

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE EDUCAÇÃO E SAÚDE
UNIDADE ACADÊMICA DE SAÚDE
CURSO DE BACHARELADO EM FARMÁCIA**

RAFAELA DE OLIVEIRA NÓBREGA

**INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E O MODO DE
AÇÃO DE CARVACROL CONTRA CEPAS DE *Cryptococcus neoformans***

CUITÉ-PB

2015

RAFAELA DE OLIVEIRA NÓBREGA

**INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E O MODO
DE AÇÃO DE CARVACROL CONTRA CEPAS DE *Cryptococcus
neoformans***

Trabalho de conclusão de curso apresentado à coordenação de Farmácia da Universidade Federal de Campina Grande – UFCG/CES como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientador (a): Prof.^a Dr.^a Igara Oliveira Lima

CUITÉ-PB
2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA NA FONTE
Responsabilidade Msc. Jesiel Ferreira Gomes – CRB 15 – 256

N754i Nóbrega, Rafaela de Oliveira.

Investigação da atividade antifúngica e o modo de ação de carvacrol contra cepas de *Cryptococcus neoformans*. / Rafaela de Oliveira Nóbrega. – Cuité: CES, 2015.

50 fl.

Monografia (Curso de Graduação em Farmácia) – Centro de Educação e Saúde / UFCG, 2015.

Orientadora: Dr^a. Igara Oliveira Lima.

1. *Cryptococcus neoformans*. 2. Carvacrol. 3.
Atividade antifúngica. I. Título.

Biblioteca do CES - UFCG

CDU 615

RAFAELA DE OLIVEIRA LIMA

**INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E O MODO
DE AÇÃO DE CARVACROL CONTRA CEPAS DE *Cryptococcus
neoformans***

Aprovado em ____ de ____ de ____.

Banca examinadora

Prof.^a Dr.^a Igara Oliveira Lima (Orientadora) – UFCG/CES

Prof. Dr. José Alixandre de Sousa Luis – UFCG/CES

Prof. Dr. Fillipe de Oliveira Pereira – UFCG/CES

AGRADECIMENTOS

À Prof.^a Dr.^a Igara de Oliveira Lima, pela orientação, sabedoria, confiança e amizade. Obrigada pelo profissionalismo e pela forma humana que conduziu minha orientação;

À Prof.^a Dr.^a Edeltrudes de Oliveira Lima por ter cedido às cepas de *Cryptococcus neoformans*;

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia (J11) – UFCG/CES, em especial a Anna Paula de Castro Teixeira, pela ajuda com o experimento;

A Deus, por me proteger e fortalecer diante dos obstáculos e todas as bênçãos derramadas sobre mim;

À minha mãe, Joana Darc, por toda dedicação, apoio e amor. O seu amor, muitas vezes, me deu força para seguir. Obrigada por sempre estar presente em nossas vidas. À minha admiração pela senhora é imensurável;

À minha irmã, Rossana, pelo companheirismo, amor e irmandade. Obrigada por ter me apoiado em todos os momentos;

Ao meu pai (*in memoriam*), sei que você compartilha dessa realização;

Ao meu noivo, Kássio, pela motivação constante e companheirismo durante toda a minha jornada. Obrigada pelo amor, paciência e por sua capacidade de me trazer paz na correria de cada semestre;

À minha família, que se fez presente e contribuiu para essa conquista;

Aos amigos que a Universidade me deu (Rafaela Duarte, Michel Perone e Nathália Raíssa), por todos os momentos (tristes e alegres) compartilhados e ensinamentos. Vocês tornaram o caminho mais leve;

Aos velhos amigos que compreenderam meus dias de ausência e que sempre torceram por mim.

*“Vou persistir, continuar a esperar e crer.
E mesmo quando a visão se turva e o
coração só chora, mas na alma, há certeza
da vitória”.*

(Padre Fábio de Melo)

RESUMO

A levedura *Cryptococcus neoformans* é agente etiológico da criptococose, uma infecção fúngica que acomete principalmente seres humanos imunocomprometidos, como soropositivos para HIV. O tratamento da criptococose é realizado através do uso da anfotericina B, um fármaco com elevada toxicidade. Desse modo, a pesquisa com produtos naturais tem sido relevante, pois possibilita o estudo de novas substâncias com ação antifúngica e que sejam menos tóxicas. O fitoconstituente carvacrol é encontrado em diversos óleos essenciais de plantas, além de possuir ampla ação biológica, incluindo a atividade antifúngica e antibacteriana. O objetivo deste trabalho foi investigar a ação antifúngica e o modo de ação do carvacrol contra cepas de *C. neoformans*. A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada pelo método de microdiluição; para investigar a Concentração Fungicida Mínima (CFM) foi realizada a técnica de semeadura em meio sólido e para o estudo do modo de ação, foi utilizada a microdiluição e de acordo com Escalante et al (2008). A CIM variou de 25µg/mL a 81 µg/mL e a CFM variou de 25µg/mL a 102µg/mL. O carvacrol interagiu com o ergosterol e com o colesterol exógeno, este último, presentes nas células de mamíferos.

Palavras-chaves: *Cryptococcus neoformans*; carvacrol; atividade antifúngica.

ABSTRACT

Cryptococcus neoformans yeast is the etiological agent of cryptococcosis, a fungal infection that mainly affects immunocompromised humans, as seropositive patients. The treatment of cryptococcosis is accomplished through the use of amphotericin B, a toxic drug for humans. Thus, research on natural products has been important because it enables the study of new substances with antifungal activity and are less toxic. The carvacrol fitoconstituente is found in several essential oils of plants, as well as having broad biological action, including antifungal and antibacterial activity. The objective of this study was to investigate the antifungal action and carvacrol action mode against strains of *C. neoformans*. The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by the microdilution method; to investigate the Minimum Fungicidal Concentration (MFC) was determined by seeding technique on solid media and for studying the mode of action, was used and microdilution according Escalante et al (2008). The MIC ranged from 25 µg/mL to 81 µg/mL and ranged from CFM 25 µg/mL to 102 µg/mL. The carvacrol interacted with the exogenous ergosterol and cholesterol, the latter present in mammalian cells.

Key-Words: *Cryptococcus neoformans*; carvacrol; antifungal activity.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Classes de medicamentos antifúngicos utilizadas no tratamento da criptococose e de algumas espécies fúngicas.

20

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Resultado da CIM da anfotericina B e carvacrol contra cepas de <i>C. neoformans</i> . | 28 |
| Tabela 2. Resultado da CFM do carvacrol frente às cepas de <i>C. neoformans</i> . | 30 |
| Tabela 3. Estudo do efeito do ergosterol na CIM do carvacrol frente <i>C. neoformans</i> LM-22 e <i>C. neoformans</i> FCF-102. | 32 |
| Tabela 4. Estudo do efeito do colesterol na CIM do carvacrol frente <i>C. neoformans</i> LM-22 e <i>C. neoformans</i> FCF-102. | 33 |
| Tabela 5. Estudo do efeito do ergosterol na CIM da anfotericina B frente <i>C. neoformans</i> LM-22 e <i>C. neoformans</i> FCF-102. | 36 |
| Tabela 6. Estudo do efeito do colesterol na CIM da anfotericina B frente <i>C. neoformans</i> LM-22 e <i>C. neoformans</i> FCF-102. | 36 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Células de levedura de <i>C. neoformans</i> com visualização da cápsula. | 17 |
| Figura 2. Ilustração dos mecanismos de ação dos antifúngicos. | 22 |
| Figura 3. Mecanismo de ação proposto para o carvacrol. | 23 |
| Figura 4. Ilustração da membrana celular fúngica do <i>Cryptococcus</i> ssp. | 31 |
| Figura 5. Ação do Carvacrol na membrana fúngica do <i>C. neoformans</i> . | 34 |

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AB - Anfotericina B

CIM - Concentração Inibitória Mínima

CFM - Concentração Fungicida Mínima

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute

HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana

LCR - Líquido Cefalorraquidiano

μL - Microlitros

μg - Microgramas

Kg - Quilogramas

UFC - Unidade formadora de colônia

ATP - Trifosfato de Adenosina

ASD – Ágar Sabouroud Dextrose

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 13 |
| 2. OBJETIVOS..... | 15 |
| 2.1 Objetivo Geral..... | 15 |
| 2.2 Objetivos Específicos..... | 15 |
| 3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA..... | 16 |
| 3.1 <i>Cryptococcus Neoformans</i> | 16 |
| 3.2 Epidemiologia da Criptococose..... | 18 |
| 3.3 Tratamento Farmacológico..... | 19 |
| 3.3 Fitoconstituente Carvacrol..... | 22 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS..... | 25 |
| 4.1. Reagentes..... | 25 |
| 4.2 Cepas Fúngicas..... | 25 |
| 4.3 Local de Trabalho..... | 25 |
| 4.4 Preparo do Fitoconstituínte..... | 25 |
| 4.5 Antifúngico Padrão..... | 25 |
| 4.6 Inóculo..... | 26 |
| 4.7 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Fungicida Mínima (CFM)..... | 26 |
| 4.8 Ensaio com Ergosterol e Colesterol..... | 27 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 28 |
| 6. CONCLUSÃO..... | 39 |
| REFERÊNCIAS..... | 40 |

1 INTRODUÇÃO

Os fungos, extensamente dispersos no meio ambiente, são cada vez mais reconhecidos como importantes patógenos pela frequência de doenças fúngicas sistêmicas graves, que têm aumentado nas últimas décadas. A maior ocorrência de infecções fúngicas em humanos tem despertado o interesse no estudo de algumas enfermidades fúngicas, como criptococose que se tornou comum em todo o mundo (PIERCE, et al., 2008).

A criptococose é uma doença infecciosa fúngica que acomete mais comumente pessoas com o sistema imunológico comprometido. O agente etiológico é *Cryptococcus neoformans*. Esse fungo se apresenta como uma levedura envolta por uma cápsula (QUEIROZ et al., 2008), um dos principais fatores de sua virulência (COSTA, 2011). O *Cryptococcus neoformans* variedade *neoformans* possui distribuição universal, apresentando um predomínio nas regiões de clima temperado e frio, em áreas urbanas. Estudos apontam que os pombos não apresentam manifestações clínicas, esse fato provavelmente possa estar relacionado à alta temperatura corporal (entre 40 e 42° C), mas são considerados propagadores da doença (GAZZONI, 2007). A infecção se dá pela inalação de partículas infecciosas e pode atingir várias partes do corpo, como pulmão e ainda apresenta tropismo pelo sistema nervoso central, causando meningite (CONTIN et al., 2011).

A criptococose é tratada com fármacos fungistáticos e/ou fungicidas (NOBRE et al., 2002) e que podem ser utilizados em associação como, Anfotericina B com 5- flucitosina e o fluconazol para manutenção do tratamento (FAVALESSA et al., 2009; SAAG et al., 2000). Porém, o surgimento das cepas resistentes e a reincidência das infecções fúngicas tem sido uma das causas na falha da terapêutica clássica (FAVALESSA et al., 2009). Como por exemplo, a resistência ao fluconazol é possível principalmente durante tratamentos supressivos prolongados como nos casos de meningite por *C. neoformans*, há relatos da não melhora clínica e micológica de um paciente soropositivo apresentando meningite por *Cryptococcus neoformans* após tratamento de manutenção com Fluconazol (BIVANCO et al., 2006). As limitações do uso de antifúngicos fizeram com que buscasse alternativas para o tratamento e os fitoconstituintes isolados dos óleos essenciais, são alternativas eficazes (BAKKALI et al., 2008).

Para este fim, novos compostos podem ser testados como o carvacrol, um fitoconstituente com propriedade biológica presente nos óleos essenciais, por exemplo, orégano (*Origanum vulgare*), tomilho (*Tymus vulgaris*), lípia (*Lippia graveolens*) e alecrim-

pimenta (*Lipia sidoides*) (POZZATTI et al., 2006; FREISTAS et al., 2013). Os estudos estão cada vez mais concentrado nessa área no intuito de elucidar o mecanismo, a toxicidade e as atividades desse monoterpeno. Atividades antimicrobiana, antiparasitária, inseticida, antiprotozoários e antioxidante já foram observados em muitos das substâncias químicas de origem natural (COWAN, 1999; BURT, 2004).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade antifúngica de monoterpeneo carvacrol contra cepas de *Cryptococcus neoformans*.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Fungicida Mínima (CFM) do fitoconstituente carvacrol frente às cepas de *Cryptococcus neoformans* ;
- Avaliar da interferência do ergosterol e colesterol frente à CIM no intuito de nortear o possível mecanismo de atividade do carvacrol.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 *Cryptococcus neoformans*

C. neoformans é um fungo que se apresenta como uma levedura encapsulada, encontrado no ambiente, como solo contaminado e nas fezes de aves, como por exemplo, o pombo. A referida espécie é o agente etiológico da criptococose, uma micose sistêmica oportunista (DINIZ et al., 2005), que acomete pacientes com o sistema imunológico comprometido, como os soropositivos para HIV (QUEIROZ et al., 2008).

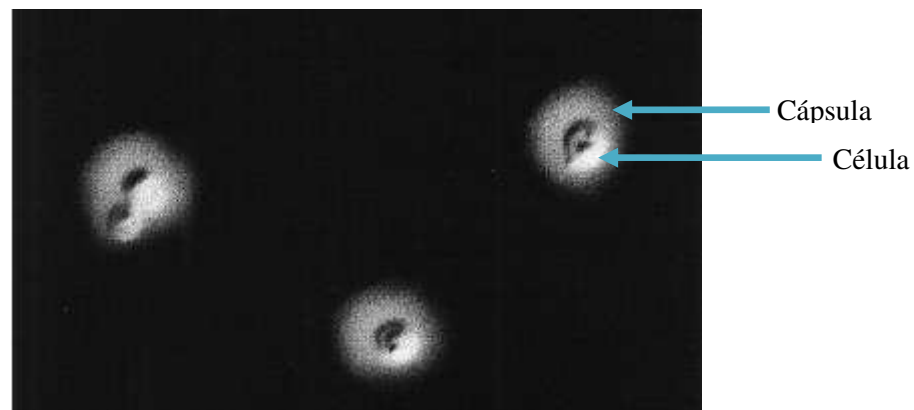
Por estar presente no ambiente, a sua transmissão ocorre pela inalação de partículas infecciosas de *C. neoformans* carregadas pelo ar ou proveniente de basidiósporos. Essas partículas, uma vez inaladas, se alojam no trato respiratório superior ou se depositam nos alvéolos pulmonares, podendo acarretar pneumonia fúngica (SILVA; GAGLIANI, 2014) e se a imunidade do hospedeiro estiver comprometida, a infecção pode disseminar-se sistematicamente (LIN; HEITMAN, 2006) podendo acometer outros órgãos, principalmente o sistema nervoso central causando a meningoencefalite, a mesma torna-se fatal quando não tratado com fármacos antifúngicos ou quando se encontrar imunocomprometido (MITCHELL; PERFECT, 1995).

C. neoformans é classificado em três variedades: *C. neoformans* (sorotipo A) var. *grubii*, *Cryptococcus neoformans* (sorotipo D) var. *neoformans*, essas de ampla distribuição mundial, e *Cryptococcus neoformans* (sorotipo B e C) pertencentes à variedade *gattii*, que está limitada às regiões tropicais e subtropicais do mundo (LENGELER et al., 2001). *C. neoformans* var. *neoformans* e *C. neoformans* var. *gatti* são os que mais comumente causam infecção no homem (ROSENBAUM; GONÇALVES, 1994), sendo que um atinge hospedeiros infectados pelo HIV, enquanto que, o outro acomete hospedeiros imunocompetentes, respectivamente (FILIÚ et al., 2002). Ambas as variedades exibem tropismo para o Sistema Nervoso Central (CONTIN, 2011). O tratamento antifúngico é prolongado na variedade *gatti*, enquanto que, os pacientes infectados com a variedade *neoformans*, a mortalidade é alta (CONTIN, 2011).

Em rotina laboratorial, colônias de *C. neoformans* desenvolvem-se entre 36 a 72 horas. Elas são de cor branca a creme e opaco e podem ser de vários milímetros de diâmetro. As colônias são tipicamente mucoides (MITCHELL; PERFECT, 1995).

Microscopicamente, apresentam-se como leveduras globosas ou ovaladas, com 3 a 8µm de diâmetro, com brotamento único ou múltiplo, de colo estreito, e envolvido por cápsula mucopolissacarídica (KON et al., 2008), conforme a Figura 1. A cápsula é um importante fator de virulência, mas não é o único (COSTA, 2011). A levedura pode ser vista no escarro, lavado brônquico, líquido cefalorraquidiano (LCR), pus de abscesso, urina, aspirados de medula óssea e de gânglios, fragmentos de tecidos (KON et al., 2008).

Figura 1. Células de levedura de *C. neoformans* com visualização da cápsula.



Fonte: RODRIGUES; ALVIANO; TRAVASSOS, 1999.

Para o diagnóstico da criptococose, o exame direto é o mais utilizado para pesquisa de fungos em fluidos corporais, o LCR é o principal após centrifugação. É uma técnica simples e de baixo custo. Permite a visualização direta das leveduras encapsuladas com a adição da tinta de nanquim ao fluido (COSTA, 2011; CASADEVAL; PERFECT, 1998). Também é feito a cultura dos fungos em Ágar Sabouraud e incubadas a 72 horas de cinco a oito dias e em seguida observa-se as características das colônias (COSTA, 2011). Quando o exame direto e de cultura são negativos (ZAITZ, 1998), é feito a detecção de antígenos no soro e no local da infecção pelo teste de aglutinação de partículas de látex sensibilizadas com o anticorpo monoclonal da cápsula de *C. neoformans* (COSTA, 2011).

A cápsula atua inibindo a quimiotaxia dos leucócitos, inibindo a fagocitose, diminuindo apresentação do antígeno às células T com a consequente redução da resposta imune, e pode ainda mascarar os fatores do sistema complemento (BUCHANAM; MURPLY, 1998; CAMPOS; BARONI, 2010).

A gravidade da doença depende da integridade do sistema imune do hospedeiro, das características das espécies de *Cryptococcus* (WORMLEY; PERFECT, 2005) e do processo patológico. Um dos fatores determinantes do processo patológico é o tamanho

da partícula, a virulência do micro-organismo e a intensidade da resposta inflamatória (GAZZONI, 2007).

3.2 Epidemiologia da Criptococose

As linhagens de *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* têm uma maior prevalência no meio ambiente e nos casos clínicos e se encontram em solo e excretas de aves, como o pombo (CASALI, et al., 2001). Os mesmos podem permanecer em suas fezes durante anos e acaba por se tornar um depósito de infecções (BARONI et al., 2006). Devido à movimentação das aves se tem a dispersão do fungo no ar e conseqüentemente a inalação de esporos.

A infecção por *C. neoformans* ocorre esporadicamente em todas as partes do mundo. De acordo com o relatório de outubro de 1998 do Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV / AIDS, a meningite criptocócica é a mais frequente infecção fúngica sistêmica em pessoas infectadas com HIV. Vale ressaltar, outras condições em que a criptococose é frequente, como em pacientes com extenso tratamento com corticosteroides, leucemias crônicas e linfomas, e sarcoidose (MITCHELL; PERFECT, 1995). O relatório mostrou ainda a prevalência da criptococose em seis Países: Costa do Marfim 5%, Brasil 5%, México 7-11%, Tailândia 2%, Estados Unidos 7%, Zaire 19%. Ainda no Brasil, o *C. gatti* é endêmica na região Nordeste, representando 62,7 a 91,2 % dos casos (CONTIN, 2011).

Em cerca de 4,4 % dos casos de AIDS, a criptococose se mostra como a principal infecção oportunista. No Brasil, dados recentes demonstram que houve um aumento da prevalência da criptococose, de 8-12% na região Sudeste deste País (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012). As estimativas atuais indicam que a cada ano, cerca de um milhão de casos de meningite criptocócica são diagnosticados em todo o mundo e que a doença é responsável por mais de 600 mil mortes (PARK et al., 2009). De acordo com Moreira, Ferreira e Borges (2006), a criptococose é considerada atualmente a doença oportunista com maior morbidade e mortalidade entre os pacientes soropositivos para HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana) sendo um agente um patógeno humano emergente.

Estudo realizado no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia com 96 pacientes acometidos por micose, onde 81,3 % portador de AIDS, em 56,3% dos casos a meningite criptocócica foi a manifestação mais descrita, 59,4 % foram tratados com

anfotericina B e derivados tiazólicos, sendo que 72,9% evoluíram para óbito, em particular os portadores de AIDS, que representam 62,5 % dos casos (MOREIRA et al., 2006).

A criptococose relacionada a AIDS em homens, é predominante na região Sul e Sudeste com mortalidade em cerca de 35% a 40%, ocasionada pela variedade *neoformans* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012). Um estudo epidemiológico da criptococose feito no Hospital Público de Porto Alegre por Mezzari et al (2013), observaram que a criptococose teve uma maior prevalência em pacientes do sexo masculino, brancos, na faixa etária entre 30 e 49 anos e que apresentava alguma imunodeficiência, sendo a AIDS dominante nos casos.

3.3 Tratamento Farmacológico

O tratamento precoce é um fator importante na tentativa de minimizar a mortalidade e este é realizado com fármacos antifúngicos. Os mesmos exercem ações fungistáticas ou fungicidas, direta ou indiretamente. Apresentam características importantes quanto ao seu mecanismo de ação, via de administração, podendo ser classificados com base no sítio-alvo e estrutura química (NOBRE, et al., 2002). Os principais alvos dos fármacos antifúngicos são a parede celular, membrana e núcleo da célula fúngica (RANG; DALE, 2012).

Os principais agentes utilizados na terapia fúngica são: azólicos, triazólicos, poliênicos e a flucitosina (KAUFFMAN, 1996). A terapêutica medicamentosa para *Cryptococcus* spp. e outras espécies fúngicas estão descritas no quadro 1 (LIMA, 2011).

Os azólicos são os antifúngicos mais utilizados, caracterizados por apresentar um anel pentagonal na estrutura molecular (MARTINEZ, 2006) e atuam inibindo a esterol-14- α -lanosterol-desmetilase, um sistema de enzimas microssômicas dependentes do citocromo P450 (CHEN; SORRELL, 2007), comprometendo a síntese de ergosterol na membrana plasmática e, por conseguinte a viabilidade fúngica (MARTINEZ, 2006). Dentro dessa classe existem ainda dois grupos, os Imidazólicos e os Triazóis, um contém três átomos de carbono e dois de nitrogênio e o outro dois de carbono e três de nitrogênio, respectivamente (MARTINEZ, 2006). A utilização de Imidazóis (cetoconazol) se limita a tratar micoses superficiais. Os Triazóis (fluconazol e itraconazol) têm ampla aplicação na terapia tanto superficial quanto na infecção fúngica invasiva (CHEN; SORRELL, 2007).

Os novos triazóis de segunda geração voriconazol, posaconazol e ravuconazol apresentam maior potência e espectro de ação mais amplo do que os antigos azóis (TKACKZ;

DIDOMENICO, 2001), são resultantes de modificações na estrutura química de, respectivamente, fluconazol e itraconazol. Os principais efeitos adversos das drogas azólicas relacionam-se com intolerância gastrointestinal, hepatotoxicidade, hipersensibilidade e, para o cetoconazol em doses elevadas, ginecomastia e irregularidades menstruais (MARTINEZ, 2006). Os azóis de primeira geração e já alguns de segunda geração apresentam já muitas resistências, toxicidade e efeitos adversos. Assim, novas estratégias têm que se delineadas para os antifúngicos disponíveis e novos fármacos têm que ser desenvolvidos (GUPTA; TOMAS, 2003).

Quadro 1. Classes de medicamentos antifúngicos utilizadas no tratamento da criptococose e de algumas espécies fúngicas.

| Classe dos Antifúngicos | Fármaco | Micro-organismo alvo | Referência |
|--------------------------------|--|--|--|
| Azólicos | Fluconazol Itraconazol Cetoconazol | <i>Candida</i> spp. <i>Cryptococcus</i> spp. <i>Aspergillus fumigatus</i> . | MARTINEZ, 2006. |
| Triazóis | Voriconazol Posaconazol | <i>Cryptococcus</i> spp. <i>Candida</i> spp. resistentes aos azóis | MARTINEZ, 2006. |
| Polienos | Anfotericina-B Nistatina | <i>Candida</i> spp. <i>Cryptococcus</i> spp. <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> , <i>Histoplasma capsulatum</i> , <i>Coccidioides immitis</i> , <i>Blastomyces dermatitidis</i> . | MARTINEZ, 2006. |
| Análogos de Pirimidina | Flucitosina | <i>Cryptococcus</i> spp <i>Candida</i> spp | SANGLARD, 2003; MUKHERJEE et al., 2005. |

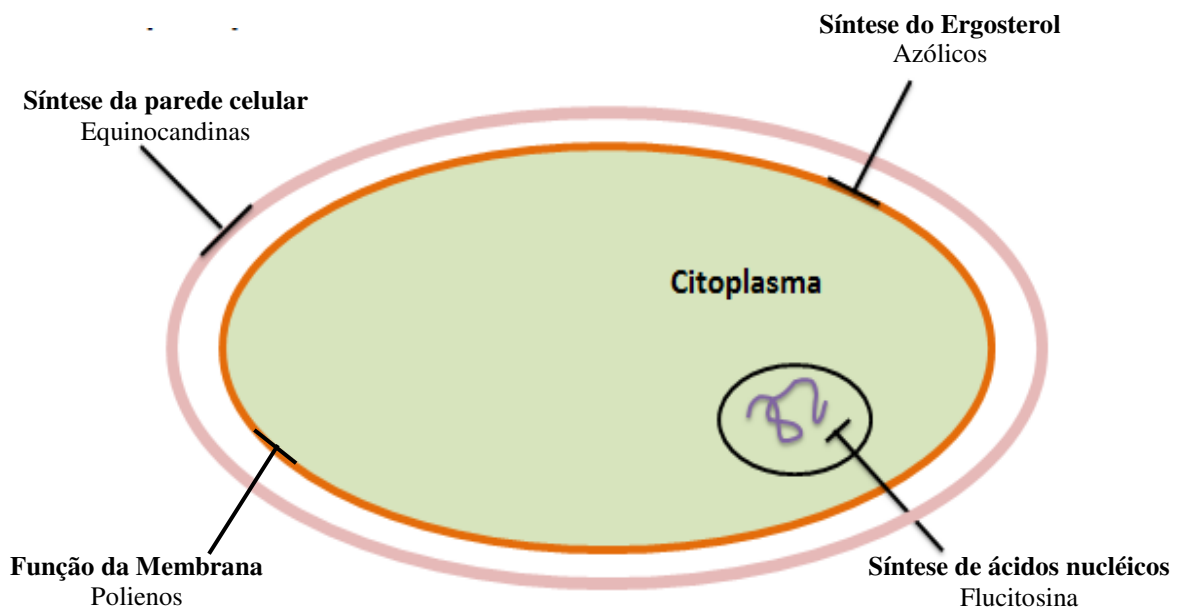
Fonte: Adaptado de Lima, 2011.

Na classe dos Poliênicos fazem parte a anfotericina-B (AB) e a nistatina. AB é eficiente no tratamento com um amplo espectro de infecções fúngicas, porém apresentam desvantagens farmacológicas como: efeitos adversos, baixa disponibilidade oral havendo necessidade de administração via endovenosa, toxicidade celular, principalmente associada à nefrotoxicidade (DAS; SURESH, 2011). Atua ligando-se ao ergosterol, o que altera a permeabilidade da membrana e causando a perda de constituintes citoplasmáticos (MARTINEZ, 2006).

A flucitosina é um análogo fluorado da citosina que se converte em 5-fluorouracil nas células dos fungos. O fluorouracil inibe a timidilato sintetase, interferindo na síntese de DNA

e na síntese protéica do fungo (FRATTARELLI et al., 2004). O antifúngico é administrado em combinação com a AB para o tratamento de meningite causada por *Cryptococcus* spp. (CHEN; SORRELL, 2007), já que a AB apresenta uma boa penetração no sistema nervoso central (FRATTARELLI et al., 2004) e não é recomendado sua administração como agente único porque as cepas desenvolvem rápida resistência (CHEN; SORRELL, 2007). Os mecanismos na resistência à flucitosina envolvem alterações em varias etapas enzimáticas intracelulares envolvidas no mecanismo de ação, incluindo alterações nas enzimas pirofosforilase monofosfato de uridina, citosina permease e citosina desaminase, ou o aumento de pirimidinas (PEREA et al., 2002). Na figura 5, mostra a ação geral dos anitifúngicos.

Figura 2. Ilustração dos mecanismos de ação dos antifúngicos.



Fonte: Adaptado de Ashley et al (2006).

A eficácia para qualquer agente terapêutico depende do potencial de tolerância e resistência deste composto após sua primeira utilização. A resistência dos fungos ou bactérias é devido a mecanismos fisiológicos e bioquímicos, bem como o uso excessivo ou indevido de fármacos (DAVIES; DAVIES, 2010). O aparecimento da resistência torna-se uma grande dificuldade para o tratamento, visto que os pacientes estão debilitados e de alto risco (LIN, 2009).

O tratamento com esses fármacos não é sempre efetivo, pois alguns fungos são menos susceptíveis ou resistentes a agentes antifúngicos, além disso, apresentam toxicidade e são de alto custo (CHEN; SORRELL, 2007).

Os indesejados resultados das terapias antifúngicas atuais enfatizam (LIN, 2009) a urgência de buscar por terapias alternativas. As plantas são fontes importantes de compostos biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em modelos para a síntese de um grande número de fármacos (LIMA et al., 2007). A síntese de tais moléculas em laboratório é difícil devido a complexidade em funcionalidade e quiralidade das mesmas (DAVIES; DAVIES, 2010).

3.4 Fitoconstituente Carvacrol

Fitoconstituente é o termo que se refere a compostos químicos, não nutritivos, que ocorrem naturalmente em plantas e apresentam atividade biológica. Possuem atividades protetoras e ou preventivas de doenças (DANTAS, 2013). É identificado a partir de extratos de plantas e de óleos essenciais. Os fitoconstituintes vêm sendo bastante estudados por representarem uma possibilidade para obtenção de novos fármacos que sejam utilizados no tratamento contra agentes infecciosos ou outras doenças (LIMA et al., 2005; BEZERRA, et al., 2013)

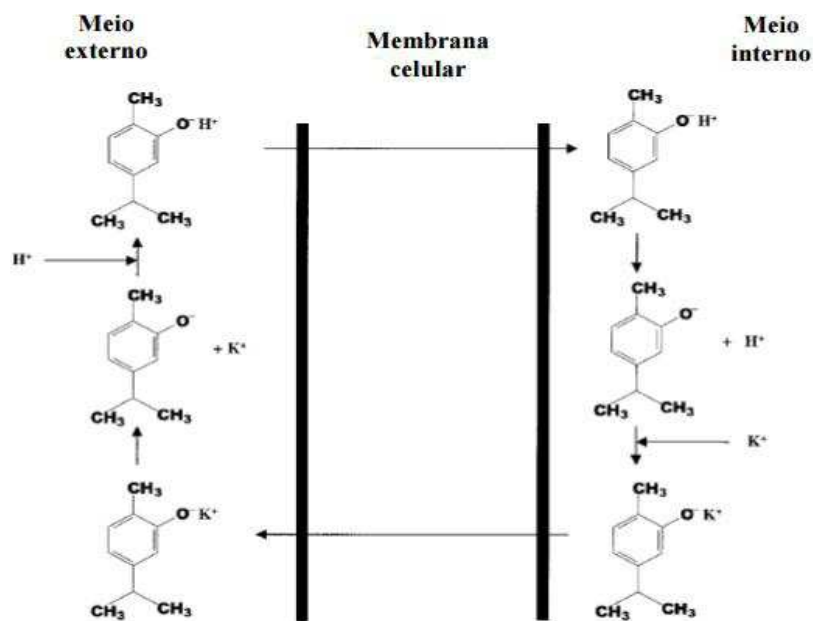
O fitoconstituente carvacrol, encontra-se presente nos óleos essenciais de orégano mexicano (*Lippia graveolens*), tomilho (*Tymus vulgaris*) e orégano (*Origanum vulgare*), onde neste último apresenta-se como componente majoritário (POZATTI et al., 2006). O óleo essencial de *O. vulgare* L., tem mostrado destacáveis resultados *in vitro* na inibição de diferentes micro-organismos, como *Candida albicans* e *Candida kruzei* (SOUZA et al., 2007), *A. hydrophyla*, *B. cereus*, *Bacillus subtilis*, *Enterobacter aerogenes*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Salmonella choleraesuis*, *S. enterica*, *Serratia mercencens*, *Shigella flexneri*, *S. sonnei* e *Y. enterocolitica*. (SOUZA; STAMFORD; LIMA, 2006).

O carvacrol, composto fenólico, apresenta característica pungente e odor aromático, semelhante ao orégano, e pouca solubilidade em água (NEVES, 2009). A presença do grupamento hidroxila e de um sistema de elétrons deslocalizados na molécula de carvacrol parecem ser fatores importantes para a sua atividade antimicrobiana. Agindo como um

trocador de cátions através da troca do próton (H^+) da hidroxila pelo íon K^+ (mecanismo proposto na figura 4) reduz o gradiente de pH da célula, causando um colapso na força próton-motriz. Como consequência, não pode mais haver a síntese de ATP (Trifosfato de Adenosina), o que pode levar à morte celular (ULTEE; BENNIK; MOEZLAAR, 2002).

Essa hipótese é apoiada pelo efluxo observado de K^+ e influxo de H^+ em *B. cereus* durante a exposição ao carvacrol (ULTEE; KETS; SMID, 1999) e pelos resultados com mentol. Embora o mentol tenha um grupo hidroxila, ele não possui uma elevada atividade antimicrobiana. A baixa atividade é causada pela ausência de um sistema de elétrons deslocalizados (ligações duplas) e, conseqüentemente, a incapacidade de o grupo hidroxila liberar o seu próton (ULTEE; BENNIK; MOEZLAAR, 2002).

Figura 3. Mecanismo de ação proposto para o carvacrol: molécula não dissociada difunde-se através da membrana celular e se dissocia no interior da célula, liberando H^+ no citoplasma. Retorna novamente ao meio extracelular na forma não dissociada, carregando um íon K^+ . Um novo próton é ligado à molécula de carvacrol e esta difunde-se novamente através da membrana, reiniciando o processo.



Fonte: Adaptado de Ultee, Bennik e Moezelaar (2002).

Botelho et al (2007) relataram que timol e carvacrol inibem efetivamente o crescimento de patógenos orais como *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*, apresentando atividade antibacteriana e antifúngica. Em outro estudo, Nostro et al (2004)

demonstrou que o carvacrol, timol e óleo essencial de orégano apresentaram atividade antimicrobiana contra *S. epidermidis* e *S. aureus* resistente à meticilina.

Sobral-Souza et al (2014) avaliaram o potencial antiparasitário do carvacrol e do α -pineno, e os mesmos foram eficazes contra as cepas de parasitos testadas apresentando uma fonte alternativa de produtos naturais com atividade contra *L. brasiliensis*.

Além da atividade antifúngica e antimicrobiana, estudos mostram que o carvacrol possui propriedades antitumorais, antioxidantes, antidepressivo, ansiolítico e com isso a sua atuação no sistema nervoso central (KOPARAL et al., 2003; ZOTTI et al., 2013).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Reagentes

Foram utilizados meios de cultura Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) e caldo Sabouraud Dextrose (DIFCO® - Laboratories Ltda). O carvacrol, tween 80, anfotericina B, ergosterol, colesterol foram adquiridos da Sigma Aldrich®.

4.2 Cepas fúngicas

As cepas de *Cryptococcus neoformans* (LM-0310, FCF-119, ICB-59, FCF-102, ICB-2601, JM-10, LM-5, LM-120, LM-39, LM-22) que foram utilizadas, foram gentilmente cedidas pela Prof.^a Dr.^a Edeltrudes de Oliveira Lima (Micoteca do Laboratório de Micologia / Departamento de Ciências Farmacêuticas / CCS / UFPB).

As mesmas foram estocadas em Ágar Sabouraud Dextrose e mantidas a 28-30 °C (temperatura ambiente) e a 4° C.

4.3 Local de trabalho

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Microbiologia (J11) da Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Educação e Saúde, *Campus Cuité-PB*.

4.4 Preparo do fitoconstituente

Para solubilizar o carvacrol, foi utilizado tween 80 a 1%, concentração que não interfere no crescimento fúngico (LIMA, 2011). O fitoconstituente foi suspenso com tween 80 em água destilada.

4.5 Antifúngico padrão

Para o controle positivo da atividade antifúngica do carvacrol testado, foi utilizada anfotericina B como padrão. O tween 80 a 1% foi utilizado para suspender o antifúngico em água destilada.

4.6 Inóculo

As cepas foram mantidas em meio de cultura ASD, durante 72 horas a 37 °C. Para o preparo do inóculo, as colônias fúngicas foram suspensas em 5mL de solução salina estéril (0,85%). Em seguida, as suspensões foram agitadas com o auxílio do Vortex e ajustada para a escala 0,5 McFarland, que corresponde $1-5 \times 10^6$ UFC/mL (CLEELAND; SQUIRES, 1991; HADACEK; GREGER, 2000).

4.7 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Fungicida Mínima (CFM)

A determinação da CIM do fitoconstituente Carvacrol foi realizada pela técnica da microdiluição em Placa de 96 orifícios e fundo em “U” para cada uma das cepas. Através da diluição seriada a uma razão de 2, foram obtidas as concentrações de 1024 a 1 µg/mL, efetuadas na própria placa, da coluna 1 até a 11. A última coluna (12) foi reservada para o controle de crescimento do micro-organismo (caldo Sabouraud dextrose, sem o produto testado). Foi realizado o controle com o antifúngico padrão sintético (anfotericina B).

Em seguida, foram adicionados 10µL do inóculo em cada uma das cavidades. O ensaio foi realizado em duplicata e submetido à incubação na temperatura de 37°C no período de 24-48 horas. A leitura foi procedida, visualmente, pela ausência ou presença de crescimento do micro-organismo através da observação da turvação do meio indicando crescimento do micro-organismo. Portanto, foi determinada como CIM, a menor concentração do produto capaz de inibir o crescimento do micro-organismo ensaiado, verificado por uma não mudança da turvação do meio (CLEELAND; SQUIRES, 1991; HADACEK; GREGER, 2000; CLSI 2002; ELOFF, 1998).

Para determinar a CFM, 10µL de volume foi retirado da cavidade em que não houve crescimento fúngico (CIM, 2xCIM e 4xCIM) e este volume foi semeado em placas com Ágar Saboroud Dextrose. O material foi incubado a 35°C durante 24-48 horas e em seguida, foi

realizada a contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFCs). A CFM foi considerada como a mais baixa concentração capaz de inibir o crescimento fúngico até o número de três UFCs (KLEPSEK et al., 1998; ERNST et al., 1999; CANTÓN et al., 2003; COSTA et al., 2008).

4.8 Ensaio do ergosterol e colesterol

Este ensaio foi realizado de acordo com Escalante et al (2008) com algumas modificações, onde a CIM do carvacrol frente às cepas FCF-102 e LM-22 foram determinados pela técnica de microdiluição, de acordo com ensaio anterior, na presença e ausência do ergosterol e colesterol nas concentrações de 100, 200 e 400 $\mu\text{g/mL}$. Como controle positivo, foi utilizada a anfotericina B e o controle que foi constituído de meio de cultura com veículo e inóculo.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A resistência dos micro-organismos à terapia medicamentosa tem aumentado e com isso a reincidência das infecções e o estudo com fitoconstituente é uma alternativa para pesquisa de novos agentes antifúngicos e até mesmo a sua utilização na potencialização do efeito do fármaco e por fim o efeito terapêutico desejado.

Para avaliar a atividade antifúngica *in vitro* foi feita a técnica de diluição em caldo, em que foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM), que corresponde à concentração mínima capaz de inibir o crescimento do micro-organismo. Essa técnica é padronizada pela CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) e avalia a atividade antimicrobiana sobre bactérias e micro-organismos em geral (CLSI, 2002).

Os resultados dos testes da determinação da concentração inibitória mínima se encontram descritos na Tabela 1. A CIM do carvacrol variou de 25µg/mL a 81µg/mL. Houve crescimento no controle positivo (meio de cultura e inóculo) e não houve no controle de esterilidade (meio de cultura), os mesmos foram utilizados para validar o método do presente estudo (CAVALCANTI et al., 2011).

A anfotericina B (AB) foi utilizada na determinação da CIM como controle positivo. O valor da CIM variou de 0,5 a 1µg/mL (Tabela 1). Todas as cepas foram sensíveis a AB, visto que, Nguyen e Yu (1998) e Lozano-Chiu et al (1998) definiram resistência à AB com valores de CIM iguais ou superiores a 2µg/mL.

Tabela 1. Resultado da CIM da anfotericina B e carvacrol contra cepas de *C. neoformans*.

| Cepas | Controle (Micro-organismos) | Anfotericina B | Carvacrol |
|----------|-----------------------------|----------------|-----------|
| LM-05 | + | 0,62 µg/mL | 25 µg/MI |
| FCF-102 | + | 0,5 µg/mL | 32 µg/MI |
| FCF-119 | + | 0,62 µg/mL | 40 µg/MI |
| ICB-59 | + | 0,5 µg/mL | 40 µg/mL |
| JM-10 | + | 1 µg/mL | 51 µg/mL |
| LM-39 | + | 0,79 µg/mL | 51 µg/mL |
| ICB-2601 | + | 0,62 µg/mL | 51 µg/mL |
| LM-120 | + | 0,5 µg/mL | 64 µg/mL |
| LM-0310 | + | 0,5 µg/mL | 64 µg/mL |
| LM-22 | + | 1 µg/mL | 81 µg/mL |

+: Presença de Crescimento fúngico.

A CIM foi determinada pelo cálculo da média geométrica.

O carvacrol é encontrado no óleo essencial de outras plantas como: *Thymus capitatus*, *Thymus vulgaris*, *Origanum dictamnus*, *Origanum majorana* (DE VICENZI et al., 2004). Além do orégano, outras plantas da família Lamiaceae são ricas em óleos essenciais com alta quantidade de compostos fenólicos (FERRARA; MONTESANTO; CHIANTESE, 2003).

De acordo com os resultados, eles foram menores e diferentes do que os resultados obtidos por Lima et al (2013), onde avaliaram a atividade antifúngica do carvacrol frente à cepa de *Candida albicans* e obtiveram CIM de 128 e 256 µg/mL, demonstrando que esse fitoconstituente tem efeito antifúngico e de outro estudo realizado por Kaulastion et al (2008), que obtiveram CIM do carvacrol pelo método de diluição em caldo para os micro-organismos *E. coli* ATCC 10536 e *S. aureus* ATCC 65288 de 400 µg/mL. Tais resultados corroboraram com os resultados obtidos por Carmo et al (2008), no qual determinou a atividade antifúngica do óleo essencial do orégano contra espécies de *Aspergillus* e encontrou CIM entre 20 e 80 µL/mL.

Estudos afirmam que a maior atividade antifúngica é designada ao óleo essencial presente na planta, por exemplo, Rangel e Silva (2010) avaliaram a atividade antifúngica do extrato etanólico de *Thymus vulgaris* L. (tomilho) e verificaram que o extrato na concentração de 50 mg/mL teve uma maior ação fúngica para *Candida glabrata* e não teve ação para *Cryptococcus neoformans* e *Candida albicans*.

A comparação dos resultados do presente estudo com os achados de outros autores, mostra que existe concordância entre eles, ainda que, alguns fatores podem interferir nos valores da CIM, como: condições de cultivo (tempo de incubação, temperatura, taxa oxigênio), meio de cultura, concentração das substâncias testadas, dispersão e emulsificação dos agentes utilizados na emulsão óleo-água (RIOS; RECIO, 2005; HAMMER et al., 1999). Assim, esses fatores podem contribuir para a diferença de resultados e dificultar a comparação com outros estudos.

Após a determinação da CIM do carvacrol, foi feita a determinação da concentração fungicida mínima (CFM) de acordo com a metodologia de Ernst et al (1999). Os resultados estão descritos na Tabela 2.

Foi considerada a CFM do carvacrol a menor concentração que decorreu o crescimento de três colônias (ERNST et al., 1999). Foi empregado o controle de cada cepa para viabilizar o crescimento das mesmas em meio sólido. A CFM variou de 25 a 102 µg/mL, para todas as cepas a CFM foi a CIM, com exceção das cepas ICB-59 e LM-309 que a CFM foi 2xCIM.

Tabela 2. Resultado da CFM do carvacrol frente às cepas de *C. neoformans*.

| Cepas | Controle (Micro-organismo) | Carvacrol |
|----------|----------------------------|-----------|
| LM-05 | + | 25 µg/mL |
| FCF-102 | + | 32 µg/mL |
| FCF-119 | + | 40 µg/mL |
| JM-10 | + | 51 µg/mL |
| ICB-2601 | + | 51 µg/mL |
| LM-120 | + | 64 µg/mL |
| LM-0310 | + | 64 µg/mL |
| ICB-59 | + | 80 µg/mL |
| LM-22 | + | 81 µg/mL |
| LM-308 | + | 102 µg/mL |

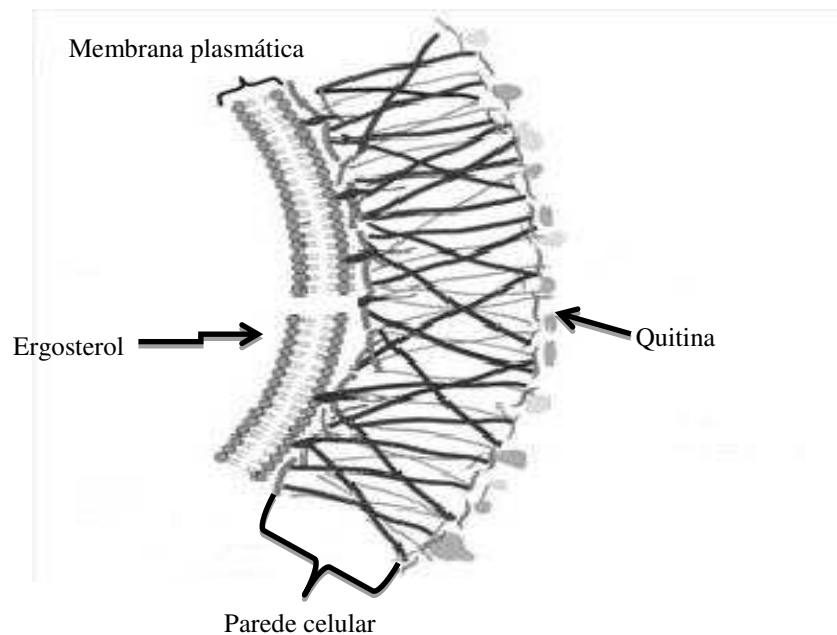
+: Presença de Crescimento fúngico.

A CFM foi determinada pelo cálculo da média geométrica.

Lima et al (2013) determinaram a CFM do carvacrol contra cepas de *Candida albicans* e obtiveram valores entre 256 e 512 µg/mL. No presente estudo, a CFM do carvacrol foi entre 25 e 102 µg/mL, sendo este valor diferente do obtido por Lima et al (2013). Em outro estudo, feito por Manohar et al (2001), a CFM do carvacrol contra uma cepa padrão de *C. albicans* (ATCC-48274) foi de 500µg/mL. As concentrações da CIM e CFM determinados no presente estudo foram baixas e conseguiu inibir totalmente as cepas, o que demonstra que nas concentrações avaliadas, o carvacrol apresentou ação fungicida. Acredita-se que para inibir o crescimento fúngico o carvacrol atue alterando a parede celular ou função da membrana (LEE et al., 1999).

A membrana plasmática dos fungos é constituída por uma dupla camada de fosfolipídios, parte desses fosfolipídios é hidrofílico e a parte mais interna da membrana é hidrofóbica. Apresenta ainda um arranjo de proteínas infiltrado na bicamada lipídica, proteínas de superfície ligadas a membrana e alguns carboidratos, o lipídio ergosterol e enzimas, como ATPase, e quitina que compõem a parede celular (LOGUERCIO-LEITE et al., 2006), conforme a Figura 4. A característica lipofílica do carvacrol permite que o fitoconstituente atravesse a membrana e penetre na célula fúngica.

Figura 4. Ilustração da membrana celular fúngica do *Cryptococcus* ssp.



Fonte: Adaptado de Alexis, 2004; Kartsonis et al. (2003).

O ergosterol (esterol) é o componente lipídico da membrana fúngica e considerado o mais importante por ser responsável pela permeabilidade e fluidez (THEVISSSEN et al., 2003).

Para investigar o modo de ação foi feito um ensaio em que o carvacrol foi colocado na presença e na ausência do ergosterol de acordo com a metodologia de Escalante et al (2008) e também na presença e na ausência do colesterol (LIMA et al., 2013), esterol presente nas células de mamíferos (ZACCHUINO, 2001).

Pode-se observar que a CIM do carvacrol aumentou na presença de ergosterol e colesterol nas concentrações de 100, 200, 400 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 3 e Tabela 4).

Na presença do ergosterol, a CIM aumentou 4 vezes na concentração de 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$ e 8 vezes na concentração de 400 $\mu\text{g/mL}$, quando testado para cepa LM-22 (Tabela 3). Neste mesmo teste, quando realizado para cepa FCF-102, a CIM aumentou 8 vezes para todas as concentrações (100, 200, 400 $\mu\text{g/mL}$) quando testado com ergosterol (Tabela 3).

Tabela 3. Estudo do efeito do ergosterol na CIM do carvacrol frente *C. neoformans* LM-22 e *C. neoformans* FCF-102.

| Carvacrol ($\mu\text{g/mL}$) | <i>C. neoformans</i> LM-22 | | | | <i>C. neoformans</i> FCF-102 | | | |
|-----------------------------------|----------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| | Ausência do Ergosterol | Ergosterol 100 $\mu\text{g/mL}$ | Ergosterol 200 $\mu\text{g/mL}$ | Ergosterol 400 $\mu\text{g/mL}$ | Ausência do Ergosterol | Ergosterol 100 $\mu\text{g/mL}$ | Ergosterol 200 $\mu\text{g/mL}$ | Ergosterol 400 $\mu\text{g/mL}$ |
| 1024 $\mu\text{g/mL}$ | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 512 $\mu\text{g/mL}$ | - | - | - | + | - | - | - | - |
| 256 $\mu\text{g/mL}$ | - | - | - | + | - | - | - | - |
| 128 $\mu\text{g/mL}$ | - | + | + | + | - | + | + | + |
| 64 $\mu\text{g/mL}$ | - | + | + | + | - | + | + | + |
| 32 $\mu\text{g/mL}$ | + | + | + | + | - | + | + | + |
| 16 $\mu\text{g/mL}$ | + | + | + | + | - | + | + | + |
| 8 $\mu\text{g/mL}$ | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 4 $\mu\text{g/mL}$ | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 2 $\mu\text{g/mL}$ | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 1 $\mu\text{g/mL}$ | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 0,5 $\mu\text{g/mL}$ | + | + | + | + | + | + | + | + |

+ : Crescimento fúngico; - : ausência de crescimento fúngico.

A CIM foi determinada pelo cálculo da média geométrica.

Na tabela 4, observa-se que o carvacrol teve sua CIM alterada na presença do colesterol. Na cepa LM-22 a CIM aumentou 6 vezes nas concentrações de 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$, e na concentração de 400 $\mu\text{g/mL}$ aumentou 10 vezes (tabela 4). Ainda neste ensaio, foi utilizada a cepa FCF-102 e observou que a CIM aumentou 8 vezes nas concentrações de 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$, e na concentração de 400 $\mu\text{g/mL}$ a CIM aumentou em 14 vezes na presença do colesterol.

Tabela 4. Estudo do efeito do colesterol na CIM do carvacrol frente *C. neoformans* LM-22 e *C. neoformans* FCF-102.

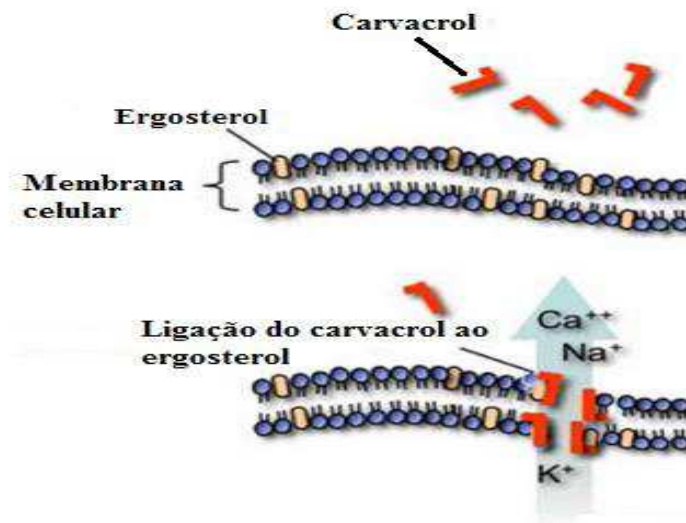
| Carvacrol ($\mu\text{g/mL}$) | <i>C. neoformans</i> LM-22 | | | | <i>C. neoformans</i> FCF-102 | | | |
|-----------------------------------|------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| | Ausência do Colesterol | Colesterol 100 $\mu\text{g/mL}$ | Colesterol 200 $\mu\text{g/mL}$ | Colesterol 400 $\mu\text{g/mL}$ | Ausência do Colesterol | Colesterol 100 $\mu\text{g/mL}$ | Colesterol 200 $\mu\text{g/mL}$ | Colesterol 400 $\mu\text{g/mL}$ |
| 1024 $\mu\text{g/mL}$ | - | - | - | + | - | - | - | + |
| 512 $\mu\text{g/mL}$ | - | - | - | + | - | - | - | + |
| 256 $\mu\text{g/mL}$ | - | + | + | + | - | - | - | + |
| 128 $\mu\text{g/mL}$ | - | + | + | + | - | + | + | + |
| 64 $\mu\text{g/mL}$ | - | + | + | + | - | + | + | + |
| 32 $\mu\text{g/mL}$ | + | + | + | + | - | + | + | + |
| 16 $\mu\text{g/mL}$ | + | + | + | + | - | + | + | + |
| 8 $\mu\text{g/mL}$ | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 4 $\mu\text{g/mL}$ | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 2 $\mu\text{g/mL}$ | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 1 $\mu\text{g/mL}$ | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 0,5 $\mu\text{g/mL}$ | + | + | + | + | + | + | + | + |

+ : Crescimento fúngico; - : ausência de crescimento fúngico.

A CIM foi determinada pelo cálculo da média geométrica.

Diante dos resultados obtidos, a CIM do carvacrol aumentou proporcionalmente ao aumento da concentração do ergosterol no meio. Este resultado sugere que o carvacrol pode atuar ligando ao ergosterol exógeno. Como o ergosterol é o esteroide presente nas células fúngicas, a ligação carvacrol-ergosterol teria como consequência o aumento da permeabilidade, ocasionando a saída de íons de Ca^{++} , K^+ radicais, proteínas (BAKKALII et al., 2008) e com isso a desestabilização da membrana e inibição do crescimento fúngico, conforme figura 5. A integridade da membrana celular é essencial para sobrevivência dos fungos porque é responsável pelas funções celulares.

Figura 5. Ação do Carvacrol na membrana fúngica do *C. neoformans*.



Fonte: Adaptado de Gonçalves (2011).

Hammer et al (2004) avaliaram a atividade antifúngica do óleo essencial de *M. alternifolia* rico em terpenóides sobre *Candida albicans*, *C. glabrata* e *Saccharomyces cerevisiae* e verificaram que o óleo essencial nas concentrações de 0,25% e 1,0% alteraram a fluidez e a permeabilidade da membrana fúngica.

Gil e Holley (2006) investigaram o rompimento da membrana celular de cepas de *L. monocytogenes*, *Lb sake* e *E. coli* O157H7 quando expostas a concentrações bactericidas de compostos aromáticos (carvacrol, eugenol e cinamaldeído). Os resultados indicaram que o carvacrol provocou a ruptura da membrana citoplasmática e o aumento da sua permeabilidade.

Porém, o carvacrol teve interação com o colesterol, tal resultado mostra que as CIM foram bem maiores na presença do colesterol, quando comparado com o meio com ergosterol. Tal resultado sugere que o fitoconstituente pode apresentar toxicidade frente às células humanas, já que o colesterol é componente das membranas plasmáticas de células animais.

Os hidrocarbonetos cíclicos, como terpenos, ciclo alcanos, podem apresentar toxicidade. Esta ação pode ser atribuída à interação da parte lipofílica desses grupos com a parte hidrofóbica da estrutura da membrana (SIKKEMA; BONT; POOLMAN, 1995), a parte lipofílica dos óleos essenciais tende a se acumular na membrana citoplasmática (POZATTI et al., 2006).

A lipofilicidade é uma característica físico-química de um composto que depende de outras características, como polaridade, solubilidade e densidade (LEO; HANSCH; JOW,

1976). Para obter informação sobre o caráter lipofílico do Carvacrol, Ultee, Bennik e Moezelaar (2002) avaliaram o seu comportamento de partição em uma mistura de octanol e água, onde o carvacrol teve uma preferência para a fase de octanol (mais hidrofóbico) que resultou em um $\log P_{o/w}$ 3.64. Diante dessa informação, o carvacrol pode apresentar afinidade com o tecido adiposo e se concentrar no tecido e causar efeitos prejudiciais.

Wright e Shadnia (2008) encontraram uma co-existência de dois mecanismos para a toxicidade de fenóis, um sendo não-específica e dependente da lipofilicidade, e a outra ligada à capacidade de fenóis para formar radicais por interação com as substâncias reativas de oxigênio geradas pelo stress oxidativo em células. Assim, se faz necessário um estudo toxicológico do fitoconstituente para assegurar o seu uso.

Entretanto, um estudo feito por Chami et al (2004), avaliaram atividades do carvacrol e eugenol frente à candidíase oral em ratos imunocomprometidos, não observaram toxicidade aguda nas doses utilizadas (160 e 380 $\mu\text{g}/\text{kg}$), categorizando esses óleos como agentes promissores para o tratamento de candidíase oral. Em outro estudo, esse realizado por Cleff et al (2008), avaliaram a toxicidade do óleo essencial de *O. vulgare* a 3% via oral e tópica em ratas. O mesmo quando utilizado por 30 dias não houve alteração na massa dos órgãos, no eritrograma, e leucograma, mostrando que não apresenta efeitos tóxicos.

Hoje, os lipossomas são bem utilizados no desenvolvimento de tecnologias. São vesículas de natureza anfótera que permitem encapsular diversas moléculas hidrofílicas e/ou lipofílicas. Quando utilizado como quimioterápicos possibilita uma maior eficácia, reduz a toxicidade e a dosagem da substância (MACHADO; GNOATTO; KLUPPEL, 2007). Com isso, os lipossomas seriam uma boa alternativa para veicular o carvacrol e atingir uma aplicação terapêutica eficiente.

Foi realizado ainda nesse estudo o ensaio do ergosterol com a AB, como controle positivo. Esse fármaco age ligando ao ergosterol, ocasionando o aumento da permeabilidade e por fim a morte celular (MOREIRA, 2005).

Na presença do ergosterol, para a cepa LM-22, a CIM da AB aumentou 10 vezes na concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, e nas concentrações de 200 e 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aumentou 14 vezes (Tabela 5). Ainda neste ensaio, a CIM da AB para a cepa FCF-102 aumentou 10 vezes na concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, e nas concentrações de 200 e 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aumentou 12 vezes (Tabela 5).

Tabela 5. Estudo do efeito do ergosterol na CIM da anfotericina B frente *C. neoformans* LM-22 e *C. neoformans* FCF-102.

| Anfotericina B ($\mu\text{g/mL}$) | <i>C. neoformans</i> LM-22 | | | | <i>C. neoformans</i> FCF-102 | | | |
|--|----------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| | Ausência do Ergosterol | Ergosterol 100 $\mu\text{g/mL}$ | Ergosterol 200 $\mu\text{g/mL}$ | Ergosterol 400 $\mu\text{g/mL}$ | Ausência do Ergosterol | Ergosterol 100 $\mu\text{g/mL}$ | Ergosterol 200 $\mu\text{g/mL}$ | Ergosterol 400 $\mu\text{g/mL}$ |
| 64 $\mu\text{g/mL}$ | - | - | + | + | - | - | - | - |
| 32 $\mu\text{g/mL}$ | - | - | + | + | - | - | - | - |
| 16 $\mu\text{g/mL}$ | - | + | + | + | - | - | + | + |
| 8 $\mu\text{g/mL}$ | - | + | + | + | - | + | + | + |
| 4 $\mu\text{g/mL}$ | - | + | + | + | - | + | + | + |
| 2 $\mu\text{g/mL}$ | - | + | + | + | - | + | + | + |
| 1 $\mu\text{g/mL}$ | - | + | + | + | - | + | + | + |
| 0,5 $\mu\text{g/mL}$ | + | + | + | + | - | + | + | + |
| 0,25 $\mu\text{g/mL}$ | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 0,125 $\mu\text{g/mL}$ | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 0,062 $\mu\text{g/mL}$ | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 0,031 $\mu\text{g/mL}$ | + | + | + | + | + | + | + | + |

+ : Crescimento fúngico; - : ausência de crescimento fúngico.

A CIM foi determinada pelo cálculo da média geométrica.

Tabela 6. Estudo do efeito do colesterol na CIM da anfotericina B frente *C. neoformans* LM-22 e *C. neoformans* FCF-102.

| Anfotericina B ($\mu\text{g/mL}$) | <i>C. neoformans</i> LM-22 | | | | <i>C. neoformans</i> FCF-102 | | | |
|-------------------------------------|----------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| | Ausência do Colesterol | Colesterol 100 $\mu\text{g/MI}$ | Colesterol 200 $\mu\text{g/mL}$ | Colesterol 400 $\mu\text{g/mL}$ | Ausência do Colesterol | Colesterol 100 $\mu\text{g/mL}$ | Colesterol 200 $\mu\text{g/mL}$ | Colesterol 400 $\mu\text{g/mL}$ |
| 64 $\mu\text{g/mL}$ | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 32 $\mu\text{g/mL}$ | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 16 $\mu\text{g/mL}$ | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 8 $\mu\text{g/mL}$ | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 4 $\mu\text{g/mL}$ | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 2 $\mu\text{g/mL}$ | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 1 $\mu\text{g/mL}$ | - | + | + | + | - | - | - | - |
| 0,5 $\mu\text{g/mL}$ | + | + | + | + | - | + | + | + |
| 0,25 $\mu\text{g/mL}$ | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 0,125 $\mu\text{g/mL}$ | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 0,062 $\mu\text{g/mL}$ | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 0,031 $\mu\text{g/mL}$ | + | + | + | + | + | + | + | + |

+ : Crescimento fúngico; - : ausência de crescimento fúngico.

A CIM foi determinada pelo cálculo da média geométrica

No caso do caso do efeito do colesterol sob a CIM da AB, foi o dobro do valor da CIM desse antifúngico para LM-22 e FCF-109 em todas as concentrações (Tabela 6). Vale ressaltar, que foram realizados juntamente com estes experimentos os ensaios para o controle positivo e negativo e que os mesmos indicaram que as cepas estavam viáveis e o meio estéril.

A AB é utilizada na terapia antifúngica sistêmica, atua rapidamente e causa danos letais na maioria dos agentes de micoses endêmicas e oportunistas. Constituem indicações primárias de terapia com AB casos de criptococose, aspergilose, infecções disseminadas por *Candida* spp. resistentes a triazólicos e infecções por certos agentes de feohifomicoses e de hialohifomicoses (GONÇALVES, 2011).

As moléculas de AB quando estão em altas concentrações, elas se auto-associam formando dímeros ou agregados maiores (LARABI et al, 2004). Um estudo realizado por Huang et al (2002), constatou que AB tanto na forma monomérica quanto agregada, pode formar canais em membranas contendo ergosterol, mas somente a forma agregada formou tais canais em membranas contendo colesterol.

Assim, embora a AB possua maior afinidade por ergosterol, muitos dos efeitos tóxicos que lhe são atribuídos são resultados da sua capacidade em ligar-se ao colesterol (BOLARD et al., 1993; HUANG et al., 2002). A toxicidade renal é um dos efeitos de maior incidência causado pelo uso desse antifúngico, cujas principais manifestações são: redução da filtração glomerular, hipocalcemia e hipomagnesemia (SARA et al., 1990). Em um estudo comparativo entre anfotericina B e Caspofungin®, 24,8% dos pacientes que foram tratados com AB (0,6 - 1,0 mg/kg/dia) apresentaram nefrotoxicidade comprovada através de achados laboratoriais (MORA-DUARTE et al., 2002).

Outro fator limitante no tratamento das infecções fúngicas é a resistência do fungo frente à ação dos fármacos disponíveis (OLIVEIRA, 2012). Dalazen et al (2011), demonstraram alta taxa de resistência a AB (96,6%) quando avaliaram isolados clínicos de *Candida* sp. Trilles et al (2004), avaliaram a susceptibilidade *in vitro* de nove antifúngicos contra *Cryptococcus gattii*, em que mais de 90% dos isolados exibiram concentrações inibitórias mínimas maiores que 16 µg/mL e 64 µg/mL ao itraconazol e fluconazol respectivamente para 57 isolados avaliados, indicando assim resistência para esses antifúngicos. Ainda nesse estudo, os resultados obtidos por estes autores apontam menor susceptibilidade de *C. gattii* frente aos antifúngicos testados quando comparados a *C. neoformans*.

Diante das considerações, o fitoconstituente carvacrol mostra-se como uma alternativa promissora para o tratamento de infecções fúngicas. Apesar da interação do carvacrol com o

colesterol, é necessário estudos de toxicidade para comprovar tal efeito, visto que a técnica desenvolvida no presente trabalho não substitui os ensaios de toxicidade.

Uma forma de otimizar o uso do carvacrol, é a sua associação com fármacos convencionais. Essas associações vêm sendo bastante estudadas por métodos *in vitro*, sendo a técnica de “checkerboard” bastante utilizada (ODDS, 2003; GRECO; BRAVO; PARSONS, 1995). Então, é necessário realizar a associação do carvacrol com a AB para assegurar o seu uso e o efeito da sua possível associação. Rosato et al (2008) demonstraram a potencial atividade sinérgica entre óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia*, *Origanum vulgare*, *Pelargonium graveolens* e AB contra espécies de *Candida* sp. (ROSATO et al., 2008). Vale ressaltar, que o composto farmacologicamente ativo presente no óleo essencial do orégano é o carvacrol (3 a 17%) (FARMACOPEIA ITALIANA, 1998).

O antifúngico do futuro deve ter amplo espectro de atividade fungicida, ser seguro e não tóxico para as células do hospedeiro (CARRILLO-MUÑOZ et al., 2006). Assim, diante dos resultados obtidos, o fitoconstituente carvacrol pode futuramente torna-se um fármaco, porém, estudos adicionais são necessários para elucidar seu mecanismo e a toxicidade.

6 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos no presente trabalho, pode-se concluir:

- Nas condições avaliadas, o fitoconstituente carvacrol apresentou ação antifúngica contra cepas de *Cryptococcus neoformans*;
- O carvacrol pode atuar ligando-se ao ergosterol exógeno;
- O fitoconstituente apresentou interação com o colesterol, esterol presente nas células de mamíferos.

REFERÊNCIAS

ABAD, M. J.; ANSUATEGUI, M.; BERMEJO, P. Active antifungal substances from natural sources. **Arkivoc**, v. vii, p. 116-145, 2007.

ALEXIS, D. P. Nuevos antifúngicos: Las equinocandinas. **Revista Chilena de Infectología**, v. 22, p. 89-101, 2004.

ANVISA. **Manual Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI**. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/clsi.asp>>. Acesso em: 20 dez. 2014.

ARAÚJO, J. C. L. V.; LIMA, E. O.; CEBALLOS, B. S. O.; FREIRE, K. R. L.; SOUZA, E. L.; FILHO, L. S. Ação antimicrobiana de óleos essenciais sobre microrganismos potencialmente causadores de infecção oportunista. **Revista de Patologia Tropical**, v. 33, p. 55-64, 2004.

ASHLEY, E. S. D.; LEWIS, R.; LEWIS, J. S.; MARTIN, C.; ANDES, D. Pharmacology of Systemic Antifungal Agents. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, p. S28-39, 2006.

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

BARONI, F.A.; PAULA, C.R.; SILVA, E.G.; VIANI, F.C.; RIVERA, I.N.G.; OLIVEIRA, M.T.B. & GAMBALE, W. *Cryptococcus neoformans* strains isolated from church towers in Rio de Janeiro city, RJ, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, p. 71-75, 2006.

BARREIRO, E. L.; BRAGA, C. A. M. A utilização do Safrol principal componente do óleo de Sassafrás, na Síntese de substâncias bioativas na cascata do Ácido araquidônico: anti-inflamatórios, analgésicos e antitrombóticos. **Química Nova**, v. 5, p. 744-759, 1999.

BEZERRA, L. M. D.; FERREIRA, G. L. S.; SILVA, I. C. G.; CASTRO, R. D. Atividade Antibacteriana *In Vitro* de Fitoconstituintes Sobre Microrganismos do Biofilme Dentário. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 17, p. 79-84, 2013

BOLARD, J.; JOLY, V.; YENI, P. Mechanism of action of amphotericin B at the cellular level. It's modulation by delivery system. **Journal of Liposome Research**, v. 3, p. 409-427, 1993.

BUCHANAN, K. L.; MURPLY, J. W. What Makes *Cryptococcus neoformans* a Pathogen?. **Emergig Infectious Diseases**, v. 4, p. 71-83, 1998.

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

BIVANCO, F.C. **Criptococose cutânea**. Arq. Méd. Machado CDS & Martins E.L, 2006. ABC, v.31, p.102-9.

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

CAMPOS, L. F.; BARONI, F. A. Isolados de *Cryptococcus neoformans*, *C. gattii* e *C. laurentii* Produtores de Protease e Fosfolipase. **Revista de Patologia Tropical**, v. 39, p. 83-90, 2010.

CANTÓN, E. et al. Minimum fungicidal concentrations of amphotericin B for bloodstream *Candida* species. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 45, p. 203-206, 2003.

CARRILLO-MUÑOZ, A. J.; GIUSIANO, G.; EZKURRA, P. A.; QUINDÓS, G. Antifungal agents : Made of action in yeast cells. **Revista Española Quimioterapia**, v. 19, p. 130-139, 2006.

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

CAVALCANTI, Y. M.; ALMEIDA, L. F. D.; PADILHA, W. W. N. Atividade Antifúngica de Três Óleos Essenciais Sobre Cepas de *Candida*. **Revista Odontológica do Brasil Central**, v. 20, p. 68-73, 2001.

CASALI, A. K.; STAATS, C. C.; SHANCK, A.; VAINSTEIN, M. H. *Cryptococcus neoformans*: Aspectos Moleculares e Epidemiológicos. **Biotecnologia Ciência & Tecnologia**, v. 4 , p. 34-37, 2001.

CONTIN, J. T.; QUARESMA, G. S.; SILVA, E. F.; LINARDI, V. R. Ocorrência de *Cryptococcus neoformans* em fezes de pombos na cidade de Caratinga, MG – Brasil. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 21, p. 19-24, 2011.

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

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

COSTA, E. V. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of the Amazon Guatterio species. **Phytochemistry**, v. 69, p. 1895-99. 2008.

COSTA, S. B. **Efeitos Imunorregulatórios do Antígeno Polissacarídeo Capsular (GXM) do *Cryptococcus neoformans* e do *Cryptococcus gatti* sobre a produção de Quimiocinas e Espécies Reativas e de Oxigênio IN VITRO.** 2011. 96 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Clínica)-Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2011.

CHAMI, N.; CHAMI, F.; BENNIS, S.; TROIILLAS, J.; REMMAL, A. Antifungal treatment with carvacrol and eugenol of oral candidiasis in immunosuppressed rats. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 8, p. 217-226, 2004.

CHEN, S. C.; SORRELL, T. C. Antifungal agents. **The Medical Journal of Australia**, Sydney, v. 187, p.404-409, 26 jul. 2007.

CLSI 2002. **Clinical and Laboratory Standards Institute, formerly NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards)**, Method M27-A2, 2ª ed. Wayne Ed.; v. 22, p. 1-29.

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

CLEFF, M. B.; MEINERZ, A. R.; SALLIS, E. S.; ANTUNES, T. A.; MATTEI, A.; RODRIGUES, M. R.; MEIRELES, M. C. A.; MELLO, J. R. B. Toxicidade Pré-Clínica em Doses Repetidas do Óleo Essencial do *Origanum vulgare* L. (Óregano) em Ratas Wistar. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, p. 704-709, 2008.

DALAZEN, D.; ZANROSSO, D.; WANDERLEY, L.; SILVA, N.L.; FUENTEFRIA, A.M. Comparação do perfil de suscetibilidade entre isolados clínicos de *Candida* spp. orais e vulvovaginais no Sul do Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, p. 33-38, 2011.

DANTAS, T. B. **Atividade antifúngica in vitro de timol sobre cepas do gênero *Penicillium*.** 2013. 98 f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Biotativos)-Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2013.

DAS, S.; SURESH, P. K. Nanosuspension: a new vehicle for the improvement of the delivery of drugs to the ocular surface..Application to amphotericin B. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v.7, p. 242-247, 2011

DAVIES, J.; DAVIES D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 74, p. 417-433, 2010.

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

DE VINCENZI, M.; STMAMATI, A.; DE VINCENZI, A.; SILIANO, M. Constituents of aromatic plants: carvacrol. **Fitoterapia**, v. 75, p. 801-804, 2004.

DINIZ, R. S. et al. Criptococose: revisão sistemática dos casos ocorridos no Brasil entre 1995-2005. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 4, p.236-241, dez. 2005.

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

ELOFF, J. N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Medica**, v. 64, p. 711-13. 1998.

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, p. 75-80, 1999.

ESCALANTE, A.; GATTUSO, M.; PÉREZ, P.; ZACCHINO, S. Evidence of the mechanism of action of the antifungal phytolaccoside B isolated from *Phytolacca tetramera* Hauman. **Journal of Natural Products**, v. 71, p. 1720-25. 2008.

FARMACOPEA UFFICIALE DELLA REPUBBLICA ITALIANA. X Edizione. Roma: Istituto Poligrafico e Zecca dello Stato, 1998. V.I, p.206-210.

FAVALESSA, O. C.; RIBEIRO, L. C.; TADANO, T.; FONTES, C. J. F.; DIAS, F. B.; COELHO, B. P. A.; HAHN, S. C. Primeira descrição da caracterização fenotípica e susceptibilidade *in vitro* a drogas de leveduras do gênero *Cryptococcus* spp isoladas de pacientes HIV positivos e negativos, Estado de Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, p. 661-665, 2009.

FERRARA, L. K.; MONTESANTO, D.; CHIANTESE, C. *Origanum marjoran* L. in medicine and foods. **Ingredientia Alimentaria**, v. 2, p. 23-25, 2003.

FILIÚ, W.F.O.; WANKE, B.; AGUENA, S. M.; VILELA, V. O.; MACEDO, R. C. L.; LAZERA, M. Cativeiro de aves como fonte de *Cryptococcus neoformans* na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, v. 35, p. 591-595, 2002.

FRATTARELLI, Daniel Ac et al. Antifungals in systemic neonatal candidiasis. **Drugs**, v. 64, p.949-968, 2004.

FREITAS, M. A.; ANDRADE, J. C.; GUEDES, G. M. M.; TINTINO, S. R.; SOUZA, C. E. S.; LEITE, N. F.; GONDIM, C. N. F. L.; MORAIS-BRAGA, M. F.B; MATIAS, E. F. F.; COUTINHO, H. D. M. Avaliação In Vitro da Atividade Antimicrobiana do Carvacrol através dos Métodos de Contato Direto e Gasoso. **Bioscience Journal**, v. 29, p. 781-786, 2013.

FROST, D. J.; BRANDT, K. D.; CUGIER, D.; GOLDMAN, R. J. A whole-cell *Candida albicans* assay for the detection of inhibitors towards fungal cell wall synthesis and assembly. **The Journal of Antibiotics**, v. 48, p. 306-10, 1995.

GAZZONI, A. F. **Diagnóstico histopatológico da criptococose**. 2007. 101 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Pneumológicas)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciências Pneumológicas, Rio Grande do Sul, 2007.

GILL, A. O.; HOLLEY, R. A. Description of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* membranes by plants oil aromatics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 108, 1-9, 2006.

GUPTA, A. K.; TOMAS, E. New antifungal agents. **Dermatologic clinics**, v. 21, p. 565-576, 2003.

GRECO, W. R.; BRAVO, G.; PARSONS, J. C. The search for synergy: a critical review from a response surface perspective. **Pharmacological Reviews**, v.47, p. 331-385, 1995.

GONÇALVES, A. H. **Mecanismo de ação e toxicidade da anfotericina B no tratamento de micoses**. 2011. 29 f. Monografia (Curso de Especialização em Microbiologia)- Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, 2011.

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

HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Antifungal effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and its components on *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 53, p. 1081–1085, 2004.

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

HOOD, J. R.; WILKISON, J. M.; CAVANAGH, H. M. A. Evaluation of common antibacterial screening methods utilized in essential oil research. **Journal of Essential Oil Research**, v. 15, p. 428-433, 2003.

HUANG, W.; ZHANG, Z.; HAN, X.; TANG, J.; WANG, J. DONG, S.; WANG, E. Ion channel behavior of amphotericin B in sterol-free and cholesterol- or ergosterol- containing supported bilayer model membranes investigated by electrochemistry and spectroscopy. **Biophysical Journal**, v. 83, p. 3245-3255, 2002.

JOCA, H. C. **Carvacrol reduz a excitabilidade neural pela inibição dos canais para sódio dependente de voltagem.** 2012. 74 f. Tese (Mestrado em Fisiologia) - Universidade Estadual do Ceará, Centro de Ciências da Saúde, Curso de Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas, Fortaleza, 2012.

KAUFFMAN, C. A. Role of Azoles in Antifungal Therapy. **Clinical Infection Diseases**, v. 22, p. 148-152, 1996.

KALOUSTION, J.; CHEVALIER, J.; MIKAIL, C.; MARTINO, M.; ABOU, L.; VERGENES, M. F. Étude de six huiles essentielles : composition chimique et activité antibactérienne. **Phytotherapié**, v. 6, p. 160-164, 2008.

KARTSONIS, N. A.; NIELSEN, J.; DOUGLAS, C. M. Caspofungin: the first in a new class of antifungal agents. **Drug Resistance Updates**, v.6, p. 197-218, 2003.

KON, A. S.; GRUMACH, A. S.; COLOMBO, A. L.; PENALVA, A. C. O.; WANKE, B.; TELLES, F. Q.; SEVERO, L. C.; ARANHA, L. F.; LAZERA, M. S.; RESENDE, M. R.; SALMITO, M. A.; SHIKANAI-YASUDA, M. A.; MORETTI, M. L.; FERREIRA, M. S.; VERGARA, M. L. S.; ANDRADE, N. M. P.; TRABASSO, P.; MENDES, R. P.; KOPARAL, A. T.; ZEYTINOGLU, M. Effects of Carvacrol on a Human Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) Cell Line, A549. **Cytotechnology**, v.43, p. 149–154, 2003.

KLEPSEK, M.E.; ERNST, E. J.; LEWIS, R. E.; ERNST, M. E.; PFALLER, M.A. Influence of test conditions on antifungal time-kill curve results: proposal of standardized methods. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 42, p. 1207-1212, 1998.

KNOBLOCH, K.; PAULI, A.; IBERL, B., WEIGAND, H.; WIES, N. Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. **Journal of Essential Oil Research**, v. 1, p.118-119, 1989.

LAMBERT, R.J.W.; SKANDAMIS, P.N.; COOTE, P.J. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal Applied Microbiology**, v.91, p.453-462, 2001.

LARABI, M.; GULIK, A.; DEDIEU, J.P.; LEGRAND, P.; BARRATT, G.; CHERON, M. New lipid formulation of amphotericin B: spectral and microscopic analysis. **Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes**, v.1664, p.172-181, 2004.

LEE, S. H.; LEE, J. R.; LUNDE, C. S.; KUBO, I. In vitro antifungal susceptibilities of *Candida albicans* and other fungal pathogens to polygodial, a sesquiterpene dialdehyde. **Planta Medica**, v.65, p. 204–208, 1999.

LEO, A.; HANSH, C.; JOW, P. Y.C. Dependence of hydrophobicity of apolar molecules on their molecular volume. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.19, p. 611-615, 1976.

LENGELER, K.B.; COX, G.M.; HEITMAN, J. Serotype AD strains of *Cryptococcus neoformans* are diploid or aneuploid and are heterozygous at the mating-type locus. **Infection and Immunity**, v. 69, p. 115-122, 2001.

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, p. 199-203, 2005.

LIMA, I. G. **Atividade antifúngica e toxicidade dos monoterpenos citral e carvacrol**. 2011. 125 f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos)-Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2011.

LIMA, C. B.; BELLETTINI, N. M. T.; SILVA, A. S.; CHEIRUBIM, A. P.; JANANI, N. M. T.; VIEIRA, M. A. V.; AMADOR, T. S. Uso de Plantas Medicinais pela População da Zona Urbana de Bandeirantes-PR. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, p.600-602, 2007.

LIMA, I. O.; PEREIRA, F. O.; OLIVEIRA, W. A.; LIMA, E. O.; MENEZES, E. A.; CUNHA, F. A.; DINIZ, M. F. F. M. Antifungal activity and mode of action of carvacrol against *Candida albicans* strains. **The Journal of Essential Oil Research**, v. 25, p. 138-142, 2013.

LIN, X.; HEITMAN, J. The Biology of the *Cryptococcus neoformans* Species Complex. **Annual Review Microbiology**, v. 60, p. 69-105, 2006.

LIN, X. *Cryptococcus neoformans*: Morphogenesis, infection, and evolution. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 9, p. 401-416, 2009.

LOGUERCIO-LEITE, C.; GROPOSO, C.; DRESCHLER-SANTOS, E. R.; FIGUEIREDO, N. F.; GODINHO, P. S.; ABRÃO, R. L. A particularidade de ser um fungo – I. Constituintes celulares, **Biotemas**, v. 19, p. 17-27, 2006.

LOZANO-CHIU, M.; PAETZNICK, V. L; GANNOUM, M. A.; REX, J. H. Detection of resistance to amphotericin B among *Cryptococcus neoformans* clinical isolates: performances of three different media assessed by using E-test and National Committee for Clinical Laboratory Standards M27-A methodology. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p.2817-2822, 1998.

MACHADO, L. C.; GNOATTO, S. A.; KLUPPEL, M. L. W. Lipossomas Aplicados em Farmacologia. **Estudos de Biologia**, v. 29, p. 215-224, 2007.

MANOHAR, V.; INGRAM, C.; GRAY, J.; TALPUR, N.A.; ECHARD, B.W.; BAGCHI, D.; PREUSS, H.G. Antifungal activities of origanum oil against *Candida albicans*. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 228, p. 111-117, 2001.

MARTINEZ, R. Atualização no uso de agentes antifúngicos. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 32, p.449-460, 2006.

MARTINEZ, R. PONZIO, V. Consenso em criptococose – 2008. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, p.524-544, 2008.

MEZAZARI, A.; WLIBBELLING, A. M. P.; FREITAS, G. S. O.; MAY, G. G.; ALBÉ, G. C.; FILIK, H. P.; PORTICH, J. P.; KISSMANN, N.; BEHAR., VIELA, R. M. M. Criptococose em um Hospital Público de Porto Alegre: dados epidemiológicos. **Journal of Infection Control**, v. 3, p. 135-139, 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012. Disponível em <http://www.sgc.goias.gov.br/upload/arquivos/2012-05/proposta_ve-criptococose1.pdf> Acesso em: 10 de Janeiro de 2014.

MICHELIN, D. C.; MORESHI, P. E.; LIMA, A. C.; NASCIMENTO, G. G. F.; POGANELLI, M. O.; CHAUD, M. V. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 316-320, 2005.

MITCHELL, T. G.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis in the era of AIDS--100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8, p.515-548, 1995.

MORA-DUARTE, J.; BETTS, R.; ROTSTEIN, C.; COLOMBO, A.L.; THOMPSON-MOYA, L.; SMIETANA, J.; LUPINACCI, R.; SABLE, C.; KARTSONIS, N.; PERFECT, J. Comparison of caspofungin and amphotericin B for invasive candidiasis. **New England Journal of Medicine**, v. 347, p 2020-2029, 2002.

MOREIRA, T. A.; FERREIRA, M. S.; RIBAS, R. M.; BORGES, A.S.; Criptococose: estudo clínico- epidemiológico, laboratorial e das variedades do fungo em 96 pacientes. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 3, p. 255-258, 2006.

MOREIRA, M. E. L. Controvérsias a respeito da sepse fúngica no pré-termo extremo: profilaxia e esquemas terapêuticos. **Jornal de Pediatria**, v. 81, p. S52-S57, 2005.

MUKHERJEE, P. K.; SHEEHAN, D. J.; HITCHCOCK, C. A.; GHANNOUM, M. A. Combination treatment of invasive fungal infections. **Clinical microbiology reviews**, v.18, p. 163-194, 2005.

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

NEVES, D. P. **Estudo farmacológico do timol e carvacrol sobre a contratilidade da aorta isolada de rato.** 2009. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas)-Universidade Estadual do Ceará, Centro de Ciências da Saúde, Curso de Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas, Fortaleza, 2009.

NOBRE, M. O.; NASCENTE, P. S.; MEIRELES, M. C.; FERREIRO, L. Drogas Antifúngicas para pequenos e grandes animais. **Ciência Rural**, v. 32, p.175-184, 2002.

NGUYEN, M. H.; YU C. Y. *In vitro* comparative efficacy of voriconazole and itraconazole against fluconazole-susceptible and resistant *Cryptococcus neoformans* isolates. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 42, p. 471-472, 1998.

ODDS, F.C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, p. 1, 2003.

OLIVEIRA, V. M. **Associação entre anfotericina B e *Camellia sinensis*: atividade antifúngica e citotoxicidade.** 2012. 64 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-Universidade Estadual de Ponta Grossa, Guarapuava, 2012.

PARK, B. J., WANNEMUEHLER, K. A.; MARSTON, B. J.; GOVENDER, N.; PAPPAS, P. G.; CHILLER, T. M. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. **AIDS**, v. 23, p. 525-530, 2009.

PEREA, S.; PATTERSON, T.F. Antifungal resistance in pathogenic fungi. **Antimicrobial Resistant**, v. 15, p.1073 – 1080, 2002.

PIERCE, C. G.; UPPULURI, P.; TRISTAN, A. R., JUNIOR, F. L. W.; MOWAT, E.; RAMAGE, G.; LOPEZ-RIBOT, J. L. A simple and reproducible 96 well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. **Nature protocols**, v. 3, p. 1494-1500, 2008.

POZATTI, P.; MULLER, L. G.; SPADER, T. B.; ALVES, S. H. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais extraídos de condimentos. **Revista Saúde**, v. 32, p. 53-58, 2006.

QUEIROZ, P. J. A. F.; SOUSA, F. D. N.; LAGE, R. A.; IZAEL, M. A.; SANTOS, A. G. Criptococose – Uma revisão bibliográfica. **Acta Veterinária Brasileira**, v. 2, p.32-38, 2008.

RANG, H. B.; DALE, M. M. (eds) **Farmacologia**. 7ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

RANGEL, E. T.; SILVA, T. B. Avaliação da Atividade Antimicrobiana do Extrato Etanólico do Tomilho (*Thymus vulgaris L.*) *In Vitro*. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. VII, p. 48-58, 2010.

REX, J. H. et al. Antifungal susceptibility testing. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 6, p. 367-381, 1993.

RIOS, J. L.; RECIO, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 80-84, 2005.

RODRIGUES, M. L.; ALVIANO, C. S.; TRAVASSOS, L. R. Pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*: virulence factors and immunological mechanisms. **Microbes and Infection**, v. 1, p. 293-311, 1999.

ROSATO, A.; VITALI, C.; GALLO, D.; BALLEZANO, L.; MALAMACI, R. The inhibition of *Candida* species by selected essential oils and their synergism with amphotericin B. **Phytomedicine**, v. 15, p. 635-638, 2008.

ROSENBAUM, R.; GONÇALVES, A. J. R. Clinical epidemiological study of 171 cases of cryptococcosis. **Clinical Infectious Disease**, v. 18, p. 369-380, 1994.

SAAG, M. S.; GRAYBILL, R. J.; LARSEN, R. A.; PAPPAS, P. G.; PERFECT, J. R.; POWDERLY, W. G.; SOBEL, J. D.; DISMUKES, W. E. Practice guidelines for the management of cryptococcal disease. Infectious Diseases Society of American. **Clinical Infection Diseases**, v. 30, p. 710-718, 2000.

SARA, R.; TAKAHASHI, K.; BRANCH, R. A.; BADR, K. F. Mechanisms of amphotericin B-induced reduction of the glomerular filtration rate: a micropuncture study. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 253, p. 34-37, 1990.

SANGLARD, D. Resistance and tolerance mechanisms to antifungal drugs in fungal pathogens. **Mycologist**, v. 17, p. 74-78, 2003.

SIANI, A. C.; SAMPAIO, A. L. F.; SOUSA, M. C.; HENRIQUE, M. G. M. O.; RAMOS, M. F. S. Óleos Essenciais. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, a. 3, p. 38-43, 2000.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis:Editora da Universidade UFRGS / Editora da UFSC, 2004.

SILVA, M. A. P.; GAGLIANI, L. H. Diagnóstico e Prevalência da Meningite Criptocócica em Pacientes Portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida – SIDA. **Revista UNILUS Ensino e Pesquisa**, v. 11, p.23-44, 2014.

SIKKEMA, J.; BONT, J. A. M.; POOLMAN, B. Mechanisms of Membrane Toxicity of Hydrocarbons. **Microbiological Reviews**, v. 59, p. 201-222, 1995.

SOBRAL-SOUZA, C. E. et al. Avaliação da atividade citotóxica e potencial antiparasitário in vitro do α -pineno e carvacrol. *Acta Toxicológica Argentina*, v. 22, p. 76-81, 2014.

SOUZA, E. L.; STAMFORD, T. L. M.; LIMA, E. O. Sensitivity of spoiling and pathogen food-related bacteria to *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) essential oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 527-532, 2006.

SOUZA, E. L.; STAMFORD, T. L. M.; LIMA, E. O.; TRAJANO, V. N. Effectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. **Food Control**, v. 18, p. 409-413, 2007.

TKACKZ, J. S.; DIDOMENICO B. Antifungals: what's in pipeline. **Current Opinion Microbiology**, n. 4, p.510-515. 2001.

TRILLES, L., FERNANDEZ-TORRES, B.; LAZERA, M. S.; WANKE, B.; GUARRO, J. *In vitro* Antifungal Susceptibility of *Cryptococcus gattii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 4815-4817, 2004.

ULTEE, A.; KETS, E. P. W.; SMID, E. J. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.4606–4610, 1999.

ULTEE, A.; BENNIK, M. H. J.; MOEZELAAR, R. The Phenolic Hydroxyl Group of Carvacrol Is Essential for Action against the Food-Borne Pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 1561-1568, 2002.

WORMLEY, F. L., Jr.; PERFECT, J. R. Immunology of infection caused by *Cryptococcus neoformans*. **Methods in Molecular Medicine**, v. 118, p. 193-198, 2005.

WRIGH, J. S.; SHADNIA, H. Computacional modeling of substituent effects on phenol toxicity. **Chemical Research in Toxicology**, v. 21, p. 1426-1432, 2008.

ZAITZ, Clarisse. **Compêndio de Micologia Médica**. Rio de Janeiro: Medsi, 1998, 434p.

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

ZOTTI, M.; COLAIANNA, M.; MORGESE, M. G.; TUCCI, P.; SHIAVONE, S.; AVATO, P.; TRABACE, L. Carvacrol: From Ancient Flavoring to Neuromodulatory Agent. **Molecules**, v. 18, p. 6161-6172, 2013.