeman, A.; Gulluce, M.; Akpulat, H.A.; Daferera, D.; Tepe, B.; Polissiou, M.; Sokmen, M.; Sahin, F. The *in vitro* antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius*. *Food Control* **2004**, *15*, 627–634.
39. Giordani, R.; Regli, P.; Kaloustian, J.; Mikail, C.; Abou, L.H. Portugal, Antifungal Effect of Various Essential Oils against *Candida albicans*. Potentiation of Antifungal Action of Amphotericin B by Essential Oil from *Thymus vulgaris*. *Phytother. Res.* **2004**, *18*, 990–995.
40. Ahmad, A.; Khan, A.; Yousuf, S.; Khan, L.A.; Manzoor, N. Proton translocating ATPase mediated fungicidal activity of eugenol and thymol. *Fitoterapia* **2010**, *81*, 1157–1162.
41. Hammer, K.A.; Carson, C.F.; Riley, T.V. Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *J. Appl. Microbiol.* **2003**, *95*, 853–860.
42. Kalembe, D.; Kunicka, A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr. Med. Chem.* **2003**, *10*, 813–829.
43. Odds, F.C.; Brown, A.J.P.; Gow, N.A.R. Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol.* **2003**, *11*, 272–279.
44. Spellberg, B.; Edwards, J., Jr.; Ibrahim, A. Novel Perspectives on Mucormycosis: Pathophysiology, Presentation, and Management. *Clin. Microbiol. Rev.* **2005**, *18*, 556–569.
45. Osherov, N.; May, G.S. The molecular mechanisms of conidial germination. *Fems Microbiol. Lett.* **2001**, *199*, 153–160.
46. Carmo, E.S.; Lima, E.O.; Souza, E.L.; Sousa, F.B. Effect of *Cinnamomum zeylanicum* Blume essential oil on the growth and morphogenesis of some potentially pathogenic *Aspergillus* species. *Braz. J. Microbiol.* **2008**, *39*, 91–97.
47. Lukács, G.Y.; Papp, T.; Nyilasi, I.; Nagy, E.; Vágvolgyi, C.S. Differentiation of *Rhizomucor* species on the basis of their different sensitivities to lovastatin. *J. Clin. Microbiol.* **2004**, *42*, 5400–5402.

48. Galgóczy, L.; Papp, T.; Kovács, L.; Leiter, E.; Pócsi, I.; Vágvolgyi, C. Interactions between statins and *Penicillium chrysogenum* antifungal protein(PAF) to inhibit the germination of sporangiospores of different sensitive Zygomycetes. *FEMS Microbiol. Lett.* **2007**, *270*, 109–115.
49. Galgóczy, L.; Kovács, L.; Krizsa, K.; Papp, T.; Vágvolgyi, C. Inhibitory Effects of Cysteine and Cysteine Derivatives on Germination of Sporangiospores and Hyphal Growth of Different Zygomycetes. *Mycopathologia* **2009**, *168*, 125–134.
50. Lupetti, A.; Danesi, R.; Campa, M.; Del Tacca, M.; Kelly, S. Molecular basis of resistance to azole antifungals. *Trends Mol. Med.* **2002**, *8*, 76–81.
51. Escalante, A.; Gattuso, M.; Pérez, P.; Zacchino, S. Evidence for the mechanism of action of the antifungal phytolaccoside B isolated from *Phytolacca tetramera* Hauman. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 1720–1725.
52. Rasooli, I.; Owlia, P. Chemoprevention by thyme oils of *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin production. *J. Am. Mosq. Control. Assoc.* **2005**, *21*, 80–83.
53. Baginski, M.; Sternal, K.; Czub, J.; Borowski, E. Molecular modelling of membrane activity of amphotericin B, a polyene macrolide antifungal antibiotic. *Acta Biochim. Pol.* **2005**, *52*, 655–658.
54. Baran, M.; Borowski, E.; Mazerski, J. Molecular modeling of amphotericin B—Ergosterol primary complex in water II. *Biophys. Chem.* **2009**, *141*, 162–168.
55. Adams, R.P. *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy*; Allured Publishing Corporation: Carol Stream, IL, USA, 1995.
56. Espinel-Ingroff, A.; Bartlett, M.; Bowden, R.; Chin, N.X.; Cooper, C., Jr.; Fothergill, A.; McGinnis, M.R.; Menezes, P.; Messer, S.A.; Nelson, P.W.; *et al.* Multicenter Evaluation of Proposed Standardized Procedure for Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi. *J. Clin. Microbiol.* **1997**, *15*, 139–143.
57. Adam, K.; Sivropouou, A.; Kokkini, S.; Lanaras, T.; Arsenakis, M. Antifungal activities of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia* and *Salvia fruticosa* essential oils against human pathogenic fungi. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 1739–1745.
58. Hadacek, F.; Greger, H. Testing of antifungal natural products: Methodologies, Comparability of results and assay choice. *Phytochem. Anal.* **2000**, *11*, 137–147.
59. Rasooli, I.; Rezaei, M.B.; Allameh, A. Growth inhibition and morphological alterations of *Aspergillus niger* by essential oils from *Thymus eriocalyx* and *Thymus x-porlock*. *Food Control* **2006**, *17*, 359–364.
60. Sharma, N.; Tripathi, A. Effects of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem. *Microbiol. Res.* **2006**, *163*, 337–344.
61. Shiosaki, R.K.; Albuquerque, C.D.C.; Okada, K.; Fukushima, K.; Campos-Takaki, G.M. Monitoring the Effect of Pyrene on the Germination and Radial Growth of the Wild and Mutant Strains of *Rhizopus arrhizus* UCP402. *Braz. Arch. Biol. Technol.* **2008**, *51*, 613–621.

Sample Availability: Samples of the compounds thymol and *p*-cymene are available from the authors.