

PATRICIA DE SOUZA SANTOS

**Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica de óleos
essenciais sobre *Cryptococcus neoformans***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública.

Orientadora: Profa. Dra. Maria de Fátima Costa Pires

SÃO PAULO

2011

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Santos, Patricia de Souza

Avaliação “in vitro” da atividade antifúngica de óleos essenciais sobre *Cryptococcus neoformans* / Patricia de Souza Santos - São Paulo, 2011.

Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública

Orientadora: Maria de Fátima Costa Pires

1. *Cryptococcus neoformans* 2. Meningite fúngica 3. Óleos voláteis
4. Testes de sensibilidade microbiana 5. Antimicóticos

SES/CCD/CD-246/11

Metade

*Que a força do medo que tenho
Não me impeça de ver o que anseio*

*Que a morte de tudo em que acredito
Não me tape os ouvidos e a boca
Porque metade de mim é o que eu grito
Mas a outra metade é silêncio.*

*Que a música que ouço ao longe
Seja linda ainda que tristeza
Que a mulher que eu amo seja pra sempre amada
Mesmo que distante
Porque metade de mim é partida
Mas a outra metade é saudade.*

*Que as palavras que eu falo
Não sejam ouvidas como prece e nem repetidas com fervor
Apenas respeitadas
Como a única coisa que resta a um homem inundado de sentimentos
Porque metade de mim é o que ouço
Mas a outra metade é o que calo.*

*Que essa minha vontade de ir embora
Se transforme na calma e na paz que eu mereço
Que essa tensão que me corrói por dentro
Seja um dia recompensada*

Porque metade de mim é o que eu penso, mas a outra metade é um vulcão.

*Que o medo da solidão se afaste, e que o convívio comigo mesmo se torne
ao menos suportável.*

*Que o espelho reflita em meu rosto um doce sorriso
Que eu me lembro ter dado na infância
Por que metade de mim é a lembrança do que fui
A outra metade eu não sei.*

*Que não seja preciso mais do que uma simples alegria
Pra me fazer aquietar o espírito
E que o teu silêncio me fale cada vez mais
Porque metade de mim é abrigo
Mas a outra metade é cansaço.*

*Que a arte nos aponte uma resposta
Mesmo que ela não saiba
E que ninguém a tente complicar
Porque é preciso simplicidade pra fazê-la florescer
Porque metade de mim é plateia
E a outra metade é canção.
E que a minha loucura seja perdoada
Porque metade de mim é amor
E a outra metade também.*

Oswaldo Montenegro

DEDICATÓRIA

A Deus

Supremo e causa primária de todas as coisas. Por me permitir viver, ter saúde, ter minha família, meus amigos e por me guiar nessa incrível jornada chamada pós graduação. A Ele ofereço todas estas linhas, estas páginas, todos os momentos de minha vida. Nunca me desamparou, sempre está comigo, permitindo a realização de mais um sonho.

Aos meus pais

Por tudo que sou, por toda dedicação, por todo Amor. Pelos ensinamentos de vida. Ensinaram-me a acreditar em meus sonhos, a lutar pelos meus ideais, encorajando-me a extrair o muito de onde não havia nada. Por todas as dificuldades passadas para hoje ser quem eu sou e ser vitoriosa em minha vida. Responsáveis por minha vida, pelo meu crescimento moral e psicológico, todos os acontecimentos, todas as vitórias e desta obra são também responsáveis pela existência, pois acreditaram e desejaram que eu estivesse aqui. Ao meu pai Euflordizio (in memoriam) e a minha mãe Aurea. Amo vocês!

Aos meus irmãos

Edilson, Sandro e especialmente ao Ezequiel, que sempre me acompanhou, inclusive nas madrugadas de estudo, sempre me colocando “em alerta”! Amo vocês!

A minha tia Zoraide,

Ela sempre diz que somos os “filhos que ela não pariu”! Mais do que uma tia, é mãe, pai, irmã... Pura dedicação em todos os momentos de nossas vidas. Obrigada por tudo! Amo você!

A amiga Elza

Pela nossa linda amizade, por me considerar como sua filha! Por todas as orações em minha intenção para que nada de ruim me aconteça, por toda torcida, por toda dedicação. Por essa afinidade sem fim. Por ser quem você é. Obrigada por tudo!

A amiga e orientadora Maria de Fátima Costa Pires

A querida professora e amiga dedico estas palavras, por me “adotar” e pela acolhida quando mais precisei. Jamais esquecerei o que fez por mim. Pela dedicação que conduziu todos os momentos de orientação, sempre atenciosa, muito paciente, criteriosa e amiga. Por me acalmar nos meus momentos de ansiedade. Foram muitas as expectativas para realização deste trabalho, a troca de experiências, histórias, momentos de descontração... Levando a conclusão deste trabalho. Obrigada por ser essa grande Orientadora e pela amiga inesquecível que ganhei de presente.

AGRADECIMENTOS

Muitas pessoas contribuíram direta e indiretamente para realização deste trabalho.

*A Prof^ª Dr^ª Claudete Rodrigues Paula, do ICB-USP que generosamente cedeu os isolados de *Cryptococcus neoformans* para esse trabalho. Por toda sua colaboração e parceria.*

Ao Fernando Amaral da World's Naturals Fragrances por ter cedido os óleos essenciais analisados neste trabalho.

A Samanta Karina Alves do departamento técnico da World's Naturals Fragrances pelas informações técnicas referentes aos óleos essenciais analisados.

Ao Prof. Dr. Massuo Jorge Kato da Universidade de São Paulo pelas análises cromatográficas.

Ao Prof. Dr. Andre Gustavo Tempone Cardoso, as Seção de Parasitologia do Instituto Adolfo Lutz, permitir a utilização de seu laboratório para preparo de materiais para esse trabalho e seus funcionários Martília e Vicente pelo apoio no preparo.

Aos membros da Banca de Qualificação: Prof. Dr. Andre Gustavo Tempone Cardoso, Prof^ª Dr^ª Dominique Corinne Hermine Fisher e Prof^ª Dr^ª Adriana Pardini, por todas as sugestões propostas para o melhoramento deste trabalho.

Ao meu grande amigo Wilmar dos Santos, pela amizade de longa data, pela torcida e festa que faz quando nos encontramos, por todos os elogios, que são recíprocos!!! E pela pessoa incrível que é.

A toda minha família (tios, tias, primos, primas, sobrinhos e cunhadas) que torcem e se orgulham de mim, em especial a tia Teresa, tia Nilda e a prima Luciana. Às vezes acho um pouco de exagero tantos elogios, mas sei que todos me amam e querem o melhor para mim. Por todas as orações que intencionam a mim, por toda torcida. Obrigada Família! Amo muito todos vocês!

A todos meus grandes amigos, em especial Milena e Adilson, Renata e Well, e primos Elisabete e Geraldo, por compreender minha ausência e torce muito por mim. Amo vocês.

A minha nutricionista preferida Sula! Grande amiga que conheci na pós. A nossa amizade e companheirismo durarão por toda eternidade. Te Adoro Amiga!

A Maria Luiza Makabe e André Luiz pela amizade e por todos os momentos que passamos e iremos passar em nossa caminhada acadêmica. Da-lhe experimentos!

As Secretarias da Pós Graduação Tirces e Carol, por toda dedicação, amizade e paciência com todos os alunos!

A todos, muitíssimo obrigada!!!

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
C.	<i>Cryptococcus</i>
°C	graus Celsius
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIM50	CIM de um antifúngico capaz de inibir o crescimento de 50% dos Isolados.
CIM90	CIM de um antifúngico capaz de inibir o crescimento de 90% dos Isolados
CLM	Concentração Letal Mínima
CLSI	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
cm	Centímetro
DMSO	Dimetil sulfóxido
EPI	Equipamento de proteção individual
et al.	e outros
g	Gramas
GXM	Glicoronoxilomanana
GLX	Glicoxilomanana
h	hora
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
ICB	Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo
Kg	Kilograma
mg	Miligramas
mL	Mililitro
mm	Milímetro

MOPS	Ácido 3-(N-morfino) propanosulfônico
MS	Ministério da Saúde
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
Pz	Atividade enzimática
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
µg	Micrograma
µm	Micrômetro
µL	Microlitro
WNF	<i>World's Natural Fragrances</i>

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	08
LISTA DE TABELAS.....	15
LISTA DE GRÁFICOS.....	19
LISTA DE FIGURAS.....	22
LISTA DE QUADROS.....	27
RESUMO.....	28
ABSTRACT.....	30
1. INTRODUÇÃO.....	31
1.1 Gênero <i>Cryptococcus</i>	32
1.1.1 <i>Cryptococcus neoformans</i>	33
1.1.2 <i>Cryptococcus gattii</i>	35
1.2 CRIPTOCOCOSE.....	36
1.2.1 Patogênese.....	38
1.2.2 Manifestações Clínicas.....	39
1.2.3 Fatores de Virulência.....	40
1.2.3.1 Cápsula.....	41
1.2.3.2 Crescimento a 37°C.....	42
1.2.3.4 Fosfolipase.....	43
1.2.3.5 Proteinase.....	44
1.3 ANTIFÚNGICOS SINTÉTICOS.....	45
1.4 ANTIFÚNGICOS NATURAIS.....	46
1.4.1 Óleos Essenciais.....	48

1.4.2 Espécies vegetais dos óleos essenciais estudados.....	49
1.4.2.1 <i>Eucalyptus citriodora</i> Hooker.....	49
1.4.2.2 <i>Eucalyptus globulus</i> Labill.....	50
1.4.2.3 <i>Eugenia caryophyllus</i> Sprengel.....	52
1.4.2.4 <i>Melaleuca alternifolia</i> Chell.....	53
1.4.2.5 <i>Thymus vulgaris</i> Lin.....	55
1.4.2.6 Blend de óleos essenciais.....	56
1.5 Considerações.....	56
3. OBJETIVOS.....	57
3.1 Objetivo Geral.....	58
3.2 Objetivos Específicos.....	58
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	59
4.1 <i>C. neoformans</i>	60
4.1.1 Pesquisa de Fatores de Virulência.....	60
4.1.1.1 Produção de exoenzimas - Proteinase e Fosfolipase.....	60
4.1.1.2 Pesquisa de Cápsula.....	62
4.2 Óleos Essenciais.....	62
4.3 Tensoativos e solvente.....	62
4.3.1 Pesquisa da interferência dos polissorbatos Tween 20, Tween 80 e solvente dimetilsufóxio DMSO sobre cepa padrão de <i>C. neoformans</i> ICB 163 D.....	63
4.4 Pesquisa da atividade dos óleos essenciais sobre <i>C. neoformans</i>	64
4.4.1 Preparação da suspensão de levedura.....	64
4.4.2 Avaliação <i>in vitro</i> da atividade antifúngica dos óleos essenciais sobre isolados de <i>C. neoformans</i>	64
4.4.2.1 – Ensaio da atividade antifúngica dos óleos essenciais sobre a cepa padrão de <i>C. neoformans</i> ICB 163 D sem adição de tenso ativo e solvente.....	65

4.4.3 Controles.....	65
4.4.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima.....	65
4.4.5 Avaliação da atividade fungistática e fungicida dos óleos essenciais.....	66
4.6 Ensaio da atividade antifúngica do Fluconazol.....	67
4.7 Ensaio da atividade antifúngica da Anfotericina B.....	67
4.7.1 Método E-Test®- Kit comercial (AB-Biodisk, Solna, Suécia).....	67
4.7.1.1 Meios de cultura.....	67
4.7.1.2 Fitas E-Test®.....	67
4.7.1.3 Preparo do inóculo.....	68
4.7.1.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima.....	68
4.7.1.5 Determinação e interpretação do teste.....	68
4.8 Controles de qualidade e biossegurança.....	69
4.9 Descartes dos resíduos.....	69
4.10 Considerações éticas.....	69
5. RESULTADOS.....	70
5.1 <i>Cryptococcus neoformans</i>	71
5.2 Fatores de virulência.....	71
5.2.1 Atividade Enzimática.....	71
5.2.2 Cápsula.....	74
5.3 Atividade dos tensoativos Tween 20, Tween 80 e solvente DMSO sobre cepa padrão de <i>C. neoformans</i> ICB 163 D.....	75
5.4 Características e Composição dos óleos essenciais.....	79
5.4.1 <i>Eucalyptus citriodora</i> Hooker.....	79
5.4.2 <i>Eucalyptus globulus</i> Labill.....	79

5.4.3 <i>Eugenia caryophyllus</i> Sprengel.....	79
5.4.4 <i>Melaleuca alternifolia</i> Cheel.....	80
5.4.5 <i>Thymus vulgaris</i> Lin.....	80
5.5 Atividade dos óleos essenciais sobre a cepa padrão <i>C. neoformans</i> ICB 163 D.....	81
5.5.1 Atividade dos óleos essenciais sobre a cepa padrão <i>C. neoformans</i> ICB 163 D sem a presença de tenso ativos e solvente.....	85
5.6 Atividade do óleo essencial de <i>E. citriodora</i> Hooker sobre <i>C. neoformans</i>	89
5.6.1 Isolados biológicos de origem humana.....	89
5.6.2 Isolados biológicos de origem ambiental.....	92
5.7 Atividade do óleo essencial de <i>E. globulus</i> Labill sobre <i>C. neoformans</i>	97
5.7.1 Isolados biológicos de origem humana.....	97
5.7.2 Isolados biológicos de origem ambiental.....	100
5.8 Atividade do óleo essencial de <i>E. caryophyllus</i> Sprengel sobre <i>C. neoformans</i>	105
5.8.1 Isolados biológicos de origem humana.....	105
5.8.2 Isolados biológicos de origem ambiental.....	108
5.9 Atividade do óleo essencial de <i>M. alternifolia</i> Cheel sobre <i>C. neoformans</i>	113
5.9.1 Isolados biológicos de origem humana.....	113
5.9.2 Isolados biológicos de origem ambiental.....	116
5.10 Atividades do óleo essencial de <i>T. vulgaris</i> Lin sobre <i>C. neoformans</i>	121
5.10.1 Isolados biológicos de origem humana.....	121
5.10.2 Isolados biológicos de origem ambiental.....	124
5.11 <i>Blend</i> – mistura dos óleos essenciais de <i>Eugenia caryophyllus</i> , <i>Melaleuca alternifolia</i> e <i>Thymus vulgaris</i>	129
5.11.1 Isolados biológicos de origem humana.....	129
5.11.2 Isolados biológicos de origem ambiental.....	132

5.12 Atividades do antifúngico Fluconazol sobre <i>C. neoformans</i>	137
5.12.1 Isolados biológicos de origem humana.....	137
5.12.2 Isolados biológicos de origem ambiental.....	140
5.13 Valores CIM 50 e CIM 90 para óleos essenciais e o antifúngico Fluconazol sobre <i>C. neoformans</i> isolados de origem humana e ambiental.....	144
5.14 Valores CFM 50 e CFM 90 para óleos essenciais e o antifúngico Fluconazol sobre <i>C. neoformans</i> isolados de origem humana e ambiental.....	145
5.15 E-Test®	146
5.15.1 Isolados Biológicos de origem humana.....	146
5.15.2 Isolados Biológicos de origem ambiental.....	148
5.16 – CIM 50 e CIM 90 da Anfotericina B sobre isolados de <i>C. neoformans</i>	151
5.17 Composições químicas dos óleos essenciais com atividade antimicrobiana.....	152
5.18 Concentrações Fungicida Mínima de <i>C. neoformans</i> e principais compostos químicos dos óleos essenciais com atividade antifúngica.....	153
6. DISCUSSÃO.....	154
7. CONCLUSÃO.....	172
8. REFERÊNCIAS.....	174
9. ANEXOS.....	203
ANEXO 1: Aprovação do Comitê de Ética do Instituto Adolfo Lutz.....	204
ANEXO 2: Ficha de identificação de leveduras.....	205
ANEXO 3: Cromatografia de <i>Eucalyptus citriodora</i>	206
ANEXO 4: Cromatografia de <i>Eucalyptus globulus</i>	209
ANEXO 5: Cromatografia de <i>Eugenia caryophyllus</i>	215
ANEXO 6: Cromatografia de <i>Melaleuca alternifolia</i>	224
ANEXO 7: Cromatografia de <i>Thymus vulgaris</i>	228
ANEXO 8: Cromatografia de <i>Blend</i>	238

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** *Cryptococcus neoformans*: número de isolados de amostras biológicas de origem humana e ambiental 71
- Tabela 2.** Atividade enzimática (Pz): Produção de exoenzimas Proteinase e Fosfolipase da cepa padrão de *Cryptococcus neoformans* ICB 163 D.....71
- Tabela 3.** Atividade enzimática: produção de exoenzimas proteinase e fosfolipase de *Cryptococcus neoformans* isolados biológicos de origem humana.....72
- Tabela 4.** Atividade enzimática: produção de exoenzimas proteinase e fosfolipase de *Cryptococcus neoformans* isolados biológicos de origem ambiental.....73
- Tabela 5.** Média, desvio padrão, mediana, máxima e mínima de produção de proteinase de *C. neoformans* isolados biológicos de origem humana e ambiental.....74
- Tabela 6.** Média, desvio padrão, mediana, máxima e mínima de produção de fosfolipase de *C. neoformans* isolados de amostras biológicas de origem humana e ambiental.....74
- Tabela 7.** Atividade dos tensoativos Tween 20, Tween 80 e DMSO sobre o crescimento e produção de cápsula da cepa padrão de *Cryptococcus neoformans* ICB 163 D.....75
- Tabela 8.** Concentração Inibitória Mínima e Concentração Fungicida Mínima dos óleos essenciais de *E. citriodora*, *E. globulus*, *E. caryophyllus*, *M. alternifolia*, *T. vulgaris*, Blend e Fluconazol sobre a cepa padrão de *C. neoformans* ICB 163 D.....82
- Tabela 9.** Concentração Inibitória Mínima e Concentração Fungicida dos óleos essenciais *E. citriodora*, *E. globulus*, *E. caryophyllus*, *M. alternifolia*, *T. vulgaris* e Blend (sem tenso ativos e solventes) sobre a cepa padrão de *C. neoformans* ICB 163 D.....86
- Tabela 10.** Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) do óleo essencial de *E. citriodora* sobre isolados de *C. neoformans* de origem humana.....90

Tabela 11. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) do óleo essencial de <i>E. citriodora</i> sobre <i>C. neoformans</i> isolados de origem ambiental.....	93
Tabela 12. Média, desvio padrão, mediana, máxima e mínima da CIM do óleo essencial de <i>E. citriodora</i> sobre <i>C. neoformans</i>	95
Tabela 13. Média, desvio padrão, mediana, máxima e mínima da CFM do óleo essencial de <i>E. citriodora</i> sobre <i>C. neoformans</i>	95
Tabela 14. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) dos isolados de origem humana frente ao óleo essencial de <i>E. globulus</i>	98
Tabela 15. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) dos isolados de origem ambiental frente ao óleo essencial de <i>E. globulus</i>	101
Tabela 16. Média, desvio padrão, mediana, máxima e mínima da CIM do óleo essencial de <i>E. globulus</i> sobre <i>C. neoformans</i>	103
Tabela 17. Média, desvio padrão, mediana, máxima e mínima da CFM do óleo essencial de <i>E. globulus</i> sobre <i>C. neoformans</i>	103
Tabela 18. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) do óleo essencial de <i>E. caryophyllus</i> sobre <i>C. neoformans</i> isolados de origem humana.....	106
Tabela 19. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) do óleo essencial de <i>E. caryophyllus</i> sobre <i>C. neoformans</i> isolados de origem ambiental.....	109
Tabela 20. Média, desvio padrão, mediana, máxima e mínima do óleo essencial de <i>E. caryophyllus</i> sobre <i>C. neoformans</i>	111
Tabela 21. Média, desvio padrão, mediana, máxima e mínima do óleo essencial de <i>E. caryophyllus</i> sobre <i>C. neoformans</i>	111
Tabela 22. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) do óleo essencial de <i>M. alternifolia</i> sobre <i>C. neoformans</i> isolados de origem humana.....	114

Tabela 23. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) do óleo essencial de <i>M. alternifolia</i> sobre <i>C. neoformans</i> isolados de origem ambiental.....	117
Tabela 24. Média, desvio padrão, mediana, máxima e mínima do óleo essencial de <i>M. alternifolia</i> sobre <i>C. neoformans</i>	119
Tabela 25. Média, desvio padrão, mediana, máxima e mínima do óleo essencial de <i>M. alternifolia</i> sobre <i>C. neoformans</i>	119
Tabela 26. . Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) do óleo essencial de <i>T. vulgaris</i> sobre <i>C. neoformans</i> isolados de origem humana.....	122
Tabela 27. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) do óleo essencial de <i>T. vulgaris</i> sobre <i>C. neoformans</i> isolados de origem ambiental.....	125
Tabela 28. Média, desvio padrão, mediana, máxima e mínima do óleo essencial de <i>T. vulgaris</i> sobre <i>C. neoformans</i>	127
Tabela 29. Média, desvio padrão, mediana, máxima e mínima do óleo essencial de <i>T. vulgaris</i> sobre <i>C. neoformans</i>	127
Tabela 30. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) do <i>Blend</i> de óleos essenciais sobre <i>C. neoformans</i> isolados de origem humana.....	130
Tabela 31. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) do <i>Blend</i> de óleos essenciais sobre <i>C. neoformans</i> isolados de origem ambiental.....	133
Tabela 32. Média, desvio padrão, mediana, máxima e mínima do <i>Blend</i> de óleos essenciais sobre <i>C. neoformans</i>	135
Tabela 33. Média, desvio padrão, mediana, máxima e mínima do <i>Blend</i> de óleos essenciais sobre <i>C. neoformans</i>	135

Tabela 34. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) do Fluconazol sobre <i>C.neoformans</i> isolados biológicos de origem humana.....	138
Tabela 35. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) do Fluconazol sobre <i>C.neoformans</i> isolados biológicos de origem ambiental.....	141
Tabela 36. Média, desvio padrão, mediana, máxima e mínima do Fluconazol sobre <i>C. neoformans</i>	143
Tabela 37. Média, desvio padrão, mediana, máxima e mínima do Fluconazol sobre <i>C. neoforman</i>	143
Tabela 38. Valores CIM 50 e CIM 90 para óleos essenciais e o antifúngico Fluconazol sobre <i>C. neoformans</i> isolados de origem humana e ambiental.....	144
Tabela 39. Valores CFM 50 e CFM 90 de óleos essenciais e o antifúngico Fluconazol sobre <i>C. neoformans</i> isolados de origem humana e ambiental.....	145
Tabela 40. Valores da CIM para Anfotericina B sobre <i>C.neoformans</i> isolados de amostras biológicas de origem humana.....	147
Tabela 41. Valores da CIM para Anfotericina B sobre <i>C.neoformans</i> isolados biológicos de origem ambiental e cepa padrão de <i>C.neoformans</i> ICB 163 D.....	149
Tabela 42. Média, desvio padrão, mediana, máxima e mínima da sensibilidade de <i>C. neoformans</i> a anfotericina B utilizando o Etest®.....	150
Tabela 43. Valores de CIM50 e CIM90 de anfotericina B sobre os isolados de <i>C. neoformans</i> de origem humana e ambiental utilizando-se o método Etest®	151

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1.** Concentrações inibitórias mínimas (CIM) dos óleos essenciais: 1 - *E. citriodora*, 2 - *E. globulus*, 3 - *E. caryopjyllus*, 4 - *M. alternifolia*, 5 - *T. vulgaris*, 6 – Blend e o antifúngico 7 – Fluconazol sobre a cepa padrão de *C. neoformans* ICB 163 D.....83
- Gráfico 2.** Concentrações Fungicidas Mínimas (CFM) dos óleos essenciais: 1 - *E. citriodora*, 2 - *E. globulus*, 3 - *E. caryopjyllus*, 4 - *M. alternifolia*, 5 - *T. vulgaris*, 6 – Blend e o antifúngico 7 – Fluconazol sobre a cepa padrão de *C. neoformans* ICB 163 D.....83
- Gráfico 3.** Concentrações inibitórias mínimas (CIM) aos óleos essenciais sem tensoativos e solvente 1 - *E. citriodora*, 2 - *E. globulus*, 3 - *E. caryopjyllus*, 4 - *M. alternifolia*, 5 - *T. vulgaris* e 6 – Blend sobre a cepa padrão de *C. neoformans* ICB 163 D.....87
- Gráfico 4.** Concentrações Fungicidas Mínimas (CFM) aos óleos essenciais sem tensoativos e solvente: 1 - *E. citriodora*, 2 - *E. globulus*, 3 - *E. caryopjyllus*, 4 - *M. alternifolia*, 5 - *T. vulgaris*, 6 – Blend sobre a cepa padrão de *C. neoformans* ICB 163-D.....87
- Gráfico 5.** Concentrações inibitórias mínimas (CIM) do óleo essencial de *Eucalyptus citriodora* sobre *C. neoformans* isolados de origem humana.....91
- Gráfico 6.** Concentrações fungicidas mínimas (CFM) do óleo essencial de *Eucalyptus citriodora* sobre *C. neoformans* isolados de origem humana.....91
- Gráfico 7.** Concentrações inibitórias mínimas (CIM) do óleo essencial de *Eucalyptus citriodora* sobre *C. neoformans* de origem ambiental.....94
- Gráfico 8.** Concentrações fungicidas mínimas (CFM) do óleo essencial de *Eucalyptus citriodora* sobre *C. neoformans* de origem ambiental.....94
- Gráfico 9.** Concentrações inibitórias mínimas (CIM) do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* sobre *C. neoformans* isolados de origem humana.....99
- Gráfico 10.** Concentrações fungicidas mínimas (CFM) do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* sobre *C. neoformans* isolados biológicos de origem ambiental.....99

Gráfico 11. Concentrações inibitórias mínimas (CIM) do óleo essencial de <i>Eucalyptus globulus</i> sobre <i>C. neoformans</i> isolados de origem ambiental.....	102
Gráfico 12. Concentrações fungicidas mínimas (CFM) do óleo essencial de <i>Eucalyptus globulus</i> sobre <i>C. neoformans</i> isolados biológicos de origem ambiental.....	102
Gráfico 13. Concentrações inibitórias mínimas (CIM) do óleo essencial de <i>Eugenia caryophyllus</i> sobre <i>C. neoformans</i> isolados de origem humana.....	107
Gráfico 14. Concentrações fungicida mínimas (CFM) do óleo essencial de <i>Eugenia caryophyllus</i> de <i>C. neoformans</i> isolados de origem humana.....	107
Gráfico 15. Concentrações inibitórias mínimas (CIM) do óleo essencial de <i>Eugenia caryophyllus</i> sobre <i>C. neoformans</i> isolados de origem ambiental.	110
Gráfico 16. Concentrações fungicidas mínimas (CFM) do óleo essencial de <i>Eugenia caryophyllus</i> sobre <i>C. neoformans</i> isolados de origem ambiental.....	110
Gráfico 17. Concentrações inibitórias mínimas (CIM) do óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i> sobre <i>C. neoformans</i> isolados de origem humana.....	115
Gráfico 18. Concentrações fungicidas mínimas (CFM) do óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i> sobre <i>C. neoformans</i> isolados de origem humana.....	115
Gráfico 19. Concentrações inibitórias mínimas (CIM) do óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i> sobre <i>C. neoformans</i> isolados de origem ambiental.....	118
Gráfico 20. Concentrações fungicidas mínimas (CFM) do óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i> sobre <i>C. neoformans</i> isolados de origem ambiental.....	118
Gráfico 21. Concentrações inibitórias mínimas (CIM) do óleo essencial de <i>Thymus vulgaris</i> sobre <i>C. neoformans</i> isolados de origem humana.....	123
Gráfico 22. Concentrações fungicidas mínimas (CFM) do óleo essencial de <i>Thymus vulgaris</i> sobre <i>C. neoformans</i> isolados de origem humana.....	123
Gráfico 23. Concentrações inibitórias mínimas (CIM) do óleo essencial de <i>Thymus vulgaris</i> sobre <i>C. neoformans</i> isolados biológicos de origem ambiental.....	126

Gráfico 24 Concentrações fungicidas mínimas (CFM) do óleo essencial de <i>Thymus vulgaris</i> sobre <i>C. neoformans</i> isolados biológicos de origem ambiental.....	126
Gráfico 25. Concentrações inibitórias mínimas (CIM) do <i>Blend</i> de óleos essenciais sobre <i>C. neoformans</i> isolados de origem humana.....	131
Gráfico 26. Concentrações fungicidas mínimas (CFM) do <i>Blend</i> de óleos essenciais sobre <i>C. neoformans</i> isolados de origem humana.....	131
Gráfico 27. Concentrações inibitórias mínimas (CIM) do <i>Blend</i> de óleos essenciais sobre <i>C. neoformans</i> isolados de origem ambiental.....	134
Gráfico 28. Concentrações fungicida mínimas (CFM) do <i>Blend</i> de óleos essenciais sobre <i>C. neoformans</i> isolados de origem ambiental.....	134
Gráfico 29. Concentrações inibitórias mínimas (CIM) do Fluconazol sobre <i>C. neoformans</i> de isolados de origem humana.....	139
Gráfico 30. Concentrações fungicidas mínimas (CFM) do Fluconazol sobre <i>C. neoformans</i> de isolados de origem humana.....	139
Gráfico 31. Concentrações inibitórias mínimas (CIM) do Fluconazol sobre <i>C. neoformans</i> isolados de origem ambiental.....	142
Gráfico 32. Concentrações fungicidas mínimas (CFM) do Fluconazol sobre <i>C. neoformans</i> isolados de origem ambiental.....	142
Gráfico 33. Concentrações inibitórias mínimas (CIM) da anfotericina B sobre <i>C. neoformans</i> isolados de origem humana.....	148
Gráfico 34. CIM Concentrações inibitórias mínimas (CIM) da anfotericina B sobre <i>C. neoformans</i> isolados de origem ambiental cepa padrão de <i>C. neoformans</i> ICB 163 D.....	150

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Cepa padrão de *Cryptococcus neoformans*- ICB 163 D – Aumento 3000X34
- Figura 2.** Cepa padrão de *Cryptococcus neoformans* ICB 163 D – Aumento 3000X.....35
- Figura 3 A e B.** *Eucalyptus citriodora* – A: hábito arbóreo; B:detalhe das folhas.....50
- Figura 4 A e B.** *Eucalyptus globulus* - A: hábito arbóreo; B:detalhe das folhas.....52
- Figura 5 A, B e C.** *Eugenia caryophyllus* – A: botões florais; B: botões florais em processo de secagem natural; C: Botões florais secos (cravo-da-índia).....53
- Figura 6 A e B.** *Melaleuca alternifolia* - A: hábito arbóreo; B: folhas e floração.....54
- Figura 7 A e B.** *Thymus vulgaris* – A: tomilho rosa; B: tomilho branco; C: folhas55
- Figura 8.** Cepa padrão de *C. neoformans* ICB 163 D – amostra controle – aumento 3000X.....77
- Figura 9.** Cepa padrão de *C. neoformans* ICB 163 D após exposição ao Tween 20 a 12,5% - aumento 3000X.....77
- Figura 10.** Cepa padrão de *C. neoformans* ICB 163 D após exposição ao Tween 80 a 12,5% – aumento 3000X.....77
- Figura 11.** Cepa padrão de *C. neoformans* ICB 163 D após exposição ao DMSO a 3,12% – aumento 3000X.....78
- Figura 12 A e B.** Cepa padrão de *C. neoformans* ICB 163 D amostra Controle – aumento 3000X.....78
- Figura 13 A e B.** Cepa padrão de *C. neoformans* ICB 163 D – após exposição ao Tween 20 a 0,02% - aumento 3000X.....78
- Figura 14 A e B.** Cepa padrão de *C. neoformans* ICB 163 D após exposição Tween 80 a 0,02% - aumento 3000X.....78

Figura 15 A e B. Cepa padrão de <i>C. neoformans</i> ICB 163 D - DMSO a 0,02% após exposição - aumento 3000X.....	78
Figura 16. Cepa padrão de <i>C. neoformans</i> ICB 163 D controle - 3000X.....	84
Figura 17. Cepa padrão de <i>C. neoformans</i> ICB 163 D – Depois da exposição ao óleo essencial de <i>E. citriodora</i> (dose subinibitória - concentração a 87,89µg/mL) – redução da cápsula – aumento 3000X.....	84
Figura 18. Cepa padrão de <i>C. neoformans</i> ICB 163 D – Depois da exposição ao óleo essencial de <i>E. globulus</i> (dose subinibitória - concentração a 10,98µg/mL) redução da cápsula e aumento do tamanho da célula - aumento 3000X.....	84
Figura 19. Cepa padrão de <i>C. neoformans</i> ICB 163 D – Depois da exposição ao óleo essencial de <i>E. caryophyllus</i> (dose subinibitória - concentração a 43,9µg/mL) redução da cápsula e aumento do tamanho da célula – aumento 3000X.....	84
Figura 20. Cepa padrão de <i>C. neoformans</i> ICB 163 D – Depois da exposição ao óleo essencial de <i>M. alternifolia</i> (dose subinibitória - concentração a 43,9µg/mL) – redução da cápsula – aumento 3000X	84
Figura 21. Cepa padrão de <i>C. neoformans</i> ICB 163 D – Depois da exposição ao óleo essencial de <i>T. vulgaris</i> (dose subinibitória a 0,34µg/mL) redução da cápsula – e aumento de célula – aumento 3000X.....	84
Figura 22. Cepa padrão de <i>C. neoformans</i> ICB 163 D Depois da exposição ao <i>Blend</i> de óleo essencial (dose subinibitória a 21,97µg/mL) redução da cápsula e aumento de célula – aumento 3000X.....	84
Figura 23. Cepa padrão de <i>C. neoformans</i> ICB 163 D controle – 3000X.....	88
Figura 24. Cepa padrão de <i>C. neoformans</i> ICB 163 D – Depois da exposição ao óleo essencial <i>E. citriodora</i> (dose subinibitória a 0,34µg/mL) redução da cápsula e aumento da célula – 3000X.....	88
Figura 25. Cepa padrão de <i>C. neoformans</i> ICB 163 D - Depois da exposição ao óleo essencial <i>E. globulus</i> (dose subinibitória a 5,49µg/mL) redução da cápsula e aumento da célula – 3000X.....	88

- Figura 26.** Cepa padrão de *C. neoformans* ICB 163 D – Depois da exposição ao óleo essencial *E. caryophyllus* (dose subinibitória a 0,68µg/mL) redução da cápsula e aumento da célula– 3000X.....88
- Figura 27.** Cepa padrão de *C. neoformans* ICB 163 D – Depois da exposição ao óleo essencial *M. alternifolia* (dose subinibitória a 87,89µg/mL) redução da cápsula e aumento da célula – 3000X.....88
- Figura 28.** Cepa padrão de *C. neoformans* ICB 163 D – Depois da exposição ao óleo essencial *T. vulgaris* (dose subinibitória a 0,0002µg/mL) ausência da cápsula e aumento da célula – 3000X.....88
- Figura 29.** Cepa padrão de *C. neoformans* ICB 163 D – Depois da exposição ao *Blend* de óleos essenciais (dose subinibitória a 0,005µg/mL) redução da cápsula e aumento da célula – 3000X.....88
- Figura 30 A e B:** Isolado 3 :HIV+. : HIV+. **A-** Antes e **B** - depois da exposição ao óleo essencial de *E. citriodora* (dose subinibitória- concentração de 87,89µg/mL) redução da cápsula – aumento 3000X.....96
- Figura 31 A e B:** Isolado 10: HIV-. **A** - Antes e **B** - depois da antes e depois da exposição ao óleo essenciais de *E. citriodora* (dose subinibitória- concentração de 5.625µg/mL) redução da cápsula – aumento 3000X.....96
- Figura 32 A e B:** Isolado 38 ambiental – **A** - Antes e **B** - depois da exposição ao óleo essencial de *E. citriodora* (dose subinibitória- concentração de 87,89µg/mL) ausência de cápsula – aumento 3000X.....96
- Figura 33 A e B.** Isolado 3 :HIV+. **A** - Antes e **B** - depois da exposição ao óleo essencial de *E. globulus* (dose subinibitória – concentração de 2×10^{-5} mg/mL ausência de cápsula - aumento o 3000X.....104
- Figura 34 A e B.** Isolado 10: HIV-. **A** - Antes e **B** - depois da exposição ao óleo essencial de *E. globulus* (dose subinibitória – concentração de 0,08mg/mL) de redução cápsula – aumento 3000X.....104
- Figura 35 A e B.** Isolado 38: ambiental - Antes e depois da exposição ao óleo essencial de *E. globulus* (dose subinibitória – concentração de 0,04mg/mL) de redução a ausência de cápsula – 3000X.....104

- Figura 36 A e B.** Isolado 3 HIV+ : **A** - Antes e **B** - depois da exposição ao óleo essencial de *E. caryophyllus* (dose subinibitória – concentração de 0,68µg/mL) de redução de cápsula – aumento 3000X.....112
- Figura 37 A e B.** Isolado 10 HIV-. **A** - Antes e **B** - depois da exposição ao óleo essencial de *E. caryophyllus* (dose subinibitória – concentração de 87,89µg/mL) de redução de cápsula – aumento 3000X..... 112
- Figura 38 A e B.** Isolado 38: ambiental. **A** - Antes e **B** - depois da exposição ao óleo essencial de *E. caryophyllus* (dose subinibitória – concentração de 175,78µg/mL)de redução de cápsula – aumento 3000X..... 112
- Figura 39 A e B.** Isolado 3 HIV+: **A** - Antes e **B** - depois da exposição ao óleo essencial de *M. alternifolia* (dose sub-inibitória na concentração de 2812,5µg/mL) - redução de cápsula – 3000X.....120
- Figura 40 A e B.** . Isolado 10 HIV-. **A** - Antes e **B** - depois da exposição ao óleo essencial de *M. alternifolia* (dose subinibitória – concentração de 703,12µg/mL) redução de cápsula – 3000X..... 120
- Figura 41 A e B.** Isolado 38: ambiental. **A** - Antes e **B** - depois da exposição ao óleo essencial de *M. alternifolia* (dose subinibitória – concentração de 175,78µg/mL)- de redução de cápsula –3000X..... 120
- Figura 42 A e B.** Isolado 3: HIV+. **A** - Antes e **B** - depois da exposição ao óleo essencial de *T. vulgaris* (doses subinibitórias – concentração de 10,98µg/mL ausência de cápsula e aumento de célula – 3000X.....128
- Figura 43 A e B.** Isolado 10 HIV-: **A** - Antes e **B** - depois da exposição ao óleo essencial de *T. vulgaris* (doses subinibitórias – concentração de 87,89 µg/mL) ausência de cápsula e aumento de célula – 3000X..... 128
- Figura 44 A e B.** Isolado 38: ambiental. **A** - Antes e **B** - depois da exposição ao óleo essencial de *T. vulgaris* (doses subinibitórias – concentração de 1406,25µg/mL) ausência de cápsula e aumento de célula - 3000X..... 128
- Figura 45 A e B.** Isolado 3 HIV+. **A** - Antes e **B** - depois da exposição ao *Blend* de óleos essenciais (dose subinibitória – concentração de 87,89µg/mL) de redução de cápsula e aumento de célula - 3000X136

Figura 46 A e B Isolado 10 HIV-. **A** - Antes e **B** - depois da exposição ao *Blend* de óleos essenciais (dose subinibitória – concentração de 175,78µg/mL) de redução de cápsula e aumento de célula - 3000X..... 136

Figura 47 A e B. Isolado 38: ambiental. **A** - Antes e **B** - depois da exposição ao *Blend* de óleos essenciais (dose subinibitória – concentração de 175,78µg/mL) de redução de cápsula e aumento de célula - 3000X..... 136

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1.** Composição dos óleos essenciais de *E. citriodora*, *E. globulus*, *E. caryophyllus*, *M. alternifolia* e *T. vulgaris* com atividade antimicrobiana.....152
- Quadro 2.** CFM90 de *C.neoformans* e principais compostos químicos com atividade antifúngica dos óleos essenciais de *E. citriodora*, *E. globulus*, *E. caryophyllus*, *M. alternifolia* e *T. vulgaris*.....153

RESUMO

Cryptococcus neoformans é uma levedura patogênica e o agente etiológico da criptococose, uma doença infecciosa cosmopolita que acomete o homem, animais domésticos e silvestres. A infecção ocorre por inalação das leveduras e a doença se manifesta com mais frequência em pessoas e animais com baixa imunidade celular. *C. neoformans*, tem tropismo para o sistema nervoso central. O tratamento efetivo para a criptococose é a anfotericina B associada ou não a 5-fluocitosina apesar da alta toxicidade e nefrotoxicidade. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade *in vitro* dos óleos essenciais de *Eucalyptus citriodora* Hooker, *Eucalyptus globulus* Labill, *Eugenia caryophyllus* Sprengel, *Melaleuca alternifolia* Chell e *Thymus vulgaris* Linneaus e uma mistura de *E. caryophyllus*, *M. alternifolia* e *T. vulgaris* denominada *Blend* sobre *C. neoformans*. Em doses subinibitórias avaliar a produção de cápsula e de exoenzimas proteinase e fosfolipase. Foram utilizadas 21 isolados de origem humana, 29 isolados ambientais e uma cepa padrão de *C. neoformans* ICB 163 D (NIH 163D). Para a avaliação da atividade antifúngica e obtenção da concentração inibitória mínima (CIM) utilizou-se a técnica de microdiluição em caldo, em meio RPMI 1640, com Tween-20 a 0,02% como emulsificador. E a confirmação da inibição em Agar Sabouraud dextrose, a 37°C por 48 hs com obtenção da concentração fungicida mínima (CFM). Para a avaliação da sensibilidade ao fluconazol utilizou-se microdiluição em caldo com meio RPMI 1640 e para a avaliação da sensibilidade a anfotericina B foi utilizado o teste comercial Etest®. Para cada óleo essencial foram encontrados os seguintes resultados de CFM50 e CFM90: *E. citriodora* CFM50 de 21,97 a 2812,5µg/mL e CFM90 de 703,12 a 2812,5µg/mL; *E. globulus* CFM50 de 175,78 a 703,12µg/mL e CFM90 de 703,12 a 2812,5µg/mL; *E. caryophyllus* CFM50 de 87,89 a 175,78µg/mL e CFM90 de 703,12µg/mL; *M. alternifolia* CFM50 de 11.250 a 45.000µg/mL e CFM90 de 45.000µg/mL; *T. vulgaris* CFM50 de 21,97 a 175,78µg/mL e CFM90 de 351,56 a 703,12µg/mL; *Blend* CFM50 de 175,78 a 351,56µg/mL e CFM90 de 1406,25 a 2812,5µg/mL. A CFM50 para fluconazol foi de 87,89µg/mL e CFM90 de 175,78 a 22.500µg/mL e para anfotericina B foi CFM50 de 0,25 a 0,125 e CFM90 de 0,38 a 0,5µg/mL Quanto à produção de proteinase e fosfolipase todos os isolados eram fortemente positivos e após exposição aos óleos essenciais todos tornaram-se negativos. Quanto a presença de cápsulas todos os isolados apresentavam cápsula e após contato com o óleo ocorreu redução ou ausência da mesma, bem como as células de leveduras tenderam a se agrupar em número de 2, 4 ou mais células. Pelo exposto e nas condições desse estudo conclui-se que os óleos essenciais de *E. caryophyllus* e *T. vulgaris*, apresentaram atividade fungicida com as menores concentrações inibitórias em relação aos óleos essenciais de *E. citriodora*, *E. globulus*, *M. alternifolia* e o *Blend* sobre *C. neoformans*.

Palavras chaves: *Cryptococcus neoformans*; óleos essenciais; antifúngicos naturais; microdiluição em caldo; *Eucalyptus citriodora*; *Eucalyptus globulus*; *Eugenia caryophyllus*; *Melaleuca alternifolia*; *Thymus vulgaris*.

ABSTRACT

Cryptococcus neoformans is a yeast and the pathogenic agent of cryptococcosis, a cosmopolitan infectious disease that affects humans, domestic and wild animals. Infection occurs by inhalation of the yeast and the disease manifests itself most often in people and animals with low cellular immunity. *C. neoformans* has tropism for the central nervous system. Effective treatment for cryptococcosis is amphotericin B with or without 5-flucytosine despite the high toxicity and nephrotoxicity. The objective of this study was to evaluate the in vitro activity of essential oils of *Eucalyptus citriodora*, *Eucalyptus globulus*, *Eugenia caryophyllus*, *Thymus vulgaris* and *Melaleuca alternifolia* and a mixture of *E. caryophyllus*, *M. alternifolia* and *T. vulgaris* called *Blend* on *Cryptococcus neoformans*. At doses subinhibitory assess capsule production and exoenzymes proteinase and phospholipase. We used 21 isolates of human origin, 29 environmental isolates and a standard sample of *C. neoformans* ICB 163 D (NIH 163D). To evaluate the antifungal activity and obtaining the minimum inhibitory concentration (MIC) used the technique of microdilution in RPMI 1640 with Tween-20 to 0.02% as an emulsifier. And the confirmation of inhibition in Sabouraud dextrose agar at 37 ° C for 48 hours to obtain the minimum fungicidal concentration (CFM). To evaluate the sensitivity fluconazol we used broth microdilution with RPMI 1640 and for the evaluation of sensitivity to amphotericin B was used to test commercial Etest ®. For each essential oil were found the following results for CFM50 and CFM90 *E. citriodora* - CFM50 21.97 to 2812,5 µg/mL and CFM90 703,12 to 2812,5 µg/mL, *E. globulus* - CFM50 175,78 to 703,12 µg/mL and CFM90 703,12 to 2812,5 µg/mL, *E. caryophyllus* - CFM50 87,89 to 175,78 µg/mL and the CFM90 703,12 µg/mL; *M. alternifolia* - CFM50 of 11.250 - 45.000µg/mL and the CFM90 45.000µg/mL, *T. vulgaris* - CFM50 21,97 to 175,78 µg/mL and CFM90 351,56 to 703,12 µg/mL, *Blend*- CFM50 175,78 to 351,56 µg/mL and CFM90 1406,25 to 2812,5µg/mL. The CFM50 for Fluconazole was 87,89µg/mL and the CFM90 175,78 - 22.500µg/mL and amphotericin B was CFM50 0,25 to 0,125 and CFM90 0,38 to 0,5µg/mL. The production of proteinase and phospholipase all isolates were strongly positive and after exposure to all essential oils have become negative. The presence of all isolates had capsules capsule and after contact with the oil caused a reduction or lack of it, as well as yeast cells tended to cluster number 2, 4 or more cells. For these reasons and conditions of this study concluded that the essential oils of *Eugenia caryophyllus*, *Thymus vulgaris*, showed fungicidal activity with the lowest inhibitory concentrations in relation to the essential oils of *Eucalyptus citriodora*, *Eucalyptus globules*, *Melaleuca alternifolia* and "Blend" on *C. neoformans*.

Keywords: *Cryptococcus neoformans*, essential oil, natural antifungals, broth microdilution, *Eucalyptus citriodora*, *Eucalyptus globulus*, *Eugenia caryophyllus*, *Melaleuca alternifolia*, *Thymu vulgaris*.

1. INTRODUÇÃO

1.1 GÊNERO *Cryptococcus*

O gênero *Cryptococcus* é classificado segundo o estado teleomórfico no Reino: Fungi, Divisão: Basidiomycota, Ordem: Filobasidiales, Família: Filobasidiaceae, Gênero *Filobasidiella*: Espécie: *Filobasidiella neoformans* var *neoformans* (sorotipo A e D) e *Filobasidiella neoformans* var *bacillispora* (sorotipo B e C). E respectivamente, na forma anamórfica: *Cryptococcus neoformans* var *neoformans* e *Cryptococcus neoformans* var *gattii* (Mitchell & Perfect, 1995; Kurtzman & Fell, 1998).

Cryptococcus sp podem formar hifas verdadeiras durante a reprodução sexuada, mas não são considerados fungos dimórficos verdadeiros porque a fase filamentosa é apenas transitória, surgindo após fusão entre dois *mating types*, ou tipos sexuais: α e **a** resultando no estágio sexuado do fungo denominado *Filobasidiella* spp (Mitchell & Perfect, 1995).

Este gênero possui em torno de 40 espécies e bioquimicamente, as espécies não fermentam açúcares, hidrolizam os amidos, produzem urease e assimilam inositol (Kurtzman; Fell, 1998).

Três sorotipos de *Cryptococcus neoformans* foram inicialmente, reconhecidos e ainda hoje são citados por alguns autores: sorotipo A (var. *grubii*), sorotipo D (var. *neoformans*) e sorotipo AD híbrido. Posteriormente *C. neoformans* foi definido como tendo duas variedades-*var neoformans* e *var gattii*. (Kurtzman & Fell, 1998, Casadevall & Perfect, 1998; Franzot *et al.*, 1999, Chuang *et al.* 2009; Zapata & Galindo, 2009; Liaw *et al.* , 2009; Zhu *et al.*,2009; Illnait-Zaragozi, 2010, Simwami *et al.* , 2011).

Estudos genômicos mostraram que as diferenças genéticas entre as variedades foram suficientes para classificá-las em duas espécies distintas: *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*; sendo considerados os principais patógenos para os seres humanos (Lengeler *et al.*, 2001; Litvintseva *et al.*, 2006). E em cinco sorotipos com base na especificidade antigênica do polissacarídeo capsular, denominado glicoronoxilomanana

(GXM), que é sintetizado tanto *in vivo* quanto *in vitro*, ficando *C. neoformans* (sorotipos A, D e AD), com distribuição mundial e responsável pela maioria das infecções associadas aos pacientes infectados pelo HIV (Human Immunodeficiency Virus) e *C. gattii* (sorotipos B e C) limitado a regiões tropicais e subtropicais, freqüentemente podendo ser a causa de infecção em indivíduos imunocompetentes. O sorotipo AD é o resultado da fusão entre a variedade de sorotipo A e um sorotipo D seguido por um defeito na meiose devido a incompatibilidades genômicas (Hoog, 2001; Lengeler *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2002; Nishikawa *et al.*, 2003; Litvintseva *et al.*, 2006; Liaw *et al.*, 2009; Ma & May, 2009; Zhu *et al.*, 2009; Zatz, *et al.*, 2010 e Kaufman *et al.* 2011).

1.1.1 *Cryptococcus neoformans*

C. neoformans são leveduras que macroscopicamente apresentam colônias lisas, convexas, na cor creme-amarelado, em meios de cultura sólidos, crescem entre 20 e 37° C e microscopicamente apresentam formas arredondadas com 3 a 6 µm de diâmetro e se reproduzem por brotamento. No hospedeiro e em certos meios de cultura, observa-se uma cápsula de polissacarídeo ao redor de cada célula. (Figura 1 e 2). Cepas de *C. neoformans* podem utilizar creatinina como fonte de nitrogênio e produzir melanina. É cosmopolita, comumente encontrada nas fezes de pombos ou no solo (Mitchell & Perfect, 1995, Kurtzman; Fell, 1998).

Os pulmões são a porta de entrada para estas leveduras que podem causar infecções no homem após ser inalada de ambiente habitados por aves (Mitchell & Perfect, 1995; Casadevall & Perfect, 1998; MA & MAY, 2009). O sistema nervoso central (SNC), a pele, a próstata e os olhos são os principais órgãos do hospedeiro afetados por *C. neoformans*. (Mitchell & Perfect, 1995).

Normalmente os isolados de *C. neoformans* são do sorotipo A e D. O sorotipo A é predominantemente o mais isolado e o responsável por 95%

das infecções. O sorotipo D é mundialmente encontrado, sendo prevalente em climas temperados. Na Europa, 30% dos isolados são deste sorotipo. (Ma & May, 2009).

As manifestações clínicas das infecções causadas pelos sorotipos A e D são semelhantes, embora sejam relatadas diferenças quanto à virulência em modelos animais (Lin *et al.*, 2008).

O sorotipo AD é um híbrido das variedades A e D. Diferentemente do que se pensava a infecção por esse sorotipo pode ser comum. Lengeler *et al.*, (2001); Xu *et al.*, (2002) relataram que na América do Norte aproximadamente 7,5% dos isolados ambientais foram sorotipo AD. No Brasil a presença do sorotipo AD foi observada em isolados de amostras tanto de origem humana como ambiental (Nishikawa *et al.*, 2003).

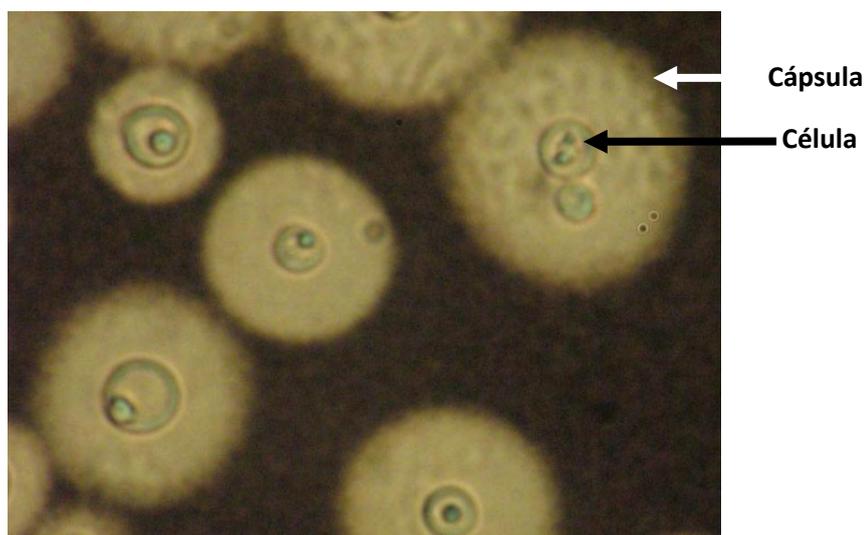


Figura 1. Cepa padrão de *Cryptococcus neoformans*- ICB-163 D – Aumento 3000X

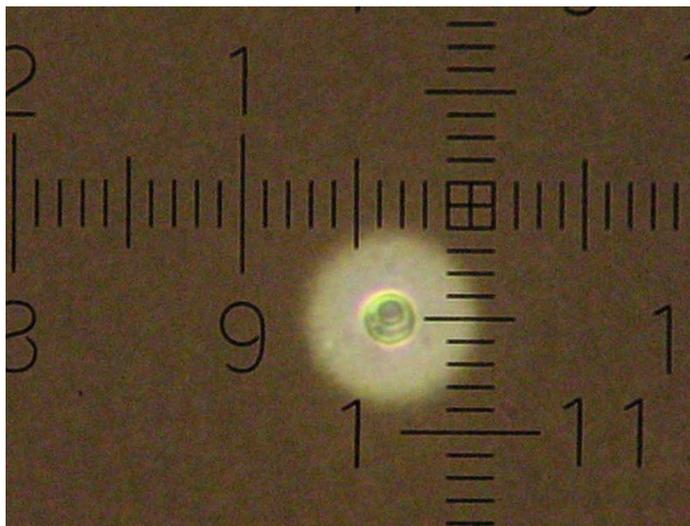


Figura 2. Cepa padrão de *Cryptococcus neoformans* – ICB-163 D – Aumento 3000X

1.1.2 *Cryptococcus gattii*

C. gattii é encontrado no ambiente principalmente em regiões tropicais e subtropicais, mas áreas de clima temperado e frio devem ser incluídas nesta distribuição (Franzot *et al.*, 1999, Nishikawa *et al.*, 2003). Inicialmente foi descrito na Austrália, associado a restos vegetais e de madeira em decomposição de várias espécies e em eucaliptos, especialmente *Eucalyptus camaldulensis* e *Eucalyptus tereticornis* (Ellis & Pfeiffer, 1990).

No Brasil foi isolado de outras espécies de árvores como *Moquilea tomentosa* (oiti), *Cassia grandis* (cássia gigante, cássia-rosa) *Mangira indica* (mangueira), entre outras, incluindo o *E. camaldulensis* na cidade de São Paulo. (Montenegro *et al.*, 2000; Granados & Castañeda, 2005; Dixit *et al.*, 2009).

C. gattii já foi isolado de amostras da cavidade bucal de animais nativos e domésticos na Austrália, como cães, gatos, cavalos e os marsupiais australianos como os coalas (Sorrell *et al.*, 1996).

Ma & May em 2009 relataram principalmente acometimento de indivíduos que não apresentavam deficiência imunológica, embora infecções associadas a portadores do HIV foram relatadas.

O paradigma de estar presente em regiões tropicais e subtropicais foi quebrado com o surto na Ilha de Vancouver, no Canadá, região de clima temperado. Neste caso esta levedura adaptou-se a um novo ambiente. Neste surto foram acometidos pacientes hígidos, imunodeprimidos, animais e espécies vegetais (Fraser *et al.*, 2003).

Fraser *et al.* em 2003 fizeram comparações dos isolados B e C de Vancouver e A e D da Austrália e forneceram um modelo para um questionamento central de como um organismo oportunista escapa do controle imune e evolui para uma patogenia primária.

C. gattii apresenta epidemiologia e ecologia distintas do *C. neoformans*, pois não tem distribuição universal e é praticamente restrito às regiões tropicais e subtropicais do Brasil, África, Austrália e sul da Califórnia. No entanto, a descrição do surto de Vancouver Island (Canadá) sugere que *C. gattii* esteja se adaptando aos ambientes de clima temperado (Kidd *et al.*, 2004).

1.2 CRIPTOCOCOSE

Criptococose é uma doença grave que pode ocorrer em indivíduos imunocompetentes, mas principalmente em pacientes imunocomprometidos, sobretudo paciente HIV positivo (McCarthy *et al.*, 2008).. O relatório do UNAIDS de 2009 relata que no mundo existem 33,4 milhões de pessoas com HIV e ocorreram 2,6 milhões de novas infecções nesse mesmo ano. Estima-se que tenha havido cerca de dois milhões de óbitos devido a doenças relacionadas à AIDS em todo o mundo em 2008.

Cryptococcus neoformans e *Cryptococcus gattii*, são os principais agentes etiológicos da criptococose, já que as outras espécies raramente são descritas (Kantarcioglu *et al.*, 2007). *Cryptococcus neoformans* é o patógeno fúngico mais comumente encontrado em infecções do sistema nervoso central (SNC), é de distribuição universal, isolado do solo, principalmente solos contaminados com excreta de aves, pombos em particular, além de madeira em decomposição, frutos, vegetais e ocos de árvores, (Lindenberg *et al.*, 2008; McCarthy *et al.*, 2008; Thakur *et al.*, 2008).

A criptococose é a segunda doença neurológica mais prevalente em pacientes brasileiros com AIDS (Vidotto *et al.*, 2006; Martins *et al.*, 2007; Pappalardo *et al.*, 2007). O índice de mortalidade da criptococose no SNC é de 15 a 30%, mesmo com o tratamento (Charlier *et al.*, 2008).

Atualmente, mesmo com a terapia antirretroviral para pacientes infectados pelo HIV, casos de criptococose são frequentes e apresentam alto índice de letalidade. A doença pode se manifestar mesmo durante este tratamento e o prognóstico continua a ser desfavorável (Dromer *et al.*, 2004; Dromer *et al.*, 2007; Friedman *et al.*, 2005; Lindenberg *et al.* 2008; McCarthy *et al.* 2008).

Entre os pacientes não infectados por HIV, a criptococose ocorre em 20 a 60% dos pacientes submetidos a transplante. Sendo a terceira causa de infecção fúngica invasiva nos pacientes transplantados por órgãos sólidos no mundo. No Brasil, a criptococose é considerada a segunda, dentre as infecções fúngicas, nesse grupo de pacientes (Shoham *et al.*, 2005; Consenso em Criptococose, 2008).

Os casos de infecção pelo *C. neoformans* em pacientes transplantados ocorrem principalmente nos adultos do sexo masculino, variando de 11 a 66 anos. A criptococose é considerada uma infecção tardia,

com aparecimento após um ano do transplante em 72% dos casos (Consenso de Criptococose, 2008).

Em gestantes, a transmissão vertical da criptococose é rara, mas pseudocistos no SNC foram descritos (Castro *et al.*, 2006).

Em crianças infectadas pelo HIV, a prevalência da infecção encontra-se em torno de um a 1,4%, diferente da população adulta onde a prevalência varia de 4 a 8% (Consenso de Criptococose, 2008).

No Brasil, a criptococose em crianças imunocompetentes foi relatada na região norte, no Estado do Pará com o maior número de casos. Foram estudadas 19 crianças, entre dois e 13 anos e todas com envolvimento no SNC, tais como: nódulo, atrofia difusa e hidrocefalia. *Cryptococcus gattii* foi responsável por metade dos casos e o óbito ocorreu em 30% das crianças (Correa *et al.*, 1999; Dannaoui *et al.*, 2006).

1.2.1 Patogênese

A hipótese mais aceita para esta infecção é a inalação dos propágulos leveduriformes desidratados, de 2 a 3 µm de diâmetro. Estes podem atingir os alvéolos pulmonares, podendo regredir ou progredir. A progressão para as formas sintomáticas dependerá da competência das células de defesa do hospedeiro, do número e da virulência das células de leveduras inaladas.

A ativação de macrófagos, normalmente são suficientes para uma resposta imunológica satisfatória. Contudo, a presença de cápsula é componentes de parede celular da levedura que pode tornar a resposta imunológica ineficaz, permitindo a infecção pulmonar em graus de extensão variáveis, bem como a subsequente disseminação da levedura para o sistema nervoso central (SNC) no qual tem tropismo, causando quadro grave de meningoencefalite, após disseminação hematogênica, podendo

ainda atingir outros órgãos e tecido cutâneo, ossos e próstata (Mitchell & Perfect, 1995; Bicanic; Harrison, 2004; Patel *et al.*, 2009).

O neurotropismo de *C. neoformans* pode estar associado a presença de substâncias que servem de substratos para a fenoloxidase como a epinefrina, noraepinefrina e dopamina que são essenciais para a atividade cerebral (Barbosa Jr, 2005; Severo *et al.*, 2009).

Recentemente foi descrito mecanismo de invasão direta do cérebro pela via capilar e envolvimento pela deformação celular. Neste caso, o neurotropismo de *C. neoformans* poderia ter mais de um mecanismo (SHI *et al.*, 2010).

1.2.2 Manifestações Clínicas

A criptococose é uma infecção oportunista, cosmopolita, associada a condições de imunodepressão celular do hospedeiro causada principalmente por *C. neoformans* e a criptococose primária de hospedeiro aparentemente imunocompetente é endêmica em áreas tropicais e subtropicais, causada predominantemente por *C. gattii* (Mitchell & Perfect, 1995; Franzot *et al.*, 1999; Nishikawa *et al.*, 2003; Bicanic & Harrison, 2004).

A infecção pulmonar subclínica é a forma mais comum da criptococose, ainda que seja diagnosticada menos freqüentemente do que a meningite, por ser muitas vezes assintomática. Na forma pulmonar, os sintomas quando presentes, incluem febre variável, dor no peito, tosse, e a produção de escarro mucóide e sanguinolento. Os achados radiológicos são variáveis com áreas bem circunscritas de pneumonite comum. As lesões podem ser bilaterais ou comprometer apenas um lobo. Infiltrado difuso e doença miliar, semelhante à tuberculose também são diagnosticados. Cavitação, fibrose e calcificação não são comuns (Mitchell & Perfect, 1995, Kinjo *et al.*, 2009; Sakurai, *et al.*, 2009).

A infecção no cérebro e nas meninges é a forma clínica mais importante, e a mais relacionada com mortes nos casos de criptococose. Em pacientes aids a neurocriptococose é muito insidiosa no início, com poucos sintomas meníngeos. Em alguns pacientes, no entanto, a infecção é muito mais abrupta no princípio, sendo a cefaléia o sintoma mais comum (Mitchell & Perfect, 1995; Patel *et al.*, 2009).

Eventualmente a manifestação no SNC pode simular massa tumoral encefálica denominada criptococoma cujo diagnóstico confirmatório utiliza a biópsia estereotáxica e a tomografia computadorizada (Oliveira *et al.*, 2007; Sakurai, *et al.*, 2009 Zatz *et al.*, 2010).

1.2.3 Fatores de Virulência

Apesar de certos aspectos da virulência serem determinados geneticamente estes são expressos pelos microrganismos apenas quando existem condições ambientais favoráveis, tais como: teor nutricional, atmosfera de oxigênio e temperatura. Essas condições são específicas para cada microrganismo e podem variar de hospedeiro para hospedeiro e mesmo entre os diferentes tecidos de um mesmo hospedeiro (Ghannoum e Radwan, 1990).

Nenhum fator de virulência parece ser responsável individualmente pela patogenicidade, mas provavelmente uma combinação dos diferentes fatores que atuam em determinadas fases da infecção (Cutler, 1991; Odds, 1994; Pires *et al.*, 2001).

Os fatores implicados na virulência de *C. neoformans* são a capacidade de crescer a 37°C, a produção de cápsula polissacarídica rica em glicoxilomanana (GXL), a produção de proteinases e fosfolipases extracelulares, a produção de melanina, a produção de manitol, urease, assim como o sistema *mating-type*. Além destes, produção de lacase e superóxido dismutase (Mitchell & Perfect, 1995; Chang *et al.*, 2000; Cox *et*

al., 2000; Nishikawa *et al.*, 2003; Dambrós, 2005; Dias *et al.* 2006 (a); Cerikã *et al.*, 2009, Eisenman *et al.*, 2009; Gates-Hollingsworth MA & Kozel TR, 2009; Liaw *et al.*, 2009; Liu & Nizet, 2009; Campos & Baroni, 2010).

1.2.3.1 Cápsula

A cápsula é considerada um importante fator de virulência com capacidade imunossupressora e antifagocítica. É constituída pelos polissacarídeos glucuronoxilomanana (GXM) (90%), galactoxilomanana (GalXM) (7%) e manoproteína (MP)(3%) (Mitchell & Perfect, 1995; Casadevall & Perfect, 1998; Casali *et al.*, 2001; Nishikawa *et al.*, 2003; Moyrand *et al.*, 2002; Levitz & Specht, 2006; Zaragoza *et al.*, 2009).

Como um patógeno intracelular facultativo *Cryptococcus* libera a cápsula polissacarídea intracelularmente e esta se acumula em vesículas no citoplasma o que tem efeito negativo nos macrófagos e permite a sobrevivência da levedura (Viviani & Tortorano, 2009; Anaisse *et al.*, 2009).

Liaw *et al.*, em 2010 observaram que todas as 100 cepas de *C. neoformans* utilizadas no estudo produziram cápsulas, porém não ocorreu uma correlação significativa entre o tamanho da cápsula ou qualquer um dos outros três fatores de virulência (produção de melanina, produção de fosfolipase e urease).

Relatos na literatura informaram que a cápsula tem um importante papel na sobrevivência e é considerada essencial para a virulência de *C. neoformans*, promovendo a proteção do fungo no meio ambiente à desidratação e o efeito de radiações solares (Zaragoza *et al.*, 2003; Martinez, & Casadevall, 2005; Zaragoza *et al.*, 2009).

A cápsula como principal fator de virulência e a complexidade dessa estrutura na superfície de *C. neoformans* vem despertando o interesse no

processo de síntese, expressão e formação dessa estrutura na superfície do fungo.

Em geral, os sinais que induzem o crescimento da cápsula são muito heterogêneos, tais como pH, concentrações de ferro livre, disponibilidade de CO₂, osmolaridade do meio, concentração de nutrientes, temperatura e sorotipo (Zaragoza *et al.*, 2009).

A distinção dos cinco sorotipos para este fungo (A, B, C, D e AD) é baseada na reação imunológica com anti-soro produzido contra diferentes epítopos dos polissacarídeos que compõe a cápsula da levedura (Nishikawa *et al.*, 2003).

1.2.3.2 Crescimento a 37° C

Para iniciar uma infecção sistêmica, qualquer microrganismo deve ser capaz de crescer no hospedeiro (Mitchell & Perfect, 1995). Estudos com mutante de *C. neoformans* sensível a altas temperaturas demonstraram ter sua virulência atenuada (Bovers *et al.*, 2008).

C. neoformans e *C. gattii* crescem a 37° C (Steenbergen & Casadevall, 2003), mas nem todas as leveduras do gênero *Cryptococcus* tem habilidade de crescer nessa temperatura (Mitchell & Perfect, 1995). À 41° C, essas leveduras podem ser inibidas ou mortas, sendo esta temperatura de restrição determinante para a patogenicidade. Apesar de *C. neoformans* e *C. gattii* apresentam bom crescimento a 37° C, a temperatura ótima de crescimento para ambas as espécies está entre 30 e 35 °C (Mitchell & Perfect, 1995; Bovers *et al.*, 2008).

1.2.3.4 Fosfolipase

A fosfolipase é um fator de virulência relacionado à capacidade da levedura de desestabilizar as células epiteliais e endoteliais, por meio da hidrólise das ligações éster em glicerofosfolípídeos na bicamada lipídica da membrana celular (Ghannoum 2000), permitindo a penetração do microrganismo nos tecidos do hospedeiro.

Cox *et al.* (2001) associaram a produção da enzima com virulência, pois ao induzir mutação no gene *PBL1* que codifica a fosfolipase e com posterior infecção em camundongos observaram que as cepas selvagens, ou seja, sem mutação, eram mais virulentas que as cepas mutantes.

As fosfolipases constituem um grupo heterogêneo de enzimas com atividade de fosfolipase B (PLB), lisofosfolipase (LPL) e lisofosfolipase transacilase (LPTA). De maneira geral essas enzimas são hábeis em hidrolisar um ou mais ésteres ligados a glicerofosfolípídios. Ainda não está claro como essas enzimas contribuem na patogênese, mais é sabido que elas facilitam a invasão das barreiras ricas em fosfolípídios, como membranas celulares (Cox *et al.*, 2001). Sendo assim, as atividades das fosfolipases podem resultar, na lise celular (Cox *et al.*, 2001; Ghannoum, 2000). Além disso, acredita-se que a ação dessas enzimas resulte em lise das células fagocitárias e degradação da membrana do fagossomo liberando a célula no citoplasma do fagossomo (Schmiel & Miller, 1999).

C. neoformans excreta fosfolipase B (PLB), lisofosfolipase (LPL) e transacilase de lisofosfolipase (LPTA) e a quantidade de produção da enzima está correlacionada com a virulência em ratos. As três enzimas são mais ativas em temperaturas que variam de 25°C a 40°C (Santangelo *et al.*, 1999).

Baroni (2001) relata que a produção desta enzima foi positiva em 90% das cepas de *C. neoformans* isoladas de excretas de pombos.

1.2.3.5 Proteinase

As proteinases contribuem para a virulência do microrganismo por destruírem proteínas do hospedeiro, causando dano tecidual ou vasodilatação crescente, que provavelmente fornece nutrientes para o patógeno, fazendo com que ocorra a invasão e disseminação dos fungos nos tecidos do hospedeiro. As proteinases atuam através da degradação de proteínas como: colágeno, elastina, fibrinogênio e, principalmente de proteínas imunologicamente importantes como imunoglobulinas e fatores do sistema complemento. Desta forma pode interferir com os mecanismos de defesa do hospedeiro, pela destruição destas proteínas envolvidas no sistema imune (Aoki *et al.* 1994, Chen *et al.* 1996). *C. neoformans* apresenta na maioria das vezes baixa atividade proteolítica (Casadevall & Perfect 1998).

Aoki *et al.*, (1994), utilizando oito cepas de *C. neoformans* isoladas de pacientes com AIDS e empregando meios líquidos e sólidos para observação da atividade proteolítica, mostraram que todas as cepas cresceram bem em meio, ágar *Yeast Carbon Base* suplementado com 0,1% de albumina bovina e com 0,01% de polipeptona. Observaram também, nesta fase, um decréscimo na quantidade de albumina bovina, talvez, *C. neoformans* produza proteinase e use a albumina bovina como fonte de nitrogênio.

Amostras de *C. neoformans* isoladas de excretas de pombos da cidade do Rio de Janeiro, não foram produtoras desta enzima (Baroni, 2001). Em estudo com 116 amostras de *C. neoformans* isoladas do sistema

nervoso central de cães, todas foram produtoras de proteinase e fosfolipase (Campos & Baroni, 2010).

1.3 ANTIFÚNGICOS SINTÉTICOS

O uso da anfotericina B, associada ou não a 5-flucitosina é o principal tratamento para a criptococose, embora os efeitos colaterais sejam extremamente graves (Casadevall; Perfect, 1998).

A anfotericina B foi introduzida na década de 1950, atua sobre *C. neoformans* por meio de ligação específica ao ergosterol, presente na membrana da célula fúngica. Esta ligação resulta em uma desorganização da membrana, pela formação de poros, compostos por pequenos agregados do fármaco e ergosterol. Estes defeitos causam despolarização da membrana, aumento na sua permeabilidade para prótons e cátions monovalentes e conseqüentemente lise e morte celular (Groll & Kolve 2004).

A anfotericina B ainda permanece como a substância fungicida mais utilizada no tratamento de micoses sistêmicas, principalmente em pacientes imunocomprometidos, mesmo com a sua alta nefrotoxicidade (Filippin & Souza, 2006). A alternativa utilizada está sendo a formulação lipídica - anfotericina B lipossomal, que tem apresentado resultados positivos, com menor nefrotoxicidade do que a anfotericina B convencional (Bicanic & Harrison, 2004; Dambrós, 2005, Liaw *et al.*, 2009; Ritter & Goldman, 2009).

Na década de 80 o fluconazol e o itraconazol, inibidores da síntese de ergosterol, colaboraram no tratamento da criptococose, principalmente após a ocorrência de pacientes portadores de HIV. No entanto, para o tratamento da criptococose, o fluconazol mostrou-se superior em relação ao itraconazol (Dismukes, 1993; Bicanic & Harrison, 2004, Liaw *et al.* , 2009; Ritter & Goldman, 2009 ; Sakurai, *et al.*, 2009).

Convém lembrar que nas falhas terapêuticas, para caracterizar uma amostra como resistente é fundamental o conhecimento de questões como: o estado imunológico do paciente, os níveis séricos ideais do antifúngico, interações medicamentosas e outros agentes infecciosos associados que não só a levedura (Polachini, 2004).

Uma substancia eficaz e com baixa toxicidade e tolerância por via oral é necessária como terapia para essa doença. Pesquisas com extratos e óleos essenciais de plantas, eficazes e com menos efeitos colaterais pode ser uma novas opção para o tratamento desta infecção (Dismukes, 1993; Araújo *et al*, 2004; Meneses *et al.*, 2009).

1.4 ANTIFÚNGICOS NATURAIS

Para Sallé (1996), a maior parte dos medicamentos sintéticos têm sua origem nos componentes ativos das plantas.

O estudo inicia-se a partir de um revisão etnofarmacológica, identificando as espécies mais utilizadas pela população e com atividade antifúngica, assim vários extratos de plantas, tinturas óleos essenciais e produtos opoterápicos tem sido testados sobre leveduras principalmente do gênero *Candida* (Araújo *et al.*, 2004; Carvalho, 2004; Polachini, 2004; Silva, 2004; Oliveira, 2005; Duarte, 2006, Lima *et al.*, 2006; Oliveira, *et al.*, 2006; Abrahão, 2007; Oliveira, 2007; Oliveira *et al.*, 2007, Silva, 2007 e Costa *et al.*, 2009)

As plantas possuem composições químicas complexas, envolvendo centenas de compostos em pequenas concentrações. Essa complexidade faz com que tenham aplicação em diversas doenças, e nem sempre umas estão relacionadas com as outras; podendo uma planta servir para mais de uma enfermidade quando aplicada como fitoterápico (Polachini, 2004).

Ferreira (1998), relata ser muito comum que o extrato de uma planta medicinal seja uma mistura de substâncias. A separação em substâncias isoladas -pode levar a perda do efeito farmacológico esperado.

Um dos primeiros estudos relacionando a antifúngicos naturais sobre *Cryptococcus* foi realizados por Viollon e Chaumont (1994). Neste *C. neoformans* foi inibido por óleos essenciais de palmarosa e canela e substancias isolados desses óleos, como compostos fenólicos, timol e carvacrol, terpenóides, citral, geraniol e citronelol.

Passos *et al.*, (2002) estudaram *in vitro* a atividade antifúngica de *Caryocar brasiliensis* sobre *C. neoformans* e observaram a inibição do crescimento em 91,3% (21/23) dos isolados dessa levedura em concentração \leq a 250 μ g/mL.

Ocimum gratissimum L., conhecida como alfavaca, foi testada quanto as suas propriedades antifúngicas sobre *C. neoformans*, *Paracoccidioides brasiliensis* e *Histoplasma capsulatum* e mostrou ter atividade antifúngica para *C. neoformans* e *P. brasiliensis* mas não para *H. capsulatum*. (Lemos, 2004).

A planta popularmente conhecida como sucupira-branca (*Pterodon emarginatus*), possui propriedades farmacológicas, utilizadas contra reumatismo e diabetes e apresentou atividade antifúngica sobre *C. neoformans* (Santos *et al.*, 2007).

Isolados de *C. neoformans* foram submetidos ao teste de atividade antifúngica do extrato etanólico de própolis (EEP) G12 nas concentrações de 0,1 a 1,6 mg.mL⁻¹. O efeito inibitório do EEP G12 sobre o crescimento fúngico foi observado na concentração de 0,2 mg/mL⁻¹. Fernandes *et al.*, (2007), observaram que a concentração de 1,6 mg/mL⁻¹ foi considerada fungicida.

As plantas utilizadas na medicina popular representam uma alternativa econômica e de fácil acesso para o tratamento de doenças, mas

necessitam de estudos aprofundados para uso com finalidades terapêuticas adequada as diversas doenças.

1.4.1 Óleos Essenciais

A denominação de óleo essencial refere-se a um complexo de substâncias naturais, extraídas de diversas partes de plantas por meio de destilação por arraste com vapor d'água, e os obtidos por expressão de pericarpos cítricos. São constituídos de numerosos compostos voláteis, com tensões de vapor elevadas, odoríferos, insolúveis em água, porém, solúveis em álcool e em vários solventes imiscíveis na água (Simões, 2004).

Os óleos essenciais constituem um dos mais importantes grupos de substâncias para as indústrias farmacêuticas, alimentícias e de cosméticos. Constituídos principalmente por substâncias de baixo peso molecular que são os monoterpenos, sesquiterpenos, fenilpropanóides, ésteres, alcoóis, aldeídos e cetonas, normalmente são utilizados *in natura*, pois suas propriedades estão associadas a vários componentes que formam cada óleo em particular.

A principal característica é a volatilidade, diferindo dos óleos fixos, misturas de substâncias lipídicas, obtidos geralmente de sementes. Está associada a várias funções necessárias a sobrevivência do organismo vegetal em um ecossistema, exercendo o papel fundamental na defesa contra microrganismos e predadores, como também na atração de insetos e outros agentes polinizadores (Craveiro & Queiroz, 1993; Vitti & Brito, 2003; Magalhães, 2009).

As estruturas secretoras tem se mostrado relevante para o conhecimento da anatomia vegetal, da natureza química do exsudato e do papel que desempenham no corpo do vegetal. De acordo com a família a que pertencem às diversas espécies de plantas acumulam essas

substâncias voláteis em órgãos vegetais específicos: folha, flor, fruto, semente, caule, etc (Gazim et al., 2008).

Cerca de 60% dos óleos essenciais possuem propriedades antifúngicas (Gazim et al., 2009).

1.4.2 Espécies vegetais dos óleos essenciais estudados

1.4.2.1 *Eucalyptus citriodora* Hooker

Eucalyptus citriodora Hooker., pertencente a Família Myrtaceae, ocorre principalmente no norte e no sul de Queensland, na Austrália, em altitudes que variam de 50 a 1000 m e de 70 a 400 m de altitude, respectivamente. *E. citriodora* (Figura 3 A e B) é uma árvore de porte médio. As árvores originárias do norte possuem casca rosada e as do sul apresentam manchas em sua casca e a copa espalhada. Crescem em vários tipos de solo, em florestas abertas com outras espécies, mas é facilmente diferenciada pelo forte cheiro de citronela de suas folhas. No Brasil, *E. citriodora* foi introduzido com outras espécies de eucalipto, com o objetivo inicial de produção da madeira. Além das aplicações na indústria de móveis e construção, atualmente é o eucalipto mais cultivado no país para produção de óleo essencial. (Vitti & Brito, 2003).

Na composição do óleo do *E. citriodora* encontra-se citronelal, geraniol, cineol, isopulegol, pinenol e sesquiterpenos. Citronelal entra na composição de produtos como aromatizantes, sabonetes, cremes dentais, detergentes, balas, perfumes, desodorantes, desinfetantes, ceras, saches, inseticidas, etc (Andrade & Gomes, 2000).

O citronelal é indicado no tratamento de casos de infecções pulmonares, principalmente a tuberculose entre outras doenças respiratórias (Duarte, 2007). Também é utilizado como antifúngico, antiinflamatório nas infecções geniturinárias, herpes zoster como antivírus e antialérgico, reumatismos, artrites cervicais, dorsais e reumáticas.



Fonte: http://www.desert-tropicals.com/Plants/Myrtaceae/Eucalyptus_citriodora.html

Figura 3 A e B . *Eucalyptus citriodora* – A: hábito arbóreo; B: detalhe das folhas

1.4.2.2 *Eucalyptus globulus* Labill

Eucalyptus globulus Labill., pertencente a família Myrtaceae, *E. globulus* (Figura 4 A e B) é uma árvore nativa da Austrália, onde após a colonização europeia, se espalhou por quase todas as regiões tropicais e subtropicais do globo. Possui folhas alternadas, grande, brancas e vistosas e seu fruto é do tipo cápsula. Foi à primeira espécie de eucalipto introduzida no Brasil, visando a produção de madeira. O início da extração de óleo ocorreu durante a Segunda Guerra Mundial, devido às dificuldades de importação deste tipo de óleo. Por ser explorado em pequena escala, uma vez que esta espécie está mais adaptada a climas frios, o óleo produzido no Brasil sofre grande concorrência com o importado da China. O rendimento em óleo essencial no Brasil varia de 1,6 a 2%, com teor de cineol de 70 a 80% (Vitti & Brito, 2003; Rocha & Santos, 2007).

No Brasil é popularmente conhecido como: árvore – da - febre, gomeiro - azul (Cunha et al., 2003), comeiro – azul, eucalipto, mogno – branco, eucalipto – limão (Lorenzi & Matos, 2002).

O eucalipto é uma planta com grande importância, tanto do ponto de vista econômico, quanto medicinal.

Apesar das folhas de todas espécies de *Eucalyptus* terem propriedades idênticas, as do *E. globulus* que possuem a preferência no uso medicinal. São ricas em tanino e do óleo essencial sendo extraídos o 1,8 - cineol ou eucaliptol destinados a fabricação de produtos farmacêuticos como inalantes e mucolítico, produtos de higiene bucal e para dar sabor e aromatizar medicamentos (Vitti & Brito, 2003). Altas doses de óleos essenciais podem provocar, em geral, nefrites e hematúrias. Somente a espécie de *E. globulus* pode ser utilizada internamente (Martins et al., 2003). Podendo estar incluídos em formas farmacêuticas tais como: elixires, xaropes, loções peitorais, para combater afecções das vias respiratórias (garganta, brônquios, pulmões sinusites e rinites alérgicas), afecções do fígado, estômago e da bexiga, bem como nas dores ciáticas, reumatismos, gota,. Como anti-séptico, em lesões da pele, úlceras e outras enfermidades da pele produzidas por vírus e bactérias e como desinfetante. Como protetor e fortalecedor da musculatura ainda é pouco conhecido. O Óleo de Eucalipto é tônico, imunoestimulante ideal para a manipulação de produtos ligados a recuperação muscular e prática esportiva, utilizado em forma de gel, xampu, óleo de massagem, óleo para banho, spray ambiente e antifúngico (Cordero, 1978; Zoghbi et al., 2001; Rocha & Santos, 2007).

Durante o verão, as árvores de eucalipto podem aparecer envoltas por uma névoa azul, provocada pelo óleo essencial que evapora de suas folhas, liberando moléculas com propriedade anti-sépticas, que podem ajudar a proteger contra as pragas. A expressão “as florestas azuis da Austrália” origina-se deste fenômeno (Price, 1999).



Fonte: <http://www.homeopathyandmore.com>

Figura 4 A e B. *Eucalyptus globulus* - **A:** hábito arbóreo; **B:** detalhe das folhas

1.4.2.3 *Eugenia caryophyllus* Sprengel

Eugenia caryophyllus Sprengel., pertence a Família Myrtaceae, originária da Índia e cultivada em lugares de clima quente e úmido. A árvore de *E. caryophyllus* (Figura 5A, B e C) pode atingir de 15 a 20 metros de altura e produz botões aromáticos conhecidos na culinária como cravo-da-índia. No Brasil é cultivada desde São Paulo até a Bahia. Os botões florais são secos a sombra e submetidos à extração do óleo essencial, ou usado apenas como especiaria na culinária. O rendimento em óleo, na destilação por arraste a vapor, em torno de 16 a 18%. O óleo essencial de cravo-da-índia localiza-se, em maior quantidade nos botões florais e nas folhas (6,6%), rico em eugenol (85%). O eugenol é um dos constituintes do óleo essencial de *E. caryophyllus*, utilizado como analgésico, germicida, antisséptico e anestésico local, de uso tópico em odontologia (Rodrigues, 2001). O óleo essencial de *E. caryophyllus* pode apresentar outros compostos como cariofileno, humuleno, acetato de eugenila, óxido de cariofileno, aldeídos e derivados de furfural. Também utilizado como analgésico, germicida, antisséptico e anestésico tópico em odontologia,

também é utilizado na síntese de outras substâncias como a vanilina (Sousa *et al.*, 1991).



Fonte: <http://www.terra-flor.com/produto/cravo> e <http://natural.enternauta.com.br/plantas-medicinais/cravo-da-india-propriedades-medicinais/>

Figura 5 A, B e C. *Eugenia caryophyllus* – **A:** botões florais; **B:** botões florais em processo de secagem natural; **C:** Botões florais secos (cravo-da-índia)

1.4.2.4 *Melaleuca alternifolia* Chell

Melaleuca alternifolia Chell., (Figura 6 A e B), pertence a Família Myrtaceae, conhecida como Tea Tree ou árvore de chá e o Óleo de Melaleuca, são originárias da Austrália, podem atingir sete metros de altura, têm uma casca fina e folhas longas e pontiagudas que, quando partidas, emitem um aroma forte. O óleo varia de incolor ao amarelado, tem um aroma que lembra eucalipto. Obtido das folhas, o óleo pode conter quantidades variadas de terpenos (pineno, terpineno e cimeno), terpinenol (terpinen-4-ol), sesquiterpenos e cineol que são os constituintes mais importantes relacionados à atividade antimicrobiana. O cineol é um conhecido irritante da pele e o terpinenol é apontado como o maior contribuinte da atividade antimicrobiana dentre os componentes. O óleo de boa qualidade contém quantidade iguais ou superiores a 2 e 5% de cineol e entre 40 a 47% de terpinenol. (Simões *et al.*, 1999; Hammer *et al.*, 2003; Carson *et al.*, 2006).

A partir da destilação das suas folhas, ramos e caule é possível extrair um óleo conhecido mundialmente pelas suas características benéficas. Devido às suas qualidades curativas, o óleo de Melaleuca “Tea tree oil” foi usado pelas tribos aborígenes da Oceania durante anos. As folhas desta planta eram esmagadas juntamente com lama, sendo a pasta assim obtida e aplicada no tratamento de cortes e infecções da pele (Silva et al., 2002; Simões *et al.*, 2002; Hammer et al., 2004).

O óleo de Melaleuca “Tea Tree Oil” é um potente agente antisséptico, antifúngico e parasiticida natural, não tóxico e não irritante para os tecidos, muito testado clínica e laboratorialmente. O óleo de Melaleuca é reconhecidamente um germicida potente, eficaz em inibir o crescimento de diversos tipos de microrganismos, tais como: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Aspergillus Níger*, *Streptococcus pyogenes*, dentre outros, mesmo na presença de sangue ou de material fecal (Oliveira et al., 2003; Hammer et al., 2004).

As propriedades antibacteriana, antifúngica e antiviral do óleo vêm da combinação de muitos compostos diferentes trabalhando juntos. Geralmente, a ação do óleo essencial é o resultado do efeito combinado de ambos os compostos ativos e inativos. Os compostos inativos podem influenciar a velocidade das reações e biodisponibilidade dos compostos ativos. (Peciulyte, 2004).



Fonte: <http://www.herbgarden.co.za/mountainherb>

Figura 6 A e B. *Melaleuca alternifolia* - A: hábito arbóreo; B: folhas e floração;

1.4.2.5 *Thymus vulgaris* Lin.

Thymus vulgaris Linneaus., pertencente à Família Lamiaceae é uma pequena planta arbustiva comum de sabor e odor fortes. Conhecido popularmente como tomilho, tomilho-de-inverno, erva-urso, timo, arçã, segurelha, tomilho-ordinário, tomilho-vulgar, poejo, tomilho-de-jardim, o *T. vulgaris* é principalmente utilizado como chá e tempero. Possui folhas pequenas, lineares ou lanceoladas e flores róseas ou esbranquiçadas. O tomilho produz óleo essencial com atividade inseticida, rico em carvacrol (0,07%) e timol (13 a 58%) (Castro *et al.*, 2003) (Figura 7 A, B e C).

Suas propriedades medicinais são: adstringente, antisséptico, diurético, expectorante, imunoestimulante (www.plantasmedicinaisefitoterapia.com), efeito antibacteriano, antifúngico e anti-helmintico para o timol e efeito bactericida para o carvacrol (Carreto *et al.*, 2007).

Os principais componentes do óleo essencial de tomilho são: borneol, carvacrol, linalol, cimol, timol, taninos, flavonóides saponinas e ácidos terpênicos. O óleo essencial e extratos de folhas frescas e as flores podem ser utilizadas como aditivos aromáticos em alimentos, produtos farmacêuticos e cosméticos. *T. vulgaris* é antiespasmódico, carminativo, expectorante e sedativo. Na forma de extrato ou infuso, o tomilho é utilizado para inflamações de garganta, problemas nos brônquios, incluindo bronquite aguda, laringite, coqueluche, também para a gastrite crônica (Klaric *et al.*, 2006; Behnia *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2010).



Fonte: http://gardening.wikia.com/wiki/Thymus_vulgaris

Figura 7 A e B. *Thymus vulgaris* – **A:** tomilho rosa; **B:** tomilho branco

1.4.2.6 Blend de óleos essenciais

O *Blend* é uma mistura de três óleos essenciais: *Eugenia caryophyllus*, *Melaleuca alternifolia* e *Thymus vulgaris*. (Anexo 8)

1.5 Considerações

Considerando que *C. neoformans* é um dos principais patógenos oportunistas em indivíduos imunodeprimidos, principalmente em pacientes com HIV;

Considerando que o tratamento utiliza a anfotericina B que é altamente nefrotóxica;

Considerando que existe a possibilidade da resistência de algumas cepas aos antifúngicos convencionais;

É relevante contribuir com novas opções terapêuticas, eficazes e seguras de baixo custo para a população e maior acessibilidade ao produto, no controle de condições mórbidas prevalentes.

Neste trabalho avaliou-se a atividade antifúngica de óleos essenciais sobre *C. neoformans*.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral:

Avaliar a atividade antifúngica dos óleos essenciais de *Eucalyptus citriodora*, *Eucalyptus globulus*, *Eugenia caryophyllus*, *Melaleuca alternifolia*, *Thymus vulgaris* e um *Blend* composto por uma mistura de óleos essenciais de *Eugenia caryophyllus*, *Melaleuca alternifolia*, *Thymus vulgaris* sobre *Cryptococcus neoformans*.

3.2 Objetivos específicos:

- Avaliar *in vitro* agentes tensoativos e solventes a serem utilizados nos testes de atividade antifúngica dos óleos essenciais sobre *C. neoformans*.
- Avaliar *in vitro* a atividade dos óleos essenciais de *Eucalyptus citriodora*, *Eucalyptus globulus*, *Eugenia caryophyllus*, *Melaleuca alternifolia*, *Thymus vulgaris* e um *Blend* de óleos essenciais sobre *C. neoformans* com e sem agentes tensoativos e solventes.
- Observar a presença, redução ou ausência de cápsulas em isolados de *C. neoformans*, antes e após contato com os diferentes óleos essenciais.
- Determinar e comparar a produção das exoenzimas proteinase e fosfolipase em isolados de *C. neoformans*, antes e após contato com os diferentes óleos essenciais.
- Avaliar o comportamento dos isolados de *C. neoformans* frente aos antifúngicos fluconazol e anfotericina B como medicamento controle.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 *C. neoformans*

Foram utilizados vinte e um isolados biológicos de origem humana sendo 08 de pacientes com sorologia positiva para o HIV e 13 com sorologia desconhecida para o HIV e 29 isolados de origem ambiental e uma cepa padrão de *C. neoformans* ICB 163 D (NIH 163D) mantidas na micoteca do Laboratório de Leveduras Patogênicas da Seção de Micologia do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo – ICB/USP.

Todos os isolados foram mantidos em ágar Sabouraud Dextrose (Difco – USA). E reidentificados quanto às características macroscópicas, microscópicas e fisiológicas (Kurtzman e Fell, 1998), conforme o protocolo utilizado para a identificação de leveduras desse mesmo Laboratório (Anexo 2).

4.1.1 Pesquisa de fatores de virulência

4.1.1.1 Produção de exoenzimas - Proteinase e Fosfolipase

A produção de proteinase e fosfolipase foi avaliada antes e após contato com os óleos essenciais.

A proteinase foi avaliada segundo a técnica descrita por Ruchel *et al* (1982) (Meio Base: ágar (Difco) 18,0 g; água destilada 900,0 mL. Este meio foi autoclavado a 120°C por 15 minutos. Meio de albumina; *yeast carbon base* (Difco) 11,7 g; albumina bovina fração V (Sigma) 2,0 g; protovit (manipulado por Farmácia Bueno Ayres, SP-Brasil) 2,5 mL; água destilada 100,0 mL. Este meio foi esterilizado por filtração em membranas, Milipore de 0,22 mm. O meio básico esterilizado foi resfriado a 50°C, adicionando-se o meio de albumina e em seguida a mistura foi distribuída em placas de Petri em volume de 20 mL).

A atividade enzimática da proteinase foi observada pela formação de um halo ao redor da colônia (PZ). PZ é igual á razão entre o diâmetro da colônia (dc) e o diâmetro da colônia (dc) + diâmetro de degradação (zd) \Rightarrow $PZ = dc/dc + zd$.

A fosfolipase avaliada conforme descrita por Price *et al* (1982). (Meio de emulsão de ovo: gema de ovo 80,0 g; solução fisiológica 80,0 mL. Os ovos foram deixados em álcool a 70% durante uma hora para serem desinfetados. Em seguida as gemas foram separadas e colocadas em um recipiente estéril contendo pérolas de vidros, pesadas e adicionadas a solução salina 0,9%, agitando-se em vortex. Meio ágar fosfolipase: peptona (Difco) 10,00g; glicose (Synth) 20,00 g; cloreto de sódio (Reagen) 53,30 g; cloreto de cálcio (Reagen) 0,55 g; ágar (Difco) 20,00 g; água destilada 1000,00 mL. O meio foi autoclavado a 120°C por 15 minutos. Ao ágar resfriado a 50°C foi adicionada uma emulsão de ovo. Volume de 20mL foi distribuído em placas de Petri.

A atividade enzimática da fosfolipase é observada pela formação de um halo de precipitação ao redor da colônia (PZ). PZ é igual à razão entre o diâmetro da colônia (dc) e o diâmetro da colônia (dc) + diâmetro de precipitação (zp) \Rightarrow $PZ = dc/dc + zp$.

Após contato com o óleo essencial a pesquisa de produção das exoenzimas foi realizada nas concentrações sub-inibitórias da cepa padrão *C. neoformas* ICB 163 D e de cada isolado testado. Como controle de produção das exoenzimas, isolados sem o contato com o óleo essencial foram avaliados simultaneamente. As amostras foram semeadas em pontos equidistantes de cada placas de Petri contendo o meio específico para cada enzima. Todas as amostras foram incubadas em estufa a 32°C com leituras em dias alternados até 15 dias, conforme descrito por Campos & Baroni, (2010).

Os resultados foram classificados de acordo com Price *et al.*, 1982:

Índice 1 - Pz =1,0 = Ausência de atividade enzimática

Índice 2 - $1,0 < Pz \leq 0,64$ = Atividade enzimática positiva

Índice 3 - $Pz < 0,64$ = Atividade fortemente positiva

4.1.1.2 Pesquisa de Cápsula

A pesquisa da cápsula foi realizada colocando-se um inóculo da levedura a ser testada e uma gota de tinta da nanquin entre lâmina e lamínula e observou-se no microscópio de luz a presença de cápsula quando ocorre ao redor da levedura um halo claro. Após contato com o óleo essencial a pesquisa de cápsula foi realizada nas concentrações sub-inibitórias na cepa padrão *C. neoformans* ICB 163 D e de cada isolado testado. Como controle de presença de cápsula foi avaliado amostra sem o contato com o óleo essencial.

4.2 Óleos Essenciais

Nesta pesquisa foram avaliados os óleos essenciais comerciais de *Eucalyptus citriodora*, *Eucalyptus globulus*, *Eugenia caryophyllus*, *Melaleuca alternifolia*, *Thymus vulgaris* e um Blend de óleos essenciais composto de *Eugenia caryophyllus*, *Melaleuca alternifolia* e *Thymus vulgaris* cedidos pela empresa World's Naturals Fragrances (WNF), em todos os isolados e na cepa padrão *C. neoformans* ICB 163 D. Todos os óleos essenciais foram mantidos em frasco âmbar à temperatura ambiente.

4.3 Tensoativos e solvente

Foram avaliados os agentes tensoativos polissorbato Tween 20 (Sigma) e polissorbato Tween 80 (Sigma) ou tensoativos hidrofílicos, geralmente solúveis ou dispersáveis em água e empregados para obter emulsões do tipo óleo em água, como dispersantes ou solubilizantes de óleos. É um surfactante não-iônico, pouco tóxico para as membranas

biológicas (Rege *et al.*, 2002) e o solvente dimetilsulfóxido DMSO (Tedia-Brazil), a partir de 10.000µg/mL (100%) em meio RPMI 1640 (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) sobre a cepa padrão de *C. neoformans* ICB 163 D e nas concentração a 0,02 % de Tween 20 (Sigma) e Tween 80 (Sigma) e DMSO (Tedia-Brazil) em meio RPMI-1640, conforme proposto por Nascimento *et al* 2007. Após contato com esses agentes foram realizadas a pesquisa de cápsula nas doses subinibitória, conforme técnica descrita 4.1.1.2.

4.3.1 Pesquisa da interferência dos polissorbatos Tween 20, Tween 80 e solvente dimetilsufóxido DMSO sobre a cepa padrão de *C. neoformans* ICB 163 D

➤ Preparação da suspensão de *C. neoformans*

Cepa padrão de *C. neoformans* ICB 163 D foi cultivada em ágar Sabouraud-dextrose (Difco- USA), a 37°C. A suspensão foi preparada a partir de uma cultura de 48 horas, com turbidez equivalente à escala 0,5 de Mc Farland, concentração equivalente a $1-5 \times 10^6$ UFC/mL (Pfaller *et al.*, 1988). A 1 mL desta suspensão em PBS pH 7.2 acrescentou-se 9 mL do meio de cultivo RPMI-1640 (Gibco BRL,Grand Island,NY,USA) ajustando-se a suspensão final para $0,5 - 2,5 \times 10^5$ UFC /mL.

➤ Avaliação *in vitro* da interferência do Tween 20, Tween 80 e DMSO a cepa padrão de *C. neoformans* ICB 163 D

Após preparação da suspensão de *C. neoformans* ICB 163 D os ensaios foram realizados em placas de microdiluição, de fundo chato, com 96 poços e capacidade de 300 uL. Foram colocados em cada poço 100 uL de RPMI 1640 (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) e 100 µL do agente tensoativo. A partir do segundo poço foi colocado 100 µL foi realizada a diluição seriada na base dois até o 36^o poço e adicionado-se por último 100 uL da suspensão da levedura a cada poço. Esses testes foram realizados

em duplicata e a microplaca selada com Parafilm "M"® e incubadas em estufa a 37°C por 48 horas.

➤ **Controles**

Foi utilizado um controle negativo, para verificar a esterilidade do meio RPMI-1640 (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), um controle negativo do meio e cada agente tensoativo e um controle positivo para crescimento da levedura (meio RPMI-1640 + suspensão da levedura)

4.4 Pesquisa da atividade dos óleos essenciais sobre *C. neoformans*

4.4.1 Preparações da suspensão de leveduras

Os isolados de origem humana e ambiental e a cepa padrão de *C. neoformans* ICB 163 D, foram cultivados em ágar Sabouraud Dextrose (Difco – USA) e incubadas em estufa a 37°C por 48 horas. A suspensão dos isolados e da cepa padrão *C. neoformans* foram preparados a partir de uma cultura de 48 horas, com turbidez equivalente à escala 0,5 de Mc Farland, concentração equivalente a $1-5 \times 10^6$ UFC/mL (Pfaller et al., 1988). A 1 mL desta suspensão em PBS pH 7.2 acrescentou-se 9 mL do meio de cultivo RPMI-1640 (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) ajustando-se a suspensão final para $0,5-2,5 \times 10^5$ UFC /mL.

4.4.2 – Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica dos óleos essenciais sobre isolados de *C. neoformans*

Os ensaios, foram realizados em microplacas, de fundo chato, com 96 poços e capacidade de 300µl. Em cada poço foi colocado uma solução de 100µL de meio RPMI- 1640 (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) acrescido do emulsificador de escolha, até o 36^o poço. No primeiro poço foi colocado 100µL do óleo essencial a ser testado a partir de 90.000µg/mL (100%). A partir do segundo poço, 100µl do mesmo produto foi homogeneizado e

diluído em série, na “base 2” até 36º poço, Na sequência foram distribuídos em cada poço 100µL da suspensão da levedura de cada amostra. As placas foram seladas com Parafilm “M”® e incubadas em estufa a 37°C por 48 horas.

4.4.2.1 – Ensaio da atividade antifúngica dos óleos essenciais sobre a cepa padrão de *C. neoformans* ICB 163 D sem adição de tensoativos e solvente

Foi preparada uma suspensão de leveduras da cepa padrão de *C. neoformans* ICB 163 D conforme técnica descrita no item 4.4.1. e ensaio da atividade dos óleos essenciais conforme técnica descrita no item 4.4.2 sem adição de tensoativo no meio. RPMI- 1640 (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) .

4.4.3 – Controles

Em uma placa de microdiluição foi utilizado um controle negativo, para verificar a esterilidade do meio RPMI -1640 (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), um controle negativo do tensoativo de escolha, um controle negativo para o óleo essencial e um controle positivo para cada levedura (meio + inoculo). A placa de controles também foi selada com Parafilm “M”® e incubada em estufa a 37°C por 48 horas.

4.4.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada na microplaca e confirmada em cultura no meio de ágar Sabouraud - dextrose (DIFCO). A CIM foi considerado a menor concentração do óleo essencial que impediu o crescimento visível de *C. neoformans*. A avaliação da sensibilidade de *C. neoformans* na microplaca foi realizada 48 horas após a incubação.

Os resultados de concentrações inibitórias mínimas (CIM) obtidos foram analisados segundo a variação dos valores de CIM para cada óleo essencial assim definidos:

- CIM-50 que representa a concentração inibitória mínima da substância capaz de inibir o crescimento de 50% das amostras testadas.

- CIM-90 que representa a concentração inibitória mínima da substância capaz de inibir o crescimento de 90% das amostras testadas.

4.4.5 Avaliação da atividade fungistática e fungicida dos óleos essenciais

Também pode se expressar em termos de concentração fungicida mínima CFM, considerada como a menor concentração da substância capaz de levar a morte o fungo (Cury,1997), após 48 horas.

A avaliação das atividades fungistática ou fungicida dos óleos essenciais foi realizada em placas de Petri com ágar Sabouraud Dextrose (DIFCO), semeando-se 5µl das três diluições anteriores ao poço com inibição do crescimento fúngico. As placas de Petri com os inoculos foram incubadas em estufa a 37°C por 48 horas.

Os resultados de concentrações fungicidas mínimas (CFM) obtidos foram analisados segundo variação dos valores de CFM: para cada óleo essencial:

- CFM-50 representa a concentração fungicida mínima da substância capaz de inibir o crescimento de 50% das amostras testadas.

- CFM-90 representa a concentração fungicida mínima da substância capaz de inibir o crescimento de 90% das amostras testadas.

4.6 Ensaio da atividade antifúngica do Fluconazol

Fluconazol foi um dos antifúngicos utilizados como controle negativo na concentração de 200 mg/mL. Utilizando a mesma técnica de microdiluição em caldo citada no item 4.4.1. O Fluconazol utilizado nessa pesquisa foi manipulado pelo Laboratório Buenos Ayres (São Paulo, SP – Brasil) e mantido em frasco com 30mL a temperatura de 4°C.

4.7 Ensaio da atividade antifúngica da Anfotericina B

4.7.1 Método E-Test[®] – Kit Comercial (AB-Biodisk, Solna, Suécia)

Este método foi utilizado na pesquisa de sensibilidade ao antifúngico: Anfotericina B

4.7.1.1 Meios de cultivo

O meio RPMI –ágar (20,8g de RPMI-ágar-1640 (Gibco) e 1000,0 mL de água deionizada) foi ajustado para pH 7,0 com MOPS para anfotericina B. Após esterilização por filtração, o meio foi distribuído em tubos, em volume de 25 mL. Este meio foi esterilizado em autoclave a 120°C durante 15 minutos e guardado em volume de 25 mL a 4°C até o momento do uso.

4.7.1.2 Fitas E-Test[®]

As fitas foram adquiridas da AB BIODISK, com um gradiente de concentrações correspondendo de anfotericina B de 0,002 a 32 µg/mL sendo este gradiente identificado no verso da tira. As tiras E-Test[®] foram armazenadas em freezer a -20°C até serem utilizadas.

4.7.1.3 Preparo do Inóculo

As leveduras foram cultivadas em ágar Sabouraud dextrose (Difco) por 48 horas a 35°C. A suspensão foi preparada em 1 mL de água deionizada esterilizada e a densidade celular com turbidez equivalente à escala 1 de Mc Farland.

4.7.1.4 Determinação da concentração inibitória mínima

Os frascos contendo 25 mL de ágar dextrose foram fundidos, resfriados a 50°C e adicionados de 25 mL do meio de ágar RPMI-1640. A mistura homogeneizada contendo 50 mL foi vertida em placa de Petri esterilizada (15 mm x 15 mm). Após solidificação do meio as placas foram estocadas a 4°C. Antes da inoculação, as placas de ágar RPMI-1640 e as fitas de E-Test[®] foram mantidas por 30 minutos, a temperatura ambiente. Um volume de 0,6 mL referente a cada inóculo foi distribuído homogeneamente com o auxílio de *swab* sobre a superfície do ágar e as placas deixadas à temperatura ambiente por 15 minutos para completa absorção da suspensão pelo ágar. Decorrido este tempo, as fitas de E-Test[®] foram cuidadosamente colocadas sobre a superfície do ágar. As placas foram mantidas a 35°C durante 48-72 horas.

4.7.1.5 Determinação e interpretação do teste

As leituras da concentração inibitória mínima (CIM) foram realizadas 48h para *C. neoformans* após a incubação, considerando-se o ponto de intersecção entre a fita e a zona onde o crescimento da levedura foi inibido.

4.8 Controles de qualidade e biossegurança

Durante a realização do projeto até a fase dos testes foram seguidas e respeitadas todas as normas de Ética e Biossegurança. Todas as preparações e análises foram realizadas pelos mesmos técnicos utilizando-se os equipamentos de proteção individual (EPIs) como luvas, avental, máscara, óculos e equipamentos de proteção coletiva como cabine de segurança biológica, bico de Bunsen e capela de exaustão. (Oda, 1995 e 1998; CDC, 1999).

4.9 Descartes dos resíduos

Todos resíduos gerados das coletas e análises microbiológicas seguiram as normas de descarte estabelecidas pelo plano de gerenciamento de resíduos do Instituto Adolfo Lutz (Instituto Adolfo Lutz, 2002; Brasil, 2003).

4.10 Considerações éticas

Este trabalho seguiu as recomendações da resolução 196/96. Este projeto foi analisado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz.

5. RESULTADOS

5.1. *Cryptococcus neoformans*

Os 50 isolados deste estudo foram reidentificados como *C. neoformans* e 100% (50/50) apresentaram cápsula.

A tabela 1 mostra o número de isolados de *C. neoformans* estudados nesta pesquisa distribuídos em vinte e um isolados biológicos de origem humana, 29 isolados biológicos de origem ambiental e uma cepa padrão (ICB 163-D).

Tabela 1. *Cryptococcus neoformans*: número de isolados de amostras biológicas de origem humana e ambiental

C. NEOFORMANS	CEPA PADRÃO ICB – 163D	Isolados HIV+ *	Isolados Não HIV**	Total de Isolados de origem humana	isolados de origem ambiental
Número de cepa e isolados	1	8	13	21	29

* pacientes com sorologia positiva para o HIV

** pacientes com sorologia desconhecida para o HIV

5.2 Fatores de virulência

5.2.1 Atividade Enzimática

Produção de exoenzimas: Proteinase e Fosfolipase

Na tabela 2 observa-se a produção de proteinase e fosfolipase pela cepa padrão de *C. neoformans* ICB 163 D.

Tabela 2. Atividade enzimática (Pz): Produção de exoenzimas proteinase e fosfolipase da cepa padrão de *Cryptococcus neoformans* ICB 163 D

Cepa padrão	Proteinase Pz	Índice	Fosfolipase Pz	Índice
<i>C. neoformans</i> ICB 163 D	0,28	3	0,30	3

Atividade enzimática : Pz =1,0 = Ausência de atividade enzimática - (Índice:1)
1,0 < Pz ≤ 0,64 = Atividade enzimática positiva (Índice:2);
Pz < 0,64 = Atividade fortemente positiva - (Índice:3)

Todos os isolados de *C.neoformans* de origem humana (21/21) (Tabela 3) apresentaram produção de proteinase e fosfolipase fortemente positiva (índice 3) com média de Pz 0,34 ± 0,0 para proteinase e Pz 0,30 ± 0,50 para fosfolipase (Tabelas: 5 e 6).

Tabela 3. Atividade enzimática: produção de exoenzimas proteinase e fosfolipase de *Cryptococcus neoformns* isolados de amostras biológicas de origem humana

C.neoformans origem humana	Proteinase Pz*	Indice	Fosfolipase Pz*	Indice
1 – ICB 78	0,33	3	0,38	3
2 – ICB 87	0,28	3	0,40	3
3 – ICB 89	0,33	3	0,33	3
4 – ICB 105	0,33	3	0,22	3
5 – ICB 107	0,33	3	0,20	3
6 – ICB 108	0,30	3	0,40	3
7 – ICB 113	0,36	3	0,27	3
8 – ICB 127	0,38	3	0,33	3
9 – ICB 150	0,30	3	0,25	3
10 – ICB 154	0,38	3	0,28	3
11 – ICB 155	0,37	3	0,25	3
12 – ICB 160	0,50	3	0,40	3
13 – ICB 164	0,33	3	0,38	3
14 – ICB 167	0,33	3	0,30	3
15 – ICB 168	0,40	3	0,33	3
16 – ICB 169	0,36	3	0,30	3
17 – ICB 170	0,33	3	0,28	3
18 – ICB 172	0,30	3	0,30	3
19 – ICB 183	0,22	3	0,25	3
20 – ICB 189	0,41	3	0,26	3
21 – ICB 283	0,33	3	0,30	3

Legenda: Em azul *C.neoformans* isolados de pacientes com sorologia desconhecida para o HIV
Em rosa *C.neoformans* isolados de pacientes com sorologia positiva para o HIV

***Pz: Atividade enzimática:**

Pz =1,0 = Ausência de atividade enzimática - (Indice:1)

1,0 < Pz ≤ 0,64 = Atividade enzimática positiva - (Indice:2)

Pz < 0,64 = Atividade fortemente positiva - (Indice:3)

Na tabela 4 observa-se que o isolado de *C. neoformans* número 44 de origem ambiental (1/29) não apresentou produção da exoenzima proteinase e a média de produção dessa enzima para este grupo foi de Pz $0,28 \pm 0,07$ e para fosfolipase foi de Pz $0,30 \pm 0,04$ (Tabela 5 e 6).

Tabela 4. Atividade enzimática: produção de exoenzimas proteinase e fosfolipase de *Cryptococcus neoformans* isolados de amostras biológicas de origem ambiental

<i>C.neoformans</i> origem ambiental	Proteinase Pz*	Indice	Fosfolipase Pz*	Indice
22 – B 07	0,33	3	0,33	3
23 – B 08	0,30	3	0,30	3
24 – B 20	0,33	3	0,33	3
25 – B 64	0,22	3	0,04	3
26 – ICB 114	0,30	3	0,25	3
27 – ICB 165	0,37	3	0,20	3
28 – ICB 166	0,25	3	0,22	3
29 – ICB 174	0,30	3	0,28	3
30 – ICB 175	0,33	3	0,30	3
31 – ICB 176	0,30	3	0,33	3
32 – ICB 178	0,30	3	0,25	3
33 – ICB 182	0,38	3	0,27	3
34 – P3 A20	0,33	3	0,30	3
35 – P9 A5	0,30	3	0,33	3
36 – P9 A7	0,30	3	0,20	3
37 – P9 A10	0,33	3	0,23	3
38 – P11 A8	0,33	3	0,28	3
39 – P17 A9	0,25	3	0,20	3
40 – P3 B5	0,40	3	0,14	3
41 – P6 B4	0,30	3	0,16	3
42 – P9 B11	0,40	3	0,20	3
43 – P10 B8	0,33	3	0,14	3
44 – P10 B20	1,0	1	0,42	3
45 – P17 B5	0,40	3	0,27	3
46 – P1 C6	0,33	3	0,30	3
47 – P3 C2	0,33	3	0,22	3
48 – P3 C11	0,33	3	0,33	3
49 – P9 C5	0,38	3	0,27	3
50 – P10 C5	0,22	3	0,27	3

*Pz: Atividade enzimática:

Pz =1,0 = Ausência de atividade enzimática - (Indice:1)

1,0 < Pz ≤ 0,64 = Atividade enzimática positiva - (Indice:2)

Pz < 0,64 = Atividade fortemente positiva - (Indice:3)

Tabela 5. Média, desvio padrão, mediana, máxima e mínima de produção de proteinase de *C. neoformans* isolados de amostras biológicas de origem humana e ambiental

VARIÁVEL	Isolados HIV+*	ISOLADOS NÃO HIV**	TOTAL DE	
			Isolados de origem humana	isolados de origem ambiental
PROTEINASE	N=8	N=13	N=21	N=29
$\mu \pm dp$	0,34*** \pm 0,03	0,34 \pm 0,06	0,34 \pm 0,0	0,28 \pm 0,07
Mediana	0,33	0,33	0,33	0,20
Min. – Max.	0,30 – 0,41	0,22 – 0,50	0,33 – 0,50	0,22 – 1,0

* pacientes com sorologia positiva para o HIV

** pacientes com sorologia desconhecida para o HIV

*** Atividade enzimática Pz =1,0 = Ausência de atividade enzimática
 1,0 < Pz \geq 0,64 = Atividade enzimática positiva
 Pz < 0,64 = Atividade fortemente positiva

Tabela 6. Média, desvio padrão, mediana, máxima e mínima de produção de fosfolipase de *C. neoformans* isolados de amostras biológicas de origem humana e ambiental

VARIÁVEL	Isolados HIV+*	ISOLADOS NÃO HIV**	TOTAL DE	
			Isolados de origem humana	isolados de origem ambiental
FOSFOLIPASE	N=8	N=13	N=21	N=29
$\mu \pm dp$	0,30*** \pm 0,02	0,30 \pm 0,07	0,30 \pm 0,50	0,30 \pm 0,04
Mediana	0,30	0,27	0,30	0,30
Min. – Max.	0,26 – 0,33	0,20 – 0,40	0,33 – 0,38	0,27 – 0,33

* pacientes com sorologia positiva para o HIV

** pacientes com sorologia desconhecida para o HIV

*** Atividade enzimática Pz =1,0 = Ausência de atividade enzimática
 1,0 < Pz \geq 0,64 = Atividade enzimática positiva
 Pz < 0,64 = Atividade fortemente positiva

5.2.2 Cápsula

A cápsula foi observada na cepa padrão de *C. neoformans* ICB 163D (Figuras 1 e 8) e em todos os isolados de *C. neoformans* de origem humana (Figuras 30 A, 31 A) e ambiental (Figura (32 A)).

5.3 Atividade dos tensoativos Tween 20, Tween 80 e solvente DMSO sobre a cepa padrão de *C.neoformans* ICB 163 D

A tabela 7 apresenta a sensibilidade da cepa padrão de *C. neoformans* ICB 163 D aos tensoativos Tween 20, Tween 80 e ao solvente DMSO. Na placa de microdiluição observou-se ausência de crescimento até a concentração a 25% (2500µg/mL) para o Tween 20 e Tween 80 e 6,25% (625µg/mL) para o DMSO. Na pesquisa da atividade fungicida e fungistática observou atividade fungistática na concentração de 25 a 100% (2500 a 10.000 µg/mL) para Tween 20 e Tween 80 e de 6,25% a 100% (625 a 10.000µg/mL) para o DMSO.

Tabela 7. Atividade dos tensoativos Tween 20, Tween 80 e o solvente DMSO sobre o crescimento e produção de cápsula da cepa padrão de *Cryptococcus. neoformans* ICB 163 D.

Atividade	MICRODILUIÇÃO	Atividade Fungistática/Fungicida*		PESQUISA DE CÁPSULA		
	CIM*	concentrações		nas concentrações*		
Tensoativos e solvente	%(v/v) - µg/mL	FUNGISTÁTICA %(v/v) - µg/mL	FUNGICIDA %(v/v) - µg/mL	12,5% 1250µg/mL	3,12%- 3,125µg/mL	0,02% 0,2µg/mL
Tween 20	25 - 2500**	25 a 100 – 2500 a 10000 ***	SA	R	NR	R
Tween 80	25 - 2500	25 a 100 – 2500 a 10000	SA	R	NR	R
DMSO	6,25 - 625	6,25 a 100 - 625 a 10000	SA	NR	A	R

*Condições do estudo: Pesquisa da Concentração inibitória mínima CIM em placas de microdiluição e leitura em 48 horas: resultado em % e µg/mL
 Pesquisa da atividade fungistática e fungicida em Ágar Sabouraud dextrose e leitura em 48 horas: presença de crescimento atividade fungistática e ausência de crescimento atividade fungicida
 Pesquisa de cápsula foi realizada com tinta nanquim nas doses sub- inibitórias. Na presença de cápsula observa-se a formação de um halo claro ao redor da colônia

A: Ausência de cápsula
 R: Redução
 SA: Sem atividade
 NR: não realizado
 V/V: volume por volume em porcentagem

A pesquisa de cápsula foi realizada após contato com a cepa padrão de *C.neoformans* ICB 163 D com os tensoativos e solvente, nas doses subinibitória encontrando-se os seguintes resultados: 12,5% (1250µg/mL) para o Tween 20 e Tween 80 e 3,12% (312,5µg/mL) para o DMSO.

Nos tensoativos Tween 20 e no Tween 80 observou-se redução do tamanho da cápsula em relação ao controle e no solvente DMSO observou-se ausência da cápsula em relação ao controle. (Tabela 7 e Figuras 8, 9, 10 e 11).

Nascimento *et al* 2007 recomenda a utilização do Tween 20 a 0,02% como tensoativo nos testes com óleo essencial e neste caso avaliou-se a atividade dos tensoativos na produção de cápsula nessa concentração.

A tabela 7 e as figuras 12 A e B a 15 A e B mostram redução de cápsula em relação ao controle para os 2 tensoativos e para o solvente com uma coaderência no Tween 20 e alteração da morfologia com aumento do tamanho das células no tensoativo Tween 80 e solvente DMSO em relação ao controle.

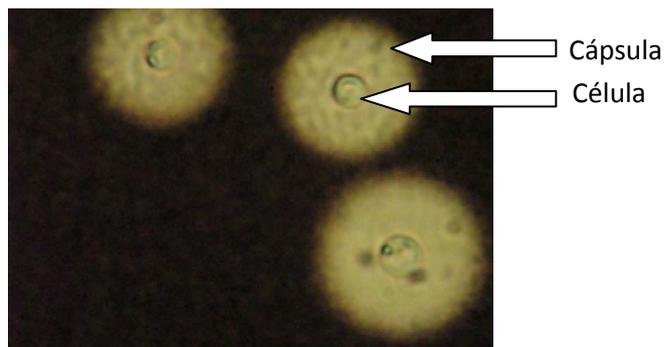


Figura 8. Cepa padrão de *C. neoformans* ICB 163 D – amostra controle – aumento de 3000X.

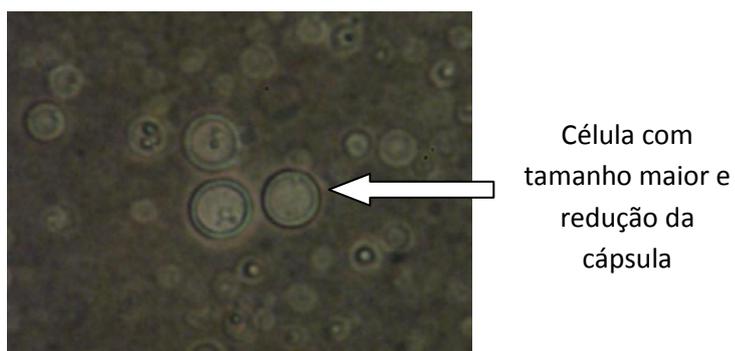


Figura 9. Cepa padrão de *C. neoformans* ICB 163 D após exposição ao Tween 20 a 12,5% - aumento 3000X



Figura 10. Cepa padrão de *C. neoformans* ICB 163 D após exposição ao Tween 80 a 12,5% – aumento 3000X



Figura 11. Cepa padrão de *C. neoformans* ICB 163 D após exposição ao DMSO a 3,12% - aumento 3000X.

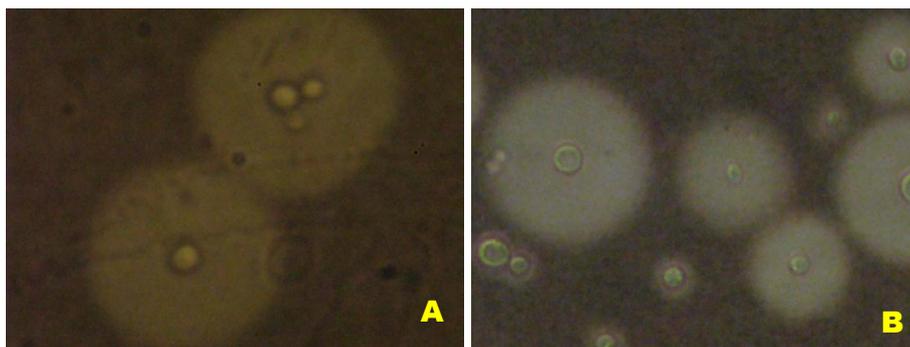


Figura 12 A e B Cepa padrão de *C. neoformans* ICB 163 D amostra Controle - aumento 3000X.

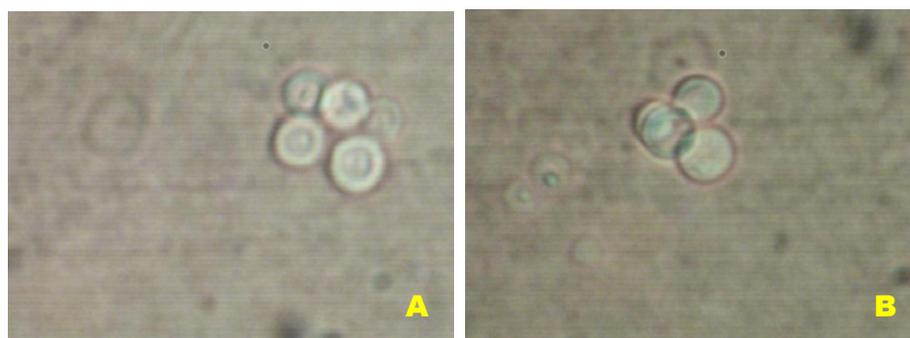


Figura 13 A e B Cepa padrão de *C. neoformans* ICB 163 D – após exposição ao Tween 20 a 0,02% - aumento 3000X.

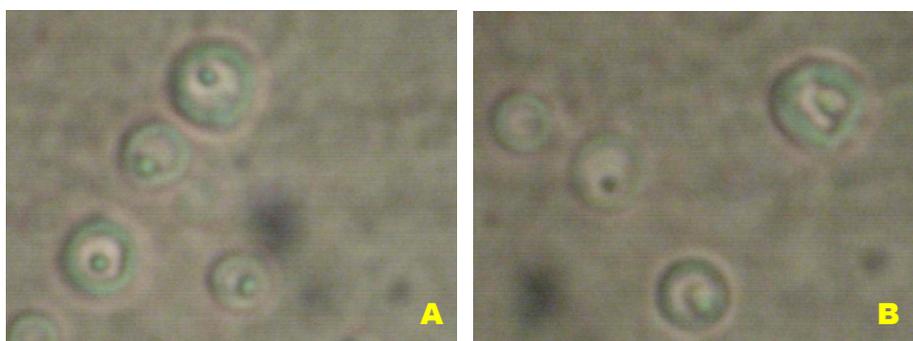


Figura 14 A e B Cepa padrão de *C. neoformans* ICB 163 D após exposição Tween 80 a 0,02% aumento 3000X

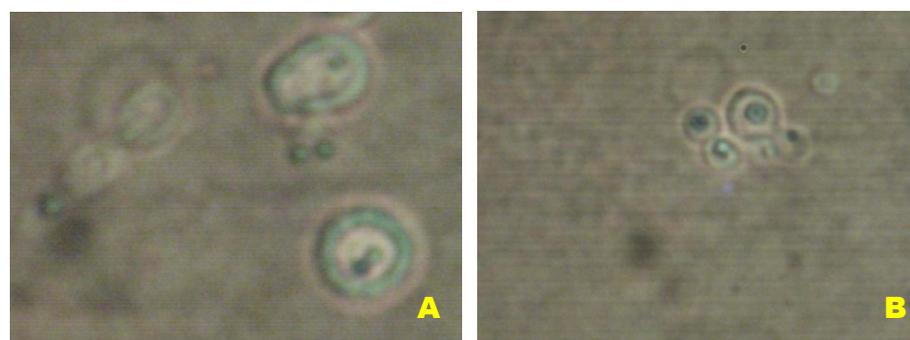


Figura 15 A e B Cepa padrão de *C. neoformans* ICB 163 D - DMSO a 0,02% após exposição aumento 3000X

5.4 Características e Composição dos óleos essenciais

5.4.1 *Eucalyptus citriodora* Hooker.

O boletim técnico da WNF informou que o óleo essencial de *Eucalyptus citriodora* foi extraído da folhagem, a destilação a vapor d'água com rendimento de 1,5g de óleo por kg da planta. Seu aspecto é líquido límpido, com coloração amarelo a amarelo-esverdeado. Farmacologicamente é composto por aldeídos (55-70%), alcoóis monoterpenos (20-25%), ésteres (< 5%), sesquiterpenos (< 5%), alcoóis sesquiterpênicos (3%), monoterpenos (< 3%) e óxidos (< 1%). A cromatografia do óleo essencial de *E. citriodora* indica como seus principais compostos químicos o citronelal (93,99%) e β -citronelol (2,29%). (Anexo 3)

5.4.2 *Eucalyptus globulus* Labill.

O boletim técnico da WNF informou que o óleo essencial de *Eucalyptus globulus* foi extraído da folhagem nova, a destilação a vapor d'água com rendimento de 8 a 20g de óleo por kg da planta. Seu aspecto é transparente e incolor. Farmacologicamente é formado por cetonas (<01%), aldeídos (<01%), alcoóis monoterpênicos (0,3%), ésteres (03%), sesquiterpenos (01%), alcoóis sesquiterpênicos (01-03%), álcoois monoterpênicos (03%), monoterpenos (15-20%) e óxidos (60-75%). A cromatografia do óleo essencial de *E. globulus* indica como seus principais compostos químicos o eucaliptol (80,50%) e limoneno (14,03%). (Anexo 4)

5.4.3 *Eugenia caryopjyllus* Sprengel.

O boletim técnico da WNF informou que, o óleo essencial de *Eugenia caryopjyllus* foi extraído de folhas e botões, a destilação a vapor d'água com rendimento de 15g de óleo por kg da planta. Seu aspecto é de cor de

caramelo claro ao escuro. Farmacologicamente é formado por ácidos (traços), éteres (01%), ésteres (08%), sesquiterpenos (10%) e fenóis (75 – 85%). A cromatografia do óleo essencial de *E. caryophyllus* indica como seus principais compostos químicos o eugenol (84,10%) e β -citronelol (12,67%). (Anexo 5)

5.4.4 *Melaleuca alternifolia* Cheel.

O boletim técnico da WNF informou que óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* foi extraído da folhagem por destilação a vapor d'água com rendimento de 20g de óleo por kg da planta. Seu aspecto é de cor claro transparente, ínfimo verde. Farmacologicamente é formado por sesquiterpenos (5-10%), óxidos (05-15%), álcoois sesquiterpênicos (<01%), álcoois monoterpênicos (25-40%), monoterpênicos (30-40%) e fenóis (<01%%). A cromatografia do óleo essencial de *M. alternifolia* indica como seus principais compostos químicos o 4- terpineol (77,15%) e γ -terpineol (7,24%). (Anexo 6)

5.4.5 *Thymus vulgaris* Lin.

O boletim técnico da WNF informou que o óleo essencial de *Thymus vulgaris* foi extraído das partes aéreas e flores, por destilação a vapor d'água, com rendimento de 4g de óleo por kg da planta. Seu aspecto é de óleo fino e transparente. Farmacologicamente é composto por cetonas (<01%), éteres (<2%), sesquiterpenos (<02%), óxidos (02%), álcoois sesquiterpênicos (07%), monoterpênicos (17-45%) e fenóis (40-55%). A cromatografia do óleo essencial de *T. vulgaris* indica como seus principais compostos químicos o cimeno (14,43%) e timol (62,13%). (Anexo 7)