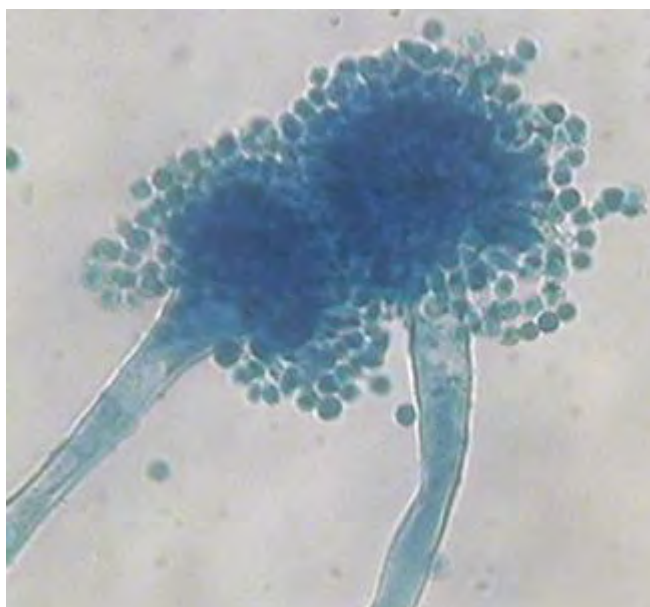


NADÁBIA ALMEIDA BORGES DE SOUZA

**POSSÍVEIS MECANISMOS DE ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE ÓLEOS
ESSENCIAIS CONTRA FUNGOS PATOGÊNICOS**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA FARMACÊUTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E
SINTÉTICOS BIOATIVOS**



JOÃO PESOA-PB

2010

NADÁBIA ALMEIDA BORGES DE SOUZA

**POSSÍVEIS MECANISMOS DE ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE ÓLEOS
ESSENCIAIS CONTRA FUNGOS PATOGÊNICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde/Laboratório de Tecnologia Farmacêutica Prof. Delby Fernandes de Medeiros da Universidade Federal da Paraíba, para obtenção do grau de DOUTOR EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS. Área de concentração: FARMACOLOGIA

ORIENTADORA: Profa. Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Diego Nunes Guedes

JOÃO PESSOA PB

2010

NADÁBIA ALMEIDA BORGES DE SOUZA

**POSSÍVEIS MECANISMOS DE ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE ÓLEOS
ESSENCIAIS CONTRA FUNGOS PATOGÊNICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde/Laboratório de Tecnologia Farmacêutica Prof. Delby Fernandes de Medeiros da Universidade Federal da Paraíba, para obtenção do grau de DOUTOR EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS. Área de concentração: FARMACOLOGIA

Aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima/ DCF/CCS/UFPB (ORIENTADOR)

Prof. Dr. Diego Nunes Guedes/DFP/CCS/UFPB (CO-ORIENTADOR)

Profa. Dra. Lindomar de Farias Belém/DF/CCBS/UEPB

Profa. Dra. Margareth de Fátima F. M. Diniz/DCF/CCS/UFPB

Prof. Dr. Thompson Lopes de Oliveira/DCF/CCS/UFPB

Prof. Dr. José Pinto de Siqueira Júnior/DBM/CCEN/UFPB

Profa. Dra. Maria Carméli C. Sampaio/DCF/CCS/UFPB – suplente

**Um dia você aprende que pode
ir muito mais longe, depois de
pensar que não podemos.
E que realmente a vida tem
valor, e que você tem valor
diante da vida!**

**Nossas dúvidas são traidoras e
nos fazem perder o bem que
poderíamos conquistar, se não
houvesse o medo de tentar.**

William Shakespeare

AGRADECIMENTOS

Esta parte de agradecimentos é uma tarefa difícil, pois muitas vezes cometemos injustiças e por esquecimento não mencionamos nomes de pessoas que também contribuíram para o trabalho. Os que não tiverem seus nomes mencionados, não se sintam excluídos, pois vocês fazem parte da minha história.

Considero que a elaboração de uma tese de doutorado é um produto coletivo embora sua escrita, seja de responsabilidade individual. Várias pessoas contribuíram para que este trabalho fosse concluído de forma satisfatória. A todas elas registro minha gratidão.

À Deus sobre todas as coisas, pois é Ele quem rege a minha vida.

Aos meus pais, por me incentivarem sempre, especialmente a minha mãe pelo apoio incondicional, pelas orações e pelo carinho.

Ao meu filho, que apesar da pouca idade, mostrou-se maduro para enfrentar sozinho, grandes tribulações, no decorrer do meu doutorado. Fui mera espectadora de suas batalhas, devido ao intenso ritmo do trabalho e dos estudos, mas estou orgulhosa do ser que gerei. Obrigada Deus e obrigada mãe!

À Profa. Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima, minha orientadora, pela competência científica e acompanhamento do trabalho, pelas críticas, correções e sugestões relevantes feitas durante a orientação, bem como pela sua grande benevolência, creio ter sido a experiência de vida pautada em trabalho e estudo, que a levou ser extremamente generosa comigo em função dos muitos intervalos que ocorreram ao longo da construção desta tese de doutorado.

Ao Prof. Dr. Diego Nunes Guedes, meu co-orientador, pela sua forma exigente e crítica de argüir as idéias apresentadas, bem como pela disponibilidade e amizade então demonstradas.

Ao Prof. Dr. Evandro Leite de Souza, pela colaboração científica e pelas suas reflexões criativas sobre nosso objeto de estudo, as quais muito nos ajudaram a compreendê-lo e a realizar uma análise crítica sobre o mesmo.

Ao Prof. Dr. Siqueira Júnior, por nos ceder a tão preciosa clorpromazina e suas idéias sobre a bomba de efluxo em fungos, tornando possível a realização deste trabalho, encorajando-me a prosseguir na execução deste teste inovador.

À Vivyanne dos Santos Falcão Silva, aluna de doutorado do Departamento de Biologia Celular e Molecular, pelos seus valiosos conhecimentos a respeito das proteínas de efluxo, ajudando-me a interpretar os dados e discutí-los.

Ao Prof. Dr. Frederico Barbosa de Sousa pelo inestimável apoio e concessão em utilizar o Laboratório de Microscopia e Imagem Biológica para realização das microfotografias.

Aos professores Drs. Thompson, Lindomar, Carméli e Magareth pela disponibilidade e cordialidade sempre!

Em especial aos colegas do meu grupo: Egberto Carmo, Fillipe Pereira e Ana Carolina pela alegre convivência, apoio e sugestões, algumas destas foram essenciais no desenvolvimento deste trabalho. À vocês, muito obrigada!

Aos colegas e professores de laboratório que estão desenvolvendo seus trabalhos e com quem tive o privilégio de estar e conhecer: Giliara, Assuero, Vinicius, Zélia, Fátima e Neuza, com quem compartilhei, mais de perto, dúvidas, angústias e conhecimentos.

A todos os colegas de turma de doutorado que contribuíram, dentro e fora de aula, para minha formação.

À Tânia Alves, pela amizade, apoio prestado, paciência e pela forma carinhosa com que sempre me recebeu.

À CAPES, pela ajuda financeira nos primeiros anos do doutorado, pelo apoio e condições de trabalho que me proporcionou, sem o qual não seria possível a concretização deste sonho e que agora é uma realidade.

LISTA DE ABREVIATURAS

AB- Anfotericina B

ATCC – Coleção de cepas de padrão americano

CCS – Centro de Ciências da Saúde

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CFM – Concentração Fungicida Mínima

mL – Unidade de medida. Definido como um milésimo do litro (1×10^{-3} L)

μ L – Unidade de medida de volume. Definido como a milionésima parte de um litro (1×10^{-6} L).

μ m – Unidade de medida de distância. Definido como a milionésima parte do metro (1×10^{-6} m)

μ g - Unidade de medida de peso. Definido como a milionésima parte do grama(1×10^{-6} g)

CPZ- Clorpromazina

FLU- Fluconazol

FT-Fitoconstituintes

GC-MS- Cromatografia gasosa acoplado ao espectrofotômetro de massa

GC-FID- Gas chromatography flame ionization detector. Cromatografia gasosa acoplada ao detector de ionização de chama. É sensível aos analitos medindo correntes elétricas geradas por elétrons.

KET- Cetoconazol

NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards.

NY-Nistatina

SPAM – Combinação da proteção osmótica promovida pelo sorbitol e características morfológicas das células fúngicas

OE – Óleo essencial

5-FLU – 5-fluorocitosina

UDP-glu- Uridina Difosfato Glucose

5-flúor-UMP- 5-flúor Monofosfato de Uridina

5-flúor-UTP- 5-flúor Trifosfato de Uridina

GlcNAc- N-acetil glicosamina

LISTA DE FIGURAS E ORGANOGRAMA

Figura 1- Macro e micromorfologia de fungo leveduriforme <i>Candida albicans</i>.....	24
Figura 2 - Macro e Micromorfologia do fungo filamentoso <i>Aspergillus flavus</i>.....	25
Figura 3- Estrutura química da anfotericina B.....	28
Figura 4- Estrutura química da nistatina.....	29
Figura 5- Mecanismo de ação da nistatina e da anfotericina B.....	29
Figura 6- Estrutura química da griseofulvina.....	30
Figura 7- Mecanismo de ação da griseofulvina.....	30
Figura 8 – Estrutura química da flucitosina.....	31
Figura 9 - Mecanismo de ação da flucitosina.....	32
Figura 10 – Estrutura química dos imidazoles	32
Figura 11 – Estrutura química dos triazólicos	33
Figura 12 – Estrutura química da terbinafina	34
Figura 13 – Estrutura química da caspofungina.....	34
Figura 14 – Esquema de difusão em meio sólido Ágar Sabouraud para testar compostos fungistáticos ou fungicida.....	38
Figura 15 – Esquema da macrodiluição em caldo Sabouraud para avaliar ação fungistática e/ou fungicida dos produtos testados.....	39
Figura 16 - Fluxograma sobre os métodos autobiográficos para avaliar a atividade antifúngica dos produtos testados (extratos brutos) frente aos microrganismos.....	40
Figura 17 - Representação da parede celular fúngica.....	42
Figura 18 - Diagrama esquemático do bioensaio do sorbitol com valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	45

Figura 19- <i>Cinnamomum zeylanicum</i> (canela).....	54
Figura 20 - <i>Citrus limonum</i> (limoeiro).....	56
Figura 21 - <i>Caryophyllus aromaticus</i> (cravo da Índia).....	57
Figura 22 - <i>Cymbopogon citratus</i> (capim santo).....	59
Figura 23 - <i>Eucalyptus globulus</i> (eucalipto).....	60
Figura 24 - <i>Melissa officinalis</i> (erva cidreira).....	62
Figura 25 - <i>Laurus nobilis</i> (louro).....	63
Figura 26 - <i>Origanum majorana</i> (manjerona).....	65
Figura 27 - <i>Origanum vulgare</i> (orégano).....	67
Figura 28 – Estrutura química dos fitoconstituintes.....	68
Figura 29 - Esquema da triagem inicial dos óleos essenciais e fitoconstituintes.....	76
Figura 30 – Esquema da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) em meio sólido.....	79
Figura 31 – Esquema da determinação da CIM, através da macrodiluição em caldo.....	80
Figura 32 - Placa para determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM).....	81
Figura 33 - Procedimento de contagem direta de cepas leveduriformes, no ensaio sobre a cinética fúngica.....	83
Figura 34 – Esquema ilustrando o procedimento de contagem do diâmetro radial de fungos filamentosos.....	83
Figura 35- Esquema sobre ensaio da micromorfogênese dos fungos.....	84
Figura 36- Fotos da triagem inicial para avaliar a atividade antifúngica dos óleos essenciais e fitoconstituintes frente a cepas de fungos leveduriformes e filamentosos.....	88

Figura 37 – Cinética de morte microbiana da cepa controle de crescimento de <i>M. canis</i> LM 36, frente a droga cetoconazol (CIM 50 μ L/mL) e da cepa exposta ao óleo essencial de <i>C. zeylanicum</i> (80 μ L/mL), após 4 dias de interação.....	114
Figura 38 – Cinética de morte microbiana da cepa controle de crescimento de <i>M. canis</i> LM 36, frente ao cetoconazol (CIM 50 μ L/mL) e da cepa exposta ao óleo essencial de <i>C. zeylanicum</i> (80 μ L/mL), após 10 dias de interação.....	114
Figura 39 - Microfotografias de luz do micélio de <i>A. flavus</i> LM 02, crescendo na ausência ou na presença do óleo essencial de <i>O. vulgare</i>	119
Figura 40 - Microfotografias de luz do micélio de <i>A. flavus</i> LM 02, crescendo na presença do óleo essencial de <i>O. majorana</i>	120
Figura 41 - Microfotografias do micélio de <i>A. flavus</i> LM 02, crescendo na presença do óleo essencial de <i>C. zeylanicum</i>	120
Organograma 1- Biossíntese do ergosterol e do colesterol.....	35

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Efeito dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* (Orégano); *Origanum majorana* (Manjerona) e *Cinamonum zeylanicum* (Canela) sobre a cinética de morte de *Candida albicans* ATCC7645. T-Tukey ($p < 0,05$).....110

Gráfico 2: Efeito dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* (Orégano); *Origanum majorana* (Manjerona) e *Cinamonum zeylanicum* (Canela) sobre a cinética de morte de *T. rubrum* LM 800. T-Tukey ($p < 0,05$).....112

Gráfico 3: Efeito dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* (Orégano); *Origanum majorana* (Manjerona) e *Cinamonum zeylanicum* (Canela) sobre a cinética de morte de *M. canis* LM 36. T-Tukey ($p < 0,05$).....112

Gráfico 4: Efeito dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* (Orégano); *Origanum majorana* (Manjerona) e *Cinamonum zeylanicum* (Canela) sobre a cinética de morte de *A. flavus* LM 02. T-Tukey ($p < 0,05$).....113

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Antifúngicos sintéticos de referência, em discos da CECON/SP.....	77
TABELA 2 – Triagem inicial dos óleos essenciais e fitoconstituintes contra cepas de fungos leveduriformes e filamentosos.....	89
TABELA 3 – Antifungigrama, mostrando sensibilidade de fungos patogênicos aos antifúngicos padrões (CECON/SP).....	91
Tabela 4 – Média dos resultados (n=2) da CIM, do óleo essencial de <i>Cinnamomum zeylanicum</i> B. sobre as cepas de fungos leveduriformes e filamentosos.....	93
Tabela 5 – Média dos resultados (n=2) da CIM, do óleo essencial de <i>Cymbopogon citratus</i> D. C. sobre as cepas de fungos leveduriformes e filamentosos.....	95
Tabela 6 – Média dos resultados (n=2) da CIM, do óleo essencial de <i>Laurus nobilis</i> L. sobre as cepas de fungos leveduriformes e filamentosos.....	97
Tabela 7 – Média dos resultados (n=2) da CIM, do óleo essencial de <i>Origanum majorana</i> L. sobre as cepas de fungos leveduriformes e filamentosos.....	99
Tabela 8 – Média dos resultados (n=2) da CIM, do óleo essencial de <i>Origanum vulgare</i> L. sobre as cepas de fungos leveduriformes e filamentosos.....	101
Tabela 9 – Média dos resultados (n=2) da CIM, do fitoconstituente α -pineno sobre as cepas de fungos leveduriformes e filamentosos.....	103
Tabela 10 – Média dos resultados (n=2) da CIM, do fitoconstituente citral sobre as cepas de fungos leveduriformes e filamentosos.....	105
Tabela 11 – Média dos resultados (n=2) da CIM, do fitoconstituente eugenol sobre as cepas de fungos leveduriformes e filamentosos.....	107
Tabela 12 – Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM), dos óleos essenciais de <i>C. zeylanicum</i> , <i>O. majorana</i> e <i>O. vulgare</i> contra alguns fungos patogênicos.....	116

Tabela 13 – CIM (na ausência e na presença de sorbitol) dos óleos essenciais de *C. zeylanicum*, *O. majorana* e *O. vulgare* contra alguns fungos patogênicos122

Tabela 14 - CIM do antifúngico fluconazol (FLU), na presença e ausência do inibidor da bomba de efluxo, clorpromazina (CPZ) e dos óleos essenciais de *C. zeylanicum*, *O. majorana* e *O. vulgare*.....124

Tabela 15 - CIM do antifúngico anfotericina B (AB), na presença e ausência do inibidor da bomba de efluxo, clorpromazina (CPZ) e dos óleos essenciais de *C. zeylanicum*, *O. majorana* e *O. vulgare*.....124

RESUMO

Após triagem microbiológica por meio de difusão, avaliou-se a susceptibilidade fúngica de dez óleos essenciais e três fitoconstituintes. Os óleos de *C. zeylanicum*, *O. majorana*, *O. vulgare* foram escolhidos por apresentarem elevada atividade antifúngica sobre vinte e uma cepas testadas. Os ensaios para determinação da CIM e a CFM mostraram que os óleos essenciais de canela e orégano foram letais sobre as cepas leveduriformes e filamentosas, o que confirmou a boa atividade antifúngica destes óleos. A avaliação do potencial de inibição do crescimento micelial, pela cinética de morte microbiana, mostra que os óleos essenciais de canela e orégano, exibiram atividade antifúngica relevante em relação ao óleo essencial de manjerona. Os óleos foram capazes de interferir acentuadamente na fase logarítmica da levedura, num período de 24 horas, com pronunciado efeito fungicida e fungistático, após 4 horas de exposição. Esta atividade antifúngica foi comparada ao efeito fungistático e fungicida do cetoconazol. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$), encontrada entre as contagens das leveduras frente aos óleos essenciais e o antifúngico padrão, cetoconazol. O efeito fumigante, dos óleos essenciais, quando analisado sob a luz da microscopia óptica, mostra que o possível mecanismo de ação destes óleos essenciais acontece por interferir na formação da parede celular. Para confirmar o modo de ação sugerido, o presente trabalho testou o efeito do sorbitol, protetor osmótico, adicionado ao meio. Observaram-se modificações microscópicas, como: diminuição do teor de citoplasma, perda de pigmentação, desenvolvimento distorcido de hifas e hifas vazias. Também, verificou-se grande resistência dos fungos, causadas em parte, pela presença de proteínas de efluxo na membrana de algumas cepas.

PALAVRAS CHAVES: Óleos essenciais, parede celular, atividade antifúngica

ABSTRACT

A microbiological screening tested ten essential oils and three phytochemicals in solid discs with a sterile medium *to evaluate* the susceptibility of different fungal strains. Oils *from C. zeylanicum, O. majorana, O. vulgare* were chosen *due to their efficient* antifungal activity against twenty-one strains analyzed. The tests that *determine CIM and CFM have proven* through essential oils *from C. zeylanicum and O. vulgare were able of causing death* on yeast and filamentous strains. *The analyze about of the inhibition mycelial growth potential by kinetics of microbial death indicates which essential oils from cinnamon and oregano obtained a important antifungal activity compared with essential oil of marjoram.* The oils were able to interfere *accenually* in the logarithmic phase of yeast *during twenty-four hours exposure.* This antifungal activity was compared with fungistatic and fungicidal effect of ketoconazole. *In regard to count of yeasts, there was not a significant difference ($p > 0.05$) between* to essential oils and the standard antifungal, ketoconazol. The fumigant effect of the essential oils *examined in an optical microscope indicates* that the possible mechanism of action *is an interference with cell wall formation.* *In agreement with what research suggests,* this study tested the effect of sorbitol, an osmotic protector *which is a complement,* this way, microscopic changes, *such as:* decreased percentage of cytoplasm, loss of pigmentation, deficient development of hyphae and empty hyphae were observed. This present study also analyzed the essential oils tested against resistant strains caused in part by the presence of efflux proteins on the membrane of some them.

KEY-WORDS: Essential oils; cell wall; antifungal activity.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	v
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE GRÁFICOS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	20
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	22
2.1. Fungos.....	22
2.2. Antifúngicos sintéticos e seus mecanismos de ação.....	26
2.3. Detecção de compostos com atividade antifúngica <i>in vitro</i> - Célula inteira sem alvo específico.....	36
2.4. Detecção de compostos com atividade antifúngica <i>in vitro</i> – célula inteira com alvo específico ou sistema enzimático.....	41
2.4.1. Esteróides da membrana.....	41
2.4.2. Inibidores da síntese de DNA/RNA.....	41
2.4.3. Topoisomerasas fúngicas.....	42
2.4.4. Parede celular fúngica.....	42
2.4.4.1. Inibidores da Parede Celular Fúngica – Bioensaio com Células	43
A) Alterações morfológicas da hifas.....	43
B) Bioensaio com <i>Neurospora crassa</i>	43
C) Bioensaio do sorbitol.....	44

2.4.4.2. Inibidores da parede celular fúngica - principais ensaios com enzimas.....	45
A) Ensaio de glicano sintase.....	45
B) Ensaio da quitina sintase.....	46
2.5. Inibidores da bomba de efluxo.....	47
2.6. Resistência aos antifúngicos.....	48
2.7. Produtos naturais.....	50
2.8. Triagem das espécies vegetais, baseada em seu potencial medicinal.....	53
3. OBJETIVOS.....	70
3.1. Objetivo geral.....	70
3.2. Objetivos específicos.....	70
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	71
4.1. MATERIAIS.....	71
4.1.1. Óleos essenciais e fitoconstituintes.....	71
4.1.2. Espécies fúngicas estudadas.....	72
4.1.3. Meio de cultura e matéria-prima utilizados.....	73
4.1.4. Antifúngicos sintéticos padrão.....	73
4.2. METODOLOGIA.....	73
4.2.1. Preparo dos inóculos de fungos leveduriformes.....	73
4.2.2. Preparo dos inóculos de fungos filamentosos.....	74
4.2.3. Avaliação da atividade antifúngica.....	74
4.2.4. Triagem microbiológica.....	75
4.2.5. Ensaio de atividades com antifúngicos sintéticos padrões (antifungigrama).....	76

4.2.6. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) em meio sólido.....	78
4.2.7. Determinação da CIM pela macrodiluição em caldo Sabouraud.....	79
4.2.8. Determinação da concentração fungicida mínima (CFM).....	81
4.2.9. Cinética de morte microbiana.....	82
4.2.10. Efeito do óleo essencial sobre a micromorfologia das cepas fúngicas filamentosas.....	84
4.2.11. Avaliação do possível mecanismo de ação antifúngica, através do protetor osmótico, sorbitol.....	85
4.2.12. Inibidores da bomba de efluxo.....	85
4.2.13. Tratamento estatístico.....	86
5. RESULTADO E DISCUSSÃO.....	87
5.1. Triagem microbiológica.....	87
5.2. Ensaio de atividades com antifúngicos sintéticos padrões (antifungigrama).....	89
5.3. Concentração inibitória mínima (CIM) em meio sólido.....	92
5.4. Cinética de morte fúngica.....	108
5.5. Concentração inibitória mínima (CIM) pela macrodiluição e concentração fungicida mínima (CFM).....	114
5.6. Efeito dos óleos essenciais sobre as malformações das hifas.....	116
5.7. Avaliação do possível mecanismo de ação antifúngica – teste com sorbitol.....	121
5.8. Avaliação de mecanismo de resistência – teste com inibidores da bomba de efluxo.....	122
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	125

7. PERSPECTIVAS.....	128
8 . REFERÊNCIAS.....	129

1. INTRODUÇÃO

No intuito de viabilizar o desenvolvimento de tecnologias e produtos medicamentosos próprios, o Brasil certamente dispõe de uma situação privilegiada, contando com uma vasta e diversificada flora, aliada ao fato da existência de uma população com uma rica tradição cultural na utilização de plantas medicinais. Esses elementos fornecem subsídios que servirão como ponto de partida de delineamentos experimentais para estudos científicos das espécies, enquanto produtoras de compostos farmacologicamente viáveis (SOEJARTO & FARNSWORTH, 1989).

Os fungos e bactérias são responsáveis por várias doenças nos animais e nos vegetais. Em especial no homem, estes microrganismos adquiriram resistência ao longo dos anos, devido ao uso indiscriminado e continuado dos antibióticos e antifúngicos.

Apesar da síntese de novos agentes antimicrobianos, linhagens de microrganismos resistentes ou multi-resistentes estão a cada dia surgindo e impondo a necessidade da pesquisa e o desenvolvimento de novas drogas. Neste sentido, as pesquisas atualizadas, envolvem a triagem de extratos vegetais, para desta forma, conhecer os metabólitos bioativos com relevante atividade biológica (SAITO et. al., 1990; SILVER & BOSTIAN, 1993; HOAREAU et. al., 1999; ALVES et. al., 2000; MONTANARI et. al., 2000; YUNES et. al., 2001; ZHANG, 2002).

Existe um consenso geral de que são necessários novos antimicrobianos mais potentes, mas sobretudo mais seguros que os em uso atualmente (SELITRENNIKOFF, et. al., 1992). A busca se orienta no sentido de compostos que atuem de modo seletivo, que causem a inibição de um processo do patógeno que não exista no hospedeiro ou sejam suficientemente diferentes, para que seu metabolismo seja pouco afetado (ZACCHINO, 2001). A maioria dos trabalhos de pesquisas de atividade antifúngica, já realizados com os compostos atuais, usa métodos celulares sem alvo específico. Eles são úteis para detectar compostos que inibem o crescimento (fungistáticos) ou matam o fungo (fungicidas), mas não dão informações sobre seu modo de ação.

Tendo em vista o potencial terapêutico apresentado pelos óleos essenciais e de seus fitoconstituintes é objeto deste estudo verificar como agem estes compostos (fungicidas ou fungistáticos), avaliando fungos leveduriformes e filamentosos, assim como estudar seus possíveis mecanismos de ação. Tendo em vista que o futuro da terapia antimicrobiana parece estar orientado para o uso combinado de fármacos, a descoberta de compostos com mecanismo de ação seletivo agregará alternativas promissoras para a terapia antimicrobiana.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Fungos

Os fungos de interesse médico, agentes de micoses, são de dois tipos morfológicos: leveduras, que são unicelulares e bolores ou fungos filamentosos, que são multicelulares. Existe um subgrupo dentro dos filamentosos, chamados fungos dimórficos, que apresentam ambas as formas, dependendo das condições ambientais e/ou físicas, da temperatura, influência do teor de CO₂ e condições nutricionais (HOOG, 2000; LARONE, 2000).

As leveduras têm como estrutura primária, células que se reproduzem por brotamento, único ou múltiplo, em geral, de forma arredondada. Estas células são esporos de origem assexual e se denominam blastoconídios. Alguns gêneros de leveduras menos importantes na micologia médica, reproduzem-se por fissão (MIDLEY, 1998; LARONE, 2000).

Os fungos patogênicos para os humanos são um grupo altamente divergente de espécies fúngicas. *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* e *Cryptococcus neoformans* são os patógenos de maior relevância causadores de severas infecções sistêmicas numa população de indivíduos imunodeprimidos (SUSSMAN, et al, 2004). Os fungos filamentosos também apresentam alta partogenicidade.

Espécies de *Candida* e de *Cryptococcus* spp. são reconhecidas como as leveduras mais envolvidas na etiologia de infecções micóticas. A candidíase caracteriza-se como a infecção fúngica mais comum, sendo *Candida albicans* seu agente etiológico mais freqüente (LIMA et al., 2006). Os quadros clínicos mais rotineiramente reportados relacionados à candidíase são a do tipo cutâneo-mucosa, sistêmica/visceral e alérgica (LACAZ et al., 1991; ANAISSE, 1992).

O componente principal da parede dos fungos é a quitina, (N-acetil glicosamina). Fungos do gênero *Cryptococcus*, como o *Cryptococcus neoformans* apresentam cápsula de natureza polissacarídica, que envolve a parede celular. Outros importantes componentes na parede celular são as hexoses e hexoaminas, que formam mananas, ducanas e galactanas.

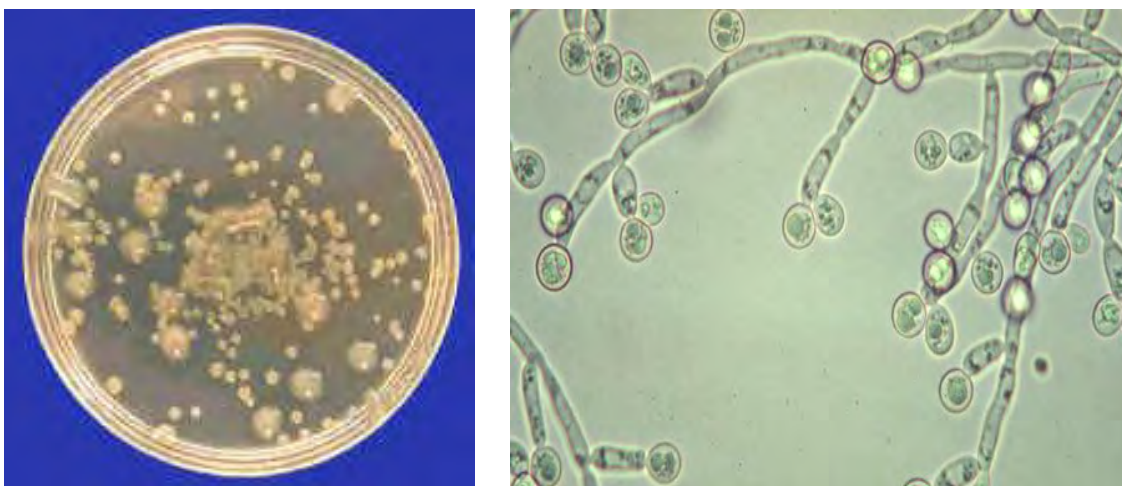
Os fungos, seres eucariontes, heterotróficos, possuem ampla distribuição na natureza, podendo ser encontrados em vários habitats, como: ar, água, solo, animais, alimentos. Suas espécies sofrem em sua incidência variações conforme a localidade, estação do ano, grau higroscópico do ar, entre outras (LACAZ; PORTO; MARTINS, 1991; SIDRIM & MOREIRA, 1999).

Primariamente são observados pela sua forma vegetativa. Sendo esta, unicelular como são conhecidas as leveduras, ou multicelular, caso dos filamentosos (mais abundantes na natureza). Ainda existem os dimórficos, ou seja, podem apresentar-se leveduriformes a temperatura de 37-39°C ou filamentosos a temperatura ambiente (SIDRIM & MOREIRA, 1999).

A identificação dos fungos, dá-se por meio de suas características morfológicas. Macromorfológicamente, quanto ao tamanho, textura, bordos, pigmentação, relevo da colônia fúngica crescida em cultura e micromorfológicamente, através de estruturas de frutificação e ornamentação (muitas vezes observadas através de microcultivo), sendo realizadas, quando necessário, provas nutricionais, bioquímicas, formação de tubo germinativo, entre outras (LACAZ et al., 1998; SIDRIM & MOREIRA, 1999).

Muitas espécies de leveduras constituem uma população da microbiota normal da superfície da pele e de algumas mucosas. Seu número varia de acordo com o sítio anatômico, no entanto, sabe-se que, no indivíduo saudável esta população residente encontra-se em estado de equilíbrio com o hospedeiro, sem causar-lhe dano. A história natural das doenças causadas por leveduras é mais bem compreendida sob à luz da susceptibilidade do hospedeiro. Os mecanismos de defesa podem ser sobrepujados por fatores intrínsecos ou extrínsecos, que causam seu desequilíbrio, resultando no super crescimento da população residente de leveduras, seguido por invasão e lesão dos tecidos vivos (SIDRIM et al., 1999).

A maioria das leveduras produz colônias glabras, de coloração branca ou bege, textura cremosa e superfície lisa. Na dependência de condições nutricionais ou de incubação, alguns isolados demonstram borda fina, estrelada ou franjada na margem da colônia.



**Figura 1- Macro e micromorfologia de fungo leveduriforme, *Candida albicans*.
Fonte: Fotos e microfotografias dos produtos testados no laboratório de Micologia/DCF/UFPB**

Além da *Candida albicans*, agente oportunista mais comum de doenças fúngicas graves, tem aumentado o número de infecções sistêmicas causadas por espécies de leveduras ditas “não-albicans”, como é o caso de *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *C. parapsilosis* e *Trichosporon* spp. e outras espécies (SIDRIM et al., 2004; MENEZES et al., 2005; MENEZES & NEUFELD, 2006).

Os fungos filamentosos possuem como elemento constituinte básico a hifa, que pode ser septada ou não septada (cenocítica). A partir da hifa formam-se esporos, para propagação das espécies. Na grande maioria dos fungos, os esporos podem ser chamados de conídios, pois nascem diretamente delas ou sobre estruturas ligadas a elas. Esses conceitos fundamentais representam a base para a identificação de um fungo, pois a classificação de filamentosos é feita, em regra, pelas características morfológicas, tanto macroscópicas (cor, aspecto, textura da colônia, etc.), quanto microscópicas (forma e cor da hifa, presença ou não de septos, tipo e arranjo de esporos, etc.), além da velocidade de crescimento (lenta, moderada ou rápida). A identificação de leveduras, ao contrário, é feita, principalmente, por características fisiológicas, devido a morfologia destes fungos não ser muito variada e não permitir distinção entre espécies e, em regra, entre gêneros (LACAZ, 1998).

As infecções causadas por fungos filamentosos, a exemplo, as aspergiloses mostram as seguintes espécies envolvidas: *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus terreus* (RODRIGUES et al., 1997).

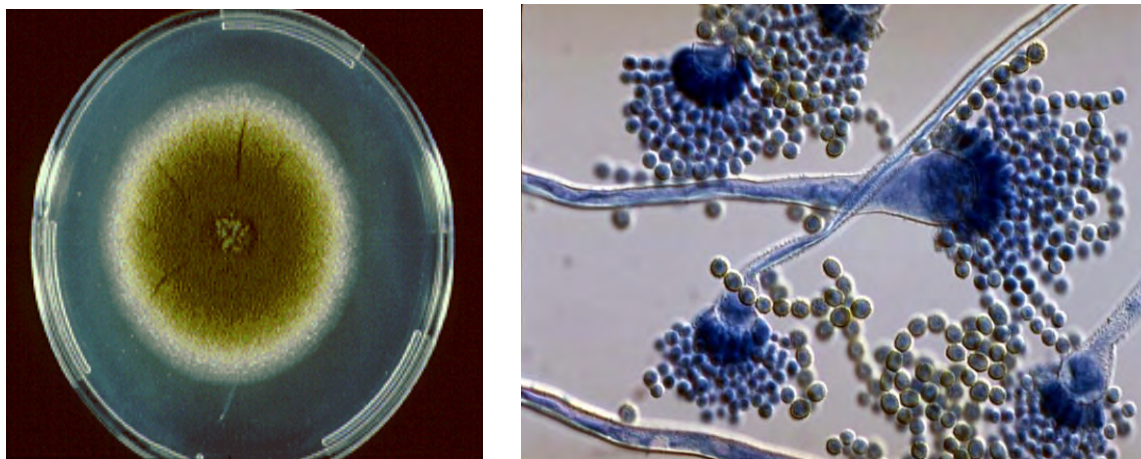


Figura 2 - Macro e Micromorfologia do fungo filamentosos, *Aspergillus flavus*.

Fonte: Fotos e microfotografias dos produtos testados no laboratório de Micologia/DCF/UFPB

Somente o gênero *Aspergillus* inclui aproximadamente 180 espécies, das quais 33 têm sido associadas às doenças humanas (PERFECT et al., 2001).

A identificação dos aspectos gerais de fungos filamentosos e dimórficos na apresentação filamentosa, refere-se a capacidade de caracterização das suas colônias. Na observação das características culturais destes organismos, devemos ressaltar os seguintes aspectos: a) tamanho da colônia, b) características das bordas, c) textura, d) relevo e e) pigmentação. Geralmente, apresenta-se com tamanho bastante variado. São conhecidos na prática micológica, por macro colônias. Nas bordas, podem ser observados muitos desenhos, que vão desde morfologias bem delimitadas até achados de projeções irregulares, que lembram franjas. A importância da análise das bordas pode ser exemplificada com colônias de *Sporotrix schenckii*, onde se observa que as bordas tornam-se escuras com o envelhecimento da cultura. As colônias também podem ser classificadas quanto à textura, como: 1- algodonosas (aspecto de algodão), 2- furfuráceas (lembra substância farinácea), 3- penugentas (lembram a penugem de aves), 4- arenosas (assemelha-se a areia da praia), 5- aveludadas (aspecto de tecido aveludado) e

6- glabrosa (visual de cera ou mateiga). O relevo e a pigmentação também são características que auxiliam a identificação de determinadas espécies fúngicas (LACAZ et al., 1998; SIDRIM & MOREIRA, 1999).

2.2 Antifúngicos Sintéticos e seus mecanismos de ação

O termo antimicrobiano é utilizado, embora muitas vezes como sinônimo de antibiótico, para designar fármacos usados no tratamento de doenças infecciosas no geral, ou seja, infecções bacterianas, fúngicas e virais (ANDREAZZA, 2000; FRANCO, 2003).

A terapia antifúngica utilizada na terapia contemporânea tem aumentado muito, nestes últimos anos, buscando atender uma demanda crescente na micologia médica. Segundo Sidrim & Rocha (2004) a partir do surgimento do iodeto de potássio, as buscas por fármacos mais efetivos e menos tóxicos para o hospedeiro têm sido crescentes. Nessa perspectiva, em 1939, surgiu a griseofulvina, muito embora só tenha sido usada clinicamente em 1958, após a comprovação de sua eficácia no tratamento de lesões dermatofíticas em animais de laboratórios. Desta forma até os dias atuais continua sendo o fármaco de eleição na terapia das dermatofitoses. No início da década de 1950, surgiram os derivados poliênicos, dos quais a nistatina apareceu, em 1951, como uma opção terapêutica para infecções por leveduras, em particular aquelas relacionadas com *Candida* spp., sendo portanto, até o presente momento, muito utilizada no tratamento de infecções de pele e mucosas causadas por espécies do gênero *Candida*.

Com o surgimento da anfotericina B, em 1956, houve um grande avanço no prognóstico das micoses, haja vista que esta foi a primeira droga eficaz no tratamento de infecções fúngicas profundas (HANN, I. M. & PRENTICE, H.G., 2001). Nesta época (1964), foi descoberta a atividade micótica de um derivado pirimidínico, denominado fluocitosina, que muito ampliou o arsenal terapêutico para micoses profundas. Entretanto, seu uso clínico é feito em conjunto com a anfotericina B, devido ao rápido surgimento de mecanismos de resistência quando essa droga é administrada sozinha (SIDRIM & ROCHA, 2004). A terapêutica antifúngica, teve um grande impulso com a descoberta da

propriedade antimicótica do benzimidazol. Vários estudos foram conduzidos, buscando a descoberta de outros derivados azólicos com essa atividade. Posteriormente, com os avanços das pesquisas nessa linha, descobriram-se os derivados triazólicos que, por sua vez, além de exercerem menos efeitos deletérios no hospedeiro, apresentam propriedades farmacocinéticas mais favoráveis produzindo, por conseguinte uma terapia antifúngica mais segura e eficaz.

Além disso na década de 1990, surgiram os derivados morfolínicos, como a amorolfina (1994), bem como as alilaminas, representadas pela naftifina e segundo Abdel-Rahman & Nahata (1997), a terbinafina (1993), amplificando assim, o arsenal terapêutico contra as infecções fúngicas, em especial das dermatomicoses. Por último, em 2001, a Food and Drug Administration (FDA) aprovou a caspofungina, membro da classe das equinocandinas, que tem mostrado um papel importante no tratamento da aspergilose invasiva.

O mecanismo de ação dos antifúngicos, segundo Sidrim & Rocha (2004), as principais drogas utilizadas na terapêutica contemporânea são divididas nas seguintes categorias:

- 1) Agentes originados de microrganismos, como, por exemplo os derivados poliênicos (nistatina e anfotericina B) e a griseofulvina.
- 2) Os agentes químicos, tais como: iodeto de potássio, flucitosina, derivados azólicos (clotrimazol, miconazol, isoconazol, tioconazol, cetoconazol, fluconazol, itraconazol, etc.); alilaminas (naftifina e terbinafina); derivados morfolínicos (amorolfina) e equinocandinas (caspofungina).

Os principais efeitos adversos estão associados a administração endovenosa, quando se refere aos agentes antifúngicos originados de microrganismos. Reações iniciais são febre de até 40°C, calafrios, cefaléia, náuseas e ocasionalmente hipotensão. A maioria dos pacientes desenvolve algum grau de nefrotoxicidade. Devido a uma diminuição inicial da taxa de filtração glomerular que resulta da ação vasoconstritora nas arteríolas aferentes. Pode ser acompanhada de um efeito no túbulo renal distal que causa perda de K⁺ (hipomagnesemia), provocada por insuficiência na reabsorção de Mg²⁺ ou acidose tubular (BRODY, 1994; SIDRIM & MOREIRA, 1999).

Nistatina - Pertence ao grupo dos poliênos, classe de substâncias formadas por átomos de carbono com dupla ligação, e mais especificamente, do grupo dos tetraenos, que são poliênos que apresentam quatro duplas ligações não-saturadas em sequência (TAVARES, 2001; HAC-WYDRO & DYNAROWICZ-LATKA, 2006). Também é considerada um macrolídeo, já que possui uma estrutura química grande e cíclica (TAVARES, 2001; GILMAN et al., 2003). Usado em infecção de pele e mucosas.

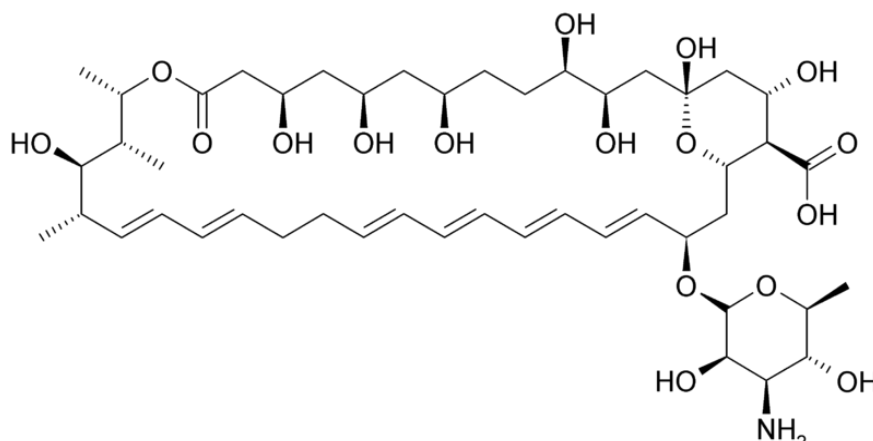


Figura 4- Estrutura química da nistatina.
Fonte: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Nistatina>

Mecanismo de ação: Liga-se ao ergosterol na membrana celular do fungo alterando a sua permeabilidade. A perda de pequenas moléculas, principalmente potássio causa a morte da célula fúngica (SIDRIM & ROCHA, 2004; BRODY, 1994)

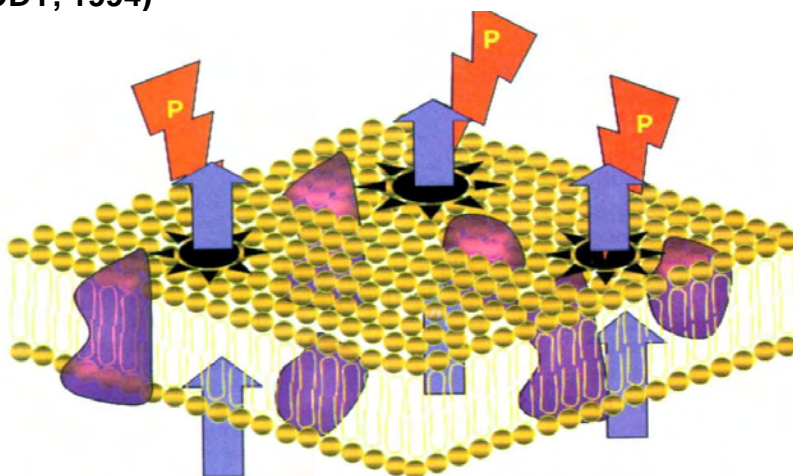


Figura 5- Mecanismo de ação da nistatina e da anfotericina B, mostrando os poros formados na membrana plasmática e o fluxo de saída, das células, de íons e moléculas importantes para a sobrevivência celular. Fonte: SIDRIM & ROCHA, 2004)

Griseofulvina - Isolada de *Penicillium griseofulvum* em 1939. Utilizada desde 1957 para tratamento de dermatomycoses. Possui atividade antifúngica-fungistático para dermatófitos: *Microsporum*, *Epidermophyton*, e *Trichophyton* (SIDRIM & ROCHA, 2004).

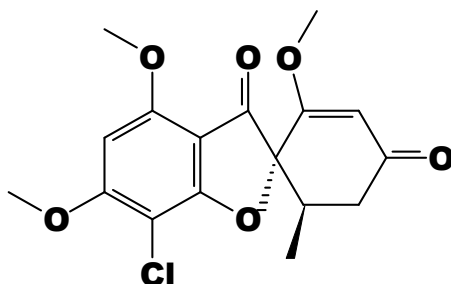


Figura 6- Estrutura química da griseofulvina.
Fonte: <http://pt.wikipedia.org/wiki/griseofulvina>

Mecanismo de ação: 1) Interfere na síntese do DNA. Interage com microtúbulos, rompendo o fuso mitótico do fungo. 2) Distribui-se nos tecidos queratinizados, tais como: pele, pêlos, unhas, acumulando-se nas células precursoras de queratina, promovendo assim, a reposição do tecido saudável (SIDRIM & ROCHA, 2004).

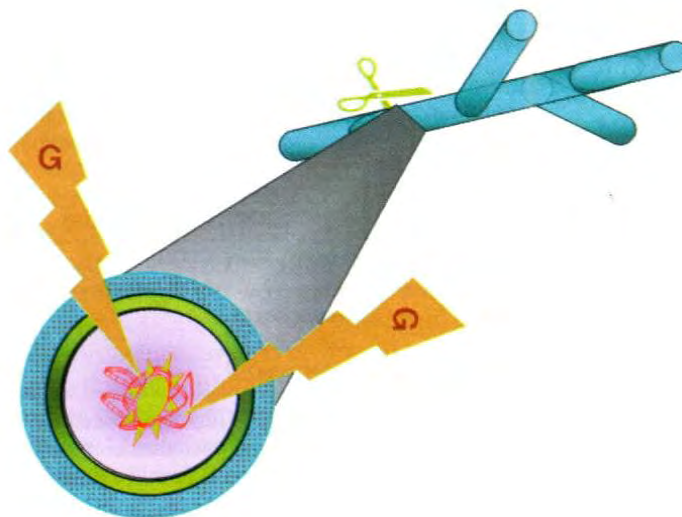


Figura 7- Mecanismo de ação da griseofulvina, mostrando a interferência da droga na síntese do DNA, pela interação com microtúbulos do fuso mitótico. Fonte: SIDRIM & ROCHA, 2004

ANTIFÚNGICOS SINTÉTICOS

Inibem a síntese de ergosterol, promovem também inibição da síntese de colesterol e interferem na ação dos complexos enzimáticos citocromo P- 450 em diversos tipos celulares de mamíferos, incluindo as células de Leydig. O resultado é uma queda das concentrações circulares de testosterona nos homens adultos (dependendo da dose empregada). As concentrações dos hormônios luteinizantes e estimulante dos folículos, elevam-se em virtude da queda do feedback negativo da testosterona (BRODY, 1994).

Flucitosina - Utilizada em estreito espectro de infecções fúngicas, geralmente combinada com a anfotericina. Segundo Sidrim & Rocha (2004) é utilizada no tratamento de micoses profundas, como as causadas por *C. neoformans* e *Candida* spp. Vale ressaltar que, muito comumente, os fungos desenvolvem resistência à flucitosina.

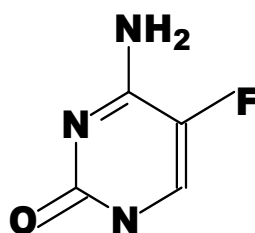


Figura 8- Estrutura química da flucitosina.
Fonte: w <http://pt.wikipedia.org/wiki/flucitosina>

Mecanismo de ação: A flucitosina penetra na célula fúngica por uma citosina permease (não encontrada em mamíferos), denominada citosina desaminase. Em seguida, é convertida em 5-fluorouracil (5-FLU). As células de mamífero são incapazes de converter a flucitosina em 5-fluorouracil. A 5-FLU é um potente inibidor da timidilato sintetase e portanto, da síntese de DNA (BRODY, 1995).

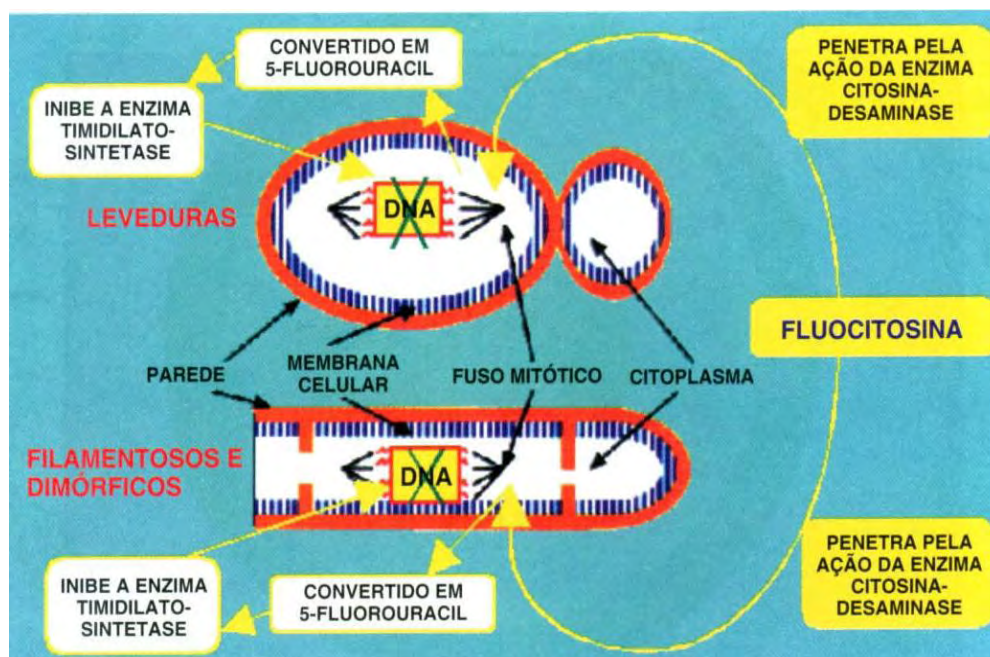


Figura 9 - Mecanismo de ação da flucitosina, interferindo na síntese de DNA. Fonte: SIDRIM & ROCHA, 2004.

Azóis - Possuem amplo espectro de atividade antimicrobiana. Destacam-se entre os imidazóis: cetoconazol, miconazol e entre os triazóis: Itraconazol, Fluconazol e voriconazol.

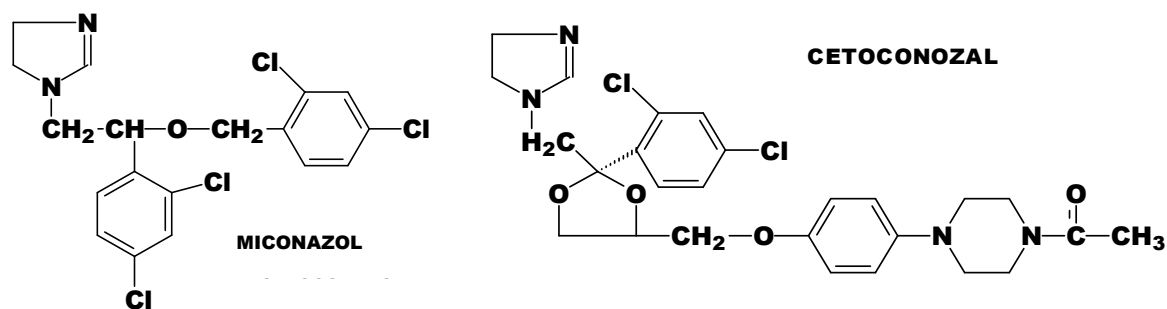


Figura 10- Estrutura química dos imidazóis.
Fonte: <http://pt.wikipedia.org/wiki/cetoconazol>;
<http://pt.wikipedia.org/wiki/miconazol>

Cerca 3 a 20% dos indivíduos tratados com cetoconazol apresentam náuseas e vômitos. Febre, prurido, icterícia, dor abdominal, cefaléia, tonturas, diarreia, apresentam uma incidência de 1% ou menos, e entre outros agravos toxicidade hepática e morte, podem acontecer. O indivíduo pode apresentar ainda ginecomastia transitória e hipersensibilidade dolorosa da mama devido

ao bloqueio da síntese de testosterona; no caso de altas doses, podem levar a oligospermia, azoospermia, impotência, irregularidades menstruais, bloqueio da síntese de cortisol e supressão da resposta adrenal ao hormônio adrenocorticotrófico (BRODY, 1994; FUCHS; WANNMACHER; FERREIRA, 2004).

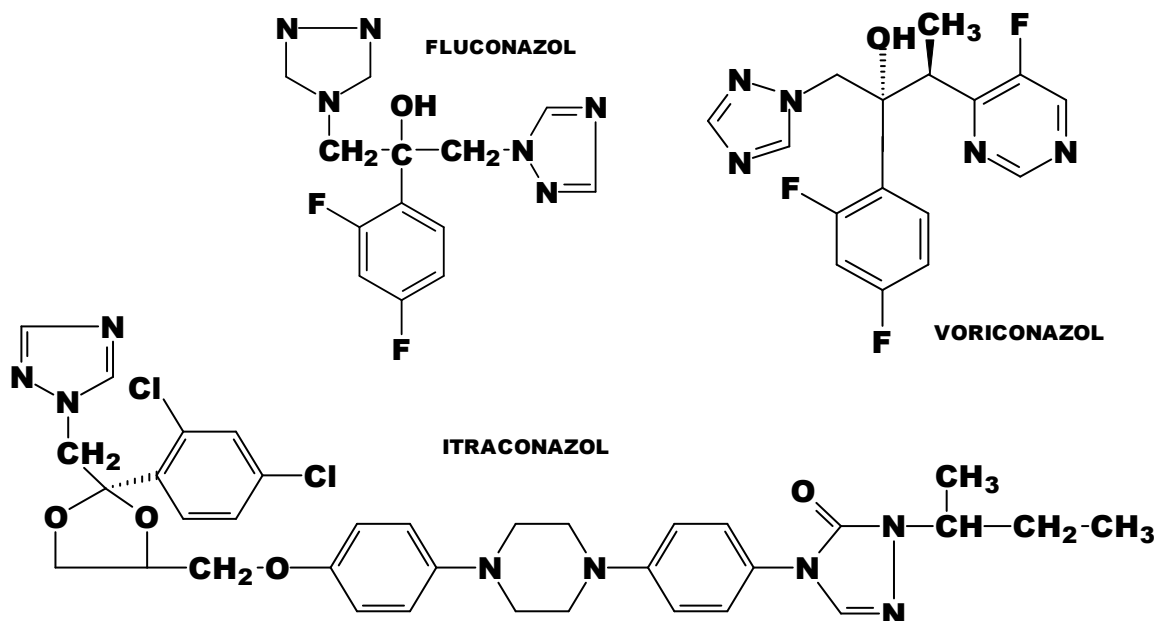


Figura 11- Estrutura química dos triazólicos. Fonte:

<http://pt.wikipedia.org/wiki/fluconazol>, <http://pt.wikipedia.org/wiki/voriconazol>
<http://pt.wikipedia.org/wiki/itraconazol>

Mecanismo ação: 1) Bloqueia a síntese dos lipídios fúngicos (esterol 14- α -demetilase), especialmente o ergosterol, alterando a permeabilidade da membrana das células fúngicas, interferindo na ação enzimática associada à membrana (VER ESQUEMA 1). 2) Inibe a transformação das células da levedura *Candida* sp em hifas (forma invasiva e patogênica do fungo).

Terbinafina (alilaminas)- Segundo Sidrim & Rocha (2004), a terbinafina possui ação antifúngica (fungicida ou fungistática) excelente contra onicomicose. A Naftifina tem menor expressão clínica, mas é eficiente contra tinhas (uso tópico).

Mecanismo de ação: Segundo Brody (1995) e Sidrim & Rocha (2004), as alilaminas inibem a síntese de ergosterol, inibindo a enzima esqualeno-2,3-epoxidase (ver organograma 1).

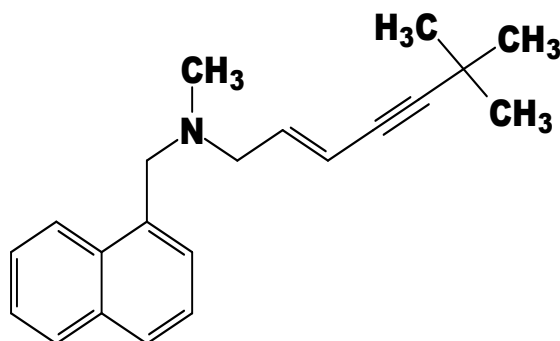


Figura 12- Estrutura química da terbinafina
Fonte: <http://pt.wikipedia.org/wiki/voriconazol>

As Equinocandinas (ex.:caspofungina) - O seu uso intra-venoso (IV) é indicado para o tratamento da aspergilose invasiva. Utilizado em pacientes refratários ou intolerantes à terapia clássica com anfotericina B ou itraconazol.

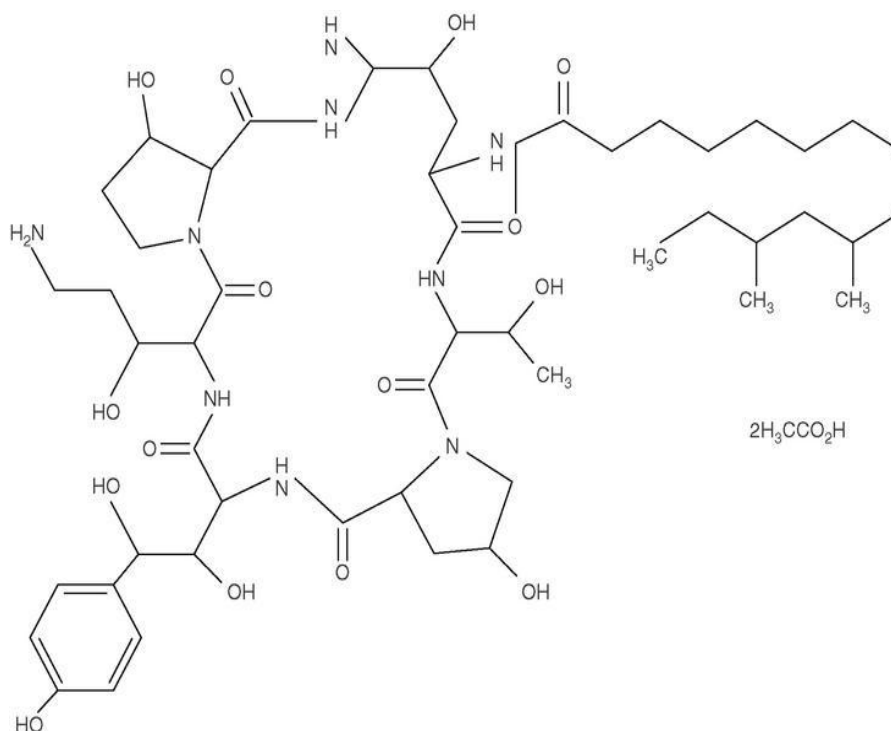
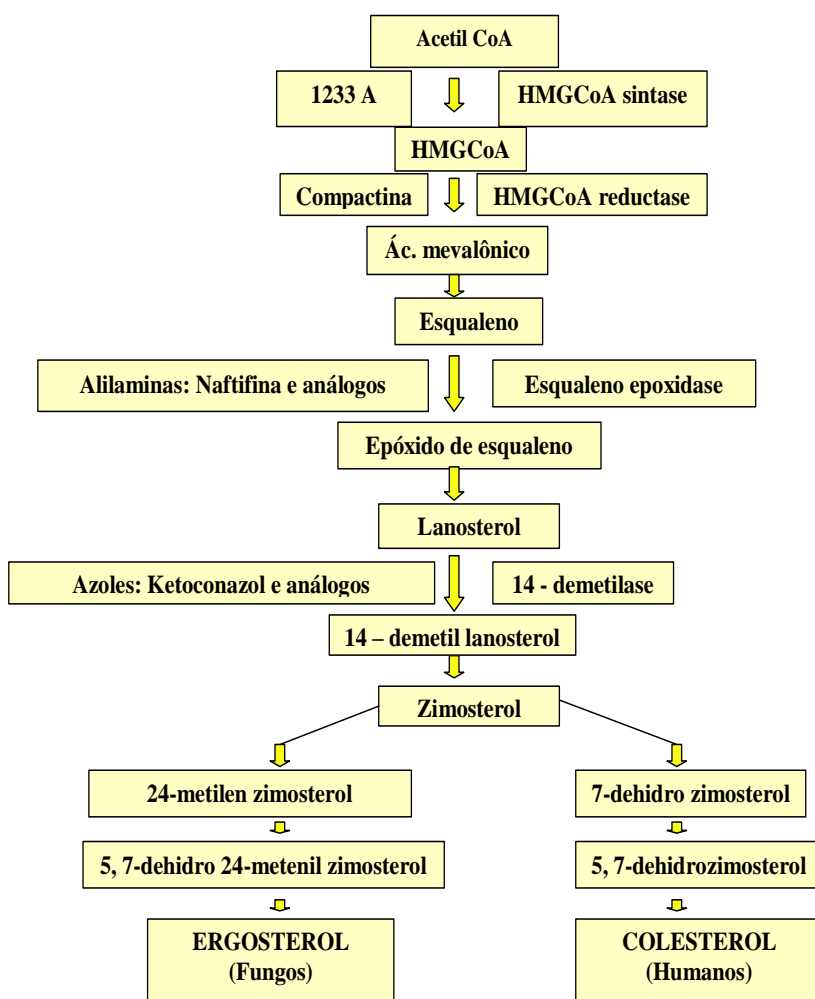


Figura 13-Estrutura química da caspofungina.
Fonte: <http://pt.wikipedia.org/wiki/voriconazol>

Mecanismo de ação: Segundo Brody (1995), as equinocandinas inibem a síntese de (1,3)- β -D-glucano - polissacarídeo essencial da parede dos fungos patogênicos, exceto de *Criptococcus neoformans*

Os fungos possuem paredes celulares, sendo uma estrutura essencial para eles, diferentemente das células dos mamíferos, e este fato faz com que todos os sistemas enzimáticos que fazem parte da síntese e montagem da parede celular fúngica se transformem em alvo útil para o descobrimento e desenvolvimento de novos fármacos antifúngicos com maior especificidade (WALSH et al., 2001; SELITRENNIKOFF et al., 1995; LÓPEZ et al., 2001;



Organograma 1- Biossíntese do ergosterol e do colesterol. Os quadros à direita das flechas mostram enzimas que participam nesta etapa de biossíntese. Os quadros à esquerda das flechas mostram inibidores destas enzimas (ZACCHINO, 2001).

Infelizmente, as células fúngicas e humanas apresentam muitas semelhanças. Compartilham a maioria das vias de metabolismo intermediário, utilizando enzimas muito similares não sendo fácil encontrar alvos que ofereçam a seletividade requerida para obter-se um antifúngico seguro. Os alvos que apresentam maior possibilidade de levar a antifúngicos seletivos são os inibidores da biossíntese do ergosterol, a inibição das topoisomerases fúngicas e a inibição da parede celular fúngica (URBINA et al, 2000; ZACCHINO et al., 2001; LACAZ et al., 2002)

2.3. Detecção de compostos com atividade antifúngica in vitro - Célula inteira sem alvo específico

A busca para se introduzir novos compostos químicos, que possam ser utilizados eficazmente pela sociedade moderna, tem encontrado, ao longo da história, nos vegetais, uma fonte inestimável para fornecimento de substâncias ativas. Estas têm servido de modelos para uma conseqüente produção em escala industrial através de síntese ou de culturas de tecidos vegetais (GOTTLIEB & KAPLAN, 1990).

A natureza tem produzido a maioria das substâncias orgânicas conhecidas. Entretanto, no processo de evolução ocorrido na Terra, o reino vegetal ocupa lugar de destaque, devido à capacidade da sua utilização com fins alimentícios e medicamentosos. Durante milhões de anos, os vegetais sofreram modificações para assim melhor adaptarem-se ao meio ambiente. Este processo, anátomo-fisiológico, lhes deu a capacidade da síntese do próprio alimento – o metabolismo de ordem primária, que inclui os lipídios, proteínas e carboidratos com funções vitais bem definidas (DIAS, 2001; DISTASI, 1996; GOTTLIEB et al., 1996; YAMADA, 1998).

O vegetal, além da organização trófica conseguida através da fotossíntese, possui um mecanismo regulador que o ajuda a desempenhar suas funções vitais. Por meio desse mecanismo – o metabolismo de ordem secundária, a planta consegue elaborar substâncias que desempenham papéis específicos em casos de estresse, crescimento e reprodução, repelir organismos invasores, atrair insetos ou pássaros necessários para a

polinização e adaptação às mudanças físico-químicas do meio externo. Devido a essas características, são atribuídos aos princípios químicos vegetais diversas ações biológicas constituindo a planta, um enorme laboratório de síntese orgânica, fruto de milhões de anos de evolução (BEART, et. al., 1988; CARVALHO & SARTI, 1995; DIAS, 2001; DI STASI, 1996; HARBONE, 1988; HARBONE & WILLIAMS, 1995; MACHADO et. al., 1995; SALLÈ, 1996; VON POSER & MENTZ, 2000; MONTANARI & BOLZANI, 2001).

Segundo Selitrennikoff, et. al. (1992) são necessários novos antifúngicos mais potentes, mas sobretudo mais seguros que os em uso atualmente. A busca se orienta no sentido de compostos que atuem de modo seletivo, que causem a inibição de um processo do patógeno que não exista no hospedeiro ou sejam suficientemente diferentes, para que seu metabolismo seja pouco afetado (ZACCHINO, 2001).

Segundo Zacchino (2001) a maioria dos trabalhos de pesquisas de atividade antifúngica, já realizados com os compostos atuais, usa métodos celulares sem alvo específico. Eles são úteis para detectar compostos que inibem o crescimento (fungistáticos) ou inibem irreversivelmente o crescimento do fungo (fungicida), mas não dão informações sobre seu modo de ação. Os métodos mais usados são:

- Difusão
- Diluição
- Autobiografia

Difusão

O extrato da planta ou composto a testar é colocado num reservatório (discos de papel, poços no meio de cultura ou cilindro sobre a superfície), em contato com um meio solidificado (Ágar Sabouraud), inoculando com um determinado fungo. Após um tempo adequado de incubação, mede-se o diâmetro ou raio da zona clara (onde não houve o crescimento fúngico) em volta do reservatório (Figura 14). A teoria deste método já foi descrita com detalhe (LINTON et al., 1983).

A informação obtida é qualitativa, útil para esclarecer a sensibilidade do microrganismo, mas não para estabelecer uma comparação da eficácia antimicrobiana das amostras dos antibióticos (ZACCHINO, 2001).

A triagem da atividade antimicrobiana dos compostos testados, é realizado pelo método de diluição em Agar. Este é um método clássico utilizado em testes *in vitro* (BARON E FINEGOLD, 1990).

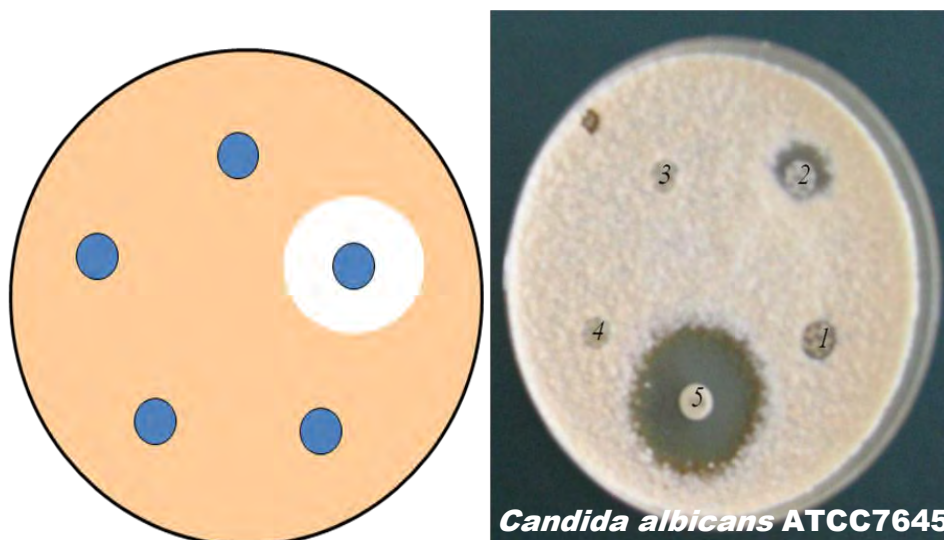


Figura 14 – Esquema de difusão em meio sólido Ágar Sabouraud para testar compostos fungistáticos ou fungicidas, através do diâmetro dos halos de inibição do crescimento, que os produtos testados exercem sobre os microrganismos. Fonte: Fotos obtidas no laboratório de microscopia/CCS/UFPB.

Diluição

Neste método, uma quantidade fixa de amostra a ser testada é dissolvida homogeneamente, num meio específico. Usualmente, utilizam-se diluições da amostra original, a cada uma das quais se inocula o fungo a testar (Figura 15).

A diluição em meio solidificado produz resultados quantitativos, permitindo verificar a concentração mínima de agente antimicrobiano necessário para inibir o crescimento de um microrganismo específico (BARON E FINEGOLD, 1990). O teste pode ser estendido para fornecer informações sobre a concentração fungicida mínima (CFM) (LI et al., 1995).

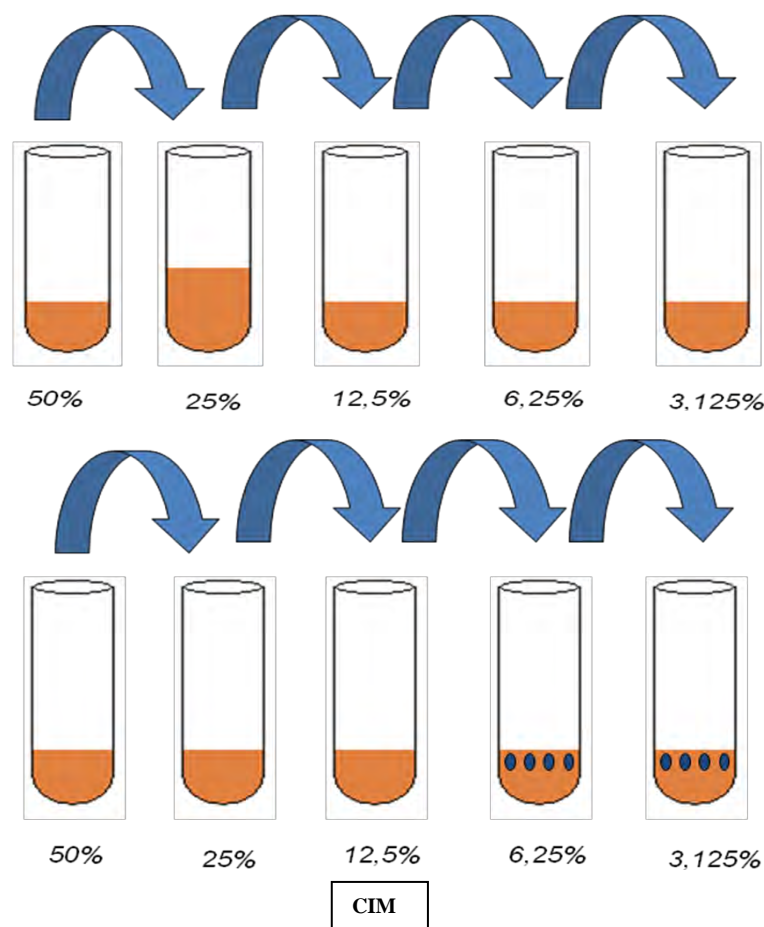


Figura 15 – Esquema da macrodiluição em caldo Sabouraud para avaliar ação fungistática e/ou fungicida dos produtos testados. Seqüência de diluições até a quantidade mínima do produto testado, capaz de inibir o crescimento do microrganismo (CIM).

Autobiográficos

A autobiografia é um método útil para a localização de compostos antifúngicos em um cromatograma de um extrato complexo. Isso permite o isolamento bio guiado de compostos ativos. Na técnica autobiográfica, denominada bioautografia por imersão, um meio de ágar inoculados é aplicado sobre a placa cromatográfica, na qual é eluído o extrato. Os componentes devem passar ao Agar por um processo de difusão e as zonas de inibição são visualizadas com um corante vital (RAHALISON et al., 1991)

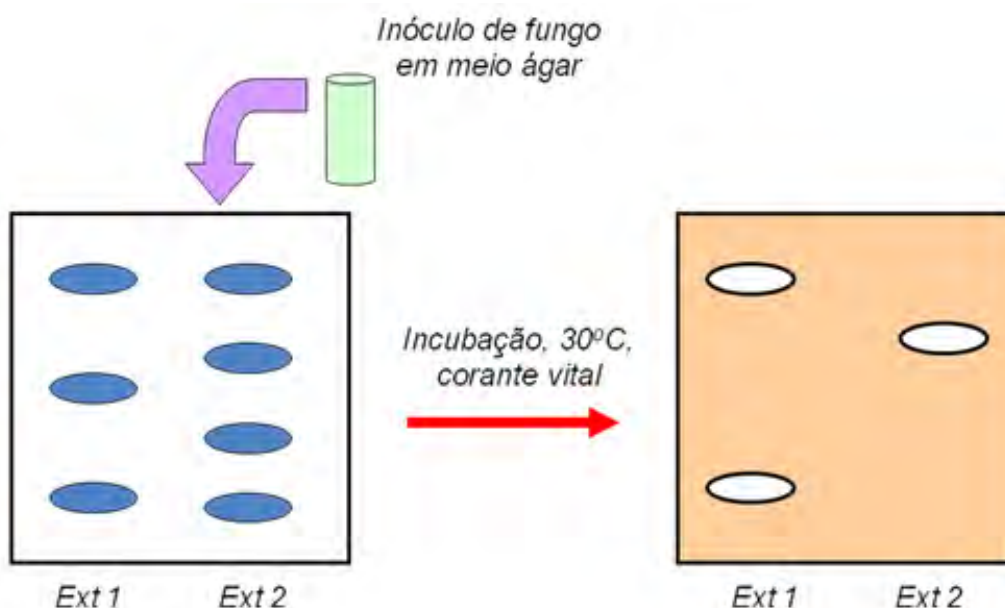


Figura 16 - Esquema sobre os métodos autobiográficos para avaliar a atividade antifúngica dos produtos testados (extratos brutos) frente aos microrganismos. A coloração de banda e a luminescência em lâmpada de UV são os parâmetros utilizados na obtenção dos resultados.

Embora estes métodos sejam úteis para detectar compostos com capacidade antifúngica, eles devem ser usados para uma primeira instância de triagem, já que não detectam agentes antifúngicos que atuem de um modo seletivo e, portanto, que assegurem antifúngicos mais seguros.

Estes ensaios têm como alvo componentes estruturais dos fungos ou uma via metabólica definida do microrganismo. As células de mamíferos e dos fungos, assemelham-se muito, todas são eucarióticas e compartilham uma grande quantidade de processos enzimáticos. Portanto, muitos destes alvos não são seletivos e os agentes antifúngicos que detectam, nem sempre são úteis para um futuro desenvolvimento na clínica, já que apresentam sérios efeitos secundários (SELITRENNIKOFF et. al., 1995).

2.4. Detecção de compostos com atividade antifúngica in vitro – Célula inteira com alvo específico ou sistema enzimático - Mecanismo de ação

Enumeram-se abaixo os principais alvos úteis para detectar fármacos antifúngicos

2.4.1. Esteróides da membrana

Os esteróides estão em todas as células fúngicas. O principal esteroide das leveduras, e muitos outros fungos, é o ergosterol que modula a fluidez da membrana e evita suas alterações, além de ter um papel vital nos fungos, regulando o crescimento e proliferação celular (PARKS et al, 1992; GEORGOPAPADAKOU et al., 1987). Os principais agentes antifúngicos em uso clínico atualmente (polienos, azóis, alilaminas) devem sua atividade à interação direta com o ergosterol ou inibição de sua síntese. Os antifúngicos que atuam em nível do ergosterol o fazem por formação de complexo com o ergosterol ou inibindo alguma das etapas da sua biossíntese (ZACCHINO, 2001).

2.4.2. Inibidores da síntese de DNA/RNA

Interferem no metabolismo das pirimidinas, impedindo a síntese de DNA/RNA e conseqüentemente, de proteínas na célula fúngica. A 5-flucitosina atua por este mecanismo. Por meio da enzima citosina desaminase, este composto se desamina intracelularmente à 5-fluorouracila (inibe a síntese de RNA e DNA, por diferentes vias). Por um lado, se convertem à 5-flúor-UMP e logo em 5-flúor-UTP que se incorpora ao RNA, causando toxicidade para o hospedeiro. Entretanto, este composto desenvolve rápida resistência (SELITRENNIKOFF et al., 1995; GHANNOUM et al., 1999).

2.4.3. Topoisomerases fúngicas

O DNA celular, tanto cromossomal como plasmídico, encontra-se num círculo fechado, covalentemente onde pode estar em estruturas topológicas diferentes, relaxado ou superenovelado. As DNA-topoisomerases são um grupo de enzimas capazes de catalisar a interconversão de ambas as formas topológicas, permitindo que o mesmo cumpra suas funções de transcrição, tradução ou recombinação dentro da célula. Estas enzimas, ropendo transitoriamente uma das cadeias de DNA (topoisomerases tipo I) ou as duas (topoisomerases tipo II) e logo, despolimerizando-as, permitem as transformações topológicas que de outra forma seriam impossíveis. Os efeitos citotóxicos das DNA-topoisomerases parecem vir da estabilização do complexo catalítico intermediário que se forma entre a topoisomerase e o DNA, impedindo o relaxamento. Esta estabilização desencadeia um processo desconhecido que causa morte celular (SHEN et al., 1994).

2.4.4. Parede celular fúngica

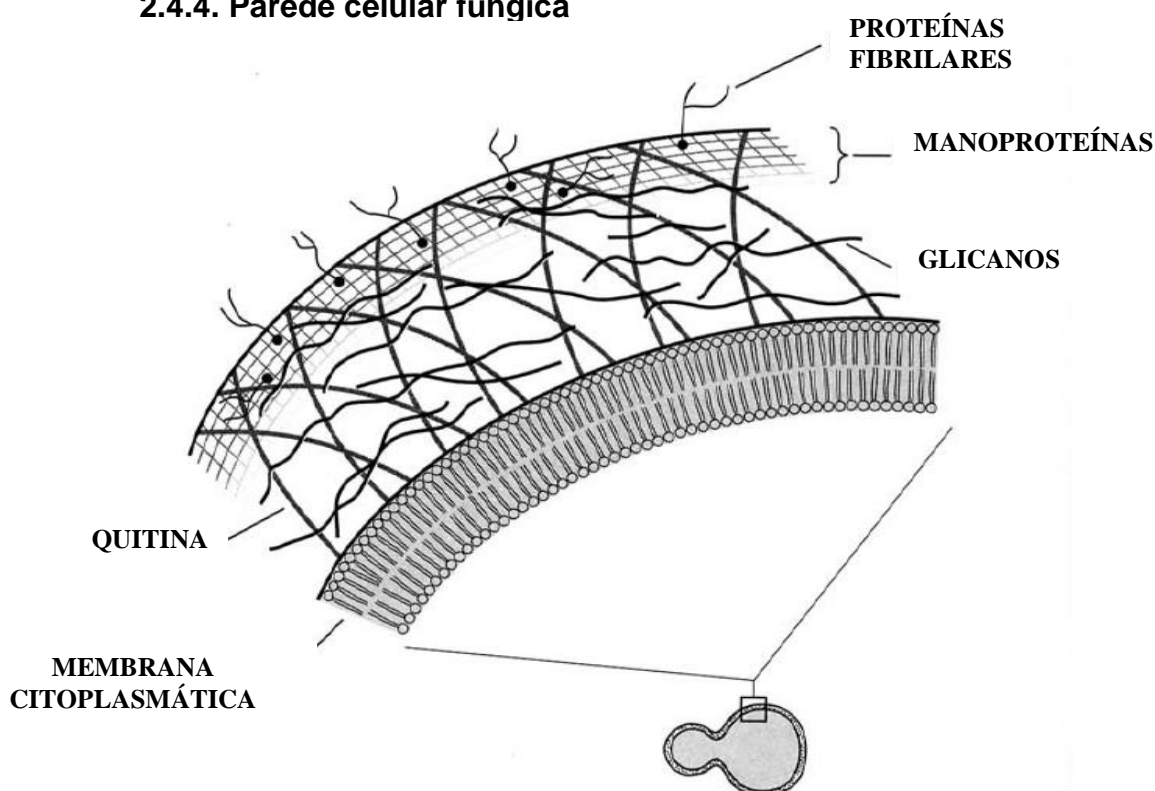


Figura 17 - Representação da parede celular fúngica. Fonte: <http://www.abev.com.br/controldeinfeccao/palestras/resistencia.pdf>

A parede celular não é somente uma cobertura externa inerte, mas também cumpre um papel dinâmico em todos os aspectos da fisiologia fúngica. Ela serve ao fungo como uma barreira protetora, evita sua ruptura osmótica e lhe confere forma, é essencial para o seu crescimento e viabilidade. É formada por muitos componentes macromoleculares, dentre eles β -glicanos, quitina, manoproteínas e outras proteínas. Três atividades enzimáticas têm mostrado ser essenciais para a formação da parede celular fúngica: 1,3- β -glicano sintase; 1,6- β -glicano sintase e quitina sintase que catalisam a formação de 1,3 e 1,6- β -glicanos e quitina respectivamente, alvos atrativos para o descobrimento de novos fármacos antifúngicos (FROST et al., 1995)

2.4.4.1 Inibidores da Parede Celular Fúngica – Bioensaio com Células Inteiras

A) Alterações morfológicas da Hifas

Muitos agentes antifúngicos que interferem com a parede celular fúngica, muitas vezes mostram malformações que se pode ver microscopicamente (GUNJI et al., 1983).

Segundo Fukushima et al., 1993 três compostos do fungo *Hemicarpenales acanthosporus* atuam como indutores de malformações das hifas de *Phytophthora capsici* e que dois dois deles, (+)-isoisoeoxidona e ophiobolina A, inibiam a formação a formação de 1,3- β -glicano (FUKUSHIMA et al., 1993). Além disso, a polioxina, inibidora da quitina sintase, causou engrossamento das hifas e outras deformações em *Piricularia oryzae* e *Mucor racemosus*. A aculeacina, inibidor da síntese de glicano em leveduras, causou diferentes malformações em várias leveduras e fungos filamentosos, entre eles, *Aspergillus fumigatus* (GUNJI et al., 1983)

B) Bioensaio com *Neurospora crassa*

Para realização do estudo do mecanismo de inibição da parede celular fúngica através *Neurospora crassa*, que se constitui um fungo filamentoso que quando está em presença de inibidores da parede celular fúngica e em certas

condições (37°C e meio osmótico) cresce como protoplasto (sem parede celular), as quais microscopicamente mostram malformações (hifas muito curtas e ramificadas) (SELITRENNIKOF, 1983).

Estes podem ser visualizadas macroscopicamente num ensaio de difusão em ágar inoculados com os esporos da *N. crassa*. Os halos produzidos pelos compostos que inibem a parede celular fúngica aparecem salpicados, enquanto que os antifúngicos que não interagem com a parede produzem zonas claras de inibição. Este ensaio evita o inconveniente de ter que olhar ao microscópio as colônias para detectar malformação de hifas (SELITRENNIKOF, 1983; FUKUDA, 1991).

C) Bioensaio do sorbitol

Protoplastos estabilizados com osmoprotetores têm sido importantes ferramentas bioquímicas para estudar a arquitetura da parede celular (SENTANDREU et al., 1983). Além disso, a estabilidade osmótica tem sido usado com *C. albicans* e outros fungos para estudar o mecanismo de ação de alguns antibióticos (YAMAGUCHI H. et al., 1982; VARONA et al., 1983).

Danos aos componentes essenciais da parede celular a partir de agentes antifúngicos (inibidores da síntese de parede celular) lisariam células na ausência de um osmoprotetor, porém as células continuarão a crescer se um estabilizador adequado estiver presente no meio. Positivos, são então, examinados através da microscopia para verificar alterações morfológicas. Células tratadas com drogas que interferem na síntese da parede celular freqüentemente têm características morfológicas distintas. As mudanças na morfologia podem sugerir possíveis alvos ou modo de ação dos inibidores de parede celular. A morfologia das células têm sido usada como um método para identificar novos antifúngicos inibidores de parede celular (ZACCHINO, 2003).

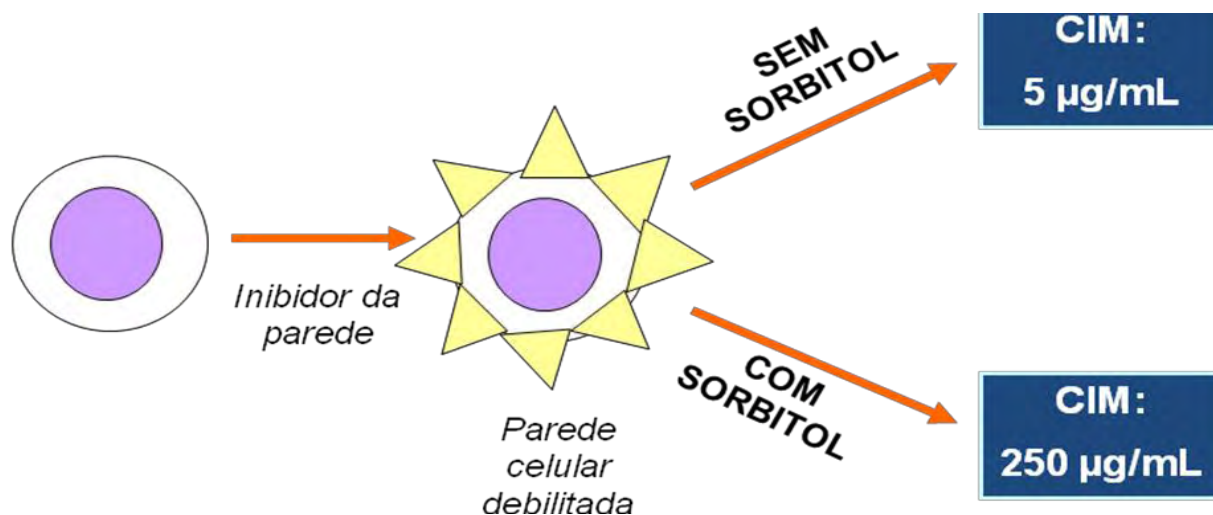


Figura 18 - Diagrama esquemático do bioensaio do sorbitol com valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM). Observar o aumento da CIM quando o fungo é tratado com um protetor osmótico. Fonte: ZACCHINO, 2001.

A combinação da proteção osmótica promovida pelo sorbitol e características morfológicas das células fúngicas constituem a base da proteção osmótica exercida pelo sorbitol e sua morfologia (SPAM) são ensaios que permitem avaliar agentes antifúngicos que atuam interferindo na formação da parede celular (FROST, et al., 1995).

2.4.4.2. Inibidores da Parede Celular Fúngica - Principais ensaios com enzimas

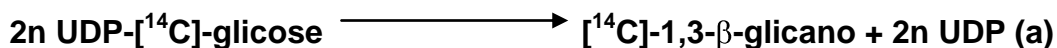
A) Ensaio de glicano sintase

1, 3- β -glicanos são os polímeros estruturais mais abundantes na parede fúngica. A biossíntese dos mesmos *in vivo* é catalisada pela enzima 1,3 β -glicano sintase, uma enzima localizada na membrana, utilizando UDP-glu como substrato da seguinte reação (SELITRENNIKOFF et al., 1992; FUKUSHIMA et al., 1993).



Os ensaios medem a incorporação de UDP-[¹⁴C]-glicose em [¹⁴C]-1,3-β-glicano, de acordo com o seguinte esquema:

1,3-β-glicano sintase



1,3-β-glicano sintase + composto a testar



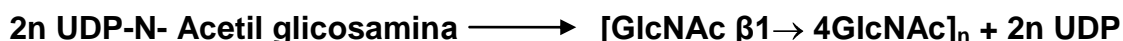
A UDP-[¹⁴C]-glicose (solúvel), não incorporada em cada uma das reações (a) e (b), é separada do [¹⁴C]-1,3-β-glicano (insolúvel) por cromatografia ou por filtração, usando filtros de nitrocelulose ou fibra de vidro. O [¹⁴C]-1,3-β-glicano será retido nos filtros enquanto a UDP-[¹⁴C]-glicose não incorporada passará ao filtrado. Quantifica-se o glicano retido nos filtros com um contador de cintilação em ambas reações (a) e (b). A proporção de glicano formado na segunda reação, com respeito à primeira, indica a proporção de enzimas inibidas pelo composto ensaiado. Atualmente, se usam *Candida albicans* e *Neurospora crassa* como fontes da enzima em ensaio de alta eficiência, realizados em placas “multiwell” com 96 poços (SELITRENIKOFF et. al., 1995; GHANNOUM et. al., 1999).

Embora já se tenham descoberto alguns compostos inibidores da 1,3-β-glicano sintase, poucos têm potencial para ser agentes terapêuticos úteis, já que alguns são tóxicos, pouco solúvel em água ou não absorvíveis por via oral (SELITRENIKOFF et al., 1995; GHANNOUM et al., 1999)

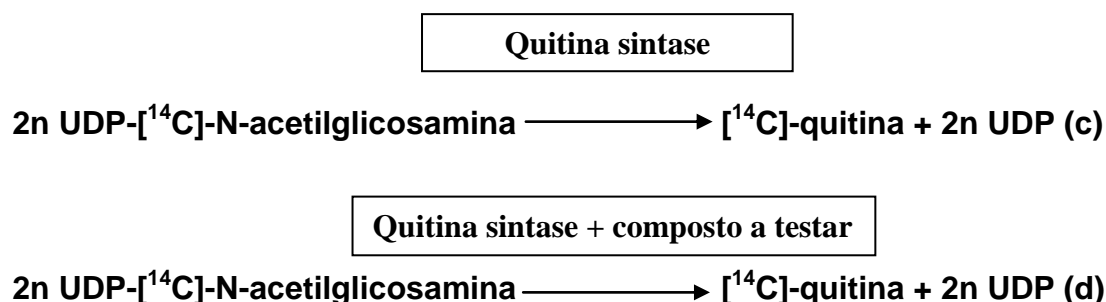
B) Ensaio da quitina sintase

A quitina é outro polímero da parede fúngica indispensável para sua viabilidade. Sua síntese *in vivo* é catalisada pela quitina sintase, que transfere N-acetilglicosamina para quitina.

Quitina sintase



Os ensaios medem a incorporação de UDP-[¹⁴C]-N-acetilglicosamina comercial em quitina marcada, de acordo com o seguinte esquema:



A UDP-[¹⁴C]-N-acetilglicosamina (solúvel) é separada da [¹⁴C]-quitina (insolúvel), da mesma forma que o ensaio de 1,3-β-glicano sintase. Quantifica-se a quitina insolúvel retida nos filtros em ambos os casos (c) e (d), com um contador de cintilação. O ensaio é semelhante ao da glicano sintase. A enzima se obtém de *Saccharomyces cerevisiae* (CABIB et. al., 1987)

2.5. Inibidores da Bomba de Efluxo

Bombas de efluxo são proteínas transmembrana envolvidas no transporte de substratos tóxicos, incluindo todas as classes de antibióticos clinicamente relevantes, do interior das células para o ambiente extracelular, diminuindo a concentração intracelular do substrato antimicrobiano e tornando a célula menos susceptível ao agente. Assim, a proteína de efluxo nas bactérias e fungos contribuem para a manutenção celular destes microrganismos no seu habitat (PIDDOCK, 2006). Modificadores da atividade antibiótica é um termo usado para substâncias que modulam ou mesmo revertem a resistência bacteriana a certos antibióticos, como é o caso de vários produtos naturais de origem vegetal (extratos e fitoconstituintes) que alteram a susceptibilidade microbiana a antibióticos por inibição de bombas de efluxo (GIBBONS, 2004).

Os genes das proteínas de efluxo e seus produtos estão presentes em todos os organismos, desde bactérias até fungos e eucariotos superiores (VAN BAMBEKE, et al., 2003). Sabe-se atualmente que as bombas de efluxo

contribuem para a resistência intrínseca e adquirida aos antibióticos, estimulando o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos.

Certos produtos naturais, como reserpina (alcalóide) têm sido capazes de bloquear bombas de efluxo e reduzir a CIM (Concentração Inibitória Mínima) da norfloxacino e outros antimicrobianos. Porém a concentração necessária de reserpina para inibir a bomba de efluxo é neurotóxica para os humanos (MARKHAN, et al. 1999). Outros inibidores do sistema de efluxo como verapamil, omeprazol, sertralina, siderófora e fenotiazinas também requerem concentrações acima do permitido clinicamente (KAATZ, et al., 2003; VAN BAMBEKE, et al., 2003). A clorpromazina (CPZ) e as trifluoperazina (TFP), pertencentes ao grupo das fenotiazinas, são compostas conhecidos por modificar a resistência à droga em células cancerosas (MICHACAK, et al., 2001).

A escassez de inibidores de efluxo efetivos na prática clínica leva a constante procura pela identificação e desenvolvimento de novos inibidores, tanto contra os sistemas de efluxo em microrganismos como em células tumorais resistentes a múltiplas drogas (DICKSON, et al., 2006; KAATZ, et al., 2003). A procura por novos agentes tem enfatizado os produtos naturais como moduladores da atividade antibiótica.

De acordo com essa perspectiva trabalhos têm caracterizado produtos naturais como modificadores da resistência por bomba de efluxo. Extratos de planta demonstraram atividade contra os sistemas de efluxo, são eles: *Rosmarinus officinalis* L. (OLUWATUYI, et al., 2004), *Lycopus europaeus* L. (GIBBONS, et al., 2003), *Jatropha elliptica* Pohl. (MARQUEZ, et al., 2005) *Dalea spinosa* A. Grey (BELOFSKY, et al., 2006). Ainda há poucas evidências em relação à atuação dos óleos essenciais de vegetais como agentes modificadores de resistência (CÉGIELA-CARLIOZ, et al., 2005).

2.6. Resistência aos antifúngicos

A resistência microbiana tem resultado em crescente morbidade e mortalidade, como também tem elevado os custos de saúde. O desenvolvimento de qualquer novo antimicrobiano vem sendo acompanhado

pele aparecimento de resistência bacteriana. A emergência de patógenos resistentes aos antimicrobianos é uma ameaça a esses avanços (MOELLERING JR., 2000).

Vários são os mecanismos pelos quais os microrganismos resistem aos efeitos dos antimicrobianos, entre eles incluem-se: alteração da estrutura molecular de antimicrobianos ou produção de enzimas que inativam a droga (por exemplo: β -lactamases ou enzimas modificadoras de aminoglicosídeos), alteração das proteínas ligantes da penicilina ou outros pontos-alvo nas paredes das células, alvos modificados da DNA-girase, mutações de permeabilidade e modificações ribossômicas (FILE JR., 2000).

Muitos fatores contribuem para o desenvolvimento da resistência bacteriana, porém um dos principais fatores é a exposição repetida, à concentração de antimicrobianos. Dados farmacológicos que descrevem a relação entre concentração da droga no soro e seus efeitos farmacológicos podem ser úteis em esquemas de tratamento que minimizam a probabilidade de exposição dos patógenos a níveis subletais de drogas (BURGESS, 2000; CHÁVEZ, 2001).

A resistência a antimicrobianos pode ser transferida entre bactérias pelos plasmídeos, transposons, ou pelos mecanismos de inserção seqüencial. Os plasmídeos transferíveis podem possuir genes que apresentam código de transferência em relação a uma ampla gama de drogas antimicrobianas. Assim, para os microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos, uma única transferência pode resultar na aquisição de vários determinantes de resistência microbiana. Maior número de cepas fúngicas está se tornando resistente aos fármacos antifúngicos atualmente utilizados. Outro problema é representado pelo aparecimento de novas cepas de fungos comensais que se tornaram patogênicos. Por conseguinte, estão sendo pesquisados novos e melhores agentes antifúngicos (RANG et al, 2004).

A farmacocinética e a farmacodinâmica estão inter-relacionadas. As propriedades farmacocinéticas de uma droga caracterizam o aumento e a queda das concentrações da droga no sangue e no tecido no decorrer do tempo. Os parâmetros farmacodinâmicos integram a atividade microbiológica e farmacocinética de uma droga anti-infecciosa, focalizando seus efeitos

biológicos, especialmente a inibição do crescimento e o extermínio de patógenos (BURGES, 2000).

Com frequência, as infecções fúngicas são de difícil tratamento, fato intrinsecamente relacionado à aquisição por parte de seus agentes etiológicos de resistência frente à ação de antifúngicos (ARAÚJO, 2004).

2.7. Produtos Naturais

A medicina aromática tem sua origem relatada no antigo Egito há mais de 6000 anos. Difundiu-se para a Grécia, Roma e depois para todo o mundo. Com o surgimento da ciência moderna, no século XIX, passou a ser dada maior importância para a produção de drogas em laboratórios, como foi o caso da penicilina, aspirina dentre outras. No entanto, o uso abusivo de muitas destas substâncias, acarretou efeitos indesejáveis como é o caso da dependência química e resistência bacteriana (LAVABRE, 1993).

Devido ao aumento da importância clínica dada às infecções fúngicas e o progressivo desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos é que um grande número de pesquisas científicas enfatizando propriedades antifúngicas de produtos vegetais tem sido avaliada (SOUZA et al., 2007; ATANDA; AKPAN; OLUWAFEMI, 2007).

Plantas da flora brasileira, particularmente plantas de uso popular no Brasil têm sido usada na medicina natural, pela população local, no tratamento de diversas doenças tropicais, incluindo esquistossomoses, leishmanioses, malária e infecções bacterianas e fúngicas (ALVES, et al., 1999). Entretanto, apesar da rica flora somente alguns dados, de poucas plantas, estão disponíveis, incluindo plantas nativas e exóticas (SARTORATTO, et al., 2004).

A medicina popular e o conhecimento sobre o uso de plantas são o resultado de influências culturais oriundas dos colonizadores europeus, indígenas e africanos. Baseando-se no uso popular das plantas, os cientistas podem direcionar a escolha das plantas que são estudadas. Através dessas pesquisas, podem validar o uso de plantas medicinais, facilitando o uso de medicamentos equivalentes ou complementares aos existentes no mercado,

com qualidade farmacológica comprovada (AMORIM et al., 2003; DORES et al., 2003).

As propriedades bacteriostáticas, bactericidas, fungistáticas e fungicidas a partir de produtos vegetais, tem sido comprovadas através de intensivas pesquisas em todo mundo (RASOOLI; REZAEI; ALLAMEH, 2006; SHARMA & TRIPATHI, 2006; SOUZA et al., 2007). Geralmente, são estudadas, avaliadas e confirmadas através de ensaios biológicos *in vitro* – testes de susceptibilidade ou sensibilidade. Estes ensaios são realizados por meio de técnicas padronizadas, incluindo os métodos de diluição em tubos e difusão em meio solido – disco, cavidade, cilindro (ALLEGRIINI; BOUCHBERG; MAILLOLS, 1973; CASALS, 1979; MIMS et al., 1995).

A atividade antimicrobiana de produtos naturais, como extratos, frações, óleos essenciais, é avaliada através da determinação de uma pequena quantidade da substância necessária para inibir o crescimento do microrganismo-teste, esse valor é conhecido como Concentração Inibitória Mínima (CIM). Um aspecto bastante relevante na determinação da CIM de extratos vegetais é a preocupação em relação aos aspectos toxicológicos, microbiológicos e legais pertinentes aos compostos naturais ou suas combinações (PINTO, et al., 2003)

Os óleos essenciais certamente constituem substâncias com atividades diversas, terapeuticamente e cientificamente comprovadas (SHUBINA *et.al.*, 1990), fato que tem gerado vários estudos relacionados com as propriedades farmacológicas destes compostos.

O Uso continuado de drogas anti-infecciosas resultou no aparecimento de vírus, fungos e bactérias resistentes aos medicamentos. Para superar o aumento de microrganismos patogênicos, uma variedade de plantas medicinais têm sido rastreadas e estudas mundialmente pelas suas propriedades antimicrobianas. O objetivo é encontrar novos e efetivos agentes antimicrobianos com novos modelos de ação. Os óleos essenciais derivam de plantas medicinais e têm sido estudados por se mostrarem eficazes contra bactéria, leveduras, fungos filamentosos e vírus (REICHLING, 2009).

Os óleos essenciais, essências vegetais ou óleos voláteis, são misturas de compostos orgânicos que apresentam como principais propriedades a

volatilidade, aroma intenso, imiscibilidade em água e solubilidade em solventes orgânicos (COSTA, 1975). O termo óleo essencial é empregado para designar líquidos oleosos voláteis, dotados de aroma forte quase sempre agradável, extraídos de plantas por alguns processos específicos, sendo mais freqüentemente a destilação por arraste em vapor d'água (CRAVEIRO et. al., 1981). Os óleos essenciais constituem os elementos voláteis contidos em muitos órgãos vegetais, e, estão relacionados com diversas funções necessárias à sobrevivência vegetal, exercendo papel fundamental na defesa contra microrganismos (SIQUI et al., 2000). Ainda, tem sido estabelecido cientificamente que cerca de 60% dos óleos essenciais possuem propriedades antibacterianas (BHAVANANI, 1992)

Durante investigações acerca da composição química dos óleos essenciais, descobriram-se hidrocarbonetos isoméricos de fórmula $C_{10}H_{16}$ designados de terpenos (ALLINGER et.al., 1978), constatando-se uma grande diversidade destes constituintes relacionados com atividades farmacológicas das mais diversas (COSTA, 1975).

Os óleos essenciais apresentam-se constituídos principalmente de monoterpenos, sesquiterpenos, fenil-propanóides, ésteres e outras substâncias de baixo peso molecular (CRAVEIRO & QUEIROZ, 1993). Os monoterpenos e sesquiterpenos dos óleos essenciais, que são formados por duas e três unidades isoprênicas respectivamente, são encontrados normalmente em sementes, frutos, cascas, folhas e flores de muitas espécies vegetais, e são considerados, em muitos casos, como responsáveis pelos odores de plantas aromáticas (CHAVEZ, 1991).

Recentemente, os constituintes voláteis, especialmente terpenos, tornaram-se importantes instrumentos na caracterização taxonômica de plantas de quase todos os grupos superiores. Os avanços em técnicas, como a cromatografia gasosa de alta resolução acoplada ao espectrômetro de massa, favorecem a análise dos óleos no tocante a sua composição química (FLAKE & TURNER, 1973; JOÃO et.al., 1985).

Alguns óleos essenciais foram obtidos a partir das partes aéreas de *Mentha piperita*, *Thymus vulgais*, *Aloysia triphylla* e *Origanum vulgare* e foram avaliados quanto à atividade antimicrobiana contra bactérias e contra a

levedura *Candida albicans* pelo método de bioautografia. De acordo com os resultados, a maioria dos óleos essenciais estudados foram efetivos contra *Enterococcus faecium* e *Salmonella choleraesuis*, *A. triphylla* e *O. basilicum*, apresentam inibição moderada contra *Staphylococcus aureus* enquanto apenas *A. tryphila* e *M. piperita* foram capazes de inibir completamente, a levedura *Candida albicans* (SARTORATTO, 2004).

Tendo em vista o potencial terapêutico apresentado pelos óleos essenciais e seus fitoconstituintes, o descobrimento de compostos de origem natural com mecanismo de ação seletivo, agregar-se-ão às alternativas promissoras na terapia antifúngica, num futuro próximo onde a utilização da terapia antimicrobiana sintética parece estar orientada para o uso combinado com produtos naturais.

2.8. Triagem das espécies vegetais, baseada em seu potencial medicinal

Os óleos essenciais têm sido usados de forma empírica para uma grande variedade de propósitos por muitos séculos. Nas últimas décadas em particular, muitos estudos *in vitro* foram realizados devido às suas atividades antibacterianas e antifúngicas. Muitos óleos essenciais possuem atividade antimicótica e podem ser usados como futuros agentes antifúngicos (DEANS et al., 1989).

***Cinnamomum zeylanicum* Blume**

Dentre os inúmeros grupamentos vegetais estudados, destaca-se a família Lauraceae, da qual faz parte a planta *Cinnamomum zeylanicum* Blume, conhecida como canela que é uma árvore mediana, odorífera, possui casca castanho claro (ALMEIDA, 1993).



Figura 19- *Cinnamomum zeylanicum* , conhecido como canela.
(Fonte: www.tecnocientista.info/nd.asp.cod=6313)

***C. zeylanicum* Blume conhecida popularmente como canela ou canela-do-Ceilão é originária de algumas regiões da Índia e do Ceilão (figura 19). Sua árvore é caracterizada por apresentar uma altura de 6-12m; casca pálida e sem pêlos. Suas folhas são simples, opostas e lanceoladas. Suas flores são pequenas, de cores branco-amareladas, formando pequenas panículas. E cultivada em países tropicais da América, em especial, Brasil. Sendo as cascas e folhas as partes utilizadas com fins terapêuticos (ALONSO, 1998),**

As partes mais úteis da canela são o córtex dessecado e o óleo. O óleo é obtido das folhas por destilação, por arraste a vapor. Os constituintes químicos mais encontrados são: acetato de eugenol, ácido cinâmico, aldeídos, cimeno, cineol (CARRICONDE et al., 1996; ALONSO, 1998). A composição química do óleo volátil de *Cinamomum zeylanicum* foi bastante estudado por GC e GC-MS, evidenciando a existência de hidrocarbonetos terpênicos e terpenóides oxigenados (JAYAPRAKASHA, 2002).

As atividades farmacológicas de *C. zeylanicum* B. estão fundamentalmente relacionadas aos seus óleos essenciais, que incluem: espasmolítica, antiinflamatória, antipirética, carminativa, antibacteriana, antifúngica, larvicida, sedante, anti-hipertensiva (CARRICONDE et al., 1996).

Uma considerável atividade antimicrobiana, produzida pelos óleos essenciais de *C. zeylanicum* B. tem sido evidenciada contra bactérias Gram-

positivas e Gram-negativas (CHAO; YOUNG; OBERG, 2000), vírus (MANCINI et al., 1999), fungos leveduriformes e filamentosos (BELEM, 2002; GAYOSO et al., 2004; MOREIRA, 2006).

***Citrus limonum* L.**

O gênero *Citrus* tem aproximadamente 16 espécies na família Rutaceae e são frequentemente cultivadas em regiões subtropicais. Os óleos essenciais de *Citrus* movimentam um amplo setor da produção mundial de óleos essenciais (TIRADO et al., 1995). A árvore atinge 4 metros de altura, com ramos curtos e muitos espinhos. As flores são brancas, reunidas em inflorescências com 2 a 20 unidades. Os frutos têm suco ácido, aromático, de cor amarelo-clara. A casca, também muito aromática, é verde-clara ou amarela quando o fruto amadurece. Originário da Índia ou da Malásia, o limão foi introduzido na Assíria e de lá passou para a Grécia e Roma. Depois se espalhou pelo norte da África e Europa antes do descobrimento da América. Os portugueses o trouxeram para o Brasil (LAVABRE, 1997).

A família *Rutaceae* é bastante conhecida por sua atividade antimicrobiana. O óleo essencial de *Citrus limonum*, assim como os óleos essenciais de *Eucalyptus globules*, *Melaleuca alternifolia*, *Mentha piperita*, *Origanum vulgare*, entre outros, são bastante conhecidos por esta propriedade (MOREIRA, 2005). O óleo essencial de *Citrus limonum* contém limoneno, citral, uma boa quantidade de pineno e citronelal (ALONSO, 1998; SELLAN, 2002).

Outras propriedades medicinais relacionadas ao *C. limonum*, estão relacionadas ao combate de ateromas (remove placas gordurosas das artérias), constipações, gripes, dores de garganta, acidez gástrica e úrica (alcaliniza o sangue), frieiras, caspas, cicatrizações, ajuda a manutenção de colágeno, hemoglobina, atua como anti-séptico entre outras (ALONSO, 1998; LAVABRE, 1997).



Figura 20 - *Citrus limonum*, conhecido como limoeiro.
Fonte: www.ethnopharmacologia.org/default.asp?page

Os constituintes voláteis dos óleos de citrus são uma mistura de monoterpeno (limoneno) e sesquiterpenos, aldeídos(citral), cetonas, álcool (linalol) e ésteres (BORGSMANN et al., 2004; SMITH et al., 2001; FLAMINI et al., 2007).

Embora os óleos essenciais de *Citrus limonum* estejam sendo revisados exaustivamente (BURT, 2004; INOUE TAKIZAWA & YAMAGUCHI, 2001; LANCIOTTI et al., 2004), suas atividades antimicrobianas têm sido relativamente pouco exploradas até o presente momento.

***Caryophyllus aromaticus* L.**

Caryophyllus aromaticus L. (*Eugenia caryophyllata*) conhecido popularmente como cravo da Índia e originário das ilhas Molucas (figura 21). É uma árvore verde em forma de coluna, que pode chegar a 15 metros de altura. Desenvolve-se melhor em lugares claros. A flor possui brotos de tonalidade marrom-avermelhadas. As folhas são pequenas e acinzentadas (CORREA, 1984; MAZZAFERA, 2003). Planta da família Myrtaceae que utiliza os botões florais secos, com fins terapêuticos.

É conhecida por suas propriedades medicinais afrodisíacas, anti-séptica, aperientes, bactericida, digestiva, excitante, repelente (inseto), sudorífico, tônico estimulante (ALONSO, 1998; SELLAN 2002).

A utilização de compostos naturais biologicamente ativos, ou princípios ativos oriundos do *Caryophyllus aromaticus* L. tem sido merecedor de destaque. O cineol, canfora, cariofileno, carvacrol, eugenol, citral, entre outros, são constituintes desta planta, comprovadamente fungitóxicos, conforme relatos em diversos artigos (OKIGBO e OGBONNAYA, 2006; SILVA et al., 2004; SCHWAN-STRADA, 2002).



Figura 21- *Caryophyllus aromaticus* L., conhecido como Cravo da Índia. (Fonte: http://aromacoresabor.com/img/cravo_da_india.jpg)

Seu óleo é usado na odontologia como analgésico e antiséptico, com comprovada ação bactericida (LAVABRE, 1992). Muitos trabalhos relatam outras ações além de bactericida, como fungicida, antiviral, inseticida (NASCIMENTO et al., 2000; BELEM, 2002; MOREIRA, 2006).

A busca por novas fontes terapêuticas alternativas (em especial os óleos essenciais) para tratamento de infecções por fungos do gênero *Aspergillus* e motivada não só pelas manifestações clínicas que estes provocam em indivíduos susceptíveis a sua colonização e infecção, mas também devido à toxicidade dos antifúngicos sintéticos disponíveis no mercado e

principalmente pelo aparecimento de cepas resistentes a essas drogas (CARMO, 2008).

***Cymbopogon citratus* DC Stapf.**

A planta *Cymbopogon citratus* DC Stapf., é conhecida popularmente como Capim limão, capim santo, capim cheiroso. Planta da família Poaceae. que utiliza os as folhas, o rizoma e as raízes frescas ou secas, com fins terapêuticos (ALONSO, 1998).

É conhecida por suas propriedades medicinais: analgésico suave, ansiolítico, antiálgico, antibacteriano, anticonvulsionante, antidiarréico, antidisentérico, antiespasmódico, anti-histérico, antipirético, anti-reumático, antitérmico, aperiente, aromatizante, estomacal, bactericida, béquico, carminativo, depurativo, digestivo, diurético, emenagogo, estimulante lácteo, expectorante, febrífugo, fungicida, hepato-protetor, miorelaxante, repelente de inseto, sedativo, sudorífera, vasodilatador (SELLAN 2002).

A percentagem dos principais constituintes do óleo essencial das folhas de *Cymbopogon citratus* revelou os seguintes compostos majoritários aldeídos, cetonas, ácidos, ésteres, sesquiterpenos e terpenos, citrol (mistura dos aldeídos neral e geraniol), saponinas álcoois (cimeropogonol e cimopogonol), alcalóides (cineol, geranial, geraniol, linalol, mentona, nerol, a e b-pineno, terpineol, terpinoleno, a-canforeno, limoneno, citronelal (KOKA, et al., 2009; ANDRADE et al., 2009)

A atividade antifúngica contra a espécie *C. acutatum* do óleo essencial de *Thymus vulgaris* e *Cymbopogon citratus*, além dos componentes majoritários destes óleos essenciais, timol e citral, foram avaliados mostrando que o timol 125mg/L e citral 300mg/L inibiram completamente o crescimento micelial durante sete dias. Além do mais, a germinação dos esporos foram afetadas 100% com o óleo de *Cymbopogon citratus* de 350 e 400mg/, timol de 100 a 125mg/L e citral de 300 mg/L, inibiu completamente a esporulação dos fungos, enquanto que timol a 350mg/L afetou bem menos (ALZATE et al., 2009)



Figura 22- *Cymbopogon citratus* DC Stapf., conhecido como capim santo. (Fonte: websmed.portoalegre.rs.gov.br/emily.html)

Segundo (IRKIN, 2009) O óleo essencial de *Cymbopogon citratus* L. é conhecido como tendo propriedades terapêuticas e antibacterianas, sendo sua atividade antifúngica objeto de renovado interesse. Excelente atividade antifúngica do óleo essencial de *C. citratus* in vitro, foi observada na inibição do crescimento e sobrevivência de alguns fungos filamentosos, como: *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum* e *Penicillium roquefortii* e leveduriformes, como: *Candida albicans*, *Candida oleophila*, *Hansenula anomala*, *Saccharomyces cerevisiae*.

Também foi testada a atividade do óleo essencial de *C. citratus* in vitro contra *A. flavus*, *A. fumigatus*, *Alternaria alternata*, *Penicillium citrinum* e *Trichoderma harzianum*, mostrando redução nos esporos de germinação deste fungos. O *Aspergillus niger* foi a cepa mais sensível aos efeitos deste óleo (MAHANTA et al., 2007)

Também foram estudados os efeitos deste óleo essencial de *C. citratus* L. sobre o crescimento, morfogênese e produção de aflatoxina da cepa de *A. flavus* ML2, sendo o crescimento do *A. flavus*, completamente inibido por este óleo (HELLAL, 2007).

***Eucalyptus globulus* L.**

Eucalyptus globulus L. foi a primeira espécie de *Eucalyptus* introduzida no Brasil, hoje outras espécies congêneres são cultivadas em muitas regiões de clima tropical e subtropical (LORENZI, 2002).

É largamente produzido na Espanha, Portugal e China por suas diferentes propriedades medicinais (LAVABRE, 2001). Planta da família *Myrtaceae*, conhecida popularmente como eucalipto, eucalipto-limão, eucalipto-comum, combate doença de chagas, úlceras e outras enfermidades do tecido e da pele (ROCHA, 2007)



Figura 23 - *Eucalyptus globulus* L., conhecido como eucalipto.
(Fonte: www.forestis.pt/forestis/multimedia)

Existem aproximadamente 300 variedades de eucalipto. O óleo essencial usado na aromaterapia é destilado da árvore gomífera tão apreciada pelos australianos, o *Eucalyptus globulus*, embora haja cerca de 15 dentre as centenas de espécies que fornecem um óleo de boa qualidade. A árvore foi introduzida na Europa no século XIX como uma espécie ornamental, mas

desenvolveu certas características que não figuram em seu local de origem (DAVIS et al., 1996).

É uma planta que se destacando no reino vegetal pela sua importância, tanto do ponto de vista de suas virtudes medicinais, como do ponto de vista econômico (CRUZ, 1965).

As principais espécies de *Eucalyptus* cultivadas no Brasil para a produção de óleo essencial são: *E. citriodora*, *E. globulus* e o *E. staigeriana* (VITTI; BRITTO, 2003). Óleos comerciais são destinados à fabricação de produtos farmacêuticos inalantes, estimulantes da secreção nasal, produtos de higiene bucal, ou simplesmente, como função de dar sabor e aroma aos medicamentos. Os óleos também estão presentes nas indústrias de perfumes, mas são mais usados nos produtos de limpeza, como sabão e desinfetante (ROCHA, 2007).

***Melissa officinalis* L**

A *Melissa officinalis* L., também chamada de erva-cidreira-verdadeira, pertencente à família *Lamiaceae*, é perene, arbustiva, podendo atingir de 30 a 100 cm de altura, caule quadrangular, herbáceo, ereto, piloso e aromático, ramificando-se a partir da base formando touceiras. As folhas são verde-escura na parte superior e verde-clara na parte inferior, com 5 a 8 cm de comprimento, são pecioladas, opostas, ovais, pilosas e com nervuras bem salientes. As flores, quando surgem são brancas ou amareladas, reunidas em fascículos de 2 a 6 unidades com florescimento de outubro a março na Europa (HERTWIG, 1986).

A parte utilizada da planta é o caule folhado e florido, usado no tratamento da insônia, enxaqueca, tensão nervosa, neurastemia, ansiedade, como antiespasmódica, estimulante do chacra cardíaco (ALONSON, 1998). A planta possui atividade sedativa, tendo um papel importante no controle das emoções. É tranqüilizante e também indutora do sono. O citral, seu constituinte majoritário, é responsável pela ação relaxante (SADRAEI et al., 2003). O óleo essencial de *M. officinalis* produzida no nordeste brasileiro tem atividade antitumoral em trabalho realizado por Sousa et al. (2004).



Figura 24 - *Melissa officinalis* L., conhecida como erva cidreira. (Fonte: <http://ipt.olhares.com/data/big/153/1533526.jpg>)

Foram avaliadas as atividades antimicrobianas dos óleos de Lavanda e erva-cidreira (*Melissa officinalis* L), dentre outros. A análise dos óleos por GC-FID revelaram que os maiores constituintes destes óleos foram linalol (23,1%), acetato de linalol (23,1%), citronelal (23,8%) e geraniol (11,6%) e na erva-cidreira, α -pineno (24,4%). A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais avaliaram a sobrevivência e crescimento de alguns microrganismos potencialmente perigosos. A *Escherichia coli* foi o microrganismo mais sensível dentre os testados (ROMEIO, 2008)

O possível papel dos óleos essenciais de algumas plantas, dentre elas a *Melissa officinalis* L., assim como o modo de ação destes produtos naturais é discutido no que diz respeito à prevenção e tratamento do câncer, doenças cardiovasculares, incluindo aterosclerose e da trombose, bem como a sua bioatividade como antibacteriana, antiviral antioxidantes e agentes anti-diabéticos (EDRIS, 2007).

***Laurus nobilis* L.**

A planta *Laurus nobilis* L., conhecido como loureiro, é uma árvore perenifólia com a copa arredondada, originária do mediterrâneo. Possui folhas simples, coriáceas, verde-escuras e aromáticas. Apresenta flores masculinas e femininas separadas na mesma planta, axilares e de coloração amarelada.

Produz frutos tipo drupa, globosos, suculentos, arroxeados e com pequena semente (LORENZI et al., 2003).

A planta apresenta importância econômica principalmente pela produção de folhas que são utilizadas como aromatizantes na culinária. (LORENZI et al., 2003). A folha é a parte da planta utilizada com fins terapêuticos (PANIZZA, 2004; LORENZI, 2002).



Figura 25 - *Laurus nobilis* L., conhecido como louro.
(Fonte: www.receitamaneira.com.br/.../folha-de-louro)

O seu óleo essencial possui os seguintes fitoconstituintes: geraniol, cineol, eugenol, linalol, terpineno, pineno, costunolide e deacetillaurebiolide, taninos, açúcares e pectinas (WYK, 2004).

Esta planta também foi estudada por Kaileh (2007) quando fez uma triagem de plantas medicinais indígenas com potente atividade antiinflamatória e por suas atividades anti-tumorais citotóxicas. As atividades biológicas e fisicoquímicas de *L. nobilis* tem sido extensamente estudadas. Suas folhas e frutos acalmam problemas estomacais e suas atividades narcóticas, estimulantes e aromáticas também têm sido reportadas (BUTTERY, et al.,

1974). As atividades anticonvulsivantes e anti-epilépticas do extrato de *L. nobilis* também têm sido confirmadas (SAYYAH, 2002). As folhas de *L. nobilis* são tradicionalmente usadas oralmente no tratamento dos sintomas de problemas gastrointestinais, como dores epigástricas, flatulências e má digestão. Recentes estudos sobre essa planta têm mostrado que as suas folhas aumentam a secreção do suco gástrico e tratam desordens digestivas, sendo os maiores responsáveis por essas atividades seus fitoconstituintes como os sesquiterpenos (MATSUDA et al., 2002). A atividade anti-oxidante das folhas de *L. nobilis* também tem sido investigada (SIMIC, 2003).

***Origanum majorana* L.**

Planta da família *Labiatae*, conhecida como manjerona< eucalipto, eucalipto-limão, eucalipto-comum, nativa do Oriente Médio. Aclimatada e cultivada no Sul da Europa. Atualmente cresce em jardins domésticos na América Tropical e Ilhas Ocidentais (MORTON, 1981). Na Idade Média, esta erva foi introduzida da Europa, onde, em forma de saches. Manjeronas silvestres estão presentes por toda a paisagem da Grécia, e a impregnam com o seu perfume.

A parte usada da planta é a folha e sumidade florida. É conhecida por suas propriedades aromáticas e pelas propriedades afrodisíaca, digestiva, expectorante, hidratante da pele, revigorante do cabelo (ALONSON, 1998). O óleo essencial é rico em terpenol, timol, carvacrol e hidrocarbonetos terpênicos, Ácidos fenólicos: caféico, clorogênico, rosmarínico; flavonóides: derivados do apigenol, luteolol, cenferol, diosmetol; hidroquinona (ALONSO, 1998; BOZIN et al., 2006).

Embora vários estudos tenham sido conduzidos no tocante às propriedades antibacterianas e antifúngicas dos óleos essências das plantas, assim como de seus extratos (BURT, 2004; VÁGI, et al., 2005), apenas poucos estudos sobre as atividades dos óleos essenciais sobre os alimentos são reportados na literatura (HOLLEY & PATEL, 2005).



Figura 26 - *Origanum majorana* L., conhecido como manjerona.
(Fonte: www.klickeducacao.com.br/.../Ma/11812/4170.jpg)

Dentre os vários óleos essenciais que podem ser usados como agentes antimicrobianos, o óleo de manjerana (*O. majorana* L.) pode ter o maior potencial para uso na aplicação industrial (BARATTA et al., 1998; DEANS & SVOBODA, 1990; DAFERERA et al., 2000; EZZEDDINE et al., 2001).

Segundo Oliveira et al., (2009), foi demonstrada a atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *O. vulgare* L. e *O. majorana* L. contra *Staphylococcus aureus*, *S. coagulase negativa*, *Enterobacter spp.*, *Proteus spp.*, *Acinetobacter spp.*, *Klebsiella spp.* isoladas de pacientes com conjuntivite. Os resultados mostraram um efeito inibitório proeminente de ambos os óleos essenciais em todas as cepas bacterianas. Observaram-se grandes zonas de inibição do crescimento bacteriano (15-32mm). A concentração inibitória mínima (MIC) entre 5-20 m μ L / mL e 2,5-10 m μ / mL para os óleos essenciais de *O. vulgare* e *O. majorana*, respectivamente. O MIC foi capaz de causar efeito inibitório significate ($P < 0,05$) sobre a viabilidade de células de *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.* e *S. aureus* uma total eliminação do inóculo bacteriano em um tempo máximo de 24 h de exposição. Estes resultados mostraram a eficácia antibacteriana de *O. vulgare* e *O. majorana* óleos essenciais e apoiou a possibilidade de seu uso como fontes de compostos antimicrobianos.

***Origanum vulgare* L.**

Originária das regiões da Ásia e Europa mediterrânea, a planta *Origanum vulgare* L é uma erva perene, cuja altura pode variar de 25 a 80 cm. Faz parte da família Labiateae, cuja parte usada é a planta florida, sendo bastante explorada por suas atividades antimicrobianas, contém uma grande variedade de compostos como carvacrol, timol e grandes variedades de hidrocarbonetos monoterpênicos (limoneno, terpineno, cariofileno, etc) e álcoois monoterpênicos(4-terpineol). Foi reportado ao óleo essencial de *O. vulgare*, atividade antimicrobiana com grande potencial contra 10 cepas de bactérias, 15 fungos e espécies de leveduras (SAHIN, 2004).

Estudos têm mostrado que espécies de *Origanum* possuem propriedades antimicrobianas e antioxidantes, e enfatizam que as suas propriedades biológicas podem variar de acordo com a técnica de cultivo, origem, estágio vegetativo e a estação de coleta do material vegetal (MILOS et al., 2000).

Ao abordar os relatos da literatura, nota-se que o orégano (*Origanum vulgare* L.), tem apresentado resultados de destaque como agente hábil de inibição de bactérias e fungos, principalmente em alimentos (ALIGIANIS, et al., 2001). Devido à sua ampla variedade de características químicas e de aroma, diferentes espécies e biótipos de *Origanum* são amplamente utilizados como insumos na indústria farmacêutica e cosmética, erva culinária, flavorizante de alimentos, em bebidas alcoólicas e em perfumaria na obtenção de fragrâncias picantes (SILVROPOULOU et al, 1996; NOVACK et I., 2000; ALIGIANIS et al., 2001).

A atividade antibacteriana e antioxidante dos óleos essenciais isolados de *Thymbra capitata* e *Origanum vulgare* L. mostram que três componentes principais constituem 70% do óleo, isto é, timol (33%), γ -terpineno (26%) e p-cimeno (11%) (FALEIRO, 2005).



Figura 27 - *Origanum vulgare* L., conhecido como orégano. (Fonte: www.about-garden.com/fe/en/0001-origanum)

A atividade antifúngica do óleo essencial de orégano (*O. vulgare* L.), dentre outros óleos essenciais, foi testada contra o crescimento micelial de *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus parasiticus* utilizando ágar batata dextrose (PDA) *in vitro*. O óleo essencial de *O. vulgare* foi o mais efetivo sobre o crescimento micelial de *A. alternata* em comparação com outros dois fungos. O óleo de orégano foi o mais ativo contra todos os fungos testados (SAGLAM, 2009).

Excelente atividade antibacterida foi obtida ao testar o *O. vulgare* contra bactérias Gram-positivas (SAEED, 2009).

Tampieri et al., 2003 avaliaram *in vitro* a atividade de inibição de alguns óleos essenciais e seus principais constituintes contra cepas de *Candida albicans*. Dezesesseis óleos essenciais e quarenta e dois componentes puros (álcoois, aldeídos, cetonas, fenóis e hidrocarbonetos), foram testados. Os óleos essenciais de *Origanum vulgare*, *Satureja montana*, *Mentha piperita*, *Cinnamomum verum*, *Cymbopogon flexuosus* mostraram atividade inibitória máxima (CIM = 500 ppm) após 7 dias.

Infecções oportunistas causadas por leveduras têm sido caracterizadas como doenças emergentes em todo o mundo e este fenômeno tem levado ao desenvolvimento de novos produtos capazes de inibir a sobrevivência de seus agentes etiológicos.

Fitoconstituintes: alfa-pineno, citral e eugenol

O conteúdo dos óleos essenciais em diferentes espécies é influenciado pelo material genético, condições de cultura e meio ambiente (CHARLES, 1990) e finalmente, pelo processo de coleta e pós-coleta (PAAKKONEN, 1990). A atividade de muitos óleos essenciais é dada pelos seus componentes majoritários.

A presença de substâncias químicas como compostos fenólicos, cumarinas, terpenóides, flavonóides, alcalóides, glicosídeos, taninos e quinonas, que são encontradas como metabólitos secundários dos vegetais podem desencadear efeitos benéficos ou maléficos sobre outros vegetais ou demais organismos (RODRIGUES e LOPES, 2001).

As tradicionais drogas antifúngicas têm variáveis efeitos adversos e a resistência fúngica está cada vez mais comum. Então, agentes antifúngicos mais potentes e mais seguros precisam ser descobertos (RANG et al., 1999; WU et al., 2004).

Este estudo, também avaliou o perfil de sensibilidade de fungos potencialmente causadores de infecções oportunistas frente aos fitoconstituintes alfa-pineno, citral e eugenol.

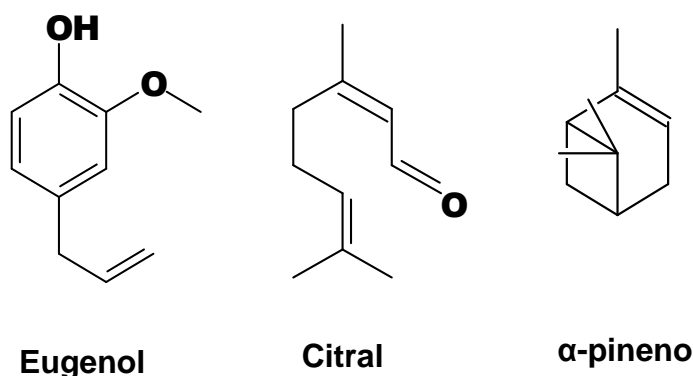


Figura 28- Estrutura química dos fitoconstituintes.

Fonte: http://pt.wikipedia.org/wiki/%C3%93leo_essencial

A validação da utilização de plantas medicinais depende da investigação sistemática realizada sob vários aspectos. Dentre esses aspectos podemos citar o aspecto químico, farmacológico e microbiológico, que somados a outros irão resultar no medicamento fitoterático (ROJAS et al., 1992; NIERO et al., 2003).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade antifúngica dos óleos essenciais e fitoconstituintes obtidos de plantas medicinais referenciadas pela medicina popular.

3.2 Objetivos Específicos

- **Fazer uma triagem dos óleos essenciais e fitoconstituintes de maior relevância na literatura que expressa atividade antifúngica;**
- **Realizar ensaios que permitem a elucidação dos possíveis mecanismos de ação;**
- **Determinar a Concentração Inibitória (CIM) e Fungicida Mínima (CFM) dos óleos essenciais e fitoconstituintes obtidos destas espécies de plantas;**
- **Verificar sensibilidade e resistência das cepas aos medicamentos antifúngicos, assim como aos óleos essenciais e fitoconstituintes estudados, através de antifungigrama;**
- **Verificar alterações das hifas, perda de pigmentação, perda de citoplasma, através da microscopia de luz, para selecionar quais óleos essenciais tem atividade antifúngica;**
- **Verificar a cinética de crescimento fúngico frente aos óleos essenciais e fitoconstituintes, avaliando a susceptibilidade dos microrganismos testados;**
- **Realizar bioensaio com Sorbitol para verificar inibição de parede celular fúngica;**
- **Verificar a existência e influencia da bomba de efluxo no mecanismo de resistência dos fungos;**
- **Propor possíveis mecanismos de ação antifúngica dos óleos essenciais, das espécies de plantas que mostram promissora atividade antifúngica.**

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAIS

4.1.1 Óleos essenciais e fitoconstituintes:

Várias abordagens para a seleção de espécies vegetais têm sido apresentadas na literatura (MACIEL et al., 2002). O processo de seleção das plantas foi baseado na atividade antifúngica destas, seguindo os bioensaios anteriormente realizados por pesquisadores do laboratório, tendo como fator determinante a disponibilidade dos óleos essenciais e seus respectivos fitoconstituintes. Os óleos essenciais foram adquiridos na Ferquima Indústria e Comércio Ltda./ São Paulo e os fitoconstituintes foram cedidos pela Prof^a. Dr^a. Dionezine de Fátima Navarro do Departamento de Farmácia da Universidade Estadual de Ponta Grossa/Paraná e pelo projeto Genoma do Brasil Indústria e Comércio Ltda/Paraná. Os óleos essenciais testados foram:

- *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae) - Canela;
- *Citrus limonum* (Rutaceae) – Limão;
- *Caryophyllus aromaticus* L. (Myrtaceae) – Cravo;
- *Cymbopogon citratus* D.C. Stapf. (Poaceae) - Capim-santo;
- *Eucalypto globosus* Labill (Myrtaceae) – Eucalipto;
- *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) - Erva cidreira;
- *Laurus nobilis* L. (Lauraceae) – Louro;
- *Origanum majorana* L. (Labiatae) – Majorana;
- *Origanum vulgare* L. (Labiatae) – Orégano.

E os seguintes fitoconstituintes (encontrados em maior proporção nos óleos essenciais estudados) e disponíveis no Laboratório de Micologia (LM) do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB):

- Alfa- pineno;
- Citral;
- Eugenol

4.1.2. Espécies fúngicas estudadas

As cepas estudadas foram obtidas a partir de amostras biológicas coletadas no Laboratório de Micologia (LM) ou de coleções adquiridas da American Type Culture Collection (ATCC).

- *Candida albicans* (ATCC7645);
- *Candida albicans* (ATCC90028);
- *Candida albicans* (LM142);
- *Candida tropicalis* (LM 14);
- *Candida krusei* (ATCC6252);
- *Candida krusei* (ATCC6258);
- *Candida krusei* (LM 09);
- *Candida krusei* (LM 08);
- *Cryptococcus neoformans* (LM10);
- *Cryptococcus neoformans* (FGF5);
- *Trichophyton rubrum* (ATCC 64T);
- *Trichophyton rubrum* (ATCC 28184);
- *Trichophyton rubrum* (LM 78T);
- *Trichophyton rubrum* (LM 800);
- *Trichophyton mentagrophytes* (LM 640);
- *Microsporum gypseum* (ATCC 184);
- *Microsporum canis* (LM 36);
- *Cladosporium herbarium* (ATCC 26362);
- *Aspergillus flavus* (LM 02);
- *Aspergillus fumigatus* (IPP 21);
- *Aspergillus fumigatus* (ATCC 40640)

4.1.3. Meio de cultura e matéria-prima utilizados

Nos ensaios de viabilidade e susceptibilidade fúngica foi utilizado o meio Agar Sabouraud dextrose – ASD (Difco Laboratórios Ltda), preparado conforme instruções do fabricante. No levantamento de hipóteses para a determinação do mecanismo de ação dos óleos essenciais foi utilizado sorbitol 70%, lote:0700703, obtido no Goiolab Biagnóstica Produtos para Laboratório Ltda. /PB. Para avaliar a influência da bomba de efluxo na resistência fúngica, foi utilizada a clorpromazina do laboratório Sigma-Aldrich, cedido pelo Prof. Siqueira Júnior, do Departamento de Biologia Molecular/UFPB.

4.1.4. Antifúngicos sintéticos padrão

Para controle da avaliação da atividade antifúngica dos produtos naturais e sintéticos foram utilizados como padrão 5-fluorocitosina (5-FC) 1 μ g/mL; nistatina (NY) 100 U.I; fluconazol (FLU) 25 μ g/mL; cetoconazol (KET) 50 μ g/mL - obtidos no Centro de Controle e Produtos para Diagnóstico – CECON/SP.

4.2. METODOLOGIA

4.2.1. Preparo dos inóculos de fungos leveduriformes

A partir das cepas selecionadas e de repiques recentes, o inóculo foi preparado em solução fisiológica a 1% e esterilizada, contendo 1% de Tween 80 (CHIN LÜ, 1991; CASALS, 1979; ODDS, 1980; CLEELAND & SQUIRES, 1991).

A metodologia para a obtenção dos inóculos foi descrita por Sartori, (2003). Os inóculos foram preparados a partir das cepas de: *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Cryptococcus neoformans*. Os fungos leveduriformes foram semeados em tubos com ágar sabouraud dextrosado (Merck) inclinados, pelo menos duas vezes para assegurar pureza e viabilidade das culturas jovens e incubados a 37°C por 24 a 48 horas. Após incubação,

transferiu-se entre 4 a 5 colônias de levedura com alça esterilizada para um tubo de ensaio 16x150mm, contendo salina a 0,9%.

A suspensão foi ajustada por comparação a um tubo padrão preparado por espectrofotometria em comprimento de onda de 530nm para obtenção de 95% de transmitância. Como branco, foi utilizado água destilada estéril, ajustando-se a transmitância para 100%. A concentração final obtida foi de aproximadamente 10^5 a 10^6 células por mililitro. A confirmação da concentração final foi feita através de contagem dos microrganismos em câmara de Neubauer. Os inóculos foram armazenados sob refrigeração de acordo com a espécie de fungo (CASALS, 1979; FROMTLING et al., 1983; DRUTZ, 1987; ODDS, 1989; HADACEK e GREGER, 2000; NCCLS, 2002)

4.2.2. Preparo dos inóculos de fungos filamentosos

A metodologia para a obtenção dos inóculos foi descrita por Sartori, (2003). Os inóculos filamentosos foram preparados com *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, *Mycrosporium canis*, *M. gypseum*, *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes*, *Cladosporium herbarium*.

Os fungos filamentosos foram semeados em tubo de ágar Saboraud dextrose, incubando-se a temperatura ambiente de 12-14 dias. A contagem dos conídios foi realizada em câmara de Newbauer. A seguir, foram feitas as diluições necessárias para se alcançar a concentração desejada entre 10^5 e 10^6 células/mL (CASALS, 1979; FROMTLING et al., 1983; DRUTZ, 1987; ODDS, 1989; HADACEK e GREGER, 2000; NCCLS, 2002). Após obtenção e padronização dos inóculos, estes foram armazenados sob refrigeração de acordo com a espécie e requerimento de cada fungo filamentoso.

4.2.3. Avaliação da atividade antifúngica

Os ensaios para avaliação de atividade antifúngica foram realizados pela técnica de difusão em meio sólido, Agar Sabouraud dextrose, tanto para a triagem quanto para a determinação da concentração inibitória mínima – CIM. Esses ensaios foram realizados conforme protocolo de Bauer, Kirby e Turck

(1966); Holt (1975); Cleeland e Squires (1991); Hadacek e Greger (2000) e NCCLS (2000). O meio de cultura foi prepadado conforme instruções dos produtores, distribuídos em balões de vidro de 250mL e autoclavados a 121°C por 15 minutos (BAWER et al., 1996; CLEELAND e SQUIRES, 1991; HADECK e GREGER, 2000; NCCLS, 2000).

4.2.4. Triagem microbiológica

Para avaliação da atividade antifúngica, realizou-se uma triagem dos óleos essenciais e fitoconstituintes, pela técnica de difusão em meio sólido com discos estéreis (Dispo-Petri90x15mm) (QUIROGA et al., 2001).

Foi depositado 1mL da suspensão de cada cepa em solução fisiológica à 0,85%. Em seguida, foi adicionado 21mL do meio sólido fundido a 45-50 °C. Após solidificação, foram depositados os discos de papel de filtro embebidos com 20µL do óleo essencial e/ou seus fitoconstituintes (HADACECK, GREGER, 2000). Os ensaios foram incubados a temperatura ambiente de 37 °C por 24-48 horas para as leveduras; a temperatura ambiente (25-30°C) durante 7-14 dias para os fungos filamentosos. Foram feitos controles para os microrganismos e com antifúngicos padrões.

Cada ensaio foi realizado em duplicata e o resultado expresso pela média dos halos de inibição de crescimento em volta dos discos de papel. Foi considerado ativo o produto que inibiu o crescimento dos microrganismos, produzindo halos de inibição igual ou superior a 10mm de diâmetro (WONG-LEUNG, 1988; NAQVI et al., 1991; SAKAR; TAMER; TOKUR, 1988; ALVES et al., 2000). O National Commitee for Clinical laboratory Standards (NCCLS) adota o disco de difusão como metodologia de referência, utilizada até os dias atuais.

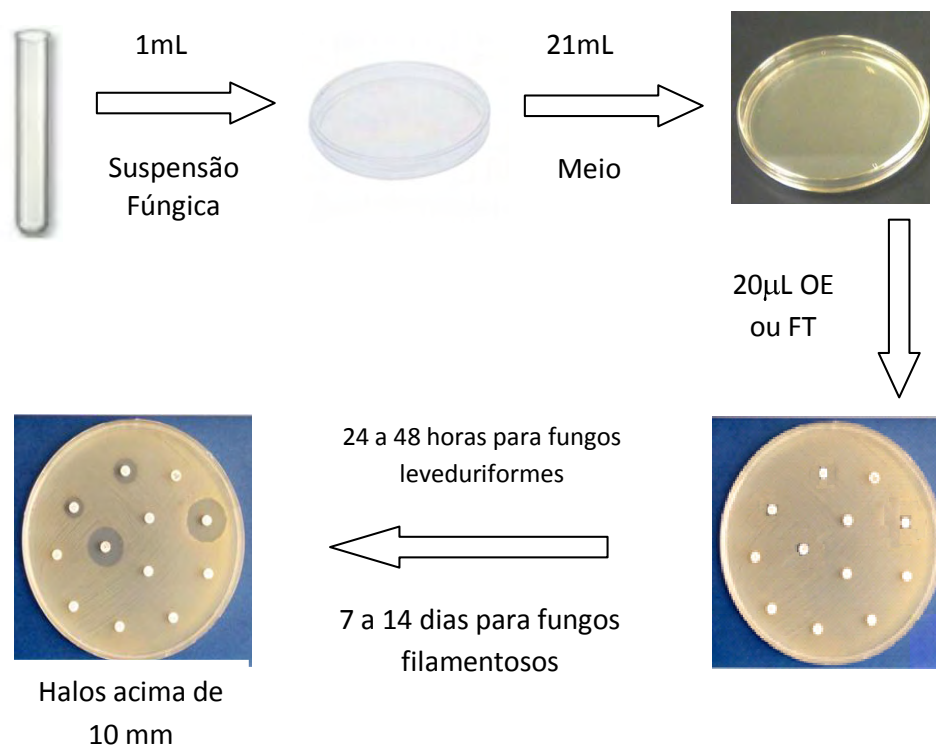


Figura 29 – Esquema da triagem inicial dos óleos essenciais e fitoconstituintes. OE: óleos essenciais testados. FT: Fitoconstituintes.

4.2.5. Ensaio de atividades com antifúngicos sintéticos padrões (Antifungigrama)

Segundo Jianhua & Hai (2008) a incidência de infecções fúngicas profundas têm aumentado, mas a variedade de medicamentos antifúngicos, utilizados na clínica, é limitada.

Todos os antifúngicos padrões, em discos, foram adquiridos na CECON/SP Ltda. Os mesmos, foram utilizados para realização do antifungigrama, servindo como controle da atividade antifúngica para compostos sintéticos e naturais.

Os discos contendo antifúngicos padrões foram colocados manualmente sobre a superfície do meio, com auxílio de um par de pinças estéreis. Os discos foram colocados, aproximadamente, 20 mm um do outro e a 15 mm da parede da placa para evitar que as zonas de inibição de crescimento se sobreponham ou se estendam até a margem do Agar. Cada disco deve ser pressionado suavemente sobre a superfície do ágar com a

ponta da pinça para assegurar um contato firme com o meio. É importante ressaltar que os discos não devem ser removidos após sua colocação (KONEMAN et al., 1993). Após preparação adequada, as placas para a prova de sensibilidades devem ser colocadas invertidas, em uma estufa, de modo que a umidade ou condensação que se acumula na tampa não caia sobre a superfície do ágar. Ainda segundo Koneman (1993), realiza-se a medição do diâmetro da zona de inibição do crescimento ao redor de cada disco, com auxílio de uma régua ou gabarito especialmente preparado, considerando-se aproximação em milímetros.

Tabela 1- Antifúngicos sintéticos de referência , em discos da CECONSP

Antifúngico	símbolo	Conc./ Discos	Halos de Inibição	Interpretação
5-Fluorocitocina	5- FC1	1 μ g	>20	Sensível
			20-10	Intermediário
			<10	Resistente
Nistatina	NY	100 U.I.	>10	Sensível
			\leq 10	Resistente
Fluconazol	FLU	25 μ g	>19	Sensível
			19-14	Intermediário
			\leq 14	Resistente
Cetoconazol	KET	50 μ g	>20	Sensível
			20-10	Intermediário
			\leq 10	Resistente
Para o <i>Aspergillus fumigatus</i>				
5-Fluorocitocina	5- FC1	1 μ g	>10	Sensível
			--	Intermediário ou
			\leq 10	Resistente

4.2.6. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) em meio sólido

Diferentes concentrações de antifúngico são incorporados ao ágar. Este método, segundo McGINNIS (1980); SHADOMY et al. (1985), foi empregado para avaliar a atividade antimicrobiana dos compostos contra espécies de microrganismos selecionadas.

Em placas esterilizadas, foi depositado 1 mL da suspensão padronizada do microrganismo e, adicionados 21mL do meio sólido fundido a 45-50 °C. Após solidificação, foram feitas cavidades de 6x8 mm de diâmetro, onde foram depositados 50 µL de cada composto solubilizado, soluções estas ajustadas para os óleos essenciais possuírem no final concentrações de 320, 160, 80, 40, 20, 10, 5µL/mL. Cada amostra a ser testada foi preparada em tubos de ensaios (120x12mm de diâmetro) estéreis. Foram adicionadas 1,6mL do óleo essencial; 0,04mL do TWEEN 80 (SIGMA CHEMICAL) e q.s.p. 5 mL de água destilada estéril, sendo submetida a agitação no vórtex por 5 minutos. Efetuaram-se diluições seriadas por adição de 2,5mL de cada concentração a ser diluída, em tubos estéreis, contendo 2,5mL de água destilada estéril, seguida de agitação por cinco minutos (ALLEGRI, 1973). Foram feitos controles para os microrganismos e com antifúngicos padrões. Os ensaios foram incubados a temperatura de 37 °C por 24-48 horas para as leveduras; a temperatura ambiente (25-30°C) durante 7-14 dias para as espécies filamentosas. Os testes serão realizados em duplicatas para se obter no final, a média aritmética da CIM.

Foi considerada como CIM a menor concentração capaz de inibir o desenvolvimento dos microrganismos, com halos de inibição igual ou superior que 10mm de diâmetro (WONG-LEUNG, 1988; NAQVI et al., 1991; LIMA, I. O. et al., 2005). Valores de CIM₅₀, ou seja, concentração inibitória para 50% das cepas e CIM₉₀, ou seja, concentração inibitória para 90% das cepas foram determinadas (SANTOS, et al., 1999)

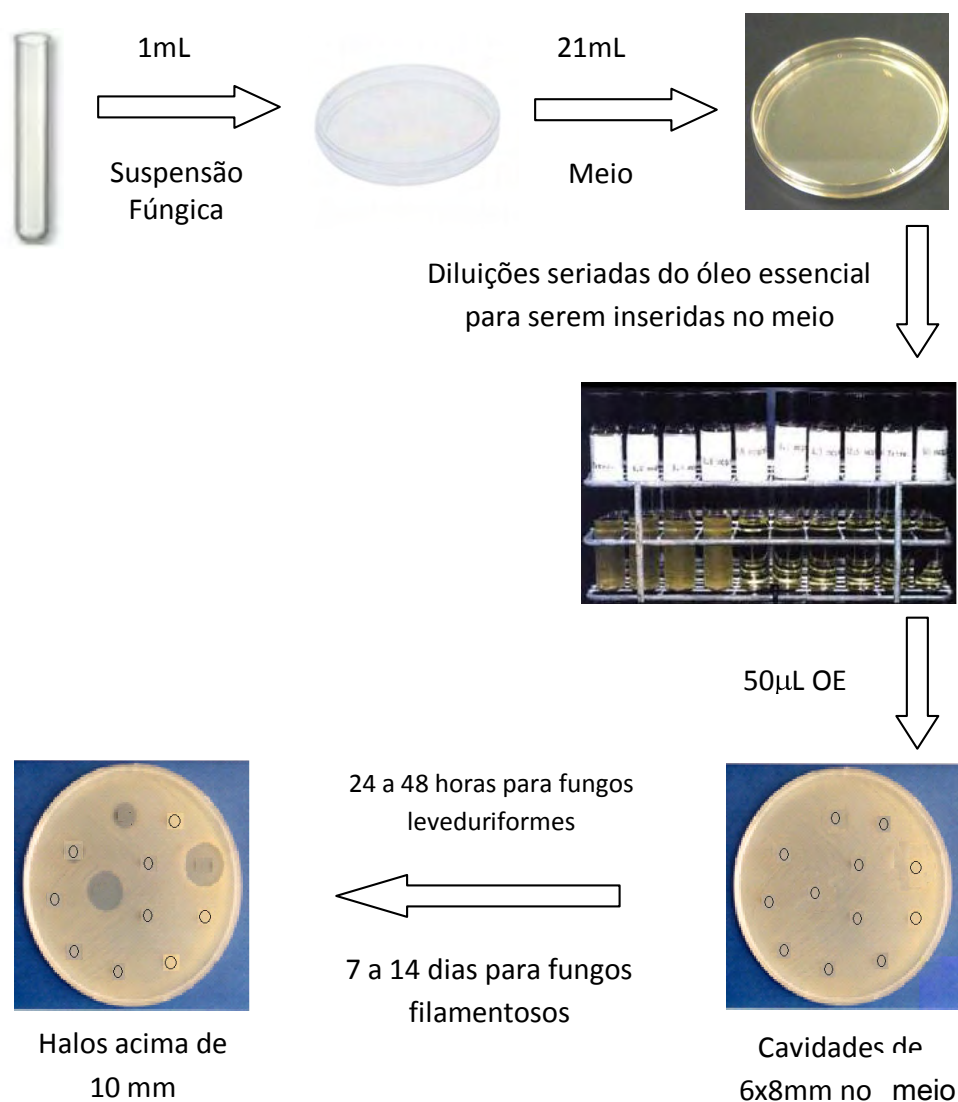


Figura 30 – Esquema da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) em meio sólido. OE= Óleo Essencial

4.2.7. Determinação da CIM pela macrodiluição em caldo Sabouraud

É utilizado como medida quantitativa da atividade *in vitro* de um agente antimicrobiano. Fornece CIM exata a partir do ensaio com 7-8 diluições (Full range-limite completo) de diferentes antimicrobianos (PIDDOCK, 1990).

O ensaio para determinação da CIM consistiu em preparar sucessivas diluições do produto testado, em meio de cultura líquido. As diluições aconteceram em tubos de ensaio (100x70mm) esterilizados, onde foi preparado

uma emulsão com a concentração inicial do produto (320 μ L/mL) para os óleos essenciais mais promissores testados no tubo de nº 1. A partir desta concentração, foram feitas diluições seriadas à razão de 2, de 320 μ L/mL até 0,5 μ L/mL, dependendo do produto testado. Em seguida, foram adicionados o inóculo da suspensão de cada fungo estudado. Os últimos dois tubos contendo o meio líquido foram utilizados para os controles, um para controle do crescimento de cada microrganismo e outro somente com um antifúngico padrão (NCCLS, 2005).

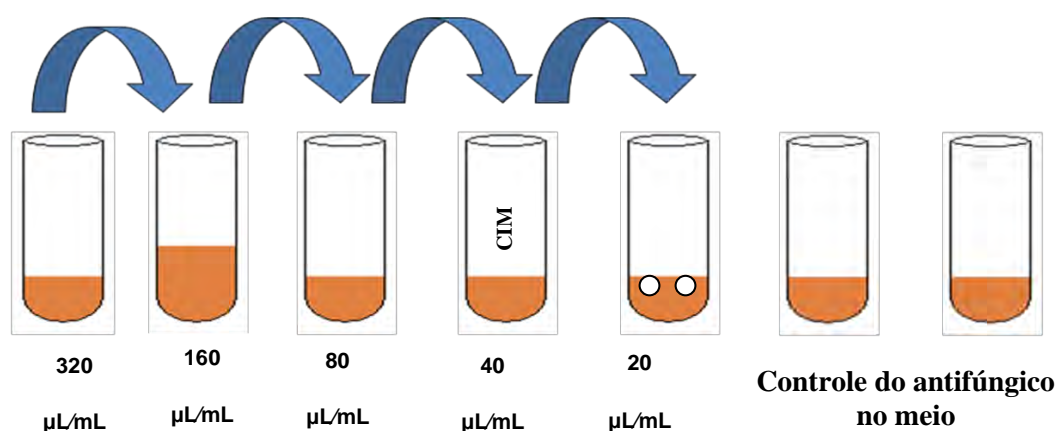


Figura 31 - Esquema da determinação da CIM, através da macrodiluição em caldo. Observar os tubos finais: controle do microrganismo e antifúngico padrão, respectivamente.

Os ensaios foram incubados a 35°C por 24-72h para leveduras e a temperatura ambiente (28-30 °C) por 10-14 dias para os fungos filamentosos.

Após o tempo adequado de incubação, verificou-se os tubos que continham os meios claros e os meios turvos. A turvação indica que o crescimento do fungo não foi inibido pela concentração dos óleos essenciais testados. Foi verificada e definida como a CIM e também a Concentração Fungicida Mínima (CFM), a menor concentração do antifúngico em μ L/mL, que inibe o crescimento *in vitro* dos microrganismos (KONEMAN, EW; ALEN, SD; DOWEL Jr. VR; SOMERS, HM; 1993).

Para classificar a atividade antimicrobiana dos extratos e frações de plantas, utilizou-se os seguintes parâmetros: os extratos e/ou extratos que apresentam CIM menor que 100 μ g/mL foram considerados com boa atividade

antimicrobiana, os que apresentaram CIM entre 100 e 500 μ g/mL, foram considerados moderadamente ativos, quando apresentaram atividade entre 100 e 1000 μ g/mL, foram considerados fracos e quando a CIM foi maior que 1000 μ g/mL, então o produto foi considerado inativo (HOLETZ et al., 2002)

O emprego do critério descrito se justifica devido ao fato da grande maioria dos antimicrobianos de uso clínico serem ativos contra microrganismos sensíveis em concentração de até 10 μ g/mL. Segundo Mitscher et al. (1972), caso um composto puro não apresente atividade até a concentração de 100 μ g/mL, é pouco provável que esse seja um candidato a uso clínico, a menos que seja ativo contra um microrganismo resistente ou ainda seja comparativamente atóxico.

4.2.8. Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)

A concentração fungicida mínima foi definida como a menor concentração de droga a partir da qual os subcultivos apresentaram resultados negativos ou produziram menos de 3 colônias por placa, utilizando-se metodologia descrita por Shadomy e Espinel-Ingroff (1974). Para esclarecer a CFM, utiliza-se a placa de Petri com ágar Sabouraud, dividida entre 2-12 partes iguais ou menos (figura 33), marcando cada parte com CIM a investigar.



Figura 32- Placa de Petri para determinação da CFM. (Fonte: www.seton.com.br/aanew/produtos/imgg/X537.jpg)

Semear a última diluição que apresentou crescimento, mais todas àquelas em que não houve. Incubar a 30°C por 24-48h ou até que se observe crescimento em área correspondente ao controle (sem óleo essencial). Para

fungos filamentosos, o tempo de incubação é de 72 h para observação do crescimento. Foram usados para controle positivo, os antifúngicos sintéticos: cetoconazol e nistatina.

4.2.9. Cinética de morte microbiana

Foram determinadas as curvas fungicidas dos óleos essenciais e fitoconstituintes sobre as amostras de fungos, estabelecendo-se variadas concentrações correlacionadas à CIM, em diferentes tempos de incubação, segundo método proposto por PEYRET et. al. (1990). O estudo do efeito dos produtos naturais sobre o número de células fúngicas viáveis, foi avaliado através da curva de morte microbiana. Utilizou-se como mecanismo de realização deste experimento o método de contagem de células viáveis (ARORA; KAUR, 1999).

Em 5 mL de caldo Sabouraud duplamente concentrado, foi feita a inoculação de uma pequena massa de cultura fúngica usada como cepa teste. Inicialmente foram utilizadas placas de Petri (60x15mm), da marca Dispo Petri/ Interlab, com 18mL de meio ASD acrescido de cada óleo essencial nas concentrações iguais ou menores que a CIM. Em seguida, retirou-se um fragmento de aproximadamente 2mm das cepas fúngicas filamentosas, de culturas mantidas a 28-30°C por 7-14 dias, colocou-o no centro da placa contendo o ASD mais óleo essencial na concentração determinada. Para fungos leveduriformes, mantidos a 28°C/48h pós-adicionamento de produtos naturais, 0,1 mL da suspensão, foi inoculado em ágar Sabouraud, sendo este sistema incubado a 28°C. Após este período, foi feita a contagem do número de colônias viáveis em diferentes intervalos de tempo (0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 14h) e comparada com o valor encontrado na suspensão controle (DELACRETAZ, 1974; TODA et al., 1988; COLOMBO et al., 1995).

O antifúngico cetoconazol 50µg/mL foi o controle, no teste com fungos filamentosos e para a verificação da viabilidade das cepas foi feita a observação do crescimento micelial ou não, em agar Sabouraud sem adição do óleo essencial. Após a montagem do sistema, a observação do crescimento micelial radial ou não em ASD, foi avaliada em diferentes intervalos de tempo

(0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 14 dias), sendo este crescimento micelial radial da colônia fúngica medido e o resultado expresso em milímetros (THYAGARA & HOSONO, 1996; DAFERERA; ZIOGAS; POLISSIOU, 2003).

Cada experimento foi realizado em duplicata e o resultado, média das duas repetições (experimento controle e experimento com óleos essenciais), foi expresso em percentual de inibição em relação à população obtida no experimento controle. O efeito de morte foi estudado para a menor concentração do óleo essencial que apresentou destacável atividade na determinação da CIM.

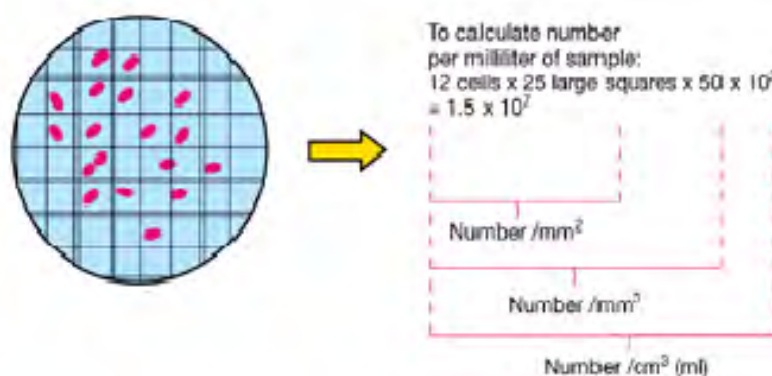


Figura 33 - Procedimento de contagem direta de cepas leveduriformes, no ensaio sobre a cinética fúngica. (Fonte: adaptado de MADGAN et al., Brock Biology of Microorganisms, 2003).

Para fungos filamentosos, mediu-se o crescimento radial, como mostrado na figura a seguir.

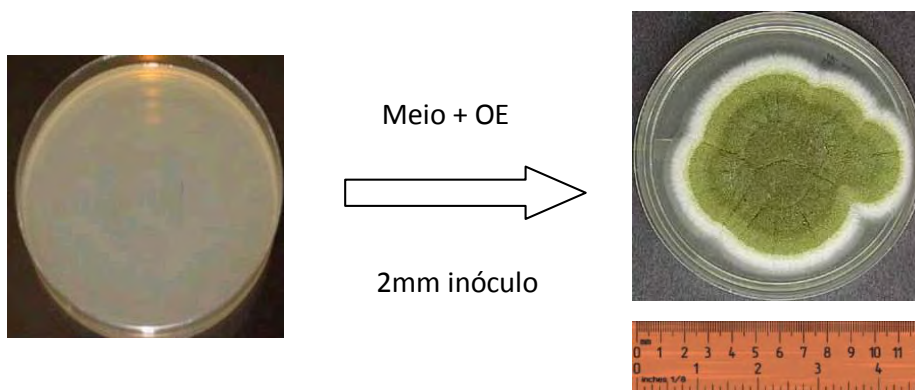


Figura 34 - Esquema ilustrando o procedimento de contagem do diâmetro radial de fungos filamentosos. OE: Óleo Essencial

4.2.10. Efeito do óleo essencial sobre a micromorfologia das cepas fúngicas filamentosas

Este ensaio permitiu a observação de possíveis alterações morfológicas, apresentadas pelos fungos filamentosos quando expostos a óleos essenciais. Os ensaios para fungos leveduriformes, mostraram-se pouco operacionais. Inicialmente em placas de Petri (90x15mm), da marca Dispo Petri/ Interlab, estéreis foram adicionados 8mL de ASD acrescidos do óleo essencial nas concentrações de CIM₉₀ e CIM₅₀. Em seguida, um inóculo de aproximadamente 2 mm foi adicionado em cima do sistema montado (ASD mais óleo). Por fim, fragmentos miceliais foram tomados da periferia das colônias dos fungos cultivados em ASD adicionado de diferentes concentrações dos óleos essenciais após cinco dias de incubação a 28-30°C. Paralelamente, o mesmo processo foi feito para as cepas fônicas cultivadas em ASD sem adição do óleo essencial, as quais serviram como procedimento controle. As amostras miceliais coletadas foram fixadas em azul lactofenol algodão, e em seguida examinadas sob microscopia luminosa utilizando aumento de 400 vezes (figura 36), a fim de observação das características micromorfológicas das cepas fônicas tratadas ou não (DE BILLERBECK et al., 2001; SHARMA e TRIPATHI, 2006).

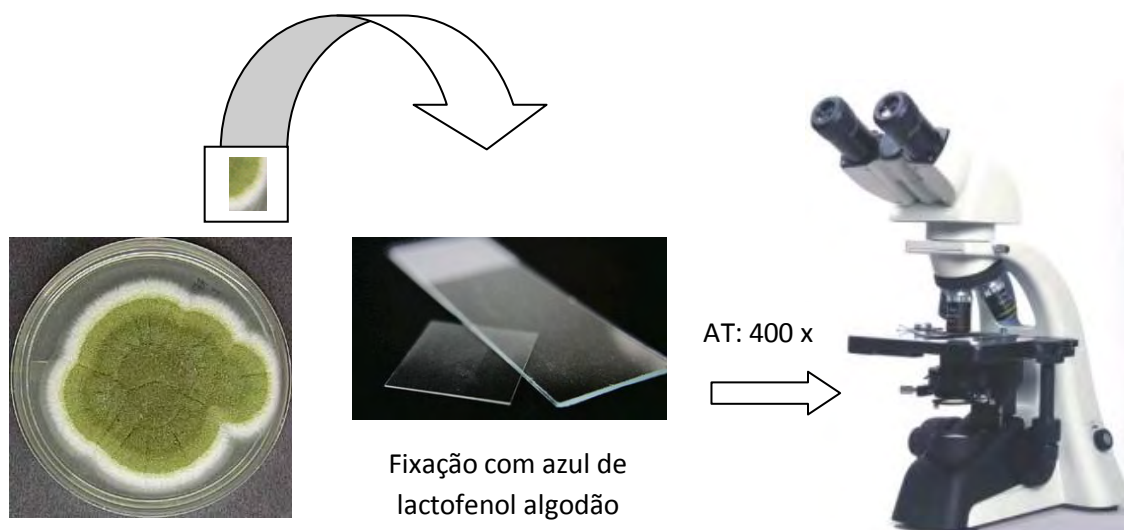


Figura 35 – Esquema sobre ensaio da micromorfogênese dos fungos. Lâmina analisada em microscópio óptico, num aumento total (AT): 400x

As malformações da hifas frente aos óleos essenciais testados foram observadas em um microscópio óptico acoplado à uma câmera fotográfica após a determinação da CIM.

4.2.11. Avaliação do possível mecanismo de ação antifúngica, através do protetor osmótico, sorbitol.

A parede celular é dispensável se os fungos estão protegidos por barreira osmótica, em condições específicas (FROST et al., 1995). Protoplastos estabilizados têm sido usados como importantes ferramentas bioquímicas para estudar a arquitetura da parede celular (SENTANDREU et al., 1983). Além disso, protetores osmóticos têm sido utilizados em ensaios com *C. albicans* e outros fungos para testar mecanismo de ação de diversos antibióticos (YAMAGUCHI et al., 1982; VARONA et al., 1983).

Valores de CIM foram determinadas pela macrodiluição em caldo, através de ensaios anteriores. Utilizou-se uma cepa padrão de fungo leveduriforme *Candida albicans* ATCC 7645 e uma cepa padrão de fungo filamentosos *Aspergillus flavus* LM02, como exemplares dos dois grupos de fungos. O teste realizado foi adaptado dos ensaios de Frost (1995), utilizando meio com sorbitol e meio sem sorbitol (controle). Foi adicionado ao caldo Sabouraud duplamente concentrado, associado ao sorbitol 0,8M (como protetor osmótico no meio), o óleo essencial (quantidade baseada na CIM, anteriormente obtida) e Tween (ajustado de acordo com o volume o óleo essencial a ser testado). Foi também adicionado ao meio, 10 µL do microrganismo a ser testado. Os tubos foram lidos de 2-7 dias, para leveduras e 2-14 dias para fungos filamentosos. Com o protetor osmótico, observa-se um aumento da CIM, caso o antifúngico testado, atue inibindo a síntese de parede celular.

4.2.12. Inibidores da Bomba de Efluxo

A clorpromazina (CPZ) e outras fenotiazinas têm sido descritas como inibidoras de sistemas de efluxo, tanto em células procariontes como

eucarióticas (KAATZ, ET al., 2003; MICHALAK, ET al., 2001; KOLACZKOWSKI, ET al., 2003).

As CIMs dos óleos essenciais, foram determinados através da técnica de diluição em caldo. As concentrações variavam de 320 μ L/mL até 0.007 μ L/mL. A CIM foi considerada a menor concentração que inibiu completamente o crescimento fúngico. Para avaliar os óleos essenciais como modificadores da resistência antifúngica, as CIMs dos produtos testados foram determinados na presença destes compostos, numa concentração sub-inibitória (1/4 da CIM), que seguramente não interfere na sobrevivência fúngica. Para melhor visualização do crescimento fúngico, após 7-14 dias. É importante realizar os testes com uma concentração baixa para evitar possíveis resultados falso-positivos (STAVRI, ET al., 2006)

4.2.13. Tratamento estatístico

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o teste de Tukey (testa toda e qualquer diferença entre duas médias de tratamento) para determinação de diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) entre os tratamentos aplicados. Para a realização destas análises utilizou-se o Software Sigma Stat 2.03.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Triagem microbiológica

Inicialmente, foi realizada uma triagem dos óleos essenciais e seus fitoconstituintes majoritários. A triagem da atividade antifúngica de um óleo essencial é, geralmente, utilizado como teste preliminar do seu potencial antimicrobiano, e de acordo com os resultados obtidos, pode-se elaborar uma seqüência de análises mais detalhadas com vistas à obtenção de maiores informações sobre propriedades biológicas do produto (LIMA, 2001).

Estas plantas foram escolhidas para pesquisa devido à disponibilidade e relatos na literatura de suas consideráveis atividades antifúngicas. Assim, foram avaliados dez óleos essenciais e três fitoconstituintes, com o objetivo de selecionar quem apresentava melhor perfil de atividade antifúngica. As plantas utilizadas na triagem foram: *Cinnamomum zeylanicum* Blume, *Citrus limonum* L., *Caryophyllus aromaticus* L., *Cymbopogon citratus* D.C.Stapf., *Eugenia uniflora* L., , *Melissa officinallis* L., *Laurus nobilis* L., *Origanum manjerona* L., *Origanum vulgare* L., além de seus fitoconstituintes majoritários: α -pineno, citral e eugenol contra fungos leveduriformes e filamentosos: *C. albicans* (ATCC 7645) e *A. flavus* (LM-02).

Percebeu-se nesta triagem, a intensa atividade antifúngica para ambos os grupos de fungos, no entanto, como se observa na figura 37, o óleo essencial de pitanga (*Eugenia uniflora* L.) foi pouco efetivo contra os microrganismos, seguido do óleo essencial de limão (*Citrus limonum* L.), cravo (*Caryophyllus aromaticus* L.) e por último, do óleo essencial de erva-cidreira (*Melissa officinallis* L.), conforme mostram os halos de inibição (milímetros) do crescimento fúngico, apresentados na tabela 02.

Foi considerada como boa atividade antifúngica, quando os produtos testados produziram halos de inibição iguais ou superiores a 10 mm de diâmetro (WONG-LEUNG, 1988; NAQVI, et al., 1991; LIMA, 2005).

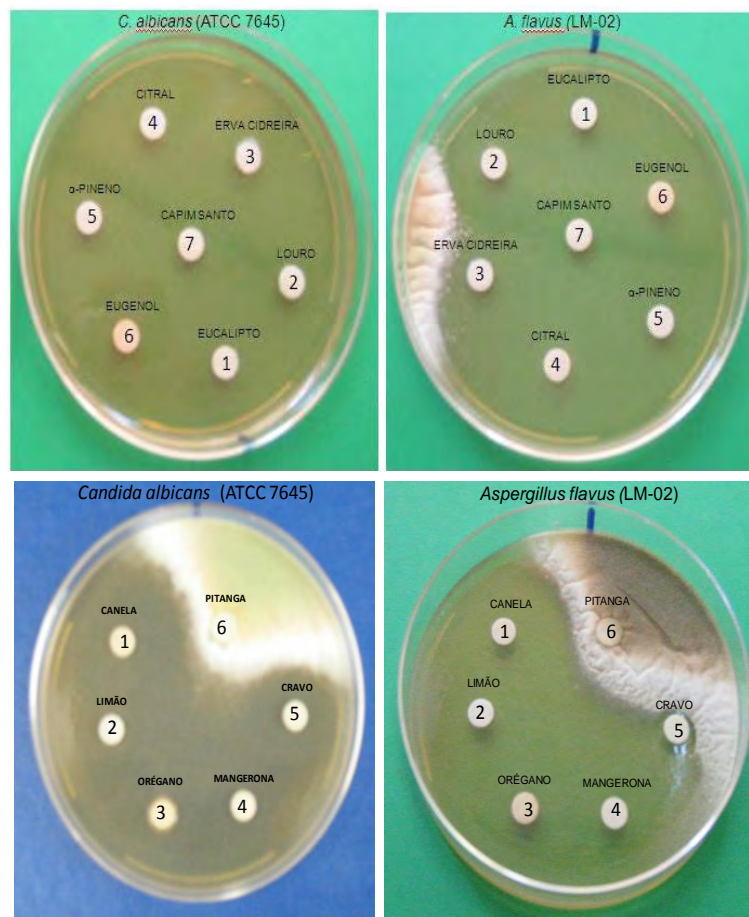


Figura 36- Fotos da triagem inicial para avaliar a atividade antifúngica dos óleos essenciais e fitoconstituintes frente a cepas de fungos leveduriformes e filamentosos.

Foi realizada uma triagem preliminar dos óleos de *C. zeylanicum*, *C. limonum*, *C. aromaticus*, *C. citratus*, *E. uniflora*, *E. globulus*, *M. officinalis*, *L. nobilis*, *O. majorona*, *O. vulgare* e dos fitoconstituintes: citral, α -pineno e eugenol, sendo este último, segundo Sellan (2002), Amaral & Bara (2005) e Gayoso (2005) o fitoconstituente majoritário em ambos os óleos de *C. zeylanicum* e *C. aromaticus*. Este ensaio, mostrou-se de extrema importância para a escolha dos óleos essenciais e fitoconstituintes com atividade antifúngica mais promissora. Através dos resultados obtidos na tabela 02 foram excluídos dos próximos ensaios, os óleos *Eugenia uniflora* e *Citrus limonum*, devido ao baixo desempenho de suas atividades antifúngicas. Assim

como, devido ao pouco material disponível no laboratório, também foram eliminados os óleos de *Eucalyptus globulus* e *Melissa officinalis*.

TABELA 02 – Triagem inicial dos óleos essenciais e fitoconstituintes contra cepas de *C. albicans* e *A. flavus*

Óleos Essenciais e fitoconstituintes	Halos de inibição (mm)	
	<i>Candida albicans</i> (ATCC 7645)	<i>Aspergillus flavus</i> (LM-02)
<i>Cinamonum zeylanicum</i> Blume	27	25
Citrus limonum	9	8
<i>Caryophyllus aromaticus</i> L.	25	10
<i>Cymbopogon citratus</i> D.C.	25	18
Eugenia uniflora L.	0	0
Melissa officinalis L.	25	5
<i>Laurus nobilis</i> L.	25	26
<i>Origanum majorona</i> L.	25	28
<i>Origanum vulgare</i> L.	30	26
Citral	25	28
α-pineno	25	26
Eugenol	25	26

mm=milímetros de diâmetro

5.2. Ensaio de atividades com antifúngicos sintéticos padrões (Antifungigrama)

Vários antifúngicos sintéticos têm sido usados isolados ou em conjunto, no tratamento das várias doenças causadas por fungos. Alguns tipos de fungos, antes sob controle, adaptaram-se e começaram a apresentar resistência às drogas antifúngicas e isso se deve em parte ao uso indiscriminado de medicamentos, ao longo de décadas. Um dos testes feitos para detectar essa resistência, foi o antifungigrama que tem respaldo do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), importante órgão internacional que padroniza e controla a realização de testes de sensibilidade.

Apenas um único polieno é usado atualmente para infecções sistêmicas, anfotericina B. Suas vantagens primárias incluem seus efeitos fungicidas contra a maioria dos patógenos clinicamente relevantes. Suas desvantagens incluem seus efeitos nefrotóxicos, por isso geralmente é utilizada na sua forma lipossomal (DIDOMENICO, 1999). O medicamento mais próximo da

Anfotericina B (AB), é a nistatina que se liga ao ergosterol e desestabiliza as membranas fúngicas, Sua toxicidade também tem limitado seu uso em infecções tópicas (JOHNSON et al., 1998; OAKLEY et al., 1999). Existe uma grande variedade de azoles que são eficazes *in vitro*, contra fungos, mas poucos têm mostrado utilidade clínica significativa. Embora os azoles demonstrem um amplo espectro de atividade, com menor toxicidade que a anfotericina B, eles geralmente não são fungicidas (PFALLER, 1998). Quanto à 5-fluorocitosina, sabe-se que é um antifúngico de ação fungistática, usado na terapia em associação com outros, pois quando usado como monoterapia, revela alto grau de resistência (PEREA, 2002).

Com base nos dados, o antifungigrama (tabela 03), fez-se necessário para a escolha de quais antifúngicos sintéticos serviriam como padrão de referência para os testes com os produtos naturais. Segundo a tabela 02, os antifúngicos 5-fluorocitosina e fluconazol foram excluídos dos testes posteriores, devido ao alto grau de resistência apresentado pelas cepas fúngicas. A nistatina e o cetoconazol foram os agentes antifúngicos que mostraram melhor efeito fumigante, sendo o cetoconazol capaz de inibir cerca de 95% das cepas fúngicas testadas (tabela 03).

TABELA 03 – Antifungograma, mostrando sensibilidade de fungos patogênicos aos antifúngicos padrões (CECON/SP).

Espécies Fúngicas	Discos de Antifúngicos Sintéticos			
	Nistatina (100U)	Cetoconazol (50,µg/mL)	5-Fluorocitosina (10,µg/mL)	Fluconazol (25,µg/mL)
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	S	I	R	R
<i>C. albicans</i> LM-142	S	S	S	R
<i>C. albicans</i> ATCC 7645	S	S	R	S
<i>C. tropicalis</i> LM-14	S	S	I	I
<i>C. krusei</i> ATCC 6252	I	S	R	R
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	I	S	R	R
<i>C. krusei</i> LM-09	S	S	I	R
<i>C. krusei</i> LM-08	S	S	R	R
<i>C. neoformans</i> LM-10	S	S	R	R
<i>C. neoformans</i> FGF-5	S	S	R	R
<i>T. rubrum</i> 64T	S	S	R	R
<i>T. rubrum</i> ATCC 28184	S	S	R	R
<i>T. rubrum</i> LM-78T	S	S	R	R
<i>T. rubrum</i> LM-800	S	S	R	S
<i>T. mentagrophytes</i> LM-640	S	S	R	R
<i>M. gypseum</i> ATCC 184	R	I	R	R
<i>M. canis</i> LM-36	S	S	R	R
<i>C. herbarium</i> ATCC 26362	S	S	R	R
<i>A. flavus</i> LM-02	S	I	R	R
<i>A. fumigates</i> IPP-21	S	I	R	R
<i>A. fumigates</i> ATCC 40640	S	R	R	R

R:RESISTENTE; I:INTERMEDIÁRIO; S:SENSÍVEL

5.3. Concentração Inibitória Mínima (CIM) em meio sólido

Os resultados para a avaliação da CIM, pelo método de difusão em meio sólido, estão distribuídos nas tabelas de 4 à 12. Nestas tabelas, foram verificadas as CIMs do óleo essencial de *C. zeylanicum* contra 21 cepas de fungos leveduriformes e filamentosos. Os resultados, do ensaio sobre atividade antifúngica de *C. zeylanicum*, mostraram que a CIM₉₀ é igual 80µL/mL, com halos de inibição variando de entre 7 a 25mm de diâmetro. Os resultados também demonstraram que não houve atividade antifúngica satisfatória contra a *A. fumigatus* ATCC 40640. A cepa foi resistente a todas as concentrações testadas deste óleo essencial.

Os antifúngicos padrões, utilizados como controle, são: nistatina(100UI) e cetoconazol (50 µL/mL). O cetoconazol foi a droga mais promissora frente as cepas testadas. A maioria destas espécies de *Aspergillus* são comumente encontradas em micoses oportunistas, após as *Candidas* (WALD et al., 1997). As diferentes cepas de fungos filamentosos, mesmo da mesma espécie, têm variável susceptibilidade aos medicamentos antifúngicos (ESPINEL-INGROFF, 2001). Certas cepas podem desenvolver resistência à estes medicamentos (MELETIADIS et al., 2002).

Na concentração de 40µL/mL, o óleo essencial de *C. zeylanicum*, inibiu 80% dos microrganismos usados nos ensaios, cujos halos de inibição ficaram entre 12 à 20mm de diâmetro.

Tabela 4 – Média dos resultados (n=2) da CIM, do óleo essencial de *C. zeylanicum* sobre cepas de fungos leveduriformes e filamentosos.

Espécies	Óleo essencial (µL/mL)							Nistatina 100UI	Cetoconazol (50µg/mL)	Controle
	320	160	80	40	20	10	5			
Halos de inibição (mm)										
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	27	22	13	12	10	0	0	20	13	+
<i>C. albicans</i> LM-142	20	18	15	14	13	11	0	25	25	+
<i>C. albicans</i> ATCC 7645	23	21	16	15	12	0	0	26	30	+
<i>C. tropicalis</i> LM-14	28	24	17	9	0	0	0	24	30	+
<i>C. krusei</i> 6252	21	19	17	14	0	0	0	13	20	+
<i>C. krusei</i> 6258	20	18	15	14	7	0	0	20	24	+
<i>C. krusei</i> LM-09	20	10	7	0	0	0	0	20	30	+
<i>C. krusei</i> LM-08	25	20	18	16	13	0	0	24	35	+
<i>C. neoform.</i> LM-10	27	24	20	14	10	0	0	25	26	+
<i>C. neoform.</i> FGF-5	26	22	17	15	12	7	0	27	30	+
<i>T. rubrum</i> 64T	21	18	15	13	10	7	0	22	28	+
<i>T. rubrum</i> ATCC 28184	17	15	14	12	0	0	0	12	23	+
<i>T. rubrum</i> LM-78T	23	20	15	12	8	0	0	24	27	+
<i>T. rubrum</i> LM-800	35	30	20	18	16	12	10	26	28	+
<i>T. mentagrophytes</i> LM-640	17	15	12	8	0	0	0	11	23	+
<i>M. gypseum</i> ATCC 184	26	24	22	12	0	0	0	8	18	+
<i>M. canis</i> LM-36	24	20	18	16	13	12	11	20	30	+
<i>C. herbarium</i> ATCC 26362	25	20	7	0	0	0	0	18	8	+
<i>A. flavus</i> LM-02	23	20	19	18	0	0	0	21	20	+
<i>A. fumigatus</i> IPP-21	36	30	25	20	10	7	0	15	12	+
<i>A. fumigatus</i> ATCC 40640	0	0	0	0	0	0	0	18	10	+

+: Crescimento das cepas fúngicas no meio de cultura isento de produto antifúngico.

Os resultados dos estudos de atividade antifúngica de *C. citratus*, encontrados na tabela 5, mostrou a CIM deste óleo essencial capaz de inibir o crescimento de 80% dos fungos na concentração de 320µL/mL, com halos de inibição variando de entre 9 a 36mm de diâmetro. Os resultados também demonstraram que não foi observada atividade antifúngica satisfatória contra a *A. fumigatus* ATCC 40640. A cepa foi resistente a todas as concentrações testadas deste óleo essencial.

Segundo Holetz e colaboradores (2002), quando os produtos naturais testados apresentam CIM entre 100 e 1000 µL/mL são considerados moderadamente ativos. Os resultados mostraram então, moderada atividade antifúngica do óleo essencial de *C. citratus*.

Trabalhos anteriores relatam atividade antimicrobiana de *C. citratus* D. C. contra *Aspergillus niger* (PAWAR & THAKER, 2006). Linalol foi responsável pela atividade antifúngica encontrada anteriormente (D`ÀURIA et al., 2005). Além do mais, as zonas de inibição dos esporos entre 20 e 30 mm foram exibidos pelos óleos essenciais de cravo, louro, manjerição e capim-santo (PAWAR & THAKER, 2006).

Dentre os antifúngicos padrões utilizados como controle: nistatina(100UI) e cetoconazol (50 µL/mL), o cetoconazol foi a droga mais promissora frente as cepas testadas, exceto em relação aos *Aspergillus*.

Tabela 5 – Média dos resultados (n=2) da CIM, do óleo essencial de *C.citratus* sobre cepas de fungos leveduriformes e filamentosos.

Espécies Fúngicas	Óleo essencial (µL/mL)							Nistatina 100UI	Cetoconazol (50µg/mL)	Controle
	320	160	80	40	20	10	5			
	Halos de inibição (mm)									
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	30	25	14	0	0	0	0	20	13	+
<i>C. albicans</i> LM-142	22	17	14	10	0	0	0	25	25	+
<i>C. albicans</i> ATCC 7645	24	18	14	12	8	0	0	26	30	+
<i>C. tropicalis</i> LM-14	9	0	0	0	0	0	0	24	30	+
<i>C. krusei</i> 6252	20	13	10	9	0	0	0	13	20	+
<i>C. krusei</i> 6258	14	12	10	7	0	0	0	20	24	+
<i>C. krusei</i> LM-09	0	0	0	0	0	0	0	20	30	+
<i>C. krusei</i> LM-08	0	0	0	0	0	0	0	24	35	+
<i>C. neoform.</i> LM-10	0	0	0	0	0	0	0	25	26	+
<i>C. neoform.</i> FGF-5	28	20	16	10	8	0	0	27	30	+
<i>T. rubrum</i> 64T	25	21	17	13	10	7	0	22	28	+
<i>T. rubrum</i> ATCC 28184	14	8	0	0	0	0	0	12	23	+
<i>T. rubrum</i> LM-78T	8	0	0	0	0	0	0	24	27	+
<i>T. rubrum</i> LM-800	19	16	13	10	7	0	0	26	28	+
<i>T. mentagrophytes</i> LM-640	26	24	22	14	12	8	0	11	23	+
<i>M. gypseum</i> ATCC 184	28	25	19	16	14	0	0	8	18	+
<i>M. canis</i> LM-36	28	25	20	17	10	7	0	20	30	+
<i>C. herbarium</i> ATCC 26362	25	20	18	10	7	0	0	18	8	+
<i>A. flavus</i> LM-02	15	9	0	0	0	0	0	21	20	+
<i>A. fumigatus</i> IPP-21	36	26	20	16	14	10	7	15	12	+
<i>A. fumigatus</i> ATCC 40640	30	26	22	18	14	10	7	18	10	+

+: Crescimento das cepas fúngicas no meio de cultura isento de produto antifúngico

A atividade antimicrobiana, encontrada no óleo essencial de *L. nobilis* é resultado dos compostos possuidores da estrutura isoprênica (C₁₀H₁₆), os chamados terpenóides. Chaurasia e colaboradores (1977), mostraram que óleos essenciais cuja presença de terpenóides era majoritária, foram inibidores de 60% dos fungos, enquanto que apenas, 30% inibiram bactérias.

Como podemos observar na tabela 6, os resultados sobre o óleo essencial de *L. nobilis* frente aos microrganismos testados, mostraram que na CIM de 320µL/mL, o óleo essencial foi capaz de inibir o crescimento de 57% dos fungos, com halos de inibição variando de entre 9 à 22 mm de diâmetro.

Esses resultados também demonstram que nas concentrações testadas não foram observadas atividades antifúngicas satisfatórias contra o *A. fumigatus* IPP-21, ATCC 40640 e *A. flavus* LM-02, representantes estes, dos fungos filamentosos. Estas cepas se mostraram resistentes à todas as concentrações testadas deste óleo essencial. Dentre as cepas leveduriformes, algumas espécies de *Candida krusei*, como *C. krusei* ATCC 6258 e LM-09 mostraram resistência à maior concentração do óleo de *L. nobilis*, assim como, alguns os dermatófitos *T. rubrum* LM-78T e LM-800, e fungos filamentosos, como *A. flavus* LM-02, *A. fumigatus* ATCC 40640 e IPP-21

Tabela 6 – Média dos resultados (n=2) da CIM, do óleo essencial de *L. nobilis* sobre cepas de fungos leveduriformes e filamentosos.

Espécies Fúngicas	Óleo essencial (µL/mL)							Nistatina 100UI	Cetoconazol (50µg/mL)	Controle
	320	160	80	40	20	10	5			
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	12	8	0	0	0	0	0	20	13	+
<i>C. albicans</i> LM-142	9	7	0	0	0	0	0	25	25	+
<i>C. albicans</i> ATCC 7645	15	12	10	7	0	0	0	26	30	+
<i>C. tropicalis</i> LM-14	14	12	10	0	0	0	0	24	30	+
<i>C. krusei</i> ATCC 6252	10	7	0	0	0	0	0	13	20	+
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	0	0	0	0	0	0	0	20	24	+
<i>C. krusei</i> LM-09	0	0	0	0	0	0	0	20	30	+
<i>C. krusei</i> LM-08	9	0	0	0	0	0	0	24	35	+
<i>C. neoform.</i> LM-10	18	14	12	10	0	0	0	25	26	+
<i>C. neoform.</i> FGF-5	14	12	10	7	0	0	0	27	30	+
<i>T. rubrum</i> 64T	10	8	0	0	0	0	0	22	28	+
<i>T. rubrum</i> ATCC 28184	14	8	0	0	0	0	0	12	23	+
<i>T. rubrum</i> LM-78T	0	0	0	0	0	0	0	24	27	+
<i>T. rubrum</i> LM-800	0	0	0	0	0	0	0	26	28	+
<i>T. mentagrophytes</i> LM-640	22	17	14	10	7	0	0	11	23	+
<i>M. gypseum</i> ATCC 184	12	10	7	0	0	0	0	8	18	+
<i>M. canis</i> LM-36	18	14	12	8	0	0	0	20	30	+
<i>C. herbarium</i> ATCC 26362	22	18	15	12	8	0	0	18	8	+
<i>A. flavus</i> LM-02	0	0	0	0	0	0	0	21	20	+
<i>A. fumigatus</i> IPP-21	0	0	0	0	0	0	0	15	12	+
<i>A. fumigatus</i> ATCC 40640	0	0	0	0	0	0	0	18	10	+

+: Crescimento das cepas fúngicas no meio de cultura isento de produto antifúngico

O. majorana frente aos microrganismos testados, mostrou que a CIM de 320µL/mL foi capaz de inibir o crescimento de 80% dos fungos, com halos de inibição variando de entre 12 á 40 mm de diâmetro.

O cetoconazol foi a droga mais promissora frente as cepas testadas, exceto para as espécies de *Aspergillus flavus* LM-02 e *Aspergillus fumigatus* IPP-21 e ATCC40640, que se mostraram mais susceptíveis à ação da nistatina. A exceção foi a cepa *A. fumigatus* IPP-21.

Observamos na tabela 7 que a cepa de *M. gypseum* ATCC184, mostrou grande resistência frente à nistatina, no entanto, mostrou-se susceptível ao óleo essencial de *O. majorana* L. (80µL/mL) e cetoconazol. As cepas de *C. tropicalis* LM-14, *C. krusei* ATCC6252 e ATCC6258, *T. rubrum* LM-78T, *T. mentagrophytes* LM-640, *A. flavus* LM-02 e o *A. fumigatus* ATCC40640, mostraram grande susceptibilidade ao óleo essencial testado.

Dentre os antifúngicos padrões utilizados como controle: nistatina(100UI) e cetoconazol (50 µL/mL), o cetoconazol foi a droga mais promissora frente as cepas testadas.

Tabela 7 – Média dos resultados (n=2) da CIM, do óleo essencial de *O. majorana* sobre cepas de fungos leveduriformes e filamentosos.

Espécies Fúngicas	Óleo essencial (µL/mL)							Nistatina 100UI	Cetoconazol (50µg/mL)	Controle
	320	160	80	40	20	10	5			
	Halos de inibição (mm)									
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	40	25	20	10	0	0	0	20	13	+
<i>C. albicans</i> LM-142	17	9	0	0	0	0	0	25	25	+
<i>C. albicans</i> ATCC 7645	17	12	9	0	0	0	0	26	30	+
<i>C. tropicalis</i> LM-14	18	12	0	0	0	0	0	24	30	+
<i>C. krusei</i> ATCC 6252	16	11	9	0	0	0	0	13	20	+
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	17	11	9	0	0	0	0	20	24	+
<i>C. krusei</i> LM-09	0	0	0	0	0	0	0	20	30	+
<i>C. krusei</i> LM-08	15	9	0	0	0	0	0	24	35	+
<i>C. neoform.</i> LM-10	26	22	15	7	0	0	0	25	26	+
<i>C. neoform.</i> FGF-5	20	12	8	0	0	0	0	27	30	+
<i>T. rubrum</i> 64T	30	25	0	0	0	0	0	22	28	+
<i>T. rubrum</i> ATCC 28184	0	0	0	0	0	0	0	12	23	+
<i>T. rubrum</i> LM-78T	22	18	14	12	10	0	0	24	27	+
<i>T. rubrum</i> LM-800	20	16	12	7	0	0	0	26	28	+
<i>T. mentagrophytes</i> LM-640	20	15	9	0	0	0	0	11	23	+
<i>M. gypseum</i> ATCC 184	22	16	9	0	0	0	0	8	18	+
<i>M. canis</i> LM-36	0	0	0	0	0	0	0	20	30	+
<i>C. herbarium</i> ATCC 26362	0	0	0	0	0	0	0	18	8	+
<i>A. flavus</i> LM-02	20	11	0	0	0	0	0	21	20	+
<i>A. fumigatus</i> IPP-21	0	0	0	0	0	0	0	15	12	+
<i>A. fumigatus</i> ATCC 40640	12	10	7	0	0	0	0	18	10	+

+: Crescimento das cepas fúngicas no meio de cultura isento de produto antifúngico

Como podemos observar na tabela 8, os resultados do óleo essencial de *O. vulgare* frente aos microrganismos testados, mostraram que a CIM de 80µL/mL foi capaz de inibir o crescimento de 80% dos fungos, com halos de inibição variando de entre 9 à 27 mm de diâmetro.

Algumas curiosidades foram observadas na tabela 8, como a capacidade do óleo essencial de inibir o crescimento das cepas fúngicas, mesmo sendo estas resistentes aos antifúngicos padrões, como: nistatina e cetoconazol.

Exemplos do bom desempenho deste óleo essencial, podem ser observados em todas as cepas de *Candida albicans*, *tropicalis* e *krusei*, exceto para a cepa *C. krusei* LM-09, assim como, apresentaram boa atividade contra fungos filamentosos, exceto para a cepa *T. mentagrophytes* LM-640 e *M. Gypseum* 184. Fungos estes, que apresentaram grande resistência aos óleos essenciais já testados, mas grande sensibilidade ao óleo essencial de *O. vulgare* L.

Dentre os antifúngicos padrões utilizados como controle, o cetoconazol foi a droga mais promissora frente as cepas testadas, exceto para as espécies de *Aspergillus flavus* LM-02 e *Aspergillus fumigatus* IPP-21 e ATCC40640, que se mostraram mais susceptíveis à ação da nistatina, assim como à ação do óleo essencial de *O. vulgare* L.

Muitos estudos já foram realizados sobre o *O. vulgare* L. devido ao seu grande poder antioxidante, fungistático e fungicida (BOZIN et al., 2006), ao seu poder antimicrobiano frente as cepas de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus choleraesuis* (SARTORATTO, et al., 2004).

Tabela 8 – Média dos resultados (n=2) da CIM, do óleo essencial de *O. vulgare* sobre cepas de fungos leveduriformes e filamentosos.

Espécies Fúngicas	Óleo essencial (µL/mL)							Nistatina 100UI	Cetoconazol (50µg/mL)	ontrole
	320	160	80	40	20	10	5			
	Halos de inibição (mm)									
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	30	23	22	13	0	0	0	20	13	+
<i>C. albicans</i> LM-142	30	29	15	11	0	0	0	25	25	+
<i>C. albicans</i> ATCC 7645	24	20	11	9	7	0	0	26	30	+
<i>C. tropicalis</i> LM-14	32	30	18	9	0	0	0	24	30	+
<i>C. krusei</i> ATCC 6252	26	17	12	10	8	0	0	13	20	+
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	15	13	12	8	0	0	0	20	24	+
<i>C. krusei</i> LM-09	0	0	0	0	0	0	0	20	30	+
<i>C. krusei</i> LM-08	20	17	13	10	0	0	0	24	35	+
<i>C. neoform.</i> LM-10	20	18	16	14	11	7	0	25	26	+
<i>C. neoform.</i> FGF-5	18	16	12	8	0	0	0	27	30	+
<i>T. rubrum</i> 64T	30	28	27	25	0	0	0	22	28	+
<i>T. rubrum</i> ATCC 28184	18	16	9	0	0	0	0	12	23	+
<i>T. rubrum</i> LM-78T	13	11	9	0	0	0	0	24	27	+
<i>T. rubrum</i> LM-800	18	16	10	0	0	0	0	26	28	+
<i>T. mentagrophytes</i> LM-640	0	0	0	0	0	0	0	11	23	+
<i>M. gypseum</i> ATC 184	0	0	0	0	0	0	0	8	18	+
<i>M. canis</i> LM-36	30	24	17	9	0	0	0	20	30	+
<i>C. herbarium</i> ATCC 26362	27	20	16	8	0	0	0	18	8	+
<i>A. flavus</i> LM-02	25	20	13	0	0	0	0	21	20	+
<i>A. fumigatus</i> IPP-21	36	28	26	8	0	0	0	15	12	+
<i>A. fumigatus</i> ATCC 40640	28	20	18	13	0	0	0	18	10	+

+: Crescimento das cepas fúngicas no meio de cultura isento de produto antifúngico

Nesta parte do trabalho, alguns fitoconstituintes majoritários dos óleos essenciais estudados foram analisados, a fim de selecionarmos quais fitoconstituintes eram potenciais antifúngicos contra os microrganismos testados. Esta seleção definiu quais os óleos essenciais e/ou fitoconstituintes seguiriam para os próximos ensaios, tornando possível, ao final destes, sugerir mecanismo de ação dos produtos naturais testados, possuidores de grande atividade antifúngica.

A caracterização química dos óleos essenciais investigados, é conhecido por nós tendo por base os dados da literatura. Estes óleos, geralmente foram analisados e caracterizados por cromatografia gasosa com espectrometria de massa (GC-MS), como *O. vulgare* (BOZI et al., 2006), mostrando que seu componente majoritário era o carvacrol e em menor quantidade, p-cimeno, α -pineno, limoneno, γ -terpineno, dentre outros em quantidade ainda menor (PLAUSE, FLORES, ATAUCUSI, 2001; NAKATANI, 2003; SOUZA et al., 2006). Após análise por cromatografia gasosa das folhas de *C. zeylanicum*, o eugenol, mostrou-se como sendo o componente majoritário desta planta e em menor proporção também foram encontrados: o α -pineno, linalol, p-cimeno, dentre outros (LIMA et al., 2005; CARMO, 2008). Como também, na análise química do óleo de *Caryophyllus aromaticus* L., foram observados a presença de diversos constituintes, sendo o eugenol, como sendo o componente majoritário e outros constituintes de menor proporção, como β -cariofileno, α -humuleno e α -pineno (JIROVETZ et al., 2006; TULLIO et al., 2007).

Como podemos observar na tabela 9, os resultados do fitoconstituinte α -pineno, frente aos microrganismos testados, mostraram que a CIM de 320 μ L/mL foi capaz de inibir o crescimento de 76% dos fungos, com halos de inibição variando de entre 8 à 35 mm de diâmetro. A resistência de várias cepas, ao α -pineno e sua elevada CIM tornou este fitoconstituinte pouco atrativo, como possível alternativa, para a terapia antifúngica.

É interessante observar que todas as cepas de *Aspergillus* foram resistentes à todas as concentrações de α -pineno, assim como, *Cladosporium herbarium* ATCC 26362 e *Cryptococcus neoformans* FGF-5.

Tabela 9 – Média dos resultados (n=2) da CIM, do fitoconstituente α -pineno sobre cepas de fungos leveduriformes e filamentosos.

Espécies Fúngicas	Óleo essencial (μ L/mL)							Nistatina 100UI	Cetoconazol (50 μ g/mL)	Controle
	320	160	80	40	20	10	5			
	Halos de inibição (mm)									
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	15	12	10	9	7	0	0	20	13	+
<i>C. albicans</i> LM-142	9	0	0	0	0	0	0	25	25	+
<i>C. albicans</i> ATCC 7645	8	0	0	0	0	0	0	26	30	+
<i>C. tropicalis</i> LM-14	17	14	0	0	0	0	0	24	30	+
<i>C. krusei</i> ATCC 6252	15	13	12	8	8	7	0	13	20	+
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	20	14	13	9	8	7	0	20	24	+
<i>C. krusei</i> LM-09	18	0	0	0	0	0	0	20	30	+
<i>C. krusei</i> LM-08	15	0	0	0	0	0	0	24	35	+
<i>C. neoform.</i> LM-10	14	10	0	0	0	0	0	25	26	+
<i>C. neoform.</i> FGF-5	0	0	0	0	0	0	0	27	30	+
<i>T. rubrum</i> 64T	35	24	16	10	0	0	0	22	28	+
<i>T. rubrum</i> ATCC 28184	12	10	8	0	0	0	0	12	23	+
<i>T. rubrum</i> LM-78T	22	18	14	10	0	0	0	24	27	+
<i>T. rubrum</i> LM-800	30	20	10	0	0	0	0	26	28	+
<i>T. mentagrophytes</i> LM-640	30	24	20	12	6	0	0	11	23	+
<i>M. gypseum</i> ATCC 184	14	12	10	7	0	0	0	8	18	+
<i>M. canis</i> LM-36	22	16	10	0	0	0	0	20	30	+
<i>C. herbarium</i> ATCC 26362	0	0	0	0	0	0	0	18	8	+
<i>A. flavus</i> LM-02	0	0	0	0	0	0	0	21	20	+
<i>A. fumigatus</i> IPP-21	0	0	0	0	0	0	0	15	12	+
<i>A. fumigatus</i> ATCC 40640	0	0	0	0	0	0	0	18	10	+

+: Crescimento das cepas fúngicas no meio de cultura isento de produto antifúngico

Dentre os antifúngicos padrões, o cetoconazol foi a droga mais promissora frente as cepas testadas, exceto para as espécies de *Aspergillus flavus* LM-02 e *Aspergillus fumigatus* IPP-21 e ATCC40640, que se mostraram mais susceptíveis à ação da nistatina, porém não sensível ao fitoconstituente, α -pineno. Já com base na quantidade de cepas resistentes ao fitoconstituente, e a elevada CIM_s do mesmo, descartamos a possibilidade de realização os demais testes com o α -pineno.

O citral é o principal fitoconstituente do *Cymbopogon citratus* D.C. que contém em suas folhas cerca de 0,3% de óleo essencial. Os óleos essenciais de cravo e de erva-cidreira também revelaram elevado efeito inibitório contra *Aspergillus niger*. O conteúdo de eugenol foi o mais alto (47,64%) seguido de álcool benzílico (34,10%), no *C. aromaticus*, ao passo que geraniol (29,40%) e neral (21,39%) foram os grandes componentes do óleo essencial de *C. citratus*, juntamente com linalol (3,2%), geraniol (29,4%), dentre outros. Existem relatos que mostram o citral como sendo o constituinte, com função antifúngica, presente no óleo de erva-cidreira (ABDULLAH et al., 1975; PARANAGAMA et al., 2003).

Como podemos observar na tabela 10, os resultados do fitoconstituente citral frente aos microrganismos testados, mostrou que a CIM de 320 μ L/mL foi capaz de inibir o crescimento de 62% dos fungos, com halos de inibição variando de entre 9 à 28 mm de diâmetro, revelando boa atividade antifúngica frente às *Candidas*, exceto *C. albicans* LM-142 e dermatófitos, exceto *T. mentagrophytes* LM-640. As cepas de *C. herbarium* ATCC26362, *Aspergillus flavus* LM-02 e *A. fumigatus* IPP-21 e ATCC 40640, mostraram-se resistentes ao fitoconstituente. A resistência de várias cepas, ao citral e sua elevada CIM torna este fitoconstituente pouco atrativo, como possível alternativa, para a terapia antifúngica.

Tem se repetido, a eficácia dos antifúngicos padrões frente às cepas testadas, o cetoconazol foi a droga mais promissora frente aos microrganismos, exceto para as espécies *C. herbarium* ATCC 26362 e para as cepas de *Aspergillus* que se mostraram mais susceptíveis à ação da nistatina.

Tabela 10 – Média dos resultados (n=2) da CIM, do fitoconstituente citral sobre cepas de fungos leveduriformes e filamentosos.

Espécies Fúngica	Óleo essencial (µL/mL)							Nistatina 100UI	Cetoconazol (50µg/mL)	Controle
	320	160	80	40	20	10	5			
	Halos de inibição (mm)									
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	20	19	17	14	12	7	0	20	13	+
<i>C. albicans</i> LM-142	0	0	0	0	0	0	0	25	25	+
<i>C. albicans</i> ATCC 7645	28	26	24	17	12	10	0	26	30	+
<i>C. tropicalis</i> LM-14	19	17	15	12	10	7	0	24	30	+
<i>C. krusei</i> ATCC 6252	24	22	20	15	12	8	0	13	20	+
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	9	0	0	0	0	0	0	20	24	+
<i>C. krusei</i> LM-09	16	8	0	0	0	0	0	20	30	+
<i>C. krusei</i> LM-08	23	11	10	9	9	0	0	24	35	+
<i>C. neoform.</i> LM-10	19	17	15	12	10	7	0	25	26	+
<i>C. neoform.</i> FGF-5	20	19	18	14	12	10	7	27	30	+
<i>T. rubrum</i> 64T	19	17	15	12	10	0	0	22	28	+
<i>T. rubrum</i> ATCC 28184	19	17	14	10	8	0	0	12	23	+
<i>T. rubrum</i> LM-78T	20	18	14	10	7	0	0	24	27	+
<i>T. rubrum</i> LM-800	23	21	17	15	10	8	0	20	28	+
<i>T. mentagrophytes</i> LM-640	0	0	0	0	0	0	0	11	23	+
<i>M. gypseum</i> ATCC 184	9	0	0	0	0	0	0	8	18	+
<i>M. canis</i> LM-36	23	21	17	14	12	8	0	20	30	+
<i>C. herbarium</i> ATCC 26362	0	0	0	0	0	0	0	18	8	+
<i>A. flavus</i> LM-02	0	0	0	0	0	0	0	21	20	+
<i>A. fumigatus</i> IPP-21	0	0	0	0	0	0	0	15	12	+
<i>A. fumigatus</i> ATCC 40640	0	0	0	0	0	0	0	18	10	+

+: Crescimento das cepas fúngicas no meio de cultura isento de produto antifúngico

No trabalho de Lima (2005), confirmou-se através de GC-MS que o óleo essencial de *C. zeylanicum* possui o eugenol como fitoconstituente majoritário (60%) e na literatura, há relatos de que as atividades antimicrobianas de alguns óleos essenciais, como os óleos de *C. zeylanicum* e *C. aromaticus*, deve-se ao eugenol (SELLAN, 2002; AMARAL & BARA, 2005; GAYOSO et al., 2005).

Os resultados dos estudos de atividade antifúngica do fitoconstituente eugenol, encontrados na tabela 11, mostrou que a CIM₉₀ é igual 80µL/mL, com halos de inibição variando de entre 9 à 32mm de diâmetro.

Dentre os antifúngicos padrões, utilizados como controle o cetoconazol foi a droga mais promissora frente as cepas testadas, exceto para as espécies *C. herbarium* e para as cepas de *Aspergillus* que se mostraram mais susceptíveis à ação da nistatina e do fitoconstituente eugenol.

Este fitoconstituente foi uma das mais interessantes alternativas à terapia antifúngica, testado no presente trabalho, tornando-o, candidato à novos ensaios para a elucidação do mecanismo de ação. No entanto, durante a revisão bibliográfica recente, verificou-se que o mecanismo de ação do eugenol, foi elucidado por Lee e colaboradores (2007). Apesar de descartarmos o eugenol dos próximos ensaios, fica a certeza da correta execução do nosso trabalho que já apontava este fitoconstituente como sendo uma promissora alternativa á terapia antifúngica.

Com base nos resultados, apenas alguns óleos essenciais são considerados promissores, como agentes antifúngicos, para serem usados em futuras formulações farmacêuticas. Os seguintes óleos essenciais seguem para os próximos ensaios: *O. vulgare*, *O. majorana* e *C. zeylanicum*.

Tabela 11 – Média dos resultados (n=2) da CIM, do fitoconstituente eugenol sobre cepas de fungos leveduriformes e filamentosos

Espécies Fúngicas	Óleo essencial (µL/mL)							Nistatina 100UI	Cetoconazol (50µg/mL)	Controle
	320	160	80	40	20	10	5			
	Halos de inibição (mm)									
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	32	30	22	18	16	14	8	20	13	+
<i>C. albicans</i> LM-142	35	30	20	18	14	11	0	25	25	+
<i>C. albicans</i> ATCC 7645	35	32	24	18	12	0	0	26	30	+
<i>C. tropicalis</i> LM-14	30	20	18	16	12	8	0	24	30	+
<i>C. krusei</i> ATCC 6252	19	18	16	11	0	0	0	13	20	+
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	21	19	9	0	0	0	0	20	24	+
<i>C. krusei</i> LM-09	25	23	21	20	10	8	0	20	30	+
<i>C. krusei</i> LM-08	30	25	20	14	9	0	0	24	35	+
<i>C. neoform.</i> LM-10	32	30	28	26	16	0	0	25	26	+
<i>C. neoform.</i> FGF-5	32	30	28	24	18	14	12	27	30	+
<i>T. rubrum</i> 64T	37	35	32	30	28	18	16	22	28	+
<i>T. rubrum</i> ATCC 28184	18	16	12	10	0	0	0	12	23	+
<i>T. rubrum</i> LM-78T	23	21	18	14	10	7	0	24	27	+
<i>T. rubrum</i> LM-800	38	30	20	18	14	0	0	26	28	+
<i>T. mentagrophytes.</i> LM-640	18	15	14	9	0	0	0	11	23	+
<i>M. gypseum</i> ATCC184	30	24	16	14	0	0	0	8	18	+
<i>M. canis</i> LM-36	17	16	9	0	0	0	0	20	30	+
<i>C. herbarium</i> ATCC 26362	30	28	26	24	20	12	0	18	8	+
<i>A. flavus</i> LM-02	30	26	22	20	12	8	0	21	20	+
<i>A. fumigatus</i> IPP-21	32	30	28	26	20	12	0	15	12	+
<i>A. fumigatus</i> ATCC 40640	24	20	18	12	0	0	0	18	10	+

+: Crescimento das cepas fúngicas no meio de cultura isento de produto antifúngico

Dentre os fitoconstituintes testados, apenas o eugenol, mostrou ser um promissor agente antifúngico. Porém o mecanismo de ação deste fitoconstituente elucidado por Lee e colaboradores (2007), sugere que a ação antifúngica deste fitoconstituente se deve ao fato, deste se ligar a membrana dos microrganismos e, assim, danificá-las.

5.4. Cinética de morte fúngica

O ensaio sobre a cinética fúngica, foi realizado com os óleos essenciais de *C. zeylanicum*, *O. vulgare* e *O. majerona*. Os fungos selecionados, Nos próximos ensaios, serão utilizados, somente representantes de cepas leveduriformes, como *Candida albicans* ATCC 7645 e *Cryptococcus neoformans* FGF-5 e cepas de fungos filamentosos como *Trychophyton rubrum* LM-800, *Microsporum canis* LM-36 e *Aspergillus flavus* LM-02, por terem sido considerados as cepas fúngicas mais sensíveis aos óleos essenciais escolhidos para maiores investigações. Levou-se também, em consideração, a patogenicidade destes microrganismos. As cepas fúngicas filamentosas, foram mantidas à 28-30°C e a leitura do seu crescimento foi feito em diferentes intervalos de tempo (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 14 dias) e para os fungos leveduriformes, que foram mantidos à 28°C/48h com os óleos essenciais, foram feitas contagens do número de colônias viáveis, em diferentes intervalos de tempo (0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 14h) e comparadas com o controle (DELACRETAZ, 1974; TODA et al., 1988; COLOMBO et al., 1995).

Para a realização destes ensaios, foram usados valores de CIMs dos óleos essenciais *C. zeylanicum*, *O. majerona* e *O. vulgare*, capazes de inibir mais de 50% das cepas fúngicas testadas. O ensaio avaliou o crescimento de *C. albicans* ATCC7645, sujeito aos óleos essenciais de *O. vulgare*, CIM de 80µL/mL, *O. majorana*, CIM de 160µL/mL e *C. zeylanicum*, CIM de 80µL/mL, em tempos diferentes. Sendo o cetoconazol, CIM de 50µL/mL, o antifúngico escolhido como padrão. Todos os óleos essenciais testados mostraram, o que os dados dos testes anteriores já indicavam, potente atividade antifúngica destes óleos essenciais frente à cepa de *Candida albicans* ATCC7645, representante das espécies de fungos leveduriformes.

Ao longo de 24 horas, a cinética de morte da cepa testada, foi considerada significativa ($p < 0,05$) quando comparados aos valores da cepa não tratada (Gráfico 1). Entretanto, ambos os óleos essenciais de canela e orégano, na CIM de $80\mu\text{L/mL}$, exibiram atividade antifúngica semelhante e discretamente mais alta que a atividade antifúngica do óleo essencial de manjerona, cuja CIM é de $160\mu\text{L/mL}$, ou seja, o óleo essencial de *O. majorana* precisou do dobro da CIM dos óleos essenciais de *C. zeylanicum* e *O. vulgare* para promover seu efeito antifúngico. Ainda assim, o seu efeito letal é semelhante ao do cetoconazol, considerado como antifúngico sintético padrão.

Os óleos foram capazes de promover uma queda acentuada no crescimento da levedura, ao longo dos intervalos avaliados sendo estabelecido um efeito fungicida após 4 horas de exposição. Esta atividade antifúngica foi comparada ao efeito fungistático e fungicida do cetoconazol. O derivado azólico mais utilizado em nosso meio continua sendo o cetoconazol. Sua ação promove alterações na membrana da célula fúngica, mas pode ocasionar reações adversas no hospedeiro. Sua atividade, assim como a do miconazol, é predominantemente fungistática, embora possa agir em situações especiais como fungicida (DANESHMEND & WARNOCK, 1983; EPSTEIN, 1990; LEWIS et al., 1991; MUZYKA & GLICK, 1995).

Um composto tem sido considerado como tendo um forte efeito fungicida quando é capaz de causar uma diminuição de 99,9% do inóculo inicial (Espinell Ingroff, 1992). Não houve diferença significativa ($p > 0,05$), encontrada entre as contagens da leveduras frente aos óleos essenciais e o antifúngico padrão, cetoconazol. O cetoconazol foi incluído no ensaio de cinética de crescimento, porque nenhum dos fungos testados apresentaram resistência a ele em ensaio de difusão em meio sólido. Os outros antifúngicos sintéticos de referência mostraram uma fraca capacidade de inibir, pelo menos uma cepa testada.

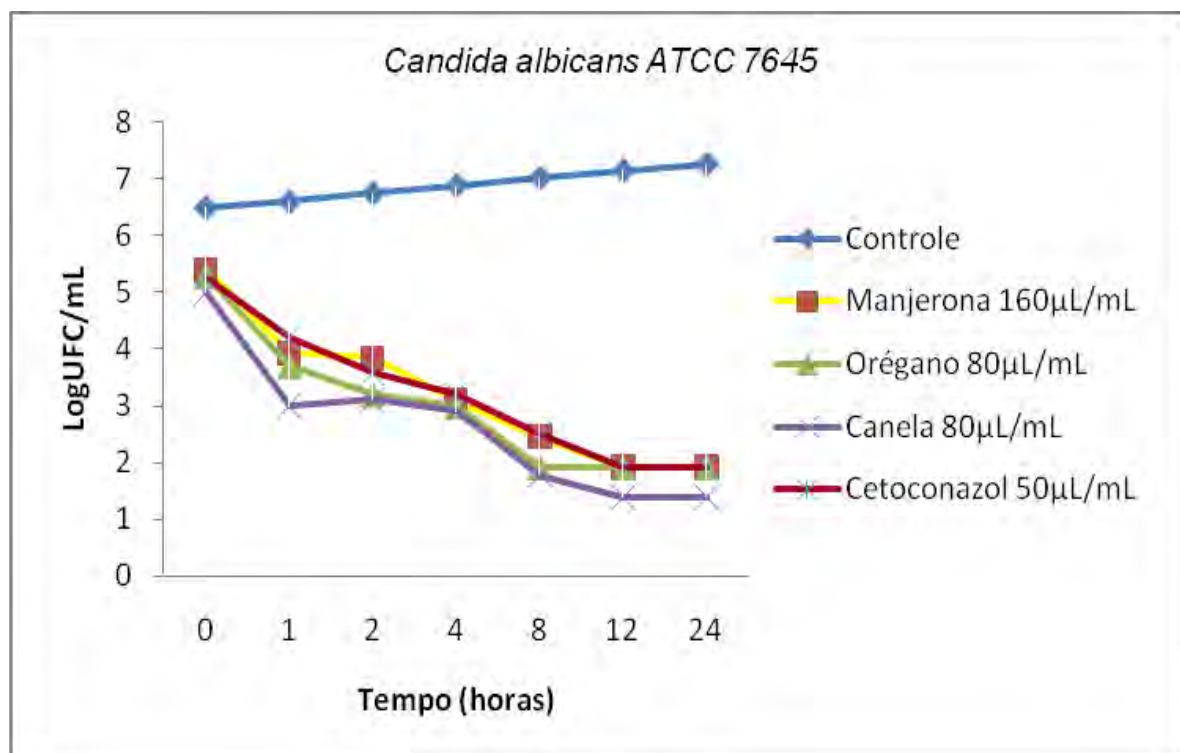


Gráfico 1: Efeito dos óleos essenciais de Orégano (*Origanum vulgare*); Manjerona (*Origanum majorana*) e Canela (*Cinamonum zeylanicum*) sobre a cinética de morte de *Candida albicans* ATCC7645. T-Tukey ($p < 0,05$).

O efeito do óleo essencial sobre o crescimento radial do micélio dos dermatófitos *T. rubrum* ATCC-28184 e *M. canis* LM-36 em meio sólido é mostrada no gráfico 2 e 3, respectivamente. Os óleos essenciais exibiram um efeito fumigante contra ambos os fungos, mostrando efeito letal contra os fungos após 2 dias. O *T. rubrum* e *M. canis* apresentaram um leve aumento no crescimento radial quando expostos a 50 µg/mL de cetoconazol. Mas isso se explica pelo fato de que os azóis, drogas consideradas fungistáticas, apresentam início de atuação retardado pela necessidade de entrada de droga na célula fúngica e necessária inibição do metabolismo celular. Durante esse período, geralmente ocorre crescimento do organismo utilizado como inóculo do ensaio, independente da concentração, de antifúngico, utilizada. Assim, a inibição tardia da multiplicação do microrganismo permite a visualização do seu tênue crescimento residual, sendo este fenômeno denominado de *trailing* (SCHREIBER, 2007)

No entanto, o crescimento de bolores foi sempre menor que o observado para o ensaio controle. A cepa controle mostrou uma taxa constante de crescimento micelial ao longo dos tempos avaliados, indicando o bom efeito antifúngico dos óleos essenciais testados.

Mitchell et al. (2009) relataram que o óleo essencial de *O. vulgare*, com CIMs 0,6, 1,25 e 2,5 µL/mL promovem efeito letal contra *A. flavus* e *A. parasiticus* após 2 dias de exposição.

Carmo et al. (2008) constataram que o óleo essencial de *C. zeylanicum* (20 - 80 µL/mL) causou inibição do crescimento micelial de *A. niger* ao longo de 14 dias. Os resultados de outros pesquisadores corroboram com os dados obtidos no presente trabalho. Os óleos essenciais de *O. vulgare*, *O. majorana* e *C. zeylanicum*, mostraram os seus efeitos fungistáticos, comparáveis, ou por vezes melhores, do que os efeitos observados com o antifúngico padrão.

O gráfico 4 apresenta o crescimento do micélio da cepa controle de *A. flavus* LM-02, numa taxa constante de crescimento e 100% de inibição do micélio frente ao cetoconazol e aos óleos essenciais de *O. vulgare* e *C. zeylanicum*, mas discreto crescimento do micélio, quando testado com o óleo essencial de *O. majorana*. Quando comparado ao controle, apresenta efeito fumigante após 2 horas de exposição.

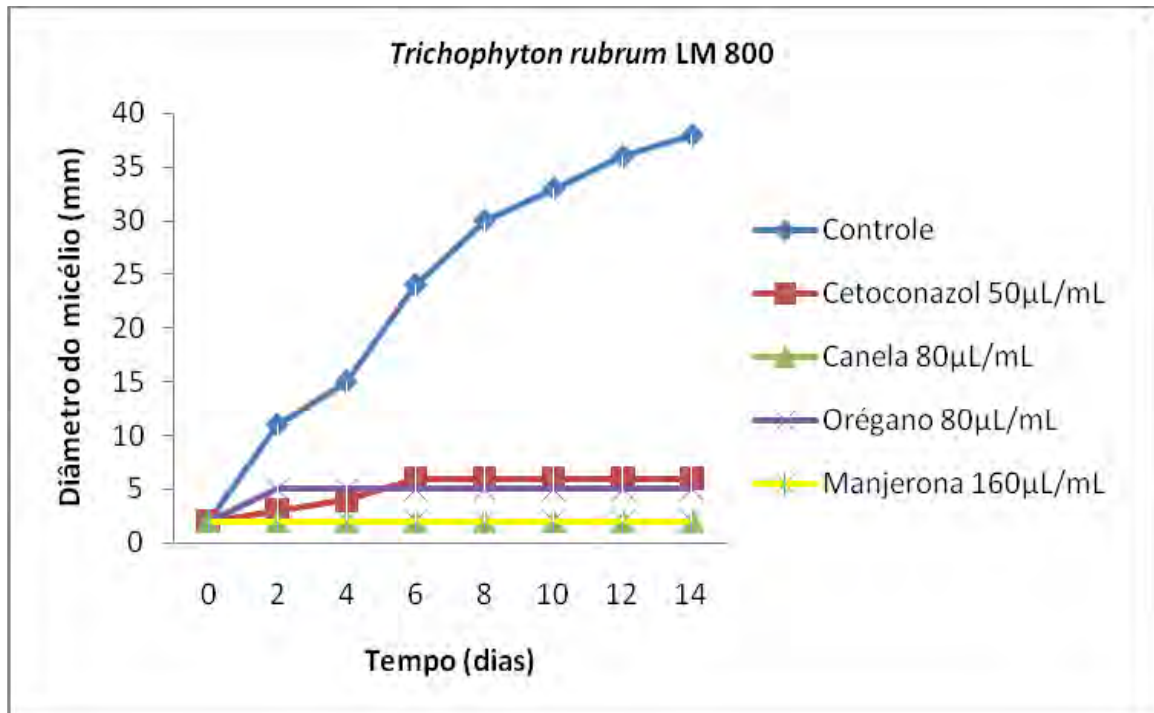


Gráfico 2: Efeito dos óleos essenciais de Orégano (*Origanum vulgare*); Manjerona (*Origanum majorana*) e Canela (*Cinamonum zeylanicum*) sobre a cinética de morte de *T. rubrum* LM 800. T-Tukey ($p < 0,05$).

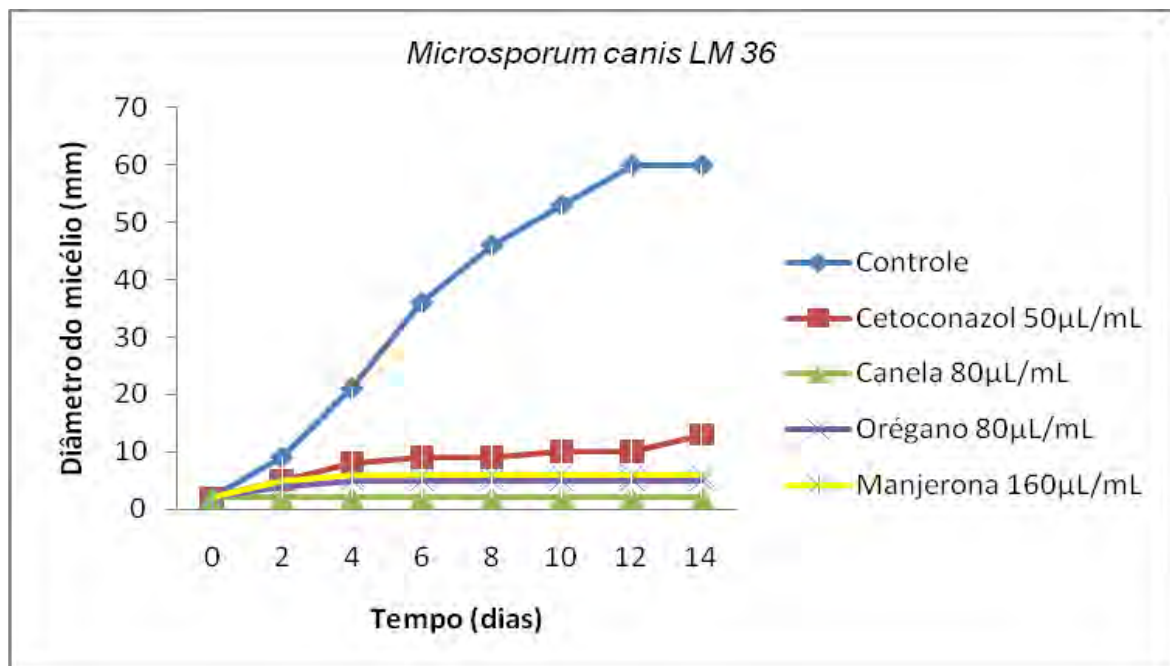


Gráfico 3: Efeito dos óleos essenciais de Orégano (*Origanum vulgare*); Manjerona (*Origanum majorana*) e Canela (*Cinamonum zeylanicum*) sobre a cinética de morte de *M. canis* LM 36. T-Tukey ($p < 0,05$).

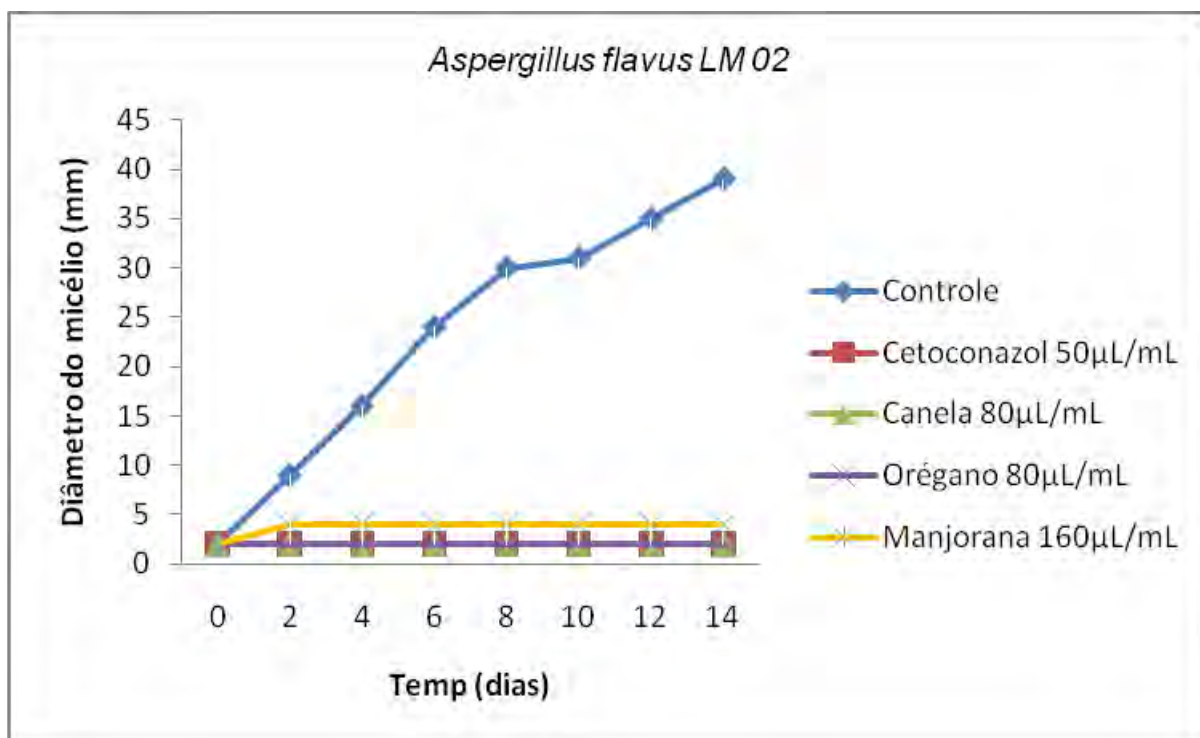


Gráfico 4: Efeito dos óleos essenciais de Orégano (*Origanum vulgare*); Manjerona (*Origanum majorana*) e Canela (*Cinamonum zeylanicum*) sobre a cinética de morte de *A. flavus* LM 02. T-Tukey (p<0,05).

Os óleos essenciais exibiram um efeito fumigante contra os fungos filamentosos. As figuras 38 e 39, mostraram o efeito letal do óleo essencial de *C. zeylanicum* contra a cepas *M. canis* LM-36, após 4 e 10 dias. O fungo filamentosos apresentou um leve aumento no crescimento radial quando exposto ao cetoconazol com CIM de 50 µg/mL, observado no gráfico 3 e nas figuras 39 e 39.

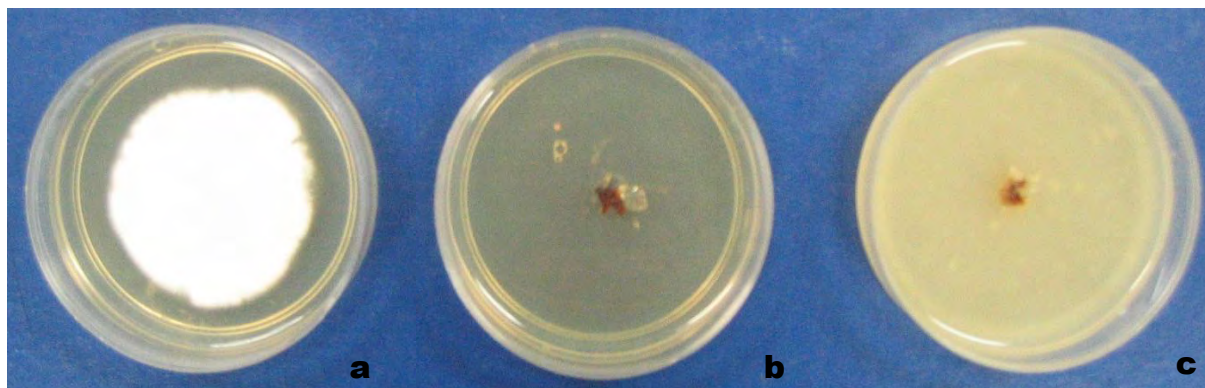


Figura 37 - Cinética de morte microbiana da cepa controle, *M. canis* LM 02 (38a). Cepa exposta ao cetoconazol, CIM 50 μ L/mL (38b) e Cepa exposta ao óleo essencial de *C. zeylanicum*, 80 μ L/mL (38c), respectivamente, após 4 dias de interação

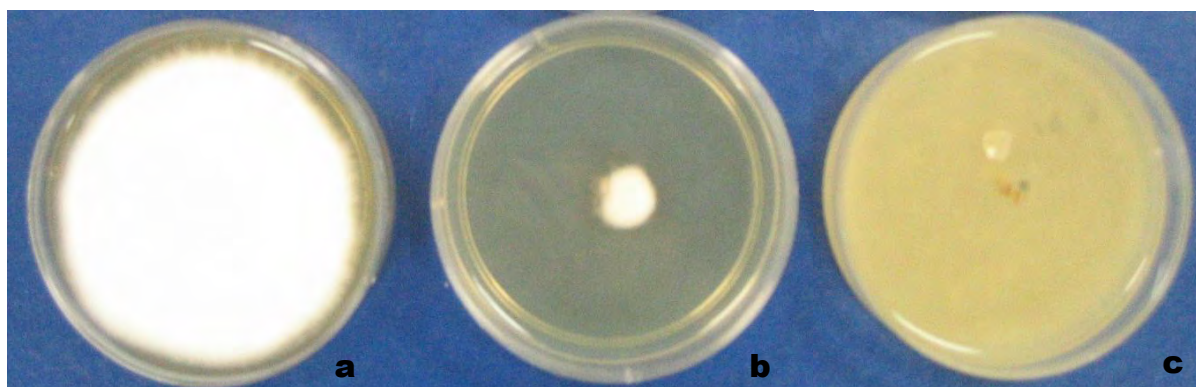


Figura 38 - Cinética de morte microbiana da cepa controle, *M. canis* LM 02 (39a). Cepa exposta ao cetoconazol, CIM 50 μ L/mL (39b) e Cepa exposta ao óleo essencial de *C. zeylanicum*, 80 μ L/mL (39c), respectivamente, após 10 dias de interação

5.5. Concentração Inibitória Mínima (CIM) pela macrodiluição e Concentração Fungicida Mínima (CFM).

Em 1997 foi liberado o documento NCCLS M27-A, referente ao teste de suscetibilidade aos antifúngicos pelo método de macrodiluição e microdiluição em caldo para leveduras e em 1998 foi editado o NCCLS M38-P, específico para formas de conídios de fungos filamentosos. Vários estudos comparativos

entre testes através da macro e microdiluição em caldo foram reportados por Pujol e colaboradores (1996) que observaram a não existência de diferenças discrepantes entre os dois testes. No entanto, a maioria dos estudos estavam preocupados apenas com fungos leveduriformes (ESPINEL-INGROFF et al., 1995). Os aspectos mais relevantes dos testes de susceptibilidade, para fungos filamentosos, eram melhor observados pela macrodiluição.

Os resultados dos ensaios da CIM pela macrodiluição e CFM, apresentados na tabela 12, mostraram notável atividade antifúngica dos óleos essenciais de *C. zeylanicum*, *O. majorana* e *O. vulgar*, entretanto, por ser laborioso, consumir muito tempo, requerer muito espaço no laboratório e gerar grande quantidade de resíduos, é usado pequeno número de réplicas (SAHM & WASHINGTON II, 1991; ZGODA & PORTER, 2001). No presente trabalho, os testes foram realizados em duplicata (n=2).

Na tabela 12, observou-se a ação do óleo essencial de *O. vulgare*, contra duas espécies de *Candida* e três espécies de fungos filamentosos, com valores de CIM variando de 0,003 à 0,03 μ L/mL e valores de CFM, variando de 0,007 à 0,06 μ L/mL, pode-se afirmar que, este óleo essencial apresenta excelente atividade fungistática e fungicida, mesmo em baixas concentrações do óleo. Resultados semelhantes foram observados quando o óleo essencial de *C. zeylanicum* foi testado, apresentando uma CIM variando de 0,003 à 0,03 μ L/mL e valores de CFM, variando de 0,007 à 0,06 μ L/mL. Quando o óleo essencial testado foi *O. majorana*, observou-se valores de CIM, variando de 0,12 à 1 μ L/mL e valores de CFM, variando de 0,25 à 2 μ L/mL.

Os resultados obtidos, mostraram baixos valores de CIMs e CFMs < 0,06 μ L/mL, para os óleos essenciais de *O. vulgare* e *Cinamonum zeylanicum* frente a todos os microrganismos testados, ou seja, excelente atividade fungicida. O óleo essencial de *O. majerona*, mostrou CIMs e CFMs < 2 μ L/mL, porém mesmo a CIM 2 μ L/mL que é a maior CIM de *O. majerona*, ainda é igual aos níveis séricos alcançados pela anfotericina B no organismo humano, conhecido por sua excelente atividade fungicida (DANESHMAND et al., 1983; HOEPRICH, 1992). Nosso estudo, à semelhança do que pudemos constatar na literatura consultada, mostrou que os óleos essenciais testados apresentaram excelente ação fungicida e fungistática *in vitro*. Bozin e

colaboradores (2006) também encontraram resultados semelhantes, ao testarem óleos essenciais, como o *O. vulgare*, frente a cinco dermatófitos e uma espécie de *Candida albicans*, com valores de CIM, variando de 1µL/mL à 2µL/mL, e valores de CFM, variando de 1µL/mL à 4µL/mL, exibindo notável atividade fungistática e fungicida.

Visto que ainda não existe um procedimento padrão, mundialmente aceito, para execução de antibiogramas para fungos, pode-se considerar que, métodos padronizados, reprodutíveis e exaustivamente avaliados em laboratórios de referência, devem ser empregados para estudar a atividade antifúngica dos produtos naturais. Foram avaliadas as CIMs e as CFMs dos óleos essenciais, como um dos melhores testes para avaliar a susceptibilidade das aos óleos.

TABELA 12 – Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM), dos óleos essenciais contra alguns fungos patogênicos.

Espécies Fúngicas	Óleos essenciais (µL/mL)					
	<i>Origanum vulgare</i> L.		<i>Origanum majorana</i> L.		<i>Cinamonum zeylanicum</i> L.	
	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
<i>C. albicans</i> ATCC 7645	0,015	0,03	0,5	1	0,015	0,03
<i>C. neoformans</i> FGF 5	0,015	0,03	0,5	1	0,015	0,03
<i>T. rubrum</i> LM 800	0,015	0,03	0,12	0,25	0,003	0,007
<i>M. canis</i> LM 36	0,003	0,007	0,12	0,25	0,003	0,007
<i>A. flavus</i> LM 02	0,03	0,06	1	2	0,03	0,06

5.6. Efeito dos óleos essenciais sobre a alterações morfológicas das hifas

Células tratadas com compostos que interferem com a biossíntese da parede celular muitas vezes têm características morfológicas distintas. As mudanças na morfologia podem sugerir o possível alvo ou o modo de ação dos inibidores de parede celular.

No presente trabalho, observaram-se grandes alterações micromorfológicas nos fungos testados, quando expostos aos óleos

essenciais de maior atividade antifúngica. Os resultados obtidos para as leveduras foram de difícil visualização, porém os resultados conferidos aos fungos filamentosos, como *A. flavus* LM 02, após exposição aos óleos essenciais, podem ser conferidos nas figuras 40, 41 e 42, sob o microscópio de luz, mostrado num aumento total de 400 x.

O exame microscópico do micélio de controle (células não tratadas) de *A. flavus* LM 02 mostrou a estrutura da célula regular com citoplasma homogêneo, conídios claramente visíveis e conidiação profusa sobre uma grande cabeça e irradiada conídios. O micélio, cultivado em meio adicionado de óleo essencial, apresentou algumas alterações morfológicas com distorções das hifas. As alterações morfológicas encontradas foram: diminuição do teor de citoplasma (hifas vazias), a perda de pigmentação, desenvolvimento distorcido de hifas e hifas vazias. As hifas tornaram-se distorcidas com intumescimento ao longo de toda sua estrutura e também foram observados, brotamentos apicais. O óleo essencial ainda causou uma clara ausência de conidiação. De Billeberk et al. (2001) e Rasooli e Abyaneh (2004) afirmam que esses tipos de alterações morfológicas nos moldes previstos pela exposição aos óleos essenciais, sugerem que o modo de atividade antifúngica destes óleos, acontecem devido ao ataque da parede celular e retração do citoplasma na hifa resultando na morte do micélio. Além disso, Carmo et al. (2008) relataram que essas modificações podem também estar relacionadas à interferência dos componentes do óleo essencial, em relação às reações de síntese da parede celular de fungos, afetando o crescimento e a morfogênese.

Estes resultados estão de acordo com os dados obtidos e relatados no ensaio do sorbitol, reforçando a tese de que a parede celular destes microrganismos, pode estar envolvida como alvo, na atividade antifúngica dos óleos essenciais testados. Frost et al (1995) afirmam que a combinação da análise de crescimento através do teste de sorbitol e o estudo das características micromorfológicas das células (Proteção do Sorbitol e Análise da Morfologia - SPAM) poderiam constituir o procedimento adequado para a detecção da ação antifúngica, sobre a parede celular.

A figura 39, mostra alguns acontecimentos anômalos flagrados pelo microscópio de luz, quando o fungo *A. flavus* foi submetido a sete dias de contato com o óleo essencial de *O. vulgare*. A figura 39a mostra o controle positivo do fungo e as figuras 39b e 39c mostram o fungo em contato com o óleo nas concentrações 0,015 μ L/mL e 0,03 μ L/mL, concentrações subinibitória e inibitória, respectivamente.

A figura 40 mostra a microfotografia dos acontecimentos intrínsecos às hifas de *A. flavus*, exposto ao óleo essencial de *O. majorana*, durante sete dias. As figuras 40a e 40b mostram os acontecimentos anômalos quando a cepa entra em contato com óleo, nas concentrações de 0,5 μ L/mL e 1 μ L/mL, concentrações subinibitória e inibitória mínima, respectivamente.

É possível visualizar nas figuras 41a e 41b, a cepa de *A. flavus* após exposição por sete dias, ao óleo essencial de *C. zeylanicum*, mostrando as mesmas mal-formações e eventos anteriores, quando a cepa foi exposta aos óleos essenciais de orégano e manjerona, perda de matéria citoplasmático visível e perda de pigmentação. A figura 41a representam as modificações ocorridas numa concentração subinibitória do óleo, e a figura 41b, mostra as modificações observadas na concentração inibitória mínima, 0,015 μ L/mL e 0,03 μ L/mL, respectivamente.

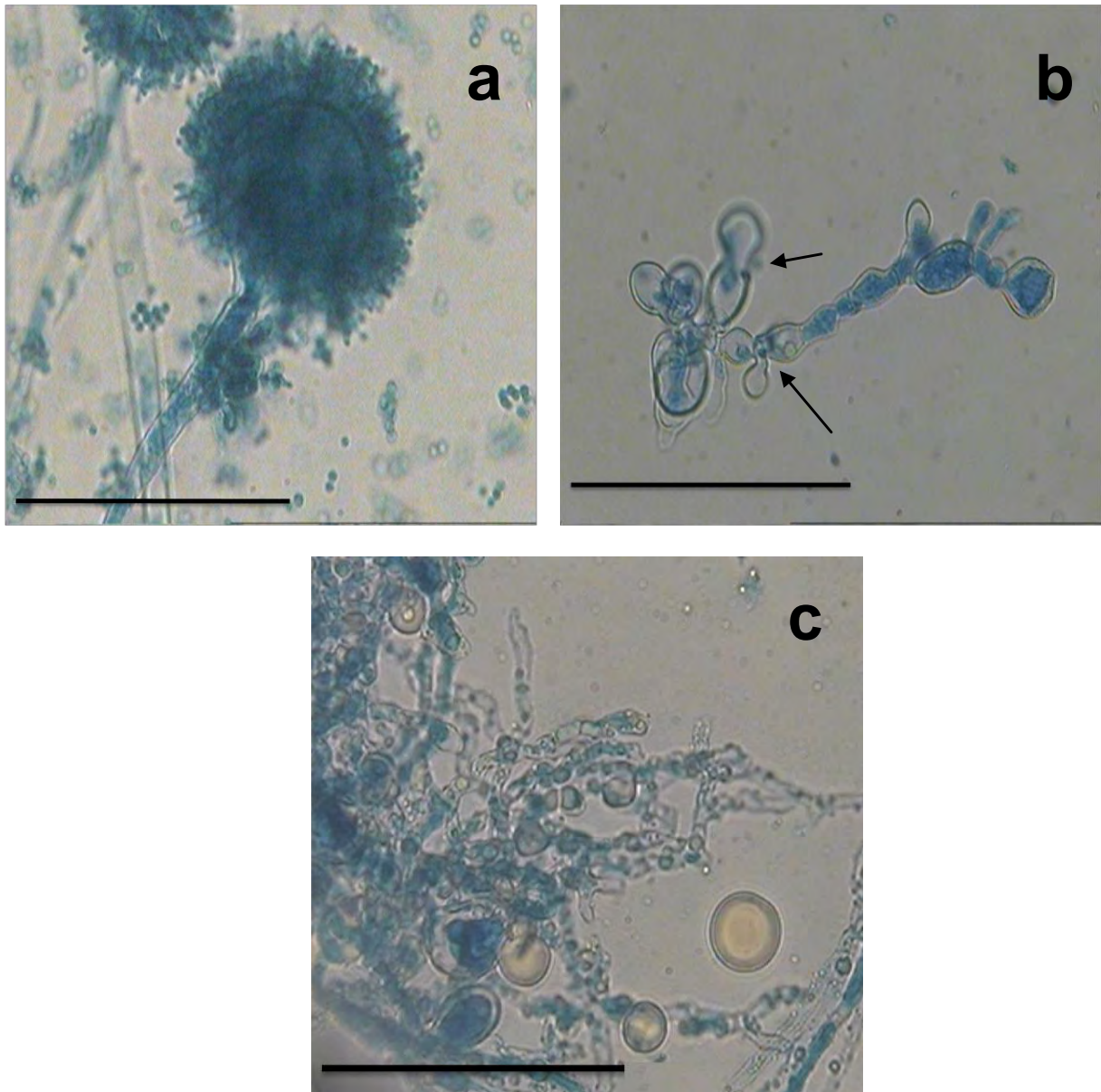


Figura 39 - Microfotografias de luz do micélio de *A. flavus* LM 02, crescendo na ausência ou na presença do óleo essencial de *O. vulgare*, durante 7-14 dias de incubação, entre 25 - 28 ° C. (a) cabeça conidial controle de *A. flavus*, grande e radiada, desenvolvimento de vesículas sobre os conidióforos, conídios claramente visíveis, Bar 100 µm. (b-c) Hifas modificadas induzidas pelo óleo essencial de *O. vulgare*, mostrando estruturas anômalas, com pequenos brotamentos e perda de pigmentação; perda visível, do conteúdo citoplasmático e destruição da estrutura celular, observada pelo rompimento da integridade das hifas. Barra 100 µm.

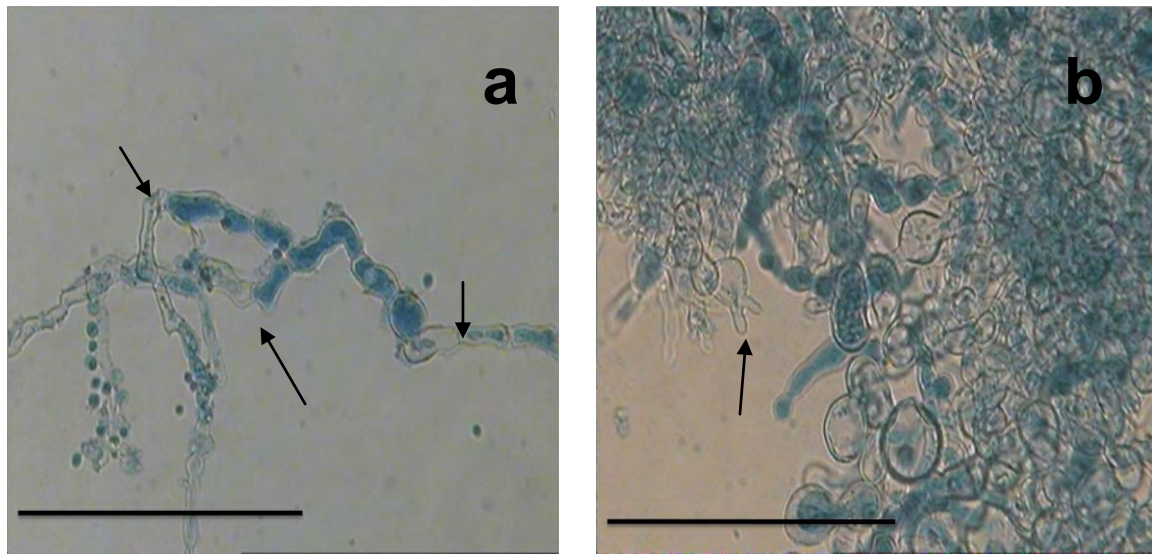


Figura 40 - Microfotografias de luz do micélio de *A. flavus* LM 02, crescendo na na presença do óleo essencial de *O. majorana*, durante 7-14 dias de incubação, entre 25 - 28 ° C. (a-b) Hifas modificadas induzidas pelo óleo essencial de *O. majorana*, mostrando estruturas anômalas, perda de pigmentação e perda visível, do conteúdo citoplasmático, observada pelo rompimento da integridade das hifas. Barra 100 µm.

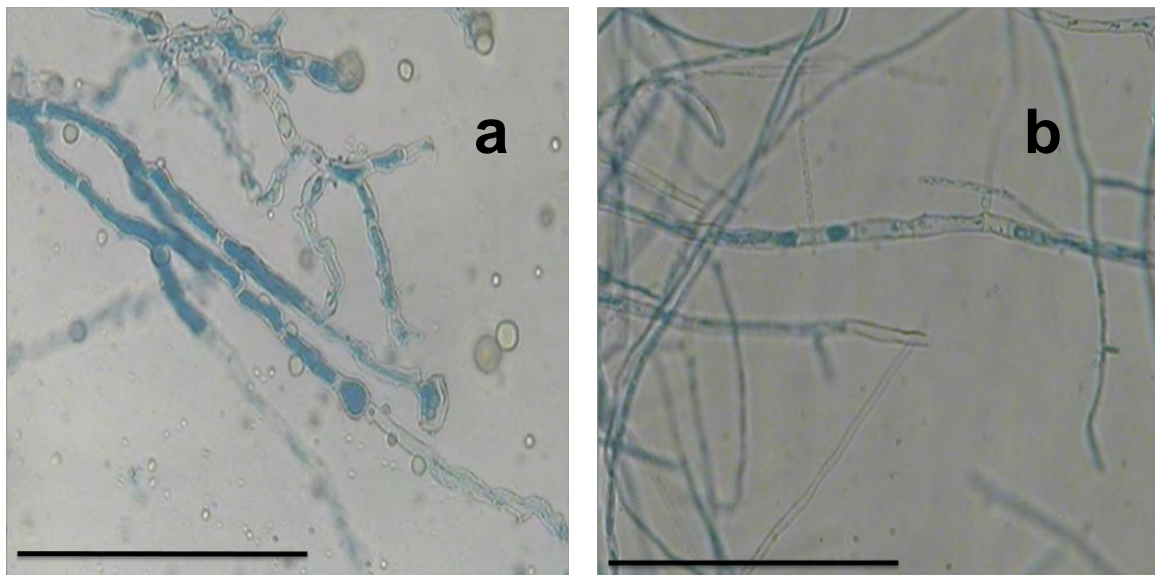


Figura 41 - Microfotografias do micélio de *A. flavus* LM 02, crescendo na na presença do óleo essencial de *C. zeylanicum*, após 7-14 dias de incubação, à 25 - 28 ° C. (a-b) Hifas modificadas, perda de pigmentação e perda visível, do conteúdo citoplasmático são modificações observadas pelo rompimento da integridade das hifas. Barra 100 µm.

As alterações morfológicas encontradas no presente trabalho com o óleo essencial de *C. zeylanicum* estão em concordância com estudos realizados por Carmo (2008) e sobre os óleos essenciais, estudados por Sharma e Tripatti (2006) que examinaram pela microscopia óptica, num aumento de 400 vezes, significativas alterações morfológicas em *A. niger* tratado com diferentes concentrações (0,5; 1,0; 2,0 μ L/mL) do óleo essencial de *Citrus sinensis*. Foram observadas modificações como perda de citoplasma da hifa fúngica, falta de esporulação, visível perda de pigmentação, redução da cabeça conidial, menor ou ausência total de conidiação, conidióforos totalmente distorcidos, além de hifas bifurcadas, tudo isso sob a luz da microscopia óptica. Na microscopia eletrônica, observou-se ruptura da parede celular da hifa na concentração de 2,0 μ L/mL.

5.7. Avaliação do possível mecanismo de ação antifúngica – Teste com sorbitol

Células tratadas com drogas que interferem na biossíntese da parede celular frequentemente têm características morfológicas distintas. As mudanças na morfologia podem sugerir os possíveis alvos ou modo de ação destes inibidores (FROST, 1995). Para continuar a investigação sobre antifúngicos que agem sobre parede celular, o antagonismo de um estabilizador osmótico e o ergosterol são cruciais para o processo.

Na tentativa de confirmar os resultados obtidos ao longo de todo o trabalho, o protetor osmótico, sorbitol, foi adicionado ao meio utilizado para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). O presente trabalho continuou testando o efeito do sorbitol sobre a cepa de *A. flavus* LM-02, que notadamente, através da microscopia óptica, apresentava mal-formações de suas hifas na presença dos óleos essenciais de *O. vulgare*, *O. majorana* e *C. zeylanicum* (Figura 30, 31 e 32). A CIM de *C. zeylanicum* na ausência de sorbitol foi de 0,015 μ L/mL, enquanto que na presença do protetor osmótico, foi de 0,15 μ L/mL, dez vezes maior que a concentração inicial. O óleo essencial de *O.vulgare* teve seu MIC aumentado em oito vezes, pois na ausência de sorbitol, a CIM foi de 0,015 μ L/mL, enquanto que na presença do protetor osmótico, a CIM foi de 0,12 μ L/mL, sugerindo que os óleos essenciais de *C.*

zeylanicum e *O. vulgare* têm seu modo de ação antifúngica ligado a danos causados na parede celular do microrganismo. O óleo de *O. majorana* teve seu MIC aumentado quatro vezes o valor da MIC sem o protetor osmótico, pois na ausência de sorbitol, a CIM foi de 0,5 µL/mL, enquanto que na presença do protetor osmótico, a CIM foi de 2 µL/mL, sugerindo que houve uma proteção limitada com o sorbitol (Tabela 13), fato este que pode ser explicado por Frost et al.(1995) quando diz que agentes antifúngicos, cujo modo de ação não está associado à síntese da parede celular ou que não interferem no processo de montagem da parede celular, mas mostram a interação inespecífica com outros alvos independentes, terão proteção limitada com sorbitol. Sendo esta, possivelmente a explicação para o baixo valor de CIM do óleo essencial de *O. manjerona* quando tratado com sorbitol.

Tabela 13 – CIM (na ausência e na presença de sorbitol) dos óleos essenciais de *O. vulgare* and *O. majorana* e *C. zeylanicum* contra fungo potencialmente patogênico*

Espécies (Família)	Nome popular	<i>Aspergillus flavus</i> LM 02	
		CIM (µL/mL)	CIM + sorbitol (µL/mL)
<i>Cinamonum zeylanicum</i> B. (Lauraceae)	Canela	0,015	0,15
<i>Origanum vulgare</i> L. (Labiatae)	Orégano	0,015	0,12
<i>Origanum majorana</i> L. (Labiatae)	Manjerona	0,5	2

* Média de CIM (n=3) na ausência e na presença de um protetor osmótico

5.8. Avaliação de mecanismo de resistência – Teste com inibidores da bomba de Efluxo

As proteínas de efluxo são conhecidas e largamente estudadas, em bactérias, mas não em fungos. Alguns pesquisadores, como Chamilos & Kontoyiannis (2005) que têm se dedicado à pesquisa sobre mecanismo de resistência promovido pelas proteínas de efluxo dos *Aspergillus fumigatus*, *A.*

flavus, *A. terreus*, *A. niger*, *A. nidulans*, *A. ustus*, *A. lentulus*, quando expostos à ação dos agentes antifúngicos, como os azoles, e possivelmente alilaminas.

Neste trabalho, testou-se cepas de *Aspergillus fumigatus* IPP 21 e ATCC 40640, por se mostrarem resistentes a grande maioria dos óleos essenciais testados desde a triagem inicial do estudo. Para as duas linhagens de *Aspergillus fumigatus* utilizadas, o valor da CIM para clorpromazina é o mesmo 0,08 µg/mL.

A clorpromazina (CPZ), inibidor da bomba de efluxo, foi incorporada ao meio de cultura na concentração correspondente a $\frac{1}{4}$ da CIM. Observou-se que para a linhagem *A. fumigatus* IPP-21 e ATCC 40640, quando testados com fluconazol, houve aumento dos valores das CIMs de todos os óleos essenciais (Tabela 14), sugerindo que não há bomba de efluxo nestas cepas ou provavelmente, o fluconazol não é substrato para a bomba de efluxo presente nas cepas de *A. fumigatus*.

A tabela 15 mostra que *A. fumigatus* IPP-21 e ATCC 40640, quando testados com anfotericina B, reduz os valores das CIMs de todos os óleos essenciais e da clorpromazina. Porém a redução da CIM da canela é mais acentuada do que para os outros óleos, sugerindo que a canela pode ser um potencial inibidor de proteínas de efluxo, destas cepas. Quando a anfotericina B é testada contra a cepa ATCC 40640, observamos redução acentuada de todas as CIMs dos óleos essenciais testados, indicando que a anfotericina B é substrato para a bomba de efluxo nesta cepa, e que os óleos essenciais são potenciais inibidores das proteínas de efluxo.

Tabela 14 - CIM do antifúngico Fluconazol (FLU), na presença e ausência do inibidor da bomba de efluxo, clorpromazina (CPZ) e dos óleos essenciais de orégano, canela e manjerona.

CIM (µg/mL)	Fluconazol	
	<i>A. fumigatus</i> IPP 21	<i>A. fumigatus</i> ATCC 40640
FLU	2,56 µg/mL	5,12 µg/mL
CPZ	0,08 µg/mL	0,08 µg/mL
FLU + ¼ CPZ	≤1,28 µg/mL	<2,56 µg/mL
FLU + ¼ Orégano	>1,28 µg/mL	>5,12 µg/mL
FLU + ¼ Canela	≤1,28 µg/mL	≥2,56 µg/mL
FLU + ¼ Manjerona	≤1,28 µg/mL	<2,56 µg/mL

Tabela 15 - CIM do antifúngico Anfotericina B (AB), na presença e ausência do inibidor da bomba de efluxo, clorpromazina (CPZ) e dos óleos essenciais de orégano, canela e manjerona.

CIM (µg/mL)	Anfotericina B	
	<i>A. fumigatus</i> IPP 21	<i>A. fumigatus</i> ATCC 40640
AB	0,04 µg/mL	0,02 µg/mL
CPZ	0,08 µg/mL	0,08 µg/mL
AB + ¼ CPZ	>0,04 µg/mL	≤0,02 µg/mL
AB + ¼ Orégano	>0,04 µg/mL	≤0,02 µg/mL
AB + ¼ Canela	≤0,02 µg/mL	≤0,02 µg/mL
AB + ¼ Manjerona	>0,02 µg/mL	>0,02 µg/mL

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Na triagem inicial em meio sólido, os óleos essenciais de *C. limonum*, *C. aromaticus*, *E. uniflora* e *M. officinalis*, não apresentam halos de inibição, quando comparado aos demais óleos;
- Os óleos essenciais e fitoconstituintes promissores foram testados contra vinte e uma cepas fúngicas. Foram definidas as CIMs capazes de inibir de 50% à 90% das cepas fúngicas;
- Os óleos essenciais de *O. vulgare*, *O. majorana* e *C. zeylanicum*, justificam sua utilização como compostos antifúngicos alternativos, devido a sua alta capacidade fungistática;
- O tempo de exposição, das cepas fúngicas aos óleos essenciais, foi importante na análise da cinética de morte fúngica, ao avaliar as leveduras e os fungos filamentosos, com pronunciado efeito fungicida após 4 horas de exposição;
- Não houve diferença significativa ($p > 0,05$), encontrada entre as contagens das leveduras e fungos filamentosos frente aos óleos essenciais e o antifúngico padrão, cetoconazol, confirmando poder fumigante dos óleos;
- A análise destas atividades fungicida e/ou fungistática dos óleos essenciais mostraram baixos valores de CIMs e CFMs ($< 0,06 \mu\text{L/mL}$), para os óleos essenciais de *O. vulgare* e *C. zeylanicum* frente aos microrganismos, indicando que estes óleos possuem alto poder de letalidade;
- O óleo essencial de *O. majorana*, mostrou CIMs e CFMs, com valores mais altos ($\leq 2 \mu\text{L/mL}$), porém mesmo a CIM $2 \mu\text{L/mL}$, encontrada como sendo a maior CIM de *O. majorana*, ainda é comparável aos níveis séricos alcançados pela anfotericina B, potente agente fungicida;
- O efeito fumigante, dos óleos essenciais, quando analisado sob a luz da microscopia óptica, mostra que o possível mecanismo de ação destes óleos acontece por interferir na formação da parede celular;

- Foram observadas modificações como: foram diminuição do teor de citoplasma (hifas vazias), a perda de pigmentação, desenvolvimento distorcido de hifas e hifas vazias;
- O teste com o sorbitol, protetor osmótico, teve o propósito de confirmar o modo de ação sugerido para alguns dos óleos essenciais, no presente trabalho;
- Observou-se que *C. zeylanicum* na ausência de sorbitol, possui uma CIM=0,015 µL/mL, e na presença do sorbitol, CIM=0,15 µL/mL, CIM, dez vezes maior que a concentração inicial, ou seja, a proteção da parede celular, causada pelo sorbitol, indica que este era o alvo do óleo essencial de canela;
- Observou-se que *O. vulgare* na ausência de sorbitol, a CIM=0,015 µL/mL, e na presença do sorbitol, CIM=0,12 µL/mL, CIM, oito vezes maior que a concentração inicial, ou seja, a proteção da parede celular, causada pelo sorbitol, indica que este era o alvo do óleo essencial de orégano;
- O óleo de *O. majorana* teve seu CIM aumentado apenas quatro vezes o valor da CIM sem o protetor osmótico. mas a proteção limitada com sorbitol, nos permite sugerir interação inespecífica com outros alvos, como esteróides de membrana, inibidores da síntese de DNA/RNA ou atuação sobre as topoisomerasas fúngicas;
- O ensaio com a clorpromazina (CPZ), inibidor da bomba de efluxo, que testa o mecanismo de resistência fúngica, mostra que a CPZ possui CIM=0,08µg/mL, quando testada com fluconazol (FLU) e apresentou CIM≤1,28µg/mL, contra os microrganismos *A. flavus* IPP21 e ATCC 40640, mostrando que o fluconazol não é substrato para a bomba de efluxo ;
- Quando o teste acontece com anfotericina B (AB), a CPZ apresentou discreta redução da CIM> 0,04 em comparação com a CIM da clorpromazina sem o antifúngico padrão, CIM=0,08µg/mL, mostrando que AB, é substrato para a bomba de efluxo;
- A redução da CIM da canela com a CPZ é mais acentuada do que em outros óleos essenciais, CIM ≤0,02µg/mL, indicando que o antifúngico AB é substrato para a bomba de efluxo existente no microrganismo testado e que a canela é inibidor destas proteínas de efluxo;

- **Baseado nos resultados, sugere-se que os óleos essenciais de *C. zeylanicum* e *O. vulgare*, atuem como inibidores de parede celular, processo este, mostrado pela microscopia óptica e pelo ensaio com o sorbitol, sugerindo também que outros mecanismos de atividade estão sendo responsáveis pela expressiva ação antifúngica do óleo essencial de manjerona.**

7 . PERSPECTIVAS

Devido ao crescimento das infecções fúngicas, cresce também, pela comunidade científica, o interesse por novos agentes antifúngicos menos tóxicos, mais seletivos e mais seguros.

O interesse pelos produtos naturais com efeito antifúngico e maior espectro de ação contra cepas resistentes, assim como efeitos colaterais reduzidos, têm sido alvo de uma busca incessante por parte de muitos pesquisadores que reconhecem a grande capacidade antifúngica dos produtos naturais, como extratos, óleos essenciais e fitoconstituintes. No presente trabalho, que precedeu o estudo pré-clínico, alguns óleos essenciais se mostraram agentes antifúngicos promissores para serem utilizados em formulações farmacêuticas sinergicamente aos antifúngicos padrões ou isoladamente em doses adequadas, após

Formulações farmacêuticas que atuem com propriedades fungistática e fungicida, inibidora de parede celular e inibidora de resistência fúngica, intrínseca aos óleos essenciais estudados, é a partir do presente trabalho, um novo desafio.

8. REFERÊNCIAS

ABDEL-RAHMAN, S. M.; NAHATA, M. C. Oral terbinafine: a new antifungal agent. *Annals of Pharmacother*, v.31, p.445-456, 1997.

ADAM, K. et al. Antifungal activities of *Origanum vulgare* subsp. *Hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia* and *Salvia fruticosa* essential oils against Fuman Pathogenic Fungi. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, v.46, p.1739-1745, 1998.

ALIGIANS, N. et al. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two *Origanum* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.49, p.4168-4179, 2001.

ALLEGRIANI, J.; BOUCHBERG, M. S.; MAILLOLS, H. Emulsions d'huiles essentielles fabrication et applications en microbiologie. *Société de Pharmacie de Montpellier*, v.33, n.1, p.86, 1973.

ALLINGER, N. L. et al. *Química orgânica*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1978.

ALMEIDA, E. R. *Plantas medicinais brasileiras*. São Paulo: Hemus, 1993. 343 p.

ALONSO, R. J. *Tratado de fitomedicina: bases clinicas y farmacologicas*. Buenos Aires: ISIS, 1998.

ALVES, T. M. de A. et al. Biological screening of brazilian medicinal plants. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v.95, n.3, p.367-373, mayo/jun, 2000.

ALZATE, D. A. et al. Evaluation of phytotoxicity and antifungal activity against *Colletotrichum acutatum* of essential oils of thyme (*Thymus vulgaris*), lemongrass (*Cymbopogon citratus*), and its mais constituents. *Vitae*, v.16, n.1, p.116-125, 2009.

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

AMORIM, A. C. L. Antinociceptive and hypothermic evaluation of the leaf essential oil and isolated terpenoids from *Eugenia uniflora* L. *Brazilian Pitanga*, v.16, p.923-928, 2009.

AMORIM, E. L. C. et al. Fitoterapia: instrumento para uma melhor qualidade de vida. *Infarma*, v.15, n.1-3, p.66-69, 2003.

ANAISSE, E. Opportunistic mycoses in immunocompromised host: experience at a Cancer Center and review. *Clinical Infectious Diseases*, v.14, p.43-53, 1992.

ANDRADE, E. H. A. et al., Chemical composition of the Essential oils of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf cultivated in north of Brazil. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, v.12, p.41-45, 2009.

ANDREAZZA, R. C. S. Análise botânica, química e microbiológica de *Salvia aliciae*, *S. lachnostachys* Benth, *S. microphylla* Kunth, *S. officinalis* L. (Lamiaceae). 2000. 125f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2000.

ARAÚJO, J. C. L. V. et al. Ação antimicrobiana de óleos essenciais sobre microrganismos potencialmente causadores de infecções oportunistas. *Revista de Patologia Tropical*, v.33, p.55-64, 2004.

ATANDA, O. O.; AKPAN, I.; OLUWAFEMI, F. The potential of some essential oils in the control of *A. parasiticus* CFR223 and aflatoxin production, *Food Control*, v.18, n.5, p.601-607, 2007.

BARATTA, M. T. et al. Chemical composition, antimicrobial and oxidative activity of laurel, sage, rosemary, oregano and coriander essential oils. *Journal of Essential Oil Research*, v.10, p.618–627, 1998.

BARON, E. J.; FINEGOLD, S. M. *Bailey & Scott's: diagnostic microbiology*. 8.ed. St. Louis: C.V. Mosby, 1990.

BAUER, A. W. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, v.45, p. 493-496, 1966.

BEART, J. E.; LILLEY, T. H.; HASLAM, E. Plant polyphenols – secondary metabolism and chemical defense: some observations. *Phytochemistry*, v. 24, p. 33-38, 1985.

BELEM, L. F. Estudo epidemiológico da Pitiríase versicolor no Estado da Paraíba e avaliação química e antifúngica de produtos naturais e sintéticos contra seu agente etiológico. 2002. 177f. Tese (Doutorado) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2002.

BELOFSKY, G. et al. Metabolites of the “smoke tree”, *Dalea spinosa*, potentiate antibiotic activity against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Natural Products*, v.69, p.261-264, 2006.

BHAVANANI, S. M.; BALLOW, C. H. New agents for Gram-positive bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, v.13, p.528-534, 1992.

BORGMANN, S. et al. Two episodes of vancomycin resistant *Enterococcus faecium* outbreaks caused by two genetically different clones in a newborn intensive care unit. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, v.207, n.4, p. 366-389, 2004.

BOZIM, B. et al. Characterization of the volatile composition of essential oils of some Lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant activities of entire oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.54, p.1822-1828, 2006.

BRODY, T. M. et al. *Farmacologia humana: de molecular a clínica*. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994.

BURGESS, D. S. Princípios Farmacodinâmicos dos Tratamentos Antimicrobianos na Prevenção da Resistência. *The Cardiopulmonary and Critical Care Journal*, v.2, Suplem.1, p.19-23, 2000. (Edição em português)

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. *International Journal of Food Microbiology*, v.94, n.3, p.223-253, 2004.

BUSSATTA, C. et al. Application of *Origanum majorana* L. essential oil as an antimicrobial agent in sausage. *Food Microbiology*, v.25, p.207-21, 2008.

BUTTERY, R. G. et al. California bay oil. I. Constituents, odor properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.22, p.773-777, 1974.

CABIB, E.; KANG, M. S.; AU YOUNG, J. Chitin synthase from *Saccharomyces cerevisiae*. New York: Academic Press, 1987. p. 643 – 649. (Methods in enzymology, 138).

CARMO, E. S. Susceptibilidade de fungos do gênero *Aspergillus* a óleos essenciais. 2008. 113f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade federal da Paraíba, João Pessoa, 2008.

CARMO, E. S.; LIMA, E. O.; SOUZA, E. O. The potential of *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) essential oil in inhibiting the growth of some food-related *Aspergillus* species. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.39, p.362-367, 2008.

CARRICONDE, C. et al. *Plantas medicinais & plantas alimentícias*. Olinda: UFRPE, 1996. v.1

CARVALHO, J. C. T.; SARTI, S. J. Produção de extratos vegetais para uso terapêutico e cosmético. Ribeirão Preto: Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais de Ribeirão Preto, 1995.

CASALS, J. B. Tablet sensitivity testing of pathogenic fungi. *Journal of Clinical Pathology*, v.32, n.7, p.719-722, 1979.

CECANHO, R. et al. Efeito do extrato hidroetanólico de *Mikania laevigata* sobre o crescimento bacteriano e a produção de glucanos por estreptococcus do grupo mutans. In: REUNIÃO ANUAL DA FESBE, 14., 1999, Caxambú. Anais... Caxambu: Federação de Sociedade de Biologia Experimental, 1999. p.290.

CÉGIELA-CARLIOZ, P. et al. Modulation of Multi-drug Resistance (MDR) in *Staphylococcus aureus* by Osha (*Ligusticum porteri* L., Apiaceae) essential oil compounds. *Flavour and Fragrance Journal*, v. 20, p. 671-675, 2005.

CHAO, S.; YOUNG, D. G.; OBERG, C. J. Screening for inhibitory of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. *Journal of Essential Oil Research*, v.12, p.639-649, 2000.

CHARLES, D. J.; SIMON, J. E. Comparison of extraction methods for the rapid determination of essential oil content and composition of basil. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, v.115, p.458-462, 1990.

CHAURASIA, S. C.; VYAS, K. K. In vitro effect of some volatile oil against *Phytophthora parasitica* var. *piperita*. *Journal of Research in Indian Medicine Yoga and Homeopath*, p.24-26, 1977.

CHÁVEZ, J. P. Terpenóides de *Ocotea corymbosa* [Meissn] Mez. 1991. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1991.

CHIN LU, Y. In vitro study of pyrrolnitrin. *Journal of the American Medical Association*, v.70, p.19-22, 1971.

CLEELAND, R.; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials *in vitro* and animal experimentall animal infection. In: Lorian, V. M. D. *Antibiotics in Laboratory Medicine*. 3. ed., Baltimore: Willians and Wilkins, 1991. p. 739-89.

COLOMBO, A. et al. Evaluation of the E test system versus a microtitre broth method for antifungal susceptibility testing of yeasts against fluconazole and itraconazole. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.36, p.93-100, 1995.

CORREA, M. P. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1984. v.1

COSTA, A. F. Farmacognósia. 3. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1975. v.1

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, v.12, n.4, p.564-582, 1999.

CRAVEIRO, A. A. et al. Óleos essenciais de plantas do Nordeste. Fortaleza: U.F.C., 1981. p. 7-19.

CRAVEIRO, A. A.; DE QUEIROZ, D. C. Óleos Essenciais e Química Fina. *Química Nova* 16 (3): 224-228,1993.

CROY, S. R.; KNOWN, G. S. The effects of Pluronic block aggregation state of nystatin. *Journal Controlled Release*, v.95, n.2, p.161-171, 2004.

CRUZ, G.L. Livro verde das plantas medicinais e industriais do Brasil. Belo Horizonte: Velloso, 1965.

D`AURIA, F. D. et al. Antifungal activity of *Lavandula angustifolia* essential oil against *Candida albicans* yeast and mycelial form. *Medical Mycology*, v.43, p.391-396, 2005.

DAFERERA, D. J.; ZIOGAS, B. N.; POLISSIOU, M. G. GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.48, p.2576-2581, 2000.

DANESHMEND, T. K.; WARNOCK, D. W. Clinical pharmacokinetics of systemic antifungal drugs. *Clinical Pharmacokinetics*, v.8, p.17-42, 1983.

DAS-DÔRES, R. G. R. et al. Fitoterapia e alopatia: a atenção farmacêutica "verde". *Infarma*, Belo Horizonte, v.15, n.1/3, p.62-65, 2003.

DAVIS, P. Aromaterapia. São Paulo: Martins Fontes, 1996.

DEANS, S.G.; SVOBODA, K.P. The antimicrobial proprieties of marjoram (*Origanum majorana* L.) volatile oil. *Flavour and Fragrance Journal*, v.5, p.187-190, 1990.

DELACRETAZ, J.; GRIGORIU, D.; DUCCEL, G. Atlas de mycologiemédicale. Paris: Masson et Cie, 1974. 187p.

DI DOMENICO, B. Novel antifungal drugs. *Current Opinion in Microbiology*, v.2, p.509-515, 1999.

DI STASI, L. C. Arte, ciência e magia. In: _____. Plantas medicinais: arte e ciência: um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: UNESP, 1996. p. 161-186.

DIAS, C. M. S. A linguagem química das plantas. Disponível em: <<http://geocities.com/~esabio/interacao/principal.htm>>. Acesso em: 24 out. 2005.

DICKSON, R. A. et al. Antimicrobial, resistance-modify effects, antioxidant and free radical scavenging activities of *Mezoneuron benthamianum* Baill., *Securinega virosa* Roxb. & wild. and *Microglosssa pyrifolia* Lam. *Phytotherapy Research*, v.20, p.41-45, 2006.

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

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

EPSTEIN, J. B. Antifungal therapy in oropharyngeal mycotic infections. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology, v.69, p.32-41, 1990.

ESPINEL-INGROFF, A. et al. Comparison study of broth macrodilution and microdilution antifungal susceptibility tests. Journal of Clinical Microbiology, v.26, n.6, p.1089-10945, 1991.

ESPINEL-INGROFF, A. In vitro fungicidal activities of voriconazole, itraconazole and amphotericin B against opportunistic moniliaceous and dermatiaceous fungi. Journal of Clinical Microbiology, v.39, p.958-958, 2001.

ESPINELL-INGROFF, A. et al. Collaborative comparison of broth macrodilution and microdilution antifungal susceptibility tests. Journal of Clinical Microbiology, v.30, n.12, p.3128-3145, 1992.

EZZEDDINE, N. B. et al. Antibacterial screening of Origanum majorana L. oil from Tunisia. Journal of Essential Oil Research, v.13, p.295–297, 2001.

Estrutura Química da anfotericina B. Disponível em <Http://www.netdrugs.info/dci/anfote.shtml>. Acesso dia 02 de junho de 2010.

Estrutura Química da nistatina. Disponível em <http://pt.wikipedia.org/wiki/Nistatina>. Acesso dia 02 de junho de 2010

Estrutura Química da nistatina. Disponível em <http://pt.wikipedia.org/wiki/griseofulvina> Acesso dia 02 de junho de 2010

Estrutura Química da nistatina. Disponível em <http://pt.wikipedia.org/wiki/flucitosina> Acesso dia 02 de junho de 2010

Estrutura Química da nistatina. Disponível em <http://pt.wikipedia.org/wiki/miconazol> Acesso dia 02 de junho de 2010

Estrutura Química da nistatina. Disponível em <http://pt.wikipedia.org/wiki/cetoconazol> Acesso dia 02 de junho de 2010

Estrutura Química da nistatina. Disponível em <http://pt.wikipedia.org/wiki/itraconazol> Acesso dia 03 de junho de 2010

Estrutura Química da nistatina. Disponível em <http://pt.wikipedia.org/wiki/voriconazol> Acesso dia 03 de junho de 2010

Estrutura Química da nistatina. Disponível em <http://pt.wikipedia.org/wiki/fluconazol> Acesso dia 03 de junho de 2010

Estrutura Química da nistatina. Disponível em <http://pt.wikipedia.org/wiki/terbinafina> Acesso dia 04 de junho de 2010

Estrutura Química da nistatina. Disponível em <http://pt.wikipedia.org/wiki/caspofungina> Acesso dia 04 de junho de 2010

Estrutura Química da citral, eugenol e α -pineno. Disponível em http://pt.wikipedia.org/wiki/%C3%93leo_essencial Acesso dia 04 de junho de 2010

FALEIRO, L. et al. Antibacterial and antioxidant activities of essential oil isolated from *Thymbra capitata* L. and *Origanum vulgare* L. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.53, n.21, p.8162-8168, 2005.

FARAH, C. S.; ASHMAN, R. B.; CHALLACOMBE, S. J. Oral candidosis. Clinics in Dermatology, v.18, n.5, p.553-562, 2000.

FETROW, C. W.; ÁVILA, J. R. Manual de medicina alternativa para o profissional. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

FILE Jr, T. M. Visão geral sobre resistência bacteriana nos anos 90. The Cardiopulmonary and Critical Care Journal, v.2, Suplem.1, p.3-9, 2000. (Edição em português).

Figura da parede celular fúngica. Cedido por: <http://www.abev.com.br/controldeinfeccao/palestras/resistencia.pdf> Acesso em: 13 fevereiro. 2010.

Figura do *C. zeylanicum* (canela). Disponível em: www.tecnocientista.info/nd.asp.cod=6313. Acesso em: 13 fevereiro. 2010.

Figura do *C. limonum* (limão). Disponível em: www.ethnopharmacologia.org/default.asp?page=p...limão. Acesso em: 13 fevereiro. 2010.

Figura do *C. aromaticus* (cravo). Disponível em: http://aromacoresabor.com/imq/cravo_da_india.jpg. Acesso em: 13 fevereiro. 2010.

Figura do *C. citratus* (capim santo). Disponível em: <http://websmed.portoalegre.rs.gov.br/emily.html>. Acesso em: 13 fevereiro. 2010.

Figura da *E. uniflora* (pitanga). Disponível em: <http://www.e-jardim.com/adm/fotos/Eugenia%20uniflora>. Acesso em: 13 fevereiro. 2010.

Figura do *E. globulus* (eucalipto). Disponível em: www.forestis.pt/forestis/multimedia. Acesso em: 13 fevereiro. 2010.

Figura da *M. officinalis* (erva cidreira). Disponível em: <http://ipt.olhares.com/data/big/153/1533526.jpg>. Acesso em: 13 fevereiro. 2010

Figura do *L. nobilis* (louro). Disponível em:
<www.receitamaneira.com.br/.../folha-de-louro>. Acesso em: 13 fevereiro. 2010.

Figura do *O. majorana* (manjerona). Disponível em:
<www.klickeducacao.com.br/.../Ma/11812/4170.jpg>. Acesso em: 13 fevereiro. 2010.

Figura do *O. vulgare* (orégano). Disponível em:
< www.about-garden.com/fe/en/0001-origanum >. Acesso em: 13 fevereiro. 2010.

FLAKE, R. H.; TURNER, B. L. Volatile Constituents, especially terpenes, and their utility and Potential as taxonomic characters in Populational studies. In: BENDZ, G.; SANTISSON, J. Chemistry in Botanical Classification. New York: Academic Press, 1973. p.123-128.

FLAMINI, G.; TEBANO, M.; GIONI, P. Volatilies emission patterns of differents plants organs and pollen of Citrus limon. Analytica Chimica Acta, v.589, p.120-124, 2007.

FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L.; FERREIRA, M. B. C. Farmacologia clínica: fundamentos da terapêutica racional. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

FUKUDA, D. et al. A complex of fungal cell wall inhibitors produced by a mold, p. 211, 1991.

FUKUSHIMA, Y.; SAKAGAMI, Y.; MARUMO, S. β -Glucan biosynthesis inhibitors isolated from fungi as hyphal malformation inducer. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, v.3, p.1219-1222, 1993.

GALLI, A.; FRANZETTI, L.; BRIGUGLIO, D. Attività antimicrobica in vitro di oil essenziali ed estratti di spezie di uso alimentare. Industrie Alimentari, v.24, p.463-466, 1985.

GAYOSO, C. W. et al. Ação inibitória do óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* Blume, α -pineno, β - pineno sobre fungos isolados de onicomioses. Jornal Brasileiro de Fitomedicina, v. 1, p. 25-29, 2004.

GAYOSO, C. W. et al. Sensitivity of fungi isolated from onycomycosis to 99 *Eugenia caryophyllata* essential oil and eugenol. Fitoterapia, v.76, p. 247-249, 2005.

GHANNOUM, M.; RICE, L. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. Clinical Microbiology Reviews, v.12, n.4, p.501-517, Oct. 1999.

GIBBONS, S.; MOSER, E.; KAATZ, G.W. Catechin gallates inhibit multidrug resistance (MDR) in *Staphylococcus aureus*. Plant Letter, v.70, p.1-3, 2004.

GIBBONS, S.; OLUWATUYI, O.; KAATZ, G. W.; A novel inhibitor of multidrug efflux pumps in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.51, p.13-17, 2003.

GIBBONS, S.Anti-staphylococcal plant natural products. *Natural Product Reports*, v.21, p.263-277, 2004

GILMAN, A. G.; HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. As bases farmacológicas da terapêutica. 10.ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2003.

GOTTLIEB, O. R.; KAPLAN, M. A. C. Amazônia: tesouro químico a preservar. *Ciência Hoje*, v.11, n.61, p.17-20, 1990.

GOTTLIEB, O. R.; KAPLAN, M. A. C.; BORIN, M. R. M. B. Biodiversidade: um enfoque químico-farmacológico. Rio de Janeiro: UFRJ, 1996.

GUNJI, S.; ARIMA, K.; BEPPU, T. Screening of antifungal antibiotics according to activities inducing morphological abnormalities. *Agricultural and Biological Chemistry*, v.47, p.2061-2068, 1983.

HAC-WYDRO, K.; DYNAROWICZ-LATKA, P. Interaction between nystatin and natural membrane lipids in Lagmuir monolayers – the role of a phospholipids in mechanism of polyenes mode of action. *Biophysical Chemistry*, v. 123, p. 154-161, 2006.

HADACEK, F.; GREGER, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. *Phytochemical Analysis*, v.11, p.137-44, 2000.

HANN, I. M.; PRENTICE, H.G. lipid-based amphotericin B: a review of the last 10 years of use. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v.17, p.161-169, 2001.

HARBONE, J. B. Introduction to ecological biochemistry. 3. ed. London: Academic Press, 1988.

HELLASL, G. A. et al. Effects of *Cymbopogon citratus* L. Essential Oil on the growth, morphogenesis and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* ML-2 strain. *Journal of Basic Microbiology*. v.47, p.5-15, 2007.

HERTWIG, I. F. Plantas aromáticas e medicinais: plantio, colheita, secagem e comercialização. São Paulo: Icone, 1986. 449 p.

HOAREAU, L.; DaSILVA, E. J. Medicinal plants: a re-emerging health aid. *Electronic Journal of Biotechnology*, v.2, n.2, p. 56-70, Aug. 1999.

HOEPRICH, P. D. Clinical use of amphotericin B and derivates: lore, mystique and fact. *Clinical Infectious Diseases*, v.14, Suppl.1, p.S114-S119, 1992.

HOLETZ, F. B. et al. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v.97, n.7, p.1027-1031, 2002.

HOLLEY, R. A.; PATEL, D. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. Food Microbiology, v.22, p.273–292, 2005.

HOOG, G. S. et al. Atlas of Clinical Fungi, 2.ed. Utrecht: CBS, 2000.

HULIN, V. et al. Les propriétés anti-microbiennes des huiles essentielles et composés sàrômes. Sciences des Aliments, v.18, p.563-582, 1998.

INOUYNE, S. et al. A novel method to estimate the contribution of the vapour activity of essential oils in Agar diffusion assay. Japanese Journal of Medical Mycology, v.47, p.91-98, 2006.

IRKIN, R. et al. Effectiveness of *Cymbopogon citratus* L. essential oil inhibit the growth some filamentous fungi and yeasts. Journal of Medicinal Food, v.12, p.193-197, 2009.

JAYAPRAKASHA, G. K. et al . Chemical composition of volatile oil from *Cinamomum zeylanicum* buds. Zeitschrift fur Naturforschung C-A Journal of Biosciences, v.57 n.11/12, p.990- 993, 2002.

JIROVETZ, L. et al. Chemical composition and antioxidant properties of clove leaf essential oil. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.54, n.17, p.6303-6307, 2006.

JOÃO, K. H. L. et al. Levantamento preliminar das espécies de *Mentha* L. (Labiatae) ocorrentes asselvajados e cultivados no Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE BOTÂNICA, 36., 1985, Curitiba. Anais... Curitiba: Sociedade Botânica do Brasil, 1985. p. 601-618.

JOHNSON, E. M. et al. Comparison in *in vitro* antifungal activities of free and liposomeencapsulated nystatin with those of four amphotericin B formulations. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v.42, p.1412-1416, 1998.

KAATZ, G. W.; SEO, S. M.; KRISTIASEN, J. E. Phenothiazianes and thioxanthenes inhibit multidrug efflux pump activity in *Staphylococcus aureus*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v.47, p.719-726, 2003.

KAILEH, M. et al. Screening of indigenous palestinian medicinal plants for potential anti-inflammatory and citotoxic activity. Journal of Pharmacology, v.113, p.510-516, 2007.

KOBA, K, et al. In vitro cytotoxic activity of *Cymbopogon citratus* L and *Cymbopogon nardus* L essential oils from Togo. Bangladesh Journal of Pharmacology, v.4, p.29-34, 2009.

KOLACZKOWSKI, M.; MICHALAK, K.; MOTOHASHI, N. Phenothiazines as potent modulators of yeast multidrug resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v.22, p.279-283, 2003.

KONEMAN, E. W. et al. Diagnóstico microbiológico: texto e atlas. 2.ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana, 1993.

LACAZ, C. S. et al. Guia para identificação de fungos actinomicetos e algas de interesse médico. 8.ed. São Paulo: Sarvier, 1998.

LACAZ, C. S. et al. Tratado de micologia médica. São Paulo: Savier, 2002. 1104p.

LANCIOTTI, R. et al. Use of natural aroma compounds to improve shelf-life and safety of minimally processed fruits. *Trends of Food Science & Technology*, v15, n.3/4, p.201-208, 2004.

LARONE, D. H. Medically important fungi: a guide to identification. 3.ed. Washington: American Society for Microbiology, 2000.

LAVABRE, M. Aromaterapia: a cura pelos óleos essenciais. 5.ed. Rio de Janeiro: Nova Era, 2001.

LEE SOOK, J. I. N. et al. Antifungal effect of Eugenol and Nerolidol against *Microsporium gypseum* in a Guinea Pig Model. *Biological and Pharmaceutic Bulletin*, v.30, n.1, p.184-188, 2007.

LEWIS, M. A. O.; SAMARANAYAKE, P.; LAMEY, P. J. Diagnosis and treatment of oral candidosis. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v.49, n.9, p.996-1002, 1991.

LI, E.; CLARK, A.; HUFFORD, C. Antifungal evaluation of pseudolaric acid B, a major constituent of *Pseudolarix kaempferi*. *Journal of Natural Products*, v.58, p.57-67, 1995.

LIMA, E. O. O estudo das dermatofitoses em João Pessoa – Paraíba e da atividade antifúngica de plantas medicinais da região contra alguns dos agentes isolados. 1996. 180f. Tese (Doutorado área de análises clínicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

LIMA, M. P. et al. Constituintes voláteis das folhas e dos galhos de *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae). *Acta Amazônica*, v.35, n.3, p.363-366, 2005.

LIMA, O. I. et al. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.16, n.2, p.197-201, 2006.

LINTON, A. H. Theory of antibiotic inhibition zone formation, disc sensitivity methods and MIC determinations. In: RUSSELL, A. C.; QUESNEL, L. B.

Antibiotics: assessment of antimicrobial activity and resistance. London: Academic Press, 1983. p.19-30.

LÓPEZ, S. N. et al. *In vitro* antifungal evaluation and structure-activity relationship of a new series of chalcone derivatives and synthetic analogues, with inhibitory properties against polymers of fungal cell wall. Bioorganical and Medical Chemistry, v.9, n.8, p.1999-29013, Aug. 2001.

LORENZI, H. et al. *Laurus nobilis* L. In: _____. Árvores exóticas no Brasil: madeireiras, ornamentais e aromáticas. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2003. p.153.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2002.

MACHADO, V. L. L.; PALMA, M. S.; COSTA, O. M. Ação repelente das frações de óleos essenciais da folha de louro (*Laurus nobilis* L.) em ninfas e adultos de *Periplaneta americana* (L.) (Blatária: Blattidade). Anais da Sociedade Entomológica do Brasil, v.24, n.1, 1995.

MACIEL, M. A. M. et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. Química Nova, v.25, n.3, p.429-438, 2002.

MAGINA, M. D. A. et al. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of *Eugenia* species. Journal of Natural Medicines, v.63, p.345-350, 2009.

MAHANTA, J. J. et al. *Cymbopogon citratus* L. essential oil as a potential antifungal agent against key weed moulds of *Pleurotus* spp spawns. Flavour and Fragrance Journal, v.22, p.525-530, 2007.

MANCINI, D. A. P. et al. Antioxidants in aqueous extract from *Cinnamomum zeylanicum* Blume as inhibitors of influenza virus. Brazilian Journal of Pharmaceutical Science, v.35, n.1, p.155-160, 1999.

MARKHAN, P. et al. Multiple novel inhibitors of the NorA multidrug transporter of *Staphylococcus aureus*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v.43, p.2404-2408, 1999.

MATSUDA, H. et al. Inhibitory mechanism of costunolide, a sesquiterpene lactone isolated from *Laurus nobilis*, on blood-ethanol elevation in rats: involvement of inhibition of gastric emptying and increase in gastric juice secretion. Alcohol & Alcoholism, v.37, p.121-127, 2002.

MAZZAFERA, P. Efeito alopático do extrato alcoólico de cravo da Índia e eugenol. Revista Brasileira de Botânica, v.26, n.2, p.231-238, 2003.

McGINNIS, M. R. Laboratory handbook of medical mycology. New York: Academic Press, 1980.

MELETIADIS, J. et al. In vitro activities of new and conventional antifungal agents against clinical *Scedosporium* isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.46, p.62-68, 2002.

MENEZES, C. H. P.; NEUFELD, P. M. Bacteriologia e micologia: para o laboratório clínico. Rio de Janeiro: Revinter, 2006. 387p.

MENEZES, E. A. et al. Frequência e atividade enzimática de *Candida albicans* isoladas da mucosa bucal de crianças de uma creche da prefeitura de Fortaleza. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v.14, n.1, p.9-13, 2005.

MICHALAK, K. et al. Compounds that modulate multidrug resistance in cancer cells. *Cellular and Molecular Biology Letters*, v.6, p.362-368, 2001.

MIDLEY, G.; CLAYTON, Y. M.; HAY, R. J. Diagnóstico em cores: micologia médica. São Paulo: Manole, 1998.

MILOS, M.; MASTELIC, J.; LERKIVIC, I. Chemical composition and antioxidant effect of glycosidically bound volatile compounds from oregano (*Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum*). *Food Chemistry*, v. 71, p.79-83, 2000.

MIMS, C. A. et al. Microbiologia médica. São Paulo: Manole, 1995.

MITSCHER, L. A. et al. Antimicrobial agents from higher plants. *Lloydia*, v.35, p.157-166, 1972.

MOELLERING Jr, R. C. Novos desafios no campo das doenças infecciosas. In: PATÓGENOS emergentes nas doenças infecciosas: relatório especial Hospital Practice. [S.l.]: Euromédice, 2000. p.5-7.

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. *Química Nova*, v.24, n.1, p.105-111, 2001.

MOREIRA, A. C. P. Avaliação da atividade antifúngica de óleos essenciais e fitoconstituintes sobre fungos dematiáceos. 2006. 94f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2006.

MOREIRA, M. R. et al. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *Food Science and Technology*, v.38, n.5, p.565-570, 2005.

MORTON, J. F. Atlas of medicinal plants of middle America: Bahamas to Ucatan. Springfield: C.C. Thomas, 1981.

MUZYKA, B. C.; GLICK, M. A review of oral fungal infections and appropriate therapy. *The Journal of the American Dental Association*, v.126, n.1, p.63-72, 1995.

NAKATANI, N. Biologically functional constituents of spices and herbs. Journal of Japanese Society of Nutrition and Food Science, v.56, n.6, p.389-395, 2003.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Performance standards for aerobic antimicrobial susceptibility testing: document M2-A7, M7-A5 and Supplemental Tablets M-100-S10. [S.I.]: NCCLS, 2000.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium-forming filamentous fungi: proposed standard, document M38-P. Wayne: NCCLS, 1998.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard M27. Villanova: NCCLS, 1997.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS/ CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Método de referência para testes de diluição em caldo para determinação da sensibilidade de leveduras à terapia antifúngica: norma aprovada. 2.ed. ANVISA, v. 22, n. 15, 2005.

NIERO, R. et al. Aspectos químicos e biológicos de plantas medicinais e considerações sobre fitoterápicos. In: BRESOLIN T. M. B.; CECHINEL FILHO, V. Ciências farmacêuticas: contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos. Itajaí, SC: UNIVALI, 2003. p.10-56.

NOVACK, J. et al. Ratios of cis-and trans-sabine hydrate in *Origanum majorana* L. and *O. midrophyllum* (Bentham). *Biochemical Systematics and Ecology*, v.28, p.697-704, 2000.

OAKLEY, K.L.; MOORE, C.B.; DENNING, D.W. Comparison of *in vitro* activity of liposomal nystatin (Nyotran) against *Aspergillus* species with those of nystatin, amphotericin B (AB) deoxycholate, AB colloidal dispersion, liposomal AB, AB lipid complex, and itraconazole. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.43, p.1264-1246, 1999.

ODDS, F. C. Antifungal activity of saperconazole (R 66905) in vitro. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.24, p.533-537, 1989.

OKIGBO, R. N.; OGBONNAYA, U. O. Antifungal effects of two tropical plant leaf extracts *Ocimum gratissimum* and *Aframomum melegueta*) on postharvest yam (*Dioscorea* spp.) rot. *African Journal of Biotechnology*, v.5, n.9, p.727-731, 2006.

OLIVEIRA, J. L. T. et al. Effectiveness of *Origanum vulgare* L. and *Origanum majorana* L. essential oils in inhibiting the growth of bacterial strains isolated from the patients with conjunctivitis. *Brazilian Archives of Biology and Technoogy*, v.52, p.45-50, 2009.

OLUWATUYI, M.; KATZ, G.W.; GIBBONS, S. Antibacterial and resistance modifying activity of *Rosmarinus officinalis*. Phytochemistry, v.65, p.3249-3254, 2004.

PAAKKONEN, K.; MALMSTEN, T.; HYVONEN, L. Drying packaging and storage effects on quality of basil, marjoram and wild marjora. Journal of Food Science, v.55, p.1373-1382, 1990.

PANIZZA, S. Plantas que curam. São Paulo: IBRASA, 28.ed., 1997. 279p.

PEREA, S.; PATTERSON, T. F. Antifungal resistance in pathogenic fungi. Clinical Infectious Diseases, v.35, n.9, p.1073-1080, 2002.

PERFECT, J. R. et al. The impact of culture isolation of *Aspergillus* species: a hospital-based survey of aspergillosis. Clinical Infectious Diseases, v. 33, n. 1, p. 1824–1833, 2001.

PESSINI, G. L. et al. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de extratos de plantas utilizados na medicina popular. Revista Brasileira de Farmacognosia, v.13, suple.1, p.21-24, 2003.

PEYRET, M. et al. Étude mathématique de la curve de mortalite d'escherichia coli exposure aux polymixines. Pathologie Biologie, Mykosen, v.38, p. 441-445, 1991.

PFALLER, M. A. et al. International surveillance of blood stream infection due to *Candida* species: frequency of occurrence and antifungal susceptibility in the SENTRY program, Unites States, Canada, and South America, 1997. In: ANNUAL INTERSCIENCE CONFERENCE ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, 38., 1998, San Diego. Abstracts. Washington: American Society for Microbiology, 1998. p.483.

PFALLER, M. A.; GERARDEN, M. Y.; WENZEL, R. P. Influence of in vitro susceptibility testing conditions on the anticandidal activity of LY121019. Diagnostic Microbiology Infectious Disease, v.11, p.1-9, 1989.

PIDDOCK, L. J. V. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacterial. Clinical Microbiology Reviews, v.19, p.382-402, 2006.

PIDDOCK, L. J. V. Techniques used for the determination of antimicrobial resistance and sensitivity in bacteria. The Journal of Applied Bacteriology, v.68, p.307-318, 1990.

PINTO, T. J. A.; KANECO, T. M.; OHANA, M. T. Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2003. 325p.

PLAUSE, E. A.; FLORES, G. S.; ATAUCUSI, S. G. Composicion quimica y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Origanum vulgare* (orégano). Revista de Medicina, v.12, n.1, p.16-19, 2001.

PONTES, Z. B. V. Atividade antifúngica de produtos naturais e sintéticos sobre espécies de *Trichosporon Behrend*. 2002. 183f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2002.

QUIROGA, E. N.; SAMPIETRO, A. R.; VATTUONE, M. A. Screening antifungal activities of selected medicinal plants. Journal of Ethnopharmacology, v.4, p.89-96, 2001.

RAHALISON, L. et al. A bioautographic Agar overlay method for the detection of antifungal compounds from higher plants. Phytochemical analysis, v.2, p. 199-203, 1991.

RANG, H. P. et. al. Farmacologia. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTLER, J. M. Pharmacology. 4.ed. Edinbergh: Churchill Livingstone, 1999.

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

REICHLING, et al. Essential oils of aromatic plants with antibacterial, antifungal, antiviral, and cytotoxic properties-na overview. Forschender Komplementarmedizin, v.16, p.79-90, 2009.

ROCHA, M. E. N.; SANTOS, C. L. O uso comercial e popular de Eucalipto. Myrtaceae. Saúde e Ambiente em Revista, v. 2, n. 2, p.23-34, jul./dez .2007.

RODRIGUES, E. A. C. et al. Infecções hospitalares: prevenção e controle. São Paulo: Sarvier, 1997.

RODRIGUES, F. C. M. P.; LOPES, B. M. Potencial alelopático de *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth sobre sementes de *Tabebuia Alba* (Cham.) Sandw. Floresta e Ambiente, Rio de Janeiro, v.8, n.1, p.130-136, 2001.

ROJAS, A. et al. Screening for antimicrobial activity of crude drug extrats and purê natural products from Mexican medicinal plants. Journal of Ethnopharmacology, v.35, p.275-283, 1992.

ROMEO, F. V. et al. Antimicrobial effect of some essential oils. Journal of Essential Oils Research. v.20, p.373-379, 2008.

SADRAEI, H.; GHANNADI, A.; MALEKSHAHI, K. Relaxant effect of essential oil of *Melissa officinalis* and citral on rat ileum contractions. Fitoterapia, n.74, p.445-452, 2003.

SAEED, S.; TARIQ, P. Antibacterial activity of oregano (*origanum vulgare* linn) against gram positive bacteria. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 22, p.421-424, 2009.

SAGLAM, C. et al. Fungal inhibition by some spice essential Oils. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, v.12, p.742-750, 2009.

SAHIN, F. et al. Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. *Food Control*, v.15, n.7, p.549-557, 2004.

SAITO, M. L. et al. Estudo da atividade inseticida de algumas espécies vegetais. In: WORKSHOP SOBRE PRODUTOS NATURAIS NO CONTROLE DE PRAGAS, DOENÇAS E PLANTAS DANINHAS, 1., 1990, Jaguariúna. Anais... Jaguariúna: EMBRAPA, 1990. p.23-30.

SALLÉ, J. O totum em fitoterapia: abordagem de fito-bioterapia. São Paulo: Rose, 1996.

SANTIN, M. R. et al. In vitro activity essential oil of *Cymbopogon citratus* and its major component (cital) on *Leishmania amazonensis*. *Parasitology Research*, v.105, p.1489-1496, 2009.

SANTOS, F. A. et al. Antibacterial activity of propolis produced in Brazil against *Actinobacillus acinomycetemcomitans*, *Fusobacterium* spp. and bacteria from the *Bacterioides fragilis* group isolated from human and marmoset hosts. *Anaerobe*, v.5, p.479-481, 1999.

SARTORATTO, A. et al. Composição e atividade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas aromáticas usadas no Brasil. *Brazilian Journal Microbiology*, n.4, p.275-280, 2004.

SARTORATTO, A. et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.35, p.275-280, 2004.

SARTORI, M. R. K. et al. Antifungal activity of fraction and two pure compounds of flowers from *Wedelia paludosa* (*Acmela brasiliensis*) (*Asteraceae*). *Pharmazie*, v.58, p.567-569, 2003.

SAYYAH, M.; VALIZADEH, J.; KAMALINEJAD, M. Anticonvulsant activity of the leaf essential oil of *Laurus nobilis* against pentylenetetrazole- and maximal electroshock-induced seizures. *Phytomedicine*, v.9, p.212-216, 2002.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. Potencial de extratos e óleos essenciais de vegetais como indutores de resistência plantas medicinais. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM PLANTAS CONTRA FITOPATÓGENOS, 1., 2002, São Pedro. Perspectivas para o século XXI. São Pedro: ESALQ/USP, 2002. p. 27-28.

SELINTRENNIKOFF, C. Screening for antifungal drugs. In: **FINKELSTEIN, D.; BALL C.** Biotechnology of filamentous fungi. Butterworth Heinemann. Boston: [s.n.], 1992. p. 189-217. (Technology and products).

SELITRENNIKOF, C. P. Use of temperature sensitive, protoplast forming *Neurospora crassa* strain for detection of antifungal antibiotics. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, n.26, p.757-65, 1983.

SELITRENNIKOFF, C. P. Antifungal drugs: (1,3)- β -glucan synthase inhibitors. Berlin: Springer-Verlag (Heidelberg), 1995.

SELLAN, W. Óleos que curam: o poder da aromoterapia. Rio de Janeiro: Nova Era, 2002.

SENTANDREU, H. et al. Synthesis and assembly of wall polymers on regenerating yeast protoplast. Experientia Journal, Suppl.46, p.187-195, 1983.

SHADOMY, S.; ESPINEL-INGROF, A.; GABHAR, R. J. *In vitro* studies with sf 86-327, a new orally active allylamionone derivatives. Journal of Medical and Veterinarian Mycology, v.23, p.125-132, 1985.

SHARMA, N.; TRIPATHI, A. Effects of Citrus sinensis (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem. Microbiology Research, v.163, n.3, p.337-344, 2008.

SHUBINA, L. P.; SIURIN, S. A.; SAVCHENKO, V. M. Inhalations of essential oils in the combined treatment of patients with chronic bronchitis Vrachebnoe Delo, v.5, p.66-67, 1990.

SIDRIM, J. J. C.; MOREIRA, J. L. B. Fundamentos clínico-laboratoriais da micologia médica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

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

SILVA, L. et al. Conformation and self-assembly of nystatin nitrobenzoxadiazole derivate in lipid membranes. Biochimica et Biophysica Acta, v.1617, p. 69-70, 2003.

SILVA, M. G. V. et al. Composition of essential oils from three *Ocimum* species obtained by steam and microwave distillation and supercritical CO₂ extraction. Arkat USA, n.6, p.66-71, 2004.

SILVER, L. L.; BOSTIAN, K. A. Discovery and development of new antibiotics: the problem of antibiotic resistance. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v.37, n.3, p.377-383, Mar. 1993.

SIMIC, M.; KUNDAKOVIC, T.; KOVACEVIC, N. Preliminary assay on the antioxidative activity of *Laurus nobilis* extracts. Fitoterapia, v.74, p.613-616, 2003.

SIVROPOULOU, A. et al. Antimicrobial and cytotoxic activities of *Origanum vulgare* essential oil. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v.44, p.1202-1205, 1996.

SMITH, D. C. et al. Quality analysis of citrus fruit extracts by GC/MS: An undergraduate experiment. *Chemical Educator*, v.6, p.28-31, 2001.

SMITH, E. et al. Antibacterials and modulators of bacterial resistance from the immature cones of *Chamaecyparis lawsoniana*. *Phytochemistry*, v.68, p.210-217, 2007.

SOEJARTO, D. D.; FARNSWORTH, N. R. Tropical rain forest: potential source of new drugs? *Perspectives in Biology and Medicine*, v.32, n.2, p.244-256, 1989.

SOUZA, A. C. et al. Antitumor and antioxidant activities of essential oil of *M. officinalis* L. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v.56, n.5, p.677-681, 2004.

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

SOUZA, E. L. Potencial antimicrobiano do óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L.): uma abordagem para uso em sistemas de conservação de alimentos. 2006. 149f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006.

STAVRI, M.; MATHEW, K. T.; GIBBONS, S. Antimicrobial constituents of *Scrophularia deserti*. *Phytochemistry*, v.67, p.1530-1533, 2006.

STAVRI, M.; PIDDOCK, L. J. V.; GIBBONS, S. Bacterial efflux pump inhibitors from natural source. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.59, n.6, p.1247-1260, 2007.

SUSSMAN, A. et al. Discovery of Cercosporamide, a known antifungal natural product, as a selective PKC1Kinase Inhibitor through High-Throughput Screening. *American Society for Microbiology*, v.3, p.932-943, 2004.

TAMPIERI, M. P. et al. The inhibition of *Candida albicans* by selected essential oils and their major components. *Mycopathologia*, v.159, p.339-345, 2005.

TAVARES, W. Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos. 3.ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2001.

TIRADO, C. et al. Comparative gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, v.697, p.501-513, 1995.

TODA, Y. et al. Isolation and characterization of a protease-producing, thermophilic, anaerobic bacterium, *Thermobacteroides leptospartum* sp. nov. *Agricultural and Biological Chemistry*, v.52, p.1339-1344, 1988.

TULLIO, V. et al. 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.

URBINA, J. M. et al. Inhibitors of the fungal cell wall. Synthesis of 4-aryl-4-N-arylamino-1-butenes and related compounds with inhibitory activities of (1-3) β glucan and chitin synthases. Bioorganic and Medicinal Chemistry, v.8, p.591-598, 2000.

VÁGI, E. et al. Essential oil composition and antimicrobial activity of *Origanum majorana* L. extracts obtained with ethyl alcohol and supercritical carbon dioxide. Food Research International, v.38, p.51–57, Jan. 2005.

VAN BAMBEKE, F. et al. Antibiotic efflux pumps in prokaryotic cells: occurrence, impact on resistance and strategies for the future of antimicrobial therapy. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v.51, p.1055-1065, 2003.

VAN WYK, B. E.; WINK, M. Medicinal plants. Portland: Timber Press, 2004. 480p.

VARONA, R.; PEREZ, P.; DURAN, A. Effect of papulacandim B on β -glucan synthesis in *Schizosaccharomyces pombe*. FEMS Microbiology Letters, v.20, p.243-247, 1983.

VILJOEN, A., et al. *Osmitopsis astericoides* (Asteraceae) - the antimicrobial activity and essential oil composition of a Cape-Dutch remedy. Journal of Ethnopharmacology, v.88, n.2/3, p.137-143, 2003.

VITTI, A. M.; BRITO, J. O. Óleo essencial de eucalipto. Documentos Florestais, n.17, p.2-25, ago. 2003.

VON POSER, G. L.; MENTZ, L. A. Diversidade biológica e sistemas de classificação. In: SIMÕES, C. M. O. et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 2. ed. Porto Alegre: UFRGS, Florianópolis: URFSC, 2000. p.66-70.

WALD, A. et al. Epidemiology of aspergillus infection in a large cohort of patients undergoing boné marrow transplantation. Journal Infectious Diseases, v.175, p.1459-1466, 1997.

WILLIAMS, C. A. Anthocyanins and others flavonoids. Natural Products Reports, v.12, n.6, p.639-57, 1995.

WU, J. J. et al. Therapy of systemic fungal infections. Dermatologic Therapy, v.17, p.532-538, 2004.

YAMADA, C. S. B. Fitoterapia: sua história e importância. Revista Racine, São Paulo, v.43, p.50-51, mar./abr. 1998.

YAMAGUCHI, H. et al. Studies on the mechanism of antifungal action of aculeacin. The Journal of Antibiotics, v.35, p.210-219, 1982.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. Química Nova, v.24, n.1, p. 47-152, 2001.

ZACCHINO, A. S. Estratégias para descoberta de novos agentes antifúngicos. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal. Chapecó: Argos, 2001. p.436-473.

ZACCHINO, A. S. et al. The need for new antifungal drugs: screening for antifungal compounds with a selective mode of action with emphasis on the inhibitors of the fungal cell wall. In: RAI, M.; MARES, D. Plant-derived antimycotics: current trends and future prospects. Oxfordshire: Haworth Press, 2003. p.1-41.

ZAROR, L. Puebas de susceptibilidad fungica frente a antimicoticos. Boletim micológico, v.4, n.2, p.77-90, 1989.

ZHANG, X. Estratégia de la OMS sobre medicina tradicional (2002-2005). Ginebra: Organización Mundial de Saúde, 2002.

**ZLOH, M.; KAATZ, G. W.; GIBBONS, S. Inhibitors of multidrug resistance (MDR) have affinity for MDR substrates. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, v.14, p.881-885, 2004.
aphy A.697, 501-513.**

FICHA CATALOGRÁFICA

Tamanho da ficha: 12,5 cm x 7,5 cm

Tamanho da fonte: 10

A ficha é impressa no verso da folha de rosto

S725p Souza, Nadábia Almeida Borges de.
*Possíveis mecanismos de atividade antifúngica de
óleos essenciais contra fungos patogênicos / Nadábia
Almeida Borges de Souza. – João Pessoa, 2010.*
149p.: il.

Orientadora: Edeltrudes de Oliveira Lima.
Tese(doutorado) CCS/UFPB.

1. Óleos essenciais. 2. Parede Celular 3. Bomba de
Efluxo.

UFPB/BC

CDU: 665.5(043)

Responsável pela catalogação: Maria de Fátima dos Santos Alves-CRB -15/149