

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

**ANNA PAULA DE CASTRO TEIXEIRA**

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO TIMOL FRENTE ÀS CEPAS DE**  
***Cryptococcus neoformans***

**CUITÉ PB**

**2017**

**ANNA PAULA DE CASTRO TEIXEIRA**

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO TIMOL FRENTE ÀS CEPAS DE  
*Cryptococcus neoformans***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Campina Grande para obtenção de título de bacharel em Farmácia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Igara de Oliveira Lima

**CUITÉ PB**

**2017**

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

T266      Teixeira, Anna Paula de Castro.

Estudo da atividade antifúngica do timol frente às cepas  
De *cryptococcus neoformans*. / Anna Paula de Castro  
Teixeira. – Cuité: CES, 2017.

54 fl.

Monografia (Curso de Graduação em Farmácia) – Centro  
de Educação e Saúde / UFCG, 2017.

Orientadora: Igara de Oliveira Lima.

1. Antifúngicos. 2. *Criptococose*. 3. Fitoconstituente. 4.  
Monoterpeno. I. Título.

Biblioteca do CES - UFCG

CDU 615.281.9

**ANNA PAULA DE CASTRO TEIXEIRA**

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO TIMOL FRENTE ÀS CEPAS DE  
*Cryptococcus neoformans***

Monografia apresentada ao Curso de em Farmácia da Universidade Federal de  
Campina Grande, para obtenção do Grau de Bacharel em Farmácia.

Aprovado em     /    /    

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Igara de Oliveira Lima

ORIENTADORA – UFCG

---

Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Fillipe de Oliveira Pereira - UFCG

EXAMINADOR

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Francinalva Dantas Medeiros - UFCG

EXAMINADOR

Dedico inicialmente a Deus, que é unipotente e unipresente.  
Aos meus pais Whilame e Marleide, que são meu alicerce e inspiração de  
superação.  
Aos meus avôs Quildo (*In memoriam*), Maria do Carmo (*In memoriam*), seria nítido o  
orgulho transparecendo em vossa face.  
À minha orientadora Igara, por ter colaborado com o meu crescimento e  
desenvolvimento acadêmico.  
Dedico.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a **Deus**, pelo dom da vida, pelo dom sabedoria, por não me abandonar e pela força de vontade para não deixar o sentimento da desistência persistir em mim. Toda honra e glória a ti, Senhor!

Segundo, agradeço aos meus pais, **Whilame Teixeira Pimenta** e **Marleide de Oliveira Castro Teixeira**, pelo amor, cumplicidade, pela boa criação, por não medirem esforços para conclusão dos meus estudos, e o principal – nunca duvidaram do meu potencial, mesmo quando eu duvidasse. À minha irmã **Kadija de Castro Teixeira**, por além de compartilhar o mesmo sangue, compartilhamos sonhos e conquistas. Grata pela paciência no decorrer da graduação. Amo a nossa família.

Agradeço em especial a minha orientadora **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Igara Oliveira Lima** pela paciência, dedicação, orientação para o desenvolvimento deste estudo, além da amizade e por acreditar na minha capacidade, me fazendo olhar sempre mais longe, sou eternamente grata, seu nome está em minhas orações.

Agradeço a todos os professores do curso, pelo profissionalismo e dedicação, em especial ao **Prof. Dr. Wylly Araújo de Oliveira**, **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Emília da Silva Menezes**, **Prof. Dr. Alecxandro Alves Vieira** e ao **Prof. Dr. Ramilton Marinho Costa** pelas orientações em atividades extracurriculares, contribuindo para a ampliação da minha visão acadêmica.

Ao grupo de pesquisa em microbiologia, em especial à **Msc. Rafaela Oliveira da Nóbrega** pelo companheirismo, amizade e colaboração com os experimentos.

À professora **Dr<sup>a</sup>. Edeltrudes de Oliveira Lima**, pela doação dos microrganismos testados, viabilizando este estudo.

Aos professores **Dr. Fillipe de Oliveira Pereira** e **Dr<sup>a</sup>. Francinalva Dantas Medeiros**, por aceitar ao convite de compor a banca avaliadora e contribuições para este trabalho.

Aos meus avôs Francisco Quildo Teixeira (*In memoriam*) e Maria do Carmo Oliveira (*In memoriam*) - foi mais difícil lidar com o "*In memoriam*" do que desenvolver este estudo – pela doce infância, pelo amor e por sentirem orgulho de mim antes de partirem.

À vovó **Antônia dos Santos Pimenta Teixeira** e vovô **Severino Alves de Castro**, obrigada por sempre se preocuparem comigo. Aos meus tios e primos, por se

fazerem sempre presente, sempre especiais, **Otto Luis, Whashington, Wênio, Wellington, José Wilson, Neuma, Ana Maria, Marlene, Margareth, Marluza, Maria Neide e Madalena**, meu muito obrigada!

Aos meus amigos de longas datas, desde a infância e adolescência, **Morgana Vieira, Marielly Souza, Vitória Fernandes, Sabine Bezerra, Pompílio Neto**, por todo o apoio, cumplicidade, amizade e carinho. Amo vocês!

Aos meus amigos de faculdade, que levarei sempre no meu coração, somos uma família criada por Cuité PB, **Dayanne Feitosa, Géssyca Isbelo, Thaisy de Fátima, Yamma Klívia e Fernando Azevedo**, não poderia esquecer do colo que ajudou a me consolar nas dificuldades, eu amo vocês.

À minha turma, ingressantes de 2012.2, em especial a **Andressa, Brenna, Gustavo, Kaltz, Lucicarla, Mikaeli, Samara, Tássia, Vanízia**, na qual compartilhamos angústias, sonhos, felicidades e ausência das nossas famílias, obrigada!

Enfim, agradeço a todos que de forma direta ou indireta colaboraram e contribuíram com este trabalho e com meu desenvolvimento acadêmico para que esta etapa pudesse ser vivida e concluída! Parafraçando Isaac Newton, se eu cheguei até onde cheguei, foi porque comigo estavam os melhores. Muito obrigada!

*"Quando a graça de Deus se encontra com um espírito puro e batalhador,  
os milagres acontecem."  
(Padre Léo)*



## RESUMO

TEIXEIRA, A. P. C. **Estudo da atividade antifúngica do timol frente às cepas de *Cryptococcus neoformans***. 2017. 54f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Universidade Federal de Campina Grande, Cuité, 2017.

*Cryptococcus neoformans* é um fungo leveduriforme encontrado principalmente em fezes de pombos, é o agente etiológico causador da criptococose, desencadeada devido a inalação do fungo e disseminação para o sistema nervoso central. Acomete pacientes com a imunidade comprometida. O tratamento de escolha é a administração de anfotericina B em associação da flucitosina, porém devido ao desencadeamento de resistência as terapias existentes, e os efeitos colaterais pelo uso prolongado, pesquisadores tem analisado os produtos naturais buscando novas terapias, sendo o timol uma molécula bastante promissora e que vem apresentando atividade antimicrobiana. O objetivo deste estudo foi investigar a atividade antifúngica do timol frente às cepas de *Cryptococcus neoformans* e um possível mecanismo de ação. A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi feita através da técnica de microdiluição. A concentração fungicida mínima (CFM) foi realizada semeando 10 µL em que não houve turvação da cavidade da placa de microdiluição, em ágar sabouraud dextrose, previamente distribuídos nas placas de Petri. O estudo do modo de ação foi realizado pela técnica de microdiluição com o timol na presença e na ausência de ergosterol e colesterol. A CIM do timol variou de 20 a 51 µg/mL, enquanto que a CFM variou de 40 a 101 µg/mL. Na presença de ergosterol, a CIM do timol foi de 64 µg/mL e na presença do colesterol, a CIM foi de 32 µg/mL para as cepas ICB-2601 e LM-39. Mediante os resultados obtidos, o timol apresentou ação antifúngica e parece interagir com o ergosterol e não interagiu com o colesterol. Porém estudos complementares são necessários para analisar os efeitos completos.

**Palavras-chaves:** Criptococose, fitoconstituente, monoterpeno.

## ABSTRACT

*Cryptococcus neoformans* is a yeast fungus found mainly in feces of pigeons, it is the causative agent of cryptococcosis, triggered due to fungus inhalation and dissemination to the central nervous system. It affects patients with compromised immunity. The treatment of choice is the administration of amphotericin B in combination with flucytosine, but due to resistance to existing therapies, and the side effects of prolonged use, researchers have analyzed the natural products seeking new therapies, and thymol is a very promising molecule And that has been presenting antimicrobial activity. The aim of this study was to investigate the antifungal activity of thymol against *Cryptococcus neoformans* strains and a possible mechanism of action. The determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) was done using the microdilution technique. The minimal fungicidal concentration (CFM) was performed by sowing 10  $\mu$ L in which there was no turbidity of the well of the microdilution plate, on sabouraud dextrose agar, previously distributed in Petri dishes. The mode of action study was performed by the microdilution technique with thymol in the presence and absence of ergosterol and cholesterol. Thymol MICs ranged from 20 to 51  $\mu$ g/mL, while CFM ranged from 40 to 101  $\mu$ g/mL. In the presence of ergosterol, thymol MIC was 64  $\mu$ g/mL and in the presence of cholesterol, MIC was 32  $\mu$ g/mL for ICB-2601 and LM-39 strains. Based on the results obtained, thymol presented antifungal action and seems to interact with ergosterol and did not interact with cholesterol. But complementary studies are needed to look at the full effects.

**KEYWORDS:** Cryptococcosis, phytoconstituent, monoterpene.

## LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AFB – Anfotericina B

AIDS – Síndrome da Imunodeficiência adquirida

ASD – Ágar Saboraud Dextrose

CFM – Concentração Fungicida Mínima

CIM – Concentração Inibitória Mínima

DCF – Departamento de Ciências Farmacêuticas

DM – Diabetes *Mellitus*

DMSO - Dimetilsulfóxido

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

LCR – Líquor

pH – Potencial Hidrogeniônico

RNA – Ácido Ribonucleico

SNC – Sistema Nervoso Central

SRI – Síndrome Inflamatória de Reconstituição Imune

UFC – Unidade Formadora de Colônia

UFPB – Universidade Federal da Paraíba

UNESCO - Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura

5-FC – 5-Flucitosina

% - Porcentagem

°C – Graus Celsius

µg/mL – Micrograma por mililitro

µL – Microlitros

g/mol – Grama por cada mol

h – Hora

kg – Quilograma

mg – Miligrama

mL - Mililitro

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b> Cultura de <i>Cryptococcus neoformans</i> em meio agar sabouraud dextrose.	19
<b>FIGURA 2</b> Ilustração do ciclo de infecção por <i>Cryptococcus neoformans</i> .	20
<b>FIGURA 3</b> <i>Cryptococcus neoformans</i> analisada por microscopia.	20
<b>FIGURA 4</b> Mecanismo de ação dos fármacos utilizado para o tratamento da criptococose.	25
<b>FIGURA 5</b> Estrutura molecular do 5-metil-2-(1-metiletil)-fenol (timol).	28
<b>FIGURA 6</b> Esquematização do possível modo do ação do timol, descrito por EMIROGLU et al., 2010.	29
<b>FIGURA 7</b> Esquematização do preparo do inóculo.	32
<b>FIGURA 8</b> Esquematização da metodologia descrita por M27-A2 do CLSI, 2002; CLEELAND, SQUIRES, 1991; ELOFF, 1998.	33
<b>FIGURA 9</b> Ilustração da técnica de microdiluição em placa de 96 cavidades em "U".	33
<b>FIGURA 10</b> Esquematização da técnica para determinar a CFM.	34

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>GRÁFICO 01</b> Frequência de <i>Cryptococcus spp.</i> em países da América do Sul e Central.....	21
<b>GRÁFICO 02</b> Análise de prontuários de hospital público em Porto Alegre de pacientes com criptococose.....	22

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b> Concentração mínima de Timol e Anfotericina B necessário para inibir o crescimento das cepas de <i>Cryptococcus neoformans</i> .....	35
<b>TABELA 2</b> Concentração Fungicida Mínima (CFM) de Timol necessária para eliminar até 99,9% UFC de <i>C. neoformans</i> .....	36
<b>TABELA 3</b> Estudo do efeito do ergosterol na CIM do timol frente <i>C. neoformans</i> ICB-2601 eLM-39.....	37
<b>TABELA 4</b> Estudo do efeito do colesterol na CIM do timol frente <i>C. neoformans</i> ICB-2601 eLM-39.....	38
<b>TABELA 5</b> Estudo do efeito do ergosterol na CIM da Anfotericina B frente <i>C. neoformans</i> ICB-2601 eLM-39.....	39
<b>TABELA 6</b> Estudo do efeito do colesterol na CIM da Anfotericina B frente <i>C. neoformans</i> ICB-2601 eLM-39.....	40

## LISTA DE QUADROS

<b>QUADRO 1</b> Classe de medicamento utilizados na terapêutica antifúngica contra criptococose, de acordo com o estado imunológico.....	24
<b>QUADRO 2</b> Efeitos colaterais desencadeado pelo uso de antifúngicos para tratar a criptococose.....	26

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>18</b>
	2.1 Objetivo Geral.....	18
	2.2 Objetivos Específicos.....	18
<b>3</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>19</b>
	3.1 Criptococose e <i>Cryptococcus neoformans</i> .....	19
	3.2 Epidemiologia.....	21
	3.3 Terapêutica medicamentosa.....	23
	3.4 Plantas medicinais e Produtos naturais.....	27
	3.5 Fitoconstituente timol.....	28
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>31</b>
	4.1 Espécimes Fúngicas e Meio de cultura.....	31
	4.2 Substância analisada.....	31
	4.3 Antifúngicos-padrão.....	31
	4.4 Inóculo.....	31
	4.5 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Fungicida Mínima (CFM).....	32
	4.6 Ensaio com colesterol e ergosterol.....	34
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>35</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>41</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>42</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>53</b>



## 1. INTRODUÇÃO

A criptococose é uma doença fúngica causada por *Cryptococcus neoformans*, desencadeada em pacientes com o sistema imunológico comprometido, após inalação do fungo, acometendo principalmente o Sistema Nervoso Central (SNC) (GILES et al., 2009; STIE; FOX, 2012). *Cryptococcus neoformans* é uma levedura encapsulada composta por polissacarídeos, cosmopolita e oportunista, encontrado principalmente em excreta de pombos, cascas de árvores e em animais domésticos (DOERING, 2009; EL-FANE et al., 2015).

Os sintomas mais comuns da criptococose são cefaleia e febre, e o diagnóstico pode ser feito por microscopia, através de esfregaço de líquido, utilizando tinta Nanquim, visualizando o contraste negativo da cápsula do fungo, devido a presença da cápsula de polissacarídeos (QUEIROZ et al., 2008; BRASIL, 2014).

O índice de mortalidade da criptococose é elevado, ocorrendo em mais de 50% dos pacientes quando infectados (PFALLER; DIEKEMA, 2007; PEMÁN; SALAVERT, 2012). Para controle da doença, devem ser adotadas medidas para minimizar a proliferação de pombos, e umidificação dos locais com acúmulo de fezes dos pombos, além de desinfetação, para que os fungos possam ser removidos com segurança, evitando a dispersão. Não necessita isolar os pacientes infectados. (BRASIL, 2010).

O tratamento de escolha da meningite criptocócica é a associação da anfotericina B com a flucitosina, o primeiro age nas células fúngicas formando complexos com o ergosterol e fosfolípidios da membrana, e o segundo, atua inibindo a síntese de ácidos nucleicos, impossibilitando a replicação do fungo (KARKOWSKA-KULETA; RAPALA-KOZIK; KOZIK, 2009; TSENG et al., 2013).

Porém os fármacos que vem sendo utilizados para o tratamento tem desencadeado resistência antifúngica, além dos efeitos adversos, sendo propícia a realização de pesquisas na busca de novas moléculas para tratar doenças, na perspectiva de menores efeitos colaterais e maior eficácia (MARTINEZ-ROSSI; PERES; ROSSI, 2008; SPINELLO, 2013).

No entanto, pesquisadores direcionam seus estudos para avaliar os efeitos antifúngicos dos óleos essenciais e seus extratos das plantas, isolando fitoconstituintes obtidos pela extração, estudando suas possíveis atividades biológicas (DANTAS, 2013).

Na literatura relata que os fitoconstituintes terpênicos, como o timol, tem sido efetivo quando utilizado para tratar infecções epiteliais e por inalação, e quando associado a outras substâncias, pode tratar infecções respiratórias, podendo, então, ser promissor diante dos microrganismos (KORDALI et al., 2008). Então é de grande valia o estudo do timol para testar sua ação antifúngica contra cepas da espécie de *Cryptococcus neoformans*, já que após a inalação do basidiósporo, este microrganismo começa a desencadear enfermidades.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

- Avaliar a atividade antifúngica *in vitro* do monoterpene timol contra *Cryptococcus neoformans*.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Fungicida Mínima (CFM) do fitoconstituente timol;
- Investigar a influência do ergosterol e colesterol exógenos na CIM do timol buscando um possível mecanismo de ação.

### 3. REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Criptococose e *Cryptococcus neoformans*

A Criptococose, também conhecida como torulose ou blastomicose europeia, é uma doença causada por um fungo encapsulado, o *Cryptococcus neoformans* (Figura 1), que frequentemente acomete pacientes com o sistema imunológico comprometido, acometendo principalmente o Sistema Nervoso Central (SNC) (GILES et al. 2009; STIE; FOX, 2012). Este fungo é uma levedura encapsulada, a qual é composta por polissacarídeos, que tem como componente principal ácido glicurônico. É a forma assexuada do basidomiceto *Filobasidiella neoformans*, cosmopolita e oportunista, encontrado principalmente em excreta de pombos, cascas de árvores e em animais domésticos (QUEIROZ et al., 2008, DOERING, 2009; EL-FANE et al., 2015).

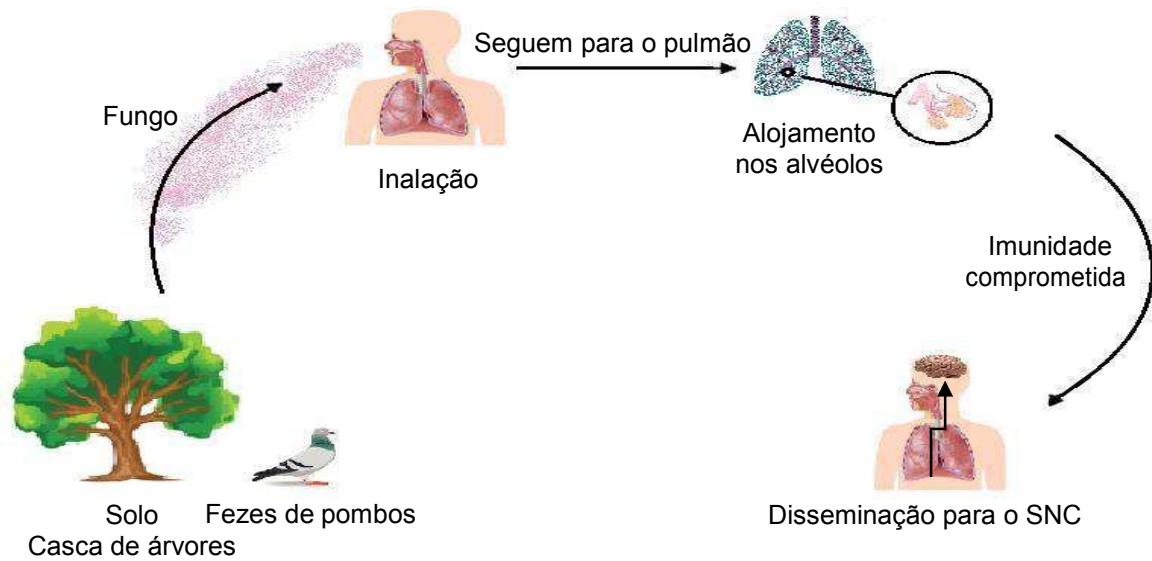
**Figura 1:** Cultura de *Cryptococcus neoformans* em meio ágar sabouraud dextrose.



Fonte: AUTOR.

*Cryptococcus neoformans* apresenta-se em cinco sorotipos distintos: A, B, C, D e AD, e em três variedades distintas: *C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo A) e *C. neoformans* var. *gattii* (sorotipos B e C), *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipos D e AD), sendo o sorotipo A é o mais frequente no Brasil, destacando-se por apresentar um acentuado dermatotropismo (BIVANCO; MACHADO; MARTINS, 2006; MOREIRA et. al., 2006). Devido à inalação do fungo, este se aloja no pulmão, iniciando o processo infeccioso, desencadeando doenças respiratórias, podendo ser assintomática, mas dependendo do estado imunológico do paciente, pode ser aguda ou crônica, chegando a causar meningoencefalite, quando disseminada para o SNC, como pode ser visto na figura 2 (VOELZ; MAY, 2010; SILVA; GAGLIANI, 2014).

**Figura 2:** Ilustração do ciclo de infecção por *Cryptococcus neoformans*.



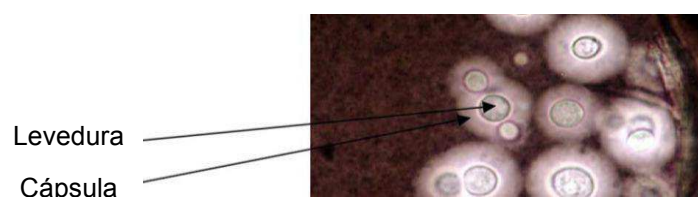
**Fonte:** Autor

O fator marcante para a patogenicidade do *C. neoformans* é a formação da cápsula de polissacarídeos, inibição da ação de macrófagos alveolares e a produção de fenol oxidase, que é a enzima que protege o fungo contra o sistema oxidativo da epinefrina do hospedeiro (QUEIROZ et al., 2008).

Os sintomas mais comuns são cefaleia e febre. Porém sinais meníngeos estão presentes em menos da metade dos casos, podendo estar presente papiledema, coma, vômito e diplopia quando há hipertensão intracraniana (BRASIL, 2014).

O principal diagnóstico para amostras com suspeitas de infecção causada por *C. neoformans* é a utilização da tinta de Nanquim em coloração de esfregaços do material fresco visualizando o contraste coloração negativa da cápsula (Figura 3), conferidos pelos os polissacarídeos (QUEIROZ et al., 2008). Porém, para o definitivo diagnóstico, deve ter como resultado positivo o teste de antígeno (LAPPIN, 2010).

**Figura 3:** *Cryptococcus neoformans* analisada por microscopia. A cápsula mucopolissacarídica não permite a penetração da tinta Nanquim, resultando contraste negativo (BRASIL, 2008).



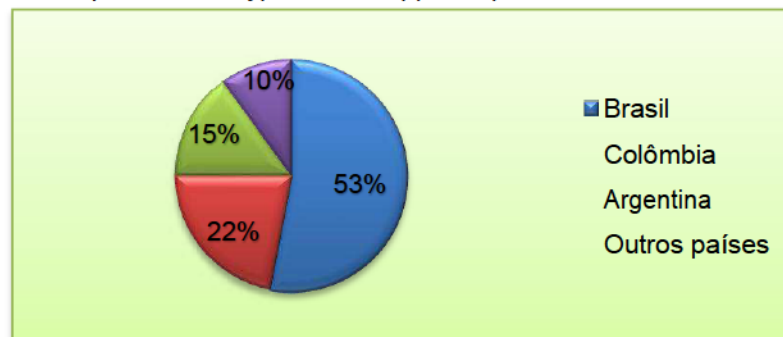
**Fonte:** <http://www.microbiologie-medicale.fr/mycologie/pouvoirpathogenechampignonsmicroscopiques.htm>

Outros diagnósticos podem ser feitos por citologia, histopatologia ou cultura, quando com manifestações clínicas, e para dados complementares, pode ser realizado a necrópsia (PETRAGLIA, 2008; QUEIROZ et al., 2008; LAPPIN, 2010; STRADIOTO, 2010).

### 3.2 Epidemiologia

O predomínio das espécies de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* está na América do Sul e Central, por serem regiões tropicais e subtropicais, em que no total de 10.548 cepas de *Cryptococcus*, 8.590 foram isoladas a partir de fontes clínicas e 1.958 a partir do ambiente e animais: isoladas excretas de pombos e outras aves, solo, poeira e habitações contaminadas, espécies de eucalipto, árvore de amêndoa, excretas de insetos, touro e ovelhas, madeira em decomposição e entre outros. Destas cepas, 53% foram do Brasil, 22% da Colômbia, 15% da Argentina, 10% dos demais países, conforme apresentado no gráfico 1 (COGLIATI, 2013).

**Gráfico 01:** Frequência de *Cryptococcus spp.* em países da América do Sul e Central.

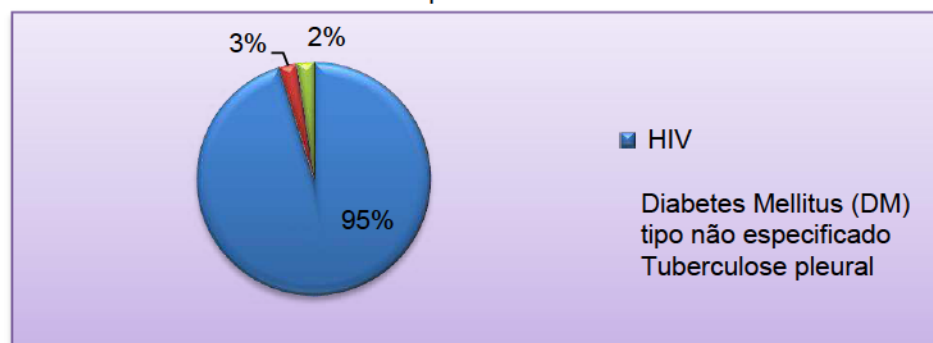


Fonte: COGLIATI, 2013.

Dentre as espécies de fungos encontradas na natureza, *Candida spp.*, *Aspergillus spp.* e *Cryptococcus neoformans* estão entre os mais comuns agentes etiológicos de infecções fúngicas, de alta relevância mundial, principalmente em pacientes transplantados de órgãos sólidos. As taxas de mortalidade associadas a essas micoses são elevadas, ocorrendo em mais de 50% dos pacientes quando infectados, caracterizando uma limitação quanto ao objetivo clínico. Não há necessidade de isolar os pacientes infectados (PFALLER; DIEKEMA, 2007; BRASIL, 2010; PEMÁN; SALAVERT, 2012).

Em estudo epidemiológico realizado por Mezzari et al. (2013) em um hospital público em Porto Alegre, dos 42 prontuários de pacientes com criptococose, 64,3% dos pacientes desencadearam devido infecção com *Cryptococcus neoformans*, enquanto os demais foram com o *Cryptococcus spp.*. 95,2% desencadearam neurocriptococose que é a disseminação do fungo no Sistema Nervoso Central e estavam coinfectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV). Dos 42 pacientes, 26% pacientes foram a óbito (Gráfico 2).

**Gráfico 02:** Análise de prontuários de hospital público em Porto Alegre de pacientes com criptococose.



Fonte: MEZZARI et al., 2013.

A grande maioria da atual incidência de doenças invasivas é devido ao sistema imunológico pouco eficaz quando acometido por infecções imunossupressoras tal como HIV e pelas intervenções médicas imunossupressoras modernas. A letalidade em pacientes com infecção pelo HIV é elevada, variando entre 45 a 72%, e é destaque como fatores de ruim prognóstico a elevada carga de fungos, corroborada pela pesquisa no líquido (LCR) e títulos elevados da reação do látex; as alterações sensoriais no início da fase clínica (pacientes obnubilados, torporosos ou em coma); a resposta inflamatória ausente no LCR; a invasão micótica fora do SNC em órgãos como pulmões, fígado, pele, no sangue, entre outros; a imunossupressão avançada (BRASIL, 2008).

Nos países desenvolvidos, a criptococose ainda é causa de óbitos, embora tenha diminuído a incidência de pacientes portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) com a meningite criptocócica devido ao tratamento com terapia antirretroviral (VILCHEZ; FUNG; KUSNE, 2002).

Lortholary et al. (2002), afirma que os hormônios femininos podem influenciar na infecção do *Cryptococcus spp.*, podendo atuar na proteção do organismo pois em estudos realizados com ratos, as fêmeas tiveram níveis mais elevados de TNF- $\alpha$  e



IFN- $\gamma$  no baço e no sangue do que os machos quando ambos infectados com o gênero do fungo.

Importante ressaltar que pacientes desenvolvem lesões granulomatosas devido a não remoção completa do microrganismo, devido a resposta imunológica comprometida (LAPPIN, 2010).

Por tanto, não existe outra forma de minimizar a criptococose a não ser medidas educacionais para diminuir a incidência do fungo no ambiente, e inviabilizar meios que possam favorecer o crescimento do fungo. Profilaxia como a umidificação das fezes de pombos pode ser realizada, desta forma, não dispersa os esporos, diminuindo proliferação (BRASIL, 2010).

### **3.3 Terapêutica medicamentosa**

Apesar do paciente não desencadear sintomas, é necessário realização do diagnóstico laboratorial, pois não exclui uma possível infecção após exposição/contato com substratos compostos nitrogenados (ureia e creatina), abundantes em solo rico com excretas de pombos, que são substâncias que favorecem a multiplicação e sobrevivência do fungo, e necessitando, após a confirmação do exame, iniciar o tratamento para evitar complicações futuras (BRASIL, 2008; PASA, 2011; ALMEIDA; MACHADO, 2014).

O Ministério da Saúde afirma que a escolha da farmacoterapia depende da forma clínica, sendo assintomática, micose (cutânea), pneumonia (pulmão), meningite (SNC), descrita no quadro 1 (BRASIL, 2008).

No caso de pacientes assintomáticos, pode ser adotado um tratamento não farmacológico, necessitando somente do acompanhamento clínico e laboratorial, monitorando a possibilidade de disseminação para outros órgãos (BRASIL, 2008; SOUSA, 2013).

Quando se trata de infecção cutânea ou pulmonar, a terapêutica passa a ser medicamentosa: prescreve-se fluconazol e itraconazol. Para o Sistema Nervoso Central (SNC), administra-se a Anfotericina B (AFB) (SOUSA, 2013). Porém a terapêutica quando em associação da anfotericina com a 5-flucitocina (5-FC) apresenta melhor tratamento inicial, e depois pode ser alterado por fluconazol por pelo menos oito semanas ou até apresentar resultados negativos em culturas de líquido (BRASIL, 2008).



Já em caso da infecção do SNC co-infectado com o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) administra-se, além da anfotericina B em associação com a flucitosina, o coquetel de medicamentos antirretrovirais, no entanto, na terapia de manutenção com o fluconazol por tempo prolongado, pode causar resistência (BRASIL, 2008; SOUSA, 2013; ALMEIDA; MACHADO, 2014).

**Quadro 1:** Classe de medicamento utilizados na terapêutica antifúngica contra criptococose, de acordo com o estado imunológico.

ESTÁGIO DA DOENÇA	CO-INFECÇÃO	CLASSE DO ANTIFÚNGICO	DROGA	MODO DE AÇÃO	REFERÊNCIA
<b>Assintomático</b>	Não	Nenhuma	Tratamento não farmacológico	Acompanhamento clínico e laboratorial	BRASIL, 2008; SOUSA, 2013
<b>Cutâneas/ Pulmonares</b>	Não	Azólicos	Fluconazol Itraconazol	Inibição da 14 $\alpha$ -lanosterol-desmetilase	BRASIL, 2008; MURRAY; KEN; MICHAEL, 2011; ALMEIDA; MACHADO, 2014
<b>SNC</b>	Não	Polienos em associação com análogos de pirimidina	Anfotericina B em associação com 5-flucitosina	Ligação da AFB ao ergosterol, desestabilizando a membrana formando poros, 5-FC impede síntese de ácidos nucleicos	BRASIL, 2008; MURRAY; KEN; MICHAEL, 2011
<b>SNC</b>	HIV	Polienos em associação com análogos de pirimidina	Anfotericina B em associação com 5-flucitosina	Ligação da AFB ao ergosterol, desestabilizando a membrana formando poros, 5-FC impede síntese de ácidos nucleicos	BRASIL,, 2008; MURRAY; KEN; MICHAEL, 2011

O fluconazol e o itraconazol são indicados para tratar infecções superficiais e profundas, agem inibindo a enzima citocromo P450 14 $\alpha$ -lanosterol-desmetilase desencadeando inibição na síntese do ergosterol (SANGLARD, 2003).

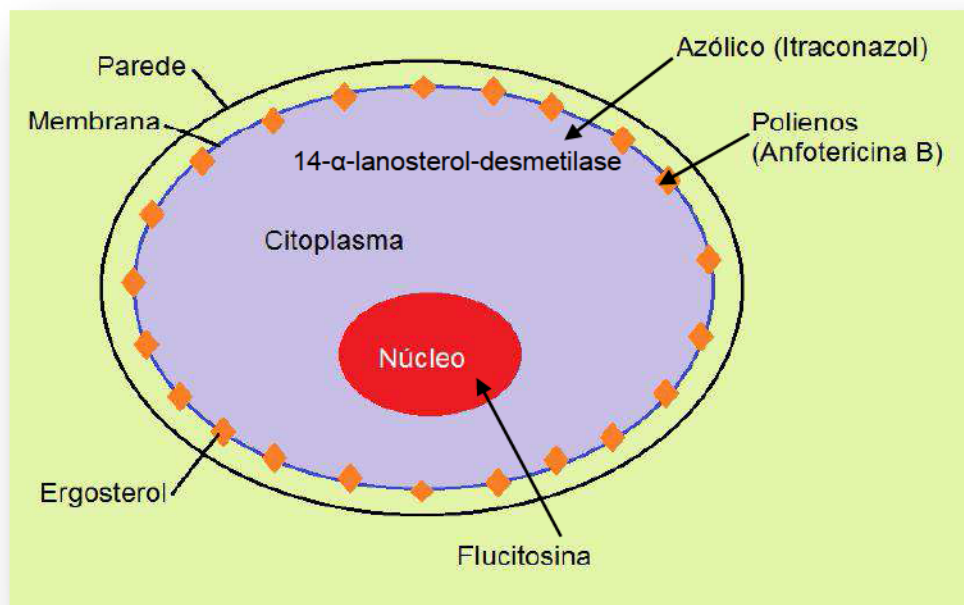
A anfotericina B, fármaco de escolha para o tratamento da criptococose, age nas células fúngicas formando complexos com o ergosterol e fosfolipídios da membrana, extravasando o conteúdo intracelular e outros componentes vitais para a célula, causando a apoptose (LINCOPAN et al., 2005).

A flucitosina atua inibindo a síntese de ácidos nucleicos, evitando a transcrição do RNA, impedindo a replicação do fungo (KARKOWSKA-KULETA et al., 2009).

A anfotericina B, quando em associação com a flucitosina, ao ligar-se no ergosterol do fungo, forma poros por onde a flucitosina passa na célula e liga-se ao núcleo. A vantagem da associação é que diminui as chances de resistência fúngica, diminuindo a dosagem e conseqüentemente, a toxicidade da anfotericina B, visto que em dosagens adequadas, mata as colônias de *C. neoformans*. Em contra partida, a terapêutica é de alto custo (SILVA, 2004; MORALES, 2009).

O alvo celular dos fármacos acima citados pode ser ilustrado pela figura 4.

**Figura 4:** Alvo celular dos fármacos utilizado para o tratamento da criptococose.



**Fonte:** AUTOR.

Infelizmente, devido à debilidade do paciente e a possível toxicidade desencadeada pelo uso simultâneo de várias drogas junto da Síndrome Inflamatória de Reconstituição Imune (SRI), o índice de óbitos tem sido elevado e frequente mundialmente (BRASIL, 2008; SOUSA, 2013).

Os efeitos colaterais desencadeados pelo uso dos antifúngicos fluconazol, itraconazol, anfotericina B e anfotericina B em associação com a flucitosina podem ser descritos no quadro 2.

**Quadro 2:** Efeitos colaterais desencadeado pelo uso de antifúngicos para tratar a criptococose.

<b>Droga</b>	Fluconazol	Itraconazol	Anfotericina B	Anfotericina B associado a flucitocina
<b>Dose</b>	200 a 400mg/ dia	200 a 400mg/dia	0,5 a 1mg/kg/dia	0,7 a 1 mg/kg/ dia + 100 mg/kg/ 6h
<b>Duração</b>	6 a 12 meses	6 a 12 meses	6 a 12 meses	2 semanas
<b>Via de administração</b>	Via Oral	Via Oral	Via Intravenosa	Via Intravenosa e via oral respectivamente
<b>Efeitos colaterais</b>	Anafilaxia; síndrome de Stevens-Johnson, necrólise epidérmica tóxica, hipersensibilidade; náusea, vômitos, dores abdominais, diarreia, dispepsia, distúrbios do paladar; Elevação transitória das enzimas hepáticas, necrólise hepática, disfunção hepática; hiperlipidemia, hiperglicemia, leucopenia, trombocitopenia, hipopotassemia, hipocortisolismo secundário, prurido, exantema, alopecia, erupção maculo-papular, angioedema, amenorreia.	Náusea, vômito, dor abdominal, diarreia, anorexia, dispepsia, obstipação, xerostomia, perda de apetite, aumento da sede; edema de membros inferiores, edema pulmonar; convulsões, cefaleia, tontura, cansaço, mudanças de humor, exantema, prurido, síndrome de Stevens-Johnson, alopecia, urticária, angioedema; diminuição da libido; distúrbios neutropênicos, diminuição do volume urinário; hipertensão; febre, hipertrigliceridemia, hepatotoxicidade; insuficiência cardíaca congestiva, hipopotassemia.	Anemia; hipopotassemia, cansaço, fraqueza, dor generalizada, parestesias, câibras; febre, cefaleia, mal-estar, vômitos, perda de apetite, diarreia, dor epigástrica, perda de peso, xerostomia, dispepsia, pele seca, gastroenterite hemorrágica, úlcera, arritmia, tromboflebite, cardiomiopatia, hipertensão; choque, edema pulmonar, dispneia, taquipneia, broncoespasmo, hipóxia. Anafilaxia, reações anafilactoides. Síndrome do homem vermelho, erupção cutânea, púrpura, prurido, sudorese, dermatite esfoliativa, eritema multiforme, alopecia.	Os mesmos da anfotericina B além de Insuficiência renal aguda, sedação e perda da distensão abdominal, audição, alucinação, confusão mental, cefaleia.
<b>Contra-indicação</b>	Hipersensibilidade ao fármaco ou a outro componente da fórmula; Porfirias agudas.	Hipersensibilidade; Uso concomitante com fármacos biotransformados pelo citocromo CYP3A4; Insuficiência cardíaca congestiva ou história desta doença; Mulheres grávidas ou que planejam engravidar.	Hipersensibilidade; Tratamento de dermatofitoses superficiais; Lactação; Infecções fúngicas não-invasivas em pacientes imunodeprimidos com contagem normal de neutrófilos.	Os mesmos da anfotericina B além de casos de gravidez, hipersensibilidade à flucitosina ou qualquer componente da fórmula.
<b>Referências</b>	BRASIL, 2008; BRASIL, 2014.	BRASIL, 2008; BRASIL, 2014.	BRASIL, 2008; BRASIL, 2014.	DERAY, 2002; BRASIL, 2008; BARBOSA-JUNIOR, 2010; BRASIL, 2014.

### 3.4 Plantas medicinais e Produtos naturais

O Brasil apresenta grande diversidade vegetal, correspondente a 20% do total da flora mundial catalogada pela Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura (UNESCO), sendo considerada a maior do mundo, e junto a isto, apresenta grande uso de plantas medicinais, associando o conhecimento tradicional à tecnologia, validando cientificamente suas finalidades terapêuticas, desenvolvendo um ramo da ciência denominada de Fitoterapia (LOPEZ, 2006).

Devido ser de fácil acesso, baixo custo, conhecimento tradicional, a fitoterapia tem uma abrangência mundial, correspondendo no Brasil a 7% do mercado farmacêutico nacional. Com isso, os produtos naturais são uma alternativa viável e eficaz na prevenção e combate de diversas patologias, devido a ações terapêuticas, como tem sido relatado na literatura (FERREIRA, 2006; NETO et al., 2014).

Em plantas aromáticas, há células especiais capazes de produzir os óleos essenciais, encontrados em partes de plantas como flores, folhas, raízes, caules e sementes, constituídos por substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas, caracterizadas por compostos orgânicos tais como hidrocarbonetos terpênicos, alcoóis simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas e cumarinas, e compostos com enxofre (MACHADO et al. 2013).

As ações terapêuticas das plantas que contém óleos essenciais, com finalidades medicinais ocorrem devido aos metabólitos secundários presentes, que são sintetizados através de reações catabólicas, anabólicas e da biotransformação dos aminoácidos, carboidratos e lipídios presentes em partes das plantas (ALVA; QUEZADA; RODRIGUEZ, 2014).

Pesquisadores relataram que plantas com ação antimicrobiana decorrem de sua composição com monoterpenos, sesquiterpenos, sendo realizados estudos nos fitoconstituintes isolados das partes das plantas como o eugenol, timol, carvacrol, citral (SOARES; TAVARES-DIAS, 2013).

Estudos realizados por Nóbrega et al., (2016), demonstram que o carvacrol frente à *Cryptococcus neoformans*, apresentou ação antifúngica, sendo assim de grande valia, estudos mais avançados para esta molécula, na intenção de novas alternativas para o tratamento.

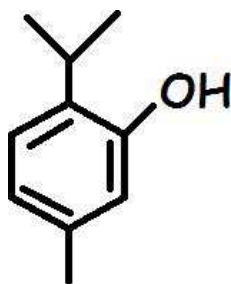
Com isto, estudos mostram que a partir dos óleos essenciais e de seus compostos isolados, tais como o carvacrol, citral, timol, entre outras moléculas, tem se apresentado como um promissor antimicrobiano *in vitro*, apesar de não apresentar o seu modo de ação bem definido (LOBO, 2009).

### 3.5 Fitoconstituente timol

O timol pode ser encontrado majoritariamente nas espécies *Lippia sidoides* Cham., *Satureja thymbra*, *Satureja montana*, *Satureja parvifoli*, *Origanum vulgare*, apresentando atividades bactericida e bacteriostática, fungicida e fungistática (MASTELIC et al, 2008; COSTA et al., 2011; GIWELI et al, 2012).

O monoterpeneo timol, 5-metil-2-(1-metiletil)-fenol (Figura 5), fórmula molecular C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>O e massa molar de 150,22 g/mol, pouco hidrossolúvel, pH neutro, apresenta-se na forma de cristais grandes translúcidos incolores ou brancos, com odor característico ao tomilho (*Thymus spp.*) (NOSTRO et al., 2004; BOTELHO et al., 2007).

**Figura 5:** Estrutura molecular do 5-metil-2-(1-metiletil)-fenol (timol).



Fonte: AUTOR.

Em estudos realizados por Coelho et al. (2013), o timol teve resultados satisfatórios, visto que a concentração inibitória mínima para *Salmonella* e Enteritidis foi de 0,39% e para *Staphylococcus aureus* foi de 0,78%, mostrando característica de bom conservantes e/ou sanificantes a serem empregados na área de alimentos.

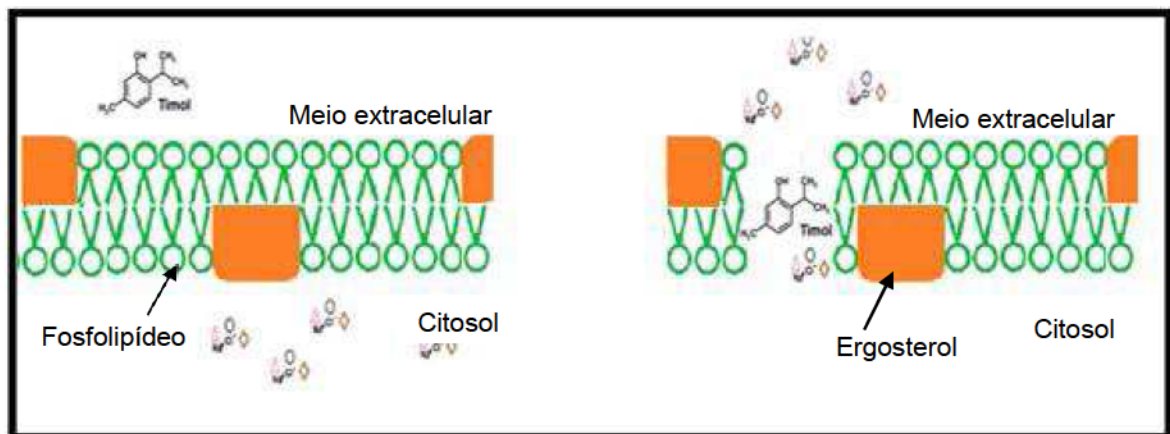
Há relatos na literatura de que o timol tem sido utilizado para tratar infecções epiteliais e por inalação, e quando associado a outras substâncias também voláteis, é utilizada para tratar infecções respiratórias (KORDALI et al., 2008).

Braga et al. (2008) realizou um estudo deste fitoconstituente frente a cepas de *Candida albicans*, e notou-se que a menor concentração de timol para inibir o crescimento foi de 125 µg/mL, em que ocorreu interação do fitoconstituente com os biofilmes presentes na constituição do microrganismo, causando alterações nas estruturas dos biofilmes do fungo.

A atividade antimicrobiana pode estar relacionada ao ataque aos fosfolipídios localizados na membrana do microrganismo (Figura 6), desencadeando um aumento na permeabilidade e perda citoplasmática, inibindo a biossíntese de ergosterol, ou até mesmo no contato com enzimas presentes na membrana celular dificultando a sobrevivência celular (EMIROGLU et al., 2010, RAO et al., 2010; AHMAD et al., 2011).

Tal modo de ação pode ser entendido devido as ligações do timol através de seu radical -OH com os grupos amina e hidroxilamina presente nas proteínas das membranas, alterando a permeabilidade e liberando o conteúdo celular (JUVEN et al., 1994; ALMEIDA, 2015).

**Figura 6:** Esquematização do possível modo de ação do timol, descrito por EMIROGLU et al., 2010. **A.** Chegada do timol a membrana celular do fungo. **B.** Ataque do timol aos fosfolipídeos presentes na membrana, extravasando o conteúdo citoplasmático.



Fonte: AUTOR.

O timol apresenta um amplo espectro de atividade biológica, além da atividade antimicrobiana e antiséptica, podendo ser utilizada para tratar diversas doenças, devido a ação antiinflamatórias, antioxidantes e cicatrizante, fato este que o fitoconstituente pode ser considerado uma molécula promissora (BOTELHO et al., 2007; SANCHEZ et al., 2009).

Por esta razão, já foram realizados estudos com micropartículas de timol dando ênfase à liberação de forma controlada, onde nos testes realizados, as micropartículas

não reticuladas apresentou uma liberação chegando a 90% no primeiro dia, enquanto que as micropartículas reticuladas reduzindo a liberação do timol, classificada como não-fickiana (mais lenta, super dispersiva) (MACIEL, 2014).

Por fim, a cerca do exposto, é propício à realização de pesquisas na busca de novas moléculas com ação antimicrobiana para tratar doenças fúngicas, pois, além da resistência, são inúmeros os efeitos adversos causados pelo uso prolongado dos antifúngicos existentes, na perspectiva de menores efeitos colaterais e maior eficácia (MARTINEZ-ROSSI et al., 2008; SPINELLO, 2013).

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 *Cryptococcus neoformans* e Meio de cultura

As cepas de leveduras de *Cryptococcus neoformans* (FCF-102, JM-10, FCF-119, ICB-2601, LM-22, LM-39, ICB-59, LM-120, LM-0310, LM-5) utilizadas foram cedidas pela Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Edeltrudes de Oliveira Lima (Laboratório de Microbiologia/DCF/UFPB) e estocadas em meio Ágar Saboraud Dextrose.

Na realização dos experimentos para análise da atividade antifúngica da substância, foram utilizados os meios de culturas caldo Saboraud e o Ágar Saboraud Dextrose (DIFICO® - Laboratories LTDA). O preparo destes meios seguiu as instruções do fabricante e foram distribuídos em tubos e placas de ensaio ideais para os estudos microbiológicos.

As cepas foram repicadas no meio de cultura ágar saboraud dextrose, incubadas em estufa bacteriológica durante 48 horas a 37°C.

### 4.2 Substância analisada

A substância timol foi obtida comercialmente da Sigma-Aldrich®. Para solubilizar este fitoconstituente em água, foi utilizado o Polissorbato 80 (Tween 80) 1% da Sigma-Aldrich® e Dimetilsulfóxido (DMSO) 1% da Sigma-Aldrich®.

### 4.3 Antifúngico-padrão

Para o controle padrão do teste da atividade antifúngica do timol, foi utilizada a anfotericina B (Sigma Aldrich®).

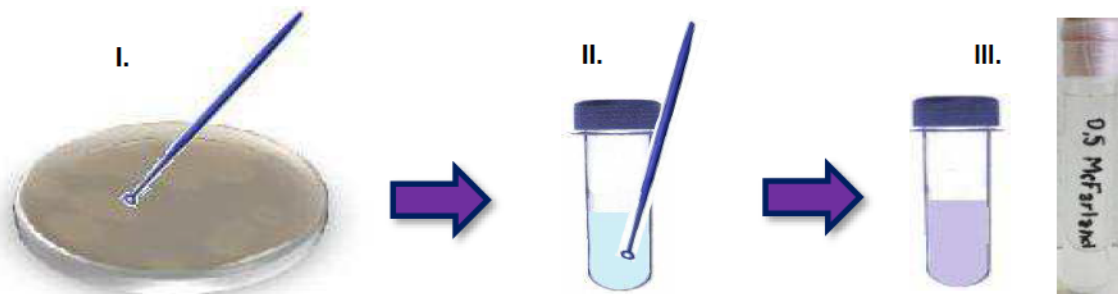
### 4.4 Inóculo

Para o preparo do inóculo, retirou-se uma alíquota da cepa de *Cryptococcus neoformans* previamente semeado em ASD e suspendeu-a em tubo com solução salina a 0,85% estéril.



O inóculo foi ajustado de acordo com a escala de 0,5 Mc Farland em suspensão do microrganismo em solução salina 0,85% estéril, correspondente a  $5 \times 10^6$  UFC/mL (Figura 7).

**Figura 7:** Esquemática do preparo do inóculo. Retirou-se uma alíquota da cepa de *Cryptococcus neoformans* em ASD (I), suspendeu-a em tubo com solução salina a 0,85% estéril (II) e comparou-se a turvação com o padrão de 0,5 Mc Farland ( $5 \times 10^6$  UFC/mL) (III).



Fonte: AUTOR.

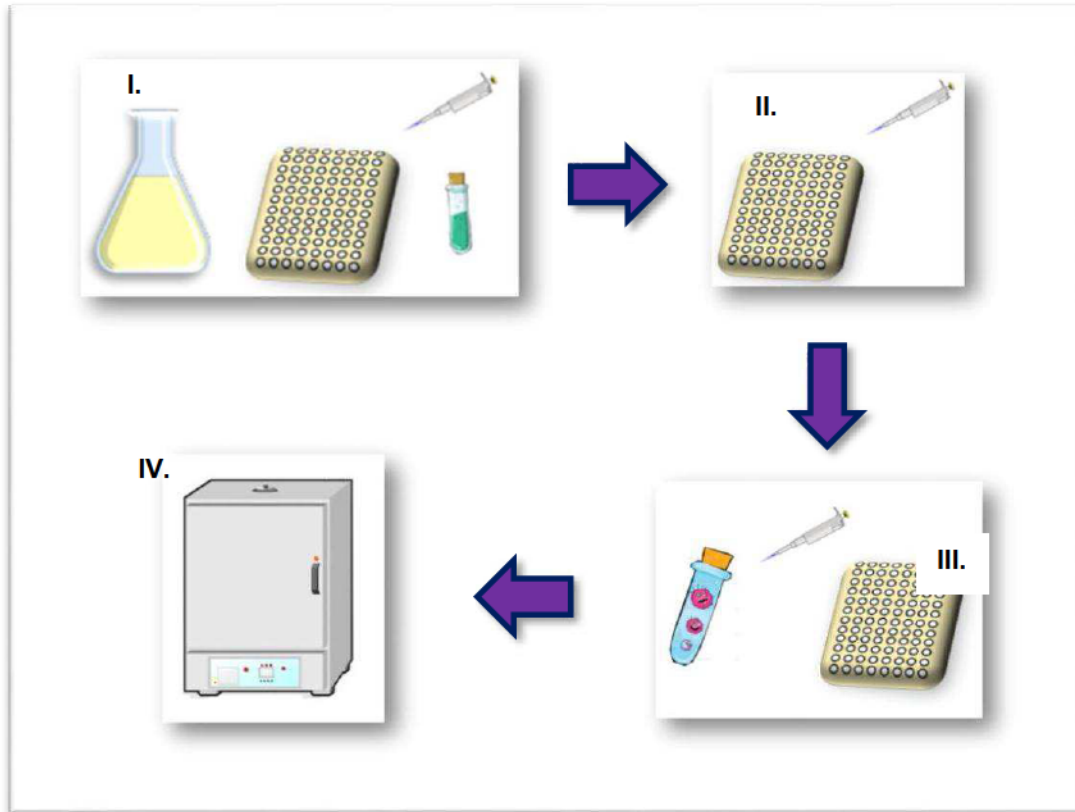
#### 4.5 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Fungicida Mínima (CFM)

Para a determinação da Concentração Inibitória mínima (CIM) do timol, foi realizada a técnica de acordo com as normas M27-A2 do CLSI, 2002; CLEELAND, SQUIRES, 1991; ELOFF, 1998, e pode ser ilustrada pela figura 8. Foram distribuídos 100  $\mu$ l do caldo Sabouraud Dextrose duplamente concentrado em placas de 96 orifícios e fundo em “U”. Em seguida, foi distribuída 100 $\mu$ l da solução timol duplamente concentrado (1024  $\mu$ g/mL) somente na primeira linha e foi realizado a diluição seriada a uma razão de 2 (Figura 9). As duas últimas linhas corresponderam ao controle para avaliar a viabilidade das cepas (meio de cultura caldo sabouraud dextrose mais inóculo sem a substância analisada) e a esterilidade do meio de cultura (caldo sabouraud sem a substância testada).

Com auxílio de uma pipeta de 10  $\mu$ l, foi adicionado o inóculo em cada uma das cavidades da placa. Foram feitos os controles com antifúngico padrão (anfotericina B) e de esterilidade. O ensaio foi realizado em triplicata e incubado a 37 °C por 48 h.

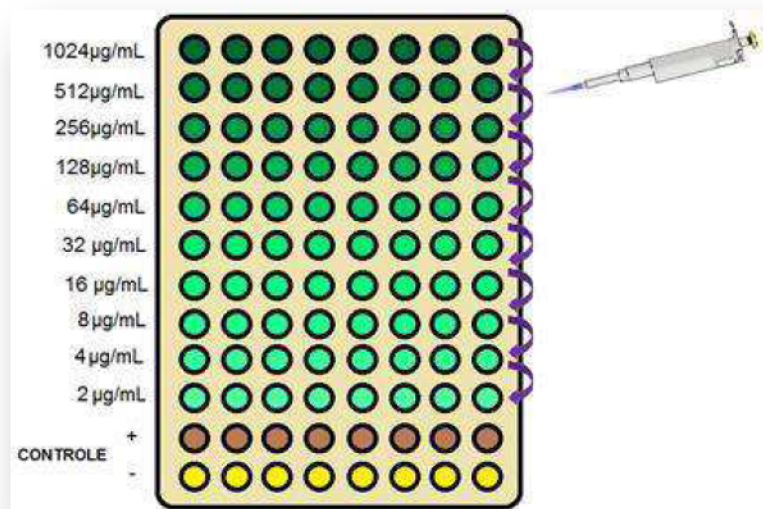
Após o período de incubação, procedeu-se a leitura da placa, visualmente, pela ausência ou presença de crescimento do microrganismo através da mudança do aspecto límpido para turvo, indicando crescimento do fungo.

**Figura 8:** Esquematização da metodologia descrita por M27-A2 do CLSI, 2002; CLEELAND, SQUIRES, 1991; ELOFF, 1998. I. Distribuição do Caldo Sabouraud duplamente concentrado nas cavidades da placa de microdiluição e adição do fitoconstituente na primeira linha da placa de cavidade em “U”. II. Microdiluição, de forma que a concentração de cada linha diminua a uma razão de 2. III. Adição do inóculo a cada poço da placa, exceto no controle negativo. IV. Armazenamento na estufa bacteriológica por 48 h a 37 °C.



Fonte: AUTOR.

**Figura 9:** Ilustração da técnica de microdiluição em placa de 96 cavidades em “U”. Após a microdiluição, a concentração inicial foi de 1024 $\mu$ L/mL. As duas últimas linhas ficaram para controle: “+” positivo (meio de cultura e o inóculo) e “-” negativo (apenas meio de cultura).

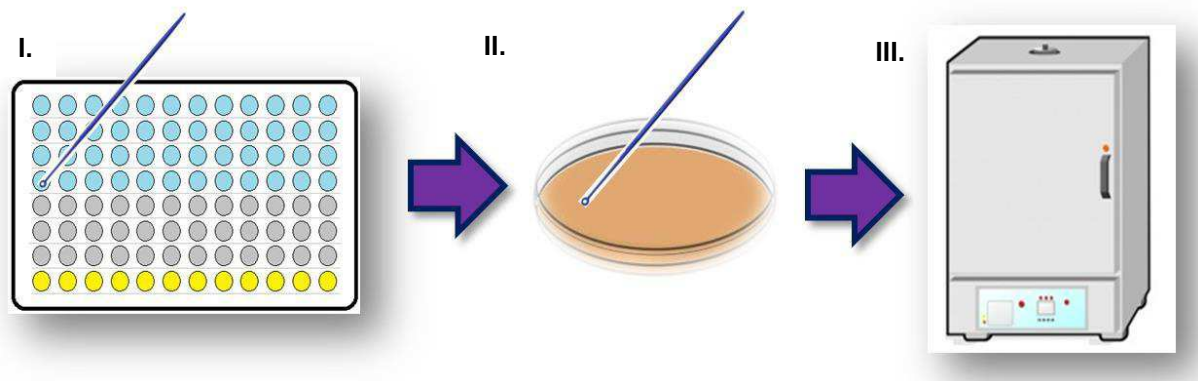


Fonte: AUTOR.

Com isso, foi determinada a CIM, a menor concentração da substância capaz de inibir o crescimento do fungo analisado, verificado por uma não mudança de aspecto límpido da cavidade da placa.

Para a determinação da CFM (Figura 10), foi retirado 10 µL da cavidade em que não houve crescimento fúngico (CIM, 2x CIM e 4x CIM) e este volume foi semeado nas placas com meio Ágar Sabouraud Dextrose (ASD). Após semear todas as Placas de Petri, foram armazenadas em uma estufa bacteriológica à 35°C por 48h. Depois do período de incubação, foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC), considerado CFM a mais baixa concentração suficiente para inibir o crescimento fúngico em até o número de três UFCs (KLEPSEK et al., 1998; ERNST et al., 1999; CANTÓN et al., 2003; COSTA et al., 2008).

**Figura 10:** Esquemática da técnica para determinar a CFM. Retirou-se 10µL das cavidades correspondente a CIM, 2xCIM e 4xCIM (I), e as semeou em placas de petri com meio ASD (II). Depois armazenou-se em estufa bacteriológica a 35°C por 48h (III) (KLEPSEK et al., 1998; ERNST et al., 1999; CANTÓN et al., 2003; COSTA et al., 2008).



Fonte: AUTOR.

#### 4.6 Ensaio com colesterol e ergosterol

A CIM do timol e da anfotericina B (controle) frente às cepas *C. neoformans* LM-39 e ICB-2601 foram determinadas pela técnica de microdiluição (CLSI M27-A2) na ausência e presença do ergosterol (ESCALANTE et al., 2008) e colesterol (LIMA et al., 2013) nas concentrações de 100, 200 e 400 µg/mL.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi realizada a análise da atividade do timol frente às cepas de *C. neoformans* pela técnica de microdiluição seriada em caldo, segundo as normas de M27-A2 do CLSI, 2002; CLEELAND, SQUIRES, 1991; ELOFF, 1998.

Importante mencionar a realização de testes da viabilidade do inóculo e esterilidade de meio de cultura durante todos os experimentos realizados, em que o inóculo estava viável e o meio de cultura estava estéril para a realização dos experimentos.

Na tabela 1 estão os resultados do experimento para determinação da Concentração inibitória mínima (CIM) do timol e do antifúngico padrão, a Anfotericina B frente ao *C. neoformans*, onde as CIM variaram de 20 a 51 µg/mL para o timol e de 0,5 a 1 µg/mL para a anfotericina B.

**TABELA 1.** Concentração mínima de Timol e de Anfotericina B necessária para inibir o crescimento das cepas de *Cryptococcus neoformans*.

CEPAS	CONTROLE (microrganismo)	TIMOL (µg/mL)	ANFOTERICINA B (µg/mL)
FCF 102	+	51	0,5
FCF 119	+	25	0,62
ICB 59	+	20	0,5
ICB 2601	+	32	0,62
JM 10	+	20	1
LM 5	+	20	0,62
LM 22	+	51	1
LM 39	+	32	0,79
LM 120	+	25	0,5
LM 310	+	20	0,5

+: Crescimento do fungo no controle

CIM foi determinada pelo do cálculo da média geométrica.

Belato (2014) utilizou a técnica de microdiluição em caldo para analisar o potencial antifúngico do timol diante de microrganismos como *C. albicans*, *S. aureus* e *S. mutans*. Após a exposição de 24 h, a CIM do timol para o fungo patogênico *C. albicans*, foi de 10 µg/mL, e para as bactérias patogênicas *S. aureus* e *S. mutans*, foi de 160 µg/mL, apresentando resultados satisfatórios. O timol demonstrou ser uma molécula promissora contra microrganismos, e apresentou melhor CIM contra fungos, apesar da CIM do timol diante de *C. neoformans* ter apresentado valor diferente.

Dantas (2013) analisou a ação inibitória do timol contra cepas de *Penicillium* pela técnica de microdiluição e obteve uma discreta superioridade de ação do fitoconstituente em relação à anfotericina B, visto que o valor da CIM foi o mesmo para as duas substâncias (128 µg/mL).

Após a determinação da CIM do timol, foi realizada a análise da concentração fungicida mínima (CFM). A CFM pode ser compreendida como o menor valor da concentração suficiente para reduzir 99,9% unidades formadoras de colônia (UFC) (ERNST et al., 1996; KLEPSEK et al., 1998; ERNST et al., 1999; CANTÓN et al., 2003; COSTA et al., 2008).

No estudo, foi utilizado o controle de cada cepa de *C. neoformans* no intuito de verificar a viabilidade das mesmas em meio sólido. A CFM para o timol variou entre 40 e 102 µg/mL, sendo estes valores correspondentes ao dobro de suas respectivas CIM, exceto para as cepas LM-120 e LM-310 que correspondeu ao quádruplo da CIM, conforme apresentado na tabela 2.

**TABELA 2.** Concentração Fungicida Mínima (CFM) de Timol necessária para eliminar até 99,9% UFC de *C. neoformans*.

CEPAS	CONTROLE (microrganismo)	TIMOL (µg/mL)
FCF 102	+	102
FCF 119	+	51
ICB 59	+	40
ICB 2601	+	64
JM 10	+	40
LM 5	+	40
LM 22	+	102
LM 39	+	64
LM 120	+	102
LM 310	+	80

+ : Crescimento fúngico do controle (inóculo e meio de cultura);  
A CFM foi determinada pelo do cálculo da média geométrica.

Quando comparando a CFM do timol com a do carvacrol frente às cepas de *C. neoformans* (NÓBREGA et al., 2016), a CFM variou entre 40 e 102 µg/mL para o timol e 25 a 101 µg/mL para o carvacrol, tais resultados similares possivelmente se deram devido a isomeria das duas moléculas quanto a posição do grupo hidroxila no anel fenólico.

Após determinado os valores da CIM e CFM, seguiu-se para a etapa de explorar o modo de ação do fitoconstituente timol, em que foram utilizadas as cepas LM-39 e ICB-2601 (cepas clínicas) de *C. neoformans* para verificar se há ligação do

timol com o ergosterol ou se há interação com o colesterol (sinal de possível toxicidade), de acordo com a metodologia de ESCALANTE et al., 2008 e LIMA et al., 2013, respectivamente.

Um dos constituintes da membrana celular fúngica, é o ergosterol, sendo o principal componente esteroide, que corresponde ao colesterol da membrana celular mamífera (TOFANI, 2014). Desta forma, se com a presença do ergosterol e colesterol, a CIM foi aumentada, indica que o timol pode estar interagindo, ou seja, possui afinidade aos esteróis.

Na Tabela 3 encontram-se os resultados da CIM do timol mediante a ausência e presença do ergosterol. Para as duas cepas de *C. neoformans* analisadas, LM-39 e ICB-2601, na ausência de ergosterol, a CIM foi de 32µg/mL. Na presença de ergosterol, a CIM manteve-se constante nas três concentrações de 100, 200 e 400 µg/mL, que foi de 64 µg/mL, em que percebeu uma discreta interação do timol com o ergosterol.

**TABELA 3.** Estudo do efeito do ergosterol na CIM do timol frente *C. neoformans* ICB-2601 e LM-39.

TIMOL (µg/mL)	<i>C. neoformans</i> ICB-2601				<i>C. neoformans</i> LM-39			
	Ausência de ergosterol	Ergosterol 100 µg/mL	Ergosterol 200 µg/mL	Ergosterol 400 µg/mL	Ausência de ergosterol	Ergosterol 100 µg/mL	Ergosterol 200 µg/mL	Ergosterol 400 µg/mL
1024	-	-	-	-	-	-	-	-
512	-	-	-	-	-	-	-	-
256	-	-	-	-	-	-	-	-
128	-	-	-	-	-	-	-	-
64	-	-	-	-	-	-	-	-
32	-	+	+	+	-	+	+	+
16	+	+	+	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	+	+
1	+	+	+	+	+	+	+	+
0,5	+	+	+	+	+	+	+	+

+ : Crescimento fúngico

- : Ausência de crescimento fúngico

A CFM foi determinada pelo do cálculo da média geométrica.

O possível mecanismo de ação do timol ocorre devido ao comprometimento da membrana plasmática, podendo dissipar as cadeias polipeptídicas prejudicando funcionalmente a membrana (NOSTRO et al., 2004; BARROSO, 2010). Como a CIM

do timol mediante presença de ergosterol aumentou para o dobro de seu valor, sugere que o referido terpeno pode estar interagindo com o ergosterol.

Corroborando com a interação do timol com o ergosterol, no estudo realizado com Mota et al., (2012) frente a cepas da espécie *Rhizopus oryzae*, o timol na presença do ergosterol (200 e 400 µg/mL) aumentou a CIM oito vezes, quando comparado na ausência do ergosterol.

Na Tabela 4, encontram-se os resultados da CIM do timol mediante a presença do colesterol e ausência do mesmo. A CIM manteve-se constante, 32 µg/mL, na ausência e nas variadas concentrações de 100, 200 e 400 µg/mL de colesterol das cepas LM-39 e ICB-2601. A adição do colesterol ao meio de cultura não interferiu na CIM do timol, indicando que provavelmente este fitoconstituente não interage com o colesterol indicando que a toxicidade do timol não é medida por este tipo de interação.

Entretanto, a atividade antifúngica desse composto pode estar associada com o aumento da permeabilidade da célula devido ao ataque aos fosfolipídios da membrana, causando lise celular (EMIROGLU et al. 2010).

**TABELA 4.** Estudo do efeito do colesterol na CIM do timol frente *C. neoformans* ICB-2601 e LM-39.

TIMOL (µg/mL)	<i>C. neoformans</i> ICB-2601				<i>C. neoformans</i> LM-39			
	Ausência de colesterol	Colesterol 100 µg/mL	Colesterol 200 µg/mL	Colesterol 400 µg/mL	Ausência de colesterol	Colesterol 100 µg/mL	Colesterol 200 µg/mL	Colesterol 400 µg/mL
1024	-	-	-	-	-	-	-	-
512	-	-	-	-	-	-	-	-
256	-	-	-	-	-	-	-	-
128	-	-	-	-	-	-	-	-
64	-	-	-	-	-	-	-	-
32	-	-	-	-	-	-	-	-
16	+	+	+	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	+	+
1	+	+	+	+	+	+	+	+
0,5	+	+	+	+	+	+	+	+

+ : Crescimento fúngico

- : Ausência de crescimento fúngico

A CFM foi determinada pelo do cálculo da média geométrica.

Em contra partida, Mota et al., (2012) verificou que a ação do timol contra espécies de *Rhizopus oryzae*, a CIM do timol quando exposto ao colesterol

quadruplicou o valor quando na ausência do colesterol, independente da concentração.

Acerca dos resultados obtidos, o timol provavelmente interage com o ergosterol, esterol específico de células fúngica, e não apresentou interação com o esterol de mamíferos - o colesterol exógeno - sendo necessários outros estudos para determinar a toxicidade do fitoconstituente diante das células humanas.

Por ter o mecanismo de ação definido, foi realizado o ensaio do ergosterol com o antifúngico anfotericina B, controle padrão. A CIM aumentou consideravelmente na presença de ergosterol (quatro vezes em relação à CIM quando comparado na ausência de ergosterol para a cepa LM-39 e oito vezes para a cepa ICB-2601, quando comparado com a CIM na ausência de ergosterol), conforme apresentado na tabela 5.

**TABELA 5.** Estudo do efeito do ergosterol na CIM da Anfotericina B frente *C. neoformans* ICB-2601 e LM-39.

AFB (µg/mL)	<i>C. neoformans</i> ICB-2601				<i>C. neoformans</i> LM-39			
	Ausência de ergosterol	Ergosterol 100 µg/mL	Ergosterol 200 µg/mL	Ergosterol 400 µg/mL	Ausência de ergosterol	Ergosterol 100 µg/mL	Ergosterol 200 µg/mL	Ergosterol 400 µg/mL
64	-	-	-	-	-	-	-	-
32	-	-	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	+	-	-	-	+
2	-	-	+	+	-	-	+	+
1	-	+	+	+	-	+	+	+
0,5	-	+	+	+	-	+	+	+
0,25	-	+	+	+	+	+	+	+
0,125	+	+	+	+	+	+	+	+

+ : Crescimento fúngico

- : Ausência de crescimento fúngico

A CFM foi determinada pelo do cálculo da média geométrica.

A anfotericina B age na célula devido à afinidade pelos esteróis possuindo afinidade pela membrana do fungo, interagindo com o ergosterol (ESPADA et al., 2008; WASAN et al., 2009), e colesterol, formando poros transmembranosos, extravasando o conteúdo intracelular necessário para a manutenção celular, causando a apoptose (CARRARO, 2013).



O efeito do colesterol na CIM da anfotericina B pode ser percebido ao ver que a CIM dobrou quando comparado com a CIM da anfotericina B na ausência de colesterol, para ambas as cepas, como pode ser visto na tabela 6.

**TABELA 6.** Estudo do efeito do colesterol na CIM da anfotericina B frente *C. neoformans* ICB-2601 e LM-39.

AFB ( $\mu\text{g/mL}$ )	<i>C. neoformans</i> ICB-2601				<i>C. neoformans</i> LM-39			
	Ausência de colesterol	Colesterol 100 $\mu\text{g/mL}$	Colesterol 200 $\mu\text{g/mL}$	Colesterol 400 $\mu\text{g/mL}$	Ausência de colesterol	Colesterol 100 $\mu\text{g/mL}$	Colesterol 200 $\mu\text{g/mL}$	Colesterol 400 $\mu\text{g/mL}$
1024	-	-	-	-	-	-	-	-
512	-	-	-	-	-	-	-	-
256	-	-	-	-	-	-	-	-
128	-	-	-	-	-	-	-	-
64	-	-	-	-	-	-	-	-
32	-	-	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-
1	-	-	-	-	-	-	-	-
0,5	-	-	-	-	-	+	+	+
0,25	-	+	+	+	+	+	+	+
0,125	+	+	+	+	+	+	+	+

+ : Crescimento fúngico

- : Ausência de crescimento fúngico

A CFM foi determinada pelo do cálculo da média geométrica.

Apesar do colesterol e ergosterol serem moléculas bastante parecidas - o ergosterol, possui um grupo metila adicional, uma dupla ligação na cadeia lateral e dupla ligação no núcleo esteroide - as moléculas de anfotericina B muito curtas (monomérica) possui pouca interação com o colesterol e forma canais, sendo assim, apresentam pouca toxicidade e um maior índice terapêutico, porém visando diminuir a toxicidade plasmática em pacientes que fazem uso prolongado de Anfotericina B, estudos mostram que a administração deste medicamento na formulação lipídica e lipossômica, minimiza a interação com o colesterol, podendo ser considerado de grande valia (BOLARD et al. 1991; RAMOS et al, 1996; HUANG et al., 2002; DENNING; HOPE, 2010; BARROS, 2013).

## 6. CONCLUSÃO

O fitoconstituente timol apresentou atividade antifúngica contra *Cryptococcus neoformans* nas condições avaliadas. O timol inibiu o crescimento do *C. neoformans* e parece estar envolvido com a complexação do ergosterol, sendo necessários novos estudos para aprofundar o potencial antifúngico desta molécula.

São necessários estudos exploratórios a respeito da toxicidade do timol diante das células humanas, apesar de que nas condições avaliadas não houve interação do timol com o colesterol exógeno no experimento *in vitro*.

## REFERÊNCIAS

AHMAD, A.; KHAN, A.; AKHTAR, F.; YOUSUF, S.; XESS, I.; KHAN, L. A.; MANZOOR, N. Fungicidal activity of thymol and carvacrol by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*. **Europea Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 30, p. 41-50, 2011.

ALMEIDA, R. L. G. MACHADO, E. R. *Cryptococcus spp.* em Pacientes com HIV/SIDA: Revisão da Literatura. **Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e Saúde**, v. 18, n. 1, p. 55-63, 2014.

ALMEIDA, R. R. **Mecanismos de ação dos monoterpenos aromáticos: timol e carvacrol**. 2015. 26f. Monografia (Bacharelado em Química). Universidade Federal de São João del-Rei, São João del-Rei, 2015.

ALVA, R. A.; QUEZADA, M. R.; RODRÍGUEZ, E. P. Metabolitos secundarios de mezcla de plantas medicinales con acción antibacterial sobre microorganismos causantes de infección puerperal en la provincia de Chachapoyas. **Pueblo Continente**, v. 25, n. 2, p. 61-69, 2014.

BARBOSA-JUNIOR, A., M. **Caracterização fenotípica e genotípica de isolados de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* de origem ambiental e clínica e epidemiologia da criptococose do estado de Sergipe, Brasil**. 2010. 140 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2010.

BARROS, A. F. A. **Desenvolvimento, caracterização e atividade antifúngica de microemulsões o/a contendo anfotericina B**. 2013. 49f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2013.

BARROSO, J. A. **Atividade do carvacrol e timol in vivo na inibição de *Streptococcus mutans* e experiência de cárie em crianças livres de cárie: um**

**estudo longitudinal.** 2010. 206f. Dissertação (Mestrado em Odontologia), Universidade Federal do Ceará: Fortaleza, 2010.

BELATO, K. K. **Análise *in vitro* da atividade antimicrobiana, citotoxicidade e genotoxicidade de um princípio ativo (timol) e de um enxaguatório bucal (Listerine® zero™).** 2014. 82f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia e Imunologia) - Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos, 2014.

BIVANCO, F. C. MACHADO, C. A.; MARTINS, E. L.. Criptococose cutânea. **Arquivos Médicos do ABC.** v.31, n.2, p.102-109, 2006.

BOLARD, J.; LEGRAND, P.; HEITZ, F.; CYBULSKALL, B. One-sided action of amphotericin B on cholesterol-containing membrane is determined by its selfassociation in the medium. **Biochemistry,** v. 30, p. 5707-5715, 1991.

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. *In vitro* and *In vivo* Cytotoxicities and Antileishmanial Activities of Thymol and Hemisynthetic Derivatives. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research,** v. 40, n. 3, p. 349-356, 2007.

BRAGA, P. C.; CULICI, M.; ALFERI, M.; DAL SASSO, M. Thymol inhibits *Candida albicans* biofilm formation and mature biofilm. **Interational Journal og Antimicrobial Agents,** v. 31, p. 472–477, 2008.

BRASIL. CONSENSO EM CRIPTOCOCOSE. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical,** v. 41, p. 524-544, 2008.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso. Brasília, **Ministério da Saúde,** 8ª edição, 2010.

BRASIL. Síndrome da Imunodeficiência Adquirida. **Tratamento das infecções oportunistas do HIV (IO)**. 2014. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/pcdt/16#criptococose> Acesso em: 11 de Fevereiro de 2017.

CANTÓN, E.; PEMÁN, J; VIUDES, A; QUINDÓS, G.; GOBERNADO, M.; ESPINELINGROFF, A. Minimum fungicidal concentrations of amphotericin B for bloodstream *Candida* species. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 45, n. 3, p. 203-206, 2003.

CARRARO, T. C. M. M. **Desenvolvimento, caracterização físico-química e biológica de nanopartículas poliméricas contendo anfotericina B**. 2013. 73 f. Dissertação (Mestrado em Fármacos, Medicamentos e Biociências), Universidade Estadual do Centro-Oeste: Guarapuava, 2013.

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, p.739-788, 1991.

CLSI. **Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica: Norma Aprovada – Segunda Edição**. M 27-A2, v. 22, n. 15, 2002.

COELHO, M. S.; DOMINGUES, M. S.; DIAS, N. A. A.; VALE, L. A.; PICOLLI, R. H. Efeito bacteriostático de citral, eugenol e timol sobre *Salmonella enteritidis* e *Staphylococcus aureus*. In: XXII CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFLA, 2013.

COGLIATI, M. Global Molecular Epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: An Atlas of the Molecular Types. **Scientifica**, Cairo, v. 2013, p.675213, 2013.

COSTA, E. V.; TEIXEIRA, S. D.; MARQUES, F. A.; DUARTE, M. C. T.; DELARMELINA, C.; PINHEIRO, M. L. B.; TRIGO, J. R.; MAIA, B. H. L. N. S. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of the Amazon Guatterriopsis species. **Phytochemistry**, v. 69, p. 1895-1899, 2008.

COSTA, J. P. R.; ALMEIDA, A. C.; MARTINS, E. R., RODRIGUES, M. N., SANTOS, C. A., MENEZES, I. R. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim-pimenta e do extrato bruto seco do barbatimão diante de bactérias isoladas do leite. **Revista Biotemas**, n. 24, n. 4, p. 1-6, 2011.

DANTAS, T. B. **Atividade antifúngica *in vitro* de timol sobre cepas do gênero *Penicillium***. 2013. 100f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2013.

DENNING, D. W.; HOPE, W. W. Therapy for fungal diseases: opportunities and priorities. **Trends in Microbiology**, v. 18, n. 5, p. 195-204, 2010.

DERAY, G. Amphotericin B nephrotoxicity. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 49, suppl. 1, p. 37-41, 2002.

DOERING, T. L. How sweet it is! Cell wall biogenesis and polysaccharide capsule formation in *Cryptococcus neoformans*. **Annual review of microbiology**, v. 63, p. 223, 2009.

EL-FANE, M.; BADAOU, L.; OULADLAHSEN, A.; SODQI, M.; MARIH, L.; CHALIB, A.; MORHOUM EL FILALI, K. Cryptococcosis during HIV infection. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 25, n. 4, p. 257-62, 2015.

ELOFF, J. N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Medica**, v. 64, n. 8, p. 711-713, 1998.

EMIROGLU, Z. K.; YEMIS, G. P.; COSKUN, B. K.; CANDOGAN, K. Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties. **Meat Science**, v. 86, n. 2, p. 283-288, 2010.

ERNST, E. J.; KLEPSEK, 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.

ERNST, M. E., KLEPSEK, M. E., WOLFE, E. J., PFALLER, M. A. Antifungal dynamics of LY 303366, an investigational echinocandin B analog against *Candida* spp. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 26, n. p. 125-131, 1996.

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.

ESPADA, R. et al. Effect of aggregation state on the toxicity of different amphotericin B preparations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 361, p. 64–69, 2008.

FERREIRA, M. G. R. Aspectos sociais da fitoterapia. Porto Velho, RO: **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA**, p. 17, 2006.

GILES, S. S.; DAGENAIS, T. R.; BOTTS, M. R.; KELLER, N. P., HULL, C. M. Elucidating the pathogenesis of spores from the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 77, p. 3491–3500, 2009.

GIWELI, A.; DZAMIC, A. M.; SOKOVIC, M.; RISTIC, M. S.; MARIN, P. D. Antimicrobial and Antioxidant Activities of Essential Oils of *Satureja thymbra* Growing Wild in Libya. **Molecules**, v.17, p. 4836-4850, 2012.

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 Ergosterol Containing Supported Phosphatidylcholine Bilayer Model Membranes Investigated by Electrochemistry and Spectroscopy. **Biophysical Journal**, v. 83, p. 3245–3255, 2002.

JUVEN, B. J.; KANNER, J.; SCHVED, F.; WEISSLOWICZ, H. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. **Journal of applied bacteriology**, v. 76, n. 6, p. 626-631, 1994.

KARKOWSKA-KULETA, J.; RAPALA-KOZIK, M.; E KOZIK, A. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. **Acta Biochimica Polonica**, v. 56, n. 2, p. 211, 2009.

KLEPSEK, M. E.; WOLFE, E. J.; PFALLER, M. A. Antifungal pharmacodynamic characteristics of fluconazole and amphotericin B against *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 41, p. 397-401, 1998.

KORDALI, S.; KOTAN, R.; MAVI, A.; ÇAKIR, A.; ALA, A.; YILDIRIM, A. Determination of the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Artemisia dracunculoides* and of the antifungal and antibacterial activities of Turkish *Artemisia absinthium*, *A. dracunculoides*, *Artemisia santonicum* and *Artemisia apicigera* essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 24, p. 9452-9458, 2008.

LAPPIN, M. R. Infecções micóticas Polissistêmicas. In: NELSON, R.W.; COUTO, C.G. Medicina Interna dos Pequenos Animais. 4ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. p. 1355-1357.

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, **Journal of Essential Oil Research**, v. 25, n. 2, p. 138-142, 2013.

LINCOPAN, N.; MAMIZUKA, E. M.; CARMONA-RIBEIRO, A. M. Low nephrotoxicity of an effective amphotericin B formulation with cationic bilayer fragments. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 55, n. 5, p. 727-734, 2005.

LOBO, P. L. D. **Avaliação *in vivo* do óleo essencial de *Lippia sidoides*, nas apresentações farmacêuticas: Bochecho, gel e dentifrício, na inibição *Streptococcus mutans* em crianças com cárie.** 2009. 111f. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.



LOPEZ, C. A. A. Considerações gerais sobre plantas medicinais. **Revista Ambiente: Gestão e Desenvolvimento**, v. 1, n. 1, p. 19-27, 2006.

LORTHOLARY, O.; IMPROVISI, L.; FITTING, C.; CAVAILLON, M.; DROMER, F. Influence of gender and age on course of infection and cytokine responses in mice with disseminated *Cryptococcus neoformans* infection. *Clinical Microbiology and Infection*, v.8, p. 31-37, 2002.

MACHADO, R. M. A.; MUSSI-DIAS, V.; SOUZA, C. L. M.; SILVA, L. B.; FREIRE, M. G. M. Avaliação de óleos essenciais sobre o crescimento *in vitro* do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. **Perspectivas online: Ciências biológicas e da saúde**, v. 8, n. 3, p. 64-75, 2013.

MACIEL, M. V. O. B. **Obtenção e caracterização de micropartículas de zeína carregadas com timol**. 2014. 86f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

MARTINEZ-ROSSI, N. M.; PERES, N. T.; ROSSI, A. Antifungal resistance mechanisms in dermatophytes. **Mycopathologia**, v. 166, n. 5-6, p. 369-383, Nov-Dez 2008.

MASTELIC J.; JERKOVIC, I; BLAZEVIC, I.; POLJAK-BLAZI, M.; BOROVIĆ, S.; IVANCIC-BACE, I.; SMRECKI, V.; ZARKOVI, N.; BRCIC-KOSTIC, K.; VIKIC-TOPIC, D.; MÜLLER, N. Comparative study on the antioxidant and biological activities of carvacrol, thymol and eugenol derivatives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 11, p. 3989-3996, 2008.

MEZZARI, A.; WLIEBBELLING, A. M. P.; FREITAS, G. S. O; MAY, G. G; ALBÉ, G. C.; FILIK, H. P.; PORTICH, J. P.; KISSMANN, N.; BEHAR, P.; VILELA, R. M. M. Criptococose em um Hospital Público de Porto Alegre: dados epidemiológicos. **Journal Infection Control**, v. 2, n. 3, p. 135-139, 2013.

MORALES, B. P. **Suscetibilidade *in vitro* de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* frente a drogas antifúngicas pela citometria de fluxo**. 2009.

49f. Dissertação (Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas) - Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Rio de Janeiro, 2009.

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.3, p.255-258, 2006.

MOTA, K. S. L; PEREIRA, F. O.; OLIVEIRA, W. A.; LIMA, I. O.; LIMA, E. O. Antifungal activity of *Thymus vulgaris* L. Essential oil and Its Constituent Phytochemicals against *Rhizopus oryzae*: Interaction with Ergosterol. **Molecules**, v. 17, n. 12, 2012.

MURRAY, P. R.; KEN, S. R.; MICHAEL, A. P. **Microbiologia Médica**. 6ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

NETO, F. R. G; ALMEIDA, G. S. S. A.; JESUS, N. G.; FONSECA, M. R. Estudo Etnobotânico de plantas medicinais utilizadas pela Comunidade do Sisal no município de Catu, Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 4, p.856-865, 2014.

NÓBREGA, R. O.; TEIXEIRA, A. P. C.; OLIVEIRA, W. A.; LIMA, E. O.; LIMA, I. O. Investigation of the antifungal activity of carvacrol against strains of *Cryptococcus neoformans*. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 11, p. 2591-2596, 2016.

NOSTRO, A.; BLANCO, A. R.; CANNATELLI, M. A.; ENEA, V.; FLAMINI, G.; MORELLI, I.; ROCCARO, A. S.; ALONZO, V. Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. **FEMS Microbiology Letters**, v.230 p.191195, 2004.

PASA, C. R. **Tipagem molecular e suscetibilidade antifúngica de *Cryptococcus* isolados de pacientes em Hospital Universitário com investigação domiciliar**. 2011. 125f. Dissertação (Mestrado em Saúde) - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2011.

PEMÁN, J.; SALAVERT, M. General epidemiology of invasive fungal disease. **Enfermedades infecciosas y microbiología clínica**, v. 30, n. 2, p. 90-98, 2012.

PETRAGLIA, F. **Relato de um caso de criptococose em gato**. 2008. 30 p. Relato de caso (Especialização *latu sensu* do curso de clínica médica e cirúrgica de pequenos animais) - Universidade Castelo Branco, Rio de Janeiro, 2008.

PFALLER, M.; DIEKEMA, D. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 1, p. 133-163, 2007.

QUEIROZ, J. P. A. F.; SOUSA, F. D. M.; LAGE, R. A.; IZABEL, M. A.; SANTOS, A. G. Criptococose - uma revisão bibliográfica. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.2, n.2, p.32-38, 2008.

RAMOS, H.; VALDIVIESO, E.; GAMARGO, M.; DAGGER, F.; COHEN, B.E. Amphotericin B kills unicellular *Leishmania* by forming aqueous pores permeable to small cations and anions. **The Journal Membrane Biology**, v. 152, p. 65-75, 1996.  
RAO, A.; ZHANG, Y.; MUEND, S.; RAO, R. Mechanism of antifungal activity of terpenoid phenols resembles calcium stress and inhibition of the TOR pathway. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 12, p. 5062-5069, 2010.

SANCHEZ, B.; GABRIEL, J.; MARTINEZ, M.; JAIRO, R.; STASHENKO, E. Actividad antimicobacteriana de terpenos/ Antimycobacterial activity of terpenes. **Revista de la Universidad Industrial de Santander**, v. 41, n. 3, p. 231-243, 2009.

SANGLARD, D.; ISCHER, F.; PARKINSON, T.; FALCONER, D.; BILLE, J. *Candida albicans* mutations in the ergosterol biosynthetic pathway and resistance to several antifungal agents. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 47, p. 2404–2412, 2003.

SILVA, M. A. P.; GAGLIANI, L. H. Diagnóstico e prevalência da meningite criptococócica em pacientes portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida-SIDA. **UNILUS Ensino e Pesquisa**, v.11, n.22, p.23-44, 2014.

SILVA, R. M. G. Meningite por *Cryptococcus neoformans* como causa de febre prolongada em pacientes com AIDS. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 50, n. 2, p. 109-26, 2004.

SOARES, B. V.; TAVARES-DIAS, M. Espécies de *Lippia* (Verbenaceae), seu potencial bioativo e importância na medicina veterinária e aquicultura. **Biota Amazônia**, v. 3, n. 1, p. 109-123, 2013.

SOUSA, R. P. M. ***Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*: Quimiotipagem e correlação com criptococose em hospitais públicos de João Pessoa/PB.** Monografia (Departamento de Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2013.

SPINELLO, A. New Insights into HIV/AIDS-Associated Cryptococcosis. **International Scholarly Research Notices AIDS**, v. 2013, p. 22, 2013.

STIE, J.; FOX, D. Blood-brain barrier invasion by *Cryptococcus neoformans* is enhanced by functional interactions with plasmin. **Microbiology**, v. 158, n. 1, p. 240-58, 2012.

STRADIOTO, E. A. P. **Criptococose felina Relato de caso e revisão bibliográfica.** 2010. 21p. Monografia (Especialização *latu sensu* do curso de clínica médica e cirúrgica de pequenos animais) - Universidade Castelo Branco, Campinas, 2010.

TOFANI, A. **Síndrome Fúngica: Entenda os principais fatores de risco, sinais e sintomas de predisposição.** 1ª edição. A. S. Sistemas, 2014.

TSENG, H. K.; LIU, C. P.; HO, M. W.; LU, P. L.; LO, H. J.; LIN, Y. H.; CHO, W. L.; CHEN, Y. C. Microbiological, epidemiological, and clinical characteristics and outcomes of patients with cryptococcosis in Taiwan, 1997-2010. **PLoS One**, v. 8, n. 4, e61921, 2013.

VILCHEZ, R. A.; FUNG, J.; KUSNE S. Criptococosis in organ transplant recipients: an overview. **American Journal of Transplantation**, v. 2, p. 575-580, 2002.

VOELZ, K. E.; MAY R. C. Cryptococcal interactions with the host immune system. **Eukaryotic cell**, v. 9, n. 6, p. 835-846, 2010.

WASAN, E. K.; BARTLETT, K. H.; GERSHKOVICH, P.; SILVAK, O.; BANNO, B.; WONG, Z.; GAGNON, J.; GATES, B.; LEON, C. G.; WASAN, K. M. Development and characterization of oral lipid-based Amphotericin B formulations with enhanced drug solubility, stability and antifungal activity in rats infected with *Aspergillus fumigatus* or *Candida albicans*. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 372, p. 76-84, 2009.

**ANEXOS**



## **ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO FITOCONSTITUINTE TIMOL FRENTE ÀS CEPAS DE *Cryptococcus neoformans***

**ANNA PAULA DE CASTRO TEIXEIRA<sup>1</sup>**; RAFAELA DE OLIVEIRA NÓBREGA<sup>1</sup>;  
EDELTRUDES DE OLIVEIRA LIMA<sup>2</sup>; IGARA OLIVEIRA LIMA<sup>1</sup>; WYLLY  
ARAÚJO OLIVEIRA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Campina Grande, Centro De Educação e Saúde,  
Unidade Acadêmica de Saúde

<sup>2</sup> Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências da Saúde,  
Departamento de Ciências Farmacêuticas

**Introdução:** A levedura *Cryptococcus neoformans* é um patógeno oportunista causador da criptococose e se encontra presente em excretas de aves, frutas e algumas espécies de plantas de eucalipto. Criptococose é uma doença que acomete o ser humano imunodeprimido e animais, por meio da inalação do basidiósporo. Nos seres humanos, pode causar infecção do trato pulmonar e do sistema nervoso central (meningite). Atualmente, a terapêutica medicamentosa das enfermidades causadas pelo *C. neoformans* é a associação da anfotericina B e flucitosina; fármacos considerados tóxicos para o organismo. Na perspectiva de se descobrir novas alternativas, moléculas de origem natural ou sintética são estudadas, como o timol, monoterpene encontrado em óleos essenciais de *Origanum vulgare* e *Lippia sidoides* Cham, que possui atividade antimicrobiana frente à diversos microrganismos. **Objetivos:** Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) do timol frente à cepas de *C. neoformans*. **Métodos:** A CIM foi avaliada através da técnica de microdiluição em placa de 96 orifícios de fundo "U", em que o timol foi diluído serialmente e em seguida foi adicionado o inoculo. As placas foram incubadas a 37°C por 48h, e após este período foi realizada a leitura. **Resultados:** A CIM variou entre 20 µg/mL e 51 µg/mL, demonstrando que o timol inibe o crescimento fúngico. **Conclusões:** Diante do presente estudo, pode-se concluir que o timol apresenta atividade antifúngica.

**Palavras-chave:** Timol, *Cryptococcus neoformans*, criptococose



**X SIMPÓSIO  
BRASILEIRO DE  
FARMACOGNOSIA**  
V SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS  
DO VALE DO SÃO FRANCISCO

# CERTIFICADO

**Certificamos que**

O trabalho intitulado  
ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO FITOCONSTITUINTE TIMOL FRENTE ÀS CEPAS DE *Cryptococcus*  
neoformans

de autoria de  
ANNA PAULA DE CASTRO TEIXEIRA; RAFAELA DE OLIVEIRA NÓBREGA; EDELTRUDES DE  
OLIVEIRA LIMA; IGARA OLIVEIRA LIMA; WYLLY ARAÚJO OLIVEIRA

foi apresentado no X Simpósio Brasileiro de Farmacognosia e V Simpósio Plantas Medicinais do Vale do São  
Francisco realizado no Complexo Multieventos da UNIVASF, Juazeiro-BA, no período de 16 a 19 de setembro  
de 2015.

**Petrolina, 19 de setembro de 2015.**

*Jackson Roberto Guedes da S. Almeida*  
Prof. Dr. Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida  
Presidente do Simpósio

*Laila S. Espindola*  
Prof. Dra. Laila Salmen Espindola  
Presidente da Sociedade Brasileira de Farmacognosia

REALIZAÇÃO

UNIVASF 10 Anos PqANSA

APOIO

FACEPE

BRUKER SINC