



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

RAQUELINE MAIARA COSTA BEZERRA CAVALCANTI

**ESTUDO DO EFEITO DO CARVACROL CONTRA *Rhizopus oryzae* e
*Rhizopus microsporus***

Cuité-PB

2017

RAQUELINE MAIARA COSTA BEZERRA CAVALCANTI

**ESTUDO DO EFEITO DO CARVACROL CONTRA *Rhizopus oryzae* e
*Rhizopus microsporus***

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Farmácia da Universidade Federal de Campina Grande, como pré-requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

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

Cuité-PB

2017

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

C376e Cavalcanti, Raqueline Maiara Costa Bezerra.

Estudo do efeito do carvacrol contra *Rhizopus orizae* e *Rhizopus microsporus*. / Raqueline Maiara Costa Bezerra Cavalcanti. - Cuité: CES, 2017.

47 fl.

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

Orientadora: Igara Oliveira Lima.

1. Carvacrol. 2. Rhizopus. 3. Mucormicose. I. Título.

Biblioteca do CES - UFCG

CDU 582.28

RAQUELINE MAIARA COSTA BEZERRA CAVALCANTI

**ESTUDO DO EFEITO DO CARVACROL CONTRA *Rhizopus oryzae* e *Rhizopus
microsporus***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à coordenação do Curso de Bacharelado em Farmácia do Centro de Educação e Saúde da Universidade Federal de Campina Grande, como pré-requisito obrigatório para obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

APROVADO EM: 14 / 02 / 2017

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Igara Oliveira Lima

(Orientadora/UAS/CES/UFCG)

Prof^ª. Dr^ª. Júlia Beatriz Pereira de Souza

(Examinadora /UAS/CES/UFCG)

Prof. Dr. Fillipe de Oliveira Pereira

(Examinador /UAS/CES/UFCG)

Cuité-PB

2017

*Dedico este trabalho a minha mãe, que mesmo
distante esteve comigo e me ensinou que o estudo
é o melhor caminho para quem quer vencer
(Rosileide)*

AGRADECIMENTOS

Sou grata a Deus pela força interior que foi fundamental para continuar a jornada sem que o desânimo e as dificuldades me fizessem desistir.

A minha mãe, Rosileide, que sempre batalhou e não mediu esforços para me ver chegar cada dia mais distante, que com sua forma ímpar de amar me fez mais forte, e meu pai Fernando, que me apoiou e acreditou no meu sonho.

A minha família que mesmo distante se fez presente e com muito amor me incentivou a continuar, em especial minha tia Sandra que se tornou minha segunda mãe, amiga e confidente, minhas irmãs, Rafaella, que sempre esteve ao meu lado me levantando e mostrando com seu amor incondicional que com fé conseguimos atingir nossos objetivos, e Ramila que me presenteou nesses últimos anos meus sobrinhos, Yasmim e Francisco, que me renovam a cada sorriso.

A minha orientadora, Igara Oliveira Lima, pela orientação, confiança, paciência, compreensão, ensinamentos e conselhos, que tanto me ajudou no crescimento pessoal e profissional, um exemplo de professora e orientadora.

As minhas amigas e irmãs que Deus colocou no meu caminho, Ana Clara, Amanda, Glaucianne, Isabele, Jade e Nayana. Pessoas maravilhosas que me apresentaram outro lado da vida, amo todas!

Ao meu namorado, Diego, que sempre com muita paciência me ajudou a crescer e trouxe paz na correria de cada semestre.

Aos meus amigos de turma que inúmeras vezes me fizeram sorrir e compartilharam do mesmo sonho.

Aos colegas do grupo de pesquisa, que sempre me ajudaram de forma direta e indireta.

A professora Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima, que doou os micro-organismos, imprescindíveis para realização desse trabalho.

*“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades,
lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram
conquistadas do que parecia impossível.”*

(Charles Chaplin)

RESUMO

CAVALCANTI, R. M. C. B. **ESTUDO DO EFEITO DO CARVACROL CONTRA *Rhizopus oryzae* e *Rhizopus microsporus***. 2017. 47 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Universidade Federal de Campina Grande, Cuité, 2017.

Rhizopus constitui um gênero causador de uma infecção fúngica rara e que possui alto índice de mortalidade denominada mucormicose, sendo um agravante o pequeno arsenal terapêutico eficaz para esse tipo de enfermidade. É nesse contexto que os produtos naturais, como os óleos essenciais e terpenos, vêm se destacando como uma possível abordagem terapêutica. O carvacrol é um monoterpeneo que possui estudos biológicos, como ação antibacteriana e antifúngica. Desta forma, essa pesquisa teve como objetivo investigar a ação do carvacrol frente a espécies de *Rhizopus* bem como o modo de ação deste fitoconstituente. Para realizar este estudo, foi utilizada a metodologia da microdiluição, no intuito de se determinar a concentração inibitória mínima (CIM). Para avaliar a concentração fungicida mínima (CFM), foi utilizada uma alíquota de 10 μ L de cada cavidade onde não houver crescimento fúngico, a partir da CIM, foi semeada em uma placa de Petri com ágar sabouraud dextrose (ASD). Na perspectiva de estudar o modo de ação, foi realizado o teste de complexação com ergosterol. A CIM do carvacrol e anfotericina B foi de 64 μ g/mL e 2 μ g/mL, respectivamente, para todas as cepas. A CFM do terpeno foi de 128 μ g/mL. A CIM na ausência do ergosterol exógeno foi de 64 μ g/mL, e na presença variou de 512 - 1024 μ g/mL. Portanto, o carvacrol apresentou atividade antimicrobiana contra espécies de *Rhizopus*, a interação com o ergosterol presente nas membranas dos fungos é o possível mecanismo de ação do carvacrol.

Palavras-chave: Carvacrol, *Rhizopus*, mucormicose

ABSTRACT

CAVALCANTI, R. M. C. B. **STUDY OF THE EFFECT OF CARVACROL AGAINST *Rhizopus oryzae* and *Rhizopus microsporus***. 2017. 47 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Universidade Federal de Campina Grande, Cuité, 2017.

Rhizopus is a genre that causes a rare fungal infection called mucormycosis it has a high mortality rate which makes the small therapeutic arsenal for this type of illness an aggravating. It is in this context that natural products such as essential oils and terpenes, they have come to stand out as a therapeutic approach. Carvacrol is a monoterpene that has biological studies, such as antibacterial and antifungal action. In this way, this research has as the objective to investigate the action of carvacrol against *Rhizopus* species as well as the mode of action of this fitoconstituente. To perform this study, the microdilution methodology was used in order to determine the minimum inhibitory concentration (MIC). To evaluate the minimum fungicidal concentration (MFC), an aliquot of 10 μ L of each well where there was no fungal growth from the MIC was cultured into a Petri dish with sabouraud dextrose agar ASD. In the perspective of studying the mode of action, the ergosterol complexation test was performed. The MIC of carvacrol and amphotericin B were 64 μ g/mL e 2 μ g/mL, respectively, for all strains. The MFC of terpene was 128 μ g/mL. The MIC in the absence of exogenous ergosterol was 64 μ g / mL, and in the presence ranged from 512 - 1024 μ g / mL. Therefore, carvacrol presented antimicrobial activity against *Rhizopus* species, the interaction with ergosterol present in fungi membranes is the possible mechanism of action of carvacrol.

Keywords: Carvacrol, *Rhizopus*, mucormycosis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Características macromorfológicas da <i>Rhizopus</i> spp. em Ágar Sabouraud Dextrose	18
Figura 2 Representação esquemática evidenciando características micromorfológica <i>Rhizopus</i> spp	18
Figura 3: Manifestações clínicas da mucormicoses mais frequentes. A) Rinocerebral, B) gastrointestinal, C) cutâneo	20
Figura 4 Alvos atuais da terapia para mucormicose	23
Figura 5 Fotos de <i>Origanum vulgare</i> L. A) detalhe das flores e B) planta inteira	25
Figura 6 Estrutura do fitoconstituente carvacrol	26
Figura 7: Determinação da CIM do carvacrol.....	28
Figura 8: Determinação da CFM do carvacrol.....	29
Figura 9: Efeito do carvacrol e anfotericina B contra <i>R. orizae</i> URL-4857 na ausência e na presença de esterol	30

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Agentes etiológicos das zigomicoses em humanos	19
Quadro 2: Apresentação clínica e fatores predisponentes	21

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do fitoconstituente carvacrol e do antifúngico anfotericina B	32
Tabela 2: Determinação da concentração fungicida mínima (CFM) do fitoconstituente carvacrol	34
Tabela 3: Efeito do carvacrol e anfotericina B contra <i>R. orizae</i> URL-4857 na ausência e na presença de ergosterol.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Humana
ASD	Ágar Sabouraud Dextrose
CSD	Caldo Sabouraud Dextrose
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
HIV	Human immunodeficiency virus
LM	Laboratório de Micologia
UFC	Unidade formadora de colônias
TWEEN 80	Polioxeliteno Sorbitano Monoleato
DMSO	Dimetilsulfóxido
NaCl	Cloreto de sódio
UFC/mL	Unidade formadora de colônia por mililitro
mg	Miligrama
Kg	Quilograma
mL	Mililitro
µg	Micrograma
µL	Microlitro
%	Percentual
µg/mL	Micrograma por mililitro
°C	Grau Celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo geral	16
2.2 Objetivos específicos.....	16
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
3.1 <i>Rhizopus</i>	17
3.1.1 Características Macroscópicas.....	17
3.1.2 Características Microscópicas.....	18
3.2 Zigomicoses	19
3.3 Tratamento	22
3.4 Plantas medicinais como alternativa terapêutica	24
4 METODOLOGIA	27
4.1 Local de Trabalho	27
4.2 Espécies fúngicas e fitoconstituintes	27
4.3 Meio de Cultura	27
4.4 Inóculo	27
4.5 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	28
4.6 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM).....	29
4.7 Interação com ergosterol exógeno	29
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
6 CONCLUSÕES	37
REFERÊNCIAS	38

1 INTRODUÇÃO

As infecções fúngicas, principalmente causadas por micro-organismo oportunista, vem adquirindo importância clínica cada vez maior. Os fungos vêm sendo reconhecidos como importantes patógenos em pacientes criticamente enfermos, ocorrendo predominantemente em pacientes que utilizam agentes antineoplásicos e imunossupressores, antibióticos de largo espectro, dispositivos protéticos e enxertos, e cirurgia mais agressiva. Outros grupos frequentemente afetados por infecções fúngicas, envolvem pacientes com neutropenia, infecção pelo HIV e pancreatite (KAUFFMAN, 2006; HARTMANN et al., 2016). A prevalência de infecções oportunistas causadas em ambiente hospitalar está relacionada com fungos pertencentes aos gêneros *Candida*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Fusarium*, e *Cryptococcus*. Embora aspergilose e candidíase estejam entre as micoses invasivas mais comuns em tais pacientes, há evidências de que a incidência de doenças infecciosas causadas por Zigomicetos tem aumentado significativamente ao longo da última década (ENOCH et al., 2006; CHAYAKULKEEREE et al., 2006).

A maioria das zicomicoes são causadas pelos fungos de ordem Mucorales, na qual encontram-se as espécies de *Rhizopus*, cuja infecção é denominada mucormicose. Cada vez mais membros dessa ordem têm sido capazes de causar infecções oportunistas progressivas, necróticas e geralmente fatais (TORRES-NARBONA et al., 2007; SCORZONI, 2016).

Rhizopus compõe um gênero causador de uma infecção fúngica rara mas que possui alto índice de morbimortalidade, tal gênero inclui espécies como *R. oryzae*, *R. stolonifer*, *R. microsporus*, *R. azygosporus*, *R. shipperae*, sendo as três primeiras mais frequentes em doenças humanas (CORDEIRO et al, 2004). Aproximadamente 60% de todas as manifestações da doença e 90% de todos os casos são rinocerebrais causada por *Rhizopus oryzae*. A rápida taxa de crescimento e a natureza angioinvasiva da doença leva a uma mortalidade global de 50% (SHIRAZI; KONTOYIANNIS, 2013).

Apesar das atuais opções de tratamento, que muitas vezes incluem cirurgia extensiva e terapia antifúngica, a mortalidade global por mucormicose permanece acima de 40%, e se aproxima de 100% em pacientes com doença disseminada hematologicamente, neutropenia e envolvimento cerebral. O tratamento medicamentoso mais eficaz está relacionado com o uso de anfotericina B ou posaconazol (RABIE; ALTHAQAFI, 2012; GEBREMARIAM et al., 2016).

Muitas pesquisas tem focado a investigação de produtos naturais como fonte de novos compostos bioativos, uma vez que tem sido relatada resistência à antimicrobianos durante o

tratamento das doenças infecciosas. Desta forma, vários estudos vêm descrevendo atividade antimicrobiana dos produtos naturais, bem como a capacidade desses agentes em modular a ação dos antimicrobianos, aumentando ou diminuindo seus efeitos (COUTINHO et al., 2008).

O carvacrol é um monoterpeneo que possui estudos biológicos contra diferentes microrganismos, Camele et al., 2012 demonstraram a ação antifúngica contra cepas de *Botrytis cinerea*, *Penicillium italicum*, *P. expansum*, *Phytophthora citrophthora* e *Rhizopus stolonifer*, além de ação antifúngica, tem sido registrada ação antibacteriana do carvacrol contra 13 sorotipos de *Escherichia coli* (DUARTE et al., 2007).

A mucormicose, apesar de ser uma infecção rara, possui alto índice de mortalidade e a terapêutica medicamentosa nem sempre permite a cura do paciente, além de possuir toxicidade. Tendo em vista este panorama, o estudo da atividade antifúngica do carvacrol frente as espécies de *Rhizopus* se torna promissor, uma vez que há poucos relatos na literatura.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar o efeito do carvacrol contra as cepas de *Rhizopus oryzae* e *Rhizopus microsporus*.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) do carvacrol;
- Analisar possível ação do carvacrol a partir da interação com ergosterol exógeno.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 *Rhizopus*

O gênero *Rhizopus* foi descrito pela primeira vez em 1821 pelo Ehrenberg e pertence à ordem Mucorales e filo Zygomycota, trata-se um fungo ubíquo na natureza, termotolerante, que pode ser encontrado em decomposição de material orgânico e solo, e um número de espécies no gênero são usados na indústria para fermentação de alimentos, produção de enzimas hidrolíticas e fabricação dos produtos de fermentação ácido láctico e ácido fumárico (EHRENBERG, 1821; MA, 2009; TSARKUNOU et al., 2014).

Rhizopus spp. é considerado cosmopolita, sendo *Rhizopus oryzae* a mais comum das espécies, observadas e identificados na Índia, no Paquistão, na Nova Guiné, em Taiwan, e na América do Sul. Os esporangiósporos de *Rhizopus* são frequentemente isolados de amostra de ar, no ambiente doméstico, tapetes, cortinas de pano, travesseiros e moveis de madeira que proporcione acúmulo de poeira. As principais formas de contaminação é por via aérea (inalação), ingestão e exposição cutânea (CHAYAKULKEEREE et al., 2006; RIBES et al., 2000).

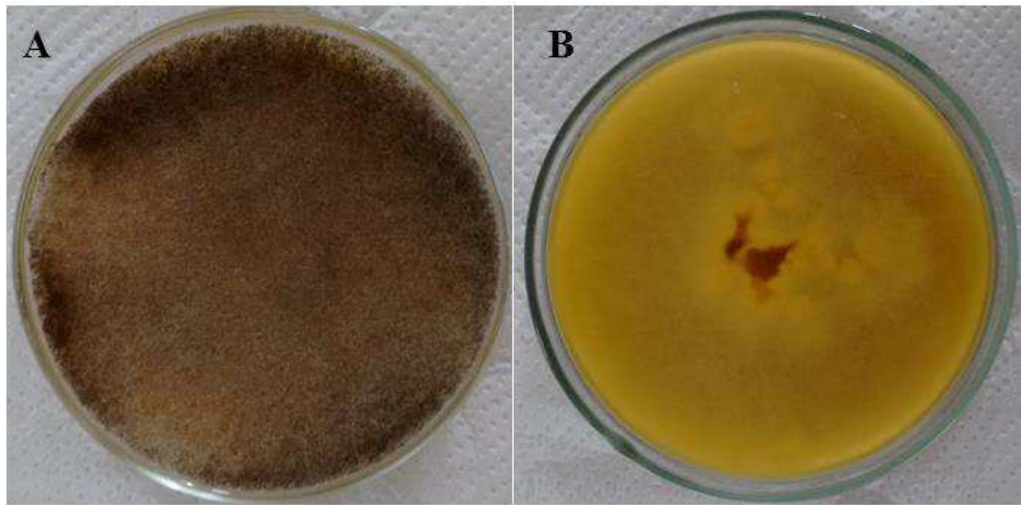
A espécie *Rhizopus oryzae* é responsável por uma grande proporção de casos da ordem Mucorales, entretanto, outros organismos associados com infecção humana são do gênero *Mucor*, *Rhizomucor*, *Absidia*, *Apophysomyces*, *Saksenaia*, *Cunninghamella*, *Cokeromyces* e *Syncephalastrum* (RABIE; ALTHAQAFI, 2012; RIBES et al., 2000).

3.1.1 Características Macroscópicas

Rhizopus spp. são fungos que crescem rapidamente, em torno de 4 dias a temperatura de 35°C. Sua colônia é caracterizada por ser alta e fibrosa, com textura algodosa, primeiramente branca e com o crescimento tornam-se acinzentadas ou amarronzadas, com abundantes esporângios pigmentados, que são vistos como áreas escuras salpicando o micélio da outra forma pálida, que rapidamente cresce e encobre toda superfície (Figura 1) (LARONE, 1995; RIBES et al., 2000).

Figura 1: Características macromorfológicas da *Rhizopus* spp. em Ágar Sabouraud Dextrose.

A) Micélio aéreo e B) micélio vegetativo.

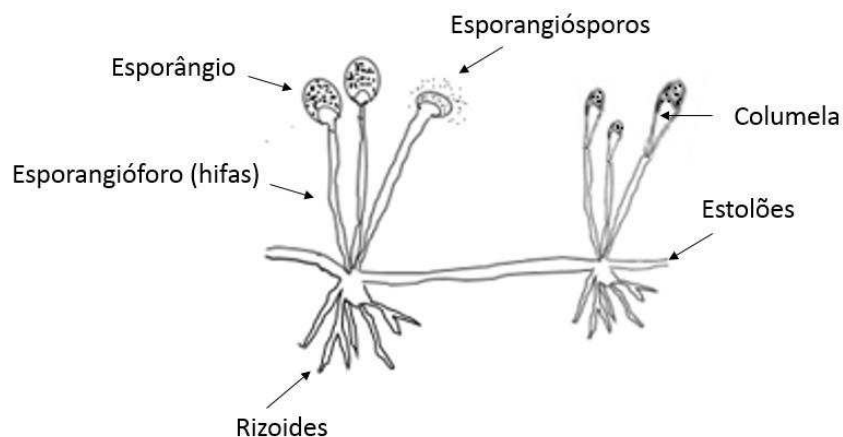


Fonte: Raqueline Maiara Costa Bezerra Cavalcanti, 2016.

3.1.2 Características Microscópicas

As espécies de fungos pertencentes esta linhagem são caracterizadas por hifas largas e asseptadas. Numerosos estolões são encontrados no micélio, conectando grupos de longos esporangióforos que não são ramificados, em sua extremidade são encontrados os esporângios que armazena os esporangiósporos ovais, incolores ou amarronzados (Figura 2). No ponto de encontro entre esporangióforos e estolões encontra-se o rizoide, estrutura semelhante à raiz de planta, responsável pela captação de nutrientes do meio e fixação do fungo (RIBES et al., 2000; MA et al., 2009).

Figura 2: Representação esquemática evidenciando características micromorfológica *Rhizopus* spp.



Fonte: Raqueline Maiara Costa Bezerra Cavalcanti, 2016.

3.2 Zigomicose

Zigomicose é um termo utilizado para uma variedade de infecções fúngicas raras e de grande intensidade causadas por membros da classe Zygomycetes (Quadro 1). Existem duas formas clínicas da doença: entomoftromicose apresenta-se usualmente como uma infecção subcutânea, ocorrendo em zonas de clima tropical, causada por espécies da ordem Entomophthorales; e a mucormicose, em que os agentes etiológicos pertencem à ordem Mucorales, raramente gera doença em pacientes imunocompetentes, visto que indivíduos saudáveis, a imunidade inata pode impedir a germinação dos esporos fúngicos e conseqüentemente o desenvolvimento da doença, porém Rabie e Althaqafi (2012) relataram um caso de infecção cutânea por *Rhizopus microsporus* em paciente do sexo masculino imunocompetente. (CORDEIRO et al., 2004; CUNHA et al, 2011; ISGRÒ et al., 2016).

Quadro 1: Agentes etiológicos das zigomicoses em humanos.

ORDEM		
	Mucorales	Entomophthorales
ESPÉCIES	<p><i>Rhizopus</i></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <i>R. arrhizus</i> (<i>R. oryzae</i>) 2. <i>R. rhizopodiformis</i> 3. <i>R. azygosporus</i> 4. <i>R. stolonifer</i> 5. <i>R. schipperae</i> 6. <i>R. microsporus</i> var. <i>microsporus</i> var. <i>rhizopodiformis</i> var. <i>oligosporus</i> 	<p><i>Basidiobolus</i></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <i>B. ranarum</i>, (<i>B. haptosporus</i>)
ESPÉCIES	<p><i>Mucor</i></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <i>M. racemosus</i>, 2. <i>M. circinelloides</i> 3. <i>M. ramosissimu</i> 4. <i>M. indicus</i> 5. <i>M. hiemalis</i> 	<p><i>Canidiobolus</i></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <i>C. coronatus</i> (<i>Entomophthora coronata</i>) 2. <i>C. incongruus</i>
ESPÉCIES	<p><i>Absidia</i></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <i>A. corymbifera</i> 	
ESPÉCIES	<p><i>Saksenaea</i></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <i>S. vasiformis</i> 	
ESPÉCIES	<p><i>Rhizomucor</i></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <i>R. pusillus</i> 	
ESPÉCIES	<p><i>Apophysomyces</i></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <i>A. elegans</i> 	
ESPÉCIES	<p><i>Cunninghamella</i></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <i>C. bertholletiae</i> 	

Fonte: Adaptado de Kwon-Chung (2012).

Os diversos agentes de mucormicose são fungos ubíquos encontrados no meio ambiente, principalmente em reservatórios associada a decomposição da matéria em todo o mundo (GARDINER et al., 2015) Esse tipo de infecção é usualmente associado a doenças hematológicas, cetoacidose diabética e transplante de órgãos, acometendo várias formas, entre as quais, rinocerebral-orbital, cutânea, gastrointestinal, (Figura3), cardíaca, pulmonar ou disseminada (Quadro 2). A forma mais frequente de infecção é rinocerebral, que ocorre através da inalação dos propágulos infecciosos (esporangiósporos), atingindo a mucosa nasal e seios paranasais e pode se espalhar para a órbita através do etmóide, seios maxilares ou canais lacrimais, chegar ao cérebro através dos vasos orbitais (ROMANO et al., 2002; SEVERO et al., 2010; CUNHA et al., 2011; RABIE; ALTHAQAFI, 2012; TSYRKUNOU et al., 2014).

Figura 3: Manifestações clínicas das mucormicoses mais frequentes. A) Rinocerebral, B) gastrointestinal, C) cutânea.



Fonte: A) Marques et al., 2010, B) Mohta et al., 2011, C) Petrikkos et al., 2012.

Quadro 2: Apresentação clínica e fatores predisponentes.

APRESENTAÇÃO CLÍNICA	FATORES PREDISPOONENTES
Rinocerebral	Cetoacidose diabética
Pulmonar	Granulocitopenia, linfoma, leucemia, corticoterapia, diabetes
Gastrointestinal	Desnutrição grave
Cutânea	Queimaduras graves, traumas cutâneos
Disseminada	Uso de deferoxamina, doenças hematológicas, diabetes, transplante de órgãos

Fonte: Adaptado de Spellberg et al., 2005.

Outras formas de contaminação menos comuns incluem o trato intestinal através da ingestão dos esporos ou alimentos contaminados, assim como inoculação por incisões ou ferimentos penetrantes na pele (ROGERS, 2008). Raramente há o desenvolvimento da mucormicose em outros estados de imunossupressão como na AIDS ou em pacientes imunocompetentes (HABER et al., 2008).

Ao contrário da ordem Mucorales, espécies da ordem Entomophthorales não causam infecções angioinvasiva, produzem infecção crônica designada entomoftromicose subcutânea que acomete pacientes imunocompetentes, ocorrendo predominantemente em climas tropicais e subtropicais.

A patogênese de Zigomicetos é menos clara do que para a aspergilose e é largamente baseada em estudos de modelos animais, porém sabe-se que a característica patognomônica é a presença de micélio septadas invasivo, que são maiores do que outros fungos filamentosos com as hifas exibindo ângulo reto e ramificação aleatória (ROGERS, 2008; ISLAM et al., 2007).

Técnicas radiológicas são ineficazes no diagnóstico de mucormicose, a utilização de tomografia computadorizada de alta resolução e principalmente ressonância magnética são mais utilizadas no diagnósticos de zigomicose rinocerebral, pulmonar e disseminada. O diagnóstico laboratorial é realizado a partir da correlação entre os exames micológicos, exames histopatológicos e manifestações clínica. Exames diretos podem ser realizados através da curetagem ou em aspirado do material do nariz na doença rinocerebral; podem ser encontrados no escarro, no aspirado brônquico e na biópsia transbrônquica na doença pulmonar (TORRES-NARBONA et al., 2007; SEVERO 2010).

3.3 Tratamento

O tratamento de sucesso para zigomicose envolve uma abordagem combinada. O diagnóstico precoce, reversão dos fatores subjacentes; desbridamento cirúrgico adequado do tecido infectado; o pronto início do uso de antifúngicos são fundamentais para o sucesso terapêutico (ROGERS, 2008; SEVERO, 2010).

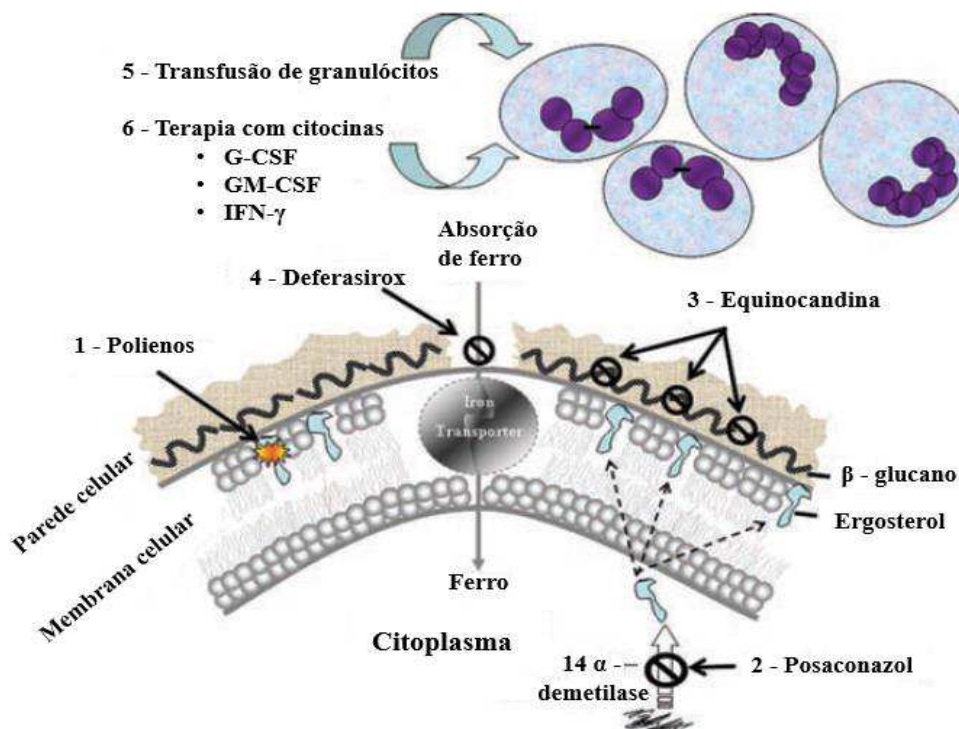
O diagnóstico precoce é de extrema importância, porque, lesões focais podem ser retiradas cirurgicamente antes da disseminar e afetar órgãos vitais, uma vez que os fungos responsáveis por essa infecção possuem crescimento rápido, bem como corrigir ou controlar os fatores reversíveis predisponentes, obtendo um melhor resultado, como é o caso de pacientes diabéticos com cetoacidose, hiperglicemia e acidemia, além de considerar a interrupção da terapia imunossupressora ou deferoxamina, especialmente esteroides, quando se tem confirmação de caso de mucormicose (SPELLPERG et al., 2005; ROGERS, 2008).

Desbridamento cirúrgico deve ser sempre considerado como prioridade no início da contaminação, visto que a mucormicose é uma infecção que possui progressão rápida e o tratamento com antifúngico isolado, muitas vezes, é insuficiente para controlar a infecção, sendo esse procedimento a intervenção que melhora a sobrevivência do paciente entre as evidências discutidas acima (RIBES et al., 2000; SPELLPERG et al., 2005; ROGERS, 2008).

Um grande desafio para os clínicos escolherem entre as antifúngicos disponíveis no tratamento da mucormicose é a falta de estudos prospectivos randomizados para definir a terapia antifúngica ideal. O arsenal de antifúngicos é outro empecilho, por ser limitado e a similaridade entre as células fúngicas e mamíferas é a principal razão elevada toxicidade frequentemente associada à terapia antifúngica (SCORZONI, 2016).

Até recentemente, apenas os membros da classe polienos, incluindo anfotericina B e seus derivados lipídicos, tinha demonstrado atividade contra os agentes de mucormicose, atualmente existe no mercado farmacêutico. Além dos 1-polienos, três fármacos para o tratamento da mucormicose, 2-posaconazol, 3-equinocandinas e 4-deferasirox (quelantes de ferro) (SPELLPERG *et al.*, 2005). A utilização de tratamentos adjuvantes como a 5-transfusão de granulócitos e 6-terapia com citocinas (Figura 4) podem reforçar a imunidade do hospedeiro, embora dados que suportem seu uso de rotina ainda sejam limitados (CHAYAKULKEEREE et al., 2006).

Figura 4: Possibilidades terapêuticas atuais da terapia para mucormicose.



Fonte: Adaptado de Spellberg *et al*, 2009.

Terapia antifúngica primária para mucormicose deve ser baseada em um polieno na maioria dos casos, a menos que os pacientes recusem a terapêutica com polieno ou, em caso de infecção mais leve em hospedeiros relativamente imunocompetentes que possa se submeter à cirurgia para remoção do ferimento, como é o caso de uma infecção suprafacial cutânea isolada (SPELLBERG *et al.*, 2009).

O tratamento de escolha é o uso de anfotericina B, principalmente as formulações lipídicas, já que a anfotericina B possui inúmeros efeitos tóxicos, especialmente nefrotoxicidade, náuseas, vômitos, hipertensão hipotensão e hipóxia. A dose recomendada de anfotericina B (desoxicolato) é de 1 a 1,5 mg / kg / dia, o que resulta numa taxa de toxicidade muito elevada, portanto a utilização de anfotericina B lipossomal está sendo mais prescrita para casos de mucormicose, uma vez que é menos nefrotóxica (ROGERS, 2008; CHAYAKULKEEREE *et al.*, 2009; SEVERO, 2010).

Os antifúngicos azólicos possui atividade limitada no tratamento da mucormicose, a exemplo do fluconazol e o voriconazol que não têm atividade contra os agentes de mucormicose, e a atividade de itraconazol está principalmente restrita a espécies de *Absidia*, ao contrário do posaconazol, que tem aumentado a atividade *in vitro* contra Mucorales, com

concentrações inibitórias mínimas de 90% de 1 a ≥ 4 mg / mL (SPELLPERG et al., 2009; SHIRAZI, KONTOYIANNIS, 2013).

As equinocandinas possui o mecanismo de ação na síntese do 1,3- β -D-glucano, principal componente da parede celular dos fungos. Estudos comprovaram que *R. oryzae* expressa a enzima alvo das equinocandinas, mas o tratamento com caspofungina, o primeiro membro da classe de equinocandina, não mostra resultado significativo, porém verificou-se que a combinação de caspofungina (1 mg / kg / dia) mais complexo lipídico anfotericina B (5 mg / kg / dia) foi sinérgica, podendo melhorar a sobrevida do paciente (ENOCH et al., 2006; SPELLPERG et al., 2009).

O ferro é exigido por praticamente todos os patógenos microbianos para o crescimento e virulência e sequestro de ferro sérico é um importante mecanismo de defesa contra a infecção por *R. oryzae*, uma que ele fortemente dependente do ferro livre para o crescimento patogênico, portanto agentes quelantes de ferro, deferasirox, mostram-se eficaz no tratamento da mucormicose (MA et al., 2008; LEWIS et al., 2012).

Nesta perspectiva, a terapêutica com antifúngicos tem sido motivos de preocupações, cada vez mais a comunidade entra em contato com espécies fúngicas resistentes, principalmente decorrente do uso indiscriminado de medicamentos ou até mesmo ausência de informações de uso dos mesmo. É nesse contexto que produtos naturais têm demonstrado grande eficiência nas infecções, a exemplo dos óleos essenciais e dos terpenos. Estes têm apresentado diversas atividades biológicas, dentre elas ações antimicrobianas. O carvacrol e o timol, fitoconstituintes majoritários de alguns óleos essenciais de plantas aromáticas (ex.: orégano), são monoterpenos e isômeros e tem sido bastante estudados por alguns autores como moléculas promissoras para o tratamento de infecções (BAKKALI et al., 2008; FERNEBRO, 2011; ÖZKAN; ERDOGAN, 2011; VERAS et al., 2013).

3.4 Plantas medicinais como alternativa terapêutica

A utilização de plantas com fins medicinais, para tratamento, cura e prevenção de doenças, é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade. No Brasil, muitas plantas são utilizadas na forma de extrato bruto, infusões ou pastas para tratar infecções comuns sem qualquer evidência científica de eficácia. Ainda hoje nas regiões mais pobres do país e até mesmo nas grandes cidades brasileiras, plantas medicinais são

comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais residenciais (MACIEL et al., 2002; HOLETZ et al., 2002; VEIGA JUNIOR; PINTO, 2005).

Dentre as plantas empregadas para fins medicinais, as plantas aromáticas constituem um grupo relevante, principalmente pelos óleos essenciais encontrados nas folhas, cascas de troncos, resinas, flores, cascas de frutas e outras partes. Os óleos essenciais são relacionados a diversas funções necessárias a sobrevivência da planta, eles apresentam composição complexa, sendo os terpenos considerados a classe de substâncias mais encontrada, com diferentes graus de lipofilicidade e relativa hidroflicidade (NUNES et al., 2006; ZAGO et al., 2009). Tais compostos são amplamente utilizados para aplicações bactericidas, virucidas, fungicidas, antiparasitárias, inseticidas, medicinais e cosméticas, especialmente nos dias de hoje nas indústrias farmacêutica, sanitária, cosmética, agrícola e alimentar (EDRIS, 2007; BUSATTA et al., 2007).

Levando em consideração a importância das plantas medicinais, passou-se a investigar as propriedades farmacológicas de *Origanum vulgare* L. (Figura 5), conhecido popularmente por orégano, espécie pertencente à família Lamiaceae, utilizada como condimento e medicinalmente, sendo-lhe atribuídas diversas indicações, tais como antibacteriano, antifúngico, antiinflamatório, antioxidante, anticancerígeno, emoliente e digestivo. Todas essas características são atribuídas ao carvacrol, fitoconstituente majoritário do orégano, mas também naturalmente disponível em tomilho, cravo e canela. (LAMBERT et al., 2001; MANOHAR et al., 2001; ZANANDREA et al., 2004; BAYDAR et al., 2004; YANISHLIEVA et al., 2006).

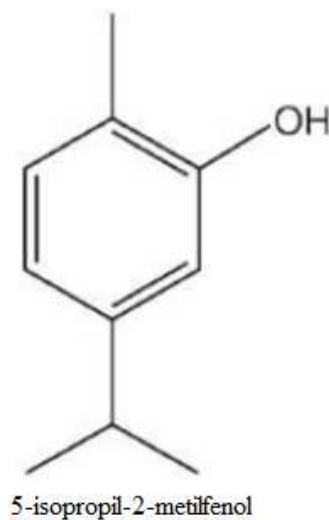
Figura 5: Fotos de *Origanum vulgare* L. A) detalhe das flores e B) planta inteira.



Fonte: Herbário virtual da flora e dos fungos.

O carvacrol, 5-isopropil-2-metilfenol, (Figura 6) é um monoterpreno fenólico. O efeito inibitório de fenóis poderia ser explicado por alterar a permeabilidade celular, inserindo-se entre as cadeias de ácido graxos que compõem a bicamada lipídica das membranas, causando alterações nas propriedades e funções da membrana (SÁNCHEZ et al., 2004; et al., 2007). Foi relatado que o carvacrol induz a alteração da permeabilidade nas membranas dos microorganismos, com consequente vazamento de prótons, fosfatos e potássio (LAMBERT et al., 2001; BOTRE *et al.*, et al., 2010).

Figura 6: Estrutura do fitoconstituente carvacrol.



Fonte: BOTRE et al., 2010

Os óleos essenciais e fitoconstituintes têm demonstrado grande eficiência nas infecções microbianas, sendo estabelecido cientificamente que cerca de 60% dos óleos essenciais possuem propriedades antifúngicas e 35% exibem propriedades antibacterianas (BHAVANANI; BALLOW, 1992; FERNEBRO, 2011). São bastante estudadas as atividades terapêuticas destes produtos contra *Candida* spp., *Cladosporium* spp., *Aspergillus* spp., *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*, *Penicillium* spp., *Alternaria alternata* (LIMA et al., 2006; COUTINHO et al., 2008; AMBER et al., 2010; SANTOS et al., 2012; VERAS et al., 2013). São escassos os estudos com óleo essencial ou seus componentes sobre atividade antifúngica contra espécies de *Rhizopus*, fungo de grande relevância, uma vez que é o principal causador de mucormicose, infecção rara, porém extremamente agressiva, fator precursor para a realização desta proposta de estudo.

4 METODOLOGIA

4.1 Local de Trabalho

O trabalho foi desenvolvido no laboratório de Microbiologia no Centro de Educação e Saúde / Universidade Federal de Campina Grande.

4.2 Espécies fúngicas e fitoconstituintes

Para a realização do trabalho, foram utilizadas duas cepas de *Rhizopus oryzae* (URL-4857 e LM-64) e uma cepa de *Rhizopus microsporus* (LM-5926), que foram doadas pela Profa Dra Edeltrudes de Oliveira Lima (Laboratório de Micologia Clínica/Departamento de Ciências Farmacêuticas/Universidade Federal da Paraíba).

O fitoconstituente testado foi o carvacrol (Sigma Aldrich). Foi utilizado 20 µL do Tween 80 para auxiliar na solubilização do monoterpene. Todas as substâncias relatadas foram adquiridas comercialmente e se encontram no local de pesquisa.

4.3 Meio de cultura

O meio de cultura sólido Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) e o meio líquido o caldo Sabouraud Dextrose (CSD) foram utilizados e preparados de acordo com as instruções do fabricante.

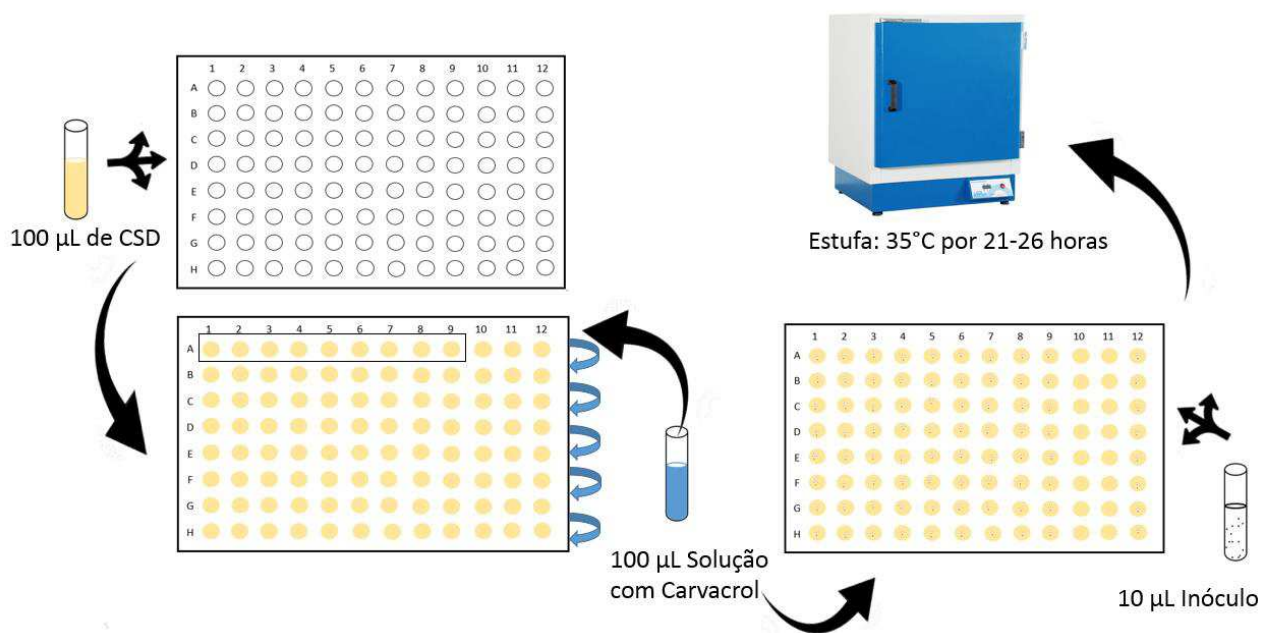
4.4 Inóculo

Os fungos foram cultivados em meio ASD inclinado por um período de 5 a 7 dias a 35°C, para atingirem um bom crescimento e formarem um maior número de esporangiósporos. Depois do período de incubação, os esporos foram suspensos pela adição de NaCl 0,85% estéril ao meio com *Rhizopus* spp, em seguida o meio de cultura com o micro-organismo mais a solução salina foram suavemente agitados por 30 segundos. Os esporangiósporos foram contados utilizando-se hemocitometro. A suspensão de esporangiósporos foi ajustada utilizando salina estéril para conter $2,5 \times 10^4$ esporangiósporos/mL (CLEELAND et al., 1991; CLSI M27-A2, 2002; DANNAOUI et al., 2003).

4.5 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A determinação da CIM do fitoconstituente carvacrol foi realizada pelo método da microdiluição utilizando microplacas com 96 cavidades. Em cada orifício da placa foi adicionado 100 μL de CSD duplamente concentrado. Em seguida 100 μL da solução com fitoconstituente, também duplamente concentrado, apenas nas primeiras cavidades da placa. Por meio de diluição seriada a uma razão de dois, foram obtidos concentrações de 1024 $\mu\text{g/mL}$ a 8 $\mu\text{g/mL}$. Posteriormente foi adicionado 10 μL do inóculo das espécies fúngicas, de aproximadamente $2,5 \times 10^4$ esporangiosporos/mL do micro-organismo, em cada cavidade. Por fim, as placas foram seladas e incubadas a 35°C , após um período de 24 horas de incubação as placas foram examinadas antes de se determinar os resultados de CIM. A CIM foi determinada como a menor concentração do carvacrol capaz de inibir visivelmente o crescimento do microrganismo. Três controles foram realizados; 1- negativo, sem adição das drogas, para confirmar a viabilidade dos esporangiósoros, 2- positivo, sem adição do micro-organismo, para confirmar a esterilidade do meio e 3 – na presença do micro-organismo e emulsificante, para comprovar que este não interage com o fungo desempenhado atividade antifúngica. Os experimentos foram realizados em triplicata independentes em diferentes ocasiões com resultados consistentes (CLEELAND; SQUIRES, 1991; ELOFF, 1998; CLSI M38-A, 2002; DANNAOUI et al., 2003).

Figura 7: Determinação da CIM do carvacrol.

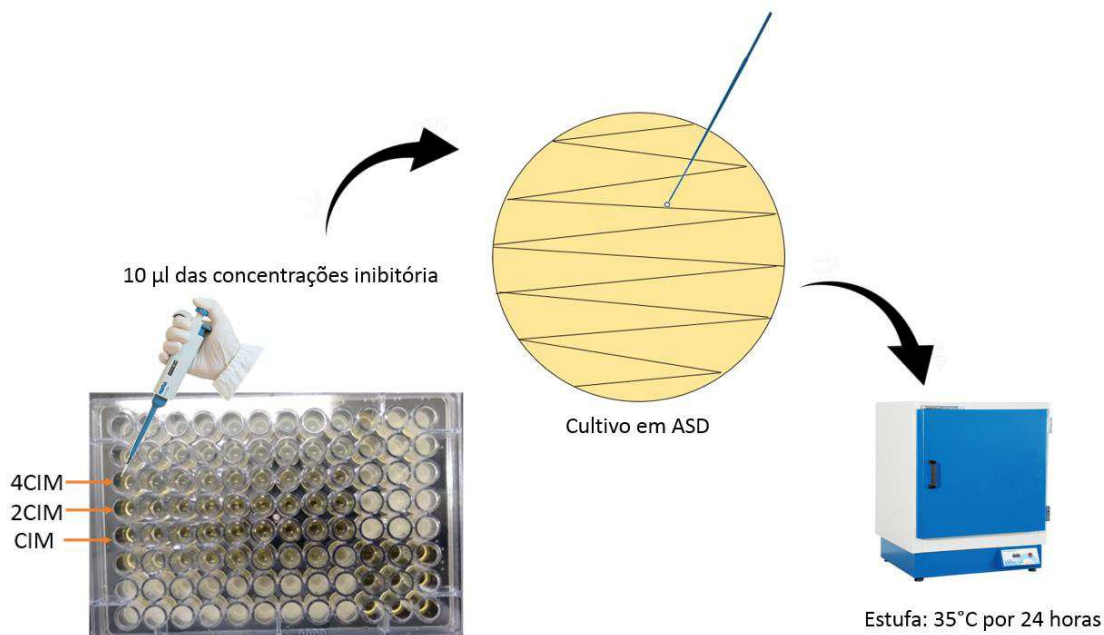


Fonte: Raqueline Maiara Costa Bezerra Cavalcanti, 2016.

4.6 Determinações da concentração fungicida mínima (CFM)

Para determinar a CFM, uma alíquota de 10 μ L de cada cavidade onde não houve crescimento fúngico, a partir da CIM, foi subcultivada em uma placa de Petri com ASD, incubada a 35°C por 24 horas. A CFM foi considerada como a menor concentração capaz de inibir visivelmente o crescimento do microrganismo por completo ou até o crescimento menor que 3 UFC, para obter 99,95% de morte. Foram realizados três experimentos independentes em diferentes ocasiões com resultados consistentes (PEREIRA et al., 2011, ESPINEL-INGROFF et al., 2002).

Figura 8: Determinação da CFM do carvacrol.

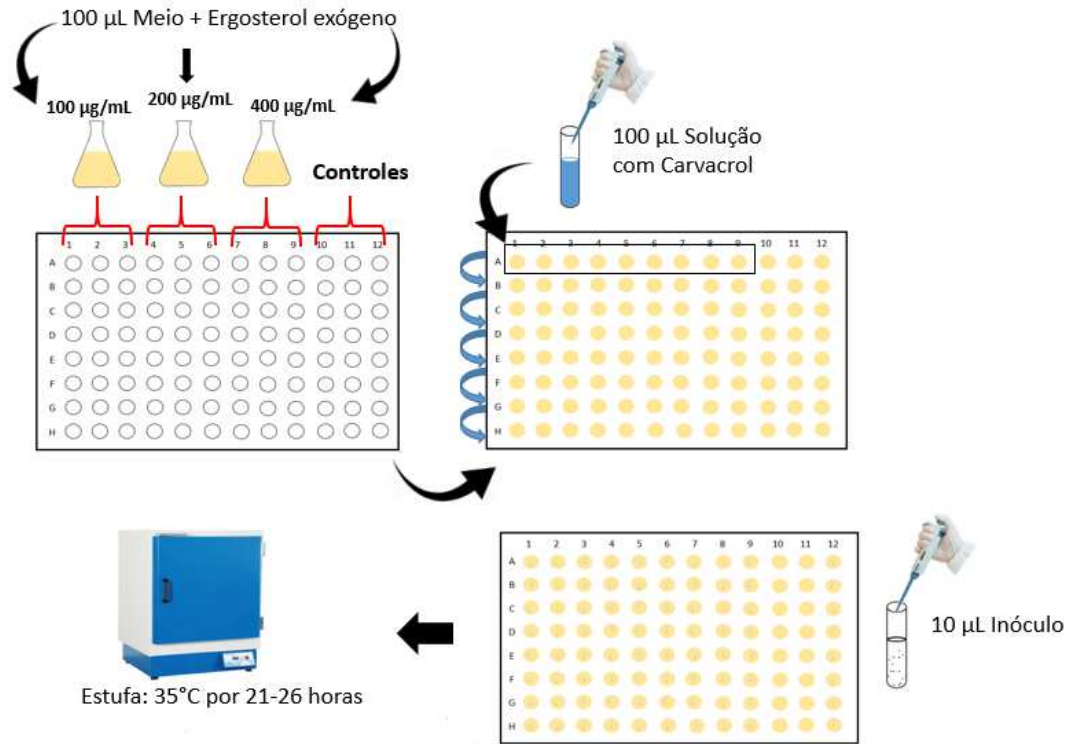


Fonte: Raqueline Maiara Costa Bezerra Cavalcanti, 2016.

4.7 Interação com ergosterol exógeno

A CIM do carvacrol foi determinada por microdiluição utilizando microplacas com 96 cavidades como descrito anteriormente, na ausência e na presença de diferentes concentrações de ergosterol incorporados ao meio (100, 200 e 400 μ g/ mL), nesta etapa foi escolhida apenas uma cepa, *Rhizopus oryzae* (URL-4857). Anfotericina B foi utilizada como controle. A CIM foi determinada após 48 horas de incubação para *Rhizopus* spp (ESCALANTE et al., 2008).

Figura 9: Interação do carvacrol com ergosterol exógeno.



Fonte: Raqueline Maiara Costa Bezerra Cavalcanti, 2016.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As infecções causadas por fungos geralmente apresentam problemas terapêuticos mais complexos do que infecções bacterianas, por se tratar de organismos eucariotas, igualmente aos animais, diferindo apenas na presença de parede celular, sendo a principal dificuldade para encontrar alvos que não atinjam as células humanas. Atualmente os tratamentos farmacológicos são eficazes, porém a crescente resistência microbiana, citotoxicidade e apenas atividade fungistática que a maioria dos antifúngicos apresentam, levam a busca por novas estratégias de tratamento (KHAN et al., 2010).

Devido ao pequeno arsenal terapêutico para tratamento da mucormicose, elevada taxa de mortalidade que essa infecção causa, além de diversos efeitos adversos associados ao uso de antifúngicos, há uma enorme necessidade de introduzir no mercado terapêutico novos produtos. Produtos naturais têm despertado interesse na comunidade científica, destacam-se óleos essenciais e seus princípios ativos, demonstrado diversas atividades biológicas *in vitro* e *in vivo* e têm um profundo impacto na descoberta de fármacos antimicrobianos (CHAYAKULKEEREE et al., 2009, LEWIS et al., 2012). Diante do exposto, o presente trabalho sugere opção para expandir a utilidade de fitoconstituente como agente antifúngico.

Nesta perspectiva foi realizada a investigação da atividade fungistática e fungicida do fitoconstituente carvacrol frente duas cepas de *R. orizae* e uma de *R. microsporus* através da técnica de microdiluição seriada para avaliar a CIM e CFM, por se tratar de um método barato para avaliação de atividade antimicrobiana de produtos naturais, sensível, alta reprodutibilidade, requer pequena quantidade de amostra, podendo ser usada para um número maior de amostras (OSTROSKY et al., 2008). Além de ser considerada metodologia padrão para testar produtos naturais (HADACEK; GREGER 2000).

Na tabela 1 encontram-se os resultados dos ensaios realizados para avaliação da CIM do carvacrol e anfotericina B. Pode-se observar que a CIM do fitoconstituente foi 64 µg/mL para todas as cepas testadas, bem como a uniformidade da CIM da anfotericina B de 2 µg/mL.

Estes resultados demonstram que o carvacrol apresentou atividade antifúngica contra cepas das espécies de *Rhizopus*. Sartoratto et al. (2004), preconizam critérios para categorizar o poder antimicrobiano de óleos essenciais a partir do valor da CIM, de acordo com esses valores estabelecidos considera-se que óleos com $CIM \leq 500 \mu\text{g/mL}$ apresentam forte atividade antimicrobiana, com $500 \mu\text{g/mL} < CIM \leq 1500 \mu\text{g/mL}$ possuem moderada atividade e $CIM > 1500 \mu\text{g/mL}$ demonstram fraca atividade. Não foi encontrado na literatura critérios

estabelecidos para categorizar fitoconstituintes, por se tratar de uma molécula isolada a partir de óleos essenciais, pode-se avaliar a potência da atividade antimicrobiana do carvacrol mediante os critérios de Sartoratto et al., 2004.

Abbaszadeh et al. (2014), estudaram atividade antimicrobiana de vários fitoconstituintes, entre eles o carvacrol, contra espécies de fungos, para *R. orizae* foi encontrada uma concentração inibitória mínima de 200 µg/mL, demonstrando a efetividade antimicrobiana do fitoconstituente, corroborando com o presente estudo.

Tabela 1: Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do fitoconstituente carvacrol e do antifúngico anfotericina B.

CEPAS	CIM (µg/mL)		VIABILIDADE *
	CARVACROL	ANFOTERICINA B	
<i>R. orizae</i> LM-64	64	2	+
<i>R. orizae</i> URL-4857	64	2	+
<i>R. microsporus</i> LM-5926	64	2	+

* Capacidade de crescimento do fungo em meio CSD e na presença do Tween. - Os resultados estão expressos em média de três experimentos.

Nascimento et al. (2007), abordam a utilização dos agentes emulsificantes, a exemplo de Tween 20, Tween 80, DMSO (dimetil sulfóxido) e etanol, para facilitar a dispersão dos óleos essenciais através do meio de cultura, auxiliando a visualização da atividade antimicrobiana dos óleos. Porém, ao se introduzir o agente emulsificante, esse está sujeito a possíveis interações com a substância em teste, e ainda, possuir atividade antimicrobiana. Por isso é necessário uma relação adequada entre óleo e emulsificador.

Takarada et al. (2004), ressalta ainda que os surfactantes podem reagir de forma antagonica ou sinergicamente aos componentes ativos do óleo. Altas concentrações de Tween pode apresentar resultado falso-positivo, através do aumento da atividade antimicrobiana da substância em teste, ou ainda, dificultar o contato direto do óleo com os microrganismos mediante formação de micelas reduzindo a bioatividade do óleo. Alguns autores propuseram a minimização desses efeitos através da padronização das concentrações dos emulsificantes, que devem variar entre 0,5 e 20% em solução com óleo (HOOD et al., 2003).

Devido a possível interação óleo-surfactante, se faz necessário um controle para verificar a sensibilidade das cepas utilizadas nos ensaios frente a uma solução contendo o emulsificante nas concentrações adotadas. No presente estudo, todas as cepas mostraram-se tolerantes ao Tween 80, não interferindo no crescimento das cepas e, portanto, confirmando que o impedimento do crescimento fúngico foi devido à presença do carvacrol.

Além do controle do Tween 80, um controle de esterilidade foi realizado para certificar que o meio CSD estava isento de microrganismos e outro para confirmar a viabilidade das cepas testadas e assim tornar os resultados obtidos mais fidedignos.

Santos et al. (2012), estudaram a atividade do óleo essencial do *Origanum vulgare* L (orégano) que tem como substância majoritária o carvacrol, contra *Rhizopus stolonifer* e *Aspergillus niger*. O resultado da CIM para *R. stolonifer* foi de 10 µg/mL, a baixa concentração pode estar associada ao sinergismo entre os compostos do óleo essencial do orégano.

Mota et al. (2012), avaliaram o poder antifúngico do óleo essencial de *Thymus vulgaris* L. rico em timol, fitoconstituente isômero do carvacrol, além de pequenas concentrações de carvacrol, contra doze cepas de *R. orizae*, de modo que as CIM variaram de 256-512 µg/mL, o estudo também avaliou o fitoconstituente timol que apresentou CIM de 128-256 µg/mL. Embora não se trate da molécula do carvacrol ou como componente majoritário, o estudo revela promissoras atividades das substâncias testadas, em especial o timol que difere do carvacrol apenas na posição da hidroxila, portanto, é esperado resultados semelhantes.

Mitchell et al, (2010) avaliaram a potencial inibição do crescimento de espécies de *Aspergillus* potencialmente toxigênicas, a partir do óleo essencial de *O. vulgare* L., através de uma série de experimentos, incluindo CIM e CFM, os resultados mostraram-se satisfatórios, uma vez que o óleo provocou ruptura de estrutura celular, perda de citoplasma, ausência de conidiação e perda de pigmentação.

Na tabela 2 encontram-se os resultados referentes a concentração fungicida mínima (CFM), sendo estes valores correspondentes ao dobro de suas respectivas CIMs. Abbaszadeh et al., 2014 também investigaram a atividade fungicida do terpeno carvacrol, o estudo obteve resultados positivos para o gênero *Rhizopus*.

Tabela 2: Determinação da concentração fungicida mínima (CFM) do fitoconstituente carvacrol.

	CEPAS		
	<i>R. orizae</i> LM-64	<i>R. microsporus</i> LM-5926	<i>R. orizae</i> URL-4857
CONTROLE	+	+	+
CIM	+	+	+
2X CIM	-	-	-
4X CIM	-	-	-

+: crescimento fúngico; -: ausência de crescimento fúngico

A ação antimicrobiana dos óleos essenciais e seus derivados, está associada ao caráter lipofílico de esqueleto de hidrocarboneto, bem como o caráter hidrófilo dos seus grupos funcionais. Sendo a classificação da atividade antifúngica na seguinte ordem decrescente fenóis > aldeídos > cetonas > álcoois > ésteres > hidrocarboneto. Nesta perspectiva, fica evidente que a atividade do óleo essencial *Origanum vulgare* e do componente majoritário fenólico, carvacrol, apresentam relação direta (KALEMBA; KUNICKA, 2003).

O ergosterol é o principal esteroide presente em leveduras e fungos filamentosos, que é necessário para o crescimento normal e função da membrana celular fúngica. Além de servir como um biorregulador da fluidez da membrana, assimetria e integridade da membrana, o ergosterol contribui para a função das enzimas ligadas à membrana. Um dos mecanismos propostos para glicosídeos triterpenos, como agentes antifúngicos, está na sua ligação ao ergosterol da membrana, o que leva à ruptura da membrana fúngica e perda do conteúdo intracelular (MORRISSEY; OSBOURN, 1999; LUPETTI et al., 2002; KHAN *et al*, 2010).

Desta forma, para determinar se o carvacrol se liga aos esteróides de membrana fúngica, foi escolhida apenas uma cepa (*R. orizae* URL-4857), a CIM foi determinada com a adição do ergosterol e comparada com a CIM sem a adição do mesmo. Se a atividade do carvacrol foi causada por ligação ao ergosterol, o ergosterol exógeno impediria a ligação às membranas do ergosterol fúngico, consequentemente a CIM em que ao meio de cultura no qual o ergosterol exógeno foi adicionado irá aumentar com relação ao meio de cultura em que o ergosterol exógeno não foi adicionado. (SHERMAN, F 1997; LUNDE; KUBO, 2000; ESCALANTE et al., 2008).

Os resultados da tabela 3 mostram que houve aumento de até 16 vezes da CIM do fitoconstituente carvacrol na presença ergosterol exógeno. O mesmo aconteceu com a anfotericina B, sendo um aumento de 128 vezes. Este resultado indica que provavelmente o terpeno em estudo pode atuar através da interação com o ergosterol, mecanismo pelo qual a anfotericina B atua, corroborando com estudos anteriores que apontam os terpenos como agentes atuantes nas membranas fúngicas, desestabilizando e provando perda de material plasmático, causando a morte celular (LAMBERT et al., 2001; SÁNCHEZ et al., 2004; BRAGA et al., 2007; BOTRE et al., 2010).

Tabela 3: Efeito do carvacrol e anfotericina B contra *R. orizae* URL-4857 na ausência e na presença de ergosterol.

DROGA	CIM ($\mu\text{g/mL}$)			
	Ausência do ergosterol	Presença de ergosterol		
		100 $\mu\text{g/mL}$	200 $\mu\text{g/mL}$	400 $\mu\text{g/mL}$
CARVACROL	64	512	512	1024
ANFOTERICINA B	2	256	256	256

*Meio contendo concentrações de ergosterol + inóculo (*R. orizae* URL-4857).

Ahmad et al. (2011), estudaram a atividade antifúngica do carvacrol contra espécies de *Candida*, onde essa ação parecem originar-se da inibição da biossíntese de ergosterol e da ruptura da integridade da membrana. Nóbrega et al. (2016), investigaram a atividade do carvacrol frente às cepas de *Cryptococcus neoformans*, sugerindo uma complexação do fitoconstituente com o ergosterol da membrana, desestabilizando a mesma, causando assim a morte do fungo.

Os estudos com interação direta com óleos essenciais e derivados com ergosterol ainda são raros, embora a anfotericina B, principal representante dos polienos, ligue-se diretamente ao ergosterol formando poros que desestabilizam a membrana, resultando em perda material intracelular e lise celular, se faz necessários outras alternativas terapêuticas, visto que hoje a resistência aos antifúngicos vêm aumentando nos últimos anos (BAGINSKI et al., 2005).

Os resultados obtidos sugerem que o mecanismo de ação antifúngica do carvacrol envolve uma interação direta com o ergosterol, o que pode levar à ruptura da membrana fúngica e perda de conteúdo intracelular.

Diante dos dados obtidos, pode-se sugerir que o fitoconstituente carvacrol apresenta promissora atividade fungistática e/ou fungicida. Tais atividades podem estar associadas à interação com o ergosterol da membrana fúngica, portanto, o carvacrol apresenta uma alternativa terapêutica no tratamento das mucormicoses, podendo ser usado no início da infecção. Contudo, é necessário estudos mais avançados, *in vitro* e *in vivo* e comprovação da potente atividade antifúngica e segurança do carvacrol para uma possível aplicação clínica.

7. CONCLUSÕES

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

- Nas condições avaliadas, o carvacrol apresentou ação fungistática (64 µg/mL) e fungicida (128 µg/mL) contra *Rhizopus oryzae* e *Rhizopus microsporus*;
- O mecanismo pelo qual o fitoconstituente carvacrol promove atividade antifúngica envolve provavelmente a interação do ergosterol presente nas membranas fúngicas.

REFERÊNCIAS

- ABBASZADEH, S.; SHARIFZADEH, A.; SHOKRI, H.; KHOSRAVI, A.R.;
 ABBASZADEH, A. Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 24, p. e51-56, 2014.
- AHMAD, A.; KHAN, A.; AKHTAR, F.; YOUSUF, S.; XESS, I.; KHAN, L.A.; MANZOOR, N. Fungicidal activity of thymol and carvacrol by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 30, p. 41–50, 2011.
- AMBER, K.; AIJAZ, A.; IMMACULATA, X.; LUQMAN, K. A.; NIKHAT, M. Anticandidal effect of ocimum sanctum essential oil and its synergy with fluconazole and ketoconazole. **Phytomedicine**, v. 17, p. 921-925, 2010.
- BAGINSKI, M.; STERNAL, K.; CZUB, J.; BOROWSKI, E. Molecular modelling of membrane activity of amphotericin B, a polyene macrolide antifungal antibiotic. **Acta Biochimica Polonica.**, v. 52, p. 655–658, 2005.
- BHAVANANI, S.M.; BALLOW, C.H. New agents for Gram-positive bacteria. **Current Opinion in Microbiology**, v. 13: p. 528-534, 1992.
- 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.
- BAYDAR, H.; SAGDIÇ, O.; OZKAN, G. Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. **Food Control**, v. 15, p. 169-172, 2004.
- BUSATTA, C.; MOSSI, A. J.; RODRIGUES, M. R. A.; CANSIAN, R. L.; OLIVEIRA, J. V. Evaluation of *origanum vulgare* essential oil as antimicrobial agent in sausage. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 610-616, 2007.

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

BOTRE, D. A.; SOARES, N. F. F.; ESPITIA, P. J. P.; SOUSA, S.; RENHE, I. R. T. Avaliação de filme incorporado com óleo essencial de orégano para conservação de pizza pronta. **Revista Ceres**, v. 57, p. 283-291, 2010.

CAMELE, I.; ALTIERI, L.; MARTINO, L.; FEO, V.; MANCINI, E.; RANA, G. L.; *In Vitro* control of post-harvest fruit rot fungi by some plant essential oil components. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 2290-2300, 2012.

CORDEIRO, R.A.; BRILHANTE, R.S.N.; SIDRIM, J.J.C. Zigomicose e Hialohifomicose. Em: SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. **Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2004. p.166.

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

CHAYAKULKEEREE M, GHANNOUM MA, PERFECT JR. Zygomycosis: the re-emerging fungal infection. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 25, p. 215-29, 2006.

CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard **Clinical and Laboratory Standards Institute, formerly NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards)**, Method M27-A2. Wayne Ed.; v. 22, p. 1-29, 2002.

CLSI. Método de referência para testes de diluição em caldo para determinação da sensibilidade a terapia antifúngica dos fungos filamentosos: norma aprovada **Clinical and Laboratory Standards Institute, formerly NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards)**, Method M38-A, 2a ed. Wayne Ed.; v. 22, p. 1-50, 2002.

CUNHA, M. A.; NERY, A. F.; LIMA, F. P.; DINIZ JUNIOR, J.; MACIEL NETO, J.; CALADO, N. B.; LUZ, K. G.; MILAN, E. P. Rhinocerebral zygomycosis in a diabetic patient. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, p. 257-259, 2011.

COUTINHO, H.D.M., COSTA, J.G.M., LIMA, E.O., FALCAO-SILVA, V.S., SIQUEIRA-JUNIOR, J.P. In vitro interference of Momordica charantia and chlorpromazine in the resistance to aminoglycosides. **Pharmaceutical Biology**, v. 47, p. 1056–1059, 2008.

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

DUARTE, M. C.; LEME, E. E.; DELARMELINA, C.; SOARES, A. A.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on Escherichia coli. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 197-201, 2007.

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. 711-713, 1998.

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

EHRENBERG, R. Academiae Caesareae Leopoldino Carolinae Naturae Curiosorum. **Nova Acta Physico- Medica**, v. 10, p. 198, 1821.

ESCALANTE, A.; GATTUSO, M.; PÉREZ, P.; ZACCHINO, S. Evidence for the mechanism of action of the antifungal phytolaccoside B isolated from *Phytolacca tetramera* Hauman. *Journal of Natural Products*, v. 71, n. 10, p. 1720-1725, 2008.

ESPINEL-INGROFF, A.; CHATURVEDI, V.; FOTHERGILL, A.; RINALDI, M. G. Optimal Testing Conditions for Determining MICs and Minimum Fungicidal Concentrations of New and Established Antifungal Agents for Uncommon Molds: NCCLS Collaborative Study. **Journal of clinical microbiology**, v. 40, p. 3776–3781, 2002.

FERNEBRO, J. Fighting bacterial infections—Future treatment options. **Drug Resistance Updates**, v. 14, p. 125–139, 2011.

GARDINER, B. J.; SIMPSON, I.; KHUU, M. H.; KIDD, S. E.; LO, C. H.; JENKIN, G. A. An unusual ulcer: A case of cutaneous mucormycosis caused by *Rhizopus oryzae*. **Medical Mycology Case Reports**, v. 7, p. 8-11, 2015.

GEBREMARIAM, T.; LIN LIN, M. L.; KONTOYIANNIS, D. P.; FRENCH, S.; EDWARDS, J. E. JR.; FILLER, S.; IBRAHIM, A. S. Bicarbonate correction of ketoacidosis alters host-pathogen interactions and alleviates mucormycosis. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 126, p. 2280-2294, 2016.

HABER, D. M.; FERNANDES, A. M.; NETO, D. S.; SCHIAVETTO, R. R. Rhino-orbitocerebral Mucormycosis Associated with Cavernous Sinus Thrombosis: Case Report. **International Archives of Otorhinolaryngology**, v. 12, p. 574-578, 2008.

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

HARTMANN, A.; MISSIO, R.; HAMMAD, M. P.; ALVES, I. S. Incidence of *Candida* spp. mucosal oral patients infected by Human Immunodeficiency (HIV) in Santo Angelo-RS. **REVISTA DE EPIDEMIOLOGIA E CONTROLE DE INFECÇÃO**, v. 6, n. 3, 2016.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. Screening of Some Plants Used in the Brazilian Folk Medicine for the Treatment of Infectious Diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 1027-1031, 2002.

HOOD, J.R.; WILKINSON, 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.

ISLAM, M. N.; COHEN, D. M.; CELESTINA, L. J.; OJHA, J.; CLAUDIO, R.; BHATTACHARYYA, I. B. Rhinocerebral zygomycosis: an increasingly frequent challenge: update and favorable outcomes in two cases. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology**, v. 104, p. 28-34, 2007.

ISGRÒ, G.; CARLUCCI, C.; GIAMBERTI, A.; FRIGIOLA, A.; RANUCCI, M. Rhinocerebral zygomycosis: an unusual dramatic presentation in a paediatric cardiac patient without risk factors. **European Heart Journal Supplements**, v. 18, p. 19-21, 2016.

KALEMBA, D.; KUNICKA, A. Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils. **Current Medicinal Chemistry**, v. 10, p. 813 – 829, 2003.

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

KHAN, A.; AHMAD. A.; AKHTAR, F.; YOUSUF, S.; XESS, I.; KHAN, L.A.; MANZOOR. N. Ocimum sanctum essential oil and its active principles exert their antifungal activity by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity. **Research in Microbiology**, v. 161, p. 816- 823, 2010.

KWON-CHUNG, K. J. Taxonomy of Fungi Causing Mucormycosis and Entomophthoromycosis (Zygomycosis) and Nomenclature of the Disease: Molecular Mycologic Perspectives. **Clinical Infectious Diseases**, v. 54, p. 8-15, 2012.

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

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

LEWIS, R. E.; LORTHOLARY, O.; SPELLBERG, B.; ROILIDES, E.; KONTOYIANNIS, P.; WALSH, T. J. How Does Antifungal Pharmacology Differ for Mucormycosis Versus Aspergillosis? *Antifungal Pharmacology*, v. 54, p. 67-71, 2012.

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

LUNDE, C. S.; KUBO, I. Effect of Polygodial on the Mitochondrial ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v.44, p.1943–1953, 2000.

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

MA, LI-JUN *et al.* Genomic analysis of the basal lineage fungus *rhizopus oryzae* reveals a whole-genome duplication. **PLoS Genetics**, v. 5, 2009.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; JUNIOR VEIGA, V. F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química nova**, v. 25, p. 429-438, 2002.

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.

MARQUES, S. A.; CAMARGO, R. M. P.; ABBADE, L. P. F.; MARQUES, M. E. A. Mucormicose: infecção oportunística grave em paciente imunossuprimido. Relato de caso. **Diagn Tratamento**, v. 15, p. 64-68, 2010.

MITCHELL, T. C.; STAMFORD, M. T. L.; SOUZA, E. L.; LIMA, E. O.; CARMO, E. S. Origanum vulgare L. essential oil as inhibitor of potentially toxigenic *Aspergilli*. *Ciência e tecnologia de alimentos*, v. 30, p.755-760, 2010.

MOHTA, A.; NEOGI, S.; DAS, S. Gastrointestinal mucormycosis in an infant. **Indian Journal of Pathology and Microbiology**, v. 54. p. 664-665, 2011.

MORRISSEY, J. P.; OSBOURN, A. E. Fungal Resistance to Plant Antibiotics as a Mechanism of Pathogenesis. *Microbiology and molecular biology reviews*, v.63, p.708–724,1999.

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, p. 14418-14433, 2012.

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

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. 45, 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.191-195, 2004.

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

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

ÖZKAN, A.; ERDOĞAN, A. A comparative evaluation of antioxidant and anticancer activity of essential oil from *Origanum onites* (Lamiaceae) and its two major phenolic components.

Turkish Journal of Biology, v. 35, p. 735–742, 2011.

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

PETRIKKOS, G.; SKIADA, K.; LORTHLARY, O.; ROILIDES, E.; WALSH, T. J.; KONTOYIANNIS, D. P. Epidemiology and Clinical Manifestations of Mucormycosis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 54, p. 23-34, 2012.

RABIE, N. B.; ALTHAQAFI, A.O. Rhizopus-associated soft tissue infection in na immunocompetent air-conditioning technician after a road traffic accident: A case report and review of the literature. **Journal of Infection and Public Health**, v 5, p. 111, 2012.

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

ROMANO, C.; MIRACCO, C.; MASSAI, L.; PIANE, R.; ALESSANDRINI, C.; PETRINI, C.; LUZI, P. Case Report. Fatal rhinocerebral zygomycosis due to *Rhizopus oryzae*. **Mycoses** 2002; v. 45, p.45-49, 2002.

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

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

SANTOS, N. S. T.; AGUIAR, A. J. A. A.; OLIVEIRA, C. E. V.; SALES, C. V., SILVA. S. M.; SILVA, R. S.; STAMFORDT. C. M., SOUZA, E. L. Efficacy of the application of a coating composed of chitosan and *Origanu vulgare* L. essential oil to control *Rhizopus*

stolonifer and *Aspergillus niger* in grapes (*Vitis labrusca* L.). **Food Microbiology**, v. 31, p. 345-353, 2012.

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

SCORZONI, L.; SANGALLI-LEITE, F.; SINGULANI, J. L.; SILVA, A. C A. P.; COSTA-ORLANDI, C. B.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; MENDES-GIANNINI, M. J. S. Searching new antifungals: The use of in vitro and in vivo methods for evaluation of natural compounds. **Journal of Microbiological Methods**, v. 123, p. 68-78, 2016.

SEVERO, C. B.; GUAZZELLI, L. S.; SEVERO, L. C. Capítulo 7- Zigomicose. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 36, p. 134-41, 2010.

SHERMAN, F. In The Encyclopedia of Molecular Biology and Molecular Medicine. Meyers & VCH Pub. Eds.; Weinheim Press: Berlin, v. 6, p. 302-325, 1997.

SHIRAZI, F.; KONTOYIANNIS, D. P. Rhizopus oryzae Potentiates Activity of Posaconazole and Itraconazole via Apoptosis. **PLOS ONE**, v. 8, 2013.

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

SPELLBERG, B.; WALSH, T. J.; KONTOYIANNIS, D. P.; EDWARDS, L. Jr.; IBRAHIM, A. S. Recent Advances in the Management of Mucormycosis: From Bench to Bedside. **Clinical Infectious Diseases**, v. 48, p. 1743-1741, 2009.

TAKARADA, K.; KIMIZUKA, R.; TAKAHASHI, N.; HONMA, K.; OKUDA, K.; KATO, T. A comparison of the antibacterial efficacies of essential oils against oral pathogens. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 19, p. 61-64, 2004.

TSYRKUNOU, A. V.; ELLISON, R. T.; AKALIN, A.; WIEDERHOLD, N.; SUTTON, D. A.; LINDNER, J.; FAN, H.; LEVITZ, S.M.; ZIVNA, I. Multifocal *Rhizopus microsporus* lung infection following brush clearing. **Medical Mycology Case Reports**, v. 6, p. 14–17, 2014.

TORRES-NARBONA, M.; GUINEA, J.; MUÑOZ, P. BOUZA, E. Zigomicetos y zigomicosis en la era de las nuevas terapias antifúngicas. **Revista española de quimioterapia**, v. 20, p. 375-386, 2007.

VEIGA JUNIOR, V. F., PINTO, A. C. Plantas medicinais: cura segura?. **Química nova**, v. 28, p. 519-528, 2005.

VERAS, H. N. H.; RODRIGUES, F. F. G.; BOTELHO, M. A.; MENEZES, I. R. A.; COUTINHO, H. D. M.; COSTA, J. G. M. Enhancement of aminoglycosides and b-lactams antibiotic activity by essential oil of *Lippia sidoides* Cham. and the Thymol. **Arabian Journal of Chemistry** (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.10.030>

YANISHLIEVA, N. V.; MARINOVA, E.; POKORNY, J. Natural antioxidants from herbs and spices. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 108, p. 776–793, 2006.

ZANANDREA, I.; JULIANO, D. S.; ANDRÉA, B. M.; JULIANE, L.; VERIDIANA, K. B. Atividade do óleo essencial de orégano contra fungos patogênicos do arroz: crescimentos micelial em placas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, p. 14-16, 2004.