

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

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO* DO ÓLEO ESSENCIAL DE
***Cymbopogon nardus* L. Rendle (Citronela) E DO FITOCONSTITUINTE**
CITRONELAL SOBRE *Cladosporium carrionii*

CAMILA GURGEL DANTAS DE PAULA

João Pessoa- PB

2015

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO* DO ÓLEO ESSENCIAL DE
Cymbopogon nardus L. Rendle (Citronela) E DO FITOCONSTITUINTE
CITRONELAL SOBRE *Cladosporium carrionii***

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento aos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Área de concentração: Farmacologia.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Edeltrudes de Oliveira Lima

João Pessoa- PB

2015

P324a Paula, Camila Gurgel Dantas de.
Atividade antifúngica *in vitro* do óleo essencial de
Cymbopogon nardus L. Rendle (Citronela) e do fitoconstituente
citronelal sobre *Cladosporium carrionii* / Camila Gurgel Dantas
de Paula.- João Pessoa, 2015.
85f. : il.
Orientadora: Edeltrudes de Oliveira Lima
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS
1. Produtos naturais. 2. Atividade antifúngica.
3. *Cymbopogon nardus*. 4. Citronelal. 5. *Cladosporium carrionii*.

UFPB/BC

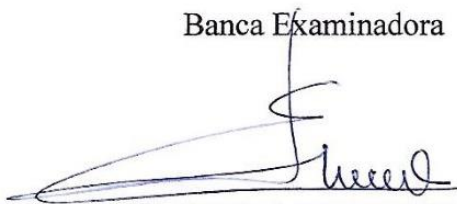
CDU: 547.9(043)

CAMILA GURGEL DANTAS DE PAULA

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO* DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Cymbopogon nardus*
L. Rendle (Citronela) E DO FITOCONSTITUINTE CITRONELAL SOBRE *Cladosporium*
*carrionii***

Dissertação de mestrado

Banca Examinadora



Prof.ª. Dr.ª. Edeltrudes de Oliveira Lima

Orientadora

Prof.ª. Dr.ª. Caliandra Maria Bezerra Luna Lima

Examinador Externo

Prof.ª. Dr.ª. Bárbara Viviana de Oliveira Santos

Examinador Interno

Prof. Dr. Damião Pergentino de Sousa

Membro Suplente

João Pessoa - PB

2015

Aos meus avós Maria das Dores Duarte (Dorinha) e Valdery Paula (Dery);

Aldivani Gurgel (Divani) e Ozenídio Dantas(Tutu).

Com todo meu amor e carinho.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me concedido a saúde e a coragem que tanto pedi para alcançar mais esse objetivo em minha vida, por Ele ter guiado a minha jornada e iluminado o meu caminho;

À minha orientadora, Professora Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima (carinhosamente, a “nossa” Edel), por ter aceitado que eu fizesse parte de sua equipe, e por ter sido, durante os últimos 24 meses, uma fonte de aprendizado. Serei eternamente grata por tudo que aprendi e por todos os dias em que convivemos juntas. Muita obrigada pela oportunidade!!

Àqueles que, além de tios, são meus padrinhos, pais e amigos: Sandra Helena e Isac Medeiros. Vocês são os maiores incentivadores da minha vida acadêmica e os melhores exemplos que eu poderia seguir. Obrigada pelo apoio constante;

Ao meu noivo Diego Nóbrega, por ter sido capaz de me acalmar nos momentos mais difíceis e ter sempre palavras de otimismo e incentivo que muito me ajudaram a concluir essa etapa. Obrigada pelo carinho e amor desde o início dessa caminhada;

Aos meus pais Valdery Paula Júnior e Mônica Helena (*In memoriam*), por serem a minha maior torcida, aqui na terra e lá no céu;

Aos meus irmãos e maiores paixões da minha vida: Eduardo e Sabine Helena, por despertarem em mim a vontade e a missão de ser um bom exemplo, mas, acima de tudo, por me fazerem tão feliz;

Aos meus colegas de turma de mestrado (Diego Igor, Inácio Alves, Iara Luna, Luciano Leite, Paula Benvindo, Priscilla Maciel, Rayssa Marques, Cinthia Dias, Tatianne Mota, Tatyanna Kelvia e Viviane Mangueira), por terem tornado a extensa carga horária de disciplinas e as angústias da reta final mais leves e fáceis de lidar;

À equipe do Laboratório de Micologia da Universidade Federal da Paraíba, que me auxiliou na execução do trabalho: Lílian Pinheiro, Janiere Pereira, Camilla Pinheiro, Júlio Abrantes e Fátima Carvalho;

À banca examinadora, Profa. Dra. Caliandra Luna Lima, Profa. Dra. Bárbara Viviana e ao suplente, Prof. Dr. Damião Pergentino, por terem aceitado o convite e pelas valiosas contribuições;

À Graduanda em Farmácia Jessyca Marina, por ter sido um importante suporte no desenvolvimento dos experimentos iniciais deste trabalho;

À Caroline Manguiera, por sempre ser tão prestativa, educada e eficiente;

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, pelos ensinamentos e colaboração;

Ao CNPq e à Universidade Federal da Paraíba pelos suportes financeiro e estrutural.

RESUMO

PAULA, C. G. D. **Atividade antifúngica *in vitro* do óleo essencial de *Cymbopogon nardus* L. Rendle (Citronela) e do fitoconstituente citronelal sobre *Cladosporium carrionii*. 85 p.** Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2015.

Fungos dematiáceos, demáceos ou escuros compõem um grupo grande e heterogêneo de fungos que causam uma variedade de doenças, incluindo feohifomicoses, cromoblastomicoses, micetomas e alergias. Espécies do gênero *Cladosporium* são relevantes no desenvolvimento de cromoblastomicoses, e se destacam como contaminantes de plantas. A toxicidade dos antifúngicos convencionais e o aumento da resistência aos esquemas terapêuticos utilizados impulsionam o estudo da atividade antifúngica de novas alternativas, incluindo as de fonte natural. Diante desse contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antifúngica *In vitro* de sete óleos essenciais (*Laurus nobilis* L., *Mentha arvensis*, *Mentha X piperita* L., *Mentha spicata*, *Ocimum basilicum* L., *Cymbopogon nardus* L. Rendle e *Origanum vulgare*) e do fitoconstituente citronelal sobre cepas de fungos dematiáceos. Neste estudo, os seguintes métodos foram utilizados: triagem microbiológica, determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM), cinética de morte microbiana, inibição da germinação de conídios e avaliação de alterações morfológicas. Dentre os óleos essenciais testados, o de *C. nardus* demonstrou uma potente atividade antifúngica, inibindo o crescimento de 83,3% das cepas de fungos demáceos utilizadas. O *Cymbopogon nardus* L. Rendle (capim-citronela) pertence à família Poaceae, subfamília Panicoideae. O gênero *Cymbopogon* é constituído de oitenta e cinco espécies. O *C. nardus* apresenta constituição do óleo essencial com dois compostos majoritários: o citronelal e o geraniol. Citronelal é um monoterpreno, predominantemente formado pelo metabolismo secundário de plantas. O óleo essencial de *C. nardus* teve sua CIM e CFM estabelecidas em 64 µg/ mL e o citronelal em 32 µg/ mL. Tanto o óleo essencial de *C. nardus* quanto o citronelal inibiram de forma significativa o crescimento micelial radial das cepas testadas, nas concentrações CIM, CIMx2 e CIMx4, após 12 dias de exposição. Nas concentrações CIM₅₀ (64 µg/ mL- óleo essencial e 32µg/mL -citronelal) e CIM₉₀ (128 µg/mL - óleo essencial e 512µg/mL - citronelal), foram capazes de inibir de forma significativa a germinação dos conídios fúngicos de ambas as cepas testadas. A determinação do efeito do óleo essencial de *C. nardus* e do citronelal sobre a morfogênese das cepas de *C. carrionii* demonstrou que ambos foram capazes de induzir alterações morfológicas, como desenvolvimento de hifas tortuosas, finas e diminuição da conidiação, nas concentrações CIM, CIMx2 e CIMx4. Dessa forma, conclui-se que o óleo essencial de *C. nardus* e o seu fitoconstituente citronelal mostraram pronunciada atividade antifúngica sobre as cepas de *C. carrionii* testadas, o que impulsiona o estudo de suas atividades antifúngicas *In vivo*, bem como a busca por formulações farmacêuticas a serem utilizadas para a terapia de algumas micoses, especialmente aquelas causadas por fungos demáceos.

Palavras- chave: Atividade antifúngica. *Cymbopogon nardus*. Citronelal. *Cladosporium carrionii*.

ABSTRACT

PAULA, C. G. D. *In vitro* antifungal activity of *Cymbopogon nardus* L. Rendle (Citronella) essential oil and citronellal against *Cladosporium carrionii*. 85 p. Dissertation (Master in Bioactive Synthetic and Natural Products). Federal University of Paraiba, João Pessoa, 2015.

Dematiaceous, demaceous or dark fungi comprise a large, heterogeneous group of fungi that cause a variety of diseases, including feohifomycoses, cromoblastomycoses, mycetoma and allergies. Species of the genus *Cladosporium* are relevant in developing cromoblastomycoses, and stand out as plant contaminants. The toxicity of conventional antifungal and increased resistance to therapeutic regimens, driving the study of the antifungal activity of new alternatives, including natural sources. Given this context, the aim of this study was to evaluate the *In vitro* antifungal activity of seven essential oils (*Laurus nobilis* L., *Mentha arvensis*, *Mentha X piperita* L., *Mentha spicata*, *Ocimum basilicum* L., *Cymbopogon nardus* L. Rendle e *Origanum vulgare*) and the phytoconstituent citronellal on strains of dematiaceous fungi. In this study, the following methods were used: microbiological screening, determining the minimum inhibitory concentration (MIC) and Minimum Fungicidal Concentration (MFC), kinetics of microbial death, inhibition of conidial germination and evaluation of morphological changes. Among the essential oils tested, the *C. nardus* essential oil demonstrated potent antifungal activity, inhibiting the growth of 83,3% of strains used. The *Cymbopogon Nardus* L. Rendle (citronella grass) belongs to the family Poaceae, subfamily Panicoideae. The *Cymbopogon* genus consists of eighty-five species. *C. nardus* presents constitution of essential oil with two major compounds: the citronellal and geraniol. Citronellal is a monoterpene, predominantly formed by the secondary metabolism of plants. The essential oil of *C. nardus* had its MIC and MFC established at 64 mg / mL and the citronellal in 32 mg / mL. Both the essential oil of *C. nardus* as citronellal significantly inhibited the radial mycelial growth of the tested strains, the MIC concentrations, MICx2 and MICx4 after 12 days of exposure. In MIC₅₀ concentrations (64 ug / ml- essential oil and 32µg / ml -citronellal) and MIC₉₀ (128 ug / ml - 512µg essential oil and / ml - citronellal), were able to significantly inhibit the germination of fungal conidia from both strains tested. The determination of the effect of the essential oil of *C. nardus* and citronellal on the morphogenesis of *C. carrionii* strains showed that both were capable of inducing morphological changes, as development tortuous hyphae, fine and decreased conidiation in MIC concentrations, MICx2 and MICx4. Thus, it is concluded that the essential oil of *C. nardus* and its phytoconstituent citronellal showed pronounced antifungal activity against the strains of *C. carrionii* tested, what drives the study of its *In vivo* antifungal activity, as well as the search for pharmaceutical formulations to be used for the therapy of certain mycoses, especially those caused by dematiaceous fungi.

Keywords: Antifungal activity. *Cymbopogon nardus*. Citronellal. *Cladosporium carrionii*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Micromorfologia e macromorfologia de fungo filamentoso (<i>Aspergillus</i> spp.).....	23
Figura 2- Macromorfologia e micromorfologia de fungo leveduriforme (<i>Candida</i> spp.)	23
Figura 3- Cultivo de fungo demáceo	25
Figura 4- Feo- hifomicose subcutânea	27
Figura 5- Aspectos clínicos da cromoblastomicose	27
Figura 6- Características morfológicas de <i>C. carrionii</i>	29
Figura 7- Distribuição mundial dos casos de cromoblastomicose	31
Figura 8- Dermatite verrucosa cromoparasitária.....	32
Figura 9- Corpos fumagóides em septação	33
Figura 10- Alvos de ação dos fármacos antifúngicos.....	35
Figura 11- Estrutura química da griseofulvina.....	36
Figura 12- Estrutura química da flucitosina	36
Figura 13- Estrutura química da anfotericina B	37
Figura 14- Estrutura química da caspofungina.....	38
Figura 15- Estruturas químicas do fluconazol e itraconazol	38
Figura 16- Fotografia de <i>Cymbopogon nardus</i>	42
Figura 17- Estrutura química do citronelal.....	44
Figura 18- Suporte para ensaio da morfogênese	54
Figura 19- Micromorfologia de <i>C. carrionii</i> na ausência (controle) e na presença do óleo essencial de <i>C. nardus</i> , do citronelal e do itraconazol.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Classificação de <i>Cymbopogon nardus</i> L. Rendle	42
Tabela 2- Valores de CIM ₅₀ e CIM ₉₀ do OE- CN, citronelal e itraconazol	53
Tabela 3 – Avaliação da atividade antifúngica dos óleos essenciais sobre cepas de fungos dematiáceos.....	57
Tabela 4- Valores de CIM e CFM dos produtos testados sobre cepas de fungos demáceos	59

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Inibição do crescimento micelial radial da cepa LM- 01 pelo OE- CN e citronelal	62
Gráfico 2- Inibição do crescimento micelial radial da cepa LM- 01 pelo itraconazol.....	63
Gráfico 3- Inibição do crescimento micelial radial da cepa URM- 5109 pelo OE- CN e citronelal.....	63
Gráfico 4- Inibição do crescimento micelial radial da cepa URM- 5109 pelo itraconazol	64
Gráfico 5- Inibição da germinação dos conídios da cepa LM- 01	65
Gráfico 6- Inibição da germinação dos conídios da cepa URM- 5109	66

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Composição semi- quantitativa do óleo de *C. nardus*45

Quadro2- Espécies vegetais das quais foram obtidas os óleos essenciais.....48

ASD Ágar Sabouraud Dextrose
ABD Ágar Batata Dextrose
CBM Concentração Bactericida Mínima
CCS Centro de Ciências da Saúde
CG- EM Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa
CIM Concentração Inibitória Mínima
CIM₅₀ Menor concentração capaz de inibir o crescimento de 50% das cepas ensaiadas
CIM₉₀ Menor concentração capaz de inibir o crescimento de 90% das cepas ensaiadas
CFM Concentração Fungicida Mínima
CSD Caldo Sabouraud Dextrose
DMSO Dimetilsulfóxido
LM Laboratório de Micologia
NaCl Cloreto de Sódio
µg/ mL Micrograma por mililitro
OE- CN Óleo essencial de *Cymbopogon nardus*
ppm Partes por milhão
UFC Unidades Formadoras de Colônias
UFC/ mL Unidades Formadoras de Colônias por mililitro
UFPB Universidade Federal da Paraíba
UFPE Universidade Federal de Pernambuco

OBS.: Os termos não listados nesta relação encontram-se descritos no texto.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo geral	21
2.2 Objetivos específicos	21
3 REFERENCIAL TEÓRICO	23
3.1 Considerações gerais sobre fungos	23
3.2 Fungos dematiáceos, demáceos ou escuros	25
3.3 O gênero <i>Cladosporium</i> spp.	28
3.4 Aspectos clínicos e epidemiológicos da cromoblastomicose	30
3.5 Disposições gerais sobre medicamentos antifúngicos	34
3.6 Produtos Naturais	40
3.7 Considerações sobre o óleo essencial de <i>Cymbopogon nardus</i> L. Rendle e citronelal	42
4 MATERIAL E MÉTODOS	48
4.1. Local da pesquisa	48
4. 2 Espécies fúngicas	48
4. 3 Óleos essenciais e fitoconstituente	48
4. 4 Meios de cultura	49
4. 5 Antifúngico sintético	49
4. 6 Inóculo	49
4.7 Triagem da atividade microbiológica	50
4.8 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	51
4.9 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)	52
4.10 Determinação da cinética de morte microbiana	52
4.11 Interferência do óleo essencial e fitoconstituente sobre a germinação de conídios de <i>C. carrionii</i>	53

4.12 Interferência do óleo essencial e fitoconstituente sobre a morfogênese fúngica de <i>C. carrionii</i>	54
4.13 Análise estatística	55
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5.1 Triagem da atividade microbiológica	57
5.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM).....	59
5.3 Interferência do óleo essencial e fitoconstituente sobre a cinética do crescimento micelial radial de <i>C. carrionii</i>	62
5.4 Interferência do óleo essencial e fitoconstituente sobre a germinação de conídios de <i>C. carrionii</i>	65
5.5 Interferência do óleo essencial e fitoconstituente sobre a morfogênese fúngica de <i>C. carrionii</i>	67
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	71
REFERÊNCIAS	72
ANEXOS	85

Introdução

1 INTRODUÇÃO

As patologias causadas por micro-organismos oportunistas adquirem, na prática médica, importância cada vez maior, principalmente em ambientes hospitalares e em serviços especializados com procedimentos invasivos, nos estados de imunossupressão induzidos pela quimioterapia antineoplásica, Síndrome da Imuno- Deficiência Humana, transplantes ou hemopatias diversas. As infecções oportunistas preocupam os administradores hospitalares e todos aqueles que estudam os aspectos microbiológicos, imunológicos, profiláticos e terapêuticos. Vírus, protozoários, bactérias, helmintos, fungos e até algas do gênero *Prototheca* podem, em certas condições, provocar manifestações clínicas diversas (SINGH, 2003; CASTRO et al., 2006; CRUZ et al., 2007).

Diferentes microrganismos causam infecções hospitalares, e o grupo de patógeno que se destaca é o das bactérias. O segundo grupo de importância médica nas infecções hospitalares são os fungos. Em um dos poucos estudos sobre a flora fúngica em UTI pediátrica e Neonatal, MARTINS-DINIZ et al., (2005) descreveram o gênero *Cladosporium* spp como o principal isolado, seguido por *Fusarium* spp, *Penicillium* spp, *Chrysosporium* spp e *Aspergillus* spp. Já MOBILIN et al., (2006) em uma pesquisa da microbiota fúngica em condicionadores de ar, descreveram o gênero *Aspergillus* spp como predominante (MELO et al., 2009).

Tendo em vista o aumento da resistência de micro-organismos aos medicamentos utilizados na clínica médica, bem como os seus efeitos colaterais, as plantas medicinais com propriedades antimicrobianas são de grande relevância nesse contexto, principalmente em países em desenvolvimento, sendo uma ótima alternativa para investimentos em pesquisas, uma vez que apontam para o uso de novos agentes antimicrobianos mais potentes e eficazes diante dos patógenos emergentes (PALMEIRA et al., 2010).

Os fitoconstituintes que atuam como agentes antimicrobianos representam uma grande fonte inexplorada de medicamentos e, portanto, têm um enorme potencial terapêutico. Eles são eficazes para o tratamento de infecções, enquanto diminuem muitos dos efeitos colaterais associados com os agentes antimicrobianos e antibacterianos sintéticos. As plantas farmacologicamente ativas têm fornecido mais de 25% dos medicamentos utilizados na medicina humana. A atividade antifúngica de produtos obtidos de plantas medicinais tem sido

cientificamente atribuída aos óleos essenciais, cumarinas, terpenos, flavonoides, amidas, imidas e alcaloides (MISHRA et al., 2009; AQUINO et al., 2003; GAYOSO et al., 2005; MOREIRA et al. 2007).

Sabendo-se que o estudo da atividade de óleos essenciais e seus fitoconstituintes sobre fungos demáceos é pouco explorado, e que as infecções por eles causadas são de relevância clínica, o presente trabalho teve como objetivo investigar a atividade antifúngica destes produtos, e, dessa forma, possibilitar uma contribuição para a pesquisa científica, no que se refere à investigação farmacológica de novos produtos antifúngicos originados de produtos naturais.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a possível atividade antifúngica *In vitro* dos óleos essenciais: *Laurus nobilis* L., *Mentha arvensis*, *Mentha X piperita* L., *Mentha spicata*, *Ocimum basilicum* L., *Cymbopogon nardus* L. Rendle e *Origanum vulgare* e do fitoconstituente citronelal frente a cepas de fungos dematiáceos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar triagem microbiológica de óleos essenciais de *Laurus nobilis* L., *Mentha arvensis*, *Mentha X piperita* L., *Mentha spicata*, *Ocimum basilicum* L., *Cymbopogon nardus* L. Rendle e *Origanum vulgare*, obtidos de espécies vegetais, sobre cepas de fungos dematiáceos;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Fungicida Mínima (CFM) do produto selecionado na triagem microbiológica, bem como do seu constituinte majoritário;
- Avaliar a interferência do óleo essencial e do seu constituinte majoritário sobre a cinética de morte microbiana;
- Avaliar a influência do óleo essencial e do seu constituinte majoritário na inibição da germinação de conídios das espécies fúngicas em estudo;
- Avaliar a ação do óleo essencial e do seu constituinte majoritário sobre os aspectos morfológicos das cepas fúngicas em estudo.

Referencial teórico

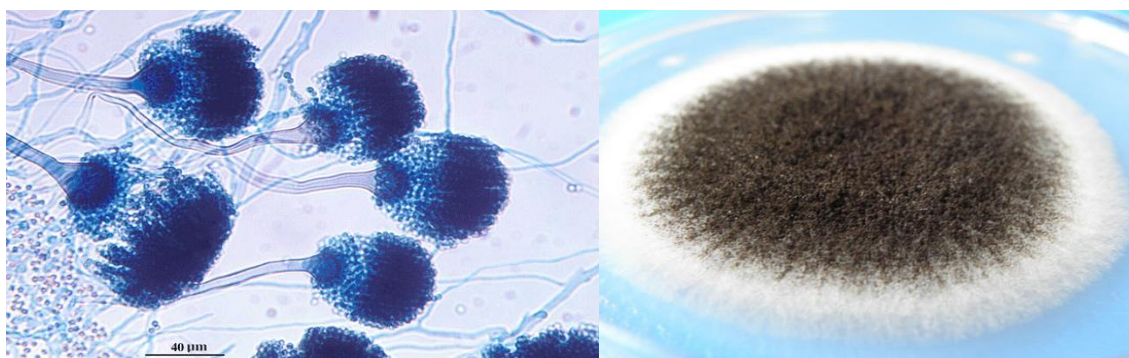
3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Considerações gerais sobre fungos

Fungos são organismos eucarióticos, isto é, apresentam uma membrana nuclear que envolve os cromossomos e o nucléolo. São encontrados em duas formas básicas: bolores (figura 1) e leveduras (figura 2). Leveduras são células únicas, enquanto os bolores (fungos filamentosos) consistem em longos filamentos de células, denominadas *hifas*. As leveduras reproduzem-se por brotamento, processo em que as células-filhas apresentam tamanho desigual, enquanto a reprodução de bolores ocorre por divisão celular (as células-filhas apresentam tamanho equivalente) (LEVINSON, 2010; SIDRIM, ROCHA, 2012).

Os fungos e seus metabólitos interessam à medicina sob vários aspectos, a saber: a) como agentes de hipersensibilidade imediata ou tardia, b) como agentes bem definidos de micoses- infecções fúngicas, c) como agentes de micetismo, por intoxicações por fungos macroscópicos e d) como agentes de micotoxicoses, pela ingestão contínua ou prolongada de alimentos contaminados por fungos produtores de micotoxinas. Desde o final do século passado, evidenciou-se um aumento considerável de micoses de caráter invasivo e de difícil tratamento, representando uma significativa causa de morbidade e mortalidade em pacientes criticamente doentes. (ZAITZ et al., 2012).

Figura 1 - Micromorfologia e macromorfologia de fungo filamentoso (*Aspergillus* spp.)



Fonte: <http://atlasmicologia.blogspot.com.br/2011/05/aspergillus-niger.html>

Figura 2 - Macromorfologia e micromorfologia de fungo leveduriforme (*Candida* spp.)



Fonte: <http://aprendeenlinea.udea.edu.co/lms/moodle/mod/resource/view>.

Os fungos são frequentemente cultivados em Ágar Sabouraud, que facilita o desenvolvimento de fungos de crescimento lento por inibir o crescimento de bactérias presentes no espécime. A inibição do crescimento bacteriano deve-se ao baixo pH do meio, assim como ao cloranfenicol e à cicloeximida que frequentemente são adicionados. O aspecto do micélio e a natureza dos esporos assexuados são, com frequência, suficientes para identificar o organismo. Na realidade, os fungos normalmente são identificados pelo tipo de esporo (LEVINSON, 2010; TORTORA, FUNKE, CASE, 2012).

A maioria dos casos de infecção é causada por bactérias, mas, desde o início dos anos 80, os fungos têm emergido como uma das maiores causas de comprometimento da saúde humana, por causarem infecções hospitalares e em indivíduos com sistema imune comprometido. Além disso, milhares de doenças causadas por fungos afetam plantas economicamente importantes, custando mais de um bilhão de dólares por ano (PEREIRA et al., 2014; TORTORA, FUNKE, CASE, 2012).

Os dados de ABDALA et al. (2012) revelaram que os índices de mortalidade causados por infecções fúngicas em pacientes recém- submetidos à transplante foram de 30- 75% (em transplante de pulmão) e entre 50- 60 % (para transplante de fígado), o que demonstra a importância de medidas profiláticas e terapêuticas eficazes no combate à esse tipo de infecção.

A resposta à infecção por diversos fungos consiste na formação de granulomas. Granulomas são produzidos nas principais doenças fúngicas sistêmicas, por exemplo, coccidioidomicose, histoplasmose e blastomicose, bem como em muitas outras. A resposta imune mediada por células está envolvida na formação de granulomas. A supuração aguda, caracterizada pela presença de neutrófilos no exsudato, também ocorre em certas doenças fúngicas, como aspergilose e esporotricose (LEVINSON, 2010).

3.2 Fungos dematiáceos, demáceos ou escuros

Fungos dematiáceos são grupos heterogêneos de fungos que pertencem à família Dematiaceae e são encontrados no solo ou vegetais em decomposição. Também denominados de fungos negros ou demáceos, formam um grupo de micro-organismos que possuem pigmentação escura (figura 3), devido à presença do complexo melanínico na sua parede celular. A melanina destes fungos é formada pelo polímero diidroxinaftaleno (DNH) que é produzido no citoplasma e excretado na parede celular. Este polímero faz interações com lipídeos, proteínas e carboidratos da parede, formando o complexo melanínico. Este complexo é um importante fator de virulência dos fungos negros, onde a sua porção lipídica está relacionada à indução do granuloma nos tecidos do hospedeiro, enquanto a porção peptídica tem a função de quelar cátions, competindo com proteínas do soro e a porção de carboidratos tem um papel importante na interação célula- célula, facilitando a interação do agente com os tecidos do hospedeiro (ZAITZ et al., 2012; AZEVEDO et al., 2005).

Figura 3- Cultivo de fungo demáceo.



Fonte: http://www.controllab.com.br/pdf/atlas_micologia_colonias.pdf

Esses fungos vivem como saprófitas no solo, vegetação e água. Isso sugere que a maioria, senão todos os indivíduos são expostos a eles, presumivelmente por inalação ou trauma. A grande importância clínica desse grupo deve-se à crescente incidência e à

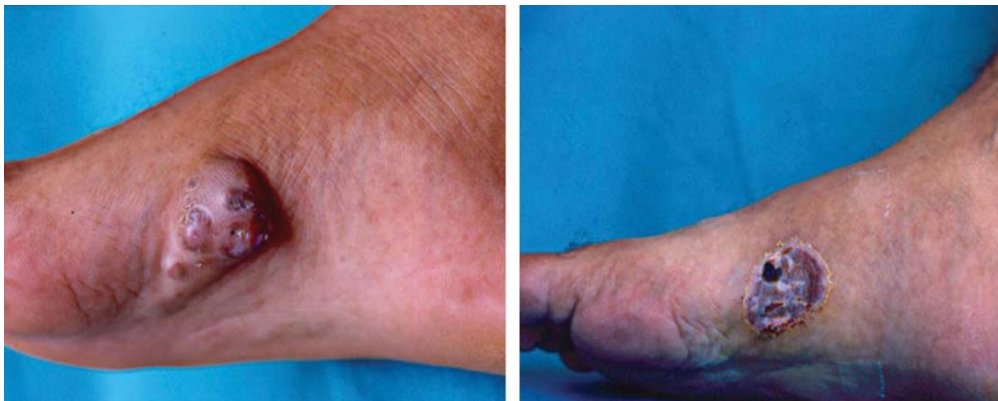
gravidade da infecção, que pode levar ao óbito. A imunossupressão de diversas causas teria forte influência na fisiopatologia do problema. A dermatologia tem papel fundamental, visto que um dos sítios mais afetados é a pele (CUNHA- FILHO et al., 2005; REVANKAR, 2007).

Espécies de fungos negros apresentam boa adaptação a uma variedade de ambientes estressantes ou extremos (GOSTINCAR et al., 2011), como aqueles criados artificialmente pelos homens, devido à proteção conferida pela pele celular melanizada. Neste ambiente, espécies de *Exophiala* têm sido isoladas frequentemente em banheiros e saunas na Ásia e Europa (SUDHADHAM et al., 2008), ralo de pia (MATOS et al., 2002; HAMADA; ABE, 2010) e lava-louças (ZALAR et al., 2011).

Os agentes etiológicos das feo- hifomicoses pertencem às classes Hyphomycetes, Coelomycetes, Ascomycetes e Blastomycetes. Esses fungos são geralmente oportunistas, isolados do solo e da matéria orgânica e alguns são fitopatógenos. Ao contrário do observado nos eumicetomas e cromomicoses, as feo- hifomicoses não são limitadas à pele e ao tecido subcutâneo, podendo provocar diferentes respostas inflamatórias e envolver qualquer órgão ou sistema. As formas mais comuns são as pulmonares e cerebrais e, recentemente, fungemias foram adicionadas ao espectro de doenças causadas por fungos demáceos (LACAZ et al. 2002; ZAITZ et al. 2012).

As infecções feo- hifomicóticas (figura 4) distribuem-se mundialmente e os fungos de maior importância médica são das espécies *Alternaria* spp., *Bipolaris* spp., *Curvularia* spp., *Exophiala* spp., *Exserohilium* spp., *Phialophora* spp. e *Xilohypha* spp. As manifestações clínicas podem ser subcutâneas e sistêmicas, distinguindo-se, nesse grupo, a infecção paranasal e cerebral. Formas mais raras como endocardite, peritonite pós-diálise, artrite e osteomielites, têm sido descritas. Além do componente infeccioso, a inalação de esporos de espécies do gênero *Alternaria* é fator precipitante de asma, e espécies de *Bipolaris* estão envolvidas com sinusite alérgica (MARTINS, MELO, HEINS- VACCARI, 2005; ZAITZ, 2012).

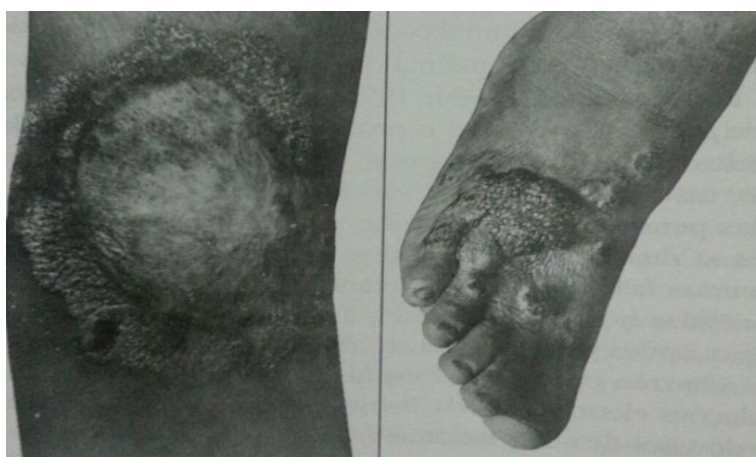
Figura 4- Feo- hifomicose subcutânea.



Fonte: <http://crescendoemcultura.blogspot.com.br/2014/04/feohifomicose.html>

Cromomicose é uma infecção micótica crônica, granulomatosa (figura 5), de evolução lenta, com supurações da pele e tecido subcutâneo, causada pela implantação traumática de uma variedade de fungos demáceos que formam corpos escleróticos no tecido. É muito comum em climas tropicais e subtropicais, e a maioria dos casos é proveniente da África e das Américas, especialmente Madagascar e Brasil, onde já foi descrita em todas as regiões, com maior frequência na Amazônia. Pode ser considerada uma doença de natureza ocupacional, pois acomete preferencialmente trabalhadores rurais. O prognóstico quanto à vida é bom, porém as ulcerações, linfedema, elefantíase e a cronicidade podem ser responsáveis por incapacidade funcional do membro afetado (LACAZ, 2002; ZAITZ, 2012).

Figura 5- Aspectos clínicos da cromoblastomicose



Fonte: LACAZ et al. 2002

Os principais agentes etiológicos descritos para as cromomicoses são: *Fonsecaea pedrosoi*, *Fonsecaea compacta*, *Phialophora verrucosa*, *Cladosporium carrionii* e

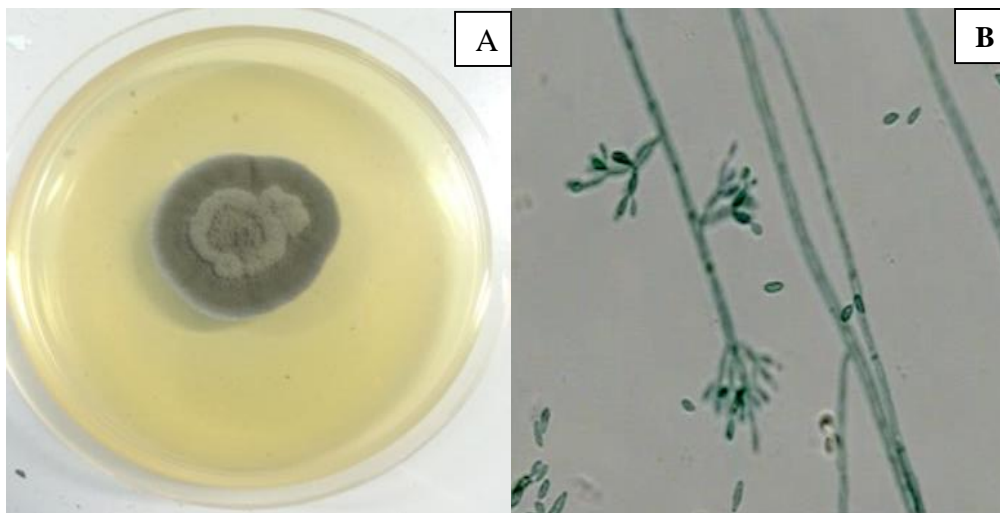
Rhinocladiella aquaspersa, sendo *Fonsecaea pedrosoi* a espécie mais frequentemente isolada de casos em regiões tropicais, seguida por *Phialophora verrucosa* e *Cladosporium carrionii* (MARTINS, MELO, HEINS- VACCARI, 2005).

Para algumas infecções em indivíduos imunocompetentes, tais como sinusite fúngica alérgica e abscesso cerebral, eles estão entre os agentes etiológicos mais comuns. O diagnóstico baseia-se em microscopia cuidadosa e exame patológico, a terapia depende da síndrome clínica e a infecção local pode ser curada com a excisão cirúrgica, enquanto a doença sistêmica é muitas vezes refratária ao tratamento (REVANKAR, 2007).

3.3 O gênero *Cladosporium* spp.

Entre os vários gêneros de fungos de importância médica destaca-se *Cladosporium* spp., que é considerado um dos mais cosmopolitas e de maior concentração na atmosfera, particularmente em regiões temperadas. *Cladosporium* spp. compõe um gênero com mais de 50 espécies, que coloniza os mais diversos ambientes e substratos. Suas colônias são características (Figura 6A) porque têm uma aparência aveludada e uma cor que varia de verde-oliva até castanho- cinza, com reverso negro. A colônia possui crescimento muito lento, atingindo 3 a 4 cm após um mês. Apresenta hifas septadas de coloração marrom, com esporulação característica do tipo *Cladosporium*. Os conidióforos são ramificados, constituídos de conídios elípticos, de tamanho uniforme, dispostos em longas cadeias (Figura 6B) (ALONSO, 2012; MARTINS, MELO, HEINS- VACCARI, 2005; ZOPPAS, 2011).

Figura 6- Características morfológicas de *C. carrionii*



(A) Macromorfologia; (B) Micromorfologia.

Os membros sapróbios comuns de *Cladosporium* ocorrem em todos os tipos de folhas e caules de plantas herbáceas e lenhosas. Como invasores secundários sobre lesões necróticas nas folhas causadas por outros fungos, são freqüentemente isolados do ar, do solo, produtos alimentícios, pintura, têxteis e outras matérias orgânicas (BROWN, HYDE, GUEST., 1998; EL-MORSY, 2000; RIESEN, SIEBER., 1985).

A cladosporiose, causada em plantas por fungos do gênero *Cladosporium*, sobretudo *Cladosporium herbarum* e *Cladosporium fulvum*, pode tornar-se severa em condições de alta umidade, com temperaturas amenas. Nestas condições pode atacar tecidos novos, como folhas, gavinhas, ramos, flores ou frutos (FISCHER et al., 2005) de diversas plantações causando danos econômicos de grande proporções.

ROCHA, SOARES e CORRÊA (2004) realizaram estudo para determinar a prevalência de contaminação fúngica nas folhas de *Cassia acutifolia* Delile (sene) e *Peumus boldus* (Molina) L. (boldo-do-Chile) comercializadas na cidade de Campinas/ Brasil e observaram que entre as amostras de boldo-do Chile provenientes de mercados, 60% apresentaram contaminação acima do limite permitido pela OMS, estando o gênero *Cladosporium* entre os mais prevalentes. Tendo em vista que essa planta é um fitoterápico bastante utilizado pela população, o seu consumo, após confirmada a contaminação por fungos, apresenta risco adicional ao consumidor, que poderia estar ingerindo micotoxinas (CORRÊA, 1998).

Além de afetarem a qualidade de plantas economicamente importantes, os fungos do gênero *Cladosporium* são responsáveis por desencadear problemas alérgicos devido à

inalação de seus esporos, pois estão dispersos abundantemente no meio ambiente (SIDRIM, ROCHA, 2012).

CHEN et al., (2014) investigaram a exposição à esporos ambientais e as mudanças pulmonares por eles causadas em crianças em idade escolar em Taiwan/ Japão, e foi evidenciado que os esporos de *Cladosporium* spp. estavam presentes em maior concentração no ambiente, causando um decréscimo nos parâmetros respiratórios testados, independente de outras partículas poluentes.

A resposta da função pulmonar na presença de *Cladosporium* spp. reflete as características do tamanho de esporos do gênero- o menor tamanho das partículas sugere o potencial de *Cladosporium* spp. para penetrar e se depositar no trato respiratório inferior humano (REPONEN et al., 1996; YEH et al., 1996).

Outros fatores de patogenicidade destas espécies são, certamente, as toxinas que produzem. *Cladosporium cladosporioides* produz cladosporina, emodina (produto mutagênico e citotóxico) bem como alguns outros compostos menos tóxicos. O efeito de toxinas foi provado em animais de laboratório sensíveis, causando icterícia hemolítica e insuficiência renal (DE HOOG et al., 2000).

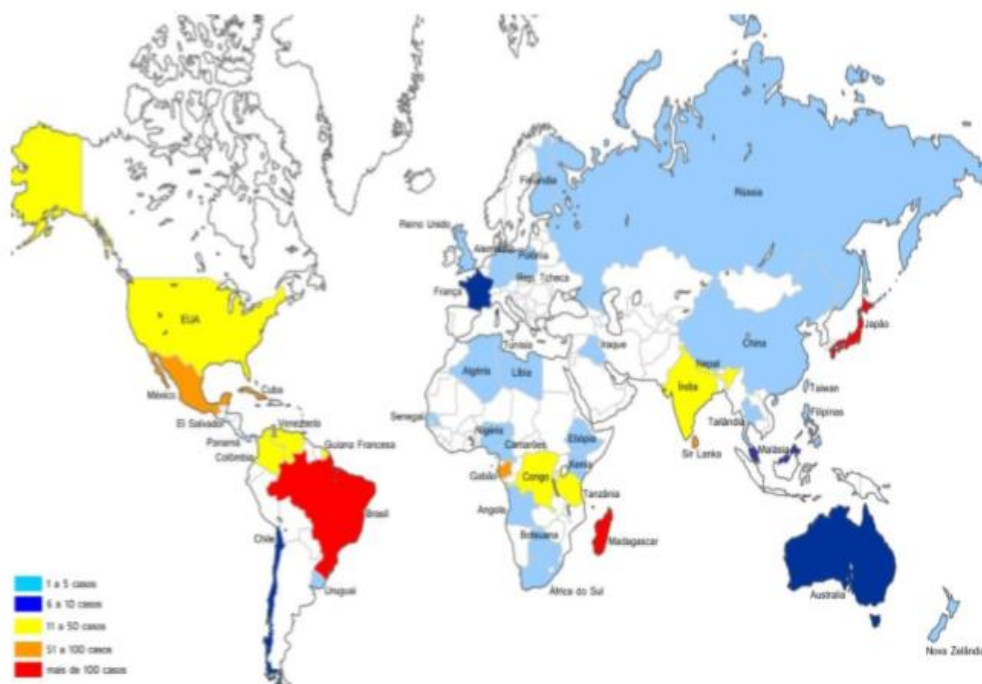
Cladosporium carrionii, *Cladosporium bantianum*, *Cladosporium herbarum*, *Cladosporium graminum* e *Cladosporium cladosporioides* são algumas das espécies pertencentes à esse gênero, sendo *Cladosporium carrionii* com grande relevância na clínica médica, e *Cladosporium herbarum* com destaque entre os fitopatógenos (TASIC; TASIC, 2007).

3.4 Aspectos clínicos e epidemiológicos da cromoblastomicose.

A cromoblastomicose, doença causada por *Cladosporium carrionii* e outros fungos dematiáceos, apresenta distribuição global (figura 7), com predominância em regiões tropicais e subtropicais. Foi descrita pela primeira vez na cidade de São Paulo/Brasil em 1911. O maior número de casos está concentrado no Continente Africano e nas Américas, em países com África do Sul, Brasil, Costa Rica e Madagascar. É uma doença ocupacional, ligada às atividades rurais e florestais, que acomete principalmente trabalhadores de baixa renda desprovidos de calçados e vestimentas adequados para a

realização destas atividades (SAMPAIO, RIVITTI, 1998; QUEIROZ- TELLES et al., 2011).

Figura 7- Distribuição mundial dos casos de cromoblastomicose.



Fonte: MASSOUD- JUNIOR (2014)

No Brasil, a cromoblastomicose não é considerada doença de notificação compulsória, sendo a região amazônica considerada a principal área endêmica de cromomicose (SILVA, DE SOUZA, ROZENTAL, 1998; MOUCHALOUAT et al., 2011). Carrion (1950) introduziu uma classificação clínica para as lesões de cromoblastomicose definida em cinco diferentes formas: nodular, tumoral, verrucosa, placa e cicatricial (QUEIROZ- TELLES et al., 2009). Posteriormente, alguns pesquisadores passaram a classificar as lesões de acordo com o grau de severidade: formas leves, moderadas e severas, baseadas na extensão da área atingida, no número de lesões, na presença de complicações e na resposta ao tratamento (CASTRO et al., 2003).

O pigmento negro presente na parede celular de *Cladosporium carrionii* e outros fungos dematiáceos favorece a capacidade fotoprotetora, permitindo ao fungo

desenvolver-se em ambientes ensolarados atuando como um dos fatores de virulência desses elementos fúngicos. As lesões de cromomicose infectam-se com facilidade, podendo desencadear erisipela, linfedema, elefantíase e, ocasionalmente, carcinoma (RIBEIRO et al, 2006; MINOTTO et al., 2001).

A erupção normalmente é única e inicia-se por lesão focal, papulosa ou pustulosa, evoluindo para nódulo verrucoso (figura 8) que pode apresentar ulceração central. A lesão normalmente é assintomática. Na fase ulcerada é comum a lesão apresentar odor fétido devido infecção fusoespiralar secundária (SAMPAIO, RIVITTI, 1998; AZULAY, AZULAY, 1999).

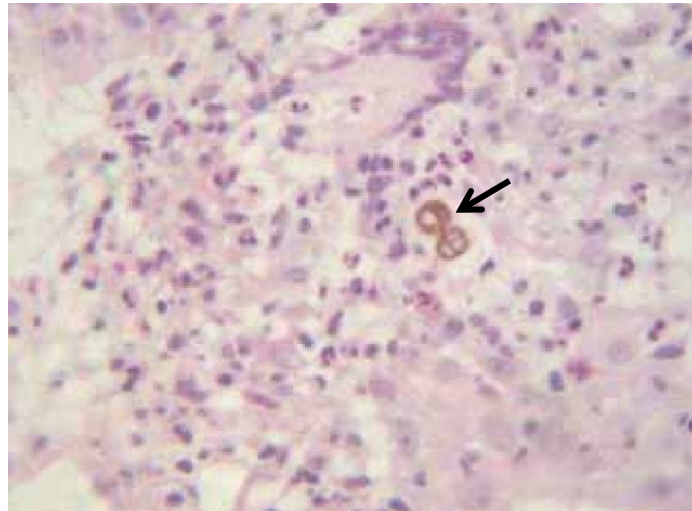
Figura 8- Dermatite verrucosa cromoparasitária



Fonte: LACAZ et al. (2008)

O diagnóstico diferencial inclui a blastomicose, tuberculose cutânea, leishmaniose tegumentar, esporotricose e carcinomas cutâneos. A confirmação diagnóstica faz-se através do achado do fungo dematiáceo por meio de exame direto ou histológico. Observam-se os corpos fumagóides - corpos micóticos cor de charuto- (figura 9) que se multiplica por septação. A histopatologia irá variar de acordo com a idade da lesão (ZANINI, 2012).

Figura 9- Corpos fumagóides em septação.



Fonte: ZANINI (2012)

Em estudo realizado por Silva et al, (2002), foi observado que a faixa etária predominantemente acometida por cromoblastomicose foi a situada entre os 50 - 60 anos (46,1% dos casos), o sexo masculino destacou-se em maior proporção e 12 dos 13 casos estudados eram de homens lavradores, tendo estreita relação com o fato de que a doença é de base ocupacional. Nesse estudo, os seguintes aspectos microscópicos das lesões foram evidenciados: epiderme com hiperqueratose, hipergranulose, acantose, hiperplasia pseudo-epiteliomatosa e exocitose; derme com intenso infiltrado inflamatório constituído por linfócitos, plasmócitos e histiócitos ao lado de gigantócitos, multinucleares que fagocitam corpúsculos acastanhados, arredondados, e refringentes com formação de microabscessos.

Em áreas onde a doença é prevalente, lesões aparecem nas extremidades superiores, embora a cromoblastomicose possa afetar vários locais, tais como as nádegas, tronco ou face. A lesão inicial pode ser uma pápula cor da pele unilateral ou rosa, com a superfície suave e pequena, que aumenta em tamanho e número (ALVARÉZ- MONTIEL, BONIFAZ, 2014).

Trata-se de uma infecção limitada à epiderme e ao tecido subcutâneo. A disseminação ocorre por contigüidade, podendo também ser presenciada nos vasos linfáticos superficiais. A sintomatologia comumente descrita pelos pacientes abrange a sensação de dor e prurido (CARRIÓN, 1950). A ausência de um manejo terapêutico adequado favorece o acometimento de infecção bacteriana secundária e edema devido à fibrose do tecido celular subcutâneo. Relatos de casos de longa evolução, que propiciaram

a conversão da lesão em neoplasia, têm sido também encontrados na literatura (QUEIROZ- TELLEZ, 1980).

O tratamento apresenta muitas dificuldades e, às vezes, é ineficaz. A eficácia do tratamento depende do agente causal, a forma clínica e a escolha de antifúngicos. Avaliação da eficácia do tratamento depende dos critérios de remissão, com base em aspectos clínicos e micológicos. Quase nunca são prescritos 5- flucitosina e fluconazol; anfotericina B é contraindicado devido sua nefrotoxicidade e cardiotoxicidade. Triazóis e terbinafina são drogas que demonstraram mais eficácia. Itraconazol é um triazol primeira geração, cujas doses são administradas em 200 mg/ dia, de 6-12 meses de tratamento (ANTONELLO et al., 2010; BONIFAZ et al., 2004; QUEIROZ- TELLES, 2009; QUEIROZ- TELLES, 2013; TORRES, LIEVANOS, BERISTAIN, ARENAS, 2010).

3.5 Disposições gerais sobre os medicamentos antifúngicos

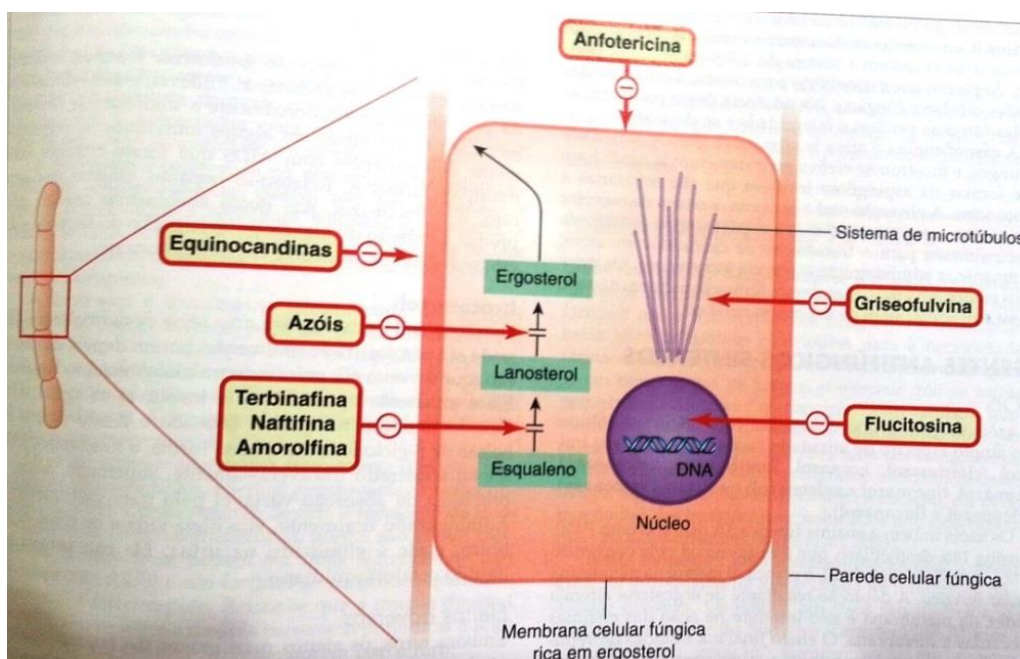
Uma maior incidência de infecções fúngicas tem sido documentada desde os anos 80. A partir dessa época, começou-se a evidenciar a emergência de novos patógenos fúngicos, que até então eram considerados não patogênicos, como agentes etiológicos de doenças sistêmicas, especialmente em hospedeiros imunocomprometidos. Um dos fatores contribuintes foi o uso generalizado de antibióticos de amplo espectro, que erradicou as populações bacterianas não- patogênicas que normalmente competem com os fungos. Embora a anfotericina B seja considerado o tratamento “padrão- ouro” de doenças invasivas causadas por leveduras e fungos filamentosos, a resposta a esse medicamento torna-se insuficiente em casos de aspergilose invasiva e outras infecções fúngicas severas. Formulações lipídicas de anfotericina B não parecem ter eficácia superior em alguns casos, e por isso estudos que avaliem a eficácia de alternativas terapêuticas são importantes (ANAÏSSIE et al., 1998; BERENQUER et al., 1997; GIRMENIA et al., 1998; RANG et al., 2012; RICHTER et al., 1999; SINGH et al., 1996; VERWEIG et al., 1999; WONG- BERINGER, 1998; WEISS, THIENKE, 1983).

As infecções fúngicas requerem agentes distintos daqueles efetivos contra bactérias. Infecções causadas por *Candida*, como por exemplo, candidíase vaginal e orofaríngea,

são comuns e preocupantes, e dois principais grupos de agentes são usados no tratamento dessas condições: os antimicrobianos polienos e os imidazois. As infecções fúngicas sistêmicas mais graves, tais como aspergilose pulmonar, ou aquelas causadas por *Cryptococcus* podem ser tratadas com infusão intravenosa prolongada de anfotericina B associada ao fluconazol; clotrimoxazol e isetionato de pentamidina (GREENE, HARRIS, 2012).

Os agentes terapêuticos atuais podem ser amplamente classificados em dois grupos: o primeiro, os antibióticos antifúngicos que ocorrem naturalmente, como os *polienos* e as *equinocandinas*, e o segundo, os fármacos sintéticos, incluindo os *azóis* e as *pirimidinas fluoradas*. Como muitas infecções são superficiais, há inúmeras preparações tópicas. Muitos agentes antifúngicos são bastante tóxicos e, quando o tratamento sistêmico é necessário, esses agentes têm de ser usados frequentemente sob supervisão médica estrita (RANG et al., 2012). Os alvos para ação dos fármacos antifúngicos comuns estão representados na figura 10.

Figura 10- Alvos de ação dos fármacos antifúngicos.

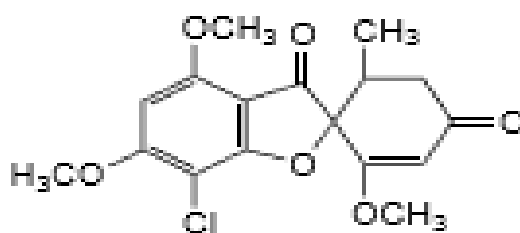


Fonte: RANG et al. (2012)

A Griseofulvina, cuja estrutura química está representada na figura 11, é o mais recente agente inibidor específico para espécies de fungos. O seu mecanismo de ação

preciso ainda é desconhecido, mas pesquisas evidenciam a sua ação como interferente na linha de montagem dos microtúbulos fúngicos, limitando o processo de mitose. A toxicidade seletiva é apenas moderada (toxicidade hepática é conhecida como um perigo ocasional) e seu espectro de ação é restrito somente à dermatófitos (RANG et al., 2012; ODDS et al., 2003).

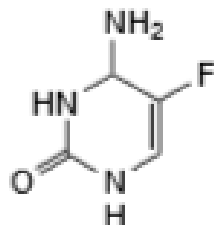
Figura 11- Estrutura química da griseofulvina



Fonte: ODDS et al. (2003)

Flucitosina é um antimetabólito, cujo espectro de atividade antifúngica é consideravelmente mais restrito que o da anfotericina B. Consiste numa pirimidina fluorada (figura 12). Os fungos sensíveis desaminam a flucitosina em 5- fluoruracila, um potente antimetabólito. A 5- fluoruracila é metabolizada e incorporada ao RNA fúngico, inibindo a timidilato sintetase, e, portanto, a síntese de DNA (BRUNTON et al., 2010; ODDS et al., 2003).

Figura 12- Estrutura química da flucitosina

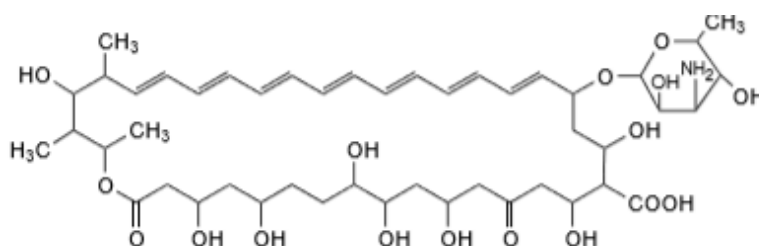


Fonte: ODDS et al. (2003)

Anfotericina (também chamada de anfotericina B) (figura 13) é o agente antifúngico com o mais amplo espectro de atividade e que continua sendo o fármaco de escolha para

a grande maioria das infecções fúngicas sistêmicas potencialmente fatais. Sua propriedade mais importante é provavelmente a capacidade de formar grandes poros na membrana, devido à grande afinidade do fármaco pelo ergosterol, um esterol da membrana fúngica. O efeito adverso mais comum e mais grave da anfotericina é a toxicidade renal. Para tentar amenizar esse problema, uma variedade de versões reformuladas deste agente tem sido introduzidas no mercado. Elas provavelmente reduzem a nefrotoxicidade por diminuir a velocidade com que a anfotericina chega aos rins para excreção. A variedade com maior sucesso terapêutico foi a formulação da anfotericina B encapsulada em lipossomas (BRUNTON et al., 2010; DUPONT, 2002; RANG et al., 2012; ODDS et al., 2003).

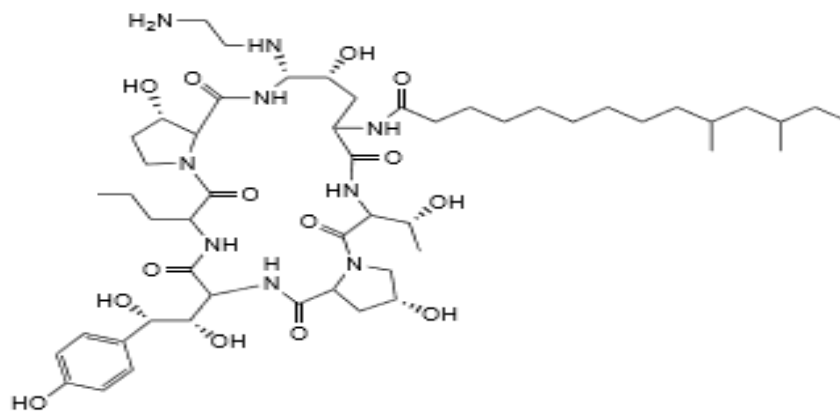
Figura 13- Estrutura química da anfotericina B



Fonte: ODDS et al. (2003)

Equinocandinas são lipopeptídeos semi- sintéticos com estrutura química de hexapeptídeos cíclicos ligados a uma cadeia lateral de ácido graxo (DERESINSKI, STEVENS, 2003). Representam uma nova classe de antifúngicos, e incluem a caspofungina (figura 14), micafungina e anidulafungina. Têm a capacidade de inibir a síntese de 1,3- β - glicano, um polipeptídeo de glicose que é necessário para manter a estrutura da parede celular fúngica. Na ausência desse polímero, as células fúngicas perdem a integridade e se destroem. (KAUFFMAN, CARVER, 2008; MOHR et al., 2008; MUÑOZ et al., 2010; RANG et al., 2012).

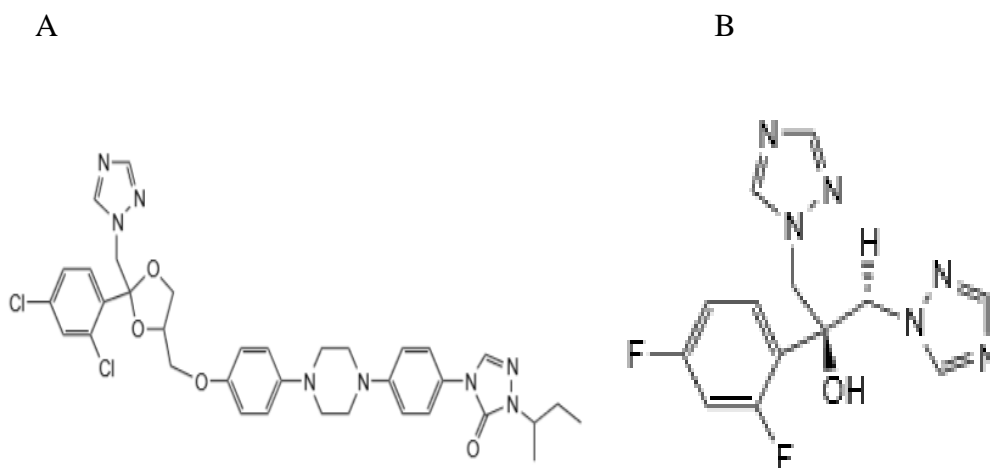
Figura 14- Estrutura química da caspofungina



Fonte: ODDS et al. (2003)

Os antifúngicos azólicos (imidazóis e triazóis) – figura 15, são a maior classe de agentes antifúngicos em uso clínico. Sua atividade é decorrente da inibição da desmetilação do lanosterol, pela inibição das citocromo P450 fúngicas, dessa forma impedindo a formação do ergosterol, alterando a permeabilidade normal da membrana fúngica, culminando com a sua degeneração (BRUNTON et al., 2010; VANDEN et al., 1995; MARICHAL et al., 1985). Clotrimazol, econazol, cetoconazol, fenticonazol, miconazol, tioconazol, itraconazol e fluconazol são representantes dessa classe de fármacos, diferindo entre si pelos núcleos imidazólicos (RANG et al., 2012).

Figura 15- Estruturas químicas do itraconazol (A) e fluconazol (B)



Fonte: ODDS et al. (2003)

Terbinafina é um composto fungicida queratinofílico, altamente lipofílico, ativo em ampla gama de patógenos da pele. É particularmente útil nas infecções de unhas, e atua inibindo seletivamente a enzima esqualenoepoxidase, que está envolvida na síntese do

ergosterol a partir do esqualeno da parede celular fúngica. O acúmulo de esqualeno é tóxico para o micro-organismo (RANG et al., 2012).

Comparado com a gama de antibióticos utilizados para tratar infecções bacterianas, o número de medicamentos antifúngicos é bastante reduzido, e em termos de número de classes de agentes que podem ser usados para tratar micoses, os alvos são focados prioritariamente na parede celular ou membrana plasmática (particularmente na síntese de esteróis de membrana, como o ergosterol). Novos agentes antifúngicos que atuem em outros alvos além destes, são consideradas inovações da terapêutica antifúngica (ODDS et al., 2003).

Os efeitos tóxicos e indesejáveis dos fármacos de escolha para tratar as infecções por fungos demáceos são bem descritos. A anfotericina desencadeia certo grau de nefrotoxicidade dose- dependente em quase todos os pacientes que usam o fármaco e a necrose tubular aguda (doença renal mais comum induzida por fármaco) é um desfecho produzido pelo seu efeito tóxico direto sobre o túbulo renal. Também há relatos de efeitos colaterais neurológicos, como surdez e convulsões. Insuficiência adrenal pelo uso de cetoconazol foi reportada mesmo com dose oral baixa, como 200 mg, desencadeando sinais e sintomas que incluem letargia, anorexia, perda de peso, hiponatremia e hipercalcemia. Também está relacionado a alguns casos de necrose hepatocelular aguda e hepatite. Itraconazol pode desencadear hepatotoxicidade rara, que oferece risco de vida (LEE, 2009; GREENE, HARRIS, 2012).

Outra problemática que envolve a atual terapia antifúngica, gira em torno de que, recentemente, o rápido aumento de micro-organismos resistentes aos antimicrobianos tem sido observado, e a terapia antifúngica não constitui uma exceção (KIM et al., 2009).

O ritmo da descoberta e desenvolvimento de um medicamento antifúngico é excessivamente lenta, e levando em consideração as novas necessidades clínicas impostas pelos quadros infecciosos, se faz necessário o estudo de novos produtos com possível atividade antifúngica, bem como de seus possíveis alvos de ação (ODDS et al., 2003).

Nesta perspectiva, as plantas medicinais com propriedades antimicrobianas são de grande relevância no contexto da problemática da resistência microbiana, principalmente em países em desenvolvimento, sendo uma ótima alternativa para investimentos em

pesquisas, uma vez que apontam para o uso de novos agentes antimicrobianos mais potentes e eficazes diante dos patógenos emergentes (PALMEIRA et al., 2010).

3.6 Produtos Naturais

A importância dos produtos naturais na terapêutica é reconhecida desde tempos imemoriais. O conhecimento de plantas alucinógenas pelos ameríndios, que as empregavam em seus ritos pagãos, bem como as propriedades afrodisíacas de diversas poções preparadas a partir de distintas espécies vegetais, acompanha o homem desde milênios. A busca do bem-estar e do prazer sempre estimulou o homem, em todas as épocas, a se aproximar da natureza, ensinando-o a se utilizar das plantas e de suas substâncias (BARREIRO, FRAGA, 2008).

De acordo com a OMS, plantas medicinais deveriam ser a melhor fonte de obter-se uma variedade de droga, pois o sistema público de saúde no Brasil não possui uma política de assistência farmacêutica capaz de suprir as necessidades medicamentosas da população, sobretudo no Nordeste brasileiro (LOBO et al., 2011; NASCIMENTO et al., 2007).

Considerando a perspectiva de obtenção de novos fármacos, os produtos naturais se diferenciam dos sintéticos sob o aspecto da diversidade molecular. Sabe-se que a diversidade molecular dos produtos de origem natural é muito superior àquela derivada dos processos de síntese, que, apesar dos avanços consideráveis, é ainda limitada. Isso proporciona a elaboração de novos fármacos com funções terapêuticas diversificadas (NISBET, MOORE, 1997).

Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) estimam que aproximadamente 80% da população dos países em desenvolvimento utilizam a medicina tradicional (popular) para atendimento de saúde, da qual a maior parte envolve o uso de extratos vegetais ou de seus princípios ativos. (BRASIL, 2006).

Compostos com propriedades biológicas, produzidos por diversas plantas, podem ser utilizados para síntese de novos medicamentos, ou mesmo, serem utilizados como substitutos de princípios ativos sintéticos, como os antibióticos, no intuito de reduzir a

resistência microbiana. No período de 2000-2006, aproximadamente 50% de moléculas químicas novas extraídas a partir de produtos naturais demonstraram a sua importância para o desenvolvimento de drogas no tratamento de doenças infecciosas (AHMAD, BEG, 2001; NEWMAN, CRAGG, 2007).

As plantas possuem vias metabólicas secundárias que dão origem a compostos, incluindo alcaloides, flavonoides, isoflavonoides, taninos, cumarinas, glicosídeos, terpenos, poliacetilenos, óleos, dentre outros, que por sua vez, são específicos a determinadas famílias, gêneros ou espécies, e cujas funções, até pouco tempo, eram desconhecidas (SIMÕES et al.; 2004; BARBOSA-FILHO et al., 1984).

As fontes naturais ainda estão disponíveis em abundância e oferecem as melhores possibilidades de encontrar substâncias de interesse terapêutico. De fato, mais de uma centena de compostos derivados de produtos naturais está em fase de testes clínicos, principalmente para tratamento do câncer e de doenças infecciosas. Além disso, um total de 13 fármacos derivados de produtos naturais foram aprovados para utilização clínica entre 2005 e 2007 (BUTLER, 2008; HARVER, 2008).

Dentro deste contexto e com base na necessidade de novas alternativas para obtenção de produtos bioativos, muitos estudos têm sido realizados com fitoconstituintes obtidos de plantas medicinais, com alto valor terapêutico que possam servir como fontes para a potencial produção de novos medicamentos úteis no tratamento de diversas doenças. A diversidade e o grande número fitoconstituintes encontrados em tais produtos é que determinam a ampla variedade de ações farmacológicas (ARESI, 2011).

3.7 Considerações sobre o óleo essencial de *Cymbopogon nardus* L. Rendle e citronelal

Cymbopogon nardus L. Rendle, popularmente conhecida como citronela ou capim-citronela (figura 16) é uma espécie de planta pertencente à família *Poaceae*, cuja classificação filogenética está mostrada na tabela 1. É uma espécie utilizada mundialmente na produção do óleo essencial de citronela, que é empregado na fabricação de perfumaria, bebidas, produtos farmacêuticos e alimentos (WEE, WEI; 2013).

Figura 16- Fotografia de *Cymbopogon nardus*

Fonte: <http://plants.usda.gov/core/profile?symbol=CYNA>. http://www.floridata.com/ref/C/cymb_nar.cfm

Tabela 1- Classificação de *Cymbopogon nardus* L. Rendle

Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta (plantas vasculares)
Superdivisão	Espermatófita (plantas com sementes)
Divisão	Magnoliófito (plantas com flores)
Classe	Liliopsida (monocotiledôneas)
Subclasse	Comelinidae
Ordem	Ciperales
Gênero	<i>Cymbopogon</i>
Espécie	<i>Cymbopogon nardus</i> (L.) Rendle

Fonte: <http://plants.usda.gov/core/profile?symbol=CYNA>.

Alguns trabalhos evidenciam a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *C. nardus* e do citronelal, a saber: Seixas et al. (2011) determinaram que os tratamentos com capim-citronela e citronelal propiciaram redução do crescimento micelial *In vitro* do fungo *Fusarium subglutinans*, sendo o óleo essencial mais efetivo em inibir o crescimento micelial em relação ao citronelal, alcançando 100% de inibição no quarto dia de exposição.

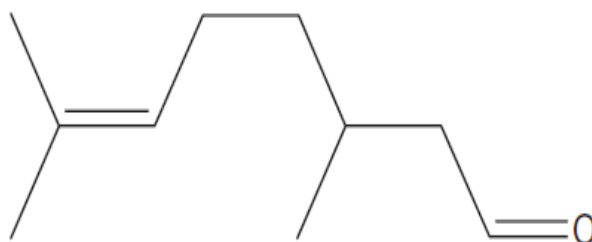
Wei & Wee (2013) estudaram a composição química e a atividade antibacteriana do óleo essencial de *C. nardus* sobre bactérias patogênicas em culturas de peixes. Os

resultados demonstraram que o óleo essencial foi capaz de inibir o crescimento de todos os 36 isolados bacterianos, bem como as 7 cepas ATCC, com valores de CIM variando entre 0,244 µg/ml e 0,977 µg/ml, comprovando a sua eficácia como agente antibacteriano.

CHEN et al. (2014) avaliaram a capacidade do óleo essencial de citronela inibir o crescimento de *Alternaria alternata*, fungo de grande importância na agricultura, devido a sua incidência como fitopatógeno. Os resultados demonstraram que a inibição do crescimento micelial do fungo, as alterações nas hifas e a inibição da germinação de esporos ocorreu de forma significativa em relação ao controle, e de uma maneira dose-dependente, com sua CIM estabelecida em 1 µL/ml após 7 dias de incubação.

Os óleos essenciais são misturas complexas e seus constituintes podem pertencer a mais diversas classes de compostos, porém os terpenos e os fenilpropenos são as classes de compostos mais comumente encontradas. Os terpenos encontrados com maior frequência nos óleos essenciais são os monoterpenos e sesquiterpenos, bem como os diterpenos, constituintes minoritários dos óleos essenciais (CASTRO et al., 2004c; LOAYZA et al., 1995). O óleo essencial extraído de *C. nardus* possui alto teor de geraniol e citronelal. O citronelal (figura 17) é utilizado como material básico para a síntese de importantes compostos químicos denominados iononas e para a síntese de vitamina A. Esse óleo apresenta atividade repelente a insetos e ação fungicida e bactericida. Ele é também utilizado na fabricação de perfumes e cosméticos (BILLERBECK et al., 2001; MUMCUOGLU et al., 2004; REIS et al., 2006; TRONGTOKIT et al., 2005; WONG et al., 2005)

Figura 17- Estrutura química do citronelal



Fonte: NAKAHARA et al. (2003)

Metabólitos secundários estão geralmente envolvidos no processo de interação das plantas com o meio ambiente. A defesa contra patógenos, a proteção contra os raios ultravioleta e a atração de polinizadores já foram reconhecidas como algumas de suas funções (SANTANA, 2011).

O óleo essencial de *C. nardus* (Quinari®- lote 519/520) teve sua análise realizada no Laboratório Unificado de Desenvolvimento de Medicamentos (LUDEM), do Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, sob responsabilidade do Professor Doutor Fabio Santos de Souza, através de um Cromatógrafo Gasoso (CG) da Shimadzu, modelo GC17- A, com sistema equipado com um Espectrômetro de Massa (EM).

A coleta de dados e integração foi realizada com o software Class5000. A fase móvel composta de hélio e bombeada na vazão de 1,6 mL/ min com split 1:5. A separação cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna capilar DB- 5 (30 mm x 0,25 mm x 0,25 µm). A quantificação dos componentes foi realizada com base na percentagem da área do pico de cada componente em relação à área total de todos os picos normalizados no cromatograma (MENEZES, 2012). O resultado da análise realizada para determinação dos fitoconstituintes do óleo essencial de *C. nardus* está demonstrado no quadro 1.

Quadro 1- Composição semi- quantitativa do óleo de *C. nardus*

	Composto	Área absoluta	Tempo de retenção	Concentração relativa (%)	Índice de similaridade (%)
Pico 1	Citronelal	737436	7,98	56,8	94
Pico 2	Citronelol	171357	9,52	13,2	92
Pico 3	Nerol	254236	10,02	19,6	91

Pico 4	β - Elemene	55794	12,47	4,3	77
Pico 5	Elemenol	79817	14,78	6,1	86

Base de dados: Willey 229/ NB

Diversos fatores são determinantes para o teor dos constituintes majoritários de um óleo essencial (temperatura, tipo de solo, época da colheita, adubação, método de extração, diferenças genéticas etc).

A análise do óleo essencial utilizado neste trabalho foi semelhante à realizada por Wei & Wee, em 2013, no que diz respeito ao perfil qualitativo, onde o citronelal foi observado como fitoconstituente majoritário, correspondendo a um total de 29,6% do total analisado. Em nossa análise, o citronelal obteve uma concentração relativa de 56, 8%, também sendo determinado como constituinte majoritário, embora em diferentes proporções com relação ao estudo citado.

Em análise realizada por NAKAHARA et al., 2003, o geraniol apresentou-se como constituinte majoritário do óleo essencial de *C. nardus*, representando um total de 35,7% da composição. Nesta análise, o citronelal correspondeu à apenas 5,8% da composição química.

Aguiar et al, (2014) determinaram as propriedades antifúngicas e a constituição química do óleo essencial de *C. nardus*. Neste trabalho, o citronelal foi o constituinte majoritário (36,53%) e quantidades substanciais de geraniol e β - citronelol foram encontradas. Essas diferenças nos percentuais do citronelal são um reflexo da vasta gama de fatores que podem alterar os constituintes químicos de uma determinada espécie de planta.

Material e métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Local da pesquisa

Os ensaios de atividade antifúngica para o desenvolvimento deste trabalho foram realizados no Laboratório de Micologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

4. 2 Espécies fúngicas

As cepas foram adquiridas da coleção de culturas da Micoteca URM do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco- UFPE e da coleção de culturas do Laboratório de Micologia da Universidade Federal da Paraíba- UFPB. Todas as cepas foram mantidas em tubos de ensaio contendo ágar batata inclinado (Difco®) sob refrigeração (8 °C) e a temperatura ambiente (28- 30 °C).

4. 3 Óleos essenciais e fitoconstituintes

Os óleos essenciais (Quadro 2) foram obtidos da Quinari Fragrâncias e Cosméticos Ltda. (Ponta Grossa, Paraná, Brasil) e o citronelal, fitoconstituente majoritário utilizado nos ensaios, da Indústria Sigma Aldrich®.

Quadro 2- Espécies vegetais das quais foram obtidas os óleos essenciais

ESPÉCIE	FAMÍLIA	NOME POPULAR
<i>Laurus nobilis</i> L.	Lauraceae	Louro
<i>Mentha arvensis</i>	Lamiaceae	Hortelã- brava
<i>Mentha X piperita</i> L.	Lamiaceae	Hortelã- pimenta
<i>Mentha spicata</i>	Lamiaceae	Hortelã- verde
<i>Ocimum basilicum</i> L.	Lamiaceae	Manjericão
<i>Cymbopogon nardus</i> L.	Poaceae	Citronela
<i>Origanum vulgare</i>	Lamiaceae	Orégano

4. 4 Meios de cultura

Os meios de cultura utilizados na realização dos ensaios para avaliação da atividade antifúngica foram os meios de cultivo sólidos Ágar Sabouraud dextrose- ASD (HIMEDIA®) e Ágar Batata Dextrose- BDA (Difco Laboratório Ltda.) e o meio de cultivo líquido RPMI 1640 com glutamina e sem bicarbonato (HIMEDIA®), que foram

preparados de acordo com informações do fabricante. Os meios foram solubilizados em água destilada e esterilizados em autoclave, a 121°C por 15 minutos.

4. 5 Antifúngico sintético

O produto utilizado como controle na execução das metodologias foi o itraconazol (Sigma Aldrich®), testado nas mesmas concentrações dos óleos essenciais e fitoconstituente majoritário.

4. 6 Inóculo

Para a preparação do inóculo, foi realizado repique das cepas em ABD e incubação a 28- 30° C por 7- 14 dias, para atingirem um bom crescimento. As suspensões das recentes colônias das cepas fúngicas foram preparadas cobrindo-as com 5 mL de solução salina estéril (NaCl 0,85% p/v- Labsynth®). As misturas resultantes de conídios e fragmentos de hifas foram retiradas e transferidas para tubos de ensaio esterilizados. Em seguida, essas suspensões foram agitadas por 2 minutos com auxílio do aparelho Vortex. Após agitação, cada suspensão teve turbidez comparada e ajustada àquela apresentada pela suspensão de sulfato de bário do tubo 0,5 da escala de McFarland, a qual corresponde a um inóculo de aproximadamente 1×10^6 Unidades Formadoras de Colônia/ mL. A quantificação dos inóculos foi confirmada por meio da contagem celular em câmara de Neubauer e as suspensões ajustadas no espectrofotômetro (Leitz- Fhotometer 340- 800), para conter aproximadamente 1×10^6 UFC/ mL (CLEELAND; SQUIRES, 1991; HADACEK; GREGER, 2000; SAHIN et al., 2004).

4. 7 Triagem de atividade microbiológica

A triagem para avaliação da atividade antifúngica dos óleos essenciais foi realizada com base na capacidade de inibição do crescimento de fungos dematiáceos em placas de microdiluição.

Para isso, 100 µL do meio RPMI duplamente concentrado foram dispostos nos orifícios das placas de microdiluição, seguidos de 100 µL da emulsão de cada óleo essencial (na concentração de 1024 µg/ mL) e, por fim, 10 µL da suspensão de cada cepa fúngica.

Paralelamente, foi realizado um controle de esterilidade do meio, no qual foram colocados 200 µL do CSD em um orifício, na ausência da suspensão dos fungos e um controle de crescimento das cepas, com 100 µL do CSD e 10 µL da suspensão dos fungos. Para verificar a ausência da interferência dos solventes utilizados na preparação das emulsões (DMSO – 5% e Tween 80- 2%), foi feito um controle no qual foram adicionados 100 µL de CSD duplamente concentrado, DMSO ou Tween 80 e 10 µL da suspensão fúngica. Todas as placas foram assepticamente seladas e incubadas a 28° C por 5 dias, e após esse período foi realizada a leitura dos resultados.

A confirmação da atividade antifúngica foi evidenciada pela inibição visual do crescimento das cepas testadas em relação aos seus respectivos controles de crescimento positivo.

Os experimentos foram realizados em duplicata e os resultados expressos em termos percentuais, levando-se em consideração a quantidade de cepas que cada emulsão de óleo essencial foi capaz de inibir o crescimento.

4. 8 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da CIM dos produtos foi realizada com o óleo essencial que demonstrou melhor perfil de atividade antifúngica no *screening* microbiológico. A CIM foi determinada pela técnica de microdiluição, utilizando placas de microtitulação contendo 96 cavidades com fundo em forma de “U” e em duplicata (HADACEK; GREGER, 2000; SAHIN et al., 2004; MOREIRA et al., 2010). Em cada orifício da placa foram adicionados 100 µL do meio líquido RPMI duplamente concentrado.

Posteriormente, 100 µL da emulsão dos produtos (óleo essencial e fitoconstituente), também duplamente concentrados, foram dispensados nas cavidades da primeira linha da placa. E por meio de uma diluição seriada a uma razão de dois, foram obtidas concentrações de 1.024 µg/mL até 4 µg/mL, de modo que na primeira linha da placa se encontrava a maior concentração e na última, a menor. Por fim, foram adicionados 10 µL do inóculo dos micro-organismos nas cavidades, onde cada coluna da placa fez referência a uma cepa fúngica.

Ao mesmo tempo, foi realizado o controle para o micro-organismo, colocando-se nas cavidades 100µL do meio RPMI duplamente concentrado, 100µL de água destilada estéril e 10 µL do inóculo de cada espécie. O controle do itraconazol foi realizado testando-se nas mesmas concentrações dos óleos e fitoconstituente. O controle do CSD foi realizado colocando-se 200µL do mesmo em um orifício sem a suspensão dos fungos. As placas foram seladas e incubadas a 28°C por 5 dias, para posterior realização da leitura.

Os ensaios foram realizados em duplicata e o resultado expresso pela média aritmética das CIM's obtidas nos dois ensaios. A CIM correspondeu à menor diluição na qual se verificou ausência de crescimento fúngico visível (CAVALCANTI, ALMEIDA, PADILHA; 2011).

A atividade antimicrobiana dos produtos foi interpretada e considerada ativa ou não, conforme os seguintes critérios: 50-500 µg/mL= forte/ ótima atividade; 600- 1500 µg/mL= moderada atividade; acima de 1500 µg/mL= fraca atividade ou produto inativo (SARTORATTO et al., 2004; HOUGHTON et al., 2007).

4. 9 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)

Para determinar a CFM, e assim confirmar os valor de CIM, após a leitura da CIM em 5 dias, alíquotas de 10 µL foram retiradas de cada cavidade da placa de microdiluição onde não houve crescimento fúngico e foram cultivadas em uma placa de Petri (90 X 15 mm) contendo ASD. O sistema foi incubado a 28°C por 72 horas.

A CFM foi definida como a menor concentração do óleo essencial e do fitoconstituente, semeadas em ASD, em que não houve crescimento fúngico, ou o crescimento for menor que 3 UFC (KLEPSEK et al., 1998; ERNST et al., 1999;

ESPINEL- INGROFF, 2002). Os experimentos foram realizados em duplicata e os resultados expressos como a média aritmética das concentrações em que houve crescimento de até 3 UFC.

4. 10 Determinação da cinética de morte microbiana

O ensaio para determinação da cinética de morte microbiana pelo óleo essencial, fitoconstituente e antifúngico- controle foi realizado pela técnica de diluição em meio sólido. Para execução da técnica, inicialmente foram preparadas placas de Petri (90 X 15 mm), Dispo- Petri®, com 20 mL de meio ASD acrescido de emulsões do óleo essencial, fitoconstituente ou itraconazol nas concentrações CIM, CIMX2 e CIMX4. Em seguida, foi retirado um fragmento de 2 mm das cepas fúngicas recentemente ensaiadas, que foi colocado no centro da placa contendo o ASD acrescido da substância- teste. O sistema foi incubado a temperatura ambiente por 12 dias, e leituras foram realizadas a cada 2 dias, com auxílio de uma régua.

Os controles incluídos neste ensaio foram a observação do crescimento micelial radial da cepa fúngica em ASD sem adição do óleo essencial ou fitoconstituente e em ASD na presença de itraconazol, nas concentrações de CIM, CIMX2 e CIMX4. Após a montagem do sistema, o crescimento micelial radial ou a sua ausência, foi avaliado em diferentes intervalos de tempo (0, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 dias), sendo esse crescimento micelial radial da colônia fúngica medido a cada dois dias e o resultado expresso em milímetros (média de dois experimentos independentes) (THYAGARAJA; HOSONO, 1996; ADAM et al., 1998; DAFERERA; ZIOGAS; POLISSOU, 2003).

4. 11 Interferência dos óleos essenciais sobre a germinação de conídios

Emulsões do óleo essencial, fitoconstituente e itraconazol nas concentrações CIM₅₀ e CIM₉₀ (tabela 2) foram preparadas e testadas em relação a sua capacidade de inibir a germinação de conídios das cepas em estudo.

Alíquotas de 20 μL de cada emulsão foram homogeneizadas, com auxílio de um aparelho Vortex, com 20 μL de suspensão de conídios fúngicos (1×10^6 UFC/ mL) obtidos de culturas com 7- 14 dias de crescimento em ABD a 28°C. Em seguida, 20 μL da mistura foram colocados no centro de lâminas de vidro estéreis. As lâminas contendo a mistura foram incubadas em uma câmara úmida a 28°C por 24 horas. Após o período de incubação, cada lâmina foi fixada e corada com azul de lactofenol algodão e observada sob microscopia óptica para visualização da germinação de conídios.

Assim, 100 conídios foram contados e a quantidade de conídios germinados calculado. No experimento controle, a emulsão do óleo essencial foi substituída por água destilada estéril. A análise foi realizada em duplicata e os resultados expressos como a média das duas repetições (PEREIRA et al., 2011; RANA; SINGH; TANEJA, 1997; SHARMA; TRIPARTHI, 2008; SURENDER et al., 1987).

Tabela 2 - Valores de CIM₅₀ e CIM₉₀ do OE- CN, citronelal e itraconazol

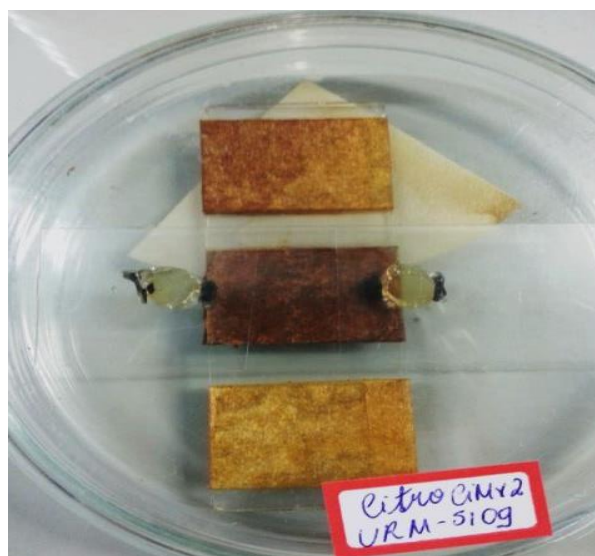
	CIM₅₀	CIM₉₀
OE- CN	64 $\mu\text{g/mL}$	128 $\mu\text{g/mL}$
Citronelal	32 $\mu\text{g/mL}$	512 $\mu\text{g/mL}$
Itraconazol	32 $\mu\text{g/mL}$	256 $\mu\text{g/mL}$

4. 12 Interferência dos óleos essenciais sobre a morfogênese fúngica

Em placas de Petri (90 x 15 mm) descartáveis e estéreis (Dispo Petri/ Interlab), foram adicionados 20 mL de ASD fundido e ajustado na temperatura de 50°C em banho maria. Em seguida, foi adicionado um volume da emulsão do óleo essencial, fitoconstituente ou itraconazol, com o objetivo de alcançar as concentrações CIM, CIMX2 e CIMX4. Após solidificação do ASD acrescido da droga- teste, cavidades foram feitas no meio de cultivo utilizando-se cânulas de vidro esterilizadas.

Com auxílio de uma alça descartável estéril, pequenos blocos deste meio foram transferidos para a superfície de uma lâmina estéril de microscopia. Em seguida, fragmentos do micélio das cepas recém- cultivadas em ASD foram dispostos sobre a superfície dos blocos de ASD acrescido da droga- teste nas diferentes concentrações, e o sistema foi coberto com uma lamínula. As lâminas foram incubadas em câmara úmida por cinco dias a 28 °C (figura 18).

Figura 18- Suporte para ensaio da morfogênese



O mesmo processo foi realizado para as cepas fúngicas cultivadas em ASD sem adição de nenhuma substância- teste, as quais serviram como procedimento controle. Os fragmentos miceliais coletados foram fixados em azul lactofenol algodão, e em seguida examinados sob microscopia óptica utilizando aumento de 400x a fim de se observar as características micromorfológicas das cepas tratadas ou não. Os experimentos foram realizados em duplicata e imagens representativas foram registradas para demonstrar as alterações observadas (BILLERBECK et al., 2001; SHARMA; TRIPATHI, 2008).

4. 13 Análise estatística

Os valores de CIM e CFM foram expressos pela média aritmética dos resultados. Os resultados dos ensaios quantitativos para avaliar os efeitos dos produtos- teste sobre o crescimento micelial radial e a germinação dos conídios foram expressos como média \pm

erro padrão (e. p.). Para a avaliação estatística destes resultados, foi empregado o teste ANOVA, seguido do pós-teste de Dunett e o teste de Fischer para determinar diferenças significantes, quando um valor de $p < 0,05$. Todos os resultados foram analisados com o software GraphPad Prism versão 5.0 para Windows, San Diego, CA, EUA.

Resultados e discussão

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Triagem da atividade microbiológica

Neste trabalho foi realizado o *screening* de atividade antifúngica de sete óleos essenciais, incluindo *Mentha arvensis*, *Cymbopogon nardus*, *Mentha spicata*, *Laurus nobilis*, *Origanum vulgare*, *Ocimum basilicum* e *Mentha piperita*, que foram selecionados para a triagem de atividade sobre fungos dematiáceos devido aos já bem descritos trabalhos científicos sobre atividade antifúngica por eles desempenhada.

Foi observado que a maioria das cepas fúngicas ensaiadas foram sensíveis à ação dos óleos essenciais (tabela 3), na concentração testada (2048 µg/mL), com exceção da cepa *Hendersoluna toruloidea* CQ- 2013, que não teve seu crescimento afetado diante da exposição à cinco dos sete óleos utilizados. *Hendersonula toruloidea* é um fungo dematiáceo patógeno humano endêmico em países tropicais e subtropicais. A infecção causada por este fungo é muitas vezes clinicamente indistinguível de *Trichophyton rubrum* ou outras dermatofitoses. É uma espécie resistente ao tratamento com antifúngicos convencionais, como griseofulvina e imidazóis (FRANKEL; RIPPON, 1989).

Tabela 3 – Avaliação da atividade antifúngica dos óleos essenciais sobre cepas de fungos dematiáceos

Óleo essencial/ Cepa	<i>F.pedrosoi</i> URM 3059	<i>C.carrionii</i> CQ- 02	<i>P.verrucosa</i> LM- 97	<i>P.verrucosa</i> URM 2667	<i>Hend.</i> <i>Toruloidea</i> CQ- 2013	<i>C.carrionii</i> LM- 01	% Inibição
<i>M.arvensis</i>	-	-	-	-	+	+	66,6%
<i>C. nardus</i>	-	-	-	-	+	-	83,3%
<i>M. spicata</i>	-	-	-	-	-	-	100%
<i>L. nobilis</i>	-	-	+	+	-	-	66,6%
<i>O. vulgare</i>	-	-	-	-	-	+	83,3%
<i>O. basilicum</i>	-	-	-	-	+	+	66,6%
<i>M. piperita</i>	-	+	-	-	+	-	66,6%
Controle	+	+	+	+	+	+	-

+ : Crescimento do micro- organismo - : Ausência de crescimento do micro- organismo

O óleo essencial de *Mentha spicata* foi capaz de inibir o crescimento de 100% das cepas ensaiadas, em relação aos seus respectivos controles positivos, seguida pelos óleos essenciais de *Cymbopogon nardus* e *Origanum vulgare*, que inibiram o crescimento de 83,3% das cepas. Os resultados aqui encontrados corroboram outras referências no que diz respeito à atividade antifúngica dos óleos essenciais testados.

Em estudo realizado por Abrantes et al. (2013), o óleo essencial de *Mentha spicata* produziu intensa atividade antifúngica sobre cepas de *Candida* não- albicans, com médias de halos de inibição do crescimento superior ao do controle feito com nistatina. No mesmo estudo, os óleos essenciais de *M. arvensis*, *M. piperita*, *O. basilicum* e *O. vulgare*

também demonstraram inibição do crescimento das cepas do gênero *Candida* spp, com melhores resultados que o controle utilizado.

Em 2006, Freire avaliou a capacidade do óleo essencial de *M. piperita* em inibir o crescimento micelial radial de fungos dos gêneros *Fusarium*, *Aspergillus* e *Cladosporium*, comumente associados à contaminação de plantas, e observou que a atividade antifúngica ocorreu de forma significativa em todas as concentrações testadas, para todas as cepas.

Viana (2013) avaliou a atividade antifúngica de óleos essenciais sobre cepas de *Fusarium*, e evidenciou que o óleo essencial de *O. vulgare* foi capaz de inibir o crescimento de todas as cepas ensaiadas, sendo o escolhido para demais testes de atividade antifúngica sobre esse gênero. O mesmo óleo essencial também demonstrou ótima capacidade de inibir o crescimento de espécies de *Cladosporium* spp. em ensaio semelhante, realizado por Menezes em 2012.

A triagem microbiológica é um teste qualitativo, utilizado como ensaio preliminar na avaliação do potencial antimicrobiano de um composto bioativo. Os resultados obtidos podem nortear uma sequência de análises mais precisas com ênfase na ação antimicrobiana do produto analisado frente ao micro- organismo teste (HSIEH; MAU; HUANG, 2001).

Vale ressaltar que o experimento aqui realizado como triagem de atividade antifúngica de óleos essenciais, por levar em consideração resultados de estudos recentes realizados, não utilizou o método de difusão em meio sólido, e sim a avaliação da capacidade de inibição do crescimento fúngico em meio líquido. Este teste promove uma economia de meios de cultura, substâncias- teste e inóculo de micro- organismos, além de requerer menor tempo para ser realizada a leitura, comparando com o método de difusão em meio sólido.

A partir dos resultados obtidos na triagem microbiológica e de levantamentos bibliográficos realizados, seguiram-se os ensaios de atividade antifúngica *in vitro* do óleo essencial de *C. nardus*, já que o mesmo inibira o crescimento de 83,3% das cepas estudadas e tendo em vista o limitado número de publicações que demonstrem a sua atividade sobre fungos demáceos.

5. 2 Determinação da CIM e CFM

A metodologia empregada neste estudo foi validada pela ausência de crescimento fúngico para o controle de esterilidade, bem como pela presença de crescimento fúngico para o controle de crescimento. As determinações dos valores de CIM e CFM dos produtos- teste foram realizadas pelo método de microdiluição e os valores da CIM e CFM encontram-se representados na tabela 4.

Tabela 4 - Valores de CIM e CFM dos produtos testados sobre cepas de fungos demáceos

Cepa fúngica	<i>C. nardus</i> (µg/mL)		Citronelal (µg/mL)		Itraconazol (µg/mL)	
	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
<i>C. carrionii</i> 2B3	64	64	512	1.024	128	128
<i>F.pedrosoi</i> URM 3059	64	64	256	256	256	256
<i>Henders toruloidea</i> . CQ- 2013	64	64	32	32	32	32
<i>P. verrucosa</i> URM- 2884	64	64	32	32	32	32
<i>C. carrionii</i> LM- 01	64	64	32	32	32	32
<i>P. verrucosa</i> URM- 2667	128	128	32	32	32	32
<i>C. carrionii</i> CL- 03	128	128	512	512	32	32
<i>C. carrionii</i> URM- 5109	64	64	32	32	32	32

O método de microdiluição escolhido para a determinação da CIM apresenta-se como uma forma simples, econômica e rápida de avaliar a atividade antimicrobiana de produtos naturais. Possui grande reprodutibilidade, sendo mais sensível que outros métodos utilizados, e requer pequena quantidade de amostra e meios de cultura, além de poder ser utilizado com grande número de amostras (SCORZONI et al., 2007, OSTROSKY et al., 2008).

A partir deste experimento, foi utilizado, também como produto- teste, o citronelal, fitoconstituente majoritário do óleo essencial escolhido para o estudo. Os fitoconstituintes, pequenas biomoléculas orgânicas, são compostos químicos oriundos dos óleos essenciais e podem apresentar atividades biológicas se utilizados de forma isolada ou em associação a outras substâncias. Seu estudo representa uma importante possibilidade de obtenção de

novos fármacos, especialmente se considerarmos a síntese dos mesmos, em laboratório, garantindo produção em larga escala (LIMA et al., 2005).

De acordo com os parâmetros de Sartoratto et al., (2004) e Houghton et al., (2007), tanto o óleo essencial de *C. nardus* quanto o seu fitoconstituente majoritário, citronelal, e o itraconazol (antifúngico controle) apresentaram perfis com forte atividade antifúngica, com exceção do citronelal frente às cepas de *C. carrionii* 2B3 e *C. carrionii* CL-03, onde apresentou valores de CIM acima de 500 µg/ mL (512 µg/ mL), mesmo assim demonstrando moderada atividade antimicrobiana. Os resultados mostraram que as concentrações de 64 µg/ mL e 128 µg/ mL do óleo essencial de *C. nardus* foram encontradas como CIMs para, respectivamente, 75 % e 25% das cepas fúngicas ensaiadas. Já para o citronelal, os valores de CIMs foram 32 µg/ mL para 62,5 % das cepas, 256 µg/ mL para 12,5% das cepas e 512 µg/ mL para 25 % das cepas ensaiadas.

Na comparação entre CIM e CFM foi observado que todas as substâncias testadas apresentaram valores de CFM semelhantes aos valores de CIM, com exceção do citronelal frente à cepa de *C. carrionii* 2B3, onde sua CFM (1024 µg/ mL) ficou estabelecida como o dobro da CIM (512 µg/ mL). A semelhança entre esses dois parâmetros é interessante do ponto de vista da atividade antifúngica, já que a CFM é considerada como a menor concentração capaz de inibir totalmente o crescimento fúngico. Quando coincide com a CIM, menores concentrações podem ser capazes de alcançar os resultados almejados, diminuindo a probabilidade do surgimento de efeitos tóxicos, quando estes são dependentes de concentração.

Segundo Hafidh et al. (2011), a razão entre os valores de CFM/CIM, quando apresentam valores de 1 ou 2, indicam que o efeito antifúngico de compostos naturais é fungicida e não fungistático. Levando esse parâmetro em consideração, tanto o óleo essencial de *C. nardus* quanto o citronelal, quando testados sobre todas as cepas estudadas, podem ter seus efeitos antifúngicos considerados como fungicidas.

Sabendo-se que geralmente os constituintes químicos majoritários determinam as propriedades biológicas dos óleos essenciais, foi realizada uma comparação entre os valores de CIMs do óleo essencial de *C. nardus* e do citronelal, e foi observado que em cinco das oito cepas em estudo (62,5 %), o citronelal apresentou uma CIM com valores menores do que o óleo essencial, demonstrando maior capacidade em inibir o crescimento fúngico. Para essas cepas, a atividade antifúngica pode ser atribuída ao citronelal de forma

isolada, não havendo necessidade de interação com outros fitoconstituintes para exercer a atividade biológica. Já para três das oito cepas ensaiadas (37, 5 %), a CIM do óleo essencial teve menor valor do que a do citronelal. Nesses casos, a maior potência do óleo essencial pode ser decorrente de uma interação entre o citronelal e um ou mais fitoconstituintes presentes no óleo, para alcançar o efeito inibitório do crescimento fúngico.

Os estudos que determinam CIM e CFM fornecem importantes informações sobre a potência dos produtos analisados e podem guiar outros estudos que visam a empregabilidade clínica dos produtos, pois é essencial que o produto natural, como um novo candidato a ser empregado como antifúngico, obtenha relevantes resultados nesses estudos *In vitro* para justificar a continuidade dos estudos (CLEELAND, SQUIRES, 1991).

Por ser uma espécie de fungo dematiáceo importante para a clínica médica, como agente etiológico relevante de cromoblastomicoses, os ensaios posteriores para avaliar a atividade antifúngica *in vitro* do óleo essencial de *C. nardus* e do citronelal foram realizados com duas cepas de *C. carrionii*: LM- 01 e URM- 5109. Pelos valores de CIM e CFM demonstrados, as duas cepas foram sensíveis à presença dos produtos testados (64 µg/ mL frente ao óleo essencial e 32 µg/ mL frente ao citronelal, para ambas as cepas), o que encorajou a continuação dos experimentos com as duas cepas citadas.

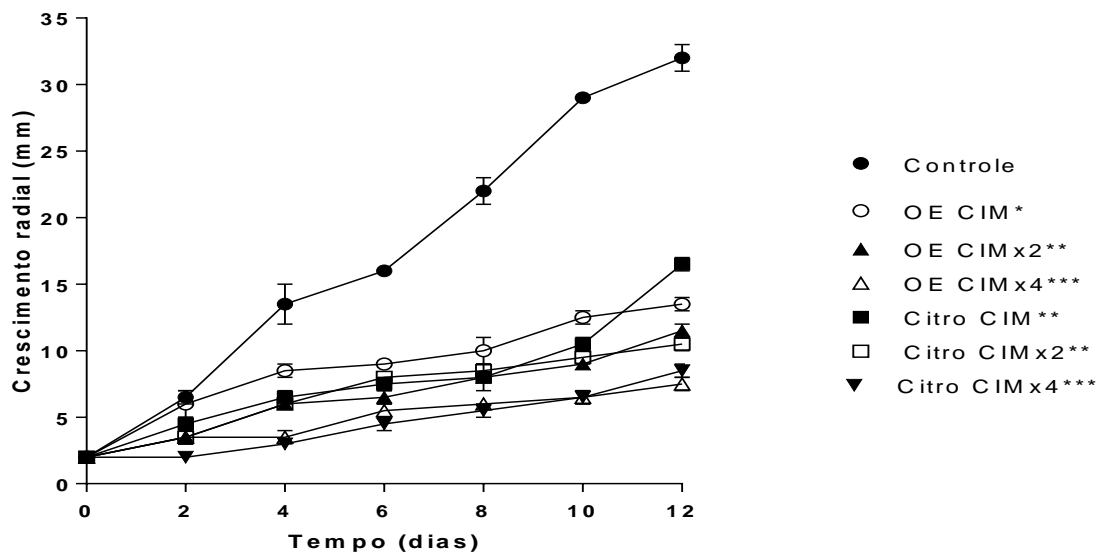
5.3 Interferência do óleo essencial e fitoconstituente sobre a cinética do crescimento micelial radial de *C. carrionii*

A interferência do óleo essencial de *C. nardus* e do citronelal sobre o crescimento micelial das cepas de *C. carrionii* (LM- 01 e URM- 5109) foi determinada através da medida diária do crescimento radial (em milímetros) do micélio em ágar Sabouraud dextrose.

O ensaio da cinética do crescimento micelial foi realizado utilizando a técnica de diluição em meio sólido e os resultados obtidos estão expressos nos gráficos 1, 2, 3 e 4, que mostram o crescimento micelial das duas cepas escolhidas, na presença da CIM, CIMX2 e CIMX4 do óleo essencial de *C. nardus*, do citronelal e do itraconazol em função dos dias de exposição (0, 2, 4, 6, 8, 10 e 12). O crescimento das cepas em ágar Sabouraud

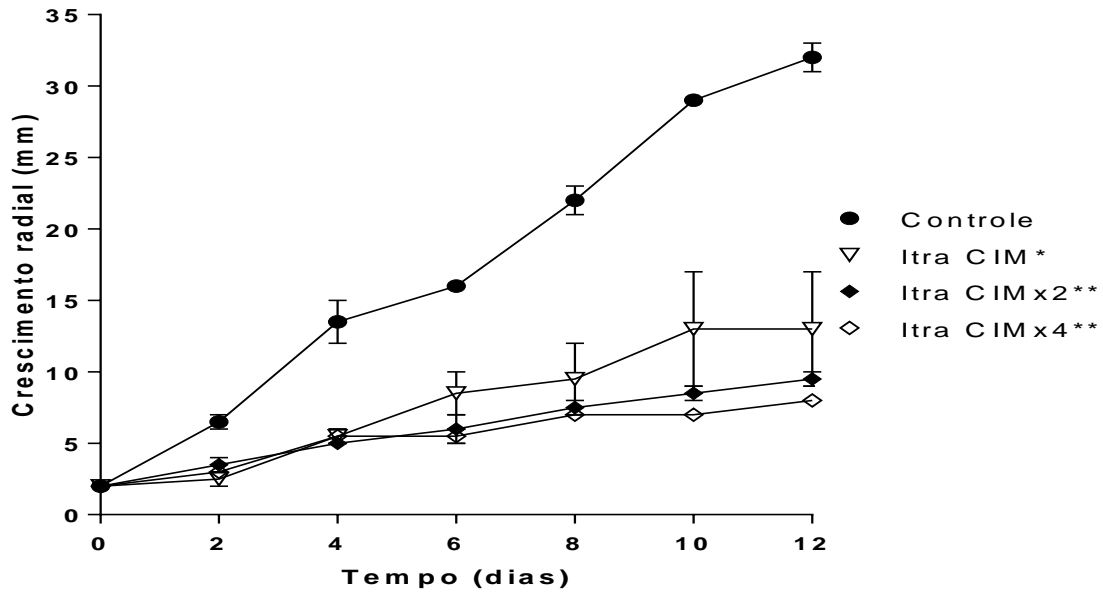
dextrose sem a presença de nenhum produto- teste foi utilizado como experimento controle.

Gráfico 1: Inibição do crescimento micelial radial da cepa LM- 01 pelo OE- CN e citronelal.



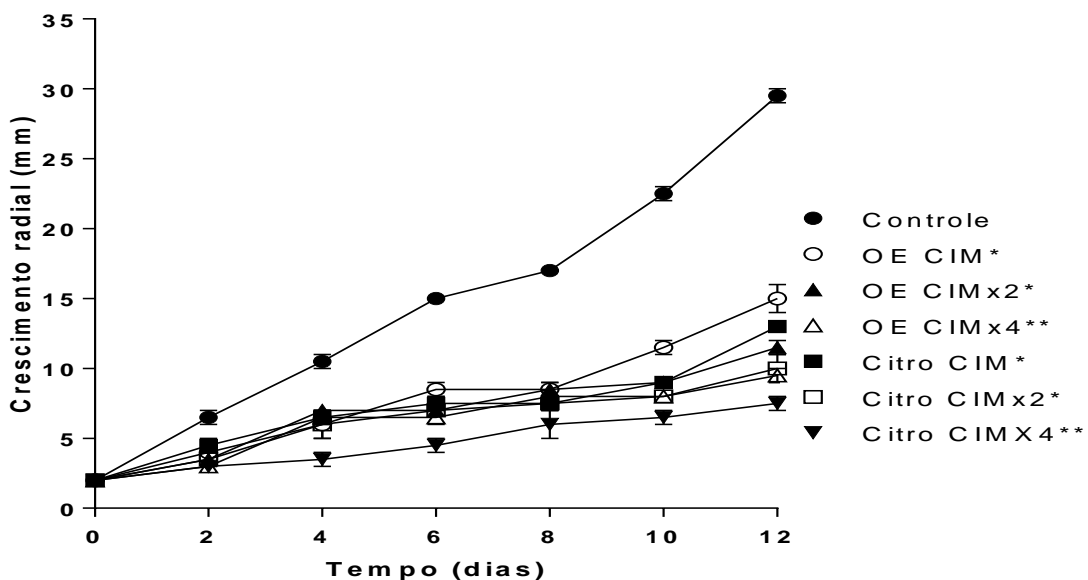
OE- CN/ LM- 01: CIM (64 $\mu\text{g}/\text{mL}$), CIMx2 (128 $\mu\text{g}/\text{mL}$), CIMx4 (256 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Citronelal/ LM- 01: CIM (32 $\mu\text{g}/\text{mL}$), CIM x2 (64 $\mu\text{g}/\text{mL}$), CIMx4 (128 $\mu\text{g}/\text{mL}$). * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0001$, quando comparados ao crescimento controle, em 12 dias de interação.

Gráfico 2: Inibição do crescimento micelial radial da cepa LM- 01 pelo itraconazol.



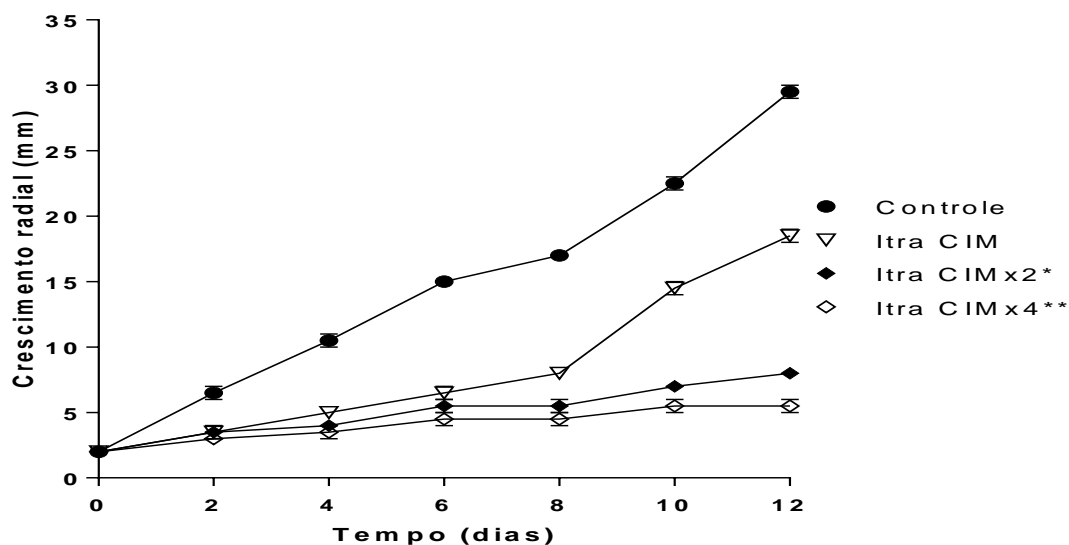
Itraconazol/LM- 01: CIM (32 $\mu\text{g}/\text{ml}$), CIM x2 (64 $\mu\text{g}/\text{ml}$), CIMx4 (128 $\mu\text{g}/\text{ml}$). * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0001$, quando comparados ao crescimento controle, em 12 dias de interação.

Gráfico 3: Inibição do crescimento micelial radial da cepa URM- 5109 pelo OE- CN e citronelal.



OE- CN/ URM- 5109: CIM (64 $\mu\text{g}/\text{ml}$), CIMx2 (128 $\mu\text{g}/\text{ml}$), CIMx4 (256 $\mu\text{g}/\text{ml}$). **Citronelal/ URM- 5109:** CIM (32 $\mu\text{g}/\text{ml}$), CIM x2 (64 $\mu\text{g}/\text{ml}$), CIMx4 (128 $\mu\text{g}/\text{ml}$). * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0001$, quando comparados ao crescimento controle, em 12 dias de interação.

Gráfico 4: Inibição do crescimento micelial radial da cepa LM- 01 pelo itraconazol



Itraconazol/ URM- 5109: CIM (32 $\mu\text{g/ mL}$), CIM x2 (64 $\mu\text{g/ mL}$), CIMx4 (128 $\mu\text{g/ mL}$). * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0001$, quando comparados ao crescimento controle, em 12 dias de interação.

Este estudo revelou um significativo efeito fungicida do óleo essencial de *C. nardus* e do citrônella, quando testados nas diferentes concentrações, sobre ambas as cepas de *C. carrionii*. De acordo com os gráficos 1 e 3, após os 12 dias do ensaio, foi observado uma significativa redução do crescimento micelial dos fungos, quando comparados ao grupo de crescimento controle (não tratado), sendo o perfil de inibição do crescimento semelhante para as duas cepas testadas.

O óleo essencial apresentou forte atividade inibitória com efeitos estatisticamente significantes quando comparados ao grupo controle, a partir da Concentração Inibitória Mínima (64 $\mu\text{g/ mL}$), para ambas as cepas. No experimento com a cepa LM- 01, essa inibição foi acentuada à medida que se aumentou a concentração do óleo, de modo que na CIMX4 (256 $\mu\text{g/ mL}$), houve inibição do crescimento micelial, com $p < 0,0001$. Para a cepa URM- 5109, ocorreu um resultado semelhante, com $p < 0,05$ para as concentrações CIM e CIMX2 e $p < 0,005$ para a concentração CIMX4.

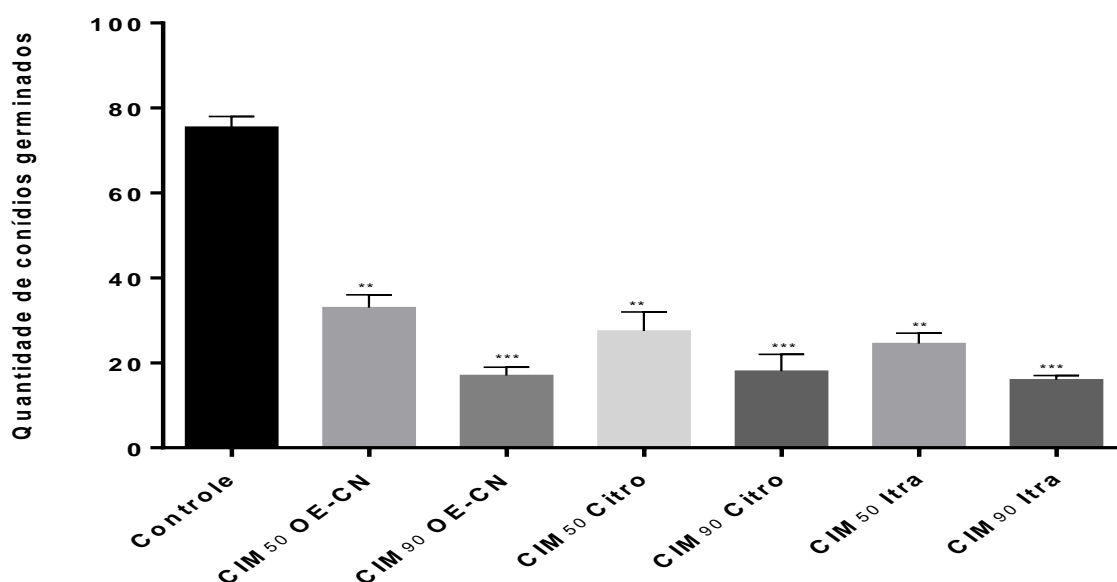
O antifúngico padrão utilizado (itraconazol), também inibiu de forma significativa o crescimento micelial de ambas as cepas (gráficos 2 e 4), com exceção da sua CIM sobre a cepa URM- 5109, onde não foi observada uma diferença estatisticamente significativa em relação ao crescimento controle. Mesmo apresentando baixos valores de CIM e CFM, não foi observado um efeito fungicida ($p < 0,0001$) do itraconazol, mesmo

quando utilizado na concentração CIMX4, sobre nenhuma das cepas. Isso pode ser explicado pelo fato de que os azóis, classe a que pertence o itraconazol, são drogas consideradas fungistáticas (SCHREIBER, 2007).

5.4 Interferência do óleo essencial e fitoconstituente sobre a germinação de conídios de *C. carrionii*

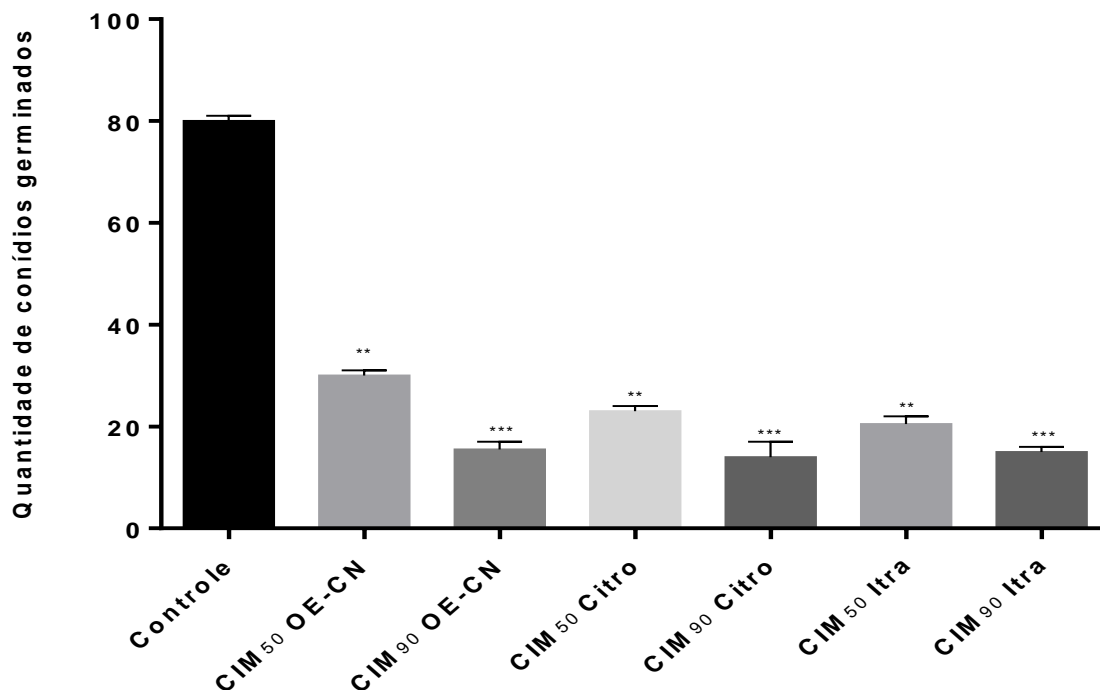
Os resultados da interferência do óleo essencial de *C. nardus*, citronelal e itraconazol sobre a germinação dos conídios de *C. carrionii* LM- 01 e URM- 5109 estão plotados nos gráficos 5 e 6, respectivamente. As concentrações utilizadas nesse experimento foram em termos de CIM₅₀ (CIM que promoveu a inibição do crescimento de 50% das cepas testadas) e CIM₉₀ (CIM que promoveu a inibição do crescimento de 90% das cepas testadas) para os três produtos em estudo. O grupo controle tivera o produto testado substituído por água destilada.

Gráfico 5: Inibição da germinação dos conídios da cepa LM- 01



LM- 01: CIM₅₀ OE- CN (64 µg/mL), CIM₉₀ OE- CN (128 µg/mL), CIM₅₀ Cítronelal (32 µg/mL), CIM₉₀ Cítronelal (512 µg/mL), CIM₅₀ Itraconazol (32 µg/mL), CIM₉₀ Itraconazol (256 µg/mL). * p< 0,05; ** p< 0,005, ***p<0,0001, quando comparados ao controle (Teste de Fisher).

Gráfico 6: Inibição da germinação dos conídios da cepa URM- 5109



URM- 5109: CIM₅₀ OE- CN (64µg/mL), CIM₉₀OE- CN (128 µg/mL), CIM₅₀ Citronelal (32 µg/mL), CIM₉₀ Citronelal (512 µg/mL), CIM₅₀ Itraconazol (32 µg/mL), CIM₉₀ Itraconazol (256 µg/mL). * p< 0,05; ** p< 0,005, ***p<0,0001, quando comparados ao controle (Teste de Fisher).

Como pode ser observado nos gráficos 5 e 6, o óleo essencial de *C. nardus*, o citronelal e o itraconazol apresentaram forte efeito inibitório sobre a germinação de conídios das cepas de *C. carrionii*, com inibições estatisticamente significantes ($p < 0,05$), quando comparados ao grupo controle. Esse efeito inibitório significativo foi evidenciado tanto para a CIM₅₀ quanto para a CIM₉₀ dos três produtos testados no experimento. A inibição tornou-se mais pronunciada, de maneira semelhante, para os três produtos testados, nos experimentos com as CIMs₉₀ ($p < 0,0001$), frente às duas cepas testadas.

Todos os fungos conhecidos, com poucas exceções, têm origem nos esporos (reprodução sexuada) ou conídios (reprodução assexuada), corpúsculos que podem ser comparados às sementes das plantas superiores, embora não sejam morfológicamente semelhantes a estas. Os esporos ou conídios, para germinarem, necessitam de calor e umidade e o resultado desta germinação é a formação de um ou mais filamentos finos, conhecidos como tubos germinativos, que se ramificam em todos os sentidos formando uma massa filamentosa, chamada micélio, que constitui o sistema vegetativo, responsável pelo desenvolvimento fúngico e pela absorção dos alimentos (MOLINARO, CAPUTO, AMENDOEIRA; 2009).

Com o objetivo de estudar a atividade antifúngica do óleo essencial de *M. officinalis* sobre *C. carrionii*, Menezes (2012) observou que já na CIM (256 µg/mL), esta inibição ocorreria na faixa de 90%, e na CIMX2 do óleo essencial, uma inibição de 100% da germinação dos conídios das cepas testadas fora observada, revelando um efeito inibitório dependente de concentração.

Pereira (2012) avaliou a capacidade de monoterpenos inibirem o percentual de conídios germinados de *T. rubrum*, e obteve como resultados que todos os produtos testados exerceram forte poder inibitório sobre a germinação de conídios, já a partir dos valores de CIMs; sendo essa inibição mais pronunciada à medida que as concentrações foram aumentadas para CIMX2.

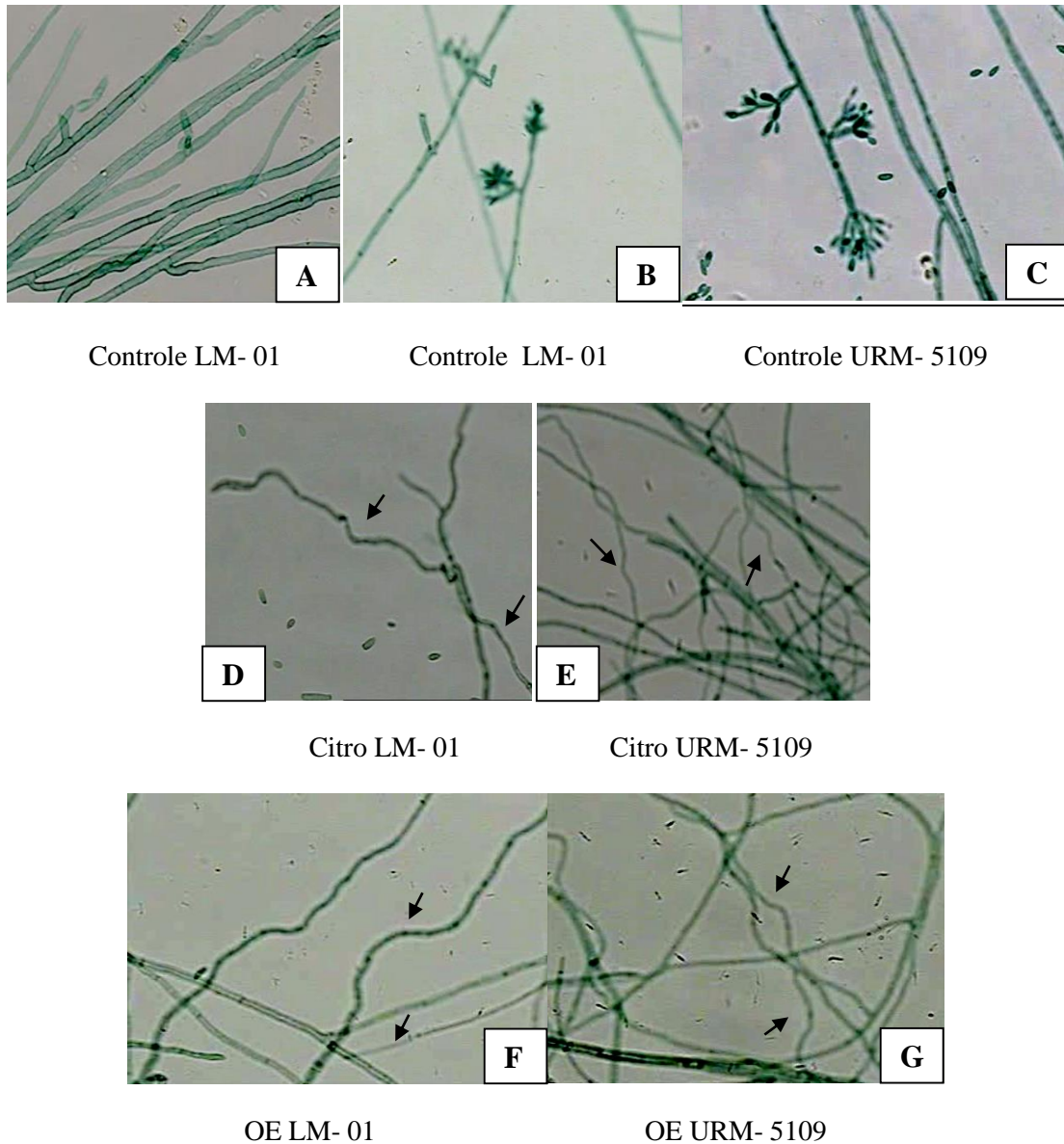
Em 2011, Oliveira determinou que o óleo essencial de *C. winterianus* tinha a capacidade de causar 100% de inibição da conidiação de cepas de *A. flavus* e *A. fumigatus*, quando testado nas concentrações CIMX2 e CIMX4. Pereira (2009) estudou a interferência do mesmo óleo essencial sobre dermatófitos do gênero *Trichophyton* (*T. rubrum* e *T. mentagrophytes*), observando que todas as concentrações testadas do óleo exerceram forte capacidade de diminuir a quantidade de conídios germinados.

Dessa forma, tendo em vista que quase todos os fungos têm origem a partir de esporos ou conídios, avaliar se um determinado produto tem ou não a capacidade de interferir sobre a germinação de conídios, constitui um bom parâmetro para determinar o sua eficácia como produto antifúngico.

5.5 Interferência do óleo essencial e fitoconstituente sobre a morfogênese fúngica de *C. carrionii*

Após exposição às concentrações (CIM, CIMx2 e CIMx4) do óleo essencial de *C. nardus*, do citronelal e do itraconazol, as cepas de *C. carrionii* LM- 01 e URM- 5109 apresentaram alterações morfológicas quando comparadas aos seus respectivos controles (figura 19 A, B, C, D, E, F e G).

Figura 19- Micromorfologia de *C. carrionii* na ausência (controle) e na presença do óleo essencial de *C. nardus*, do citronelal.



A análise microscópica dos controles demonstrou estrutura celular regular, com citoplasma homogêneo, longas cadeias de blastoconídios e intensa conidiação (Figura 19 A, B e C).

Porém, nos meios de cultura onde foram acrescentadas as substâncias- teste, as cepas de *C. carrionii* apresentaram diversas alterações morfológicas em sua estrutura micelial: diminuição da presença de conídios e pigmentação das hifas, desenvolvimento distorcido

das hifas, com presença de hifas tortuosas e finas, com alterações na parede celular (Figura 19 D, E, F e G). As alterações tornaram-se mais evidentes de acordo com o aumento da concentração do produto- teste (não demonstrado em figuras).

As alterações morfológicas observadas nas cepas expostas ao óleo essencial de *C. nardus* e ao citronelal foram semelhantes às alterações que se observaram com relação ao tratamento das cepas com o antifúngico padrão utilizado, o itraconazol.

Os resultados aqui encontrados foram semelhantes aos de Pinheiro (2012), que avaliou a interferência do óleo essencial de *M. officinalis* sobre a morfogênese de *C. carrionii* e aos de Viana (2013) que evidenciou as alterações morfológicas causadas pelo óleo essencial de *O. vulgare* sobre cepas de *Fusarium*.

Segundo Odds et al., 2003, macromoléculas cuja função esteja relacionada ao crescimento, sobrevivência, virulência ou morfogênese celular são apontadas como promissores alvos para novos agentes antifúngicos. Portanto, os resultados até aqui encontrados impulsionam a investigação dos possíveis alvos celulares do óleo essencial de *C. nardus* e seu fitoconstituente majoritário, o citronelal, bem como a busca dos possíveis mecanismos de toxicidade em modelos de estudos *in vivo*.

Considerações finais

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que:

- O óleo essencial de *C. nardus*, demonstrou alto poder de inibir o crescimento das cepas testadas na triagem microbiológica;
- As concentrações inibitórias mínimas demonstraram bons indicadores de atividade fungistática e fungicida para 100% das cepas submetidas tanto à ação do óleo essencial de *C. nardus* quanto do citronelal;
- O óleo essencial de *C. nardus* e o citronelal interferem de forma significativa na cinética de crescimento micelial radial das cepas fúngicas estudadas;
- O óleo essencial de *C. nardus* e o citronelal são capazes de inibir de forma significativa a germinação de conídios fúngicos;
- Tanto o óleo essencial de *C. nardus* quanto o citronelal são capazes de induzir alterações morfológicas sobre as cepas de *C. carrionii*;

Dessa forma, o óleo essencial de *Cymbopogon nardus* L. Rendle e o seu fitoconstituente majoritário, citronelal, apresentam-se como uma fonte promissora para o desenvolvimento de novos produtos com atividade antifúngica contra *C. carrionii*. O estudo aqui realizado encoraja a execução de investigações de atividade antifúngica *In vivo* dos produtos testados, na perspectiva de um melhor entendimento de seus mecanismos de ação, toxicidade e possível aplicabilidade na terapêutica.

REFERÊNCIAS

ABDALA et al. Prophylaxis of fungal infections in transplant patients. **Clinics**. 67(6): 681-684. 2012.

ABRANTES, M. R.; LIMA, E. O.; MEDEIROS, M. A. P.; MENEZES, C. P.; GUERRA, F. Q. S.; MILAN, E. P. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre leveduras *Candida* não-albicans. **Rev. Bras. Farm.** 94 (3): 227 – 233, 2013.

ADAM, K.; SIVROPOULOU, A.; KOKKINI, S.; LANARAS, T.; ARSENAKIS M. Antifungal activities of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula augustifolia* and *Salvia fruticosa* essential oils against human pathogenic fungi. **J. Ag. and Food Chem.**, v. 46, n. 5, p. 1739- 1745, 1998.

AGUIAR, R. W. S.; OOTANI, M. A.; FERREIRA, T. P. S.; ASCENCIO, S. D.; SANTOS, M. M.; SANTOS, G. R. Fumigant Antifungal Activity of *Corymbia citriodora* and *Cymbopogon nardus* Essential Oils and Citronellal against Three Fungal Species. **The Scien. World J.** Vol. 2014. 2014.

AHMAD, I.; BEG, A.Z. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants again multidrug resistant human pathogens. **J. Ethnopharm.**, v.74, p.113-23, 2001.

ALONSO, S. F. B. *Cladosporium*: género fúngico que deteriora soportes documentales y afecta a la salud del hombre. **Bol. del Arch. Nac.**, 18-19-20: 104-118; 2012.

ALVARÉZ- MONTIELL, I.; BONIFAZ, A. Cromoblastomicosis en placa superficial. Manifestación de una variante poco habitual. **Dermat. Rev Mex.** 58:529-533. 2014.

ALVES, A. J. **Atividade biológica de óleos essenciais e fitoconstituintes sobre espécies de *Mycobacterium***. 143 p. Tese (Doutorado). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa- PB, 2006.

ALVES, T. M. A.; SILVA, A. F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T. S. M.; SMÂNIA, E. F. A.; SMÂNIA JÚNIOR, A.; ZÁNI, C. L. Biological Screening of Brazilian Medicinal Plants. **Mem. Inst. Osw. Cruz**, v. 95, n. 3, p. 367- 373, 2000.

ANAISSE, E. H.; KANTARJIAN, H. R.; HOPFER, R. K.; ROLSTON, V.; FAINSTEIN, V.; BODEY, G. The emerging role of *Fusarium* infections in patients with cancer. **Medicine** 67:77–83. 1988

ANTONELLO, V. S.; APPEL DA SILVA, M. C.; CAMBRUZZI, E.; KLIEMANN, D. A. et al. Treatment of severe chromoblastomycosis with itraconazole and 5-flucytosine association. **Rev Inst Med Trop São Paulo.** 52:329-331. 2010.

AQUINO, P. L. P.; LIMA, E. O.; FARIAS, M. P.; FREIRE, K. R. L.; SOUZA, E. L.; CECHINEL FILHO, V.; CORRÊA, R.; ANDRICOPULO, A. Atividade antifúngica de maleimidias contra dermatófitos isolados de *Tinea capitis*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 35, n. 4, p. 191- 194, 2003.

ARESI, C. **Avaliação da potencial atividade antimicrobiana de produtos de origem natural: estudo bioguiado de *Dalbergia ecastaphyllum* L. Taub.** (Dissertação de Mestrado). 77 p. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis- SC, 2011.

AZEVEDO et al. Fungos dematiáceos: fungos negros que afetam animais, plantas e o homem. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**. Ano VIII, n. 34. 2005.

AZULAY, R. D.; AZULAY, D. R. **Dermatologia**. 2a ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 218p.1999.

BARBOSA- FILHO, J. M.; AGRA, M. F.; MEDEIROS, D. F.; XAVIER- FILHO, L. Triagem fitoquímica de plantas medicinais de Estado da Paraíba. **Boletim da Sociedade Broteriana**., v. 2, p. 1-9, 1984.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal: as bases da ação dos fármacos**.- 2. Ed.- Porto Alegre: Artmed. 2008

BERENGUER, J. J. L.; RODRIGUEZ- TUDELA, C.; RICHARD, M.; SANZ, M. A.; GUZTELURRUTIA, L. Deep infections caused by *Scedosporium prolificans*. A report on 16 cases in Spain and a review of the literature. **Medicine** 76:256–265. 1997.

BILLERBECK, V. G.; DE ROQUES, C. G.; BESSIERE, J- M.; FONVIEILLE, J-L.; DARGENT, R. Effect of *Cymbopogon nardus* (L) W. Watson essential oil on the growth and morphogenesis of *Aspergillus niger*. **Canadian Journal of Microbiology**., v. 47, n. 1, p. 9-17, 2001.

BRANCHINI, M. L. M. **Paciente em foco: Principais infecções fúngicas no paciente imunocomprometido** (Parte 1). São Paulo, PlanMark, 2002.

BROWN, K. B.; HYDE, K. D.; , GUEST, D. I. Preliminary studies on endophytic fungal communities of *Musa acuminata* species complex in Hong Kong and Australia. **Fungal Diversity**. pp. 27–511. 1998.

BRUNTON, L.; PARKER, K.; BLUMENTHAL, D.; BUXTON, I. **Manual de farmacologia e terapêutica**. Porto Alegre: Artmed. 2010.

BUTLER, M. S. Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials **Natural Product Reports**. v. 25. p. 475. 2008.

CARRIÓN, A. L. Chromoblastomycosis. **Annals of the New York Academy of Sciences**. 50:1255-1282, 1950.

CARMO, E. S.; BELÉM, L. F.; CATÃO, R. M. R.; LIMA, E. O.; , Irani Lopes da SILVEIRA, I. L.; SOARES, L. H. M. Microbiota fúngica presente em diversos setores de um hospital público em Campina Grande – PB. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, vol. 39(3): 213-216, 2007.

CASTRO, H. G. et al. Divergência genética entre acessos de mentrasto avaliada por características botânico-agronômicas, moleculares e fitoquímicas. **Revista Ceres**, v. 51, n. 294, p. 227-241, 2004c.

CASTRO, L. G.; PIMENTEL, E. R.; LACAZ, C. S. Treatment of chromomycosis by cryosurgery with liquid nitrogen: 15 years' experience. **International Journal of Dermatology**. V. 42, p.408- 412, 2003.

CASTRO, T. L.; COUTINHO, H. D. M.; GEDEON, C. C.; SANTOS, J. M.; SANTANA, W. J.; SOUZA, L. B. S. Mecanismos de resistência da *Candida* sp. a antifúngicos. **Revista Infarma**. v. 18, p. 30- 34, n°9/10, 2006.

CAVALCANTI, Y. W.; ALMEIDA, L. F. D.; PADILHA, W. W. N. Atividade Antifúngica de Três Óleos Essenciais Sobre Cepas de *Candida*. **Revista Odontológica do Brasil Central**. 20(52), 2011.

CHEN, B. Y.; CHAO, H. J.; WU, C.F.; KIM, H.; HONDA, Y.; GUO, Y. L. High ambiente *Cladosporium* spores were associated with reduced lung function in schoolchildren in a longitudinal study. **Science of the Total Environment**. 481. 370- 376. 2014.

CHEN, B. Y.; CHAO, H. J.; WU, C.F.; KIM, H.; HONDA, Y.; GUO, Y. L. Effect of citronella essential oil on the inhibition of post-harvest *Alternaria alternata* in cherry tomato. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 94:2441–2447. 2014.

CLEELAND, R.; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials *in vitro* and in experimental animal infections. In: LORRIAN, V. **Antibiotics in laboratory medicine**. 3 ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 739-788 p. 1991.

CORRÊA, B. Micotoxinas humanas e micetismos. In: ZAITZ, C.; CAMPBELL, I.; MARQUES, S. A.; RUIZ, L. R. B.; SOUZA, V. M., eds. **Compêndio de micologia médica**. Rio de Janeiro: Medsi. cap. 27, p.339-346. 1998.

CRAVEIRO, A. A.; FERNANDES, A. G.; ANDRADE, C. H. S.; MATOS, F. J. A.; ALENCAR, J. W.; MACHADO, M. I. L. **Óleos essenciais de plantas do Nordeste**. Fortaleza: UFC, 1981.

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

CUNHA- FILHO, R. R.; SCHWARTZ, J.; REHN, M.; VETTORATO, G. RESENDE, M. A. Feo-hifomicose causada por *Veronaea bothryosa*: relato de dois casos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. vol.80 no.1 Rio de Janeiro Jan./Feb. 2005

DAFERERA, D. J.; ZIOGAS, B. N.; POLISSOU, M. G. The effectiveness of plants essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. **Crop Protection**. v. 22, n. 1, p. 39- 44, 2003.

DE HOOG, G. S.; NISHIKAKU, A. S.; FERNANDEZ- ZEPPEFELDT, G.; PADÍND-GONZÁLEZ, C.; BURGER, E. BADALI, H.; RICHARD- YEGRES, N.; GERRITS VAN DEN ENDE, A. H. Molecular analysis and pathogenicity of the *Cladophialophora carrionii* complex, with the description of a novel species. **Study in Mycology**, v. 58, p. 219- 234, 2007.

DERESINSKI, S. C.; STEVENS, D. A. Caspofungin. **Clinical Infectious Diseases**., v. 36, n. 11, p. 1445- 1457, 2003.

DUPONT, B. Overview of the lipid formulations of amphotericin B. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. 49, 31–36. 2002.

EL- MORSY. Fungi isolated from the endorhizosphere of halophytic plants from the Red Sea Coast of Egypt. **Fungal Diversity**.. pp. 43–5. 2000.

ERNST, E. J., KLEPSE, M. E.; ERNST, M. E.; MESSER, S. A.; PFALLER, M. A. *In vitro* pharmacodynamic properties of MK- 0991 determined by time- kill methods. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v. 33, n. 2, p. 75- 80, 1999.

ESPINEL- INGROFF, A.; FOTHERGILL, A.; PETER, J.; RINALDI, M. G.; WALSH, T. Testing conditions for determination of minimum fungicidal concentrations of new and established antifungal agents for *Aspergillus* spp.: NCCLS collaborative study. **Journal of Clinical Microbiology**., v. 40, n. 9, p. 3204- 3208, 2002.

FISCHER, I. H.; KIMATI, H.; RESENDE, J. A. M. **Doenças do maracujazeiro** (*Passiflora* spp.). In: KIMATI, H. 2005.

FRANKEL, D. H.; RIPPON, J. W. *Hendersonula toruloidea* infection in man. **Mycopathologia**. 105: 175- 186, 1989.

FREIRE, M. M. **Composição e atividade antifúngica do óleo essencial de hortelã- pimenta** (*Mentha piperita* L.). Tese de Magister Science. Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. 2006.

FREY et al. Estudo sobre as características clínicas, epidemiológicas, histopatológicas e micológicas de pacientes com micoses profundas em um Serviço de Dermatologia de Porto Alegre, RS. **Revista da AMRIGS**, Porto Alegre, 55 (2): 123-129, abr.-jun. 2011.

GAYOSO, C. W.; LIMA, E. O.; OLIVEIRA, V. T.; PEREIRA, F. O.; SOUZA, E. L.; LIMA, I. O.; NAVARRO, D. F. Sensitivity of fungi isolated from onychomycosis to *Eugenia cariophyllata* essential oil and eugenol. **Fitoterapia**. v. 76, n. 2, p. 247- 249, 2005.

GIRMENIA, C. G.; LUZI, M. M.; MARTINO, P. Use of voriconazole in treatment of *Scedosporium apiospermum* infection: case report. **Journal of Clinical Microbiology**. 36:1436–1438. 1998.

GOSTINČAR, C.; GRUBE, M.; GUNDE-CIMERMAN, N. Evolution of fungal pathogens in domestic environments? **Fungal Biology**. UK, v.115, p.1008-1018, 2011.

GREENE, R. J.; HARRIS, N. D. **Patologia e terapêuticas para farmacêuticos: bases para a prática da farmácia clínica**. 3. ed. Porto Alegre. 968 p. Artmed, 2012.

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

HAFIDH, R. R. et al. Inhibition of growth of highly resistant bacterial and fungal pathogens by a natural product. **Current Opinion in Microbiology**. v. 5, p. 96- 106, 2011.

HAMADA, N.; ABE, N. Comparison of fungi in bathrooms and sinks. **Biocontrol Science**, Japan, v.15, p.51-56, 2010.

HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **Journal of Applied Microbiology**. 86: 985-990. 1999.

HARVEY, A. L. Natural Products in Drug Discovery. **Drug Discovery Today**. 13. 894. 2008.

HSIEH, P- C.; MAU, J- L.; HUANG, S- H. Antimicrobial effect of various combinatios of plant extracts. **Food Microbiology**. v. 18, n. 1, p. 35- 43, 2001.

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

KAUFFMAN, C. A.; CARVER, P. L. Update on echinocandin antifungals. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**., v. 29, n. 2, p. 211-219, 2008.

KIM, KEUK- JUN.; WOO, S. S.; SUH, B.K.; MOON, SEOK-KI.; CHOI, JONG- SOO.; KIM, J. G.; LEE, D. G. Antifungal activity and mode of action of silver nano- particles on *Candida albicans*. **BioMetals**, v. 22, p. 235- 242, 2009.

KLEPSEK, M. E.; ERNST, E. J.; ERNST, M. E.; MESSER, S. A.; PFALLER, M. A. Evaluation of endpoints for antifungal susceptibility determinations with LY303366. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**., v. 42, n. 6, p. 1387- 1391,1998.

KOEHN, F. E.; CARTER, G. T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nature Reviews**. V. 4. Mar. 2005.

LACAZ, C.L.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS- VACCARL, E. M.; MELO, N. T. **Tratado de Micologia Médica**. 9. Ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

LEE, A. **Reações adversas a medicamentos - 2ª Edição**. - Porto Alegre: Artmed, 2009.

LEVINSON, W. **Microbiologia médica e Imunologia**. 10. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

LIMA, I. O.; OLIVEIRA, R. A. G.; LIMA, E. O.; SOUZA, E. L.; FARIAS, N. P.; NAVARRO, D. F. Inhibitory effect of some phytochemicals in the growth of yeasts potentially causing opportunistic infections. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 2, 2005.

LOAYZA, I. et al. Essential oils of *Baccharis salicifolia*, *B. latifolia* and *B. dracunculifolia*. **Phytochemistry**, v. 38, n. 02, p. 381-389, 1995.

LOBO, P. L. D.; FONTELES, C. S. R.; CARVALHO, C. B. M.; NASCIMENTO, D. F.; FONSECA, S. G. C.; JAMACARU, F. V. F.; MORAES, M. E. A. Dose-response evaluation of a novel essential oil against Mutans streptococci in vivo. **Phytomedicine**, v. 18, n. 1, p. 551-556, 2011.

MARICHAL, P. et al. The action of itraconazole and ketoconazole on growth and sterol synthesis in *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus niger*. **Sabouraudia**. 22, 13-21. 1985.

MARTINS, J. E. C.; MELO, N. T.; HEINS- VACCARI, E. M. **Atlas de Micologia Médica**. –Barueri, SP: Manole, 2005.

MARTINS-DINIZ J.N., SILVA R.A., MIRANDA E.T., MENDESGIANNINI M.J. Monitoring of airborne fungus and yeast species in a hospital unit. **Revista de Saúde Pública**; 39:398-405. 2005.

MASSOUD- JUNIOR, H. R. **Análise morfológica *In vitro* da ação de antifúngicos em cepas de *Fonsecaea pedrosoi***. Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal do Pará, 2014.

MATOS, T.; de HOOG, G.S.; de BOER, A.G.; de CROM, I.; HAASE, G. High prevalence of the neurotrophe *Exophiala dermatitidis* and related oligotrophic black yeasts in sauna facilities. **Mycology**, Germany, v.45, p.373-377, 2002.

MELO, L.L.S.; LIMA, A.M.C.; DAMASCENO, C.A.; VIEIRA, A.L.P. Flora fúngica no ambiente da Unidade de Terapia Intensiva Pediátrica e Neonatal em hospital terciário. **Revista Paulista de Pediatria**. 2009;27(3):303-8.

MENEZES, C. P. **Atividade antifúngica in vitro do óleo essencial de *Melissa officinalis* L. (Erva- cidreira) sobre *Cladosporium carrionii***. 124 p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa- PB, 2012.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BRASIL). **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema único de Saúde- PNPIC**. PORTARIA Nº 971. 2006. Acesso em 22/01/2015.

MINOTTO, R.; BERNARDI, C. D.; MALLMAN, L. F.; EDELWEISS, M. I.; SCROFERNEKER, M. L. Chromoblastomycosis: a review of 100 cases in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **American Academy of Dermatology**. 44(4):585-92. 2001.

MISHRA, A. K.; MISHRA, A.; KEHRI, H. K.; SHARMA, B.; PANDEY, A. K. Inhibitory activity of Indian spice plant *Cinnamomum zeylanicum* extracts against *Alternaria solani* and *Curvularia lunata*, the pathogenic dematiaceous moulds. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**. 8:9, 2009.

MOBIN, M.; SALMITO, M. Microbiota fúngica dos condicionadores de ar nas unidades de terapia intensiva de Teresina, PI. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 2006;39:556-9.

MOHR, J.; JOHNSON, M.; COOPER, T.; LEWIS, J. S.; OSTROSKY- ZEICHNER, L. Current options in antifungal pharmacotherapy. **Pharmacotherapy**., v. 28, n. 5, p. 614- 645, 2008.

MOLINARO, E. M.; CAPUTO, L. F. G.; AMENDOEIRA, M. R. R. **Conceitos e Métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde**: volume 4 /400- 495. Rio de Janeiro, EPSJV,IOC, 496 p. 2009.

MOREIRA, A. C. P.; LIMA, E. O.; SOUZA, E. L.; VAND DINGENEN, M. A.; TRAJANO, V. N. Inhibitory effect of *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae) essential oil and beta-pinene on the growth of dematiaceous moulds. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 38, n. 1, p. 33-38, 2007.

MOREIRA, A. C. P.; LIMA, E. O.; WANDERLEY, P. A.; CARMA, E. S.; SOUZA, E. S. Chemical composition and antifungal activity of *Hyptis suaveolens* (L.) poit leaves essential oil against *Aspergillus* species. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 41, n. 1, p. 28- 33, 2010.

MOUCHALOUAT, M. J.; BADALI, H.; ILLNAIT- ZARAGOZI, M. T. *In vitro* activities of eight antifungal drugs against 55 clinical isolates of *Fonsecaea* spp. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. V. 54, p. 1636- 1638, 2011.

MUMCUOGLU, K. Y. et al. Repellency of citronella for head lice: double-blind randomized trial of efficacy and safety. **Israel Medical Association Journal**., v. 06, n. 12, p. 756-759, 2004.

MUÑOZ, P.; GUINEA, J.; ROJAS, L.; BOUZA, E. New antifungal agentes for the treatment of candidaemia. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 36, Suppl. 2, p. S63-S69, 2010.

NAKAHARA, N; ALZOREKY, N. S.; YOSHIHASHI, T.; HUONG, T. T. NGUYEN TRAKOONTIVAKORN, G. Chemical Composition and Antifungal Activity of Essential Oil from *Cymbopogon nardus* (Citronella Grass). **Japan International Research Center for Agricultural Science**. 37 (4) 2003.

NASCIMENTO, P. F. C.; NASCIMENTO, A. C.; RODRIGUES, C. S.; ANTONIOLLI, A. R.; SANTOS, P. O.; BARBOSA JÚNIOR, A. M. et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 3, p. 108-113, 2007.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as source of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**. vol. 70, p. 461-477, 2007.

NISBET, L. J.; MOORE, M. Will natural products remain an important source of drug research for the future? **Current Opinion in Biotechnology**., v. 8, n. 6, p. 708- 712. 1997.

ODDS, F. C.; BROWN, A. J. P.; GOW, N. A. R. Antifungal agents: mechanisms of action. **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 6, p. 272- 279, 2003.

OLIVEIRA, W. A. **Atividade do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor contra *Candida albicans*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus fumigatus***. 162 p. Tese (Doutorado). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa- PB, 2011.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana de determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**., v. 18, n. 2, p. 301- 307, 2008.

PALMEIRA, J. D.; FERREIRA, S. B.; DE SOUZA, J. H.; DE ALMEIDA, J. M.; FIGUEIREDO, M. C.; PEQUENO, A. S.; ARRUDA, T. A.; ANTUNES, R. M. P.; CATÃO, R. M. R. Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extratos hidroalcoólicos de *Angico* sobre cepas de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**. v. 42, n. 1, p. 33-37, 2010.

PEREIRA et al. Análise de fungos anemófilos em hospital da cidade de Ariquemes, Rondônia, Amazônia Ocidental, Brasil. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**. 4(1):18-22. 2014.

PEREIRA, F. O. **Investigação do mecanismo da atividade antifúngica de monoterpenos frente a cepas de *Trichophyton rubrum***. Tese (Doutorado). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa- PB, 2012.

PEREIRA, F. O.; WANDERLEY, P. A.; VIANA, F. A. C; LIMA, R. B.; SOUSA, F. B.; LIMA, E. O. Growth inhibition and morphological alterations of *Trichophyton rubrum* induced by essential oil from *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex bor. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 42, n. 1, p. 233- 242, 2011.

PEREIRA, M. C. ; VILELA, G. R. ; COSTA, L. M. A. S. ; SILVA, R. F. ; FERNANDES, A. F. ; FONSECA, E. V. N.; PICCOLI, R.H. . Inibição do desenvolvimento fúngico através da utilização de óleos essenciais de condimentos. **Ciencia e Agrotecnologia**. v. 30, p. 731-738, 2006.

QUEIROZ- TELLES, F.; ESTERRE, P.; PEREZ- BLANCO, M. Chromoblastomycosis: na overview of clinical manifestations, diagnosis and treatment. **Medical Mycology**. V. 47, p. 3- 15, 2009.

QUEIROZ- TELLES, F. NUCCI, M.; COLOMBO, A. L. Mycoses of implantation in Latin America: na overview of epidemiology, clinical manifestations, diagnosis and treatment. **Medical Mycology**. V. 49, p. 225- 236, 2011.

QUEIROZ- TELLES, F. NUCCI, M.; COLOMBO, A. L. Cromoblastomicose. **Sociedade Brasileira de Infectologia**. Janssen-Cilag: 1-11, 1980.

RANA, B. K.; SINGH, U. P.; TANEJA, V. Antifungal activity and kinetics of inhibition by essential oil isolated from leaves of *Aegles marmelos*. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 57, n. 1, p. 29-34, 1997.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; HENDERSON, G. **Farmacologia**. 7. Ed. Rio de Janeiro: Editora Elsevier. Cap. 52. 649- 654. 2012.

REIS, G. G. et al. Estudo do efeito da secagem em convecção natural e forçada na composição do óleo essencial da citronela (*Cymbopogon nardus*). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**., v. 08, n. 04, p. 47-55, 2006

REPONEN, T.; WILLEKE, K.; ULEVICIUS, V.; REPONEN, A. GRINSHPUN, S. A. Effect of relative humidity on the aerodynamic diameter and respiratory deposition of fungal spores. **Atmospheric Environment**. 30:3967. 1996.

REVANKAR, S. G. Dematiaceous fungi. **Mycoses**. 50, 91–101. 2007.

RIBEIRO, E.L.; SOARES, A. J.; FERREIRA, W. M.; CARDOSO, C. G.; FALEIRO, P. L.; DIAS, S. M. S. Cromoblastomicose: Doença presente na realidade populacional brasileira. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, vol. 38(3): 189-192, 2006.

RICHTER, S. M. G.; CORMICAN, M. A.; LEE, C. K.; PFALLER, C. K.; LEE, R.; GINGRICH, M. G.; RINALDI, D. A.; SUTTON, D. A. Fatal disseminated *Trichoderma longibrachiatum* infection in an adult bone marrow transplant patient: species identification and review of the literature. **Journal of Clinical Microbiology**. 37:1154–1160. 1999.

RIESEN, T.; SIEBER, T. Endophytic fungi in winter wheat (*Triticum aestivum* L.). **Swiss Federal Institute of Technology**.. Zürich. 1985.

ROCHA, L. O.; SOARES, M. M. S. R.; CORRÊA, C. L. Análise da contaminação fúngica em amostras de *Cassia acutifolia* Delile (sene) e *Peumus boldus* (Molina) Lyons (boldo-do-Chile) comercializadas na cidade de Campinas, Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. vol. 40, n. 4, out./dez., 2004.

SAHIN, F.; GULLUCE, M.; DAFERERA, D.; SKMEN, A.; POLISSOU, M.; SOKMEN, M.; AGAR, G.; OZER, H. 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.

SAMPAIO, S. A. P.; RIVITTI, E. A. **Dermatologia**. 1ª ed. São Paulo: Artes Médicas; São Paulo. 545p. 1998.

SANTANA, R. O. **Utilização de extratos vegetais e óleos essenciais na produção avícola.** Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, 2011.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A. L. M.; DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, M. C. T.; REHDER, V. L. G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plantes used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 275- 280, 2004.

SCHREIBER, A. Z. **Antifungigrama: Quando solicitar e como interpretar.** Prática Hospitalar. Ano IX, n. 49, p. 87- 91, 2007.

SCORZONI, L.; BENADUCCI, T.; ALMEIDA, A. M. F.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; GIANINNI, M. J. S. M. The use os Standard Methodology for Determination of Antifungal activity of natural products against medical yeasts *Candida* sp. and *Cryptococcus* sp. **Brazilian Journal of Microbiology.**, v. 38, p. 391- 397, 2007.

SEIXAS, P. T .L.; CASTRO, H.C.; SANTOS, G .R.; CARDOSO, D.P. Controle fitopatológico do *Fusarium subglutinans* pelo óleo essencial do capim- citronela (*Cymbopogon nardus* L.) e do composto citronelal. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai.**, Botucatu, v.13, especial, p.523-526, 2011.

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

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos-** [Reimpressão]- Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

SILVA, A. C. C. M.; NETO, A. S.; GALVÃO, C. E. S.; MARQUES, S. G.; SALDANHA, A. C. R. S.; SILVA, C. M. P.; FISCHMAN, O, SILVA, R. R. COSTA, M. R. S. R.; COSTA, J. M. L. Cromoblastomicose produzida por *Fonsecaea pedrosoi* no estado do Maranhão. I- aspectos clínicos, epidemiológicos e evolutivos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.**25(1):3 7-44, jan-mar, 2002.

SILVA, J. P.; DE SOUZA, W.; ROZENTAL, S. Chromoblastomycosis: a retrospective study of 325 cases on Amazonic Region (Brazil). **Mycopathology.** 143 (3):171-5. 1998.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 5 ed. Santa Catarina: UFSC e UFRGS, 2004.

SINGH, N. F. Y.; CHANG, T.; GAYOWSKY, I. R.; MARINO, I. R. Infections due to dematiaceous fungi in organ transplant recipients: case report and review. **Clinical Infectious Diseases.** 24:369–374. 1996.

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

SUDHADHAM, M.; GERRITS VAN DEN ENDE, A.H.G.; SIHANONTH, P.; SIVICHAI, S.; CHAIYARAT, R.; MENKEN, S.B.J.; VAN BELKUM, A.; DE HOOG, G.S. Elucidation of distribution patterns and possible infection routes of the neurotropic black yeast *Exophiala dermatitidis* using AFLP. **Fungal Biology**, UK, v.115, p.1051-1065, 2008 .

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

TASIC, S.; TASIC, N. M. Cladosporium spp.- Cause of Opportunistic Mycoses. **ACTA FACULTATIS MEDICAE NAISSENSIS.**, v. 24, n. 1, p.15- 19. 2007.

THYAGARAJA, N.; HOSONO, A. Effect of spice extract on fungal inhibition. **Food, Science and Technology.**, v. 29, n. 3, p. 286- 288, 1996.

TORRES, E.; BERISTAIN, J. G.; LIEVANOS, Z.; ARENAS,R. Carcinoma epidermóide como complicação letal de lesões crônicas de cromoblastomicose. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. 85(2):267-70. 2010.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B, R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

TRONGTOKIT, Y. et al. Comparative repellency of 38 essential oils against mosquito bites. **Phytotherapy Research.**, v. 19, n. 04, p. 303-309, 2005.

VANDEN, B. H. et al. P450 inhibitors of use in medical treatment: focus on mechanisms of action. **Pharmacological Therapy**. 67, 79–100. 1995.

VERWEIJ, P. E.; VAN DEN BERGH, M. F. Q.; RATH, B. E.; VOSS, A.; MEIS, J. F. G. M. Invasive aspergillosis caused by *Aspergillus ustus*: case report and review. **Journal of Clinical Microbiology**. 37:1606–1609. 1999.

VIANA, W. P. **Atividade antifúngica do óleo essencial de *Origanum vulgare* (Orégano) sobre fungos oportunistas do gênero *Fusarium***. 102 p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa- PB, 2013.

WEI, L. S.; WEE, W. Chemical composition and antimicrobial activity of *Cymbopogon nardus* citronella essential oil against systemic bacteria of aquatic animals. **Iran. J. Microbiol**. V. 5 N. 2. 147-15. 2013.

WEISS, L. M.; THIEMKE, W. A. Disseminated *Aspergillus ustus* infection following cardiac surgery. **Am. J. Clin. Pathol**. 80:408–411. 1983.

WONG- BERINGER, A.; JACOBS, R. A.; GUGLIELMO, B. J. Lipid formulations of amphotericin B: clinical efficacies and toxicities. **Clin. Infect. Dis**. 27:603–618. 1998.

WONG- LEUNG, Y. L. Antibacterial activities of some Hong Kong plants used in Chinese medicine. **Fitoterapia**, v. 69, n. 1, p. 11-16, 1988.

WONG, K. K. Y. et al. Citronella as an insect repellent in food packaging. **J. .Agricult. Food Chem.** v. 53, n. 11, p. 4633-4636, 2005.

YEH, H. C.; CUDDIHY, R. G.; PHALEN, R. F.; CHANG, I. Y. Comparisons of calculated respiratory tract deposition of particles based on the proposed NCRP model and the new ICRP66 model. **Aerosol. Sci. Tech.** 25:134. 1996.

ZAITZ, C.; CAMPBELL, I.; MARQUES, S. A.; RUIZ, L. R.B.; FRAMIL, V.M.S. **Compêndio de micologia médica**. – 2ª Edição- Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

ZALAR, P.; NOVAK, M.; de HOOG, G.S.; GUNDE-CIMERMAN, N. Dishwashers - a manmade ecological niche accommodating human opportunistic fungal pathogens. **Fungal Biol**, UK, v.115, n.10, p.997-1007, 2011.

ZANANDREA, I.; JULIANO, D. S.; ANDRÉA, B. M.; JULIANE, L.; VERIDIANA, K. B. Atividade do óleo essencial de orégano contra fungos patogênicos do arroz: crescimentos micelial em placas. **Rev. Bras. Farmacog.**, 14 (Supl.), 14-16. 2004.

ZANINI, M. Tratamento de cromomicose com criocirurgia e itraconazol sistêmico. **Med. Cutan. Iber. Lat. Am.** 40(5):168-170. 2012.

ZHAO, J.; ZENG, J.; de HOOG, G.S.; ATTILI-ANGELIS, D.; PRENAFETA-BOLDÚ, F.X. Isolation and identification of black yeasts by enrichment on atmospheres of monoaromatic hydrocarbons. **Microbiol. Ecol**, New York, v.60, p.149-156, 2010.

ZOPPAS, B. C. A et al. Distribuição de esporos de *Cladosporium* spp no ar atmosférico - **Rev. bras. alerg. imunopatol.** – Vol. 34. N° 2, 2011.

Anexos



4º Simpósio Internacional de Microbiologia Clínica - SIMC

De 22 a 24 de outubro de 2014

Hotel Tambaú - João Pessoa - Paraíba - Brasil

Certificado

Certificamos que o trabalho intitulado SCREENING OF ANTIFUNGAL ACTIVITY OF ESSENTIAL OILS AGAINST DEMATIACEOUS MOULDS com a autoria de: PAULA, C.G.D, SANTOS, J.M.C.G, LIMA, E.O foi apresentado na forma de pôster durante o 4º Simpósio Internacional de Microbiologia Clínica - SIMC realizado no Centro de Convenções do Hotel Tambaú, na cidade de João Pessoa, PB, no período de 22 a 24 de outubro de 2014.

De 22 a 24 de outubro de 2014 - Hotel Tambaú - João Pessoa - Paraíba - Brasil

Prof.ª. Dra. Marina Baquerizo Martinez
Presidente da SBM

Prof. Dr. Gustavo Goldmann
1º Secretário da SBM



7th Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry

BrazMedChem2014

Facing the turning point in medicinal chemistry

November, 9-12, 2014

Campos do Jordão – SP, Brazil

We hereby certify that

Camila Gurgel Dantas de Paula


presented the poster entitled

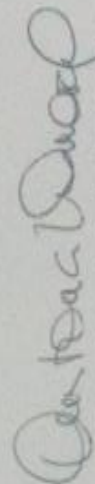
“Antifungal activity of essential oils against dematiaceous moulds”

From the authors:

Paula, C.G.D.; Santos, J.M.C.G.; Lima, E.O.
Federal University of Paraíba

during the Drug Discovery and Development session.


Prof. Andrei Leitão
Chair of BrazMedChem2014


Prof. Antonia T. do Amaral
Chair of the Scientific Committee