



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

**PAULA MARIANE SILVA SOUSA**

**ASSOCIAÇÃO ENTRE ANTIFÚNGICOS E CARVACROL CONTRA *Rhodotorula*  
*spp.***

**CUITÉ - PB  
2016**

**PAULA MARIANE SILVA SOUSA**

**ASSOCIAÇÃO ENTRE ANTIFÚNGICOS E CARVACROL CONTRA *Rhodotorula spp.***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Bacharelado em Farmácia do Centro de Educação e Saúde da Universidade Federal de Campina Grande.

Orientador: Prof. Dr. Wylly Araújo de Oliveira.

**CUITÉ - PB  
2016**

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

S725a      Sousa, Paula Mariane Silva.

Associação entre antifúngicos e carvacrol contra *Rhodotorula spp.* / Paula Mariane Silva Sousa. – Cuité: CES, 2016.

52 fl.

Monografia (Curso de Graduação em Farmácia) – Centro de Educação e Saúde / UFCG, 2016.

Orientador: Wylly Araújo de Oliveira.

1. Antifúngicos. 2. *Rhodotorula spp.* 3. Monoterpeno. I. Título.

**PAULA MARIANE SILVA SOUSA**

**ASSOCIAÇÃO ENTRE ANTIFÚNGICOS E CARVACROL CONTRA *Rhodotorula*  
*spp.***

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao curso de Bacharelado em  
Farmácia do Centro de Educação e  
Saúde da Universidade Federal de  
Campina Grande.

APROVADO EM: 06 / 09 /2016

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. Wylly Araújo de Oliveira**

Orientador/UAS/CES/UFCG

---

**Prof. Dra. Júlia Beatriz Pereira de Souza**

Membro/UAS/CES/UFCG

---

**Prof. Dr. Egberto Santos Carmo**

Membro/UAS/CES/UFCG

## **AGRADECIMENTOS**

Quero dizer que essa luta não foi fácil, mas a vontade de vencer na vida foi maior! E nada mais justo em agradecer àqueles que sempre estiveram ao meu lado, mesmo distantes! Para me expressar nesse momento, minha palavra é GRATIDÃO. Agradeço àquele que sempre esteve ao meu lado, a minha fé em um ser superior sempre foi nítida, obrigada meu Deus! Obrigada por me mostrar o caminho a seguir, obrigada pela força e perseverança, pois sempre foi um plano do SENHOR.

Agradecer aos meus pais, João Farias e Jara Alba, minha fonte de inspiração e motivação durante toda minha vida, sempre me mostraram que a forma mais linda de conquistar vitórias na vida é com estudo, acreditaram que um dia chegaria até aqui, e cheguei.

Ao meu orientador Prof. Dr. Wylly Araújo de Oliveira pela oportunidade, confiança e amizade. Obrigada por cada conselho e incentivo durante a graduação, um verdadeiro profissional que me espelho continuamente. Minha sincera admiração.

Aos meus irmãos Caio Humberto, Paula Gabriela e Lígia Oliveira pelo apoio e amor fraternal durante toda minha vida;

Aos meus familiares pelos incentivos e apoio incondicional, em especial aos meus avós maternos (Edes Costa e Dinda Tibúrcio), tios (Goya Lamartine e Jeane Elis) e primos (Samara Barreto, Sumaia Barbosa, Vinicius Gama, Malu Barbosa e Cauã Barbosa). Família é à base de tudo!

À Jefferson Rodrigues pelo companheirismo até aqui, agradeço a Deus por ter colocado você em minha vida, caminhamos e conquistamos muitas coisas juntos, isso é só o começo.

À Mariane Lorena pelos incentivos contínuos, dividir moradia com você durante 3 anos da graduação foi a melhor coisa, obrigada pela paciência e conselhos.

À minha turma, em especial a Glaucianne Oliveira, Edileuza Bezerra, Ana Laura, Kayo Cesár, e aqueles que se aproximaram depois, Brennda Rachel, Layanne Candido, Guilherme Alexandre e Danillo Alencar, obrigada por fazer os meus dias

mais divertidos mesmo nos momentos de aflição, pelos conselhos de cada um, sem vocês a luta teria sido mais árdua.

Ao CES e funcionários que contribuíram de alguma forma, com algum gesto e gentileza para o desenvolvimento desse trabalho.

Aos meus professores do CES pelos ensinamentos passados durante essa jornada, contribuindo para um melhor aprendizado.

Ao CNPQ, pelo apoio financeiro imprescindível para a execução do trabalho.

Minha gratidão para aqueles que contribuíram direta e indiretamente para essa vitória, muito obrigada!

*“Sem sonhos, a vida não tem brilho, sem metas, os sonhos não têm alicerces, sem prioridades, os sonhos não se tornam reais.”*

*(Augusto Cury)*

## RESUMO

O aumento significativo de microrganismos resistentes aos antifúngicos tem se tornado um problema a saúde pública, causando elevação na morbidade e mortalidade de pacientes. Uma alternativa para superar a resistência aos antimicrobianos pode ser o uso de produtos naturais. A busca de novas substâncias com atividade antifúngica tornou-se cada vez mais necessária, no entanto, outra estratégia bastante estudada é a associação entre agentes antimicrobianos, cuja combinação procura promover uma maior eficácia no tratamento, permitindo a utilização de doses menores de cada fármaco, diminuindo o risco de toxicidade. Nas duas últimas décadas o gênero *Rhodotorula* tem sido reconhecido como agente patogênico emergente em seres humanos. O objetivo deste trabalho foi determinar a concentração inibitória mínima (CIM) do carvacrol e dos antifúngicos (anfotericina B, cetoconazol e itraconazol) contra *Rhodotorula spp.*. Para as cepas sensíveis aos fármacos testados, também foi avaliada a eficácia dos agentes antifúngicos quando associado com o carvacrol contra *Rhodotorula spp.*. As determinações das CIMs do carvacrol e dos antifúngicos foram realizadas pelo método de microdiluição em caldo. Para o estudo de associação foi utilizado a metodologia *Checkerboard*. As CIMs do carvacrol variaram entre 8µg/mL e 128µg/mL, enquanto as CIMs da anfotericina B, do cetoconazol e do itraconazol foram entre 2µg/mL e 64µg/mL. No ensaio de *Checkerboard*, a combinação do carvacrol com cetoconazol forneceu resultado sinérgico para uma cepa de *Rhodotorula spp.*. Resultados aditivos foram demonstrados na associação do carvacrol com o itraconazol e com o cetoconazol, para anfotericina B todos os resultados foram indiferentes. É importante observar que não houve resultados antagônicos nesse trabalho. Associações de substâncias oriundas de plantas, como componentes de óleos essenciais, com antifúngicos podem ser promissores no combate de microrganismos causadores de infecções em seres humanos, como a *Rhodotorula spp.*

**Palavras-chave:** *Rhodotorula spp.*. Antifúngicos. Monoterpeno. *Checkerboard*.

## ABSTRACT

The significant increase of microorganisms resistant to antifungal agents has become a problem of public health, causing high morbidity and mortality of patients. An alternative to overcome antimicrobial resistance may be the use of natural products. The search for new substances with antifungal activity has become increasingly necessary, however, another well-studied strategy is the association between antimicrobial agents, the combination of which seeks to promote greater efficiency in the treatment, allowing the use of less of each drug doses, reducing the risk of toxicity. In the last two decades the *Rhodotorula* genus has been recognized as an emerging pathogen in humans. The objective of this study was to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of carvacrol and antifungals (amphotericin B, ketoconazole and itraconazole) against *Rhodotorula* spp.. For sensitive strains to test drugs, it was also evaluated the effectiveness of antifungal agents when associated with carvacrol against *Rhodotorula* spp.. The determination of MICs carvacrol and antifungals were performed by the broth microdilution method. For the association study we used the methodology Checkerboard. The MIC of the range between carvacrol 8µg/mL and 128µg/mL, whereas the MIC of amphotericin B, ketoconazole and itraconazole were between 2µg/mL and 64µg/mL. In the checkerboard assay, the combination of carvacrol with ketoconazole provide synergistic results for a strain of *Rhodotorula* spp.. Results additives were demonstrated in association with carvacrol itraconazole and ketoconazole, amphotericin B for all results were indifferent. It is important to note that there were no antagonistic results in this work. Combinations of substances originating from plants as constituents of essential oils, may be antifungal promising in fighting infectious agents in humans such as *Rhodotorula* spp..

**Keywords:** *Rhodotorula* spp.. Antifungals. Monoterpene. Checkerboard.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Mecanismo de ação dos antifúngicos	16
<b>Figura 2</b> - Estrutura química do carvacrol	20
<b>Figura 3</b> - Esquema Ilustrativo da preparação do inóculo	24
<b>Figura 4</b> - Esquema ilustrativo da realização da CIM	26
<b>Figura 5</b> - Resultado ilustrativo utilizando o CTT	27
<b>Figura 6</b> - Esquema ilustrativo de como foi preparado o <i>Checkerboard</i>	28

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Resultados das CIMs ( $\mu\text{g/mL}$ ) do carvacrol frente às cepas estudadas 30
- Tabela 2** - Resultados das CIMs ( $\mu\text{g/mL}$ ) dos antifúngicos contra *Rhodotorula spp.* 32
- Tabela 3** - Índice da concentração inibitória fracionada (ICIF) da combinação do carvacrol e antifúngicos contra *Rhodotorula spp.* 34

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ASD	Agar Sabouraud Dextrose
CIF	Concentração Inibitória Fracionada
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CSD	Caldo Sabouraud Dextrose
CTT	Cloreto de 2,3,5-Trifenil tetrazólio
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
ICIF	Índice da Concentração Inibitória Fracionada
µg	Microgramas
µg/mL	Microgramas por Mililitros
µL	Microlitros
NaCl	Cloreto de Sódio
UFCG	Universidade Federal de Campina Grande
UFC/mL	Unidades Formadoras de Colônias por Mililitro
%	Percentual
°C	Graus Celsius

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	14
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	22
<b>3.1 Objetivo geral</b> .....	22
<b>3.2 Objetivos específicos</b> .....	22
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	23
<b>4.1 Local</b> .....	23
<b>4.2 Meios de cultura</b> .....	23
<b>4.3 Cepas fúngicas</b> .....	23
<b>4.4 Antifúngicos</b> .....	23
<b>4.5 Preparação da emulsão do carvacrol</b> .....	24
<b>4.6 Preparação do inóculo</b> .....	24
<b>4.7 Determinação da concentração inibitória mínima</b> .....	25
<b>4.8 Método <i>Checkerboard</i></b> .....	27
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	30
<b>5.1 Determinação da concentração inibitória mínima do carvacrol</b> .....	30
<b>5.2 Determinação da concentração inibitória mínima dos antifúngicos</b> .....	32
<b>5.3 Determinação do índice da concentração inibitória fracionada</b> .....	33
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	38
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	39

## 1. INTRODUÇÃO

O aumento progressivo da resistência de microrganismos a antifúngicos tem sido uma crescente preocupação na área micológica. A resistência microbiana mostra-se como um grave problema de saúde pública, pois o índice de mortalidade devido às infecções é alto (BEDOUT; GOMÉZ, 2010; COLOMBO et al., 2013).

A terapêutica antifúngica, apesar de mais diversificada, ainda apresenta algumas limitações referente à toxicidade sobre as células humanas e a resistência, podendo ser intrínseca ao organismo específico ou pode ser adquirida pelo organismo durante a terapia. Essa resistência pode estar atribuída a uma mutação que aumenta a expressão de enzimas ou a outras alterações do alvo do fármaco (BARKER; ROGERS, 2006; NISHI et al., 2009). As cepas de *Rhodotorula spp.* foram consideradas a quarta espécie de maior prevalência entre as leveduras não-*Candida* isoladas de amostras clínicas (PFALLER et al., 2009). Espécies de *Rhodotorula*, incluindo *R. mucilaginosa* (*R. rubra*) e *R. glutinis*, são muitas vezes resistentes ao fluconazol e ao voriconazol. A anfotericina B é o agente antifúngico de primeira escolha para o tratamento de infecções por *Rhodotorula spp.*, entretanto, seu uso ainda é bastante limitado devido a problemas de reações adversas, principalmente a nefrotoxicidade (PFALLER et al., 2007).

Uma alternativa para superar os problemas como a resistência dos microrganismos aos antimicrobianos pode ser estabelecida com o uso de produtos naturais e fitoquímicos. Plantas medicinais têm sido utilizadas para o tratamento de doenças e infecções por milhares de anos na medicina tradicional, demonstrando que as plantas e os seus produtos aromáticos têm alta atividade antimicrobiana (TAJKARIMI; IBRAHIM; CLIVER, 2010).

A busca de novos fármacos e agentes mais eficientes torna-se cada vez mais necessária, como também, a associação entre agentes antimicrobianos é uma estratégia bastante importante. Essa combinação busca promover uma maior eficácia no tratamento, permitindo a utilização de doses menores de cada fármaco, diminuindo assim o risco de toxicidade dos fármacos, além da prevenção a resistência (DRAGO et al., 2007). Segundo Langeveld; Veldhuizen; Burt (2014) a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais e os seus componentes pode atuar em sinergia com alguns antimicrobianos, aumentando essa atividade.

Busca-se a partir disso, estudar a atividade antifúngica do carvacrol, anfotericina B, cetoconazol e itraconazol isoladamente, bem como em associação pela técnica de *Checkerboard*, esse método visa determinar a concentração inibitória mínima (CIM) de cada componente em combinação um com o outro em diferentes concentrações. Além disso, a atividade antifúngica foi avaliada pela determinação da CIM do carvacrol, anfotericina B, cetoconazol e itraconazol contra as cepas de *Rhodotorula spp.*

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

Os fungos são microrganismos eucariontes, heterotróficos (MEIRELES; NASCENTE, 2009). Constituídos por parede celular rica em quitina e glucanos, além disso, apresentam como principal componente na sua membrana plasmática o ergosterol (BOWMAN, FREE, 2006). Classificados morfológicamente em dois grupos principais: leveduras e filamentosos. As leveduras são unicelulares, arredondadas ou ovaladas e podem se reproduzir de forma assexuada ou sexuadamente. Os fungos filamentosos são multicelulares, são constituídos de um conjunto de células tubulares denominadas hifas, cujo conjunto é denominado micélio (SIDRIM; ROCHA, 2010). Existem ainda os fungos dimórficos, que se apresentam sob ambas as formas, dependendo principalmente da temperatura, mas sob influência também do teor de CO<sub>2</sub> e de condições nutricionais (BRASIL, 2004).

Os fungos apresentam uma ampla distribuição na natureza podendo ser encontrados em diversos ambientes entre eles: ar, água, solo, animais e alimentos. Dependendo das espécies podem sofrer variações conforme a estação do ano, grau higroscópico do ar, localidade, entre outros (LACAZ et al., 2002; SIDRIM; ROCHA, 2010).

Nas últimas décadas têm surgido infecções causadas por leveduras como uma causa comum e significativa de morbidade e mortalidade em pacientes imunocomprometidos. A maioria das infecções fúngicas é causada por fungos oportunistas geralmente reconhecidos, tais como *Candida spp.*, *Cryptococcus neoformans* e fungos dimórficos. No entanto, as leveduras atualmente saprófitas como *Rhodotorula spp.*, *Trichosporon spp.*, *Malassezia spp.* e *Geotrichum candidum* vêm surgindo como patógenos oportunistas (THAKUR et al., 2007).

*Rhodotorula* é uma levedura do tipo basidiomiceto, que pertence ao filo *Basidiomycota*, ordem *Sporidiales*, família *Sporodiobolaceae* e subfamília *Rhodotorulalodeae* (FELL et al., 2000; SCORZETTI et al., 2002). O gênero *Rhodotorula* integra trinta e quatro espécies embora apenas três estejam relacionadas a infecções no homem, *R. glutinis*, *R. minuta* e *R. mucilaginosa*. A diferença entre estas espécies reside principalmente no perfil de assimilação de carboidratos e nitratos. As *Rhodotorula spp.* geralmente apresentam aspecto liso e/ou mucoso, e pigmento carotenóide típico, variando de cor amarelada a vermelho (FELL; STATZELL-TALLMAN, 1998; WARREN; HAZEN, 1999; ALMEIDA, 2005).

Vários autores têm isolado espécies de *Rhodotorula* em diferentes ecossistemas e ambientes, podendo ser encontrado no ar atmosférico, bem como na colonização da pele, saliva, urina e fezes, além das infecções descritas em animais. Nas duas últimas décadas o gênero *Rhodotorula* tem sido reconhecido como agentes patogênicos (LARONE, 1995; MICELI; DIAZ; LEE, 2011).

Com o aumento acentuado e cada vez maior de indivíduos com a imunidade comprometida, como doentes infectados com vírus da imunodeficiência humana, com diabetes, com câncer, transplantados, entre outros, do mesmo modo que, o aumento da resistência aos antifúngicos disponíveis e a utilização de determinados métodos médicos invasivos, formam um conjunto de fatores que causam o aumento das infecções fúngicas emergentes (MCCALL; BADDLEY, 2010; ABU-ELTEEN; HAMAD, 2012).

O primeiro relato de fungemia causada por *Rhodotorula spp.* foi feita por Louria; Greenberg; Molander (1960). Subsequentemente, um número crescente de casos, tem sido publicado, especialmente nas últimas duas décadas. No entanto, este aumento de publicação pode ser após o reconhecimento desse agente como patógeno. Outra explicação, possível, é a dramática expansão de novas modalidades de tratamento relacionada à medicina intensiva e transplante, além do uso prévio de antimicrobianos, nutrição parenteral, e cirurgia abdominal. (ZAAS et al., 2003; MICELI; DÍAZ; LEE, 2011; WIRTH; GOLDANI, 2012; SPILIOPOULOU; ANASTASSIOU; CHRISTOFIDOU, 2012).

Infecção da corrente sanguínea é a forma mais frequente descrita na literatura, estudos sobre essa incidência mostrou-se entre 0,5% e 2,3% nos EUA e na Europa, respectivamente (LUNARDI et al., 2006; ALMEIDA et al., 2008). Outras infecções que estão relacionadas a esse tipo de patógeno incluem endoftalmite, onicomicose, meningite, infecções de próteses articulares e peritonite, têm sido relatados em pacientes imunocompetentes e imunocomprometidos (DUGGAL et al., 2011; WIRTH; GOLDANI, 2012).

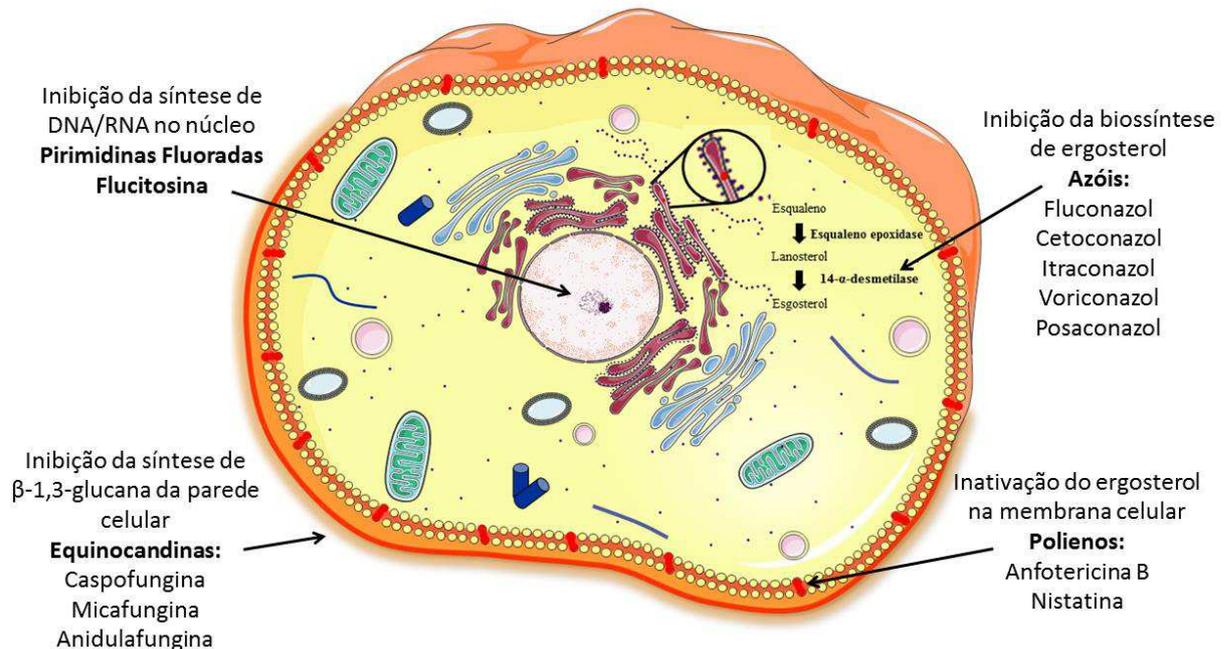
Estudo realizado por García-Suárez et al. (2011) analisa 29 casos de fungemia por *Rhodotorula* em pacientes com doenças hematológicas, mostrando que 100% dos pacientes que desenvolveram fungemia estavam associados a algum tipo de acesso venoso central. Um levantamento de infecções por espécies de *Rhodotorula* realizado por Tuon; Costa (2008) analisando 66 pacientes com fungemia, mostra

que a *R. mucilaginosa* foi responsável pela maioria dos casos, seguida por *R. glutinis*.

Segundo Nunes et al. (2013) a correlação entre fungemia ocasionada por *Rhodotorula spp.* estar diretamente relacionada com a duração do uso do cateter, atribuído na formação de biofilmes, dados publicados pelo autor demonstrou a capacidade dessas espécies, principalmente *R. mucilaginosa* e *R. minuta*, verificando também que isolados clínicos são melhores na formação de biofilmes do que cepas isoladas do ambiente.

Os agentes terapêuticos atuais podem ser divididos em dois grupos: o primeiro, os antifúngicos que ocorrem naturalmente, tais como os polienos e as equinocandinas, e o segundo, os fármacos sintéticos, incluindo os azóis e as pirimidinas fluoradas (RANG et al., 2007). Os antifúngicos podem atuar em diferentes alvos moleculares (Figura 1, pág. 16).

**Figura 1 - Mecanismo de ação dos antifúngicos**



**Fonte:** Elaborada pela autora, 2016.

Introduzido na década de 1950, a classe dos polienos representa a mais antiga família de fármacos antifúngicos (MOHR et al., 2008; MATHEW; NATH, 2009). Apesar do amplo grupo de polienos, apenas dois fármacos são os mais usados clinicamente, a anfotericina B e a nistatina, apresentam estruturas químicas similares e o mesmo mecanismo de ação (RANG et al., 2007). A anfotericina B é uma mistura

de substâncias derivadas de cepas de *Streptomyces nudous*, bactéria que habita o solo. A anfotericina B apresenta um espectro de ação muito amplo, mostrando uma atividade maior para a maioria dos fungos patogênicos. Dependendo da sua concentração e da sensibilidade do microrganismo, pode assumir uma ação fungicida (BOSSCHE; ENGELEN; ROCHETTE, 2003; DELUCIA; OLIVEIRA, 2004; LUISI et al., 2008; KLEPSER, 2011).

A atividade antifúngica dos polienos é mediada por meio da ligação ao ergosterol, um componente primordial para a membrana fúngica, a formação desse complexo, resulta na criação de poros na membrana. Esses canais formados aumentam a permeabilidade da membrana, gerando um desequilíbrio nas concentrações de componentes celulares, incluindo proteínas e cátions monovalentes e divalentes, levando a perda do potencial de membrana e consequentemente, morte celular (MOHR et al., 2008; MATHEW; NATH, 2009; CHANDRASEKAR, 2011).

As características semelhantes entre os esteroides lipídicos, ergosterol e colesterol, explicam em grande parte, os efeitos colaterais ocasionados pela anfotericina B, principalmente a nefrotoxicidade, apresentando uma alta incidência e morbidade em pacientes. Esses efeitos colaterais são justificados pelo mecanismo de ação da molécula que apresenta uma alta afinidade com o colesterol, um esteroide lipídico encontrado nas células dos mamíferos (ODDS et al., 2003; LANIARDO-LABORIN; CABRALES-VARGAS, 2009).

Os azóis são os antifúngicos mais utilizados na prática clínica e, consequentemente, são também a classe mais estudada pela comunidade científica. Dividem-se em dois grupos: os imidazóis (cetoconazol e miconazol) e os triazóis (itraconazol, fluconazol e voriconazol) (VANDEPUTTE; FERRARI; COSTE, 2012). Os azóis também exercem seus efeitos na membrana da célula fúngica, atuando na via de inibição do ergosterol. Sua atividade se dá por meio da inibição da 14- $\alpha$ -desmetilase, acarretando no acúmulo do lanosterol na célula fúngica e na interrupção da biossíntese de ergosterol, gerando a perda da integridade da membrana. Estes antifúngicos, principalmente o fluconazol, causam menos efeitos adversos que a anfotericina B, embora apresente menor potência antifúngica (THOMPSON; CADENA; PATTERSON, 2009; PFALLER, 2012).

Representando uma nova classe de fármacos antifúngicos, as equinocandinas, aprovados pela FDA (Food and Drug Administration) para o tratamento de infecções

fúngicas sistêmicas, têm como alvo farmacológico a  $\beta$ -1,3-glucano sintase, uma enzima responsável para a síntese de  $\beta$ -1,3-D-glucano, componente essencial da parede celular de vários fungos. A ação desses antifúngicos leva a desestabilização da parede celular fúngica, conseqüentemente lise e morte celular (PFALLER et al., 2011).

O análogo de pirimidina, a flucitosina, apresenta uma ação limitada e toxicidade considerável quando usado isoladamente, além da facilidade dos microrganismos desenvolverem mecanismos de resistência. Seu mecanismo ocorre quando a flucitosina é convertida no antimetabólito 5-fluorouracil nas células fúngicas. A 5-fluorouracil, que inibe a timidilato sintetase e, portanto, a síntese de DNA (MATHEW; NATH, 2009; WILSON; DREW; PERFECT, 2009).

Outra classe descoberta em 1970 é a alilaminas que atuam inibindo a síntese de ergosterol, porém por uma via diferente dos compostos azólicos. São inibidores reversíveis da esqualeno epoxidase, uma enzima envolvida nas etapas iniciais da síntese de esteróis (ODDS; BROWN; GOW, 2003; CARRILO-MUÑOZ et al., 2010).

Existem poucos estudos que determinam a sensibilidade de isolados clínicos de *Rhodotorula spp.* contra diferentes agentes antifúngicos (ZAAS et al., 2003; ALMEIDA et al., 2008; KRZYSCIAK; MACURA, 2010). Todas as *Rhodotorula spp.* foram consideradas intrinsecamente resistentes aos azóis (voriconazol e fluconazol) e equinocandinas. Recentemente, a profilaxia ou o tratamento com fluconazol foi considerado um fator de risco para fungemia por *Rhodotorula*, pacientes que receberam azóis e equinocandinas tiveram risco de avanço de desenvolver fungemia (PFALLER et al, 2009; POSTERARO et al., 2015).

Ainda é um desafio constante o tratamento das infecções fúngicas emergentes, pois os dados existentes sobre a dose ideal e o tipo de terapia adequada estão condicionados, à falta da realização de testes de sensibilidade. O tratamento tende a ser mais duradouro, muitos fármacos antifúngicos são demasiados caros e tem um grande potencial de causar toxicidade ou interações com outros tipos de medicamentos (HUPRIKAR; SHOHAM, 2013).

O aumento significativo da resistência clínica aos antifúngicos, devido ao diagnóstico tardio e o relativo número reduzido de classes de antifúngicos acessíveis, favorecem o aumento da mortalidade atribuída às infecções sistêmicas. Associado a isso, a resistência fúngica aos agentes disponíveis tornou-se um problema para alguns grupos de pacientes, especialmente os imunocomprometidos

(CANNON et al., 2009). Muitos microrganismos que causam danos à saúde humana exibem resistência aos antimicrobianos devido ao seu uso inadequado (SILVA et al., 2008).

O fenômeno de resistência pode ser entendido como uma seleção de cepas com perfil genético modificado. Existem diferentes mecanismos bioquímicos que colaboram para o fenótipo de resistência a fármacos. Os mais rotineiros entre eles envolvem uma modificação na membrana plasmática reduzindo a permeabilidade ou a captação do fármaco, alterações estruturais no sítio alvo e um aumento no efluxo dos fármacos ou alteração nos níveis intracelulares dos fármacos (BOSSCHE, 1997; DEISING et al., 2008).

A utilização de plantas com fins medicinais é uma prática antiga, até hoje é empregada na medicina popular. Segundo a Organização Mundial de Saúde, entre 70 a 90% países em desenvolvimento depende do uso de plantas medicinais como única forma de terapia para as mais diversas doenças (ARAÚJO et al, 2013). Assim, existe uma necessidade para a descoberta de novos fármacos a partir de fontes naturais, incluindo plantas, na busca de substâncias mais eficazes e menos tóxicas (HUSSAIN et al., 2015).

As plantas produzem uma grande diversidade de metabólitos secundários. Acredita-se que existam mais de 100.000 metabólitos secundários envolvidos nos sistemas de defesa das plantas, surgindo como uma resposta química às interações com predadores ao longo de séculos de evolução (WINK, 1999; SCHAFER; WINK, 2009).

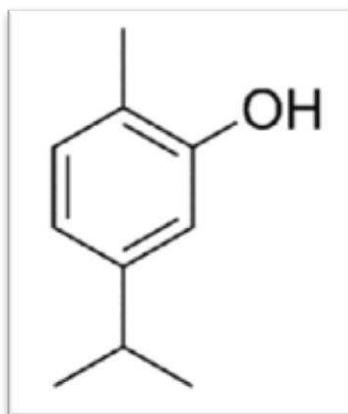
Os óleos essenciais são considerados metabólitos secundários importantes para a defesa das plantas, extraídos a partir de plantas aromáticas, geralmente conhecidas devido suas propriedades medicinais e por serem amplamente utilizadas para tratar uma variedade de doenças. Os seus constituintes variam desde hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinos, até compostos de enxofre. Esses constituintes podem variar as concentrações entre os óleos, e na maioria das vezes um deles é o componente majoritário, existindo outros em menores teores (BAKKALI et al., 2008; TAJKARIMI; IBRAHIM; CLIVER, 2010; HYLDGAARD; MYGIND; MEYER, 2012).

Os óleos essenciais mais conhecidos e utilizados são constituídos basicamente por duas classes de compostos, os terpenos e fenilpropenos, sendo os terpenos

mais abundantes. Os terpenos são compostos hidrogenados de cadeias carbônicas cíclicas ou alifáticas, a sua nomenclatura e classificação se dá em função das unidades de isoprenos ( $C_5H_8$ ) presentes na molécula. Os monoterpenos consistem em uma estrutura de 10 carbonos, constituída a partir do acoplamento de duas unidades de isoprenos. Três unidades de isoprenos ( $C_{15}$ ) constituem os sesquiterpenos, quatro unidades ( $C_{20}$ ) constituem os diterpenos, e assim por diante (WATERMAN, 1993; LOPES, 1997).

Diversas plantas apresentam o carvacrol como principal constituinte de seus óleos essenciais, dentre as espécies de vegetais que apresentam este fitoconstituintes estão, *Lippia gracilis* Schauer, *Lippia grandis* Schauer, *Origanum dictamnus*, *Origanum vulgare* (orégano), *Origanum Majorana*, *Timbra capitata*, *Satureja hortensis*, *Thymus vulgaris*, *Thymus serpyllum* e *Satureja montana* (VOKOU; KOKKINI; BESSIERE, 1993; ULTEE; BENNIK; MOEZELAAR, 2002; BURT, 2004; DE VINCENZI et al., 2004; ALBUQUERQUE, 2006; MONZOTE et al., 2009; LIOLIOS et al., 2010; SARRAZIN et al., 2012). O carvacrol (2-metil-5-isopropilfenol) é um monoterpeno (Figura 2, pág. 20) fenólico, sendo um dos fitoconstituintes mais estudados dentre os óleos essenciais, devido às diversas propriedades que apresenta, entre elas, antioxidante, hepatoprotetor, espasmolítico, vaso-relaxante, ainda possui atividade contra o câncer, além de apresentar atividade antimicrobiana (SIKKEMA et al., 1995; NOSTRO; PAPALIA, 2012; BUCHBAUER; ILIC, 2013).

**Figura 2** - Estrutura química do carvacrol



Fonte: HYLDGAARD et al. (2012).

Na literatura é possível encontrar diversos estudos que exemplificam a atividade antimicrobiana de extrato de plantas, óleos essenciais e seus constituintes químicos contra cepas de diferentes gêneros. O carvacrol, por exemplo, já foi testado contra *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida spp.* e *Streptococcus spp.* (NOSTRO et al., 2007; FREITAS et al., 2013; MAGI, MARINI; FACINELLI, 2015).

Apesar dos recentes progressos no tratamento de infecções fúngicas invasivas, a incidência dessas infecções é crescente e as taxas de resposta à terapia de primeira linha continuam a ser insuficientes. Esta falha clínica levou a algumas alternativas como, o incentivo no desenvolvimento de novos agentes antifúngicos, ou ainda associar dois ou mais agentes antifúngicos (FOHRER et al., 2006).

Existem várias razões para o uso de duas ou mais substâncias combinadas com atividade antifúngica. As combinações podem permitir a diminuição das dosagens de fármaco e, portanto, diminuir o perfil de efeitos adversos, além disso, uma combinação melhoraria a segurança e tolerabilidade de fármacos considerados tóxicos, como também proporcionaria o aumento da eficácia. Outra razão seria alcançar atividade fungicida que pode não ser possível com apenas um agente, retardando ainda o surgimento de resistência aos medicamentos. A terapia de combinação pode fornecer cobertura de amplo espectro para os pacientes gravemente doentes. Desta forma, o uso de múltiplos fármacos com diferentes mecanismos de ação, provavelmente, pode atingir diversos alvos, agindo de modo mais eficaz contra o microrganismo (LEWIS; KONTOYIANNIS, 2001; CHOU, 2006; VAZQUEZ, 2008).

Diferentes métodos possibilitam o estudo dos efeitos da combinação entre fármacos. O teste *Checkerboard* é o mais utilizado, por ser um método de fácil execução, capaz de determinar a inibição do crescimento de células fúngicas na presença da combinação de dois fármacos em diferentes concentrações, utilizando microplacas de microdiluição ou tubos de ensaios, as diluições variam acima e abaixo da CIM, sendo calculado em relação ao controle positivo para crescimento fúngico. A interpretação dos resultados é determinada através do índice da concentração inibitória fracionada (ICIF) (ODDS, 2003; O'SHAUGHNESSY et al., 2006).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral:

- Avaliar a atividade antifúngica do carvacrol quando associado com os agentes antifúngicos contra cepas de *Rhodotorula spp.*

#### 3.2 Objetivos específicos:

- Avaliar a CIM do carvacrol frente às cepas *Rhodotorula spp.*
- Determinar as CIMs da anfotericina B, cetoconazol e itraconazol contra cepas de *Rhodotorula spp.*
- Avaliar o efeito da combinação do carvacrol quando associado com anfotericina B, cetoconazol e itraconazol.

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1 Local**

Os ensaios laboratoriais referentes aos estudos de investigação da atividade antifúngica foram realizados nos Laboratórios de Bioquímica (J-08) e Microbiologia (J-11) do Centro de Educação e Saúde da Universidade Federal de Campina Grande, campus Cuité, Paraíba.

### **4.2 Meios de cultura**

Na execução dos ensaios da atividade antifúngica, foi utilizado para o cultivo das cepas fúngicas o meio sólido agar sabouraud dextrose (ASD) e para a realização dos experimentos o meio líquido caldo sabouraud dextrose (CSD), adquiridos da Difco<sup>®</sup> (Le Pont de Claix, France). O preparo e acondicionamento destes meios seguiram as instruções do fabricante.

### **4.3 Cepas fúngicas**

Para realização dos ensaios de atividade antifúngica foram selecionadas 6 cepas leveduriformes do gênero *Rhodotorula*: LMP-1, LM-139, LM-680, LM-702, LM-840 e LM-940, fornecidas pelo Laboratório de Micologia da Universidade Federal da Paraíba.

### **4.4 Antifúngicos**

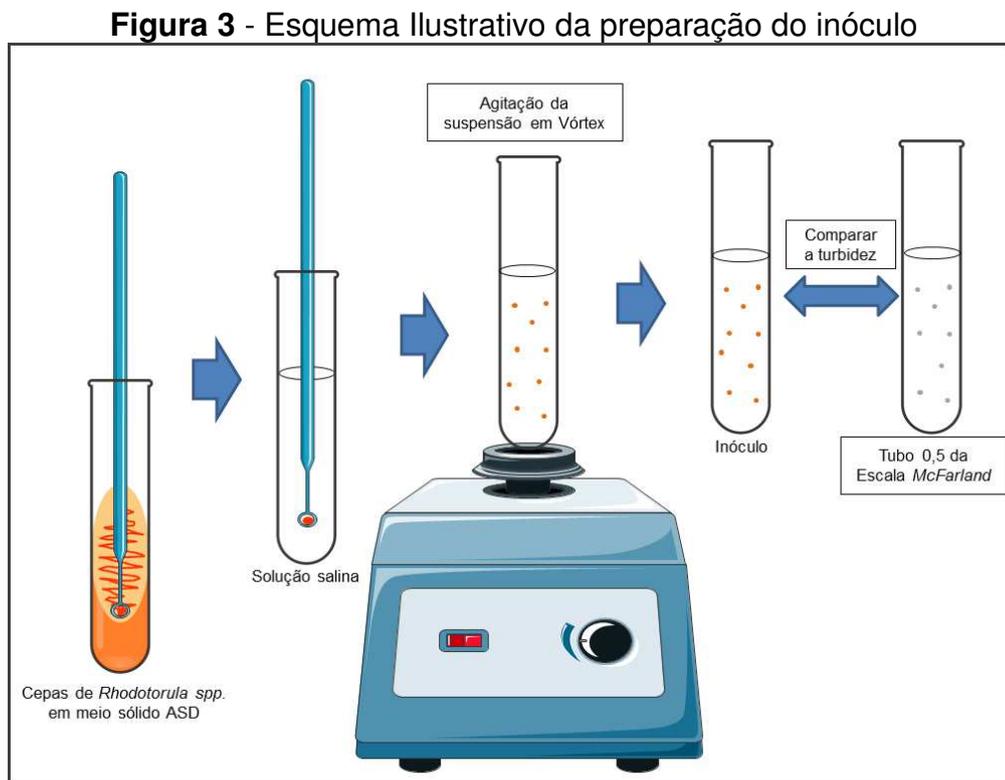
Foram utilizados os antifúngicos: anfotericina B, cetoconazol e itraconazol. O preparo das soluções foi realizado no momento da execução dos experimentos, utilizando água destilada estéril com adição de dimetilsulfóxido (DMSO), com auxílio do vórtex para a completa solubilização das soluções dos antifúngicos. Foram realizados testes controles com o DMSO nas mesmas concentrações utilizadas com os antifúngicos.

#### 4.5 Preparação da emulsão do carvacrol

O carvacrol utilizado no ensaio foi adquirido da Sigma-Aldrich® (Steinheim, Germany). As emulsões do fitoconstituente foram preparadas no momento do experimento, dissolvido primeiramente em água destilada estéril e em seguida adicionado o Tween® 80 (polissorbato), utilizando o auxílio do vórtex para solubilização.

#### 4.6 Preparação do inóculo

As cepas de *Rhodotorula spp.* foram mantidas em meio de cultura ASD durante 24-48 horas a 28°C. Para o preparo das suspensões com os microrganismos foram utilizados tubos contendo solução salina (NaCl a 0,9%). Em seguida, as suspensões foram agitadas com o auxílio do vórtex até total dissolução e homogeneização. A turbidez dos inóculos foi comparada e ajustada com o tubo 0,5 da escala *McFarland* que corresponde a  $1-5 \times 10^6$  unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) (Figura 3, pág. 24) (CLEELAND; SQUIRES, 1991; HADACEK; GREGER, 2000).



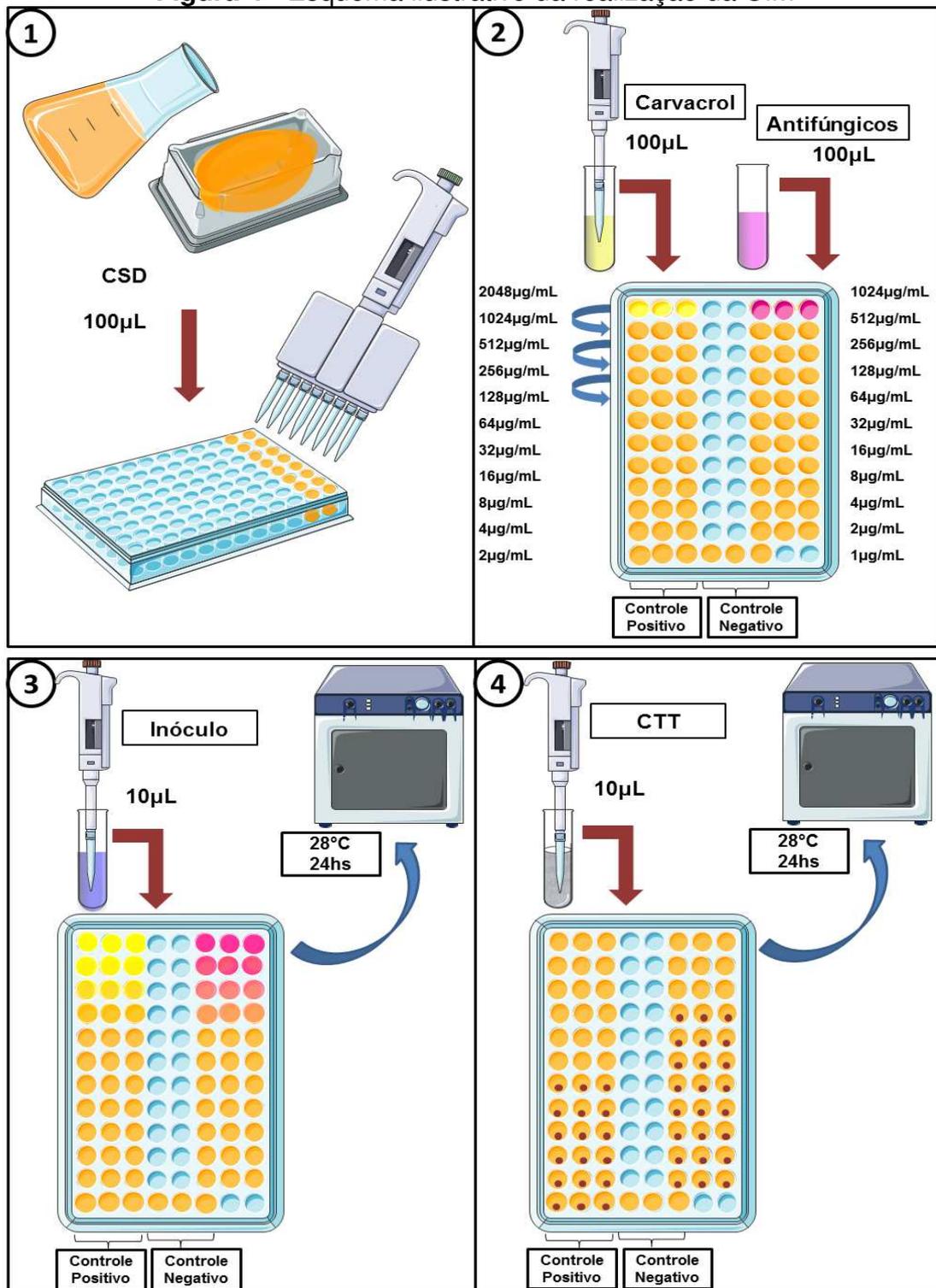
Fonte: Elaborada pela autora, 2016.

#### 4.7 Determinação da concentração inibitória mínima

As determinações das CIMs do carvacrol e dos agentes antifúngicos (anfotericina B, cetoconazol e itraconazol) foram realizadas através do método de microdiluição em caldo estabelecido pelo protocolo da CLSI (2008) (*Clinical and Laboratory Standards Institute*), documento M27-A3, realizando algumas modificações. Foram utilizadas microplacas de 96 cavidades preenchidas com CSD (100µL em cada cavidade) como meio de cultura (1, Figura 4, pág. 26), posteriormente foi realizada a adição das substâncias nas primeiras fileiras das microplacas, realizando a diluição seriada 1:2 de cada substância, individualmente. O carvacrol e os antifúngicos foram testados nas concentrações 2048µg/mL a 2µg/mL e 1024µg/mL a 1µg/mL, respectivamente (2, Figura 4, pág. 26). Adicionando, por último, 10µL do inóculo do microrganismo, sendo conduzido com aproximadamente  $1-5 \times 10^5$  UFC/mL, em cada cavidade (3, Figura 4, pág. 26). Os experimentos foram realizados em triplicata, garantindo sempre nas últimas linhas os controles positivos (CSD e microrganismo) e os controles negativos (apenas CSD). As microplacas foram incubadas em temperatura de 28°C por 24-48 horas, até sua leitura. As leituras foram feitas tanto visualmente como também com a utilização de 20µL de cloreto 2,3,5-trifenil tetrazólio (CTT) a 1% (4, Figura 4, pág. 26).

A CIM foi considerada como a menor concentração capaz de inibir o crescimento visível das cepas fúngicas nas cavidades, sem turvação ou formação de aglomerado (botão), comparando com os controles positivos e confirmado pelo CTT (CLSI, 2008). O CTT é uma substância incolor que quando na presença de microrganismo viáveis se reduz para formazano com coloração vermelha, através de uma ação enzimática (Figura 5, pág. 27) (BELOTI et al., 1999).

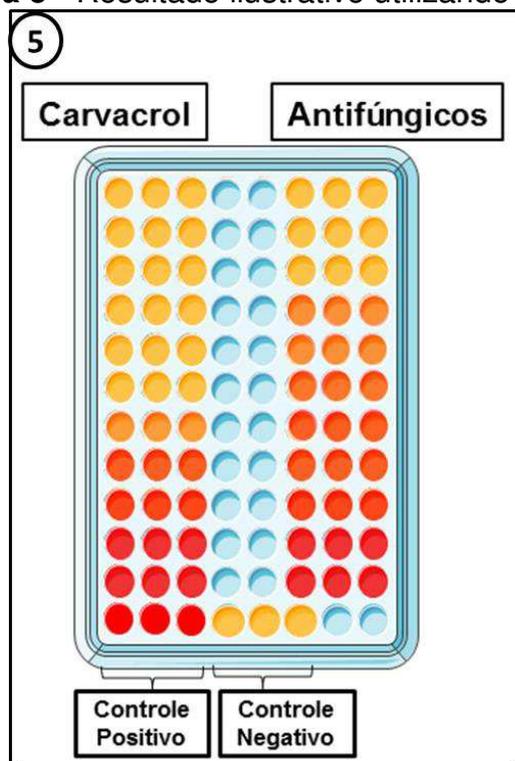
**Figura 4 - Esquema ilustrativo da realização da CIM**



- 1- Adição do CSD na microplaca.
- 2- Adição das substâncias (individualmente) na primeira linha da microplaca.
- 3- Adição do inóculo na microplaca.
- 4- Adição do CTT na microplaca.

**Fonte:** Elaborada pela autora, 2016.

**Figura 5** - Resultado ilustrativo utilizando o CTT



Fonte: Elaborada pela autora, 2016.

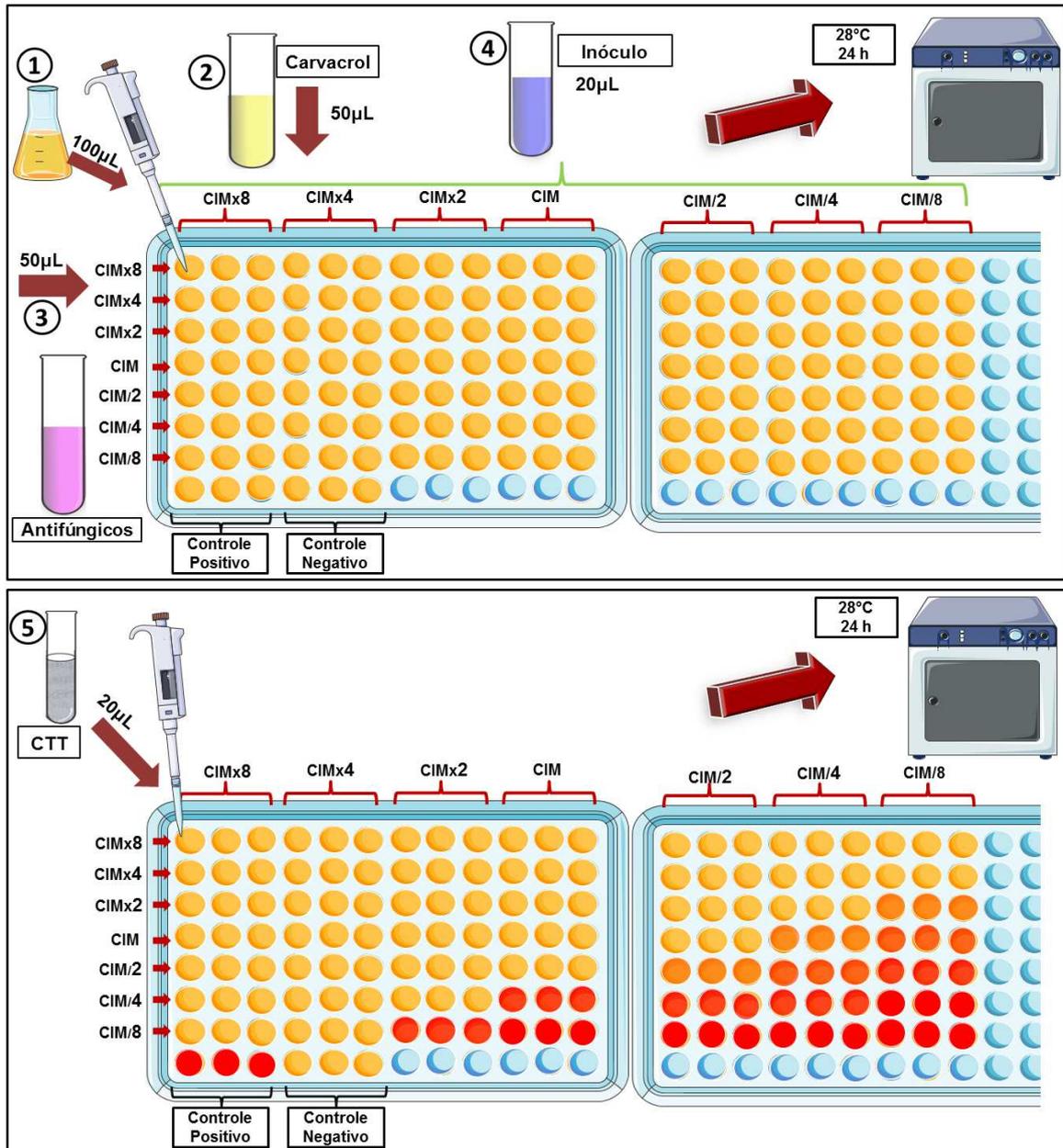
#### 4.8 Método *Checkerboard*

O estudo de associação entre o carvacrol e os antifúngicos (anfotericina B, cetoconazol e itraconazol) foi executado utilizando a técnica *Checkerboard*, a partir dos resultados obtidos das CIMs pela técnica de microdiluição em caldo. Inicialmente, foram preparadas sete diluições com concentrações diferentes tanto do carvacrol quanto dos antifúngicos, CIMx8, CIMx4, CIMx2, CIM, CIM/2, CIM/4 e CIM/8.

Adicionando primeiramente 100µL do CSD em cada cavidade da microplaca (1, Figura 6, pág. 28). Posteriormente, foi adicionado 50µL do carvacrol no sentido vertical na placa nas seguintes concentrações, CIMx8, CIMx4, CIMx2, CIM, CIM/2, CIM/4 e CIM/8 (2, Figura 6, pág. 28), e 50µL dos antifúngicos (individualmente) no sentido horizontal, CIMx8, CIMx4, CIMx2, CIM, CIM/2, CIM/4 e CIM/8 (3, Figura 6, pág. 28). Desta maneira, as diversas concentrações do carvacrol foram testadas na presença de várias concentrações de cada um dos antifúngicos. Adicionando 20µL do inóculo em cada cavidade, sempre garantindo os controles positivos e os controles negativos (4, Figura 6, pág. 28). As microplacas foram incubadas a 28°C

por 24-48 horas. A leitura das microplacas também foi feita visualmente e com a utilização do CTT (5, Figura 7, pág. 28). Todos os testes foram realizados em triplicata.

**Figura 6** - Esquema ilustrativo de como foi preparado o *Checkerboard*



- 1- Adição do CSD na microplaca.
- 2- Adição do carvacrol verticalmente na microplaca.
- 3- Adição do antifúngico horizontalmente na microplaca.
- 4- Adição do inóculo na microplaca;
- 5- Adição do CTT na microplaca.

**Fonte:** Elaborada pela autora, 2016.

O Índice da Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) foi calculado através da soma da concentração inibitória fracionada do  $CIF^A + CIF^B$ , onde A representa o carvacrol e B os antifúngicos. O  $CIF^A$ , por sua vez, foi calculado através da relação  $CIM^A$  em combinação/  $CIM^A$  individual, enquanto que o  $FIC^B = CIM^B$  em combinação/ $CIM^B$  individual. O ICIF foi interpretado da seguinte forma: sinergismo ( $\leq 0,5$ ), aditividade ( $>0,5$  a  $1,0$ ), indiferença ( $>1$  e  $<4$ ) ou antagonismo ( $\geq 4,0$ ) (CHIN; WEITZMAN; DELLA-LATTA, 1997).

$$ICIF = CIF^A + CIF^B$$

$$ICIF = \frac{CIM^A \text{ em combinação}}{CIM^A \text{ individual}} + \frac{CIM^B \text{ em combinação}}{CIM^B \text{ individual}}$$

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Determinação da concentração inibitória mínima do carvacrol

Foram determinadas as CIMs do carvacrol frente a 6 cepas de *Rhodotorula spp.*. Os valores das CIMs são mostradas na Tabela 1. O carvacrol apresentou uma inibição frente a todos os microrganismos testados, variando a concentração entre 8µg/mL a 128µg/mL, sendo que a cepa LM-139 apresentou uma maior sensibilidade ao carvacrol.

De acordo com Sartoratto et al. (2004) a CIM entre 50 e 500µg/ml é considerada uma forte atividade antimicrobiana, CIM entre 600 e 1500µg/mL atividade moderada e CIM acima de 1500µg/mL é considerada uma atividade fraca. Portanto, pode-se considerar que o carvacrol possui forte atividade contra isolados clínicos de *Rhodotorula spp.* apresentando resultados abaixo de 500µg/mL.

Devendo salientar que nos controles positivos (CSD e microrganismo) houve crescimento dos microrganismos, demonstrando a viabilidade das cepas, e nos controles negativos (apenas CSD) não foi observado crescimento fúngico, mostrando assim a esterilidade do meio utilizado.

**Tabela 1** - Resultados das CIMs (µg/mL) do carvacrol frente às cepas estudadas

Cepas <i>Rhodotorula spp.</i>	Carvacrol
LMP-1	128
LM-139	8
LM-680	32
LM-702	64
LM-840	64
LM-940	64

**Fonte:** Dados da Pesquisa, 2016.

Inúmeros trabalhos vêm relatando a atividade antimicrobiana do carvacrol contra diferentes espécies de fungos. Resultado encontrado por Abbaszadeh et al. (2014), com fungos filamentosos, entre eles *Aspergillus niger* (CIM 50µg/mL), *Cladosporium spp.* (CIM 100µg/mL), *Fusarium oxysporum* (CIM 125µg/mL) e

*Rhizopus oryzae* (CIM 200µg/mL). Lima et al. (2013) relatou uma alta atividade do carvacrol frente isolados clínicos de *Candida albicans* (CIM 128µl/mL). Atividade anti-*candida* também foi demonstrado pelo carvacrol em estudo realizado por Ahmad et al. (2011) com cepas de *Candida* sensíveis e resistentes ao fluconazol, apresentando valores de CIMs de 75mg/L a 90mg/L e 75mg/L a 100mg/L, respectivamente. Nóbrega et al. (2016) avaliando a atividade do carvacrol contra *Cryptococcus neoformans*, evidenciou resultados significativos com CIMs entre 25-81µg/mL. É importante relatar que até o momento não foi encontrado na literatura trabalhos que determine a CIM do fitoconstituente carvacrol contra cepas *Rhodotorula spp.*

Sua atividade também foi evidenciada contra espécies de bactérias. *Streptococcus* do grupo A resistente à eritromicina teve seu crescimento inibido na presença do carvacrol (CIM 64µg/mL a 256µg/mL) (MAGI; MARINI; FACINELLI, 2015). Assim como isolados clínicos de *Mycoplasma hominis* (SLEHA et al., 2014) e *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum* (CIANDRINI et al., 2014).

Além disso, diferentes óleos essenciais demonstraram uma considerável atividade antimicrobiana, apresentando o carvacrol como componente majoritário. Zomorodian et al. (2015) avaliando atividades de óleos essenciais em fungos e bactérias observaram que óleos ricos em monoterpenos fenólicos, incluindo carvacrol, mostraram uma maior atividade antimicrobiana, principalmente do óleo *Satureja khuzestanica* (87% de carvacrol). Essa atividade também foi demonstrada pelo óleo *Origanum vulgare* (64,5% de carvacrol) contra *Bacillus subtilis*, *Enterobacter cloacae*, *Micrococcus flavus*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* e *S. typhimurium* (SOKOVIC et al., 2010).

Os resultados deste trabalho corroboram com os encontrados por outros autores com relação à atividade do carvacrol em inibir o crescimento fúngico. O uso de plantas aromáticas para fins medicinais é feito há milhares de anos, logo essa prática permanece até os dias atuais. As plantas ainda são a maior fonte de novas moléculas promissoras (KINGHORN et al., 2011).

A comparação entre os resultados de testes de sensibilidade antimicrobiana *in vitro*, é muitas vezes difícil, sendo justificada pela falta de padronização entre as

técnicas utilizadas, como por exemplo, a preparação do inóculo, meio de crescimento, condições de incubação, entre outros (BALOUIRI et al., 2016).

Existem diferentes métodos para avaliar atividade antimicrobiana de produtos naturais, os mais conhecidos são, método de difusão em ágar, difusão em disco, macro e microdiluição em caldo. Este último apresenta diversas vantagens quando comparado aos demais. Por exemplo, a facilidade de reprodutibilidade, sendo trinta vezes mais sensíveis que outros métodos usados na literatura, além de ser simples e econômico, requerendo pouca quantidade de amostra e meio de cultura. (NASCIMENTO et al., 2007; SCORZONI et al., 2007; OSTROSKY et al., 2008). Esse método permite quantificar a atividade antimicrobiana *in vitro*, estimando a menor concentração da substância utilizada capaz de inibir o crescimento visível do microrganismo (PFALLER et al., 2004).

## 5.2 Determinação da concentração inibitória mínima dos antifúngicos

Apesar do aumento significativo de infecções invasivas por *Rhodotorula spp.* durante os últimos anos, ainda existem poucos estudos na literatura que determinam a sensibilidade desse gênero aos antifúngicos (SEIFI; MAHMOUDABADI; HYDRINIA, 2013).

Na Tabela 2, encontra-se descrita os resultados das CIMs dos antifúngicos (anfotericina B, cetoconazol e itraconazol), frente as cepas de *Rhodotorula spp.*.

**Tabela 2** - Resultados das CIMs ( $\mu\text{g/mL}$ ) dos antifúngicos contra *Rhodotorula spp.*

Cepas <i>Rhodotorula spp.</i>	Anfotericina B	Cetoconazol	Itraconazol
LMP-1	2	8	64
LM-139	2	32	64
LM-680	2	4	64
LM-702	2	4	64
LM-840	2	2	64
LM-940	2	2	64

**Fonte:** Dados da Pesquisa, 2016.

Em concordância com este trabalho, Chitasombat et al. (2012) apresentaram CIMs para anfotericina B superiores a  $1\mu\text{g/mL}$ . Outros trabalhos apresentaram resultados para anfotericina B entre  $0,25-1\mu\text{g/mL}$  contra cepas de *Rhodotorula*

(DICKEMA et al., 2005; CAPOOR et al., 2014). Embora este trabalho apresente resultados um pouco mais elevados, a anfotericina B ainda é a melhor opção para o tratamento das infecções causadas por espécies do gênero *Rhodotorula* (NUNES et al., 2013). Este antifúngico apresentou melhores resultados quando comparado aos demais.

Analisando a atividade do itraconazol contra o gênero *Rhodotorula*, Capoor et al. (2014) obteve CIMs entre 32µg/mL a 256µg/mL contra 14 cepas, valores maiores do que os encontrados nesse trabalho. Em estudo realizado por Diekema et al. (2005) as CIMs para o itraconazol foram superiores a 4µg/mL para quase 30% *Rhodotorula spp.*

Simon et al. (2014) analisando e comparando resultados de laboratórios diferentes, que aplicaram metodologias diferentes (E-test, YeastOne e microdiluição) para determinar a susceptibilidade de *Rhodotorula spp.* aos antifúngicos, constataram uma falta de concordância entre os resultados das CIMs dos antifúngicos, sugerindo que o teste de microdiluição do CLSI é o melhor método para determinar a sensibilidade das cepas e que a mesma deveria ser pelo menos um dos métodos aplicados em laboratórios, uma vez que esse é considerado o padrão ouro atual para testes de sensibilidade.

### **5.3 Determinação do índice da concentração inibitória fracionada**

Os resultados das combinações entre o carvacrol e os antifúngicos contra as cepas de *Rhodotorula spp.* (LM-139, LM-680 e LM-702), utilizando o método *Checkerboard*, são apresentados na Tabela 3. Neste estudo foi possível observar que o carvacrol exibiu resultados bastante significativos *in vitro* contra as cepas de *Rhodotorula spp.*. O carvacrol foi capaz de reduzir as CIMs dos antifúngicos em cinco associações, comparando esses resultados com as CIMs dos antifúngicos sozinhos. Duas mantiveram as CIMs combinadas iguais as individuais. Os resultados foram interpretados de acordo com o ICIF, obtendo um resultado sinérgico, três aditivos e cinco indiferentes, não houve resultados antagônicos.

**Tabela 3** - Índice da concentração inibitória fracionada (ICIF) da combinação do carvacrol e antifúngicos contra *Rhodotorula spp.*

Cepas <i>Rhodotorula</i> <i>spp.</i>	CIM das substâncias combinadas ( $\mu\text{g/mL}$ )		CIF		ICIF	Efeito da interação
	CAR	ANF B	CAR	ANF B		
LM - 139	1	2	0,125	1	1,125	IND
LM - 680	4	4	0,125	2	2,125	IND
LM - 702	128	0,25	2	0,125	2,125	IND
	CAR	CET	CAR	CET		
LM - 139	2	8	0,25	0,25	0,5	SIN
LM - 680	4	4	0,125	1	1,125	IND
LM - 702	32	2	0,5	0,5	1	ADI
	CAR	ITR	CAR	ITR		
LM - 139	1	32	0,125	0,5	0,625	ADI
LM - 680	4	128	0,125	2	2,125	IND
LM - 702	32	32	0,5	0,5	1	ADI

**Fonte:** Dados da Pesquisa, 2016.

CIF, concentração inibitória fracionada.

ICIF, índice concentração inibitória fracionada.

ANF B, anfotericina B; CET, cetoconazol; ITR, Itraconazol.

ADI, aditivo; IND, indiferente; SIN, sinérgico.

Existem diversos estudos na literatura associando o carvacrol com antimicrobianos contra diferentes microrganismos. Além do carvacrol diferentes substâncias extraídas a partir de plantas medicinais seguem em busca de alternativa viável no controle de infecções. Isso é mostrado em diferentes estudos que associam óleos essenciais, extratos de plantas e fitoconstituintes. Vale salientar que até o momento não foram relatados estudos na literatura associando o carvacrol com antifúngicos contra cepas de *Rhodotorula spp.*.

A combinação de óleos essenciais que apresentaram o carvacrol como componente majoritário, contra diferentes bactérias, foi mostrado por Fadli et al.

(2012) quando associaram o *Thymus maroccanus* com *Thymus broussonetii* contra *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus* e *Staphylococcus aureus*, obtendo resultados sinérgicos e aditivos. Da mesma forma, Stojkovic et al. (2013) também encontraram efeito sinérgico na associação de óleos essenciais de *Origanum vulgare* L. (64,50% de carvacrol) e *Thymus vulgaris* contra cepas de bactérias patogênicas (*Staphylococcus aureus* e *Salmonella typhimurium*).

Mahboubi e Kazampour. (2016) investigando a combinação do óleo essencial *Satureja khuzestanica* (seu principal fitoconstituente o carvacrol com 94,1%) com gentamicina e carvacrol com gentamicina observaram uma forte atividade sinérgica para as duas combinações contra cepa *Escherichia coli*, evidenciando uma maior atividade da combinação com o carvacrol. Em outro trabalho realizado por Magi, Marini e Facinelli (2015), associando o carvacrol com eritromicina contra cepas de *Streptococcus* do grupo A resistente à eritromicina teve resultados bastante significativos obtendo efeito sinérgico para 21 cepas e aditivo para 11 cepas.

Doke et al. (2014) avaliaram a atividade de 3 terpenóides (carvacrol, eugenol e timol) em combinação como fluconazol contra *Candida albicans*, o carvacrol exibiu uma excelente atividade sinérgica. Da mesma forma que Ahmad et al. (2013) associando o fitoquímico carvacrol com o fluconazol contra cepas de *Candida* sensíveis e resistente ao fluconazol obtiveram resultados do ICIF da combinação entre 0,25-1 alcançando resultados sinérgicos e aditivos.

Em concordância com este trabalho Jesus et al. (2015) associando o carvacrol com diferentes antifúngicos contra 23 cepas de *Pythium insidiosum*, observaram na associação entre o carvacrol e anfotericina B, interação do tipo indiferente para 14 cepas. Foi observado também que na associação entre carvacrol e itraconazol uma interação do tipo sinérgica para 22 cepas.

Saad et al. (2010) associando os óleos essenciais de *Thymus maroccanus* ou *Thymus broussonetti* com anfotericina B ou fluconazol contra *Candida albicans* obtiveram efeitos sinérgicos, com o valor mais acentuado na associação com o fluconazol. Resultados sinérgicos e indiferentes foram observados na combinação óleo essencial de *Ocimum sanctum* com fluconazol ou cetoconazol contra cepas de *Candida spp.* (AMBER et al., 2010).

A elevada toxicidade e a baixa tolerância têm conduzido estudos da eficácia terapêutica combinada no tratamento e controle das infecções fúngicas invasivas e geralmente essa associação relaciona antifúngicos de diferentes mecanismos de ação (MUKHERJEE et al., 2005; NISHI et al., 2009).

Há evidências que o carvacrol é capaz de afetar a superfície eletrostática da membrana celular, provocando a saída do conteúdo citoplasmático, aumentando a fluidez e a permeabilidade da mesma (HYLDGAARD al., 2012; RAO et al., 2010).

O cetoconazol e o itraconazol atuam no citoplasma fúngico, inibindo a enzima lanosterol 14 $\alpha$ -desmetilase (RANG et al., 2007). É possível dizer que, o carvacrol intensifica a penetração intracelular dos azóis no citoplasma das células fúngicas acelerando o processo de morte do microrganismo.

Entre as metodologias para determinar uma combinação de fármacos *in vitro* estão: *E-test*, *time-kill* e *Checkerboard*. Os dois últimos métodos são os mais utilizados. O método *Checkerboard* tem uma maior facilidade de reprodutibilidade e interpretação, embora seja apenas uma medida relativa da potência para a combinação, como também não fornece detalhes sobre a dinâmica da interação entre os fármacos. O método *time-kill* é capaz de detectar diferenças nas atividades antimicrobianas ao longo do tempo, avaliando a atividade fungicida e bactericida, embora essa metodologia seja muito trabalhosa e requeria mais tempo para a sua execução (WHITE et al., 1996; LEWIS et al., 2002; MUKHERJEE et al., 2005; TEIXEIRA-SANTOS et al., 2012).

A interação entre substâncias podem produzir quatro possíveis tipos de efeitos: sinérgico, aditivo, indiferente e antagônico. Nesse trabalho foi apresentado resultados promissores como a sinergia, observada quando o efeito das substâncias combinadas é maior do que a soma dos efeitos individuais. O efeito aditivo também foi evidenciado por esse trabalho, o qual significa dizer que o efeito combinado é igual à soma dos efeitos individuais, enquanto a ausência de interação é definida como indiferença. A combinação de agentes antifúngicos também pode levar ao antagonismo, tal combinação pode reduzir a capacidade dos agentes em exercer a sua ação. No entanto, esse resultado não foi encontrado por esse trabalho, tornando o carvacrol uma promissora substância a ser usada em combinação com antifúngicos no tratamento de infecções causadas por *Rhodotorula spp.* (BURT, 2004; FOHRER et al., 2006; BASSOLÉ; JULIANI, 2012).

A combinação de dois medicamentos diferentes, que exercem seus efeitos através de dois mecanismos diferentes, poderia evitar o aparecimento de resistência medicamentosa e ampliar o espectro da atividade da combinação. Além disso, com as combinações entre substâncias que possibilita o uso de doses mais baixas de cada composto, reduzindo o risco de efeitos tóxicos dos fármacos (ZHU et al., 2004). Do ponto de vista farmacológico, as substâncias isoladas com ação apenas em um alvo molecular, em geral, são menos eficientes para o tratamento de uma doença, do que a terapia combinada que atuam em vários alvos simultaneamente, potencializando o efeito terapêutico (BIAVATTI, 2009).

Os resultados da associação entre o carvacrol com anfotericina B assim como a associação do cetoconazol contra *Rhodotorula* LM-680 e com o itraconazol para mesma cepa, não atingiram os critérios estabelecidos para que a combinação entre as duas substâncias fosse considerada sinérgica, mas isso não implica dizer que essas combinações não obtiveram resultados satisfatórios, visto que em algumas combinações é possível observar a diminuição das CIMs, quando comparado com as CIMs individuais tanto dos antifúngicos quanto do carvacrol. Segundo Zhu et al. (2004) a combinação ideal de fármacos é aquela que a interação entre elas é sinérgica. Embora, seja possível mesmo na inexistência de sinergismo, ocorrer benefícios nas associações terapêuticas. De acordo com o autor, a associação de dois fármacos pode aumentar a taxa de morte do microrganismo e encurtar o período de tratamento.

## 6. CONCLUSÃO

A partir dos resultados encontrados por esse estudo foi possível observar que o carvacrol demonstrou atividade antifúngica contra cepas de *Rhodotorula spp.*. Para os antifúngicos foi possível determinar as CIMs, com resultados significativos principalmente para anfotericina B. O carvacrol quando associado com cetoconazol o efeito observado foi sinérgica contra a cepa *Rhodotorula spp.* LM-139. Resultados aditivos também foram evidenciados na associação do carvacrol com o itraconazol e com o cetoconazol. Enquanto que a indiferença foi demonstrada em cinco associações, principalmente na associação do carvacrol com a anfotericina B. É importante observar que não houve resultados antagônicos nesse trabalho.

Essa avaliação foi promissora no que se refere à redução de doses de agentes antifúngicos *in vitro*. Isso demonstra que a associação de substâncias oriundas de plantas, como componentes de óleos essenciais, com antifúngicos podem ser promissora no combate de microrganismos causadores de infecções em seres humanos, como a *Rhodotorula spp.*, embora esses testes de susceptibilidade antifúngica *in vitro* não possam prever a resposta bem sucedida em pacientes, necessitando de mais estudos que avaliem a eficácia, segurança e sua possível aplicação terapêutica.

## 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, n. 2, p. 51-56, jun. 2014.
- ABU-ELTEEN, K. H.; HAMAD, M. A. Changing epidemiology of classical and emerging human fungal infections: a review. **Jordan Journal of Biological Sciences**, v. 5, n. 4, p. 215–230, dec, 2012.
- 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, n. 1, p. 41-50, jan. 2011.
- AHMAD, A.; KHAN, A.; MANZOOR, N. Reversal of efflux mediated antifungal resistance underlies synergistic activity of two monoterpenes with fluconazole. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n. 1-2, p. 80–86, jan. 2013.
- ALBUQUERQUE, C. C.; CAMARA, T. R.; MARIANO, R. L. R.; WILLADINO, L.; MARCELINO-JUNIOR, C.; ULISSES, C. Antimicrobial Action of the Essential Oil of *Lippia gracilis* Schauer. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n. 4, p. 527-535, jul. 2006.
- ALMEIDA, G. D. M. ***Rhodotorula spp.* Isoladas de hemocultura no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo: características clínicas e microbiológicas**. São Paulo, SP, 2005. Originalmente apresentado tese de doutorado, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2005.
- ALMEIDA, G. M. D.; COSTA, S. F.; MELHEM, M.; MOTTA, A. L.; SZESZS, M. W.; MIYASHITA, F.; PIERROTTI, L. C.; ROSSI, F.; BURATTINI, M. N. *Rhodotorula spp.* Isolated from blood cultures: clinical and microbiological aspects. **Medical Mycology**, São Paulo, v. 46, n. 6, p. 547- 556, sep. 2008.
- 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, n. 12, p. 921-925, oct. 2010.
- ARAÚJO, E. J. F.; ARAÚJO, D. Y. M. L.; FREITAS, R. M.; FERREIRA, P. M. P. Aspectos toxicológicos da planta medicinal *Casearia sylvestris* Swartz: revisão de

literatura. **Revista de ciências farmacêuticas básica e aplicada**, v. 35, n. 3, p. 355-361, jun. 2013.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils- a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446–475, Feb. 2008.

BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S. K. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 6, n. 2, p. 71-79, apr. 2016.

BARKER, K. S.; ROGERS, P. D. Recent insights into the mechanisms of antifungal resistance. **Current in Infectious Disease Reports**, v. 8, n. 6, p. 449-456, nov. 2006.

BASSOLÉ, I. H.; JULIANI, H. R. Essential Oils in Combination and Their Antimicrobial Properties. **Molecules**, v. 17, n. 4, p. 3989-4006, apr. 2012.

BEDOUT, C.; GÓMEZ, B. L. *Candida* y candidiasis invasora: un reto continuo para su diagnóstico temprano. **Infectio**, v. 14, n. 2, p. 159-171, nov. 2010.

BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; FREITAS, J. C.; NERO, L. A.; SOUZA, J. A.; SANTANA, E. H. W.; FRANCO, B. D. G. M. Frequency of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (ttc) non-reducing bacteria in pasteurized milk. **Revista de Microbiologia**, v. 30, n. 2, p. 137-140, jun. 1999.

BIAVATTI, M. W. Synergy: na old wisdom, a new paradigm for pharmacotherapy. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 3, p.371-378, sep. 2009.

BOSSCHE, H. V. Mechanisms of antifungal resistance. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 14, n. 2, p. 44-49, 1997.

BOSSCHE, H. V.; ENGELEN, M.; ROCHETTE, F. Antifungal agents of use in animal health – chemical, biochemical and pharmacological aspects. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 26, n. 1, p. 05–29, feb. 2003.

BOWMAN, S. M.; FREE, S. J. The structure and synthesis of the fungal cell wall. **BioEssays**, v. 28, n. 8, p. 799-808, aug. 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Detecção e identificação de fungos de importância médica. In: BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Microbiologia clínica para o controle de infecções em serviços de saúde**. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2004. Módulo VII.

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

BUCHBAUER, G.; ILIC, A. Biological Activities of Selected Mono and Sesquiterpenes: Possible Uses in Medicine. In: RAMAWAT, K. G.; MÉRILLON, J.M. **Natural Products**. Heidelberg: Springer, 2013. cap. 139, p. 4109-4159.

CANNON, R. D.; LAMPING, E.; HOLMES, A. R.; NIIMI, K.; BARET, P. V.; KENIYA, M. V.; TANABE, K.; NIIMI, M.; GOFFEAU, A.; MONK, B. C. Efflux-Mediated Antifungal Drug Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 2, p. 291-321, apr. 2009.

CAPOOR, M. R.; AGGARWAL, S.; RAGHVAN, C.; GUPTA, D. K.; JAIN, A. K.; CHAUDHARY, R. Clinical and microbiological characteristics of *Rhodotorula mucilaginosa* infections in a tertiary-Care facility. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 32, n. 3, p. 304-309, jul. 2014.

CARRILLO-MUÑOZ, A. J.; TUR-TUR, C.; HERNÁNDEZ-MOLINA, J. M.; SANTOS, P.; CÁRDENES, D.; GIUSIANO, G. Antifúngicos disponibles para el tratamiento de las micosis ungueales. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 27, n. 2, p. 49-56, apr. 2010.

CHANDRASEKAR, P. Management of invasive fungal infections: a role for polyenes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 3, p. 457-465, mar. 2011.

CHIN, N X.; WEITZMAN, I.; DELLA-LATTA, P. *In vitro* Activity of Fluvastatin, a Cholesterol-Lowering Agent, and Synergy with Fluconazole and Itraconazole against *Candida* Species and *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 41, n. 4, p. 850–852, apr. 1997.

CHITASOMBAT, M. N.; KOFTERIDIS, D. P.; JIANG, Y.; TARRAND, J.; LEWIS, R. E.; KONTOYIANNIS, D. P. Rare opportunistic (*non-Candida, non-Cryptococcus*) yeast bloodstream infections in patients with cancer. **Journal of Infection**, v. 64, n. 1, p. 68-75, jan. 2012.

CHOU, T. C. Theoretical Basis, Experimental Design, and Computerized Simulation of Synergism and Antagonism in Drug Combination Studies. **Pharmacological Reviews**, v. 58, n. 3, p. 621-681, sep. 2006.

CIANDRINI, E.; CAMPANA, R.; FEDERICI, S.; MANTI, A.; BATTISTELLI, M.; FALCIERI, E.; PAPA, S.; BAFFONE, W. *In vitro* activity of Carvacrol against titanium-adherent oral biofilms and planktonic cultures. **Clinical Oral Investigations**, v. 18, n. 8, p. 2001-2013, nov. 2014.

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

CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard-third edition; CLSI document M27-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, v. 28, n. 14, 2008.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T.; CAMARGO, L. A. F.; RICHTMANN, R.; TELLES, F. Q.; SALLES, M. J. C.; CUNHA, C. A.; YASUDA, M. S. A.; MORETTI, M. L.; NUCCI, M. Brazilian guidelines for the management of candidiasis – a joint meeting report of three medical societies: Sociedade Brasileira de Infectologia, Sociedade Paulista de Infectologia and Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 3, p. 283-312, jun. 2013.

DEISING, H. B.; REIMANN, S.; PASCHOLATI, S. F. Mechanisms and significance of fungicide resistance. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 286-295, jun. 2008.

DELUCIA, R. E.; OLIVEIRA, R. **Farmacologia Integrada**. 2. ed. São Paulo: Editora Revinter, 2004.

DE VINCENZI, M.; STAMMATI, A.; DE VINCENZI, A.; SILANO, M. Constituents of aromatic plants: carvacrol. **Fitoterapia**, v. 75, n. 7-8, p. 801–804, dec. 2004.

DICKEMA D. J.; PETROELJE, B.; MESSER, S. A.; HOLLIS, R. J.; PFALLER, M. A. Activities of Available and Investigational Antifungal Agents Against *Rhodotorula* Species. **Journal Clinical Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 476-478, jan. 2005.

DOKE, S. K.; RAUT, J. S.; DHAWALE, S.; KARUPPAYIL, S. M. Sensitization of *Candida albicans* biofilms to fluconazole by terpenoids of plant origin. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 60, n.5, p. 163–168, jun. 2014.

DRAGO, L.; VECCHI, E.; NICOLA, L.; GISMONDO, M. R. *In vitro* evaluation of antibiotics for empirical therapy of suspected methicillin resistant *Staphylococcus aureus* severe respiratory infections. **BMC Infections Diseases**, v. 7, p. 111, sep. 2007.

DUGGAL, S.; JAIN, H.; TYAGI, A.; SHARMA, A.; CHUCH, T. D. *Rhodotorula* fungemia: two cases and a brief review. **Medical Mycology**, v. 49, n. 8, p. 879–882, nov. 2011.

FADLI, M.; SAAD, A.; SAYADIB, S.; CHEVALIERC, J.; MEZRIOUIA, N. E.; PAGÈSC, J. M.; HASSANIA, L. Antibacterial activity of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* essential oils against nosocomial infection – bacteria and their synergistic potential with antibiotics. **Phytomedicine**, v. 19, n. 5, p. 464– 471, mar. 2012.

FELL, J. W.; STATZELL-TALLMAN, A. *Rhodotorula* F. C. Harrison. In: KURTZMAN, C. P; FELL, J. W. **The Yeasts, a Taxonomic Study**. 4. ed. Amsterdam: Elsevier, 1998. p. 800-827.

FELL, J. W.; BOEKHOUT, T.; FONSECA, A.; SCORZETTI, G.; STATZELL-TALLMAN, A. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, n. 3, p. 1351-1371, may 2000.

FOHRER, C.; FORNECKER, L; NIVOIX, Y.; CORNILA, C.; MARINESCU, C.; HERBRECHT, R. Antifungal combination treatment: a future perspective. **International Journal of Antimicrobial Agents**, n. 27, n. 1, p. 25–30, jun. 2006.

FREITAS, M. A.; ANDRADE, J. C.; GUEDES, G. M. M.; TINTINO, S. R.; SOUZA, C, S, E.; LEITE, N. F.; GONDIM, C.N. F. L.; MORAIS-BRAGA, M. F. B.; MATIAS, E. F. F.; COUTINHO, H. D. M. Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana do carvacrol através dos métodos de contato direto e gasoso. **Bioscience Journal**, v. 29, n. 3, p. 781-786, jun. 2013.

GALAN-SANCHEZ, F.; GARCIA-MORTOS, P.; RODRIGUEZ-RAMOS, C.; MARIN-CASANOVA, P.; MIRA-GUTIERRZ, J. Microbiological characteristics and susceptibility patterns of strains of *Rhodotorula* isolated from clinical samples. **Mycopathologia**, v. 145, n. 3, p. 109-112, mar. 1999.

GARCIA-MARTOS, P.; DOMINGUEZ, I.; MARIN, P.; GARCIA-AGUDO, R.; AOUI, S.; MIRA, J. Antifungal susceptibility of emerging yeast pathogens. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 19, n. 6, p. 249-256, jul. 2001.

GARCÍA-SUÁREZ, J.; GÓMEZ-HERRUZ, P.; CUADROS, J. A.; BURGALETA, C. Epidemiology and outcome of *Rhodotorula* infection in haematological patients. **Mycoses**, v. 54, n. 4, p. 318–324, jul. 2011.

HADACEK, F.; GREGER, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. **Phytochemical Analyses**, v. 11, n. 3, p. 137-147, jun. 2000.

HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R. L. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. 12, p. 1-24, jan. 2012.

HUPRIKAR, S.; SHOHAM, S. Emerging fungal infections in solid organ transplantation. **American Journal of Transplantation**, v. 13, n. 4, p. 262–271, mar. 2013.

HUSSAIN, A.; AHMAD, N.; QARSHI, I. A.; RASHID, M. SHINWARI, Z. K.; AZIZ-UL- IKRAM. Inhibitory potential of nine *mentha* species against pathogenic bacterial strains. **Pakistan Journal of Botany**, v. 47, n. 6, p. 2427-2433, jan. 2015.

JESUS, F. P. K.; FERREIRO, L.; BIZZI, K. S.; LORETO, E. S.; PILOTTO, M. B.; LUDWIG, A.; ALVES, S. H.; ZANETTE, R. A.; SANTURI, J. M. *In vitro* activity of carvacrol and thymol combined with antifungals or antibacterials against *Pythium insidiosum*. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 25, n. 2, p.89-93, jun. 2015.

KINGHORN, A. D.; PAN, L.; FLETCHER, J. N.; CHAI, H. The relevance of higher plants in lead compound discovery programs. **Journal of Natural Products**, v. 74, n. 6, p. 1539-1555, Jun. 2011.

KLEPSEK, M. The Value of Amphotericin B in the Treatment of Invasive Fungal Infections. **Journal of Critical Care**, v. 26, n. 2, p. 225-235, apr. 2011.

KRZYSIAK, P.; MACURA, A. B. Drug susceptibility of 64 strains of *Rhodotorula spp.*. **Wiadomosci Parazytologiczne**, v. 56, n. 2, p. 167-170, feb. 2010.

LACAZ, C. L.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARL, E. M.; MELO, N. T. **Tratamento de Micologia Medica**. 9. ed. São Paulo: Editora Sarvier, 2002.

LANGEVELD, W. T.; VELDHUIZEN, E. J. A.; BURT, S. A. Synergy between essential oil 260 components and antibiotics: a review. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 76-94, feb. 2014.

LANIARDO-LABORIN, R.; CABRALES-VARGAS, M. N. Amphotericin B: Side effects and toxicity. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 26, n. 4, p. 223-227, dec. 2009.

LARONE, D. H. **Medically Important Fungi: A Guide to Identification**. 3. ed. Washington: American Society for Microbiology, 1995. p. 274.

LEWIS, R. E.; DIEKEMA, D. J.; MESSER, S. A.; PFALLER, M. A.; KLEPSE, M. E. Comparison of *Etest*, *Chequerboard* dilution and *Time-kill* studies for the detection of synergy or antagonism between antifungal agents tested against *Candida* species. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 49, n. 2, p. 345–351, feb. 2002.

LEWIS, R. E.; KONTOYIANNIS, D. P. Rationale for combination antifungal therapy. **Pharmacotherapy**, v. 21, n. 8, p.149S–164S, aug. 2001.

LIMA, I. O.; PEREIRA, F. O.; OLIVEIRA, W. A.; LIMA, E. O.; MENEZES, E. A.; CUNHA, F. A.; DINIZ, M. F. F. M. Antifungal activity and mode of action of carvacrol against *Candida albicans* strains. **The Journal of Essential Oil Research**, v. 25, n. 2, p. 1-6, jan. 2013.

LIOLIOS, C. C.; GRAIKOU, K.; SKALTSA, E.; CHINO, I. Dittany of Crete: a botanical and ethnopharmacological review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, n. 2, p. 229–241, sep. 2010.

LOPES, R. C. **Caracterização isozimática, divergência genética e produção de óleo essencial em acessos de *Polygonum punctatum* Ell.** Viçosa, MG, 1997. Originalmente apresentado dissertação de mestrado em genética e melhoramento, Universidade Federal de Viçosa, 1997.

LOURIA, D. B.; GREENBERG, S. M.; MOLANDER, D. W. Fungemia caused by certain nonpathogenic strains of the family *Cryptococcaceae*. Report of two cases due to *Rhodotorula* and *Torulopsis glabrata*. **The New England Journal of Medicine**, v. 263, p. 1281–1284, dec. 1960.

LUISI, S. B.; BARBACHAN, J. J. D.; CHIES, J. B. A.; FILHO, M. S. Uso de anfotericina B com antifúngicos no meio de cultura para células pulpareas humanas. **Revista Odonto Ciência**, v. 23, n. 1, p. 58-62, may 2008.

LUNARDI, L. W.; AQUINO, V. R.; ZIMERMAN, R. A.; GOLDANI, L. Z. Epidemiology and outcome of *Rhodotorula* fungemia in a tertiary care hospital. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, n. 6, p. 60-63, sep. 2006.

MAGI, G.; MARINI, E.; FACINELLI, B. Antimicrobial activity of essential oils and carvacrol, and synergy of carvacrol and erythromycin, against clinical, erythromycin-resistant Group A *Streptococci*. **Frontiers in Microbiology Original Research**, v. 6, n. 165, p. 1-7, mar. 2015.

MAHBOUBI, M.; KAZEMPOUR, N. The Antibacterial Activity of *Satureja khuzestanica* Essential Oil Against Clinical Isolates of *E. coli*. **Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products**, v. 11, n. 2, p. 30034, may 2016.

MATHEW, B. P.; NATH, M. Recent approaches to antifungal therapy for invasive mycoses. **ChemMedChem**. v. 4, n. 3, p. 310–323, mar. 2009.

MCCALL, M. J.; BADDLEY, J. W. Epidemiology of emerging fungi and fungi-like organisms. **Current Fungal Infection Reports**, v. 4, n. 4, p. 203–209, dec. 2010.

MEIRELES, M. C. A.; NASCENTE, P. S. **Micologia Veterinária**. Pelotas: Ed. Universitária UFPEL, 2009. 456 p.

MICELI, M. H.; DÍAZ, J. A.; LEE, S. A. Emerging opportunistic yeast infections. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 11, n. 2, p. 142-151, feb. 2011.

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

MONZOTE, L.; STAMBERG, W.; STANIEK, K.; GILLE, L. Toxic effects of carvacrol, caryophyllene oxide, and ascaridole from essential oil of *Chenopodium ambrosioides* on mitochondria. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 240, n. 3, p. 337–347, nov. 2009.

MUKHERJEE, P. K.; SHEEHAN, D. J.; HITCHCOCK, C. A.; GHANNOUM, A. M. Combination treatment of invasive fungal infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, n. 1, p. 163–194, jan. 2005.

NASCIMENTO, P. F. C.; NASCIMENTO, A. L. 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, n. 1, p. 108-113, mar. 2007.

NISHI, I.; SUNADA, A.; TOYOKAWA, M.; ASARI, S.; IWATANI, Y. *In vitro* antifungal combination effects of micafungin with fluconazole, voriconazole, amphotericin B, and flucytosine against clinical isolates of *Candida* species. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 15, n. 1, p. 1-5, feb. 2009.

NOBREGA, 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**, p.1-6, may 2016.

NOSTRO, A.; ROCCARO, A. S.; BISIGNANO, G.; MARINO, A.; CANNATELLI, M. A.; PIZZIMENTI, F. C.; CIONI, P. L.; PROCOPIO, F.; BLANCO, A. R. Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, p. 519–523, apr. 2007.

NOSTRO, A.; PAPALIA, T. Antimicrobial activity of carvacrol: current progress and future prospectives. **Recent Patents on Anti-Infective Drug Discover**, v. 7, n. 1, p. 28-35, apr. 2012.

NUNES, J. M.; BIZERRA, F. C.; FERREIRA, R. C.; COLOMBO, A. L. Molecular identification, antifungal susceptibility profile, and biofilm formation of clinical and environmental *Rhodotorula* species isolates. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 57, n. 1, p. 382-389, jan. 2013.

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

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

O'SHAUGHNESSY, E. M.; MELETIADIS, J.; STERGIPOULOU, T.; DEMCHOK, J. P.; WALSH, T. J. Antifungal interactions within the triple combination of amphotericin

B, caspofungin and voriconazole against *Aspergillus* species. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 58, n. 6, p. 1168-1176, dec. 2006.

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

PFALLER, M. A. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. **The American Journal of Medicine**, v. 125, n. 1, p. 3-13, jan. 2012.

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D. J.; ANDES, D.; ARENDRUP, M. C.; BROWND, S. D.; LOCKHART, S. R.; MOTYLF, M.; PERLIN, D. S.; CLSI SUBCOMMITTEE FOR ANTIFUNGAL TESTING. Clinical breakpoints for the echinocandins and *Candida* revisited: Integration of molecular, clinical, and microbiological data to arrive at species-specific interpretive criteria. **Drug Resistance Updates**, v. 14, n. 3, p. 164-176, jun. 2011.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; GIBBS, D. L.; NEWELL, V. A.; BIJIE, H.; DZIERZANOWSKA, D.; KLIMKO, N. N.; LETSCHER-BRU, V.; LISALOVA, M.; MUEHLETHALER, K.; RENNISON, C.; ZAIDI, M.; GLOBAL ANTIFUNGAL SURVEILLANCE GROUP. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: 10.5-year analysis of susceptibilities of noncandidal yeast species to fluconazole and voriconazole determined by CLSI standardized disk diffusion testing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 117–123, jan. 2009.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; GIBBS, D. L.; NEWELL, V. A.; MEIS, J. F.; GOULD, I. M.; FU, W.; COLOMBO, A. L.; RODRIGUEZ-NORIEGA, E.; THE GLOBAL ANTIFUNGAL SURVEILLANCE GROUP. Results from the ARTEMIS DISK global antifungal surveillance study, 1997 to 2005: an 8.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species and other yeast species to fluconazole and voriconazole determined by CLSI standardized disk diffusion testing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 6, p. 1735–1745, jun. 2007.

PFALLER, M. A.; SHEEHAN, D. J.; REX, J. H. Determination of fungicidal activities against yeasts and molds: lessons learned from bactericidal testing and the need for standardization. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 2, p. 268–280, Apr. 2004.

POSTERARO, B.; SPANU, T.; FIORI, B.; DE MAIO, F.; DE CAROLIS, E.; GIAQUINTO, A.; PRETE, V.; DE ANGELIS, G.; TORELLI, R.; D'INZEO, T.; VELLA,

A.; DE LUCA, A.; TUMBARELLO, M.; RICCIARDI, W.; SANGUINETTIB, M. Antifungal Susceptibility Profiles of Bloodstream Yeast Isolates by Sensititre YeastOne over Nine Years at a Large Italian Teaching Hospital. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 7, p. 3944-3955, jul. 2015.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. FLOWER, R. J. Fármacos Antifúngicos. In: RANG, H. P. et al. **Rang & Dale Farmacologia**. 6. ed, Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. p. 692-697, cap. 48.

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. dec. 2010.

SCHAFER, H.; WINK, M. Medicinally important secondary metabolites in recombinant microorganisms or plants: Progress in alkaloid biosynthesis. **Journal Biotechnology**, v. 4, n. 12, p. 1684–1703, dec. 2009.

SAAD, A.; FADLI, M.; BOUAZIZ, M.; BENHARREF, A.; MEZRIOUI, N.-E.; HASSANI, L. Anticandidal activity of the essential oils of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* and their synergism with amphotericin B and fluconazol. **Phytomedicine**, v. 17, n. 13, 1057–1060, nov. 2010.

SARRAZIN, S. L. F.; OLIVEIRA, R. B.; BARATA, L. E. S.; MOURÃO, R. H. V. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Lippia grandis* Schauer (Verbenaceae) from the western Amazon. **Food Chemistry**, v. 134, n. 3, p. 1474-1478, oct. 2012.

SCORZETTI, G.; FELL, J. W.; FONSECA, A.; STATZELL-TALLMAN, A. Systematics of basidiomycetous yeasts: a comparison of large subunit D1/D2 and internal transcribed spacer rDNA regions. **FEMS Yeast Research**, v. 2, n. 4, p. 495-517, dec. 2002.

SCORZONI, L.; BENADUCCI, T.; ALMEIDA, A. M. F.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; GIANINNI, M. J. S. M. The Use of Standard Methodology for Determination of Antifungal Activity of Natural Products Against Medical Yeasts *Candida sp.* and *Cryptococcus sp.*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 391-397, sep. 2007.

SEIFI, Z.; MAHMOUDABADI, A. Z.; HYDRINIA, S. Isolation, Identification and Susceptibility Profile of *Rhodotorula* Species Isolated From Two Educational Hospitals in Ahvaz. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 6, n. 6, p. 8935, aug. 2013.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., 2010.

SIKKEMA, J.; DE BONT, J. A. M.; POOLMAN, B. Mechanisms of Membrane Toxicity of Hydrocarbons. **Microbiological Reviews**, v. 59, n. 2, p. 201–222, jun. 1995.

SILVA, C. B.; GUTERRES, S. S.; WEISHEIMER, V.; SCHAPOVAL, E. S. E. Antifungal activity of the lemongrass oil and against *candida spp.*. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 12, n. 1, p. 63-66, feb. 2008.

SIMON, M. S.; SOMERSAN, S.; SINGH, H. K.; HARTMAN, B.; WICKES, B. L.; JENKINS, S. J.; WALSH, T. J.; SCHUETZA, A. M. Endocarditis Caused by *Rhodotorula* Infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 374–378, jan. 2014.

SLEHA, R.; MOSIO, P.; VYDRZALOVA, M.; JANTOVSKA, A.; BOSTIKOVA, V.; MAZUROVA, J. *In vitro* antimicrobial activities of cinnamon bark oil, anethole, carvacrol, eugenol and guaiazulene against *Mycoplasma hominis* clinical isolates. **Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia**, v. 158, n. 2, p. 208-211, jun. 2014

SPILIOPOULOU, A.; ANASTASSIOU, E. D.; CHRISTOFIDOU, M. *Rhodotorula* fungemia of an intensive care unit patient and review of published cases. **Mycopathologia**, v. 174, n. 4, p. 301-309, oct. 2012.

SOKOVIC, M.; GLAMOCLIJAJ, J.; MARIN, P. D.; BRKIC, D.; VAN GRIENSVEN, L. J. L. D. Antibacterial Effects of the Essential Oils of Commonly Consumed Medicinal Herbs Using an *in vitro* Model. **Molecules**, v. 15, n.11, p. 7532-7546, oct. 2010.

TEIXEIRA-SANTOS, R.; ROCHA, R.; MOREIRA-ROSÁRIO, A.; MONTEIRO-SOARES, M.; CANTÓN, E.; RODRIGUES, A. G.; PINA-VAZ, C. Novel Method for Evaluating *in vitro* Activity of Anidulafungin in Combination with Amphotericin B or Azoles. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 8, p. 2748 –2754, aug. 2012.

TAJKARIMI, M. M.; IBRAHIM, S. A.; CLIVER, D. O. Antimicrobial herb and spice compounds in food. **Food Control**, v. 21, n. 9, p. 1199-1218, sep. 2010.

THAKUR, K; SINGH, G; AGARWAL, S; RANI, L. Meningitis caused by *Rhodotorula rubra* in a human immunodeficiency virus infected patient. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 25, n. 2, p. 166-168, apr. 2007.

THOMPSON, G. R; CADENA, J; PATTERSON, T. F. Overview of antifungal agents. **Clinics In Chest Medicine**, v. 30, n. 2, p. 203-215, jun. 2009.

TUON, F. F.; COSTA, S. F. *Rhodotorula* infection: a systematic review of 128 cases from literature. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 25, n. 3, p. 135-140, sep. 2008.

ULTEE, A.; BENNIK, M. H. J.; MOEZELAAR, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 4, p. 1561–1568, apr. 2002.

VANDEPUTTE, P.; FERRARI, S.; COSTE, A. T. Antifungal Resistance and New Strategies to Control Fungal Infections. **International Journal of Microbiology**, v. 2012, p. 1-26, sep. 2012.

VAZQUEZ, J. A. Combination Antifungal Therapy for Mold Infections: Much Ado about Nothing? **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, n. 12, p. 1889–1901, jun. 2008.

VOKOU, D.; KOKKINI, S.; BESSIERE, J. M. Geographical variation of Greek oregano (*Origanum vulgare ssp. hirtum*) essential oils. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 21, n. 2, p. 287–295, mar. 1993.

WARREN, N.G; HAZEN, K. C. *Candida*, *Cryptococcus* and other yeasts of medical importance. In: MURRAY, P. R; BARON, E. J; PFALLER, M. A; TENOVER, F. C; YOLKEN, R. H. **Manual of Clinical Microbiology**. 7. ed. Washington: American Society for Microbiology, 1999. p. 1184-1199.

WATERMAN, P. G. The chemistry of volatile oils. In: HAY, R. K. M.; WATERMAN, P. G. **Volatile oil crops: their biology, biochemistry and production**. 1. Ed. Harlow: longman Scientific, 1993. p. 185.

WHITE, R. L.; BURGESS, D. S.; MANDURU, M.; BOSSO, J. A. Comparison of Three Different *in vitro* Methods of Detecting Synergy: Time-Kill, Checkerboard, and E Test. **Antimicrobial Agentes and Chemotherapy**, v. 40,n. 8, p. 1914-1918, aug. 1996.

WILSON, D. T.; DREW, R. H.; PERFECT, J. R. Antifungal therapy for invasive fungal diseases in allogeneic stem cell transplant recipients: an update. **Mycopathologia**, v. 168, n. 6, p. 313–327, dec. 2009.

WINK, M. **Functions of Plant Secondary Metabolites and Their Exploitation in Biotechnology**. Sheffield: Sheffield Academic Press, 1999. p. 362.

WIRTH, F.; GOLDANI, L. Z. Epidemiology of *Rhodotorula*: An Emerging Pathogen. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, v. 2012, p. 1-7, sep. 2012.

ZAAS, A. K.; BOYCE, M.; SCHELL, W.; LODGE, B. A.; MILLER, J. L. PERFECT, J. R. Risk of Fungemia Due to *Rhodotorula* and Antifungal Susceptibility Testing of *Rhodotorula* Isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 11, p. 5233-5235, nov. 2003.

ZHU, L. P.; GIL-LAMAIGNERE, C.; MULLER, F. M. Effects of several antifungal drug combinations against clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* from China. **Mycoses**, v. 47, n. 7, p. 319-325, aug. 2004.

ZOMORODIAN, K.; GHADIRI, P.; SAHARKHIZ, M. J.; MOEIN, M. R.; MEHRIAR, P.; BAHRANI, F.; GOLZAR, T.; PAKSHIR, K.; FANI, M. M. Antimicrobial Activity of Seven Essential Oils From Iranian Aromatic Plants Against Common Causes of Oral Infections. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 8, n. 2, p. 17766, feb. 2015.