

PATRICIA DE SOUZA SANTOS

**AVALIAÇÃO *in vitro* DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS ÓLEOS
ESSENCIAIS DE *Eugenia caryophyllus*, *Thymus vulgaris* E
SEUS COMPOSTOS QUÍMICOS MAJORITÁRIOS SOBRE
Cryptococcus neoformans.**

Tese 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 Doutora em Ciências.

Área de Concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública

Orientadora: Profa. Dra. Maria de Fátima Costa Pires

São Paulo

2016

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 dos óleos essenciais de *Eugenia caryophyllus*, *Thymus vulgaris* e seus compostos químicos majoritários sobre *Cryptococcus neoformans* / Patricia de Souza dos Santos. – 2016.

Tese (Doutorado em Ciências) - Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças, São Paulo, 2016.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública.
Orientação: Profa. Dra. Maria de Fátima Costa Pires

1. *Cryptococcus neoformans*.
2. Criptococose.
3. Óleos voláteis.
4. Testes de sensibilidade microbiana.
5. Agentes Antifúngicos.

SES/CCD/CD-324/2015

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto Adolfo Lutz.

Este trabalho teve o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES. Bolsa de Doutorado.

“Isolar um constituinte ativo de uma planta é uma afronta à natureza, é como retirar dela a inteligência e deixar para traz a sabedoria”.

Deepak Chopra

(Médico endocrinologista, escritor, professor de ayuverda, espiritualidade e medicina corpo-mente).

DEDICATÓRIA

À 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. Ensinararam-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 pelo meu crescimento moral e psicológico 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"! Por toda torcida e incentivo. 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!

As amigas Elza e Milena, e meu amigo Wilmar

Pela nossa linda amizade! Por toda torcida, por toda dedicação. Por essa afinidade sem fim. Por ser quem são. Obrigada por tudo!

A amiga e orientadora Maria de Fátima Costa Pires

A querida professora e amiga dedico estas palavras, por me "adotar" lá no mestrado e agora, me ter como "filha legítima"!!! Jamais esquecerei o que fez por mim. Pela dedicação que conduziu todos os momentos de orientação, sempre atenciosa, muito paciente, criteriosa e amiga. Por todas as trocas 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 toda minha família (tios, tias, primos, primas, sobrinhos e cunhadas). Por todas as orações que intencionam a mim, por toda torcida. Obrigada Família! Amo muito todos vocês!

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

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

Aos membros da Banca de Qualificação: Dr. Nilton José Fernandes Cavalcante Cardoso, Prof^a Dr^a Anely Salles de Azevedo Melo e Prof^a Dr^a Marcia Souza Moraes, por todas as sugestões propostas para o melhoramento deste trabalho.

As pesquisadoras Dr^a Noemi Nosomi Taniwaki e Prof^a Gislene Mitsue Namiyama Nishina do Núcleo de Microscopia Eletrônica do Instituto Adolfo Lutz, pela amizade que construímos nestes anos de pesquisa científica.

A Maria Luiza Makabe, Cláudia Giacco e Leticia Machado pela amizade e por todos os momentos que passamos e iremos passar em nossa caminhada acadêmica!

As Secretarias da Pós-Graduação Tírces Francine e Caroline Coppo, por toda dedicação, amizade e paciência com todos os alunos!

A todos, muitíssimo obrigada!!!

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	01
LISTA DE FIGURAS.....	03
LISTA DE TABELAS.....	05
LISTA DE GRÁFICOS.....	09
RESUMO.....	13
ABSTRACT.....	14
1.INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Gênero <i>Cryptococcus</i>	15
1.2 <i>Cryptococcus neoformans</i>	16
1.3 Fatores de virulência	18
1.3.1 Cápsula.....	19
1.3.2 Crescimento a 37° C	20
1.3.3 Proteinase.....	20
1.3.4 Fosfolipase.....	21
1.4 Antifúngicos sintéticos.....	21
1.5 Antifúngicos naturais.....	22
1.6 Óleos essenciais.....	23
1.7 Atividade antimicrobiana de óleos essenciais.....	25
1.8 Metabólitos secundários em plantas.....	26
1.8.1 Terpenos.....	27
1.8.2 Fenóis.....	29
1.9 Ensaio com óleos essenciais e seus compostos químicos.....	30
1.10 Espécies vegetais dos óleos essenciais e seus compostos químicos estudados.....	31
1.10.1 <i>Eugenia caryophyllus</i> Sprengel e seus compostos químicos.....	31
1.10.2 <i>Thymus vulgaris</i> Lin. e seus compostos químicos.....	32
1.11 Considerações.....	33

2. OBJETIVOS.....	34
2.1 Objetivo geral.....	34
2.2 Objetivos específicos.....	34
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1 <i>C. neoformans</i>.....	35
3.1.1 Pesquisa de fatores de virulência.....	35
3.1.1.1 Produção de exoenzimas – Proteinase e Fosfolipase	35
3.2 Pesquisa de cápsula.....	37
3.3 Tensoativos e solvente.....	37
3.3.1 Pesquisa da interferência dos polissorbatos Tween 20, Tween 80 e solvente dimetilsufóxido DMSO sobre a cepa padrão de <i>C. neoformans</i> ICB 163 D.....	38
3.4 Óleos essenciais e compostos químicos majoritários.....	39
3.4.1 Análise cromatográfica: cromatografia gasosa e espectrometria de massa (CG-MS) dos óleos essenciais.....	39
3.5 Pesquisa da atividade dos óleos essenciais e compostos químicos sobre <i>C. neoformans</i>.....	40
3.5.1 Preparações da suspensão de leveduras.....	40
3.5.2 Avaliação <i>in vitro</i> da atividade antifúngica dos óleos essenciais e compostos químicos sobre isolados de <i>C. neoformans</i>.....	40
3.6 Avaliação <i>in vitro</i> da atividade antifúngica da mistura dos compostos químicos majoritários de cada óleo essencial sobre isolados de <i>C. neoformans</i>.....	40
3.7 Controles.....	41
3.8 Determinação da Concentração Inibitória Mínima.....	41
3.9 Avaliações das atividades fungistática e fungicida dos óleos essenciais e dos compostos químicos majoritários.....	42
3.10 Controles de qualidade e biossegurança.....	42
3.11 Descartes dos resíduos.....	43
3.12 Considerações éticas.....	43
4. RESULTADOS.....	44

4.1 <i>Cryptococcus neoformans</i>	44
4.2 Fatores de virulência.....	44
4.2.1 Atividade Enzimática Produção de exoenzimas: Proteinase e Fosfolipase	44
4.2.2 Cápsula.....	46
4.3 Atividade dos tensoativos e solvente Tween 20, Tween 80 e solvente DMSO sobre a cepa padrão de <i>C. neoformans</i> ICB 163 D.....	46
4.4 Análise Cromatográfica dos óleos essenciais <i>Eugenia caryophyllus</i> Sprengel e <i>Thymus vulgaris</i> Lin.....	50
4.4.1 <i>Eugenia caryophyllus</i> Sprengel.....	50
4.4.2 <i>Thymus vulgaris</i> Lin.	50
4.5 Atividade dos óleos essenciais e seus compostos químicos majoritários sobre as cepas padrão de <i>C. neoformans</i> ICB 163 D e ATCC 90112.....	50
4.6 Atividade do óleo essencial <i>E. caryophyllus</i> Sprengel e seus compostos químicos majoritários sobre <i>C. neoformans</i>	58
4.6.1 Óleo essencial de <i>E. caryophyllus</i> Sprengel sobre isolados biológicos de <i>C. neoformans</i> de origem humana e ambiental.....	58
4.6.2 Atividade do composto químico majoritário eugenol 99% do óleo essencial de <i>E. caryophyllus</i> Sprengel sobre isolados biológicos de <i>C. neoformans</i> de origem humana e ambiental.....	61
4.6.3 Atividade do composto químico β -cariofileno a 80% do óleo essencial de <i>E. caryophyllus</i> Sprengel sobre isolados biológicos de <i>C. neoformans</i> de origem humana e ambiental.....	65
4.7 Atividade óleo essencial de <i>T. vulgaris</i> Lin. e seus compostos químicos majoritários sobre <i>C. neoformans</i>	69
4.7.1 Óleo essencial de <i>T. vulgaris</i> Lin sobre isolados biológicos de <i>C. neoformans</i> de origem humana e ambiental.....	69
4.7.2 Atividade do composto químico majoritário Linalol 97% do óleo essencial de <i>T. vulgaris</i> Lin sobre <i>C. neoformans</i> - isolados biológicos de origem humana e ambiental.....	73
4.7.3 Atividade do composto químico majoritário P-Cimeno 99% do óleo essencial de <i>T. vulgaris</i> Lin sobre <i>C. neoformans</i> - isolados biológicos de origem humana e ambiental.....	77

4.7.4 Atividade do composto químico majoritário Carvacrol 98% do óleo essencial de <i>T. vulgaris</i> Lin sobre <i>C. neoformans</i> - isolados biológicos de origem humana e ambiental.....	81
4.7.5 Atividade do composto químico majoritário Timol 99,5% do óleo essencial de <i>T. vulgaris</i> Lin sobre <i>C. neoformans</i> - isolados biológicos de origem humana e ambiental.....	85
4.7.6 Valores CIM50/CIM90 e CFM50/CFM90 para os óleos essenciais e seus compostos majoritários sobre isolados de <i>C. neoformans</i>	89
4.8 Atividade antifúngica das misturas entre os compostos químicos majoritários de cada óleo essencial sobre isolados de <i>C. neoformans</i>	90
4.8.1 Mistura dos compostos químicos majoritários do óleo essencial de <i>E. caryophyllus</i> : eugenol e β -cariofileno.....	90
4.8.2 Mistura dos compostos químicos majoritários do óleo essencial de <i>T. vulgaris</i> : P-Cimeno e Linalol	93
4.8.3 Mistura dos compostos químicos majoritários do óleo essencial de <i>T. vulgaris</i> : P-Cimeno e Carvacrol	95
4.8.4 Mistura dos compostos químicos majoritários do óleo essencial de <i>T. vulgaris</i> : P-Cimeno e Timol	97
4.8.5 Mistura dos compostos químicos majoritários do óleo essencial de <i>T. vulgaris</i> : Linalol e Timol	99
4.8.6 Mistura dos compostos químicos majoritários do óleo essencial de <i>T. vulgaris</i> : Linalol e Carvacrol.....	101
4.8.7 Mistura dos compostos químicos majoritários do óleo essencial de <i>T. vulgaris</i> : Timol e Carvacrol	103
4.8.8 Mistura dos compostos químicos majoritários do óleo essencial de <i>T. vulgaris</i> : Timol, Carvacrol, Linalol e P-Cimeno.....	105
4.8.9 Valores CIM50/CIM90 e CFM50/CFM90 das misturas dos compostos químicos majoritários dos óleos essenciais de <i>E. caryophyllus</i> e <i>T. vulgaris</i> sobre isolados de <i>C. neoformans</i> de origem humana e ambiental	107
5. DISCUSSÃO.....	108
6. CONCLUSÕES.....	133
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	135
8. ANEXOS.....	169
Anexo 01: Aprovação do Comitê de Ética do Instituto Adolfo Lutz.....	169

Anexo 02: Ficha de identificação de leveduras.....	170
Anexo 03: Cromatografia e composição química de <i>Eugenia caryophyllus</i>	171
Anexo 04: Cromatografia e composição química de <i>Thymus vulgaris</i>.....	176

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
C.	<i>Cryptococcus</i>
°C	graus Celsius
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massa
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
CO ₂	Dióxido de Carbono
DMSO	Dimetil sulfóxido
EPI	Equipamento de proteção individual
et al.	e outros
FO-USP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
g	Grama
GXM	Glicoronoxilomanana
GLX	Glicoxilomanana
h	hora
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
IQ-USP	Instituto de Química da Universidade de São Paulo
Kg	Kilograma
LPL	Lisofosfolipase
LPTA	Transacilase de Lisofosfolipase
mg	Miligramas
mL	Mililitro
mm	Milímetro

MS	Ministério da Saúde
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PLB	Fosfolipase B
pH	Potencial Hidrogeniônico
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>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: <i>Cryptococcus neoformans</i>	17
Figura 2 A, B e C. <i>Eugenia caryophyllus</i> – A: botões florais; B: botões florais em processo de secagem natural; C: Botões florais secos (cravo-da-índia)	31
Figura 3 A e B. <i>Thymus vulgaris</i> – A: tomilho rosa; B: tomilho branco.....	32
Figura 4: <i>C. neoformans</i> ICB 163D.....	46
Figura 5: <i>C. neoformans</i> ATCC 90112.....	46
Figura 6. Cepa padrão de <i>C. neoformans</i> ICB 163 D – amostra controle – aumento de 400X.....	48
Figura 7. Cepa padrão de <i>C. neoformans</i> ICB 163 D após exposição ao Tween 20 a 12,5% - aumento 400X.....	48
Figura 8. Cepa padrão de <i>C. neoformans</i> ICB 163 D após exposição ao Tween 80 a 12,5% – aumento 400X.....	48
Figura 9. Cepa padrão de <i>C. neoformans</i> ICB 163 D após exposição ao DMSO a 3,12% - aumento 400X.....	48
Figura 10 A e B Cepa padrão de <i>C. neoformans</i> ICB 163 D amostra Controle - aumento 400X.....	49
Figura 11 A e B Cepa padrão de <i>C. neoformans</i> ICB 163 D – após exposição ao Tween 20 a 0,02% - aumento 400X.	49
Figura 12 A e B Cepa padrão de <i>C. neoformans</i> ICB 163D após exposição Tween 80 a 0,02% aumento 400X.....	49
Figura 13 A e B Cepa padrão de <i>C. neoformans</i> ICB 163 D - DMSO a 0,02% após exposição, aumento 400X.....	49
Figura 14: <i>C. neoformans</i> ICB 163D – após exposição ao óleo essencial de <i>E. caryophyllus</i> (CIM: 0,04%) – aumento de 400X.....	53
Figura 15: <i>C. neoformans</i> ICB 163D – após exposição ao óleo essencial de <i>T. vulgaris</i> (CIM: 0,09%) – aumento de 400X.....	53
Figura 16: <i>C. neoformans</i> ICB 163D – após exposição ao composto químico Eugenol 99% (CIM: 24,7%) - aumento de 400X.....	53
Figura 17: <i>C. neoformans</i> ICB 163D – após exposição ao composto químico β -cariofileno 80% (CIM: 20%) – aumento de 400X.....	53
Figura 18: <i>C. neoformans</i> ICB 163D – após exposição ao composto químico Linalol 97% (CIM: 100%) - aumento de 400X.....	53
Figura 19: <i>C. neoformans</i> ICB 163D – após exposição ao composto químico P-cimeno (CIM: 100%) - aumento de 400X.....	53
Figura 20: <i>C. neoformans</i> ICB 163D – após exposição ao composto químico Carvacrol (CIM: 12,5% – aumento de 400X.....	53
Figura 21: <i>C. neoformans</i> ICB 163D – após exposição ao composto químico Timol (CIM:1,56%) - aumento de 400X.....	53

Figura 22: <i>C. neoformans</i> ATCC 90112 – após exposição ao óleo essencial de <i>E. caryophyllus</i> (CIM: 0,00002%) – aumento de 400X.....	57
Figura 23: <i>C. neoformans</i> ATCC 90112 – após exposição ao óleo essencial de <i>T. vulgaris</i> (CIM:0,04%) - aumento de 400X.....	57
Figura 24: <i>C. neoformans</i> ATCC 90112– após exposição ao composto químico Eugenol 99% (CIM:12,37%) – aumento de 400X.....	57
Figura 25: <i>C. neoformans</i> ATCC 90112– após exposição ao composto químico β -cariofileno 80% (CIM: 10%) – aumento de 400X.....	57
Figura 26: <i>C. neoformans</i> ATCC 90112– após exposição ao composto químico Linalol 97%(CIM 97%) – aumento de 400X.....	57
Figura 27: <i>C. neoformans</i> ATCC 90112– após exposição ao composto químico P-cimeno 99% (CIM: 99%) – aumento de 400X.....	57
Figura 28: <i>C. neoformans</i> ATCC 90112– após exposição ao composto químico Carvacrol 98% (CIM:12,25%) – aumento de 400X.....	57
Figura 29: <i>C. neoformans</i> ATCC 90112– após exposição ao composto químico Timol (CIM:12,43%) – aumento de 400X.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Algumas associações efetivas entre produtos naturais e antibióticos.....	26
Tabela 2. <i>Cryptococcus neoformans</i> : número de isolados de amostras biológicas de origem humana e ambiental.....	44
Tabela 3. Atividade enzimática (Pz): Produção de exoenzimas proteinase e fosfolipase da cepa padrão de <i>Cryptococcus neoformans</i> ICB 163 D e ATCC 90112.....	44
Tabela 4. Atividade enzimática: produção de exoenzimas proteinase e fosfolipase de <i>Cryptococcus neoformans</i> isolados de amostras biológicas de origem humana e ambiental.....	45
Tabela 5. Atividade dos tensoativos Tween 20, Tween 80 e o solvente DMSO sobre o crescimento e produção de cápsula da cepa padrão de <i>Cryptococcus neoformans</i> ICB 163 D....	47
Tabela 6. Concentração Inibitória Mínima e Concentração Fungicida Mínima dos óleos essenciais de <i>E. caryophyllus</i> e <i>T. vulgaris</i> e seus compostos químicos majoritários sobre a cepa padrão de <i>C. neoformans</i> ICB 163 D.....	51
Tabela 7. Concentração Inibitória Mínima e Concentração Fungicida Mínima dos óleos essenciais de <i>E. caryophyllus</i> e <i>T. vulgaris</i> e seus compostos químicos majoritários sobre a cepa padrão de <i>C. neoformans</i> ATCC 90112.....	55
Tabela 08. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) do óleo essencial de <i>E. caryophyllus</i> sobre isolados de <i>C. neoformans</i> de origem humana e ambiental.	59
Tabela 9: Média, desvio padrão, mediana, máxima e mínima do óleo essencial de <i>Eugenia caryophyllus</i> sobre isolados biológicos de <i>C. neoformans</i>	61
Tabela 10. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) do composto químico majoritário eugenol 99% do óleo essencial de <i>E. caryophyllus</i> Sprengel sobre isolados de <i>C. neoformans</i> de origem humana e ambiental.....	63
Tabela 11: Média, desvio padrão, mediana, máxima e mínima do composto químico majoritário Eugenol 99% de <i>Eugenia caryophyllus</i> sobre isolados biológicos de <i>C. neoformans</i>	65

Tabela 12. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) do composto químico majoritário β -cariofileno 80% do óleo essencial de <i>E. caryophyllus</i> Sprengel sobre isolados de <i>C. neoformans</i> de origem humana e ambiental.....	67
Tabela 13: Média, desvio padrão, mediana, máxima e mínima do composto químico majoritário β -cariofileno 80% de <i>Eugenia caryophyllus</i> sobre isolados biológicos de <i>C. neoformans</i>	69
Tabela 14. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) do óleo essencial de <i>T. vulgaris</i> Lin sobre isolados de <i>C. neoformans</i> de origem humana e ambiental.....	71
Tabela 15: Média, desvio padrão, mediana, máxima e mínima do óleo essencial de <i>T. vulgaris</i> sobre isolados biológicos de <i>C. neoformans</i>	73
Tabela 16. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) do composto químico majoritário linalol do óleo essencial de <i>T. vulgaris</i> Lin sobre isolados de <i>C. neoformans</i> de origem humana e ambiental.....	75
Tabela 17: Média, desvio padrão, mediana, máxima e mínima do composto químico majoritário Linalol 97% do óleo essencial de <i>T. vulgaris</i> sobre isolados biológicos de <i>C. neoformans</i>	77
Tabela 18. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) do composto químico majoritário P-cimeno do óleo essencial de <i>T. vulgaris</i> Lin sobre isolados de <i>C. neoformans</i> de origem humana e ambiental.....	79
Tabela 19: Média, desvio padrão, mediana, máxima e mínima do composto químico majoritário P-cimeno 99% do óleo essencial de <i>T. vulgaris</i> sobre isolados biológicos de <i>C. neoformans</i>	81
Tabela 20. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) do composto químico majoritário Carvacrol do óleo essencial de <i>T. vulgaris</i> Lin sobre isolados de <i>C. neoformans</i> de origem humana e ambiental.....	83
Tabela 21: Média, desvio padrão, mediana, máxima e mínima do composto químico majoritário Carvacrol 98% do óleo essencial de <i>T. vulgaris</i> sobre isolados biológicos de <i>C. neoformans</i>	85

Tabela 22. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) do composto químico majoritário timol do óleo essencial de <i>T. vulgaris</i> Lin sobre isolados de <i>C. neoformans</i> de origem humana e ambiental.....	87
Tabela 23: Média, desvio padrão, mediana, máxima e mínima do composto químico majoritário Timol 99,5% do óleo essencial de <i>T. vulgaris</i> sobre isolados biológicos de <i>C. neoformans</i>	89
Tabela 24. Valores CIM50/CIM90 e CFM50/CFM90 dos óleos essenciais de <i>E. caryophyllus</i> e <i>T. vulgaris</i> e seus compostos químicos majoritários sobre isolados de <i>C. neoformans</i> de origem humana e ambiental.....	90
Tabela 25: Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) das misturas dos compostos químicos majoritários do óleo essencial <i>E. caryophyllus</i> - eugenol a 84,10% e β -cariofileno a 12,67% (96,77%) sobre isolados de <i>C. neoformans</i> de origem humana e ambiental.	91
Tabela 26: Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) das misturas dos compostos químicos majoritários do óleo essencial <i>T. vulgaris</i> - P-cimeno 14,43% e Linalol 8,49% (22,92%) sobre isolados de <i>C. neoformans</i> de origem humana e ambiental.....	93
Tabela 27: Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) das misturas dos compostos químicos majoritários do óleo essencial <i>T. vulgaris</i> - P-cimeno 14,43% e Carvacrol 5,08% (19,51%) sobre isolados de <i>C. neoformans</i> de origem humana e ambiental...	95
Tabela 28: Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) das misturas dos compostos químicos majoritários do óleo essencial <i>T. vulgaris</i> - P-cimeno 14,43% e Timol a 62,13% (76,56%) sobre isolados de <i>C. neoformans</i> de origem humana e ambiental.....	97
Tabela 29: Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) das misturas dos compostos químicos majoritários do óleo essencial <i>T. vulgaris</i> - Linalol 8,49% e Timol 62,13% (70,62%) sobre isolados de <i>C. neoformans</i> de origem humana e ambiental.....	99
Tabela 30: Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) das misturas dos compostos químicos majoritários do óleo essencial <i>T. vulgaris</i> - Linalol 8,49% e Carvacrol 5,08% (13,57%) sobre isolados de <i>C. neoformans</i> de origem humana e ambiental.....	101

Tabela 31: Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) das misturas dos compostos químicos majoritários do óleo essencial *T. vulgaris* - Timol 62,12% e Carvacrol 5,08% (67,21%) sobre isolados de *C. neoformans* de origem humana e ambiental..... **103**

Tabela 32: Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) das misturas dos compostos químicos majoritários do óleo essencial *T. vulgaris* - Timol 62,12%, Carvacrol 5,08%, P-Cimeno 14,43% e Linalol 8,49% (90,13%) sobre isolados de *C. neoformans* de origem humana e ambiental..... **105**

Tabela 33: Valores CIM50/CIM90 e CFM50/CFM90 para a mistura dos compostos químicos majoritários do óleo essencial *E. caryophyllus* – Eugenol 84,10% e β -cariofileno 12,67%; *T. vulgaris* - Timol 62,12%, Carvacrol 5,08%, P-Cimeno 14,43% e Linalol 8,49% (90,13%) sobre isolados de *C. neoformans* de origem humana e ambiental..... **107**

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Concentrações inibitórias mínimas (CIM) dos óleos essenciais de <i>E. caryophyllus</i> e <i>T. vulgaris</i> e seus compostos químicos majoritários sobre a cepa padrão de <i>C. neoformans</i> ICB 163D.....	52
Gráfico 2. Concentrações Fungicidas Mínimas (CFM) dos óleos essenciais de <i>E. caryophyllus</i> e <i>T. vulgaris</i> e seus compostos químicos majoritários sobre a cepa padrão de <i>C. neoformans</i> ICB 163D.....	52
Gráfico 3. Concentrações inibitórias mínimas (CIM) dos óleos essenciais de <i>E. caryophyllus</i> e <i>T. vulgaris</i> e seus compostos químicos majoritários sobre a cepa padrão de <i>C. neoformans</i> ATCC 90112.....	56
Gráfico 4. Concentrações Fungicidas Mínimas (CFM) dos óleos essenciais de <i>E. caryophyllus</i> e <i>T. vulgaris</i> e seus compostos químicos majoritários sobre a cepa padrão de <i>C. neoformans</i> ATCC 90112.....	56
Gráfico 5. Concentrações inibitórias mínimas (CIM) do óleo essencial de <i>E. caryophyllus</i> sobre isolados de <i>C. neoformans</i> de origem humana e ambiental.....	60
Gráfico 6. Concentrações fungicidas mínimas (CFM) do óleo essencial de <i>E. caryophyllus</i> sobre isolados de <i>C. neoformans</i> de origem humana e ambiental.....	60
Gráfico 7. Concentrações inibitórias mínimas (CIM) do composto químico Eugenol a 99% sobre isolados de <i>C. neoformans</i> de origem humana e ambiental.....	64
Gráfico 8. Concentrações fungicidas mínimas (CFM) do composto químico Eugenol a 99% sobre isolados de <i>C. neoformans</i> de origem humana e ambiental.....	64
Gráfico 9. Concentrações inibitórias mínimas (CIM) do composto químico β -cariofileno a 80% sobre isolados de <i>C. neoformans</i> de origem humana e ambiental.....	68
Gráfico 10. Concentrações fungicidas mínimas (CFM) do composto químico β -cariofileno a 80% sobre isolados de <i>C. neoformans</i> de origem humana e ambiental.....	68
Gráfico 11. Concentrações inibitórias mínimas (CIM) do óleo essencial de <i>T. vulgaris</i> sobre isolados de <i>C. neoformans</i> de origem humana e ambiental.....	72

Gráfico 12. Concentrações fungicidas mínimas (CFM) do óleo essencial de <i>T. vulgaris</i> sobre isolados de <i>C. neoformans</i> de origem humana e ambiental.....	72
Gráfico 13. Concentrações inibitórias mínimas (CIM) do composto químico Linalol 97% sobre isolados de <i>C. neoformans</i> de origem humana e ambiental.....	76
Gráfico 14. Concentrações fungicidas mínimas (CFM) do composto químico Linalol 97% sobre isolados de <i>C. neoformans</i> de origem humana e ambiental.....	76
Gráfico 15. Concentrações inibitórias mínimas (CIM) do composto químico P-cimeno a 99% sobre isolados de <i>C. neoformans</i> de origem humana e ambiental.....	80
Gráfico 16. Concentrações fungicidas mínima (CFM) do composto químico P-cimeno a 99% sobre isolados de <i>C. neoformans</i> de origem humana e ambiental.....	80
Gráfico 17. Concentrações inibitórias mínimas (CIM) do composto químico Carvacrol a 98% sobre isolados de <i>C. neoformans</i> de origem humana e ambiental.....	84
Gráfico 18. Concentrações fungicidas mínimas (CIM) do composto químico Carvacrol a 98% sobre isolados de <i>C. neoformans</i> de origem humana e ambiental.....	84
Gráfico 19. Concentrações inibitórias mínimas (CIM) do composto químico Timol 99,5% sobre isolados de <i>C. neoformans</i> de origem humana e ambiental.....	88
Gráfico 20. Concentrações fungicidas mínimas (CFM) do composto químico Timol 99,5% sobre isolados de <i>C. neoformans</i> de origem humana e ambiental.....	88
Gráfico 21. Concentrações inibitórias mínimas (CIM) da mistura dos compostos químicos majoritários do óleo essencial <i>E. caryophyllus</i> - eugenol a 84,10% e β -cariofileno a 12,67% (96,77%) sobre isolados de <i>C. neoformans</i> de origem humana e ambiental.....	92
Gráfico 22. Concentrações fungicidas mínimas (CFM) da mistura dos compostos químicos majoritários do óleo essencial <i>E. caryophyllus</i> - eugenol a 84,10% e β -cariofileno a 12,67% (96,77%) sobre isolados de <i>C. neoformans</i> de origem humana e ambiental.....	92
Gráfico 23. Concentrações inibitórias mínimas (CIM) da mistura dos compostos químico do óleo essencial de <i>T. vulgaris</i> P-Cimeno 14,43% e Linalol 8,49% (22,92%) sobre isolados biológicos de <i>C. neoformans</i> de origem humana e ambiental.....	94

Gráfico 24. Concentrações fungicidas mínimas (CFM) da mistura dos compostos químicos do óleo essencial de <i>T. vulgaris</i> P-Cimeno 14,43% e Linalol 8,49% (22,92%) sobre isolados biológicos de <i>C. neoformans</i> de origem humana e ambiental.....	94
Gráfico 25. Concentrações inibitórias mínimas (CIM) da mistura dos compostos químicos majoritários de <i>T. vulgares</i> P-Cimeno 14,43% e Carvacrol a 5,08% (19,5%) sobre isolados de <i>C. neoformans</i> de origem humana e ambiental.....	96
Gráfico 26. Concentrações fungicidas mínimas (CFM) da mistura dos compostos químicos majoritários de <i>T. vulgares</i> P-Cimeno 14,43% e Carvacrol a 5,08% (19,5%) sobre isolados de <i>C. neoformans</i> de origem humana e ambiental.....	96
Gráfico 27. Concentrações inibitórias mínimas (CIM) da mistura dos compostos majoritários de <i>T. vulgares</i> P-Cimeno a 14,43% e Timol a 62,13% (76,56%) sobre isolados de <i>C. neoformans</i> de origem humana e ambiental.....	98
Gráfico 28. Concentrações fungicidas mínimas (CFM) da mistura dos compostos majoritários de <i>T. vulgares</i> P-Cimeno a 14,43% e Timol a 62,13% (76,56%) sobre isolados de <i>C. neoformans</i> de origem humana e ambiental.....	98
Gráfico 29. Concentrações inibitórias mínimas (CIM) da mistura dos compostos químicos majoritário de <i>T. vulgares</i> Linalol 8,49% e Timol 62,13% (70,62%) sobre isolados de <i>C. neoformans</i> de origem humana e ambiental.....	100
Gráfico 30. Concentrações fungicidas mínimas (CFM) da mistura dos compostos químicos majoritário de <i>T. vulgares</i> Linalol 8,49% e Timol 62,13% (70,62%) sobre isolados de <i>C. neoformans</i> de origem humana e ambiental.....	100
Gráfico 31. Concentrações inibitórias mínimas (CIM) da mistura dos compostos químicos majoritários de <i>T. vulgares</i> Linalol 8,49% e Carvacrol 5,08% (13,57%) sobre isolados de <i>C. neoformans</i> de origem humana e ambiental.....	102
Gráfico 32. Concentrações fungicidas mínimas (CFM) da mistura dos compostos químicos majoritários de <i>T. vulgares</i> Linalol 8,49% e Carvacrol 5,08% (13,57%) sobre isolados de <i>C. neoformans</i> de origem humana e ambiental.....	102
Gráfico 33. Concentrações inibitórias mínimas (CIM) da mistura dos compostos químicos majoritários Timol 62,12% e Carvacrol 5,08% (67,21%) sobre isolados de <i>C. neoformans</i> de origem humana e ambiental.....	104

Gráfico 34. Concentrações fungicidas mínimas (CFM) da da mistura dos compostos químicos majoritários de *T. vulgares* Timol 62,12% e Carvacrol 5,08% (67,21%) sobre isolados de *C. neoformans* de origem humana e ambiental..... **104**

Gráfico 35. Concentrações inibitórias mínimas (CIM) da mistura dos compostos químicos majoritárias de *T. vulgares* Timol 62,13%, Carvacrol 5,08%, P-Cimeno 14,43% e Linalol 8,49% (90,13%) sobre isolados de *C. neoformans* de origem humana e ambiental..... **106**

Gráfico 36. Concentrações fungicidas mínimas (CFM) da mistura dos compostos químicos majoritárias de *T. vulgares* Timol 62,13%, Carvacrol 5,08%, P-Cimeno 14,43% e Linalol 8,49% (90,13%) sobre isolados de *C. neoformans* de origem humana e ambiental..... **106**

RESUMO

Cryptococcus neoformans é uma levedura patogênica, agente etiológico da meningoencefalite criptococócica, manifestação clínica mais frequente da criptococose, que tem uma alta taxa de mortalidade nos países em desenvolvimento e apresentam fatores de virulência, que diretamente influenciam a infecção no hospedeiro. Uma doença infecciosa cosmopolita que ocorre por inalação das leveduras e se manifesta com mais frequência em indivíduos com baixa imunidade celular. *C. neoformans* tem tropismo pelas células do sistema nervoso central. Para o tratamento da criptococose a droga de escolha é a anfotericina B associada ou não para a 5-flucitosina apesar da alta toxicidade e nefrotoxicidade. O objetivo deste trabalho foi avaliar atividade antifúngica dos óleos essenciais de *Eugenia caryophyllus* e *Thymus vulgaris* e seus compostos químicos majoritários sobre *Cryptococcus neoformans*. Em doses subinibitórias avaliar a produção de cápsula e de exoenzimas proteinase e fosfolipase, antes e após exposição aos óleos essenciais e seus compostos químicos majoritários e avaliar a mistura dos compostos químicos sobre isolados de *C. neoformans* sensíveis aos óleos essenciais. Foram utilizados 18 isolados biológicos de origem humanas sendo, 07 de pacientes com sorologia positiva para o HIV e 11 com sorologia desconhecida para o HIV, 20 isolados de origem ambiental e 02 cepas padrão de *C. neoformans*: ICB 163 D (NIH 163D) e ATCC 90112. 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 polissorbato Tween 20 a 0,02% como tensoativo. E a confirmação da inibição em Agar Sabouraud dextrose, a 37°C por 48 hs com obtenção da concentração fungicida mínima (CFM). Para cada óleo essencial e seus compostos químicos majoritários foram encontrados os seguintes resultados de CFM50 e CFM90: *E. caryophyllus* CFM50 0,19% e CFM90 1,56%; para seus compostos majoritários: Eugenol 99% CFM50 24,75% e CFM90 99%; β -cariofileno 80% CFM50 40% e CFM90 80%. Para o óleo de *T. vulgaris* CFM50 0,09% e CFM90 1,56%; para seus compostos majoritários: Linalol 97% CFM50 e CFM90 97%; P-Cimeno 99% CFM50 e CFM90 de 99%; Carvacrol 98% CFM50 24,50% e CFM90 49%; Timol 95,5% CFM50 24,8% e CFM90 49,7%. Quanto à produção de proteinase e fosfolipase todos os isolados eram fortemente positivos produtores das exoenzimas e após exposição aos óleos essenciais e seus compostos majoritários todos se tornaram não produtores. Quanto à presença de cápsulas todos os isolados apresentavam cápsula e após contato com os óleos e seus compostos majoritários, ocorreu redução ou ausência da mesma, bem como as células de leveduras tenderam a se agrupar em número de 2, 4 ou mais células com aumento de tamanho. Para a pesquisa da mistura entre os compostos químicos majoritários, obtiveram-se os seguintes resultados quanto as CFMs 50 e 90: Eugenol 84,10% e β -cariofileno 12,67% - CFM 50 e CFM90 96,77%; P-Cimeno 14,43% e Linalol 8,49% - CFM 50 e CFM90 de 22,92%; de P-Cimeno 14,43% e Carvacrol 5,08% - CFM50 e CFM90 de 19,51%; P-Cimeno 14,43% e Timol 62,13% - CFM50 e CFM90 de 76,56%; Linalol 8,49% e Timol 62,13% - CFM50 35,31% e CFM90 de 70,62%; Linalol 8,49% e Carvacrol 62,13%- CFM50 e CFM90 de 13,57%; Timol 62,13% e Carvacrol 5,08%- CFM50 8,4% e CFM90 33,6%. A mistura de Timol 62,13%, Carvacrol 5,08%, P-Cimeno 14,43% e Linalol 8,49% foram CFM50 de 2,81% e CFM90 90,13%. Pelo exposto e nas condições desse estudo, conclui-se que as CFMs de cada composto químico majoritário sobre os isolados biológicos, apresentaram atividade antifúngica com concentrações superiores ao do óleo essencial total.

Palavras chaves: *Cryptococcus neoformans*; óleos essenciais; antifúngicos naturais; microdiluição em caldo; *Eugenia caryophyllus*; *Thymus vulgaris*; eugenol; β -cariofileno; linalol; P-Cimeno; carvacrol; timol.

ABSTRACT

Cryptococcus neoformans is a pathogenic yeast, etiological agent of meningoencephalitis cryptococcal, most common clinical manifestation of cryptococcosis, which has a high mortality rate in developing countries and have virulence factors that directly influence the infection in the host. A cosmopolitan infectious disease that occurs by inhalation of yeasts and manifests more frequently in individuals with low cellular immunity. *C. neoformans* has tropism for cells of the central nervous system. For the treatment of cryptococcosis the drug of choice is amphotericin B associated or not to 5-flucytosina despite the high toxicity and nephrotoxicity. The objective of this study was to evaluate the antifungal activity of essential oils of *Eugenia caryophyllus* and *Thymus vulgaris* and its major chemical compounds on *Cryptococcus neoformans*. In subinibitory evaluate the dose capsule production and proteinase exoenzyme and phospholipase, before and after exposure to essential oils and chemicals its controlling and evaluating the mixture of chemical compounds on *C. neoformans* isolates sensitive to essential oils. human were used 18 isolated biological origin and, 07 patients with positive serology for HIV and 11 with unknown HIV status, 20 environmental isolates and 02 standard strains of *C. neoformans*: ICB 163 D (NIH 163D) and ATCC 90112. for the evaluation of the antifungal activity and obtaining the minimum inhibitory concentration (MIC) used the broth microdilution technique in RPMI 1640 medium with Tween 0.02% polysorbate 20 as surfactant. And confirmation of inhibition Sabouraud dextrose agar at 37 ° C for 48 hours to obtain the minimum fungicidal concentration (MFC). For each essential oil and its major chemical compounds the following results CFM50 and CFM90 were found: *E. caryophyllus* CFM50 CFM90 0.19% and 1.56%; for its major compounds: Eugenol 99% 24.75% CFM50 and CFM90 99%; β -caryophyllene 80% CFM50 CFM90 40% and 80%. For *T. vulgaris* oil CFM50 CFM90 0.09% and 1.56%; for its major compounds: Linalool 97% CFM50 and CFM90 97%; P-cymene and 99% CFM50 CFM90 99%; Carvacrol 98% and 24.50% CFM50 CFM90 49%; Thymol CFM50 95.5% 24.8% and 49.7% CFM90. For the production of proteinase and phospholipase all isolates were strongly positive producers of exoenzymes and after exposure to essential oils and their major compounds all became not producers. Regarding the presence of capsules all isolates had capsule and after contact with oils and their major compounds, such decrease or lack thereof, as well as yeast cells tended to cluster numbers of 2, 4 or more cells with increased size. For the research of the mixture between the main chemical compounds, the following results as the CFMs were obtained 50 and 90: Eugenol 84.10% and β -caryophyllene 12.67% - 50 CFM and CFM90 96.77%; P-Cymene Linalool 14.43% and 8.49% - 50 CFM and CFM90 22.92%; P-cymene 14.43% and 5.08% Carvacrol - CFM50 and CFM90 of 19.51%; P-cymene and thymol 14.43% 62.13% - CFM50 and CFM90 of 76.56%; Linalool and thymol 8.49% 62.13% - 35.31% CFM50 and CFM90 of 70.62%; Linalool 8.49% and 62.13% Carvacrol - CFM50 and CFM90 of 13.57%; 62.13% Thymol and Carvacrol 5.08% - 8.4% and CFM50 CFM90 33.6%. A mixture of 62.13% thymol, 5.08% Carvacrol, P-Cymene Linalool 14.43% and 8.49% were CFM50 CFM90 2.81% and 90.13%. For these reasons and under the conditions of this study, it is concluded that the CFMs of each major chemical on biological strains showed antifungal activity at concentrations higher than the overall essential oil.

Keywords: *Cryptococcus neoformans*; essential oils; natural antifungals; microdilution broth; *Eugenia caryophyllus*; *Thymus vulgaris* .; eugenol; β -caryophyllene; linalool; P-cymene; carvacrol; thymol.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Genero *Cryptococcus*

Mundialmente difundidos no meio ambiente, os fungos são cada vez mais reconhecidos como importantes patógenos, principalmente nas últimas décadas, pela frequência de doenças fúngicas sistêmicas graves. Esta condição ocorre principalmente por comprometimento do sistema imunológico do hospedeiro (Karkowska-Kuleta *et al.* 2009; Nucci *et al.* 2010; Roilides *et al.* 2012).

Dentre estes patógenos, destaca-se a levedura *Cryptococcus neoformans*, que é um basidiomiceto intracelular facultativo responsável por cerca de um milhão de casos de meningite e 675.000 mortes por ano em pacientes infectados pelo HIV (Park *et al.*, 2009; Coelho *et al.*, 2014). Embora seja predominantemente um saprófita ambiental, *C. neoformans* causa infecções sistêmicas em humanos e pode evoluir como um patógeno capaz de sobreviver a mecanismos de defesa do macrófago, por meio de interações fagocíticas (Alvarez e Casadevall, 2007; Jianmin *et al.*, 2013).

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; Jianmin *et al.*, 2013).

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; Simwami *et al.*, 2011; Jianmin *et al.*, 2013).

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 um dos principais patógenos para os seres humanos (Lengeler *et al.*, 2001; Litvintseva *et al.*, 2006; Byrnes *et al.*, 2011). 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, frequentemente 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 (Lengeler *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2002; Nishikawa *et al.*, 2003; Litvintseva *et al.*, 2006; Liaw *et al.*, 2010; Ma & May, 2009; Zhu *et al.*, 2009, Hoog, 2011; Zatz, *et al.*, 2010 e Kaufman *et al.* 2011).

1.2 *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). 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 inaladas de ambientes habitados por

aves (Mitchell & Perfect, 1995; Casadevall & Perfect, 1998; Ma & May, 2009). Após inalação, *C. neoformans* estabelece no pulmão uma infecção e pode disseminar para outros órgãos, especialmente o sistema nervoso central (SNC), o qual tem tropismo, causando grave meningoencefalite, podendo também acometer a pele, a próstata e os olhos (Mitchell & Perfect, 1995).

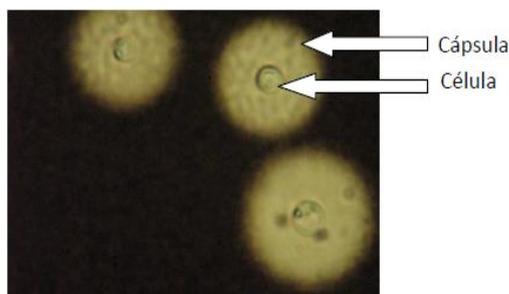


Figura 1: *Cryptococcus neoformans*

Diversos fatores estão implicados na virulência da levedura, dentre os quais a capacidade de crescimento a 37°C, síntese de melanina, presença de cápsula e a produção de diversas enzimas como proteinases, causando destruição tecidual (Aoki *et al.* 1994, Chen *et al.* 1996), urease, que tem influência direta na disseminação da criptococose para o SNC (Torres-Rodriguez *et al.*, 2008) e fosfolipase, que facilita a invasão no tecido (Cox *et al.*, 2001; Perfect & Casadevall, 2002; Chayakulkeeree & Perfect, 2006; Karkowska-Kuleta *et al.*, 2009) e pode digerir membranas celulares promovendo lise celular (Santagelo *et al.*, 1999). A cápsula, que é composta de cerca de 90% de glucurono-xilomanana (GXM) e 7% de galacto-xilomanana (GalXM) junto com algumas manoproteínas está presente nos isolados do meio ambiente e pode proteger as células de levedura e tem propriedades imunomoduladoras (Bose *et al.*, 2003; Zaragoza *et al.*, 2009). O componente polissacárido capsular que atua inibindo a fagocitose engloba fatores do complemento, absorve e neutraliza opsoninas, anticorpos protetores e promove ainda a inibição da quimiotaxia de neutrófilos (Campos & Baroni, 2010; Chang *et al.*, 1996; Chang & Kwon-Chung, 1998). A produção de melanina se dá por meio de enzimas oxidativas chamadas lacases e sua função é proteger a célula contra a fagocitose (Williamson, 1994). Além das enzimas já descritas, a superóxido dismutase, a produção de manitol e α

mating-type estão envolvidas na patogênese da criptococose (Mitchell & Perfect, 1995; Chang *et al.*, 2000; Cox *et al.*, 2000; Steen *et al.* 2002; Nishikawa *et al.*, 2003; Dambrós, 2005; Dias *et al.*2006; Cerikã *et al.*, 2009, Eisenman *et al.*, 2009; Gates-Hollingsworth MA & Kozel TR, 2009; Liaw *et al.*, 2009; Liu & Nizet, 2009; Chayakulkeeree & Perfect 2006; Huston & Mody 2009; Chan & Tay 2010; Jang *et al.* 2011; Kronstad *et al.* 2012; Negroni, 2012).

O complexo de espécies de *Cryptococcus neoformans* é formado por dois microrganismos diferentes, *C. neoformans* e *C. gattii*, que são subclassificados em pelo menos duas variedades, cinco sorotipos e oito tipos moleculares (Kwon-Chung & Varma, 2006; Bovers *et al.*, 2008; Lester *et al.*, 2011).

Apesar de partilharem várias características fenotípicas e moleculares, estas espécies diferem quanto aos aspectos ecológicos e epidemiológicos (Lin e Heitman, 2006; Costa *et al.*, 2010). São os agentes causadores de meningoencefalite criptocócica, manifestação clínica mais frequente da criptococose, que tem uma alta taxa de mortalidade nos países em desenvolvimento (Kronstad *et al.*, 2011).

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; Kon *et al.*, 2008). *Cryptococcus* spp apresentam fatores de virulência, que diretamente influenciam a infecção no hospedeiro (Ma & May 2009). Entre eles, enzimas hidrolíticas capazes de degradar proteínas (Chen *et al.*, 1996; Bien *et al.*, 2009; Chayakulkeeree *et al.*, 2011) e as fosfolipases diretamente relacionadas com a desestabilização de membranas de células hospedeiras (Ma & May, 2009).

1.3 Fatores de virulência

Apesar de certos aspectos da virulência ser 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).

1.3.1 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; Coelho *et al.*, 2014).

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 informam 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 antissoro produzido contra diferentes epítopos dos polissacarídeos que compõe a cápsula da levedura (Nishikawa *et al.*, 2003).

1.3.2 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). A 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* apresentarem 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).

1.3.3 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 por meio 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).

1.3.4 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.

1.4 Antifúngicos sintéticos

Introduzida na década de 1950, a 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). Atua sobre *C. neoformans* por ligação específica no ergosterol, presente na membrana fúngica, causando uma desorganização desta membrana, formando poros, compostos pelo agrupamento do fármaco e do ergosterol, causando despolarização da membrana, aumento da permeabilidade para prótons e cátions monovalente 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 nova opção para o tratamento desta infecção (Araújo *et al.*, 2004; Meneses *et al.*, 2009).

Embora novas drogas antifúngicas fossem desenvolvidas, nos últimos anos, a disponibilidade de agentes antifúngicos com atividade contra *Cryptococcus* spp ainda é limitada. Este cenário motiva a busca de novos compostos que apresentem propriedades antifúngicas contra *Cryptococcus* spp. (Jabra- Rizk *et al.*, 2006; Semighini *et al.*, 2008; Derengowski *et al.*, 2009; Weber *et al.*, 2010; Pammi *et al.*, 2011).

1.5 Antifúngicos naturais

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

O estudo inicia-se a partir de uma 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; Abrahão, 2007; Oliveira, 2007; Oliveira *et al.*, 2007, Silva, 2007 e Costa *et al.*, 2009)

Os óleos essenciais constituem os elementos voláteis contidos em diferentes órgãos da planta e estão relacionados com diversas funções necessárias à sua sobrevivência (Oliveira *et al.*, 2006).

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).

1.6 Óleos essenciais

As plantas possuem substâncias com potencial antimicrobiano, que estão presentes em extratos e óleos essenciais de caules, raízes, folhas e frutos (Maciel 2002). Os compostos produzidos pelos vegetais são classificados em dois grupos: os metabólitos primários, como os carboidratos, aminoácidos e lipídeos; e os metabólitos secundários que são compostos elaborados a partir da síntese dos metabólitos primários, constituídos principalmente por substâncias de baixo peso como os compostos terpenos, monoterpenos, sesquiterpenos, fenólicos, fenilpropanóides, ésteres, álcoois, aldeídos e cetonas, normalmente utilizados *in natura*, pois suas propriedades estão associadas a vários componentes que formam cada óleo em particular (Duarte 2006).

No século XVI, o médico e alquimista suíço Paracelso definiu o termo óleo essencial, o componente efetivo de uma droga, a “quinta essência”. Extraídos de parte de plantas como frutas, flores, cascas, ou de plantas inteiras, também é utilizado como especiarias e erva medicinal. São caracterizados quimicamente como misturas complexas de compostos de baixo peso molecular, constituídos de numerosos compostos voláteis, com tensões de vapor elevadas, odoríferos, insolúveis em água, porém, solúveis em álcool e em vários solventes hidrossolúveis capazes de gerar sabores e/ou aromas (Silva,1998). Parte das propriedades farmacêuticas descritas para plantas medicinais são creditadas aos óleos essenciais. O óleo obtido de uma planta serve como característica para aquela espécie. Fisicamente, se apresentam no estado líquido a temperatura ambiente, com aspecto incolor ou claro. Podem ser extraídos de diferentes modos, como hidro destilação, destilação a vapor, CO₂ supercrítico, ou com a utilização de solventes orgânicos ou gorduras. (Trombetta *et al.*, 2005, Edris, 2007).

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 têm 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).

Utilizados há séculos como flavorizantes na fabricação de cosméticos e perfumarias, e farmacologicamente com fins medicinais, os óleos essenciais vêm estimulando a procura por substâncias biologicamente ativas e eficazes, especialmente sobre microrganismos. Outro aspecto é que pelo fato de serem naturais e biodegradáveis geralmente apresenta baixa toxicidade aos mamíferos e por poderem atuar sobre várias moléculas-alvo ao mesmo tempo, quando comparado a fármacos sintéticos, tornam-se substâncias chaves para a pesquisa de novos medicamentos (Figueiredo *et al.*, 2008).

A caracterização química dos óleos essenciais pode ser obtida por cromatografia, acoplada a espectrometria de massas. Esses óleos podem apresentar mais de 60 compostos diferentes. Os componentes majoritários às vezes representam mais de 85% do total, enquanto outros compostos aparecem em quantidades ínfimas, embora a proporção não esteja relacionada com a grandeza de sua atividade, podem ser fundamentais para a ação farmacológica dos demais (Galindo *et al.*, 2010).

A atividade dos óleos essenciais engloba ação fitoterápica, antiviral, antisséptica, nutricional, antifúngica, entre outras. A atividade bacteriostática e/ou bactericida de óleos essenciais é exercida principalmente por compostos terpenóides (Burt, 2004).

Mesmo que óleos diferentes apresentem compostos iguais qualitativamente, diferenças quantitativas farão com que aquele óleo tenha

propriedades químicas e biológicas diferentes dos demais (Trombetta *et. al.*, 2005, Edris, 2007).

Ferreira (1998) relata que, o extrato de uma planta medicinal sendo uma mistura de substâncias, a separação em substâncias isoladas pode levar a perda do efeito farmacológico esperado.

1.7 Atividade antimicrobiana de óleos essenciais

Estudos vêm apontando as valiosas propriedades terapêuticas de óleos essenciais de plantas sobre as leveduras patogênicas (Villon & Chaumont, 1994; Carmo *et al.*, 1998; Alves *et al.*, 2000; Araujo, 2004; Lemos *et al.*, 2004; Araujo *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2009; Zuzarte *et al.*, 2011).

Cerca de 60% dos óleos essenciais possuem propriedades antifúngicas (Bhavanani & Ballow, 1992; Gazim *et al.*, 2009) e 35% exibem propriedades antibacterianas. Os principais compostos químicos isolados dos óleos essenciais são terpenos e seus derivados oxigenados, terpenóides, compostos fenólicos e fenilpropanóides (Gonçalves *et al.*, 2003; Solórzano-Santos & Miranda-Novales, 2011).

Os produtos do metabolismo secundário acumulado pelas plantas atuam de duas formas: como “potencializadores de atividade antibacteriana”, favorecendo a atividade de antibióticos cuja ação encontra-se limitada por mecanismos de multirresistência desenvolvidos pelos microrganismos; ou como “atenuantes de virulência”, adequando a resposta do sistema imune do hospedeiro à infecção (González-Lamothe *et al.*, 2009),

Apesar de várias estruturas químicas isoladas de produtos do metabolismo secundário das plantas exercerem alguma ação antibacteriana, a maior parte destas moléculas apresenta atividade fraca e espectro de ação limitado quando utilizadas isoladamente. Porém, ao serem combinadas entre si ou com antibióticos, podem atuar como adjuvantes, modificando a resistência bacteriana frente determinadas drogas, diminuindo a dose necessária de antibióticos para um resultado eficaz (Simões *et al.*, 1999).

O valor terapêutico da combinação de substâncias é praticado desde sistemas medicinais antigos como na Ayurveda e na Medicina Tradicional Chinesa (MTC), objetivando o sinergismo. Combinações entre óleos

essenciais são utilizadas na aromaterapia, e até mesmo a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda o uso de alguns medicamentos alopáticos de forma combinada (van Vuuren & Viljoen, 2011).

Hemaiswarya *et al.* (2008) citam algumas associações entre produtos naturais e antibióticos, visando a inibição da ação do mecanismo de resistência bacteriana ou sua expressão (Tabela 1).

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

Tabela 1: Algumas associações efetivas entre produtos naturais e antibióticos

Produtos naturais	Antibióticos	Mecanismo de ação	Microorganismos
Catequinas, epigallocatequina galato (EGCg), baicalina, corilagina	B-lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas).	Inibição da proteína de ligação à penicilina alterada (PBP2a) ou inibição de sua síntese	<i>S. aureus</i> metilina resistente (MRSA).
ECGg	Penicilina	Inibe penicilinase	<i>S. aureus</i> produtores de penicilina
Diterpenos de <i>Lycopus europeus</i> L.	Tetraciclina	Bloqueio de bombas de efluxo	<i>S. aureus</i> com mecanismo de efluxo multirresistente
Extrato de romã (<i>Punica granatum</i> L.)	Coproxifloxacina, cloranfenicol, gentamicina, oxacilina, entre outros.	Inibe Nor A (bomba de efluxo responsável por resistência a fluorquinolonas).	MRSA
α -mangostim	Vancomicina	Desconhecido	MRSA e Enterococcus vancomicina resistentes (VRE).

Fonte: Adaptado de Hemaiswarya *et al.*, 2008

1.8 Metabólitos secundários em plantas

Metabólitos secundários são substâncias produzidas em pequenas quantidades e nem sempre estão envolvidos em funções vitais do vegetal ou

mesmo presente em todos eles. São conhecidos por serem sintetizados em tipos celulares especializados e em distintos estágios de desenvolvimento, tornando seu isolamento mais complexo. Estes constituintes são diversificados, onde, cada família, gênero e espécie produzem uma categoria química característica ou uma mistura delas e podem ser utilizadas como caracteres taxonômicos na classificação das plantas (Waksmundzka-Hajnos *et al.*, 2008).

Os produtos do metabolismo secundário podem ser divididos em três grandes grupos segundo a sua biossíntese: terpenóides, alcaloides e compostos fenólicos. Em torno de 55.000 terpenóides já foram isolados, podendo estes apresentar funções tanto no metabolismo primário como secundário. Aqueles produzidos pelo metabolismo secundário são derivados da molécula precursora de cinco carbonos, o isopentenil difosfato (IPP). Os cerca de 12.000 alcaloides conhecidos apresentam uma ou mais moléculas de nitrogênio, sendo sintetizados principalmente a partir de aminoácidos. Os compostos fenólicos conhecidos, em torno de 8.000, podem ser sintetizados pela via do ácido chiquímico, ou via do acetato/malonato (Croteau *et al.*, 2000).

1.8.1 Terpenos

Os terpenos ou terpenóides representam a maior classe de constituintes ativos em plantas, tendo mais de 30.000 substâncias descritas (Raven, 2001). A classificação dos terpenos decorre do número de unidades isoprênicas que são formadas por átomos de carbono. Os monoterpenos contêm duas unidades isoprênicas (10 átomos de carbonos) são voláteis e encontrados frequentemente nos óleos essenciais (Larcher, 2000; Raven, 2001) assim como os sesquiterpenos que constituem uma classe de substâncias naturais com diversos núcleos estruturais (Brochini *et al.*, 1999). Os fatores ambientais na variabilidade de monoterpenos são de grande importância pelo fato dessas substâncias terem significado biossistemático, ecológico e evolutivo no organismo vegetal (Lima *et al.*, 2003).

Os terpenos atuam nas plantas em diferentes funções características, como por exemplo, na produção de hormônios (giberelinas), pigmentos fotossintéticos (carotenoides), carreadores de elétrons (ubiquinonas) e em

mecanismos de defesa e comunicação. A maioria dos compostos apresenta baixo peso molecular, natureza lipofílica, grande variedade de estruturas e alta pressão de vapor à temperatura ambiente (Bakkali *et al.*, 2008).

Os monoterpenos são bem conhecidos como constituintes da essência volátil de flores e óleos essenciais extraídos de plantas medicinais e aromáticas, justificando sua importância para a indústria de perfumes e aromatizantes. O geraniol, mentol, linalol e o citral são exemplos de monoterpenos. Assim como os monoterpenos, muitos sesquiterpenos podem atuar como compostos antimicrobianos (fitoalexinas) e herbicidas. Fazem parte desta classe farnesol, zingibereno e cariofileno. As resinas ácidas apresentadas por coníferas e leguminosas, os hormônios giberelinas, fitoalexinas e metabólitos secundários farmacologicamente importantes (como Taxol®, quimioterápico e forskolina, usada no tratamento de glaucoma) são exemplos de diterpenos. Os triterpenos são sintetizados a partir da condensação cauda-cauda de duas unidades de sesquiterpeno (pela extremidade fosfato). Os brassinoesteroides, fitoesteroides de membrana, algumas fitoalexinas, toxinas e componentes de ceras cuticulares compõem esta ampla classe de compostos químicos. Como exemplos de tetraterpenos, podem ser citados os carotenoides, pigmentos intimamente ligados aos processos fotossintéticos. Os triterpenos mais prevalentes contêm oito unidades de isopreno de carbono. São pigmentos carotenóide que desempenham funções essenciais na fotossíntese. Os politerpenos que contêm mais de oito unidades de isopreno incluem os portadores de elétrons quinona prenilada (plastoquinona e ubiquinona), de cadeia longa envolvida em reações de transferência de açúcar (por exemplo, Dolicol) tais como polímeros de borracha, muitas vezes encontradas no látex. (Croteau *et al.*, 2000).

Os terpenos e seus derivados exercem atividade antimicrobiana envolvendo diversas espécies de plantas e microrganismos testados. Greay & Hammer (2011) citam alguns dos mecanismos de atuação dos compostos sobre células bacterianas. Monoterpenos interferem na integridade e funcionamento da membrana celular, por meio da mudança do potencial da membrana, perda de material citoplasmático e inibição da cadeia respiratória. A exposição a terpenos pode interferir na expressão de genes codificadores de fatores de virulência, como nas linhagens de *S. aureus* produtoras de

enterotoxinas (Qiu *et al.*, 2011) e na expressão de proteínas citoplasmáticas e de membrana em *Salmonella enterica* (Di Pasqua *et al.*, 2010). Ao investigar a atividade antimicrobiana de sesqui- e diterpenos isolados da copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.) contra bactérias cariogênicas, Souza *et al.* (2011) descreveram uma maior eficiência para os compostos com apenas um grupo hidrofílico frente aos que apresentaram dois grupos.

1.8.2 Fenóis

Os fenóis ou compostos fenólicos estão presentes em todos os órgãos das plantas, sendo abundantes em legumes, frutas, grãos, vegetais como também encontrados no chocolate, vinho tinto, azeite de oliva, chá verde e café. Já foram caracterizados mais de 8.000 compostos que compreendem estruturas diversas variando de moléculas simples, como os ácidos fenólicos, compostos cujas moléculas são altamente ramificadas, como os taninos. Os polifenóis podem ser divididos em pelo menos 10 classes diferentes baseada em suas estruturas químicas (fenóis simples, ácidos fenólicos, benzoquinonas, isocumarinas e cumarinas, naftoquinonas, estilbenos, acetofenonas, xantonas, entre outros). Os flavonoides constituem a classe fenólica mais importante com mais de 5.000 compostos descritos (Bravo, 1998). Podem ser originados basicamente por duas rotas bioquímicas diferentes, seja pela via do chiquimato ou pela via do acetato/malonato (Quideau *et al.*, 2011).

A biossíntese de metabólitos secundários é um processo complexo e está sujeito a influência de diferentes variáveis. Fatores bióticos e abióticos podem interferir com a qualidade e a quantidade de produtos secundários resultantes do metabolismo de uma planta em determinado momento (Sangwan, 2001; Gobbo-Neto & Lopes, 2007).

Atividade antimicrobiana de vários compostos fenólicos de extratos de plantas tem sido avaliada em diversas pesquisas científicas. Alguns estudos (Einbond *et al.*, 2004; Banerjee *et al.*, 2005; Choi *et al.*, 2006) relatam que muitas atividades biológicas, assim como a antioxidante e antimicrobiana, são devidas ao teor de fenóis totais, como taninos e flavonóides.

1.9 Ensaios com óleos essenciais e seus compostos químicos

Foglio (2003), em um estudo com *Artemisia annua* L., encontrou uma CIM de 1.000 µg/mL a 1.100 µg/mL para *C. albicans*, nas frações purificadas de deoxiartemisinina e dihidroepioxiartenuina.

Sautour (2004) considerou significativa a atividade antimicrobiana, quando os resultados atingem valores < 200 µg/mL para compostos químicos isolados.

Lee *et al.*, 2009 estudando óleos essenciais de coníferas japonesas – *Pinus densiflora*, *Cryptomeria japonica* e *Chamaecyparis obtusa* – em diferentes microrganismos utilizando a técnica de difusão em ágar, observou que todos os óleos essenciais apresentaram atividade sobre *C. neoformans*, com CIM de 0,545 mg/mL para *P. densiflora* e CIM de 2,18 mg/mL para *C. japonica* e *C. obtusa*. *C. neoformans* foi mais sensível a *P. densiflora*. O trabalho sugere que o monoterpene α -pineno detectado em todos os óleos seja o composto com atividade antimicrobiana mais importante.

O óleo essencial de *Distichoselinum tenuifolium* (Família Umbelliferae) é composto de hidrocarbonetos monoterpênicos, sendo o principal composto mirceno (47,7 - 84,6%). Este também apresentou atividade antifúngica contra cepas de *C. neoformans* (Tavares *et al.*, 2010).

O óleo essencial de *Ocimum gratissimum*, popularmente conhecida como alfavaca e o eugenol, principal constituinte do óleo essencial desta planta, foram estudados para verificar a atividade antifúngica sobre *C. neoformans*, *Paracoccidioides brasiliensis* e *Histoplasma capsulatum*, utilizando a técnica de diluição em ágar. Como resultados foi observado à atividade sobre *C. neoformans* e *P. brasiliensis*. A análise química desse óleo é constituída por eugenol, timol e terpenóides entre outras substâncias. A fração clorofórmica desta planta na concentração de 62,5µg/mL inibiu 92% dos isolados de *C. neoformans* e o óleo essencial mostrou inibição de 8% desses isolados a uma concentração de 125µg/mL (Lemos, 2004).

Hudaib *et al.*, 2002 relatam que entre estes compostos químicos, o timol e carvacrol são um dos principais monoterpênicos existentes no óleo essencial de tomilho.

1.10 Espécies vegetais dos óleos essenciais e seus compostos químicos.

1.10.1 *Eugenia caryophyllus* Sprengel e seus compostos químicos

Eugenia caryophyllus Sprengel, pertence à Família Myrtaceae, originária da Índia e cultivada em lugares de clima quente e úmido. A árvore de *E. caryophyllus* (Figura 2A, 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 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 2 A, B e C. *Eugenia caryophyllus* – **A:** botões florais; **B:** botões florais em processo de secagem natural; **C:** Botões florais secos (cravo-da-índia).

1.10.2 *Thymus vulgaris* Lin. e seus compostos químicos

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 3 A e B).

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, flavonoides, 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 3 A e B. *Thymus vulgaris* – A: tomilho rosa; B: tomilho branco.

1.11 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 de *Eugenia caryophyllus* e *Thymus vulgaris* e seus compostos químicos majoritários sobre *C. neoformans*.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

Avaliar a atividade antifúngica dos óleos essenciais de *Eugenia caryophyllus* e *Thymus vulgaris* e seus compostos químicos majoritários sobre *Cryptococcus neoformans*.

2.2 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 *Eugenia caryophyllus* e *Thymus vulgaris* e seus compostos químicos majoritários sobre *C. neoformans*.
- ❖ Observar a presença, redução ou ausência de cápsulas em isolados de *C. neoformans*, antes e após contato com os óleos essenciais e seus compostos químicos majoritários.
- ❖ Determinar e comparar a produção das exoenzimas proteinase e fosfolipase em isolados de *C. neoformans*, antes e após contato com os óleos essenciais e seus compostos químicos majoritários.
- ❖ Avaliar *in vitro* a atividade antifúngica da mistura dos compostos químicos majoritários de cada óleo essencial sobre isolados de *C. neoformans* sensíveis aos óleos essenciais totais.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 *C. neoformans*

Foram utilizados 18 isolados biológicos de origem humanas sendo 07 de pacientes com sorologia positiva para o HIV e 11 com sorologia desconhecida para o HIV, 20 isolados de origem ambiental e 02 cepas padrão de *C. neoformans*: ICB 163 D (NIH 163D) e ATCC 90112; cedidas pela Faculdade de Odontologia, Disciplina de Estomatologia, da Universidade de São Paulo (FO-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 da Seção de Micologia do Departamento de Microbiologia do ICB - USP (Anexo 02).

3.1.1 Pesquisa de fatores de virulência

3.1.1.1 Produção de exoenzimas - Proteinase e Fosfolipase

A produção das enzimas (proteinase e fosfolipase) foi avaliada antes e após contato com os óleos essenciais e seus compostos químicos majoritários isoladamente.

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 µm. 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 de degradação 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 foi 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 foi 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 os óleos essenciais e seus compostos químicos majoritários, a pesquisa da produção das exoenzimas foi realizada nas concentrações sub-inibitórias nas cepas padrão *C. neoformas* ICB 163 D e ATCC90112, e em cada isolado testado. Como controle de produção das exoenzimas, isolados sem o contato com os óleos essenciais e seus compostos químicos majoritários foram avaliados simultaneamente. As amostras foram semeadas em pontos equidistantes de cada placa de Petri contendo o meio específico para cada enzima pesquisada. 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:

Pz =1,0 = Ausência de atividade enzimática - (Índice: 01)

Pz \geq 0,64 <1,0 = Atividade enzimática positiva (Índice: 02);

Pz < 0,64 = Atividade fortemente positiva - (Índice: 03)

3.2 Pesquisa de cápsula

A pesquisa da cápsula foi realizada colocando-se um inóculo da levedura a ser testada e uma gota de tinta 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 os óleos essenciais e compostos químicos majoritários isolados, a pesquisa de cápsula foi realizada nas concentrações sub-inibitórias nas cepas padrão *C. neoformans* ICB 163 D e ATCC 90112 e em cada isolado testado. Como controle de presença de cápsula foi avaliado em amostra sem o contato com o óleo essencial e seus compostos químicos majoritários.

3.3 Tensoativos e solvente

Foram avaliados os agentes tensoativos polissorbato Tween 20 (Sigma) e polissorbato Tween 80 (Sigma) e o solvente dimetilsulfóxido DMSO (Tedia-Brazil), como agentes emulsificadores.

Os polissorbatos Tween 20 e Tween 80 são 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.

O solvente dimetilsulfóxido DMSO (Tedia-Brazil) é um solvente orgânico, carreador penetrante para aumentar a absorção, utilizado como anti-inflamatório tópico e analgésico na veterinária, também miscível em água e solventes orgânicos.

Foram pesquisados a partir de 100% em meio RPMI 1640 (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) sobre a cepa padrão de *C. neoformans* ICB 163 D e na 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 3.2.

3.3.1 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.*, 1998). 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. Foram colocados em cada poço 100 uL de RPMI 1640 (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) e 200 µL do agente emulsificador a partir de 100%. A partir do segundo poço foi colocado 100 µL do mesmo agente emulsificador testado, 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

- Controle negativo:

Foi utilizado um controle negativo, para verificar a esterilidade do meio RPMI-1640 (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), um controle negativo de cada agente emulsificador.

-Controle positivo:

Um controle positivo para crescimento da levedura (meio RPMI-1640 + suspensão da levedura).

3.4 Óleos essenciais e compostos químicos majoritários

Nesta pesquisa foram avaliados os óleos essenciais comerciais de *Eugenia caryophyllus* e *Thymus vulgaris* e seus compostos químicos majoritários em isolados biológicos de *C. neoformans* e nas cepas padrão ICB 163 D e ATCC 90112.

Os óleos essenciais foram cedidos pela empresa World's Naturals Fragrances (WNF) e mantidos em frasco âmbar à temperatura ambiente.

3.4.1 Análise cromatográfica: cromatografia gasosa e espectrometria de massa (CG-MS) dos óleos essenciais

A análise cromatográfica dos óleos essenciais de *Eugenia caryophyllus* e *Thymus vulgaris* foi realizada pelo Prof. Dr. Massuo Jorge Kato, Laboratório de Química de Produtos Naturais, Departamento de Química Fundamental, Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

Na Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas (CG-EM), utilizou-se equipamento SHIMADZU 14B/QP5050A (Central Analítica do IQ-USP) com coluna BPX5 (não polar com 5% de polisilfenileno). A temperatura inicial foi de 60 °C, temperatura final de 280 °C e gradiente de 5 °C/min.

A pesquisa com os compostos químicos majoritários dos óleos essenciais de *E. caryophyllus* e *T. vulgaris* identificados na cromatografia foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich®.

3.5 Pesquisa da atividade dos óleos essenciais e compostos químicos majoritários sobre *C. neoformans*

3.5.1 Preparações da suspensão de leveduras

Os isolados de origem humana e ambiental e as cepas padrão de *C. neoformans* ICB 163 D e ATCC 90112, foram cultivados em ágar Sabouraud Dextrose (Difco – USA) e incubados em estufa a 37°C por 48 horas. A suspensão dos isolados e das cepas 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.*, 1998). 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.

3.5.2 Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica dos óleos essenciais e compostos químicos majoritários sobre isolados de *C. neoformans*

Os ensaios foram realizados em microplacas, de fundo chato, com 96 poços. Em cada poço foi colocado uma solução de 100µL de meio RPMI- 1640 (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) acrescido do tensoativo polissorbato Tween 20 (Sigma- Aldrich®), até o 36º poço. No primeiro poço foram colocados 200µL do óleo essencial ou do composto químico majoritário a ser testado. A partir do segundo poço, 100µl do mesmo produto testado 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.

3.6 Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica da mistura dos compostos químicos majoritários de cada óleo essencial sobre isolados de *C. neoformans*

Foi preparada uma suspensão de leveduras de cada um dos 10 isolados sensíveis aos óleos essenciais de *E. caryophyllus* e *T. vulgaris*) e das

cepas padrão de *C. neoformans* ICB 163 D e ATCC 90112, conforme técnica descrita no item 3.5.1 e ensaio da atividade dos compostos químicos majoritários conforme técnica descrita no item 3.5.2. A mistura de compostos químicos majoritários foi preparada conforme concentração desses compostos no óleo essencial.

3.7 Controles

- Controle negativo:

Em uma placa de microdiluição foi utilizado um controle negativo, para observar a esterilidade do meio RPMI -1640 (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), um controle negativo para o emulsificador, um controle negativo para os óleos essenciais e compostos químicos majoritários estudados.

- Controle positivo:

Em placa de microdiluição um controle positivo para cada levedura (meio de cultura + inoculo) testada. A placa de controles também foi selada com Parafilm "M"[®] e incubada em estufa a 37°C por 48 horas.

3.8 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 considerada a menor concentração do composto químico estudado 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) obtidas foram analisados segundo a variação dos valores de CIM para cada composto químicos majoritários 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.

3.9 Avaliação da atividade fungistática e fungicida dos óleos essenciais e dos compostos químicos majoritários

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

A avaliação das atividades fungistática ou fungicida dos óleos essenciais e dos compostos químicos 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 inóculos 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.

3.10 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 (OMS, 2004).

3.11 Descartes dos resíduos

Todos os resíduos gerados das coletas e análises microbiológicas seguiram as normas de descarte estabelecidas pelo plano de gerenciamento de resíduos do Instituto Adolfo Lutz.

3.12 Considerações éticas

Este trabalho seguiu as recomendações da resolução 466/12. Este projeto foi analisado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz (Anexo 1).

4. RESULTADOS

4.1 *Cryptococcus neoformans*

Os 38 isolados deste estudo foram reidentificados como *C. neoformans* e 100% (38/38) apresentaram cápsula.

A tabela 2 mostra o número de isolados de *C. neoformans* estudados nesta pesquisa distribuídos em 18 isolados biológicos de origem humana, 20 isolados biológicos de origem ambiental e 02 cepas padrão (ICB 163-D e ATCC 90112).

Tabela 2. *Cryptococcus neoformans*: número de isolados de amostras biológicas de origem humana e ambiental

<i>C. neoformans</i>	Cepas Padrão: ICB 163-D e ATCC 90112	Isolados HIV+*	Isolados não HIV**	Total de Isolados Biológicos de origem humana	Total de Isolados Biológicos de origem ambiental
Numero de Cepas padrão e isolados	02	07	11	18	20

* pacientes com sorologia positiva para o HIV

** pacientes com sorologia desconhecida para o HIV

4.2 Fatores de virulência

4.2.1 Atividade Enzimática Produção de exoenzimas: Proteinase e Fosfolipase

Na tabela 3 observa-se a produção de proteinase e fosfolipase das cepas padrão de *C. neoformans* ICB 163-D e ATCC 90112.

Tabela 3. Atividade enzimática (Pz): Produção de exoenzimas proteinase e fosfolipase da cepa padrão de *Cryptococcus neoformans* ICB 163 D e ATCC 90112.

Cepas Padrão	Proteinase Pz	Índice	Fosfolipase Pz	Índice
<i>C. neoformans</i> ICB 163 D	0,28	03	0,30	03
<i>C. neoformans</i> ATCC 90112	0,62	03	0,50	03

Atividade enzimática: Pz =1,0 = Ausência de atividade enzimática - (Índice: 01)

Pz ≥ 0,64 <1,0 = Atividade enzimática positiva (Índice: 02);

Pz < 0,64 = Atividade fortemente positiva - (Índice: 03)

Com exceção do isolado P10 B8 (01/38) (ausência de produção de proteinase) todos os outros apresentaram produção de proteinase e fosfolipase fortemente positiva (índice 03) (Tabela 04).

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

Isolados	Proteinase Pz*	Índice	Fosfolipase Pz*	Índice
ICB 78	0,33	03	0,38	03
ICB 87	0,28	03	0,40	03
ICB 89	0,33	03	0,33	03
ICB 105	0,33	03	0,22	03
ICB 107	0,33	03	0,20	03
ICB 108	0,30	03	0,40	03
ICB 127	0,38	03	0,33	03
ICB 154	0,38	03	0,28	03
ICB 155	0,37	03	0,25	03
ICB 160	0,50	03	0,40	03
ICB 164	0,33	03	0,38	03
ICB 167	0,33	03	0,30	03
ICB 168	0,40	03	0,33	03
ICB 179	0,36	03	0,30	03
ICB 172	0,30	03	0,30	03
ICB 183	0,22	03	0,25	03
ICB 189	0,41	03	0,26	03
ICB 283	0,33	03	0,30	03
B 07	0,33	03	0,33	03
B 20	0,33	03	0,33	03
B 64	0,22	03	0,04	03
ICB 165	0,37	03	0,20	03
ICB 175	0,33	03	0,30	03
ICB 176	0,30	03	0,33	03
ICB 182	0,38	03	0,27	03
P9 A5	0,30	03	0,33	03
P9 A7	0,30	03	0,20	03
P9 A10	0,33	03	0,23	03
P17 A9	0,25	03	0,20	03
P3 B5	0,40	03	0,14	03
P6 B4	0,30	03	0,16	03
P9 B11	0,40	03	0,20	03
P10 B8	0,33	03	0,42	03
P10 B20	1,0	01	0,42	03
P17 B5	0,40	03	0,27	03
P3 C2	0,33	03	0,22	03
P9 C5	0,38	03	0,27	03
P10 C5	0,22	03	0,27	03

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
 Em verde *C. neoformans*, isolados de origem ambiental

***Pz: Atividade enzimática:**

Pz =1,0 = Ausência de atividade enzimática - (Índice: 01)
 Pz ≥ 0,64 <1,0 = Atividade enzimática positiva (Índice: 02);
 Pz < 0,64 = Atividade fortemente positiva - (Índice: 03)

4.2.2 Cápsula

A cápsula foi observada nas cepas padrão de *C. neoformans* ICB 163D e ATCC 90112 (Figuras 4 e 5) e em todos os isolados biológicos de origem humana e ambiental de *C. neoformans*.

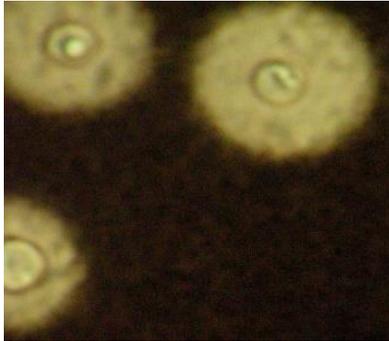


Figura 4: *C. neoformans* ICB 163D.

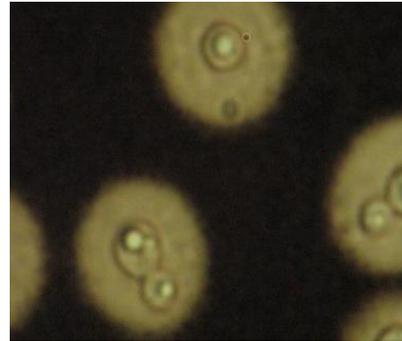


Figura 5: *C. neoformans* ATCC 90112.

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

A tabela 5 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% para o Tween 20 e Tween 80 e 6,25% para o DMSO. Na pesquisa da atividade fungicida e fungistática observou-se atividade fungistática na concentração de 25 a 100% para Tween 20 e Tween 80 e de 6,25% a 100% para o DMSO.

Tabela 5. 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)	FUNGISTÁTICA %(v/v)	FUNGICIDA %(v/v)	12,5%	3,12%-	0,02%
Tween 20	25 **	25 a 100	SA	R	NR	R
Tween 80	25	25 a 100	SA	R	NR	R
DMSO	6,25	6,25 a 100	SA	NR	A	R

*Condições do estudo: Pesquisa da Concentração inibitória mínima CIM em placas de microdiluição e leitura em 48 horas:

Resultado em %

**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 da cepa padrão de *C. neoformans* ICB 163 D com os tensoativos e solvente, nas doses subinibitória encontrando-se os seguintes resultados: 12,5% para o Tween 20 e Tween 80 e 3,12% para o DMSO.

Nos tensoativos Tween 20 e 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 5 e Figuras 6, 7, 8 e 9).

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

A tabela 5 e as figuras 10 A e B a 13 A e B mostram redução de cápsula em relação ao controle para os dois tensoativos e para o solvente com uma coaderência no Tween 20 e alteração da morfologia com aumento do tamanho das células no emulsificador Tween 80 e solvente DMSO em relação ao controle.

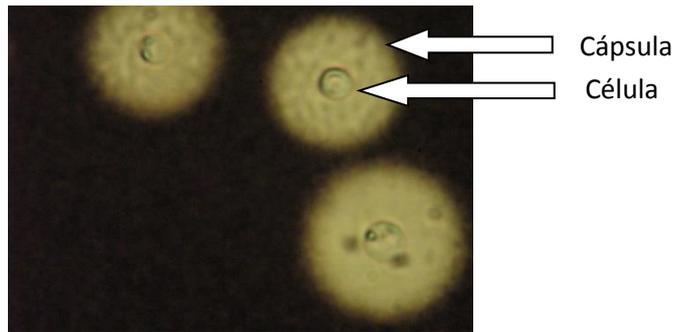


Figura 6. Cepa padrão de *C. neoformans* ICB 163 D – amostra controle – aumento de 400X.

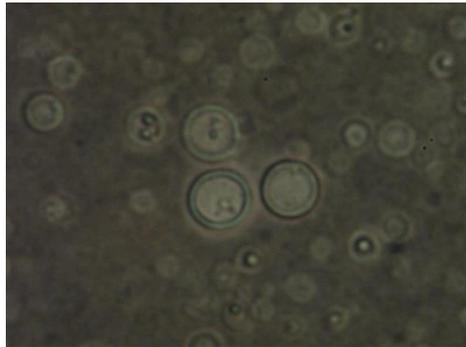


Figura 7. Cepa padrão de *C. neoformans* ICB 163 D após exposição ao Tween 20 a 12,5% - - aumento 400X

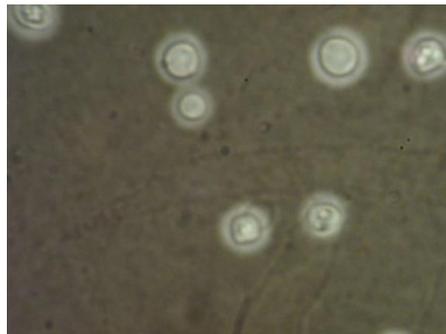


Figura 8. Cepa padrão de *C. neoformans* ICB 163 D após exposição ao Tween 80 a 12,5% – aumento 400X.



Figura 9. Cepa padrão de *C. neoformans* ICB 163 D após exposição ao DMSO a 3,12% - aumento 400X.

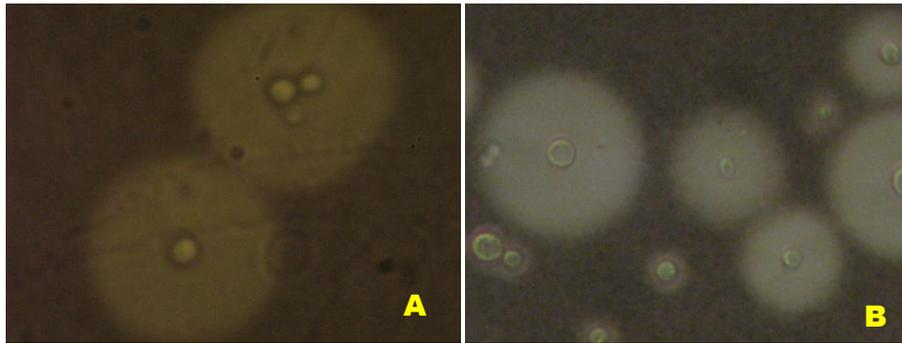


Figura 10 A e B Cepa padrão de *C. neoformans* ICB 163 D amostra Controle - aumento 400X.

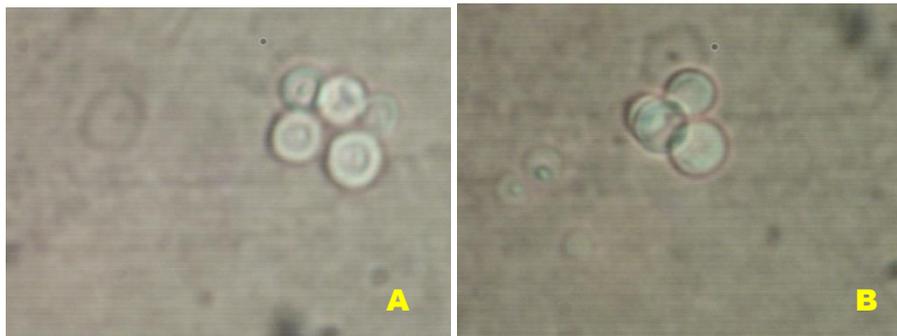


Figura 11 A e B Cepa padrão de *C. neoformans* ICB 163 D – após exposição ao Tween 20 a 0,02% - aumento 400X.

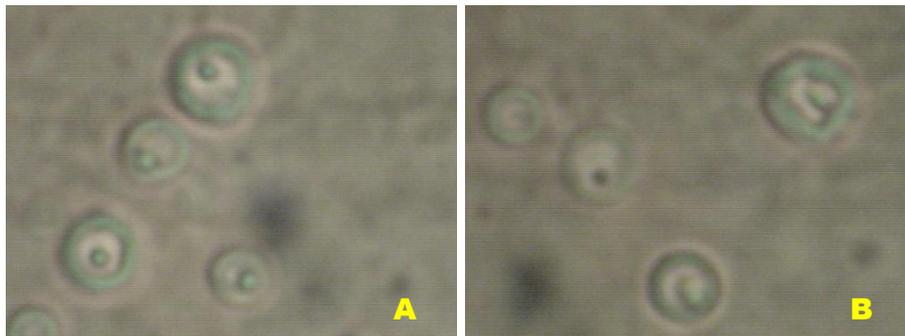


Figura 12 A e B Cepa padrão de *C. neoformans* ICB 163D após exposição Tween 80 a 0,02% aumento 400X.

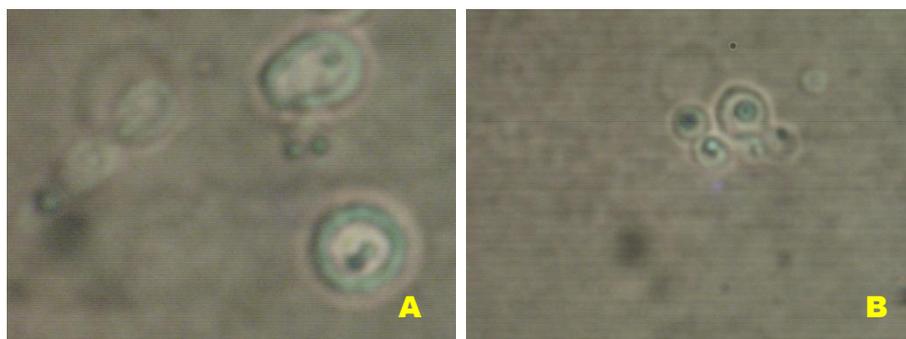


Figura 13 A e B Cepa padrão de *C. neoformans* ICB 163 D - DMSO a 0,02% após exposição, aumento 400X.

4.4 Análise cromatografica dos óleos essenciais *Eugenia caryophyllus* Sprengel e *Thymus vulgaris* Lin.

4.4.1 *Eugenia caryophyllus* Sprengel.

O óleo essencial de *Eugenia caryophyllus* 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. O óleo essencial de *E. caryophyllus* apresentou os seguintes compostos químicos majoritários: eugenol (84,10%), β -cariofileno (12,67%) e os minoritários α -cariofileno (1,51%) e acetato de isoeugenol (1,08%) (Anexo 3).

4.4.2 *Thymus vulgaris* Lin.

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. O óleo essencial de *T. vulgaris* apresentou os seguintes compostos químicos majoritários: timol (62,13%), p-cimeno (14,43%), linalol (8,49%) e carvacrol (5,08%) e os minoritários γ -terpineno (2,55%), canfora (2,37), β -cariofileno (2,15%), terpineol (1,47%) e borneol (1,34%) (Anexo 4).

4.5 Atividade dos óleos essenciais e seus compostos químicos majoritários sobre a cepa padrão de *C. neoformans* ICB 163 D e ATCC 90112

Na tabela 6 e gráficos (01 e 02) observa-se a atividade dos óleos essenciais *E. caryophyllus* e *T. vulgaris* e seus compostos químicos majoritários sobre a cepa padrão de *C. neoformans* ICB 163D. Esta foi sensível ao óleo essencial de *E. caryophyllus* na CIM de 0,04% e CFM de 0,09% e para *T. vulgaris* na CIM de 0,09% e CFM de 0,19%. Para compostos químicos majoritários do óleo essencial de *E. caryophyllus*: eugenol 99% CIM 24,7% e CFM de 49,5%; β -cariofileno 80% CIM 20% e CFM de 40%.

Para os compostos químicos majoritários de *T. vulgaris*, *C. neoformans* ICB 163D foi sensível aos compostos: carvacrol 98% com CIM de 12,25% e CFM de 24,5% e timol 99,5% com CIM de 1,55% e CFM de 3,1% e resistência ao linalol e p-cimeno.

Na pesquisa de cápsula na dose subinibitória observou-se em relação ao controle de redução a ausência da cápsula sob a influência dos óleos essenciais de *E. caryophyllus* e *T. vulgaris* e seus compostos químicos majoritários. Morfologicamente observou-se aumento do tamanho das células da cepa padrão de *C. neoformans* ICB 163-D em relação ao controle. As células tenderam a se agrupar em número de 2, 4 ou mais leveduras (Figuras 14 a 21).

A produção de proteinase e fosfolipase foi inibida frente aos dois óleos essenciais e compostos majoritários para a cepa padrão de *C. neoformans* ICB 163 D.

Tabela 6. Concentração Inibitória Mínima e Concentração Fungicida Mínima dos óleos essenciais de *E. caryophyllus* e *T. vulgaris* e seus compostos químicos majoritários sobre a cepa padrão de *C. neoformans* ICB 163 D.

Óleos Essenciais Compostos Químicos	CONCENTRAÇÕES FUNGISTÁTICA E FUNGICIDA	
	CIM % (v/v)	*CFM% (v/v)
<i>E. caryophyllus</i>	0,04	0,09
Eugenol 99%	24,7	49,5
β-cariofileno 80%	20	40
<i>T. vulgaris</i>	0,09	0,19
Linalol 97%	97	R
P-Cimeno 99%	99	R
Carvacrol 98%	12,25	24,5
Timol 99,5%	1,55	3,1

Condições do estudo: Pesquisa da Concentração inibitória mínima CIM em placas de microdiluição e leitura em 48 horas: resultado em %.

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 (CFM)

**CIM: concentração inibitória mínima

***CFM: concentração fungicida mínima:

v/v: volume por volume em porcentagem

R: Resistente – presença de crescimento a 100%

Legenda:

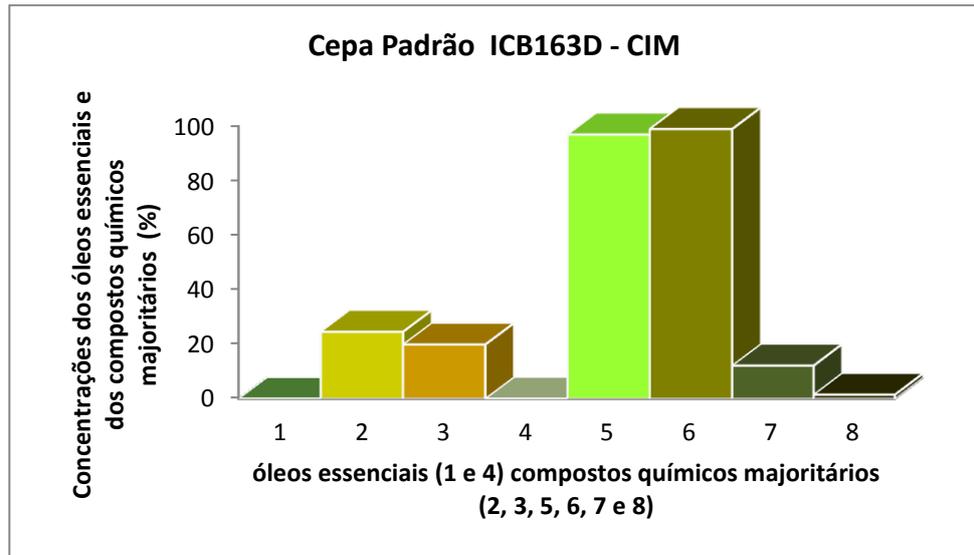
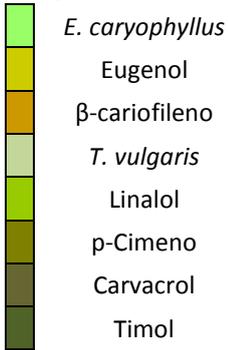


Gráfico 01. Concentrações inibitórias mínimas (CIM) dos óleos essenciais de *E. caryophyllus* e *T. vulgaris* e seus compostos químicos majoritários sobre a cepa padrão de *C. neoformans* ICB 163 D.

Legenda:

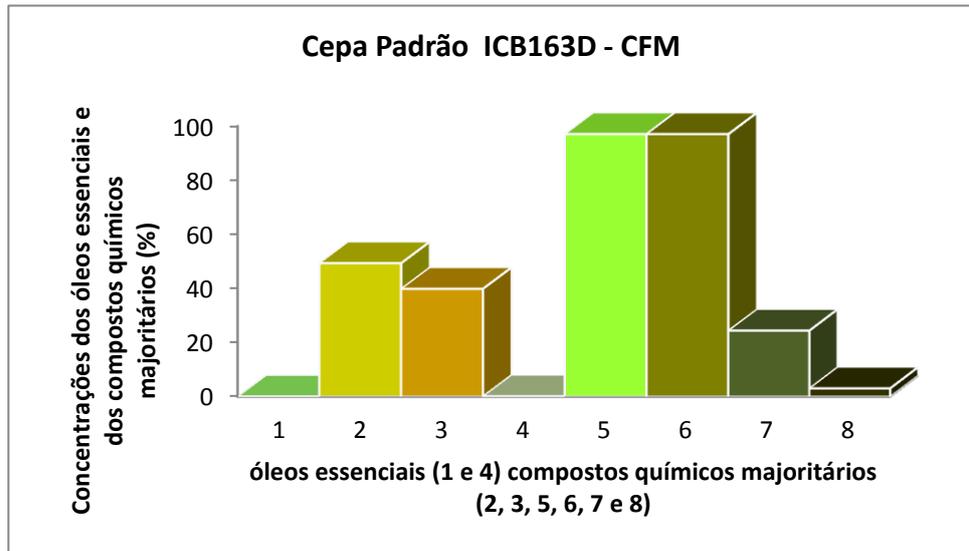
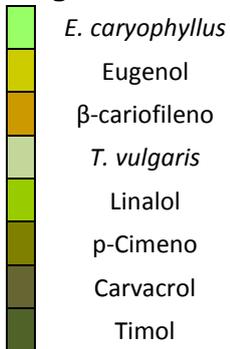


Gráfico 02. Concentrações Fungicidas Mínimas (CFM) dos óleos essenciais de *E. caryophyllus* e *T. vulgaris* e seus compostos químicos majoritários sobre *C. neoformans* ICB 163D.

Exposição da cepa padrão de *C. neoformans* ICB 163D aos óleos essenciais de *E. caryophyllus* e *T. vulgaris* e seus compostos químicos majoritários



Figura 14: *C. neoformans* ICB 163D – após exposição ao óleo essencial de *E. caryophyllus* (CIM: 0,04%) – aumento de 400X.

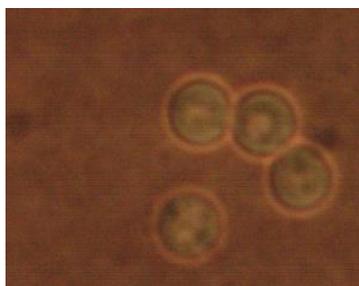


Figura 15: *C. neoformans* ICB 163D – após exposição ao óleo essencial de *T. vulgaris* (CIM: 0,09%) – aumento de 400X.

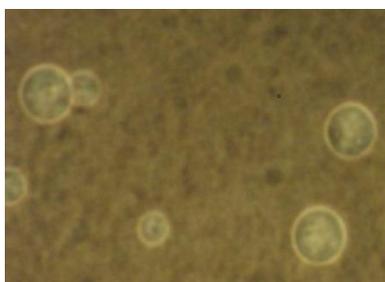


Figura 16: *C. neoformans* ICB 163D – após exposição ao composto químico Eugenol 99% (CIM: 24,7%) - aumento de 400X.



Figura 17: *C. neoformans* ICB 163D – após exposição ao composto químico β -cariofileno 80% (CIM: 20%) – aumento de 400X.

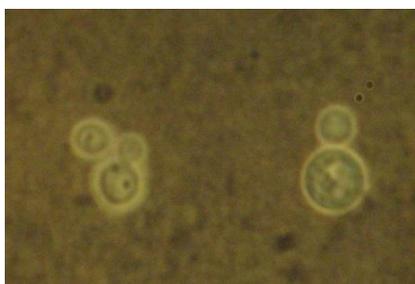


Figura 18: *C. neoformans* ICB 163D – após exposição ao composto químico Linalol 97% (CIM: 100%) - aumento de 400X.

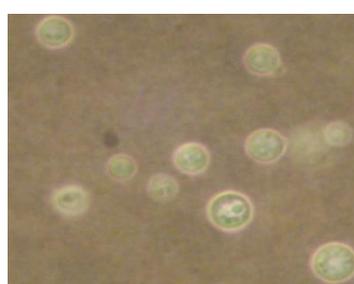


Figura 19: *C. neoformans* ICB 163D – após exposição ao composto químico P-cimeno (CIM: 100%) - aumento de 400X.



Figura 20: *C. neoformans* ICB 163D – após exposição ao composto químico Carvacrol (CIM: 12,5% – aumento de 400X.

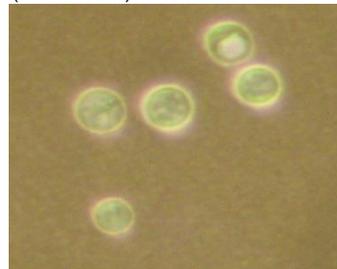


Figura 21: *C. neoformans* ICB 163D – após exposição ao composto químico Timol (CIM:1,56%) - aumento de 400X.

Na tabela 7 e gráficos (03 e 04) observa-se a atividade dos óleos essenciais *E. caryophyllus* e *T. vulgaris* e seus compostos químicos majoritários sobre a cepa padrão de *C. neoformans*. ATCC 90112. Esta foi sensível ao óleo essencial de *E. caryophyllus* na CIM de 0,00002% e CFM de 0,00004% e para *T. vulgaris* na CIM de 0,04% e CFM de 0,09%, bem como para compostos químicos majoritários do óleo essencial de *E. caryophyllus*: eugenol 99% CIM de 12,37% e CFM de 24,7%; β -cariofileno 80% CIM 10% e CFM de 20%.

Para os compostos químicos majoritários de *T. vulgaris*, *C. neoformans* ATCC 90112 foi sensível aos compostos: carvacrol 98% com CIM de 12,25% e CFM de 24,8% e timol 99,5% com CIM de 12,43% e CFM de 24,5% e resistente ao linalol e p-cimeno.

Na pesquisa de cápsula na dose subinibitória observou-se em relação ao controle redução ou ausência de cápsula sob a influência dos óleos essenciais de *E. caryophyllus* e *T. vulgaris* e seus compostos químicos majoritários. Morfologicamente observa-se aumento o tamanho da célula da cepa padrão de *C. neoformans* ATCC 90112 em relação ao controle. As células tenderam a se agrupar em número de 2, 4 ou mais leveduras (Figuras 22 a 29).

A produção de proteinase e fosfolipase foi inibida frente aos dois óleos essenciais e compostos majoritários para a cepa padrão de *C. neoformans* ATCC 90112.

Tabela 7. Concentração Inibitória Mínima e Concentração Fungicida Mínima dos óleos essenciais de *E. caryophyllus* e *T. vulgaris* e seus compostos químicos majoritários sobre a cepa padrão de *C. neoformans* ATCC 90112.

Óleos Essenciais Compostos Químicos	CONCENTRAÇÕES FUNGISTÁTICA E FUNGICIDA	
	CIM % (v/v)	*CFM% (v/v)
<i>E. caryophyllus</i>	0,00002	0,00004
Eugenol 99%	12,37	24,7
β -cariofileno 80%	10	20
<i>T. vulgaris</i>	0,04	0,09
Linalol 97%	97	R
P-Cimeno 99%	99	R
Carvacrol 98%	12,25	24,5
Timol 99,5%	12,43	24,8

Condições do estudo: Pesquisa da Concentração inibitória mínima CIM em placas de microdiluição e leitura em 48 horas: resultado em %.

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 (CFM)

**CIM: concentração inibitória mínima

***CFM: concentração fungicida mínima:

v/v: volume por volume em porcentagem

R: Resistente – presença de crescimento a 100%

Legenda:

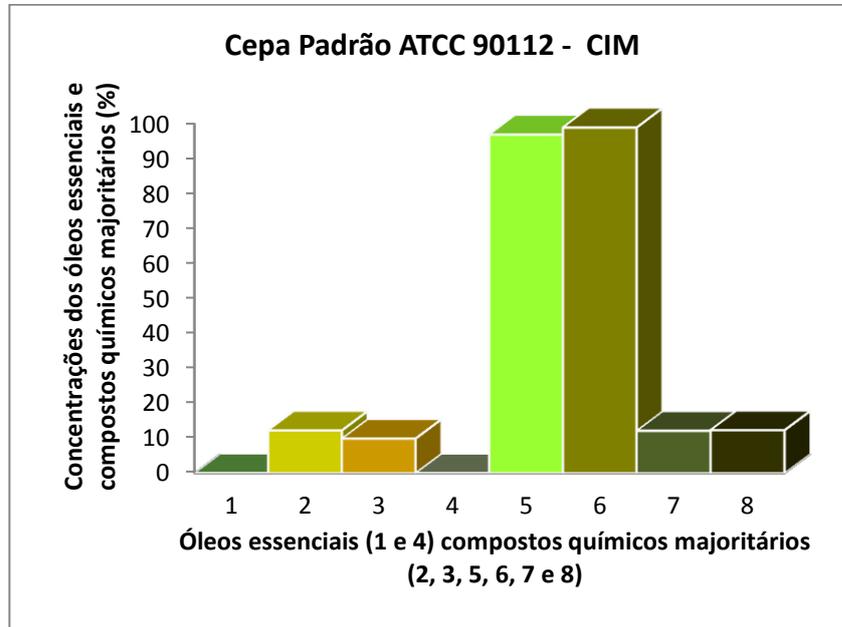
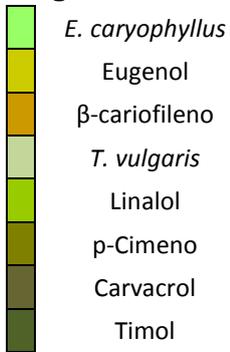


Gráfico 03. Concentrações inibitórias mínimas (CIM) dos óleos essenciais de *E. caryophyllus* e *T. vulgaris* e seus compostos químicos majoritários sobre *C. neoformans* ATCC 90112.

Legenda:

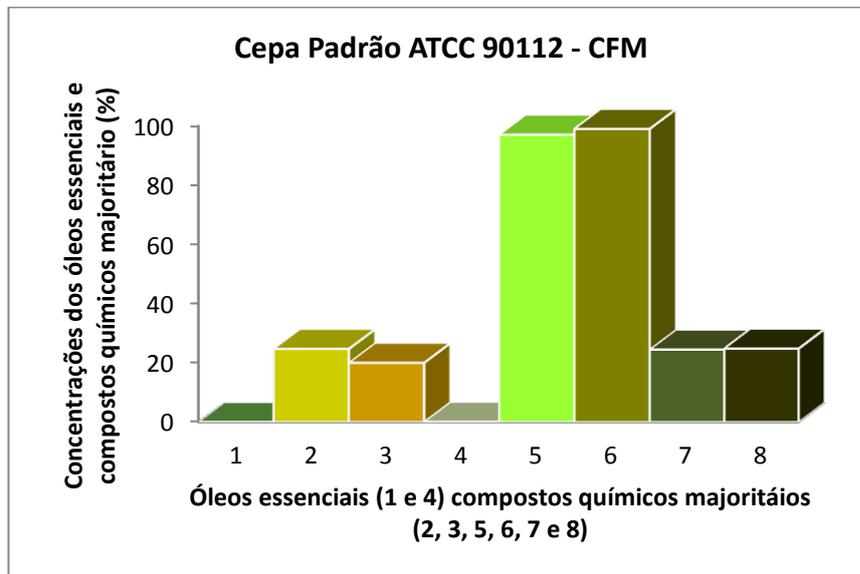
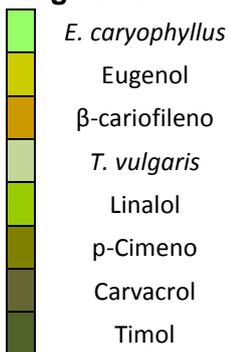


Gráfico 04. Concentrações Fungicidas Mínimas (CFM) dos óleos essenciais de *E. caryophyllus* e *T. vulgaris* e seus compostos químicos majoritários sobre *C. neoformans* ATCC 90112.

Exposição da cepa padrão de *C. neoformans* ATCC 90112 aos óleos Essenciais de *E. caryophyllus* e *T. vulgaris* e seus compostos químicos majoritários.

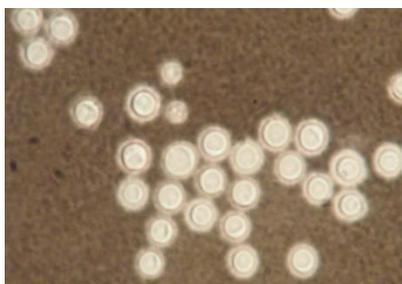


Figura 22: *C. neoformans* ATCC 90112 – após exposição ao óleo essencial de *E. caryophyllus* (CIM: 0,00002%) – aumento de 400X



Figura 23: *C. neoformans* ATCC 90112 – após exposição ao óleo essencial de *T. vulgaris* (CIM:0,04%) - aumento de 400X.



Figura 24: *C. neoformans* ATCC 90112– após exposição ao composto químico Eugenol 99% (CIM:12,37%) – aumento de 400X.



Figura 25: *C. neoformans* ATCC 90112– após exposição ao composto químico β -cariofileno 80% (CIM: 10%) – aumento de 400X.



Figura 26: *C. neoformans* ATCC 90112– após exposição ao composto químico Linalol 97%(CIM 97%) – aumento de 400X.

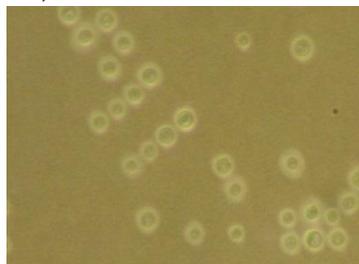


Figura 27: *C. neoformans* ATCC 90112– após exposição ao composto químico P-cimeno 99% (CIM: 99%) – aumento de 400X.



Figura 28: *C. neoformans* ATCC 90112– após exposição ao composto químico Carvacrol 98% (CIM:12,25%) – aumento de 400X.



Figura 29: *C. neoformans* ATCC 90112– após exposição ao composto químico Timol (CIM:12,43%) – aumento de 400X.

4.6 Atividade do óleo essencial de *E. caryophyllus* Sprengel e seus compostos químicos majoritários sobre *C. neoformans*.

4.6.1 Óleo essencial de *E. caryophyllus* Sprengel sobre isolados biológicos de *C. neoformans* de origem humana e ambiental.

O isolado ICB 107 de pacientes com sorologia desconhecida para o HIV (01/11) e isolado P10 B20 de origem ambiental (01/20) mostraram sensibilidade ao óleo essencial de *E. caryophyllus* até a concentração 0,000000024%. O isolado ICB 108 de pacientes com sorologia desconhecida para o HIV (01/11) foi sensível ao óleo essencial de *E. caryophyllus* na concentração de 0,00076 % (Tabela 08) (Gráficos 5 e 6).

A média e o desvio padrão da CIM do óleo essencial de *E. caryophyllus* para os isolados de pacientes HIV positivo foi $0,058 \pm 0,06\%$; para os isolados de pacientes com sorologia desconhecida para o HIV foi $0,24 \pm 0,46\%$ e para os isolados biológicos de origem ambiental foi $0,4 \pm 0,49\%$. (Tabela 09).

A média e desvio padrão da CFM do óleo essencial de *E. caryophyllus* para os isolados de pacientes HIV positivo foi $0,12 \pm 0,13\%$; para os isolados de pacientes com sorologia desconhecida para o HIV foi $0,48 \pm 0,9\%$; isolados biológicos de origem ambiental foi $0,8 \pm 0,99\%$. (Tabela 09).

Na pesquisa de cápsula na dose subinibitória observou-se em relação ao controle redução ou ausência desta estrutura nos isolados biológicos de origem humana e ambiental sob a influência do óleo de *E. caryophyllus*. Morfologicamente ocorreram alterações quanto ao tamanho da célula. As células tenderam a se agrupar em número de 2, 4 ou mais leveduras.

A produção de proteinase e fosfolipase foram inibidas frente ao óleo de *E. caryophyllus* para todos os isolados biológicos de origem humana e ambiental.

Os valores de CIM 50 e CIM 90 para óleo de *E. caryophyllus* nos diferentes isolados são 0,09% e 0,78% respectivamente. E as CFM 50 0,19% e CFM 90 1,56%. (Tabela 24).

Tabela 08. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) do óleo essencial de *E. caryophyllus* sobre isolados de *C. neoformans* de origem humana e ambiental.

ISOLADOS BIOLÓGICOS	CONCENTRAÇÕES FUNGISTÁTICA E FUNGICIDA	
	CIM % (v/v)	*CFM % (v/v)
ICB 78	0,003	0,00061
ICB 87	0,39	0,78
ICB 89	0,00076	0,0015
ICB 105	0,09	0,19
ICB 107	S	S
ICB 108	0,00038	0,00076
ICB 127	0,39	0,78
ICB 154	0,09	0,19
ICB 155	1,56	3,12
ICB 160	0,09	0,19
ICB 164	0,04	0,09
ICB 167	0,04	0,09
ICB 168	0,0061	0,012
ICB 169	0,04	0,09
ICB 172	0,19	0,39
ICB 183	0,012	0,024
ICB 189	0,04	0,09
ICB 283	0,09	0,19
B 07	0,04	0,09
B 20	0,19	0,39
B 64	0,024	0,04
ICB 165	0,09	0,19
ICB 175	0,09	0,19
ICB 176	0,09	0,19
ICB 182	0,78	1,56
P9 A5	0,78	1,56
P9 A7	1,56	3,12
P9 A10	0,09	0,19
P17 A9	0,09	0,19
P3 B5	0,78	1,56
P6 B4	0,39	0,78
P9 B11	0,024	0,04
P10 B8	0,78	1,56
P10 B20	S	S
P17 B5	0,09	0,19
P3 C2	0,09	0,19
P9 C5	0,78	1,56
P10 C5	1,56	3,12

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

Em verde *C. neoformans*, isolados de origem ambiental.

Condições do estudo: Pesquisa da Concentração inibitória mínima CIM em placas de microdiluição e leitura em 48 horas: resultado em %.

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 (CFM)

**CIM: concentração inibitória mínima

***CFM: concentração fungicida mínima:

v/v: volume por volume em porcentagem - S: Sensível – ausência de crescimento até 0,000000024%

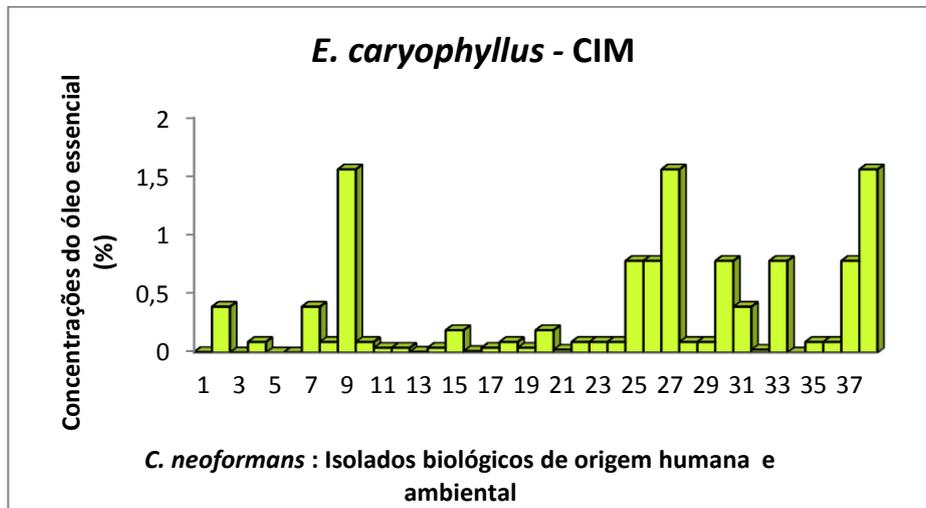


Gráfico 5. Concentrações inibitórias mínimas (CIM) do óleo essencial de *E. caryophyllus* sobre isolados de *C. neoformans* de origem humana e ambiental.

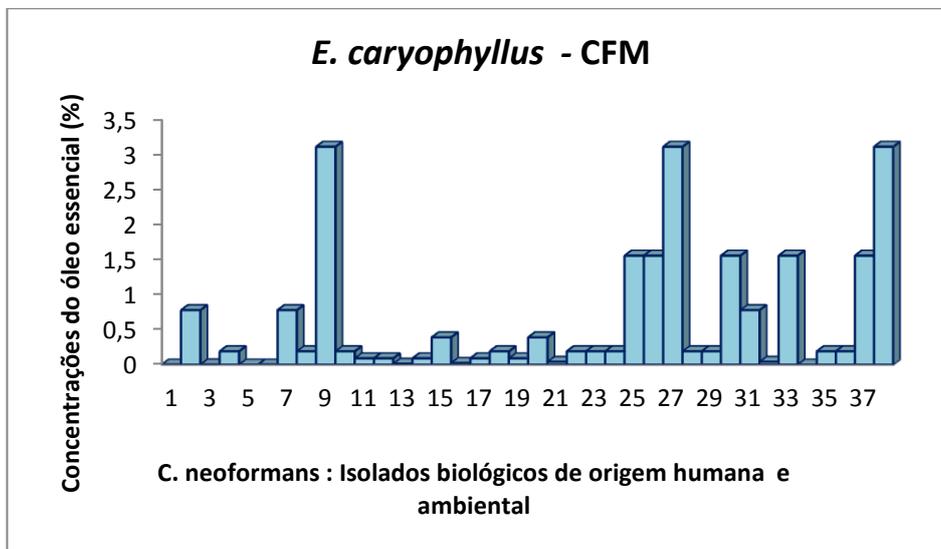


Gráfico 6. Concentrações fungicidas mínimas (CFM) do óleo essencial de *E. caryophyllus* sobre isolados de *C. neoformans* de origem humana e ambiental.

10Tabela 9: Média, desvio padrão, mediana, máxima e mínima do óleo essencial de *Eugenia caryophyllus* sobre isolados biológicos de *C. neoformans*

VARIAVEL - CIM	Isolados HIV+	Isolados não HIV	Isolados biológicos de origem ambiental
<i>E. caryophyllus</i>	N=7	N=11	N=20
$\mu \pm dp^{***}$	0,058 \pm 0,06*	0,24 \pm 0,46*	0,4 \pm 0,49*
Mediana	0,04	0,09	0,09
Min.– Max.****	0,0007 – 0,19	0 - 1,56	0 – 1,56

VARIAVEL - CFM	Isolados HIV+	Isolados não HIV	Isolados biológicos de origem ambiental
<i>E. caryophyllus</i>	N=7	N=11	N=20
$\mu \pm dp^{***}$	0,12 \pm 0,13**	0,48 \pm 0,9**	0,8 \pm 0,99**
Mediana	0,09	0,19	0,19
Min.– Max.****	0,0015 – 0,39	0 - 3,12	0 – 3,12

*Condições do estudo: Pesquisa da concentração inibitória mínima (CIM) em placas de microdiluição e leitura em 48 horas: resultado em porcentagem (%)

**Concentração fungicida mínima (CFM), pesquisa da atividade fungicida em Ágar Sabouraud dextrose, leitura em 48 horas: ausência de crescimento: resultado em porcentagem (%).

*** $\mu \pm dp$ – Média e desvio padrão

****Min. – Mínima e Max. Máxima.

4.6.2 Atividade do composto químico majoritário eugenol do óleo essencial de *E. caryophyllus* Sprengel sobre *C. neoformans* - isolados biológicos de origem humana e ambiental.

Os isolados ICB 87, ICB127, ICB 154, ICB 155 e ICB 160, respectivamente de pacientes com sorologia desconhecida para o HIV (05/11), isolado ICB 172, de paciente com sorologia positiva para o HIV (01/07) e isolados P9 A5, P17 A9, P6 B4 e P10 B20, de origem ambiental (04/20) foram resistentes ao composto eugenol na concentração 99%. Os isolados ICB 179, de paciente com sorologia positiva para o HIV (01/07) e isolado ICB189 de paciente com sorologia desconhecida para o HIV (01/11) foram sensíveis ao eugenol na concentração de 12,37%. O isolado P3B5 de origem ambiental (01/20) foi sensível na concentração de 0,77%. O isolado ICB 176 de origem ambiental (01/20) foi sensível a este composto até a concentração de 0,0000000024% (Tabelas 10) (Gráficos 7 e 8).

A média e o desvio padrão da CIM do composto químico majoritário eugenol 99% para os isolados de pacientes HIV foi 24,7 \pm 33,3%; isolados de pacientes com sorologia desconhecida para o HIV 56,2 \pm 41,1% e isolados

biológicos de origem ambiental $24,1 \pm 22,8\%$. A média e desvio padrão da CFM do composto químico majoritário eugenol 99% para os isolados de pacientes HIV positivo foi $35,33 \pm 30,6\%$; isolados de pacientes com sorologia desconhecida para o HIV $67,49 \pm 31,49\%$ e isolados biológicos de origem ambiental $42,87 \pm 31,18\%$. (Tabela 11).

Na pesquisa de cápsula na dose subinibitória observou-se em relação ao controle redução ou ausência desta estrutura nos isolados biológicos de origem humana e ambiental sob a influência do eugenol, composto majoritário do óleo de *E. caryophyllus*. Morfologicamente ocorreram alterações quanto ao tamanho da célula e estas tenderam a se agrupar em número de 2, 4 ou mais leveduras.

A produção de proteinase e fosfolipase foram inibidas frente ao eugenol para todos os isolados biológicos.

Os valores de CIM 50 e CIM 90 para o composto químico eugenol 99% nos diferentes isolados foram de 12,37% e 99% respectivamente. A CFM50 e CFM90 foram de 24,7% e 99% respectivamente (Tabela 24).

Tabela 10. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) do composto químico majoritário eugenol 99% do óleo essencial de *E. caryophyllus* Sprengel sobre isolados de *C. neoformans* de origem humana e ambiental.

ISOLADOS BIOLÓGICOS	CONCENTRAÇÕES FUNGISTÁTICA E FUNGICIDA	
	CIM% (v/v)	*CFM% (v/v)
ICB 78	24,7	49,5
ICB 87	99	R
ICB 89	12,37	24,7
ICB 105	24,7	49,5
ICB 107	24,7	49,5
ICB 108	24,7	49,5
ICB 127	99	R
ICB 154	99	R
ICB 155	99	R
ICB 160	99	R
ICB 164	12,37	24,7
ICB 167	12,37	24,7
ICB 168	12,37	24,7
ICB 179	6,18	12,37
ICB 172	99	R
ICB 183	12,37	24,7
ICB 189	6,18	12,37
ICB 283	24,7	49,5
B 07	24,7	49,5
B 20	12,37	24,7
B 64	12,37	24,7
ICB 165	12,37	24,7
ICB 175	12,37	24,7
ICB 176	S	S
ICB 182	24,7	49,5
P9 A5	49,5	R
P9 A7	12,37	24,7
P9 A10	12,37	24,7
P17 A9	49,5	R
P3 B5	0,38	0,77
P6 B4	49,5	R
P9 B11	24,7	49,5
P10 B8	12,37	24,7
P10 B20	90	R
P17 B5	12,37	24,7
P3 C2	12,37	24,7
P9 C5	24,7	49,5
P10 C5	24,7	49,5

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

Em verde *C. neoformans*, isolados de origem ambiental.

Condições do estudo: Pesquisa da Concentração inibitória mínima CIM em placas de microdiluição e leitura em 48 horas: resultado em %.

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 (CFM)

**CIM: concentração inibitória mínima

***CFM: concentração fungicida mínima:

v/v: volume por volume em porcentagem

R: Resistente – presença de crescimento a 99%.
 S: Sensível – ausência de crescimento até 0,0000000024%

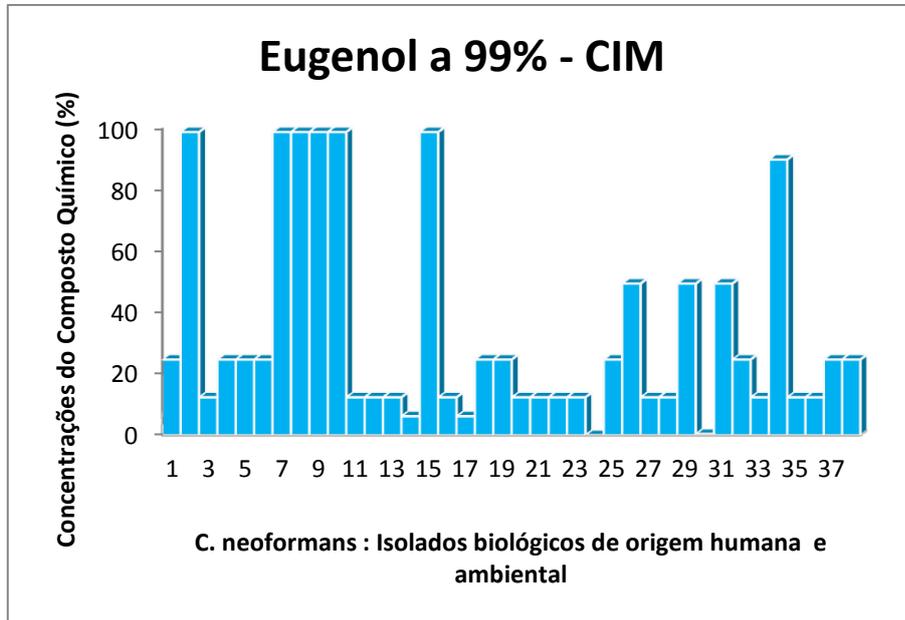


Gráfico 7. Concentrações inibitórias mínimas (CIM) do composto químico Eugenol a 99% sobre isolados de *C. neoformans* de origem humana e ambiental.

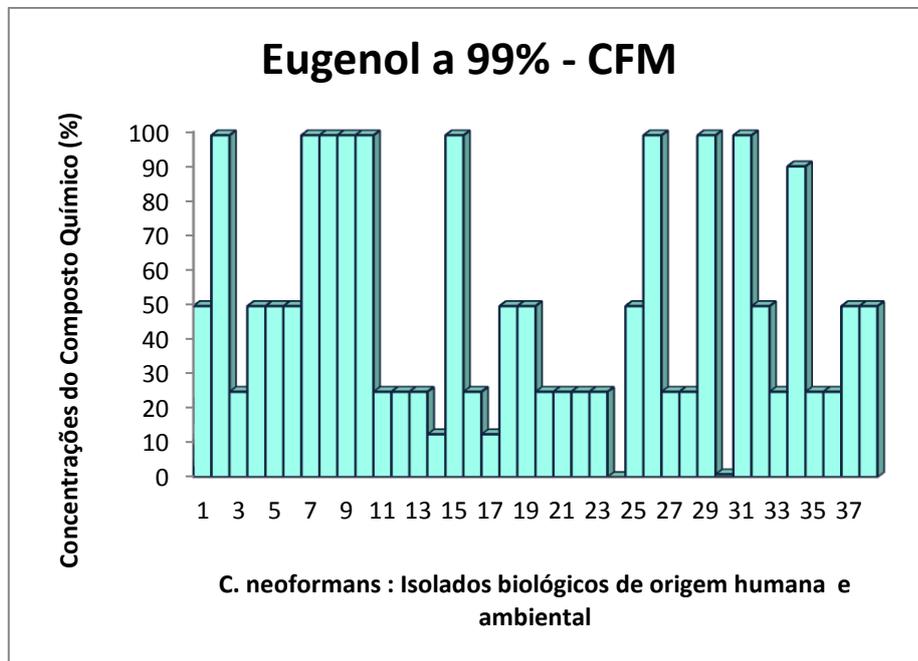


Gráfico 8. Concentrações fungicidas mínimas (CFM) do composto químico Eugenol a 99% sobre isolados de *C. neoformans* de origem humana e ambiental.

Tabela 11: Média, desvio padrão, mediana, máxima e mínima do composto químico majoritário Eugenol 99% de *Eugenia caryophyllus* sobre isolados biológicos de *C. neoformans*

VARIAVEL - CIM	Isolados HIV+	Isolados não HIV	Isolados biológicos de origem ambiental
Eugenol 99%	N=7	N=11	N=20
$\mu \pm dp^{***}$	24,7 \pm 33,3*	56,2 \pm 41,1	24,1 \pm 22,8
Mediana	12,32	24,7	12,37
Min.– Max.****	6,18 – 99	12,37 - 99	0 – 99
VARIAVEL - CFM	Isolados HIV+	Isolados não HIV	Isolados biológicos de origem ambiental
Eugenol 99%	N=7	N=11	N=20
$\mu \pm dp^{***}$	35,33 \pm 30,6**	67,49 \pm 31,49	42,87 \pm 31,18
Mediana	24,7	49,5	24,7
Min.– Max.****	12,37 – 99	24,7- 99	0 – 99

*Condições do estudo: Pesquisa da concentração inibitória mínima (CIM) em placas de microdiluição e leitura em 48 horas: resultado em porcentagem (%)

**Concentração fungicida mínima (CFM), pesquisa da atividade fungicida em Ágar Sabouraud dextrose, leitura em 48 horas: ausência de crescimento: resultado em porcentagem (%).

*** $\mu \pm dp$ – Média e desvio padrão

****Min. – Mínima e Max. Máxima.

4.6.3 Atividade do composto químico majoritário β -cariofileno do óleo essencial de *E. caryophyllus* Sprengel sobre *C. neoformans* - Isolados biológicos de origem humana e ambiental.

Os isolados de identificação ICB 78, ICB 87, ICB 105, ICB 127, ICB 154, ICB 155 e ICB 160 de pacientes com sorologia desconhecida para o HIV (06/11), isolado ICB 172, de paciente com sorologia positiva para o HIV (1/07) e P10B20 de origem ambiental (01/20) foram resistentes ao β -cariofileno na concentração de 80%. Os isolados ICB 179 e ICB 189, de paciente com sorologia positiva para o HIV (02/07) e isolado ICB 183 de paciente com sorologia desconhecida para o HIV (01/11) foram sensíveis ao β -cariofileno na concentração de 10%. O isolado P3B5 de origem ambiental (01/20) foi sensível na concentração de 0,63% e o isolado ICB 176 de origem ambiental (01/20) foi sensível composto químico β -cariofileno até a concentração de 0,000000024% (Tabelas 12) (Gráficos 9 e 12).

A média e o desvio padrão da CIM do composto químico majoritário β -cariofileno 80% para os isolados de pacientes HIV foi $24 \pm 27,4\%$; isolados de pacientes com sorologia desconhecida para o HIV $56 \pm 33,67\%$ e isolados biológicos de origem ambiental $20 \pm 18,47\%$. A média e desvio padrão da CFM do composto químico majoritário β -cariofileno 80% para os isolados de pacientes HIV positivo foi $37,14 \pm 30,93\%$; isolados de pacientes com sorologia desconhecida para o HIV $60,9 \pm 27,73\%$ e isolados biológicos de origem ambiental $37,03 \pm 27,69\%$. (Tabela 13).

Na pesquisa de cápsula na dose subinibitória observou-se em relação ao controle redução ou ausência desta estrutura nos isolados biológicos de origem humana e ambiental sob a influência do β -cariofileno, composto majoritário do óleo de *E. caryophyllus*. Morfologicamente ocorreram alterações quanto ao tamanho da célula e estas tenderam a se agrupar em número de 2, 4 ou mais leveduras.

A produção de proteinase e fosfolipase foram inibidas frente ao β -cariofileno para todos os isolados biológicos.

Os valores de CIM 50 e CIM 90 para o composto químico β -cariofileno 80% nos diferentes isolados foram de 20% e 80% respectivamente. A CFM50 e CFM90 foram de 40% e 80% respectivamente (Tabela 24).

Tabela 12. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) do composto químico majoritário β -cariofileno 80% do óleo essencial de *E. caryophyllus* Sprengel sobre isolados de *C. neoformans* de origem humana e ambiental.

ISOLADOS BIOLÓGICOS	CONCENTRAÇÕES FUNGISTÁTICA E FUNGICIDA	
	CIM% (v/v)	*CFM% (v/v)
ICB 78	80	R
ICB 87	80	R
ICB 89	40	80
ICB 105	80	R
ICB 107	20	40
ICB 108	20	40
ICB 127	80	R
ICB 154	80	R
ICB 155	80	R
ICB 160	80	R
ICB 164	10	20
ICB 167	10	20
ICB 168	10	20
ICB 179	5	10
ICB 172	80	R
ICB 183	5	10
ICB 189	5	10
ICB 283	20	40
B 07	20	40
B 20	10	20
B 64	10	20
ICB 165	10	20
ICB 175	10	20
ICB 176	S	S
ICB 182	20	40
P9 A5	40	80
P9 A7	10	20
P9 A10	10	20
P17 A9	40	80
P3 B5	0,31	0,63
P6 B4	40	80
P9 B11	20	80
P10 B8	10	20
P10 B20	80	R
P17 B5	10	20
P3 C2	10	20
P9 C5	20	40
P10 C5	20	40

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

Em verde *C. neoformans*, isolados de origem ambiental.

Condições do estudo: Pesquisa da Concentração inibitória mínima CIM em placas de microdiluição e leitura em 48 horas: resultado em %.

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 (CFM)

**CIM: concentração inibitória mínima

***CFM: concentração fungicida mínima:

v/v: volume por volume em porcentagem - R: Resistente – presença de crescimento a 80%. - S: Sensível – ausência de crescimento até 0,0000000024%

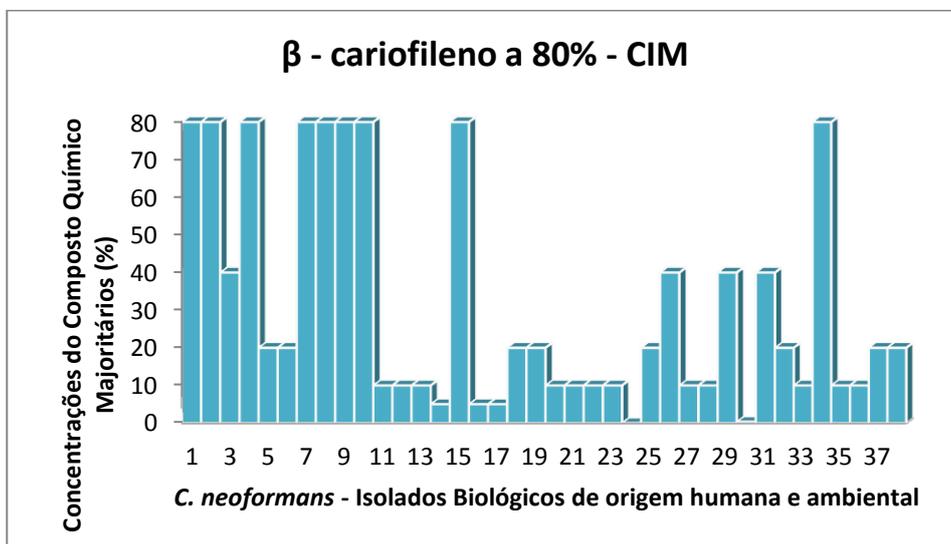


Gráfico 9. Concentrações inibitórias mínimas (CIM) do composto químico β-cariofileno a 80% sobre isolados de *C. neoformans* de origem humana e ambiental.

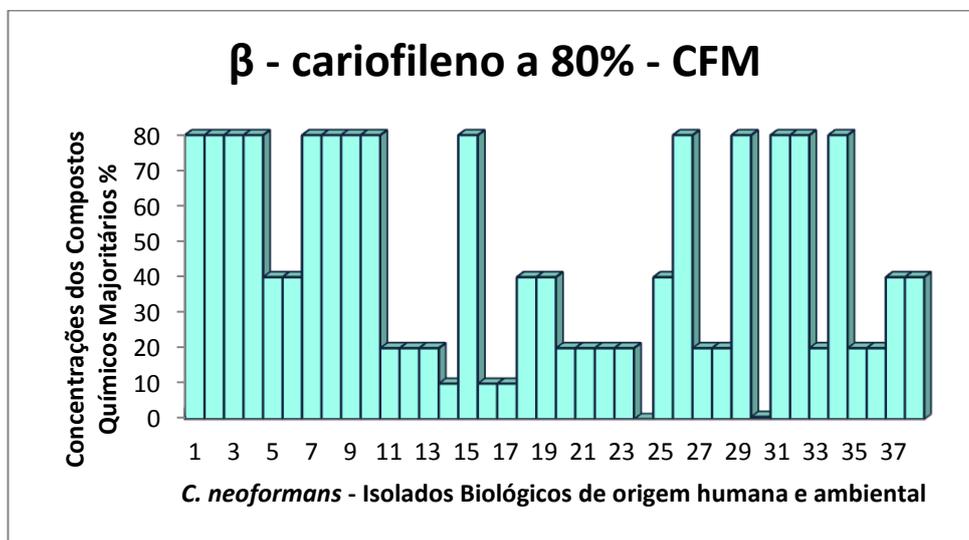


Gráfico 10. Concentrações fungicidas mínimas (CFM) do composto químico β-cariofileno a 80% sobre isolados de *C. neoformans* de origem humana e ambiental

Tabela 13: Média, desvio padrão, mediana, máxima e mínima do composto químico majoritário β -cariofileno 80% de *Eugenia caryophyllus* sobre isolados biológicos de *C. neoformans*.

VARIAVEL - CIM	Isolados HIV+	Isolados não HIV	Isolados biológicos de origem ambiental
β-cariofileno 80%	N=7**	N=11***	N=20
$\mu \pm dp$ ****	24 \pm 27,4*	56 \pm 33,67	20 \pm 18,47
Mediana	10	80	10
Min.– Max.****	5 – 80	0 - 80	0 – 80

VARIAVEL - CFM	Isolados HIV+	Isolados não HIV	Isolados biológicos de origem ambiental
β-cariofileno 80%	N=7**	N=11***	N=20
$\mu \pm dp$ ****	37,14 \pm 30,93*	60,9 \pm 27,73	37,03 \pm 27,69
Mediana	20	80	20
Min.– Max.****	10 – 80	10– 80	0 – 80

*Condições do estudo: Pesquisa da concentração inibitória mínima (CIM) em placas de microdiluição e leitura em 48 horas: resultado em porcentagem (%)

**Concentração fungicida mínima (CFM), pesquisa da atividade fungicida em Ágar Sabouraud dextrose, leitura em 48 horas: ausência de crescimento: resultado em porcentagem (%).

*** $\mu \pm dp$ – Média e desvio padrão

****Min. – Mínima e Max. Máxima.

4.7 Atividade do óleo essencial de *T. vulgaris* Lin. e seus compostos químicos majoritários sobre *C. neoformans*

4.7.1 Óleo essencial de *T. vulgaris* Lin sobre isolados biológicos de *C. neoformans* de origem humana e ambiental

Os isolados ICB 155, ICB 160 de pacientes com sorologia desconhecida para o HIV (02/11) e isolados P17A9 e P10B20 de origem ambiental (02/20) foram sensíveis ao óleo essencial de *T. vulgaris* na concentração de 0,003%. O isolado ICB 107 de pacientes com sorologia desconhecida para o HIV (01/11) foi sensível ao óleo essencial de *T. vulgaris* até a concentração de 0,000000024% (Tabelas 14) (Gráficos 11 e 12). Não houve isolado resistente a este óleo essencial.

A média e o desvio padrão da CIM do óleo essencial de *T. vulgaris* para os isolados de pacientes HIV foi 0,38 \pm 0,58%; isolados de pacientes com

sorologia desconhecida para o HIV $0,06 \pm 0,11\%$ e isolados biológicos de origem ambiental $0,39 \pm 1,38\%$. A média e desvio padrão da CFM do óleo essencial de *T. vulgaris* para os isolados de pacientes HIV positivo foi $0,78 \pm 1,16\%$; isolados de pacientes com sorologia desconhecida para o HIV $0,13 \pm 0,22\%$ e isolados biológicos de origem ambiental $0,78 \pm 2,76\%$. (Tabela 15).

Na pesquisa de cápsula na dose subinibitória observou-se em relação ao controle redução ou ausência desta estrutura nos isolados biológicos de origem humana e ambiental sob a influência do óleo essencial de *T. vulgaris*. Morfológicamente ocorreram alterações quanto ao tamanho da célula e estas tenderam a se agrupar em número de 2, 4 ou mais leveduras.

A produção de proteinase e fosfolipase foram inibidas frente ao óleo essencial de *T. vulgaris* para todos os isolados biológicos.

Os valores de CIM 50 e CIM 90 para óleo de *T. vulgaris* nos diferentes isolados foram de 0,04% e 0,39% respectivamente. A CFM 50 e CFM 90 foram de 0,09% e 1,56% respectivamente (Tabela 24).

Tabela 14. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) do óleo essencial de *T. vulgaris* Lin sobre isolados de *C. neoformans* de origem humana e ambiental.

ISOLADOS BIOLÓGICOS	CONCENTRAÇÕES FUNGISTÁTICA E FUNGICIDA	
	CIM% (v/v)	*CFM% (v/v)
ICB 78	0,024	0,04
ICB 87	0,04	0,09
ICB 89	0,012	0,024
ICB 105	0,09	0,19
ICB 107	S	S
ICB 108	0,0015	0,003
ICB 127	0,012	0,024
ICB 154	0,09	0,19
ICB 155	0,0015	0,003
ICB 160	0,0015	0,003
ICB 164	0,09	0,19
ICB 167	1,56	3,12
ICB 168	0,78	1,56
ICB 179	0,09	0,19
ICB 172	0,00076	0,015
ICB 183	0,39	0,78
ICB 189	0,09	0,19
ICB 283	0,19	0,39
B 07	6,25	12,5
B 20	0,012	0,024
B 64	0,024	0,04
ICB 165	0,19	0,39
ICB 175	0,0061	0,012
ICB 176	0,003	0,0061
ICB 182	0,39	0,78
P9 A5	0,19	0,39
P9 A7	0,003	0,0061
P9 A10	0,19	0,39
P17 A9	0,0015	0,003
P3 B5	0,19	0,39
P6 B4	0,04	0,09
P9 B11	0,04	0,09
P10 B8	0,04	0,09
P10 B20	0,0015	0,003
P17 B5	0,00076	0,015
P3 C2	0,012	0,024
P9 C5	0,04	0,09
P10 C5	0,19	0,39

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

Em verde *C. neoformans*, isolados de origem ambiental.

Condições do estudo: Pesquisa da Concentração inibitória mínima CIM em placas de microdiluição e leitura em 48 horas: resultado em %

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 (CFM)

**CIM: concentração inibitória mínima

***CFM: concentração fungicida mínima:

v/v: volume por volume em porcentagem

S: Sensível – ausência de crescimento até 0,000000024%

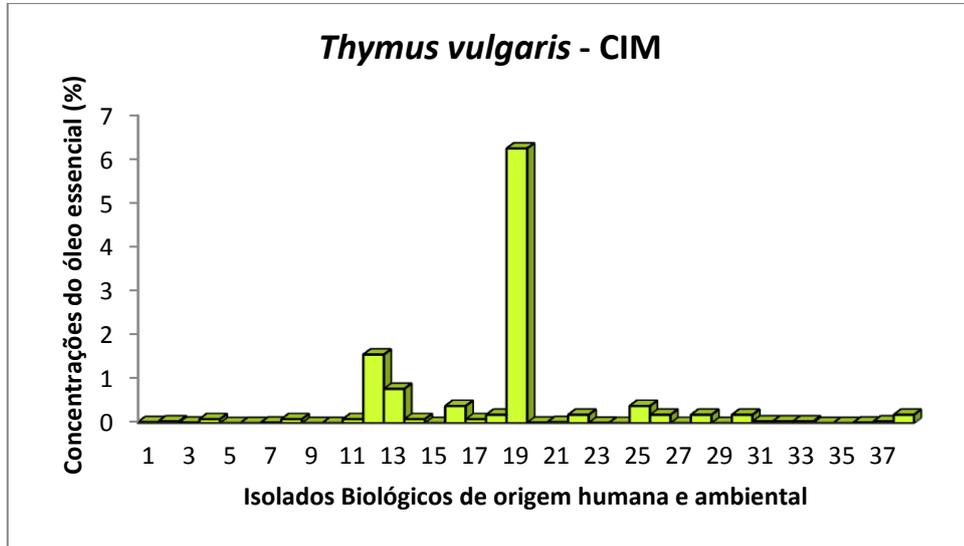


Gráfico 11. Concentrações inibitórias mínimas (CIM) do óleo essencial de *T. vulgaris* sobre isolados de *C. neoformans* de origem humana e ambiental

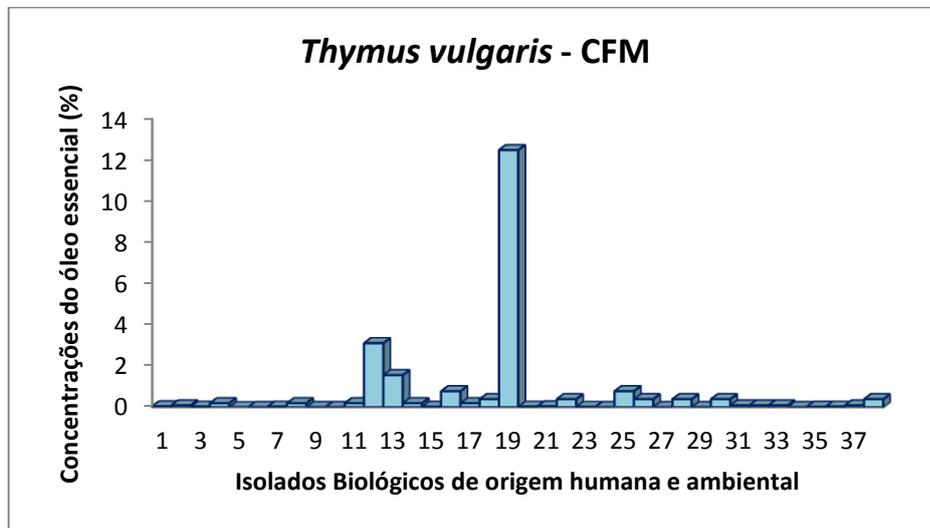


Gráfico 12. Concentrações fungicidas mínimas (CFM) do óleo essencial de *T. vulgaris* sobre isolados de *C. neoformans* de origem humana e ambiental.

Tabela 15: Média, desvio padrão, mediana, máxima e mínima do óleo essencial de *T. vulgaris* sobre isolados biológicos de *C. neoformans*.

VARIAVEL - CIM	Isolados HIV+	Isolados não HIV	Isolados biológicos de origem ambiental
<i>T. vulgaris</i>	N=7	N=11	N=20
$\mu \pm dp^{***}$	0,38 \pm 0,58*	0,06 \pm 0,11	0,39 \pm 1,38
Mediana	0,09	0,024	0,04
Min.– Max.****	0,0007 – 1,56	0 - 39	0,0007 – 6,25
VARIAVEL - CFM	Isolados HIV+	Isolados não HIV	Isolados biológicos de origem ambiental
<i>T. vulgaris</i>	N=7	N=11	N=20
$\mu \pm dp^{***}$	0,78 \pm 1,16**	0,13 \pm 0,22	0,78 \pm 2,76
Mediana	0,19	0,04	0,09
Min.– Max.****	0,015 – 3,12	0 - 0,78	0,003 – 12,5

*Condições do estudo: Pesquisa da concentração inibitória mínima (CIM) em placas de microdiluição e leitura em 48 horas: resultado em porcentagem (%)

**Concentração fungicida mínima (CFM), pesquisa da atividade fungicida em Ágar Sabouraud dextrose, leitura em 48 horas: ausência de crescimento: resultado em porcentagem (%).

*** $\mu \pm dp$ – Média e desvio padrão

****Min. – Mínima e Max. Máxima.

4.7.2 Atividade do composto químico majoritário linalol do óleo essencial de *T. vulgaris* Lin sobre *C. neoformans* - Isolados biológicos de origem humana e ambiental.

Os isolados ICB 108, ICB 160 e ICB 164 de pacientes com sorologia desconhecida para o HIV (03/11), isolado ICB 167, de paciente com sorologia positiva para o HIV (01/07) foram sensíveis ao composto químico majoritário linalol 97% na concentração de 48,5%. O isolado ICB 89, de paciente com sorologia positiva para o HIV (01/07) foi sensível ao Linalol 97% na concentração de 12,12%. Os demais isolados foram resistentes ao linalol na concentração de 97% (Tabelas 16) (Gráficos 13 e 14).

A média e o desvio padrão da CIM do composto químico majoritário Linalol 97% para os isolados de pacientes HIV foi 73,6 \pm 40,29%; isolados de pacientes com sorologia desconhecida para o HIV 69,32 \pm 34% e isolados biológicos de origem ambiental 97 \pm 0%. A média e desvio padrão da CFM do composto químico majoritário Linalol 97 % para os isolados de pacientes HIV positivo foi 77,94 \pm 34,19%; isolados de pacientes com sorologia desconhecida

para o HIV $83,77 \pm 22,65\%$ e isolados biológicos de origem ambiental $97 \pm 0\%$. (Tabela 17).

Na pesquisa de cápsula na dose subinibitória observou-se em relação ao controle redução ou ausência desta estrutura nos isolados biológicos de origem humana e ambiental sob a influência do composto químico majoritário linalol 97%. Morfologicamente ocorreram alterações quanto ao tamanho da célula e estas tenderam a se agrupar em número de 2, 4 ou mais leveduras.

A produção de proteinase e fosfolipase foram inibidas frente ao linalol para todos os isolados biológicos.

Os valores de CIM 50 e CIM 90 para o composto químico majoritário linalol 97% nos diferentes isolados foram de 97%. A CFM 50 e CFM 90 também foram de 97% (Tabela 24).

Tabela 16. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) do composto químico majoritário linalol do óleo essencial de *T. vulgaris* Lin sobre isolados de *C. neoformans* de origem humana e ambiental.

ISOLADOS BIOLÓGICOS	CONCENTRAÇÕES FUNGISTÁTICA E FUNGICIDA	
	CIM% (v/v)	*CFM% (v/v)
ICB 78	97	R
ICB 87	48,5	97
ICB 89	6,06	12,12
ICB 105	48,5	97
ICB 107	97	R
ICB 108	24,2	48,5
ICB 127	97	R
ICB 154	97	R
ICB 155	97	R
ICB 160	24,2	48,5
ICB 164	24,2	48,5
ICB 167	24,2	48,5
ICB 168	97	R
ICB 179	97	R
ICB 172	97	R
ICB 183	97	R
ICB 189	97	R
ICB 283	97	R
B 07	97	R
B 20	97	R
B 64	97	R
ICB 165	97	R
ICB 175	97	R
ICB 176	97	R
ICB 182	97	R
P9 A5	97	R
P9 A7	97	R
P9 A10	97	R
P17 A9	97	R
P3 B5	97	R
P6 B4	97	R
P9 B11	97	R
P10 B8	97	R
P10 B20	97	R
P17 B5	97	R
P3 C2	97	R
P9 C5	97	R
P10 C5	97	R

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

Em verde *C. neoformans*, isolados de origem ambiental.

Condições do estudo: Pesquisa da Concentração inibitória mínima CIM em placas de microdiluição e leitura em 48 horas: resultado em %.

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 (CFM)

**CIM: concentração inibitória mínima

***CFM: concentração fungicida mínima:

v/v: volume por volume em porcentagem - R: Resistente – presença de crescimento a 97%.

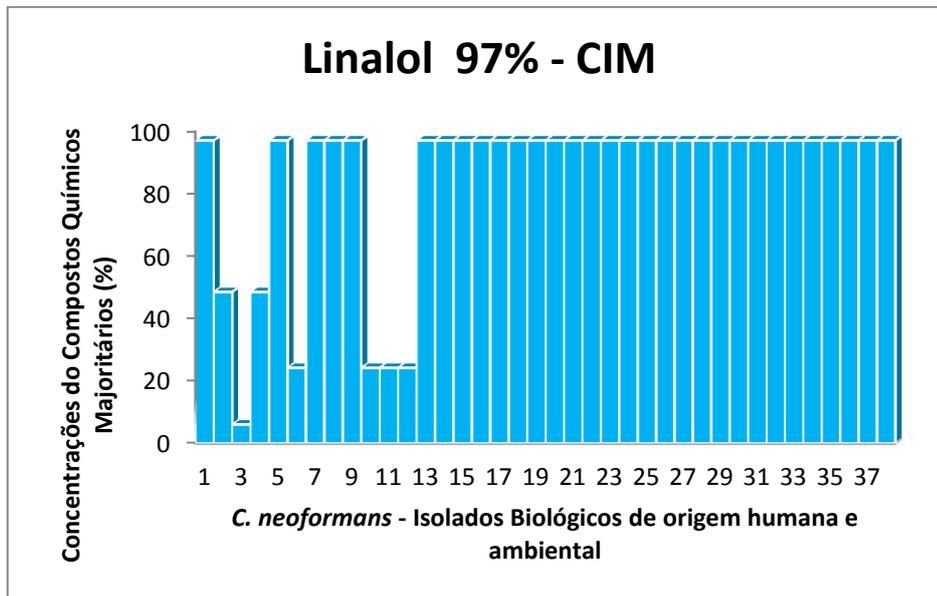


Gráfico 13. Concentrações inibitórias mínimas (CIM) do composto químico Linalol 97% sobre isolados de *C. neoformans* de origem humana e ambiental.

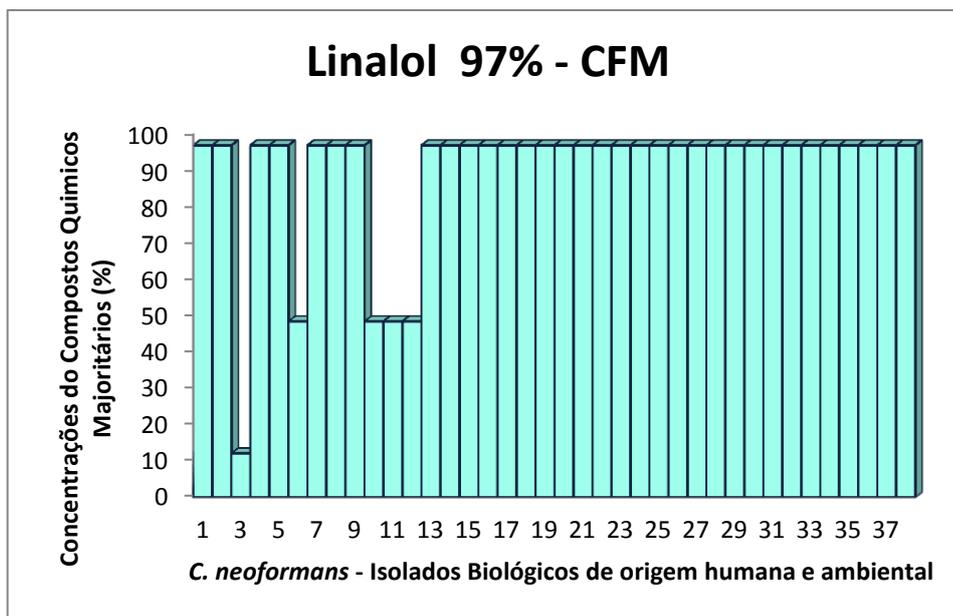


Gráfico 14. Concentrações fungicidas mínimas (CFM) do composto químico Linalol 97% sobre isolados de *C. neoformans* de origem humana e ambiental.

Tabela 17: Média, desvio padrão, mediana, máxima e mínima do composto químico majoritário Linalol 97% do óleo essencial de *T. vulgaris* sobre isolados biológicos de *C. neoformans*.

VARIAVEL - CIM	Isolados HIV+	Isolados não HIV	Isolados biológicos de origem ambiental
Linalol 97%	N=7	N=11	N=20
$\mu \pm dp^{***}$	73,6 \pm 40,29*	68,32 \pm 34	97 \pm 0
Mediana	97	97	97
Min.– Max. ****	6,06 – 97	24,2 - 97	97 – 97
VARIAVEL - CFM	Isolados HIV+	Isolados não HIV	Isolados biológicos de origem ambiental
Linalol 97%	N=7**	N=11***	N=20
$\mu \pm dp^{***}$	77,94 \pm 34,19*	83,77 \pm 22,65	97 \pm 0
Mediana	97	97	97
Min.– Max. ****	12,12 – 97	48,5– 97	97– 97

*Condições do estudo: Pesquisa da concentração inibitória mínima (CIM) em placas de microdiluição e leitura em 48 horas: resultado em porcentagem (%)

**Concentração fungicida mínima (CFM), pesquisa da atividade fungicida em Ágar Sabouraud dextrose, leitura em 48 horas: ausência de crescimento: resultado em porcentagem (%).

*** $\mu \pm dp$ – Média e desvio padrão

****Min. – Mínima e Max. Máxima.

4.7.3 Atividade do composto químico majoritário P-cimeno do óleo essencial de *T. vulgaris* Lin sobre *C. neoformans* - Isolados biológicos de origem humana e ambiental.

O isolado ICB 87 de paciente com sorologia desconhecida para o HIV (01/11), foi sensível ao composto químico majoritário p-cimeno 99% na concentração de 49,5%. Os isolados ICB 176 e ICB P17B5, de origem ambiental (02/20) foram sensíveis nas concentrações de 22,7% e 24,7% respectivamente. Os demais isolados foram resistentes a P-cimeno na concentração de 99%. (Tabelas 18) (Gráficos 15 e 16).

A média e o desvio padrão da CIM do composto químico majoritário Linalol 97% para os isolados de pacientes HIV foi 73,6 \pm 40,29%; isolados de pacientes com sorologia desconhecida para o HIV 69,32 \pm 34% e isolados biológicos de origem ambiental 97 \pm 0%. A média e desvio padrão da CFM do composto químico majoritário Linalol 97 para os isolados de pacientes HIV positivo foi 77,94 \pm 34,19%; isolados de pacientes com sorologia desconhecida

para o HIV $83,77 \pm 22,65\%$ e isolados biológicos de origem ambiental $97 \pm 0\%$. (Tabela 17).

A média e o desvio padrão da CIM do composto químico majoritário P-cimeno 99% para os isolados de pacientes HIV foi $99 \pm 0\%$; isolados de pacientes com sorologia desconhecida para o HIV $92,2 \pm 22,4\%$ e isolados biológicos de origem ambiental $87,8 \pm 28,04\%$. A média e desvio padrão da CFM do composto químico majoritário P-cimeno 99% para os isolados de pacientes HIV positivo foi $99 \pm 0\%$; isolados de pacientes com sorologia desconhecida para o HIV $94,5 \pm 14,9\%$ e isolados biológicos de origem ambiental $91,4 \pm 23,1\%$. (Tabela 19).

Na pesquisa de cápsula na dose subinibitória observou-se em relação ao controle redução ou ausência desta estrutura nos isolados biológicos de origem humana e ambiental sob a influência do composto químico majoritário P-cimeno 99%. Morfologicamente ocorreram alterações quanto ao tamanho da célula e estas tenderam a se agrupar em número de 2, 4 ou mais leveduras.

A produção de proteinase e fosfolipase foram inibidas frente ao p-cimeno para todos os isolados biológicos.

Os valores de CIM 50 e CIM 90 para o composto químico majoritário P-cimeno 99% nos diferentes isolados foi 99%. A CFM50 e CFM90 também foram de 99% (Tabela 24).

Tabela 18. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) do composto químico majoritário P-cimeno do óleo essencial de *T. vulgaris* Lin sobre isolados de *C. neoformans* de origem humana e ambiental.

ISOLADOS BIOLÓGICOS	CONCENTRAÇÕES FUNGISTÁTICA E FUNGICIDA	
	CIM% (v/v)	*CFM% (v/v)
ICB 78	99	R
ICB 87	24,7	49,5
ICB 89	99	R
ICB 105	99	R
ICB 107	99	R
ICB 108	99	R
ICB 127	99	R
ICB 154	99	R
ICB 155	99	R
ICB 160	99	R
ICB 164	99	R
ICB 167	99	R
ICB 168	99	R
ICB 179	99	R
ICB 172	99	R
ICB 183	99	R
ICB 189	99	R
ICB 283	99	R
B 07	99	R
B 20	99	R
B 64	99	R
ICB 165	99	R
ICB 175	99	R
ICB 176	12,37	22,7
ICB 182	99	R
P9 A5	99	R
P9 A7	99	R
P9 A10	99	R
P17 A9	99	R
P3 B5	99	R
P6 B4	99	R
P9 B11	99	R
P10 B8	50	99
P10 B20	99	R
P17 B5	12,37	24,7
P3 C2	99	R
P9 C5	99	R
P10 C5	99	R

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

Em verde *C. neoformans*, isolados de origem ambiental.

Condições do estudo: Pesquisa da Concentração inibitória mínima CIM em placas de microdiluição e leitura em 48 horas: resultado em %.

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 (CFM)

**CIM: concentração inibitória mínima

***CFM: concentração fungicida mínima:

v/v: volume por volume em porcentagem

R: Resistente – presença de crescimento a 99%.

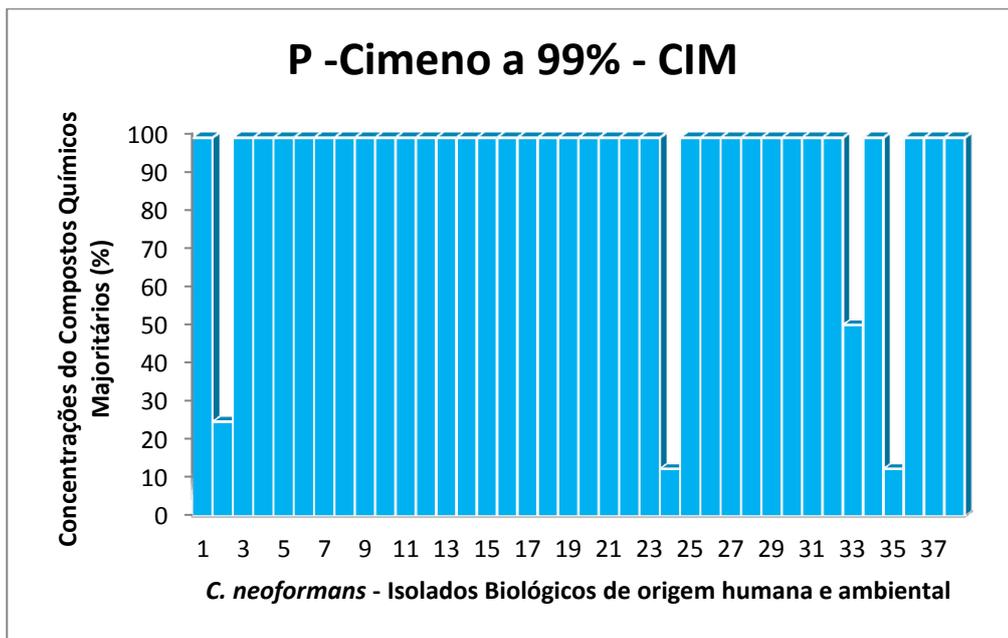


Gráfico 15. Concentrações inibitórias mínimas (CIM) do composto químico P-cimeno a 99% sobre isolados de *C. neoformans* de origem humana e ambiental

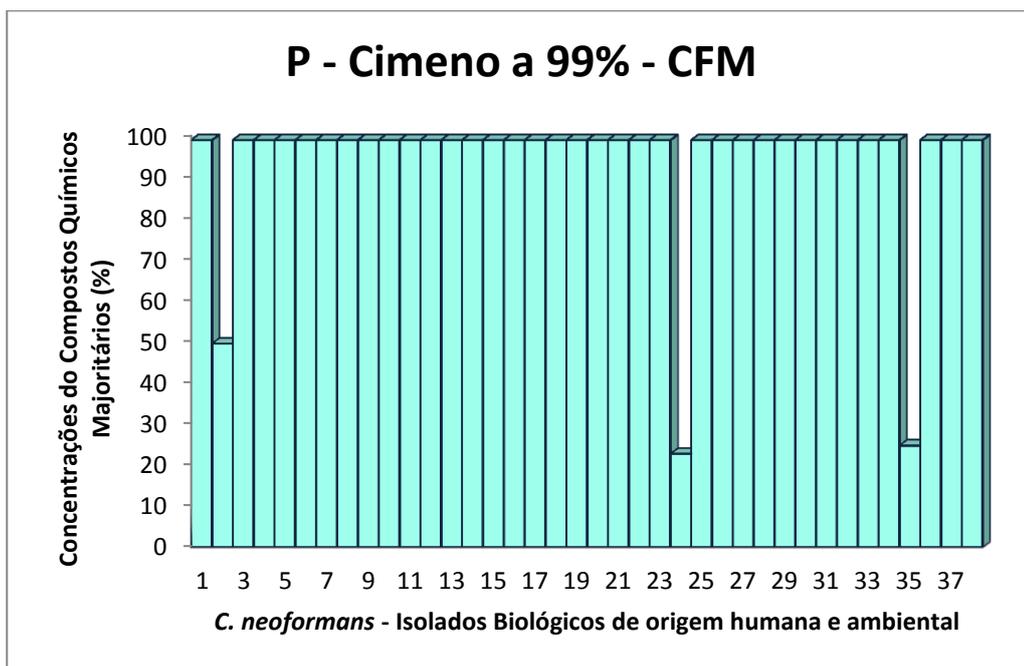


Gráfico 16. Concentrações fungicidas mínima (CFM) do composto químico P-cimeno a 99% sobre isolados de *C. neoformans* de origem humana e ambiental

Tabela 19: Média, desvio padrão, mediana, máxima e mínima do composto químico majoritário P-cimeno 99% do óleo essencial de *T. vulgaris* sobre isolados biológicos de *C. neoformans*.

VARIAVEL - CIM	Isolados HIV+	Isolados não HIV	Isolados biológicos de origem ambiental
P-Cimeno 99%	N=7**	N=11***	N=20
$\mu \pm dp$ ****	99 \pm 0*	92,2 \pm 22,4	87,8 \pm 28,04
Mediana	99	99	99
Min.– Max.*****	99 – 99	24,7 - 99	12,37 – 99
VARIAVEL - CFM	Isolados HIV+	Isolados não HIV	Isolados biológicos de origem ambiental
P-Cimeno 99%	N=7**	N=11***	N=20
$\mu \pm dp$ ****	99 \pm 0*	94,5 \pm 14,9	91,4 \pm 23,1
Mediana	99	99	99
Min.– Max.*****	99 – 99	49,5– 99	22,7– 99

*Condições do estudo: Pesquisa da concentração inibitória mínima (CIM) em placas de microdiluição e leitura em 48 horas: resultado em porcentagem (%)

**Concentração fungicida mínima (CFM), pesquisa da atividade fungicida em Ágar Sabouraud dextrose, leitura em 48 horas: ausência de crescimento: resultado em porcentagem (%).

*** $\mu \pm dp$ – Média e desvio padrão

****Min. – Mínima e Max. Máxima.

4.7.4 Atividade do composto químico majoritário carvacrol do óleo essencial de *T. vulgaris* Lin sobre *C. neoformans* - Isolados biológicos de origem humana e ambiental.

O isolado ICB 164, de paciente com sorologia desconhecida para o HIV (01/11) foi sensível ao composto químico majoritário carvacrol 98% até a concentração de 0,0000000024%. O isolado ICB167, de paciente com sorologia positiva para o HIV (01/07) e os isolados B07 e P17B5 de origem ambiental (02/20) foram resistentes ao carvacrol à concentração de 98% (Tabelas 20) (Gráficos 17 e 18).

A média e o desvio padrão da CIM do composto químico majoritário carvacrol 98% para os isolados de pacientes HIV foi 39,3 \pm 40,6%; isolados de pacientes com sorologia desconhecida para o HIV 11,69 \pm 7,84% e isolados biológicos de origem ambiental 25,1 \pm 25,5%. A média e desvio padrão da CFM do composto químico majoritário carvacrol 98% para os isolados de pacientes HIV positivo foi 50,7 \pm 34,9%; isolados de pacientes com sorologia

desconhecida para o HIV $23,38 \pm 15,6\%$ e isolados biológicos de origem ambiental $40,4 \pm 22,86\%$. (Tabela 21).

Na pesquisa de cápsula na dose subinibitória observou-se em relação ao controle redução ou ausência desta estrutura nos isolados biológicos de origem humana e ambiental sob a influência do composto químico majoritário carvacrol. Morfologicamente ocorreram alterações quanto ao tamanho da célula e estas tenderam a se agrupar em número de 2, 4 ou mais leveduras.

A produção de proteinase e fosfolipase foram inibidas frente ao carvacrol para todos os isolados biológicos.

Os valores de CIM 50 e CIM 90 para o composto químico carvacrol 98% nos diferentes isolados foram 12,25% e 24,5% respectivamente. A CFM 50 e CFM 90 foram 24,5% e 49%, respectivamente (Tabela 24).

Tabela 20. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) do composto químico majoritário Carvacrol do óleo essencial de *T. vulgaris* Lin sobre isolados de *C. neoformans* de origem humana e ambiental.

ISOLADOS BIOLÓGICOS	CONCENTRAÇÕES FUNGISTÁTICA E FUNGICIDA	
	CIM% (v/v)	*CFM% (v/v)
ICB 78	12,25	24,5
ICB 87	3,06	6,12
ICB 89	6,12	12,25
ICB 105	24,5	49
ICB 107	12,25	24,5
ICB 108	3,06	6,12
ICB 127	12,25	24,5
ICB 154	24,5	49
ICB 155	12,25	24,5
ICB 160	12,25	24,5
ICB 164	S	S
ICB 167	98	R
ICB 168	98	98
ICB 179	24,5	49
ICB 172	24,5	49
ICB 183	12,25	24,5
ICB 189	12,25	24,5
ICB 283	12,25	24,5
B 07	98	R
B 20	12,25	24,5
B 64	12,25	24,5
ICB 165	12,25	24,5
ICB 175	24,5	49
ICB 176	12,25	24,5
ICB 182	24,5	49
P9 A5	12,25	24,5
P9 A7	12,25	24,5
P9 A10	12,25	24,5
P17 A9	12,25	24,5
P3 B5	24,5	49
P6 B4	24,5	49
P9 B11	24,5	49
P10 B8	12,25	24,5
P10 B20	24,5	49
P17 B5	98	R
P3 C2	12,25	24,5
P9 C5	24,5	49
P10 C5	12,25	24,5

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

Em verde *C. neoformans*, isolados de origem ambiental.

Condições do estudo: Pesquisa da Concentração inibitória mínima CIM em placas de microdiluição e leitura em 48 horas: resultado em %.

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 (CFM)

**CIM: concentração inibitória mínima

***CFM: concentração fungicida mínima:

v/v: volume por volume em porcentagem

R: Resistente – presença de crescimento a 98%.

S: Sensível – ausência de crescimento até 0,000000024%

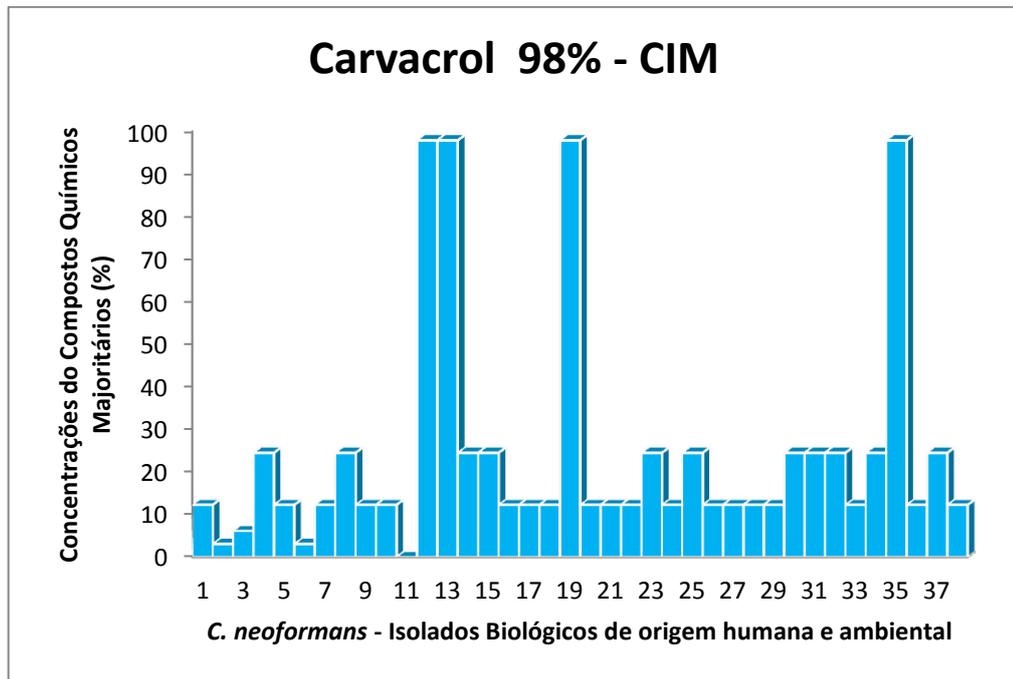


Gráfico 17. Concentrações inibitórias mínimas (CIM) do composto químico Carvacrol a 98% sobre isolados de *C. neoformans* de origem humana e ambiental

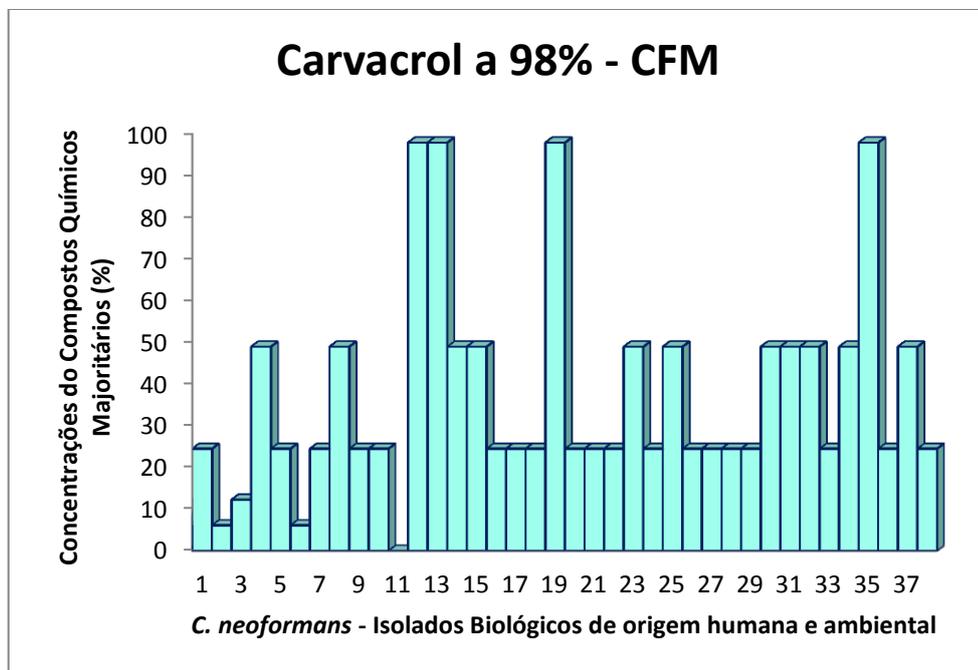


Gráfico 18. Concentrações fungidas mínimas (CFM) do composto químico Carvacrol a 98% sobre isolados de *C. neoformans* de origem humana e ambiental

Tabela 21: Média, desvio padrão, mediana, máxima e mínima do composto químico majoritário Carvacrol 98% do óleo essencial de *T. vulgaris* sobre isolados biológicos de *C. neoformans*.

VARIAVEL - CIM	Isolados HIV+	Isolados não HIV	Isolados biológicos de origem ambiental
Carvacrol 98%	N=7	N=11	N=20
$\mu \pm dp^{***}$	39,3 ± 40,6*	11,69 ± 7,84	25,1 ± 25,5
Mediana	24,5	12,25	12,25
Min.– Max. ****	6,12 – 98	0 - 24	12,25 – 98

VARIAVEL - CIM	Isolados HIV+	Isolados não HIV	Isolados biológicos de origem ambiental
Carvacrol 98%	N=7	N=11	N=20
$\mu \pm dp^{***}$	50,7 ± 34,9 **	23,38 ± 15,6	40,4 ± 22,86
Mediana	49	24,5	24,5
Min.– Max. ****	12,25 – 98	0 – 49	24,5– 98

*Condições do estudo: Pesquisa da concentração inibitória mínima (CIM) em placas de microdiluição e leitura em 48 horas: resultado em porcentagem (%)

**Concentração fungicida mínima (CFM), pesquisa da atividade fungicida em Ágar Sabouraud dextrose, leitura em 48 horas: ausência de crescimento: resultado em porcentagem (%).

*** $\mu \pm dp$ – Média e desvio padrão

****Min. – Mínima e Max. Máxima.

4.7.5 Atividade do composto químico majoritário timol de *T. vulgaris* Lin sobre *C. neoformans* - Isolados biológicos de origem humana e ambiental.

Os isolados ICB 164 de paciente com sorologia desconhecida para o HIV (01/11) e o isolado P17A9, de origem ambiental (1/20) foram sensíveis ao composto químico majoritário timol 99,5% até a concentração de (0,000000024%). O isolado ICB 167 de paciente com sorologia positiva para o HIV (01/07) e os isolados B07 e P17B5 de origem ambiental (02/20) foram resistentes ao timol à concentração de 99,5%. (Tabelas 22) (Gráficos 19 e 20).

A média e o desvio padrão da CIM do composto químico majoritário timol 99,5% para os isolados de pacientes HIV foi $21,08 \pm 35,6\%$; isolados de pacientes com sorologia desconhecida para o HIV $9,63 \pm 7,35\%$ e isolados biológicos de origem ambiental $23,6 \pm 27,3\%$. A média e desvio padrão da CFM do composto químico majoritário timol 99,5% para os isolados de pacientes HIV positivos foi $27,9 \pm 35,8\%$; isolados de pacientes com sorologia

desconhecida para o HIV $19,2 \pm 14,7\%$ e isolados biológicos de origem ambiental $37,3 \pm 27,2\%$. (Tabela 23).

Na pesquisa de cápsula na dose subinibitória observou-se em relação ao controle redução ou ausência desta estrutura nos isolados biológicos de origem humana e ambiental sob a influência do composto químico majoritário timol 99,5%. Morfologicamente ocorreram alterações quanto ao tamanho da célula e estas tenderam a se agrupar em número de 2, 4 ou mais leveduras.

A produção de proteinase e fosfolipase foram inibidas frente ao timol para todos os isolados biológicos.

Os valores de CIM 50 e CIM 90 para o composto químico majoritário timol 99,5% nos diferentes isolados foram 12,43% e 24,8% respectivamente. A CFM 50 foi de 24,8% e CFM 90 49,5% (Tabela 24).

Tabela 22. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) do composto químico majoritário timol do óleo essencial de *T. vulgaris* Lin sobre isolados de *C. neoformans* de origem humana e ambiental.

ISOLADOS BIOLÓGICOS	CONCENTRAÇÕES FUNGISTÁTICA E FUNGICIDA	
	CIM% (v/v)	*CFM% (v/v)
ICB 78	12,43	24,8
ICB 87	3,1	6,21
ICB 89	0,77	1,55
ICB 105	24,8	49,7
ICB 107	12,43	24,8
ICB 108	3,1	6,21
ICB 127	12,43	24,8
ICB 154	0,38	0,77
ICB 155	12,43	24,8
ICB 160	12,43	24,8
ICB 164	S	S
ICB 167	99,5	R
ICB 168	3,1	6,21
ICB 179	6,21	12,43
ICB 172	24,8	49,7
ICB 183	12,43	24,8
ICB 189	12,43	24,8
ICB 283	0,77	1,55
B 07	99,5	R
B 20	12,43	24,8
B 64	12,43	24,8
ICB 165	12,43	24,8
ICB 175	24,8	49,7
ICB 176	0,38	0,77
ICB 182	24,8	49,7
P9 A5	12,43	24,8
P9 A7	12,43	24,8
P9 A10	0,19	0,38
P17 A9	S	S
P3 B5	24,8	49,7
P6 B4	24,8	49,7
P9 B11	24,8	49,7
P10 B8	12,43	24,8
P10 B20	24,8	49,7
P17 B5	99,5	R
P3 C2	12,43	24,8
P9 C5	24,8	49,7
P10 C5	12,43	24,8

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

Em verde *C. neoformans*, isolados de origem ambiental.

Condições do estudo: Pesquisa da Concentração inibitória mínima CIM em placas de microdiluição e leitura em 48 horas: resultado em %.

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 (CFM)

**CIM: concentração inibitória mínima

***CFM: concentração fungicida mínima:

v/v: volume por volume em porcentagem;

R: Resistente – presença de crescimento a 99,5%.

S: Sensível – ausência de crescimento até 0,0000000024%

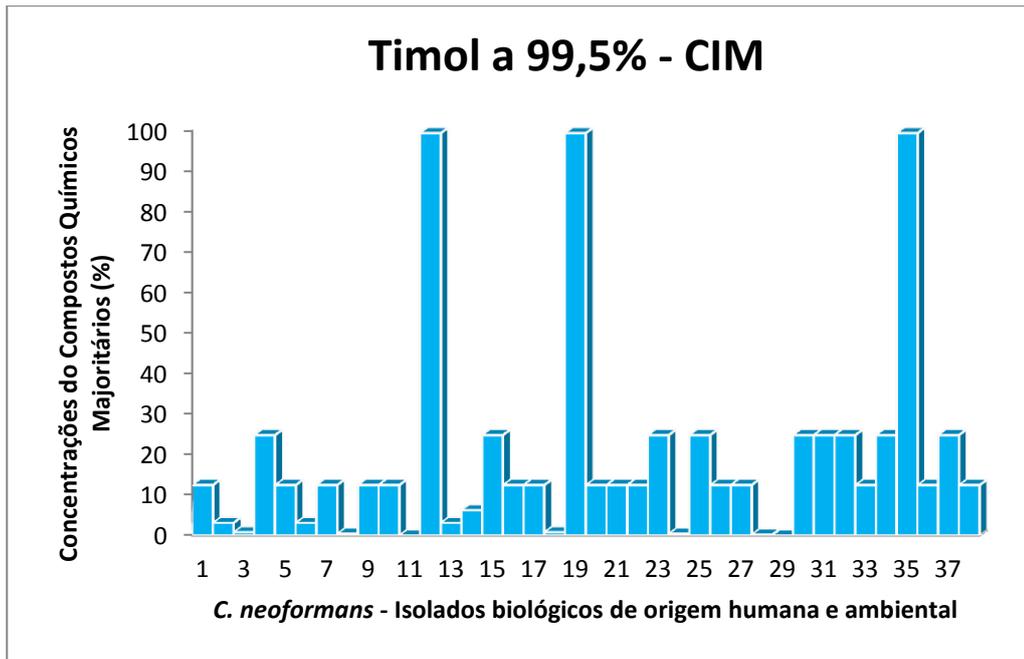


Gráfico 19. Concentrações inibitórias mínimas (CIM) do composto químico Timol 99,5% sobre isolados de *C. neoformans* de origem humana e ambiental.

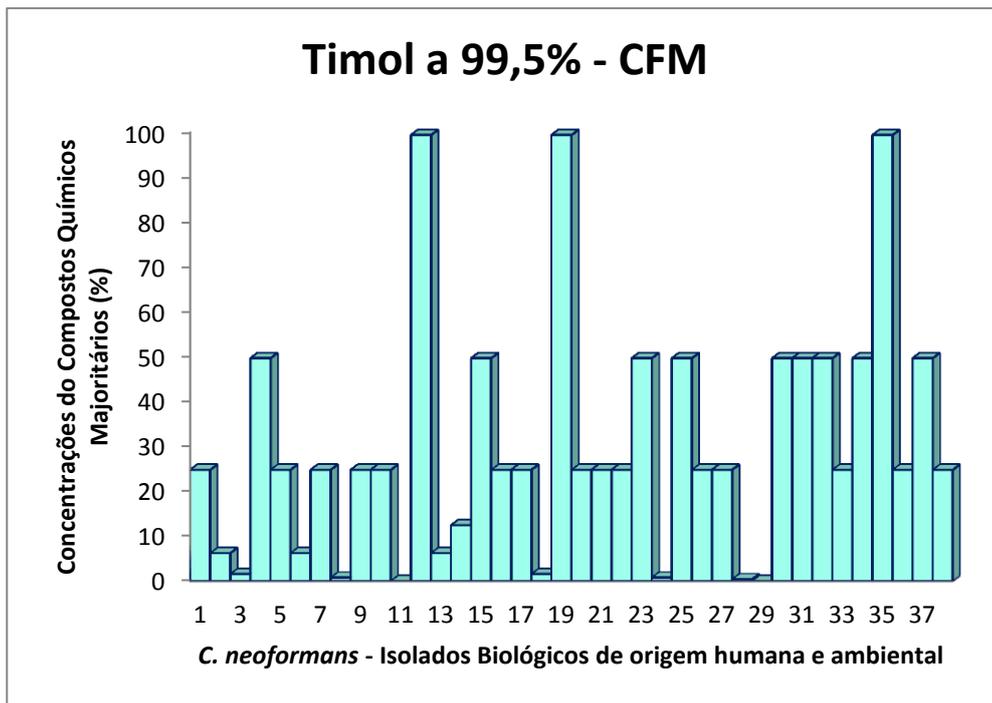


Gráfico 20. Concentrações fungidas mínimas (CFM) do composto químico Timol 99,5% sobre isolados de *C. neoformans* de origem humana e ambiental.

Tabela 23: Média, desvio padrão, mediana, máxima e mínima do composto químico majoritário Timol 99,5% do óleo essencial de *T. vulgaris* sobre isolados biológicos de *C. neoformans*.

VARIAVEL - CIM	Isolados HIV+	Isolados não HIV	Isolados biológicos de origem ambiental
Timol 99,5%	N=7	N=11	N=20
$\mu \pm dp^{***}$	21,08 \pm 35,6*	9,63 \pm 7,35	23,6 \pm 27,3
Mediana	6,21	12,43	12,43
Min.– Max.****	0,77 – 99,5	0 - 24,8	0 – 99,5

VARIAVEL - CIM	Isolados HIV+	Isolados não HIV	Isolados biológicos de origem ambiental
Timol 99,5%	N=7	N=11	N=20
$\mu \pm dp^{****}$	27,9 \pm 35,8 **	19,2 \pm 14,7	37,3 \pm 27,2
Mediana	12,43	24,8	24,8
Min.– Max.*****	1,55 – 99,5	0 – 49,7	0– 99,5

*Condições do estudo: Pesquisa da concentração inibitória mínima (CIM) em placas de microdiluição e leitura em 48 horas: resultado em porcentagem (%)

**Concentração fungicida mínima (CFM), pesquisa da atividade fungicida em Ágar Sabouraud dextrose, leitura em 48 horas: ausência de crescimento: resultado em porcentagem (%).

*** $\mu \pm dp$ – Média e desvio padrão

****Min. – Mínima e Max. Máxima.

4.7.6 Valores de CIM50/CIM90 e CFM50/CFM90 dos óleos essenciais e seus compostos químicos majoritários sobre isolados de *C. neoformans*

Na tabela 24 observam-se os valores de CIM50/CIM90 e CFM50/CFM90 do óleo essencial de *E. caryophyllus* e seus compostos químicos majoritários Eugenol 99%, β -cariofileno 80%, e do óleo essencial *T. vulgaris* e seus compostos químicos majoritários Linalol 97%, P-Cimeno 99%, Carvacrol 98% e Timol 99,5% sobre isolados de *C. neoformans*.

Tabela 24. Valores CIM50/CIM90 e CFM50/CFM90 dos óleos essenciais de *E. caryophyllus* e *T. vulgaris* e seus compostos químicos majoritários sobre isolados de *C. neoformans* de origem humana e ambiental.

CIM 50/CIM 90 e CFM 50/CFM 90 dos Compostos Químicos sobre Isolados de <i>C. neoformans</i>				
Óleos essenciais e seus compostos químicos	CIM 50* % (v/v)	CIM 90** % (v/v)	CFM 50*** % (v/v)	CFM 90**** (v/v)
<i>E. caryophyllus</i>	0,09	0,78	0,19	1,56
Eugenol 99%	12,37	99	24,7	99
β -cariofileno 80%	20	80	40	80
<i>T. vulgaris</i>	0,04	0,39	0,09	1,56
Linalol 97%	97	97	97	97
P-Cimeno 99%	99	99	99	99
Carvacro 98%	12,25	24,5	24,5	49
Timol 99,5%	12,43	24,8	24,8	49,5

Condições do estudo: Pesquisa da Concentração inibitória mínima CIM e CFM em placas de microdiluição e leitura em 48 horas: resultado em %

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

CFM: concentração fungicida mínima

***CFM50 CFM de um antifúngico capaz de inibir o crescimento de 50% dos Isolados.

****CFM90 CFM de um antifúngico capaz de inibir o crescimento de 90% dos Isolados

v/v: volume por volume em porcentagem

4.8 Atividade antifúngica das misturas dos compostos químicos majoritários

de cada óleo essencial sobre isolados de *C. neoformans*.

4.8.1 Mistura dos compostos químicos majoritários do óleo essencial de *E. caryophyllus*: eugenol e β -cariofileno.

Os compostos químicos majoritários do óleo essencial de *E. caryophyllus*: são eugenol e β -cariofileno nas concentrações de 84,10% e 12,67% respectivamente, perfazendo 96,77% do total do óleo essencial.

O isolado ICB 108, de paciente com sorologia desconhecida para o HIV foi sensível à concentração de 3%. Os isolados ICB 107 e ICB 164, de

pacientes com sorologia desconhecida para o HIV, isolada ICB 168 de paciente com sorologia positiva para o HIV e os isolados B64 e P9B11, de origem ambiental foram resistentes a mistura na concentração de 96,77%. As cepas padrão ICB163-D e ATCC 90112 foram sensíveis a mistura na CIM de 1,5% e 0,75% respectivamente; as CFM foram de 3% e 1,5% respectivamente (Tabela 25) (Gráficos 21 e 22).

Os valores de CIM 50 e CIM 90 para a mistura de eugenol a 84,10% e β -cariofileno a 12,67% (96,77%) nos 10 isolados foram de 48,38% e 96,77% respectivamente. As CFM 50 e CFM90 foram de 96,77% (Tabela 25).

Tabela 25: Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) das misturas dos compostos químicos majoritários do óleo essencial *E. caryophyllus* - eugenol a 84,10% e β -cariofileno a 12,67% (96,77%) sobre isolados de *C. neoformans* de origem humana e ambiental.

ISOLADOS BIOLÓGICOS	CONCENTRAÇÕES FUNGISTÁTICA E FUNGICIDA	
	CIM% (v/v)	*CFM% (v/v)
ICB 78	12	24.1
ICB 89	48,38	96,77
ICB 107	96,77	R
ICB 108	1,5	3
ICB 164	96,77	R
ICB 168	96,77	R
ICB 179	12	48,38
B 64	96,77	R
P9 B11	96,77	R
P10 B8	48,38	96,77
Cepas Padrão		
ICB 163 - D	1,5	3
ATCC 90112	0,75	1,5

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
 Em verde *C. neoformans*, isolados de origem ambiental.
 Condições do estudo: Pesquisa da Concentração inibitória mínima CIM em placas de microdiluição e leitura em 48 horas: resultado em %
 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 (CFM)
 **CIM: concentração inibitória mínima
 ***CFM: concentração fungicida mínima:
 v/v: volume por volume em porcentagem R: Resistente – presença de crescimento a 96,77%.

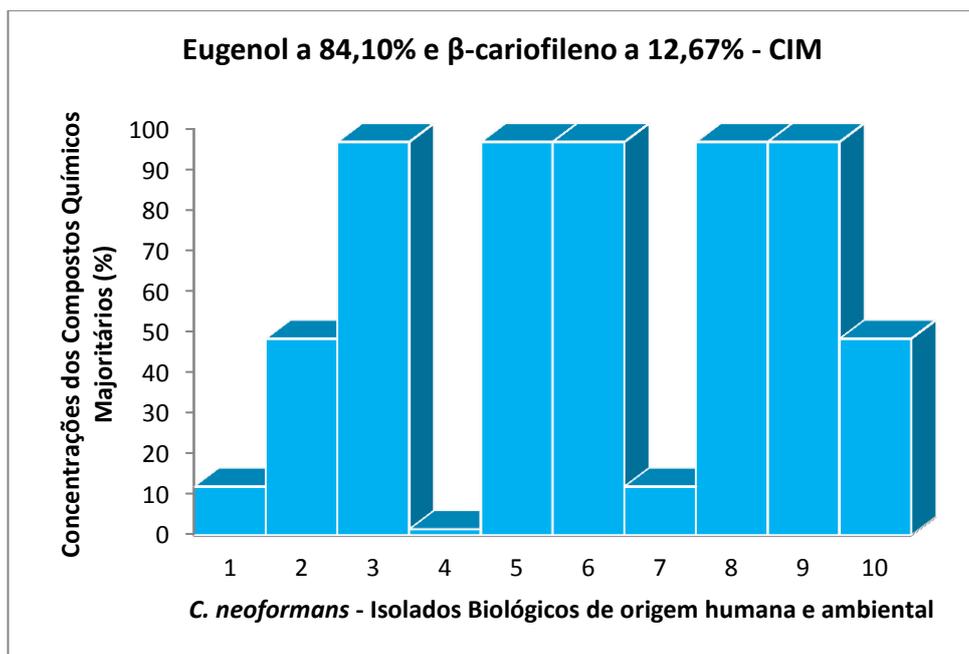


Gráfico 21. Concentrações inibitórias mínimas (CIM) da mistura dos compostos químicos majoritários do óleo essencial *E. caryophyllus* - eugenol a 84,10% e β -cariofileno a 12,67% (96,77%) sobre isolados de *C. neoformans* de origem humana e ambiental.

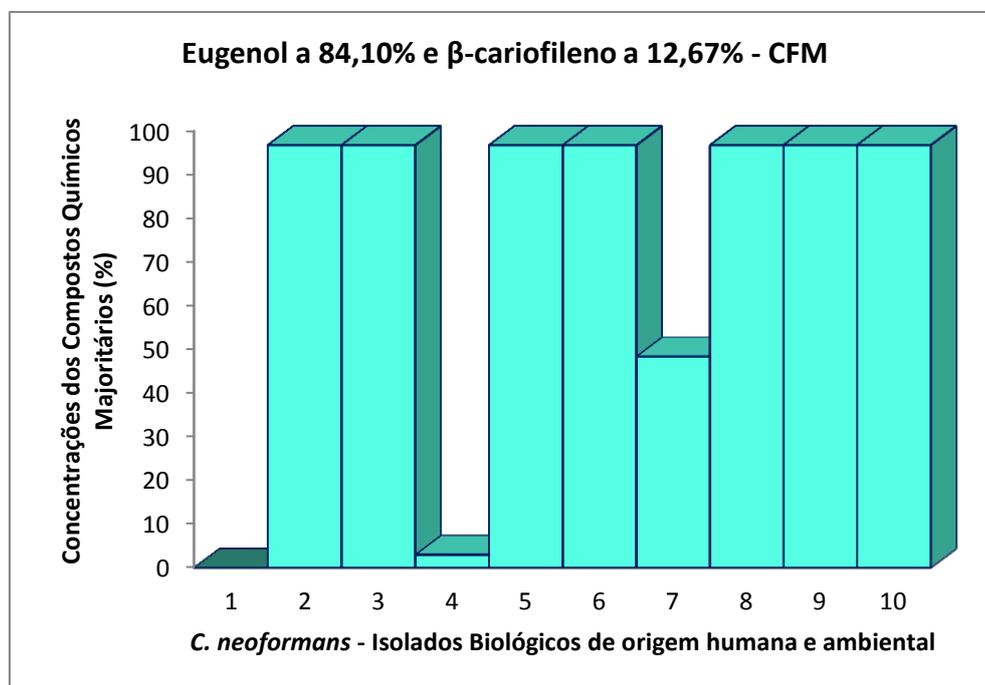


Gráfico 22. Concentrações fungicidas mínimas (CFM) da mistura dos compostos químicos majoritários do óleo essencial *E. caryophyllus* - eugenol a 84,10% e β -cariofileno a 12,67% (96,77%) sobre isolados de *C. neoformans* de origem humana e ambiental.

4.8.2 Mistura dos compostos químicos majoritários do óleo essencial de *T. vulgares*: P-Cimeno e linalol

Na mistura dos compostos químicos majoritários do óleo essencial de *T. vulgaris* P-Cimeno 14,43% e Linalol 8,49% (22,92%), apenas o isolado ICB 176, de origem ambiental foi sensível na concentração de 2,86%.

Os demais isolados foram resistentes a mistura de P-Cimeno 14,43% e Linalol 8,49% na concentração de 22,92%. As cepas padrão ICB163D e ATCC 90112 foram resistentes a essa mistura na concentração de 22,92% (Tabelas 26) (Gráficos 23 e 24).

Os valores de CIM 50 e CIM 90 para a mistura P-Cimeno 14,43% e Linalol 8,49% (22,92%), nos 10 isolados foi de 22,92%. E a CFM 50 e CFM90 também na concentração de 22,92% respectivamente (Tabela 25).

Tabela 26: Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) das misturas dos compostos químicos majoritários do óleo essencial *T. vulgaris* - P-cimeno 14,43% e Linalol 8,49% (22,92%) sobre isolados de *C. neoformans* de origem humana e ambiental.

ISOLADOS BIOLÓGICOS	CONCENTRAÇÕES FUNGISTÁTICA E FUNGICIDA	
	CIM% (v/v)	*CFM% (v/v)
ICB 107	22,92	R
ICB 155	22,92	R
ICB 160	22,92	R
ICB 172	22,92	R
B 20	22,92	R
ICB 176	1,43	2,86
P9 A7	22,92	R
P17 A9	22,92	R
P10 B8	22,92	R
P17 B5	22,92	R
Cepas Padrão		
ICB 163 – D	22,92	R
ATCC 90112	22,92	R

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
Em verde *C. neoformans*, isolados de origem ambiental.

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 (CFM)

**CIM: concentração inibitória mínima

***CFM: concentração fungicida mínima:

v/v: volume por volume em porcentagem

R: Resistente – presença de crescimento a 22,92%.

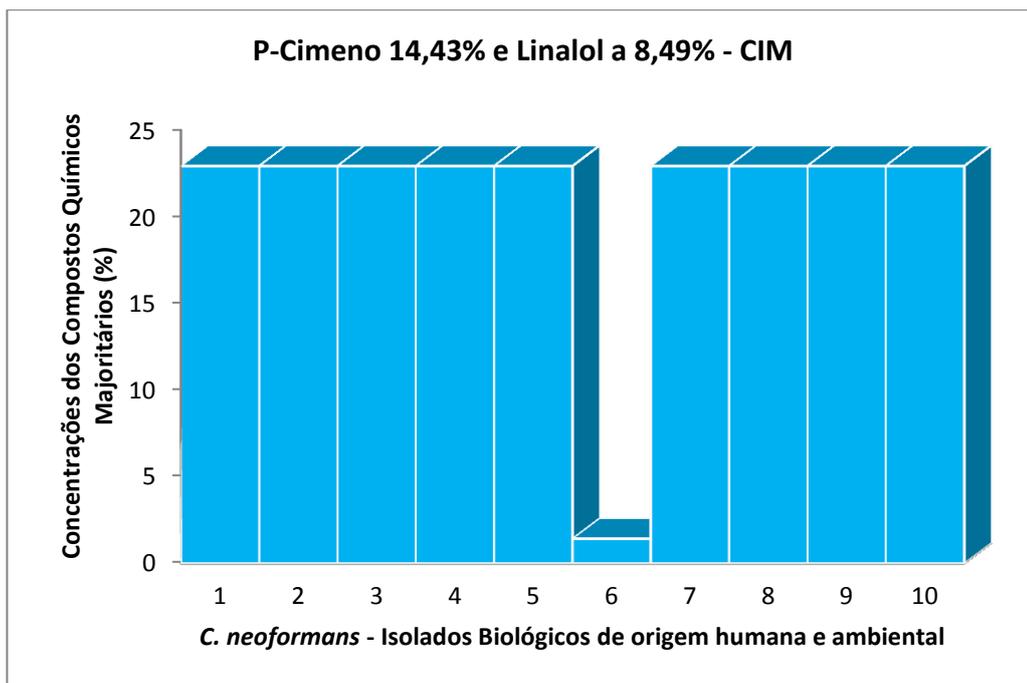


Gráfico 23. Concentrações inibitórias mínimas (CIM) da mistura dos compostos químico do óleo essencial de *T. vulgaris* P-Cimeno 14,43% e Linalol 8,49% (22,92%) sobre isolados biológicos de *C. neoformans* de origem humana e ambiental.

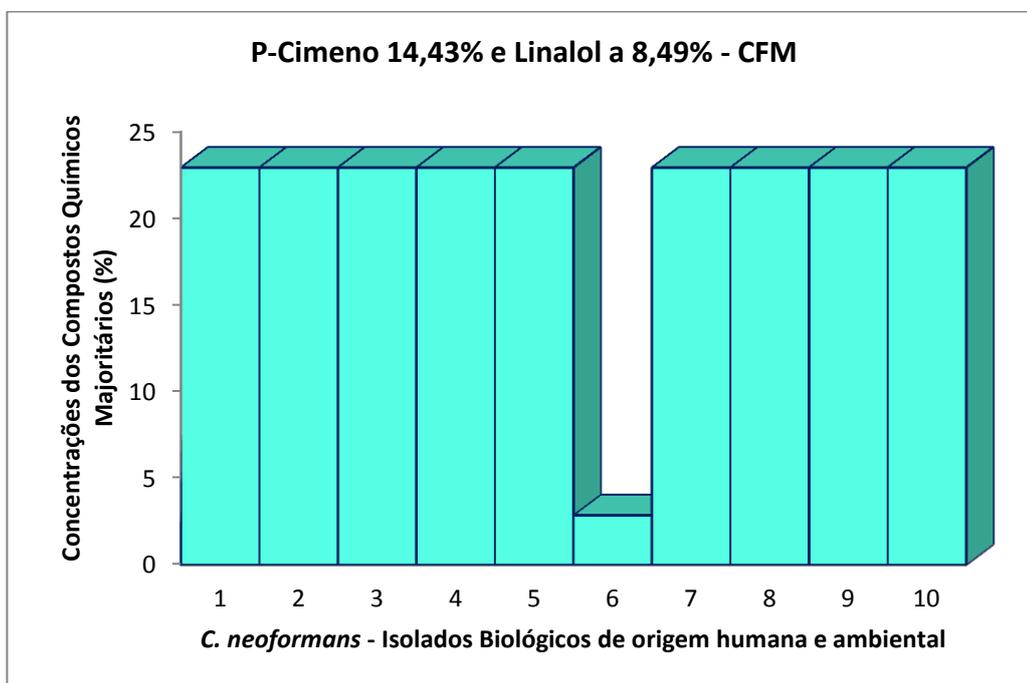


Gráfico 24. Concentrações fungicidas mínimas (CFM) da mistura dos compostos químico do óleo essencial de *T. vulgaris* P-Cimeno 14,43% e Linalol 8,49% (22,92%) sobre isolados biológicos de *C. neoformans* de origem humana e ambiental.

4.8.3 Mistura dos compostos químicos majoritários do óleo essencial de *T. vulgares*: P-Cimeno e Carvacrol.

Na mistura dos compostos químicos majoritários do óleo essencial de *T. vulgaris* P-Cimeno 14,43% e Carvacrol a 5,08 % (19,51%) os isolados P9 A7 e P19 B8 de origem ambiental foram sensíveis na concentração de 2,43%. Os demais isolados incluindo as cepas padrão foram resistentes na concentração 19,51%. (Tabelas 27) (Gráficos 25 e 26).

Os valores de CIM 50 e CIM 90 e CFM 50 e CFM 90 para a mistura de P-Cimeno 14,43% e Carvacrol 5,08% (19,51%), nos 10 isolados foram de 19,51% (Tabela 25).

Tabela 27: Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) das misturas dos compostos químicos majoritários do óleo essencial *T. vulgaris* - P-cimeno 14,43% e Carvacrol 5,08% (19,51%) sobre isolados de *C. neoformans* de origem humana e ambiental.

ISOLADOS BIOLÓGICOS	CONCENTRAÇÕES FUNGISTÁTICA E FUNGICIDA	
	CIM% (v/v)	*CFM% (v/v)
ICB 107	19,51	R
ICB 155	19,51	R
ICB 160	19,51	R
ICB 172	19,51	R
B 20	19,51	R
ICB 176	19,51	R
P9 A7	1,21	2,43
P17 A9	19,51	R
P10 B8	1,21	2,43
P17 B5	19,51	R
Cepas Padrão		
ICB 163 – D	19,51	R
ATCC 90112	19,51	R

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
Em verde *C. neoformans*, isolados de origem ambiental.

Condições do estudo: Pesquisa da Concentração inibitória mínima CIM em placas de microdiluição e leitura em 48 horas: resultado em %

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 (CFM)

**CIM: concentração inibitória mínima

***CFM: concentração fungicida mínima:

v/v: volume por volume em porcentagem

R: Resistente – presença de crescimento a 19,51%.

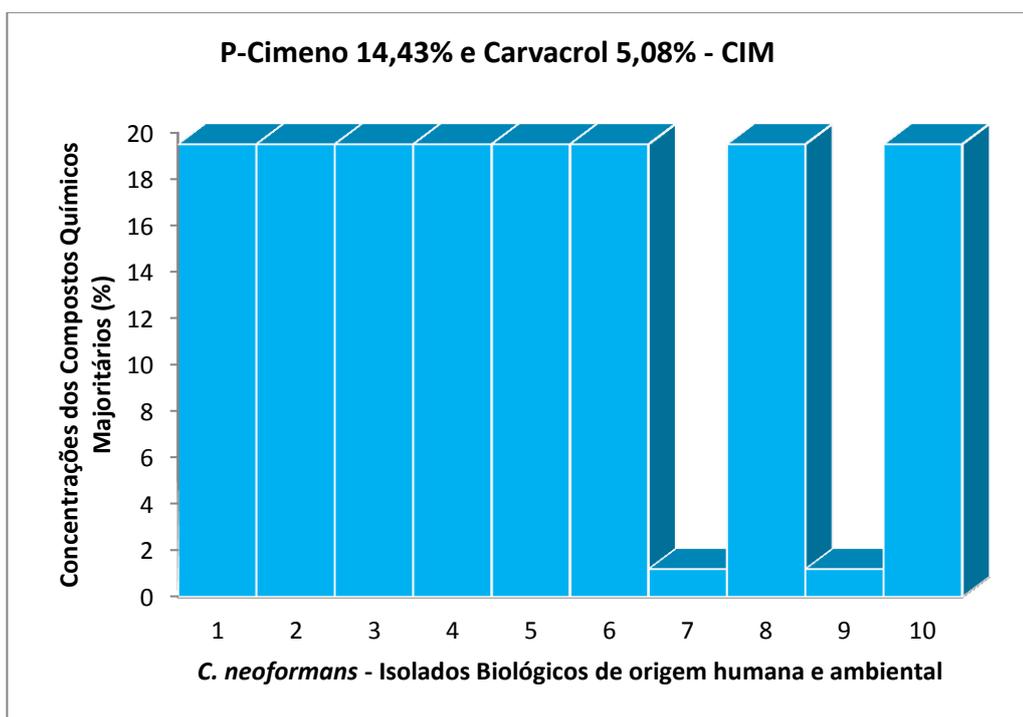


Gráfico 25. Concentrações inibitórias mínimas (CIM) da mistura dos compostos químicos majoritários de *T. vulgares* P-Cimeno 14,43% e Carvacrol a 5,08% (19,5%) sobre isolados de *C. neoformans* de origem humana e ambiental.

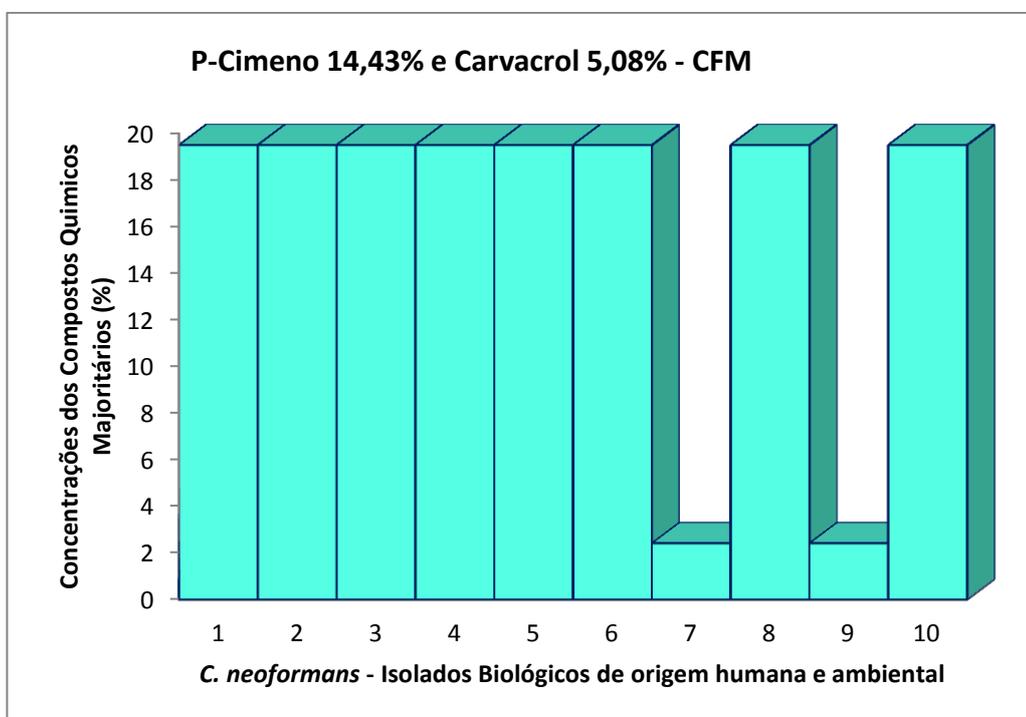


Gráfico 26. Concentrações fungicidas mínimas (CFM) da mistura dos compostos químicos majoritários de *T. vulgares* P-Cimeno 14,43% e Carvacrol a 5,08% (19,5%) sobre isolados de *C. neoformans* de origem humana e ambiental.

4.8.4 Mistura dos compostos químicos majoritários do óleo essencial de *T. vulgares*: P-Cimeno e Timol.

Na mistura dos compostos químicos majoritários do óleo essencial de *T. vulgaris* P-Cimeno 14,43% e Timol 62,13% (76,56%), apenas o isolado ICB 176, de origem ambiental foi sensível na concentração de 4,78%.

Os demais isolados testados foram resistentes a concentração de 76,56% (Tabelas 28) (Gráficos 27 e 28).

Os valores de CIM 50 e CIM 90 e CFM 50 e CFM90 para a esta mistura, nos 10 isolados foi de 76,56% (Tabela 25).

Tabela 28: Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) das misturas dos compostos químicos majoritários do óleo essencial *T. vulgaris* - P-cimeno 14,43% e Timol a 62,13% (76,56%) sobre isolados de *C. neoformans* de origem humana e ambiental.

ISOLADOS BIOLÓGICOS	CONCENTRAÇÕES FUNGISTÁTICA E FUNGICIDA	
	CIM% (v/v)	*CFM% (v/v)
ICB 107	76,56	R
ICB 155	76,56	R
ICB 160	76,56	R
ICB 172	76,56	R
B 20	76,56	R
ICB 176	2,39	4,78
P9 A7	76,56	R
P17 A9	76,56	R
P10 B8	76,56	R
P17 B5	76,56	R
Cepas Padrão		
ICB 163 – D	19,14	38,28
ATCC 90112	9,57	19,14

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
Em verde *C. neoformans*, isolados de origem ambiental.

Condições do estudo: Pesquisa da Concentração inibitória mínima CIM em placas de microdiluição e leitura em 48 horas: resultado em %

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 (CFM)

**CIM: concentração inibitória mínima

***CFM: concentração fungicida mínima:

v/v: volume por volume em porcentagem

R: Resistente – presença de crescimento a 76,56%.

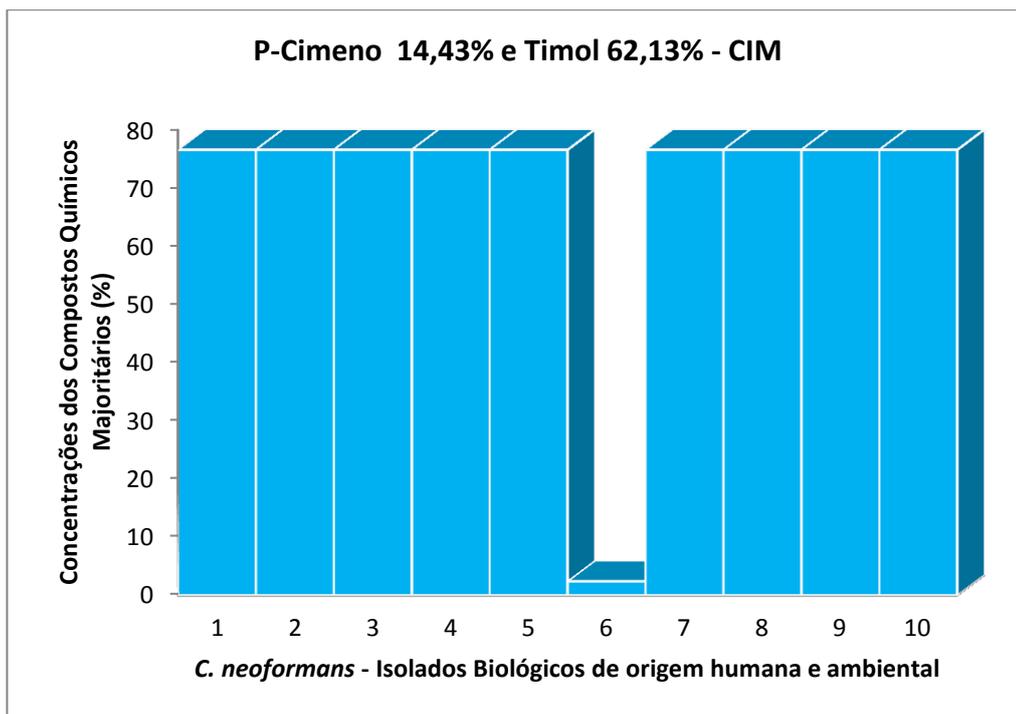


Gráfico 27. Concentrações inibitórias mínimas (CIM) da mistura dos compostos majoritários de *T. vulgares* P-Cimeno a 14,43% e Timol a 62,13% (76,56%) sobre isolados de *C. neoformans* de origem humana e ambiental.

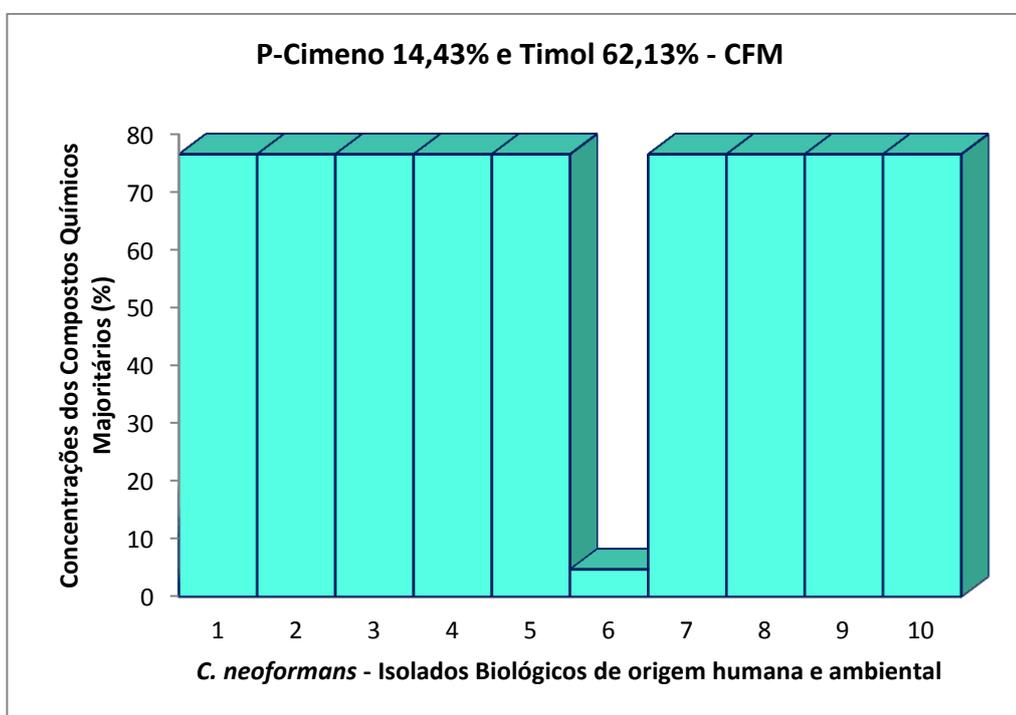


Gráfico 28. Concentrações fungicidas mínimas (CFM) da mistura dos compostos majoritários de *T. vulgares* P-Cimeno a 14,43% e Timol a 62,13% (76,56%) sobre isolados de *C. neoformans* de origem humana e ambiental.

4.8.5 Mistura dos compostos químicos majoritários do óleo essencial de *T. vulgares*: Linalol e Timol.

Na mistura dos compostos químicos majoritários do óleo essencial de *T. vulgaris* Linalol 8,49% e Timol 62,13% (70,62%), apenas o isolado ICB 176, de origem ambiental foi sensível a concentração de 1,1%. (Tabelas 29) (Gráficos 29 e 30).

Os valores de CIM 50 e CIM 90 para esta mistura nos 10 isolados 17,6% e 35,31% respectivamente. A CFM 50 e CFM90 foram de 35,31% e 70,62% respectivamente (Tabela 25).

Tabela 29: Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) das misturas dos compostos químicos majoritários do óleo essencial *T. vulgaris* - Linalol 8,49% e Timol 62,13% (70,62%) sobre isolados de *C. neoformans* de origem humana e ambiental.

ISOLADOS BIOLÓGICOS	CONCENTRAÇÕES FUNGISTÁTICA E FUNGICIDA	
	CIM% (v/v)	*CFM% (v/v)
ICB 107	8,82	17,6
ICB 155	17,6	35,31
ICB 160	35,31	70,62
ICB 172	35,31	70,62
B 20	17,6	35,31
ICB 176	0,55	1,1
P9 A7	35,31	70,62
P17 A9	17,6	35,31
P10 B8	17,6	35,31
P17 B5	35,31	70,62
Cepas Padrão		
ICB 163 – D	17,6	35,31
ATCC 90112	17,6	35,31

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
Em verde *C. neoformans*, isolados de origem ambiental.

Condições do estudo: Pesquisa da Concentração inibitória mínima CIM em placas de microdiluição e leitura em 48 horas: resultado em %.

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 (CFM)

**CIM: concentração inibitória mínima

***CFM: concentração fungicida mínima:

v/v: volume por volume em porcentagem

R: Resistente – presença de crescimento a 70,62%.

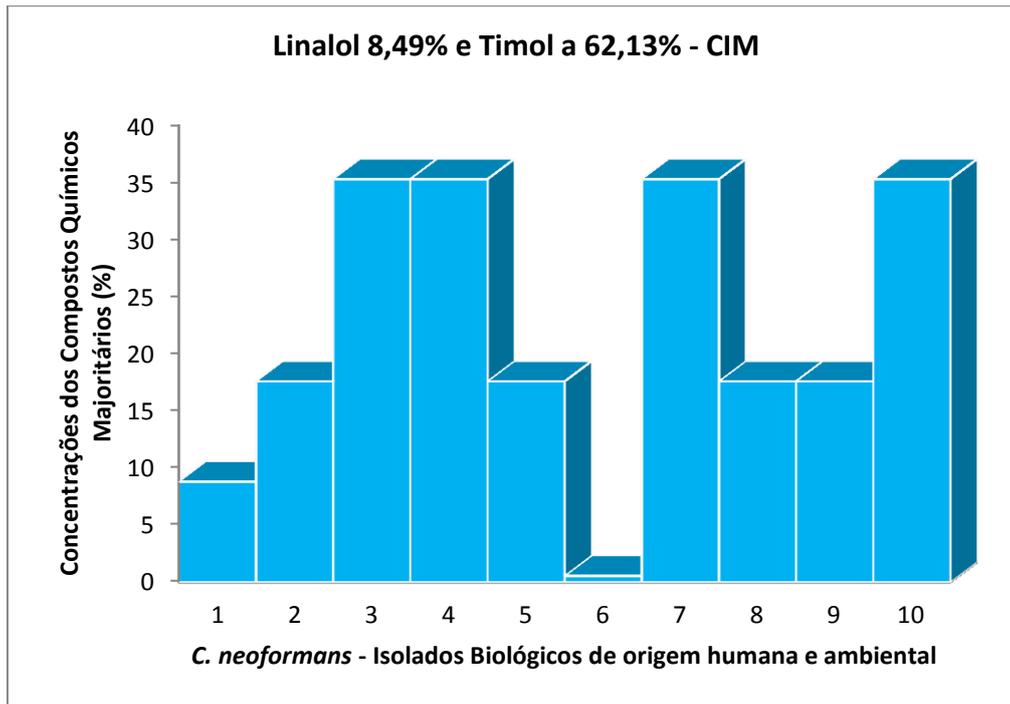


Gráfico 29. Concentrações inibitórias mínimas (CIM) da mistura dos compostos químicos majoritário de *T. vulgares* Linalol 8,49% e Timol 62,13% (70,62%) sobre isolados de *C. neoformans* de origem humana e ambiental

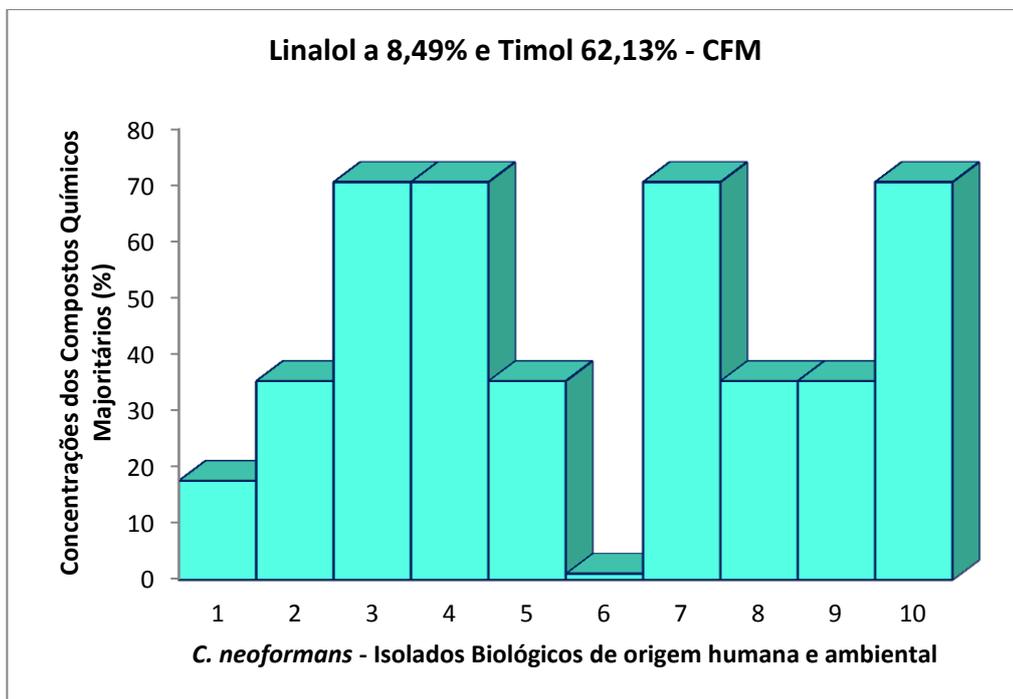


Gráfico 30. Concentrações fungicidas mínimas (CFM) da mistura dos compostos químicos majoritário de *T. vulgares* Linalol 8,49% e Timol 62,13% (70,62%) sobre isolados de *C. neoformans* de origem humana e ambiental

4.8.6 Mistura dos compostos químicos majoritários do óleo essencial de *T. vulgares*: Linalol e Carvacrol.

Na mistura dos compostos químicos majoritários do óleo essencial de *T. vulgaris* Linalol 8,49% e Carvacrol a 5,08% (13,57%) apenas os isolados B20 e P9A7, de origem ambiental foram sensíveis a concentração de 0,1% e 3,3% respectivamente. Os demais isolados e as cepas padrão ICB163D e ATCC 90112 foram resistentes na concentração de 13,57% (Tabelas 30) (Gráficos 31 e 32).

Os valores de CIM 50 e CIM 90 e CFM 50 e CFM90 para esta mistura nos 10 isolados foram 13,57% respectivamente. (Tabela 25).

Tabela 30: Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) das misturas dos compostos químicos majoritários do óleo essencial *T. vulgaris* - Linalol 8,49% e Carvacrol 5,08% (13,57%) sobre isolados de *C. neoformans* de origem humana e ambiental

ISOLADOS BIOLÓGICOS	CONCENTRAÇÕES FUNGISTÁTICA E FUNGICIDA	
	CIM% (v/v)	*CFM% (v/v)
ICB 107	13,57	R
ICB 155	13,57	R
ICB 160	13,57	R
ICB 172	13,57	R
B 20	0,05	0,1
ICB 176	13,57	R
P9 A7	1,69	3,3
P17 A9	13,57	R
P10 B8	13,57	R
P17 B5	13,57	R
Cepas Padrão		
ICB 163 – D	13,57	R
ATCC 90112	13,57	R

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

Em verde *C. neoformans*, isolados de origem ambiental.

Condições do estudo: Pesquisa da Concentração inibitória mínima CIM em placas de microdiluição e leitura em 48 horas: resultado em %

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 (CFM)

**CIM: concentração inibitória mínima

***CFM: concentração fungicida mínima:

v/v: volume por volume em porcentagem

R: Resistente – presença de crescimento a 13,57%.

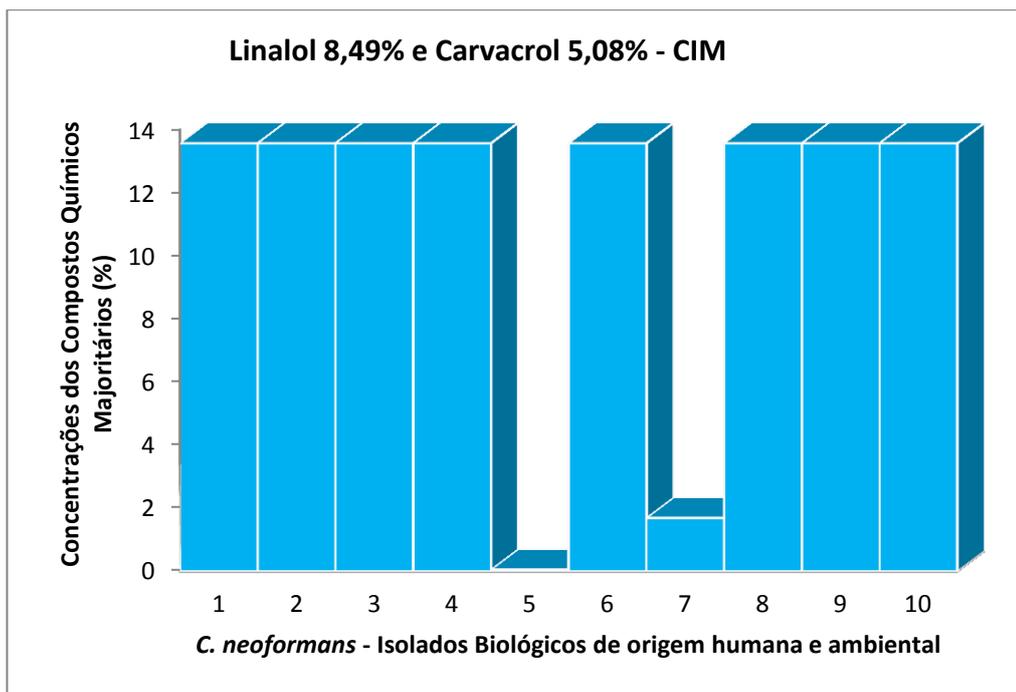


Gráfico 31. Concentrações inibitórias mínimas (CIM) da mistura dos compostos químicos majoritários de *T. vulgares* Linalol 8,49% e Carvacrol 5,08% (13,57%) sobre isolados de *C. neoformans* de origem humana e ambiental

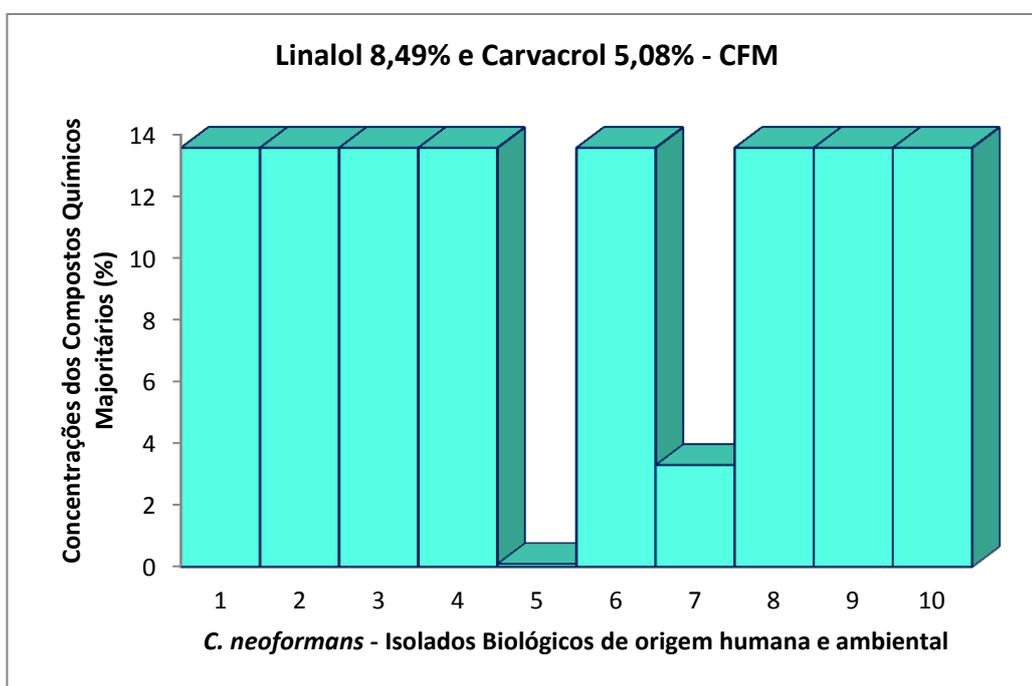


Gráfico 32. Concentrações fungicidas mínimas (CFM) da mistura dos compostos químicos majoritários de *T. vulgares* Linalol 8,49% e Carvacrol 5,08% (13,57%) sobre isolados de *C. neoformans* de origem humana e ambiental

4.8.7 Mistura dos compostos químicos majoritários do óleo essencial de *T. vulgares*: Timol e Carvacrol.

Na mistura dos compostos químicos majoritários do óleo essencial de *T. vulgaris* Timol 62,12% e Carvacrol 5,08% (67,21%), apenas o isolado P9A7, de origem ambiental foi sensível a concentração de 1,05%. Não ocorreram isolados resistentes a esta mistura. As cepas padrão ICB163D e ATCC 90112 foram sensíveis as concentrações de 33,6% e 16,8% respectivamente (Tabelas 31) (Gráficos 33 e 34).

Os valores de CIM 50 e CIM 90 para a mistura de Timol 62,12% e Carvacrol 5,08% (67,21%) nos 10 isolados foram 4,2% e 16,8% respectivamente. A CFM 50 e CFM90 para esta mistura foram de 8,4% e 33,6% respectivamente (Tabela 25).

Tabela 31: Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) das misturas dos compostos químicos majoritários do óleo essencial *T. vulgaris* - Timol 62,12% e Carvacrol 5,08% (67,21%) sobre isolados de *C. neoformans* de origem humana e ambiental.

ISOLADOS BIOLÓGICOS	CONCENTRAÇÕES FUNGISTÁTICA E FUNGICIDA	
	CIM% (v/v)	*CFM% (v/v)
ICB 107	4,2	8,4
ICB 155	8,4	16,8
ICB 160	1,05	2,1
ICB 172	16,8	33,6
B 20	4,2	8,4
ICB 176	2,1	4,2
P9 A7	0,5	1,05
P17 A9	8,4	16,8
P10 B8	8,4	16,8
P17 B5	16,8	33,6
Cepas Padrão		
ICB 163 – D	16,8	33,6
ATCC 90112	8,4	16,8

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

Em verde *C. neoformans*, isolados de origem ambiental.

Condições do estudo: Pesquisa da Concentração inibitória mínima CIM em placas de microdiluição e leitura em 48 horas: resultado em %

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 (CFM)

**CIM: concentração inibitória mínima

***CFM: concentração fungicida mínima:

v/v: volume por volume em porcentagem

R: Resistente – presença de crescimento a 67,21%.

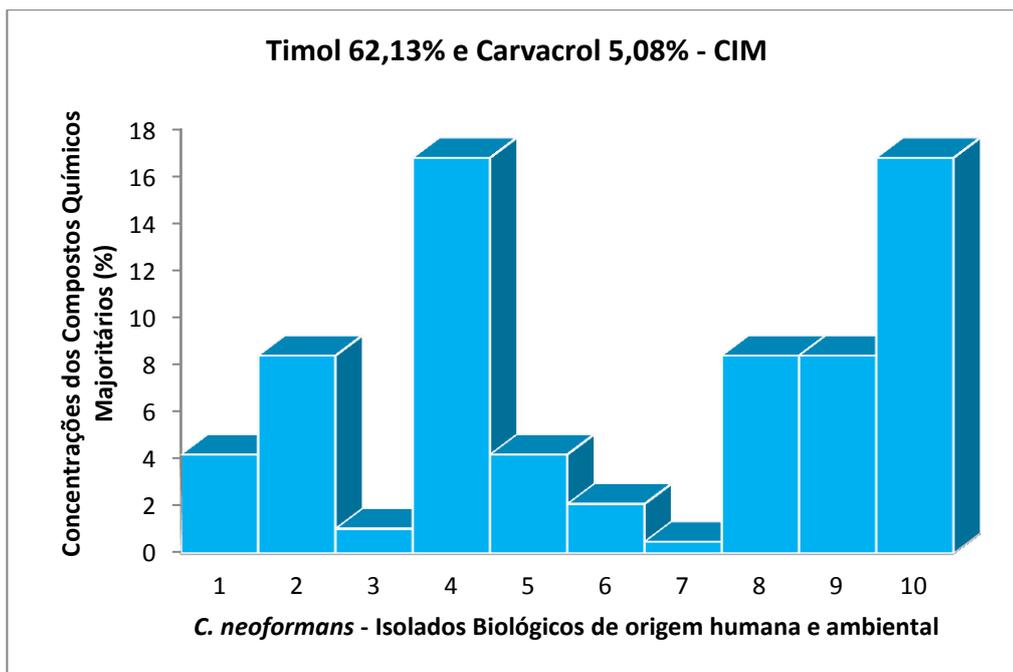


Gráfico 33. Concentrações inibitórias mínimas (CIM) da mistura dos compostos químicos majoritários Timol 62,12% e Carvacrol 5,08% (67,21%) sobre isolados de *C. neoformans* de origem humana e ambiental

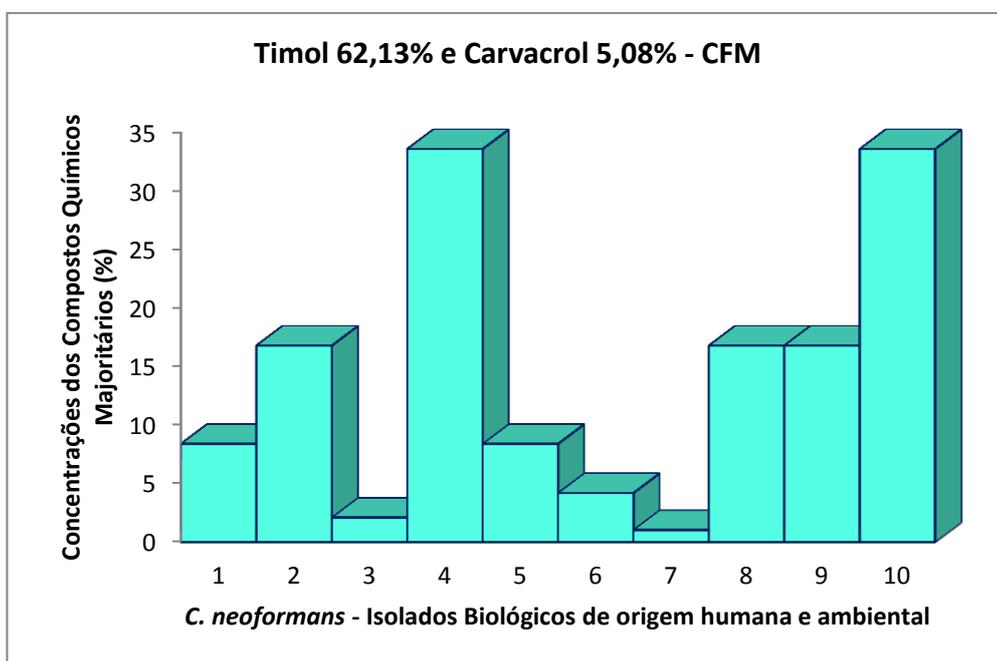


Gráfico 34. Concentrações fungicidas mínimas (CFM) da da mistura dos compostos químicos majoritários de *T. vulgares* Timol 62,12% e Carvacrol 5,08% (67,21%) sobre isolados de *C. neoformans* de origem humana e ambiental

4.8.8 Mistura dos compostos químicos majoritários do óleo essencial de *T. vulgaris* Timol, Carvacrol, Linalol e P-Cimeno.

Na mistura dos compostos químicos majoritários do óleo essencial de *T. vulgaris* Timol 62,13%, Carvacrol 5,08%, P-Cimeno 14,43% e Linalol 8,49% (90,13%), o isolado ICB 176, de origem ambiental foi sensível a concentração de 0,04%. Não ocorreram isolados resistentes a esta mistura. As cepas padrão ICB163D e ATCC 90112 foram sensíveis a concentração de 45,06% e 22,5% respectivamente (Tabelas 32) (Gráficos 35 e 36).

Os valores de CIM 50 e CIM 90 para esta mistura nos 10 isolados foram 1,4% e 45,06% respectivamente. A CFM 50 e CFM90 para esta mistura foram 2,81% e 90,13% respectivamente (Tabela 25).

Tabela 32: Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) das misturas dos compostos químicos majoritários do óleo essencial *T. vulgaris* - Timol 62,13%, Carvacrol 5,08%, P-Cimeno 14,43% e Linalol 8,49% (90,13%) sobre isolados de *C. neoformans* de origem humana e ambiental.

ISOLADOS BIOLÓGICOS	CONCENTRAÇÕES FUNGISTÁTICA E FUNGICIDA	
	CIM% (v/v)	*CFM% (v/v)
ICB 107	1,4	2,81
ICB 155	22,5	45,06
ICB 160	1,4	2,81
ICB 172	45,06	90,13
B 20	0,7	1,4
ICB 176	0,02	0,04
P9 A7	22,5	45,06
P17 A9	45,06	90,13
P10 B8	22,5	45,06
P17 B5	0,7	1,4
Cepas Padrão		
ICB 163 – D	22,5	45,06
ATCC 90112	11,2	22,5

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

Em verde *C. neoformans*, isolados de origem ambiental.

Condições do estudo: Pesquisa da Concentração inibitória mínima CIM em placas de microdiluição e leitura em 48 horas: resultado em %

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 (CFM)

**CIM: concentração inibitória mínima

***CFM: concentração fungicida mínima:

v/v: volume por volume em porcentagem

R: Resistente – presença de crescimento a 90,13%

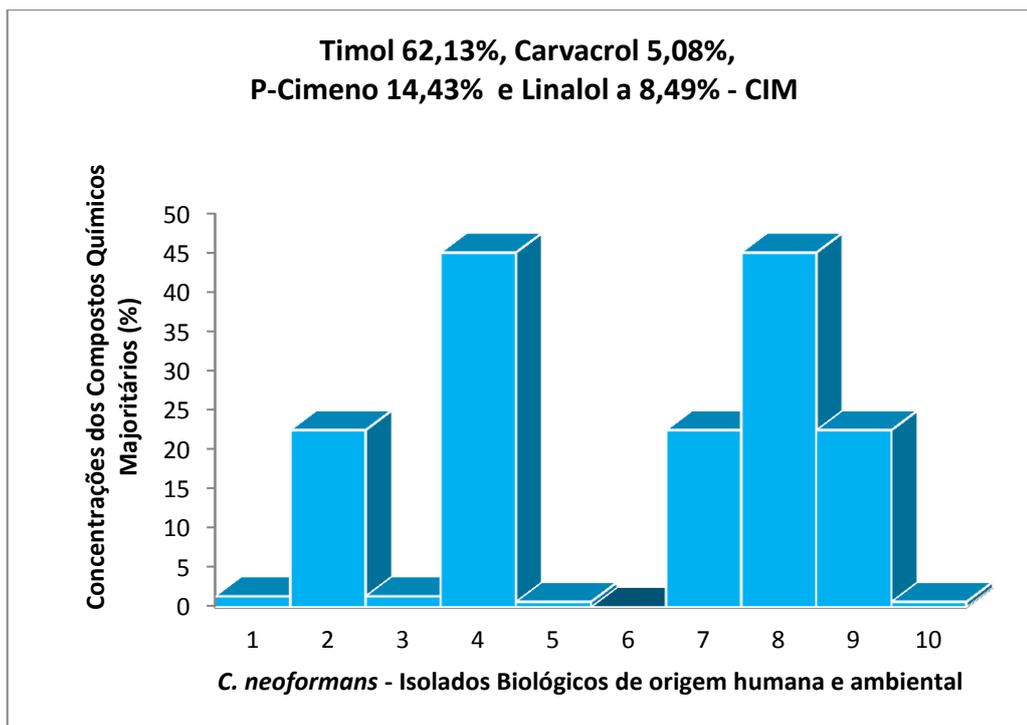


Gráfico 35. Concentrações inibitórias mínimas (CIM) da mistura dos compostos químicos majoritários de *T. vulgares* Timol 62,13%, Carvacrol 5,08%, P-Cimeno 14,43% e Linalol 8,49% (90,13%) sobre isolados de *C. neoformans* de origem humana e ambiental

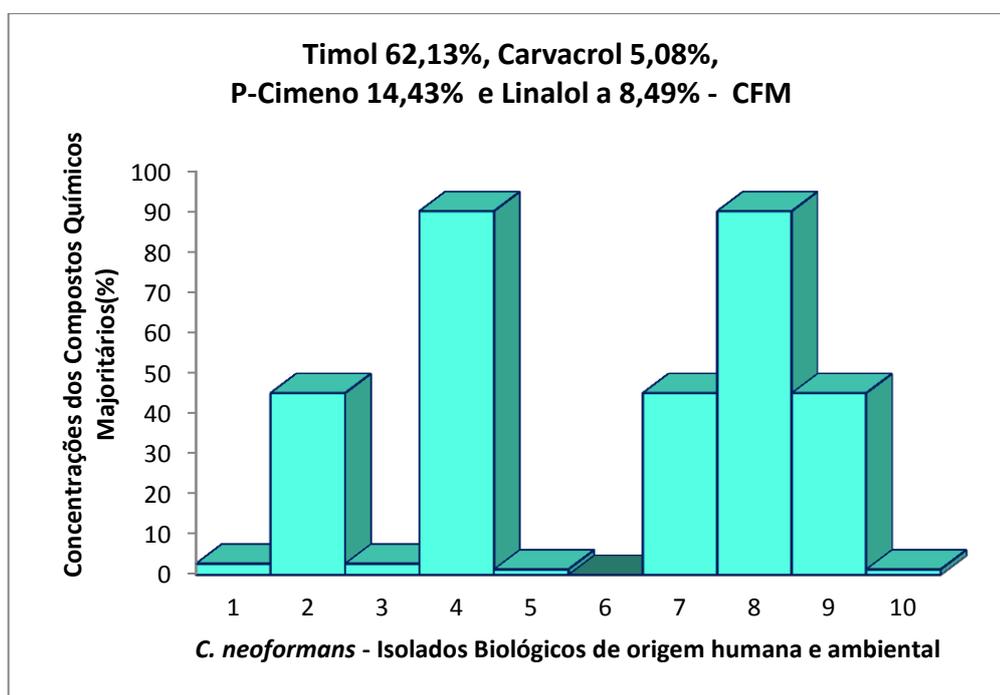


Gráfico 36. Concentrações fungicidas mínimas (CFM) da mistura dos compostos químicos majoritários de *T. vulgares* Timol 62,13%, Carvacrol 5,08%, P-Cimeno 14,43% e Linalol 8,49% (90,13%) sobre isolados de *C. neoformans* de origem humana e ambiental.

4.8.9 Valores CIM50/CIM90 e CFM50/CFM90 das misturas dos compostos químicos majoritários dos óleos essenciais de *E. caryophyllus* e *T. vulgaris* sobre isolados de *C. neoformans* de origem humana e ambiental

Na tabela 33 observam-se os valores CIM50/CIM90 e CFM50/CFM90 das misturas dos compostos químicos majoritários dos óleos essenciais de *E. caryophyllus* e *T. vulgaris* sobre isolados de *C. neoformans* de origem humana e ambiental

Tabela 33 Valores CIM50/CIM90 e CFM50/CFM90 para a mistura dos compostos químicos majoritários do óleo essencial *E. caryophyllus* – Eugenol 84,10% e β -cariofileno 12,67%; *T. vulgaris* - Timol 62,13%, Carvacrol 5,08%, P-Cimeno 14,43% e Linalol 8,49% sobre isolados de *C. neoformans* de origem humana e ambiental.

Compostos Químicos Majoritários	CIM 50* % (v/v)	CIM 90** % (v/v)	CFM 50*** % (v/v)	CFM 90**** % (v/v)
Eugenol 84,10% + β -cariofileno 12,67%	48,38	96,77	96,77	96,77
P-Cimeno 14,43% + Linalol 8,49%	22,92	22,92	22,92	22,92
P-Cimeno 14,43% + Carvacrol 5,08%	19,51	19,51	19,51	19,51
P-Cimeno 14,43% + Timol 62,13%	76,56	76,56	76,56	76,56
Linalol 8,49% + Timol 62,13%	17,6	35,31	35,31	70,62
Linalol 8,49% + Carvacrol 5,08%	13,57	13,57	13,57	13,57
Timol 62,13% + Carvacrol 5,08%	4,2	16,8	8,4	33,6
Ti + Car+ Lin+ P-Ci	1,4	45,06	2,81	90,13

Condições do estudo: Pesquisa da Concentração inibitória mínima CIM e CFM em placas de microdiluição e leitura em 48 horas: resultado em %

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

CFM: concentração fungicida mínima

***CFM50 CFM de um antifúngico capaz de inibir o crescimento de 50% dos Isolados.

****CFM90 CFM de um antifúngico capaz de inibir o crescimento de 90% dos Isolados

v/v: volume por volume em porcentagem

5. DISCUSSÃO

C. neoformans

C. neoformans é um dos agentes etiológicos da criptococose, comumente encontrado no sistema nervoso central (SNC) (Lindenberg *et al.*, 2008; McCarthy *et al.*, 2008; Thakur *et al.*, 2008).

A criptococose é uma doença grave que pode ocorrer em indivíduos imunocompetentes, mas principalmente em pacientes imunocomprometidos, sobretudo os pacientes HIV positivos (McCarthy *et al.*, 2008). Sua prevalência varia de 2,9% a 13,3% representando importante causa de mortalidade na AIDS, apesar do tratamento específico (Junior *et al.*, 2006). É a segunda doença neurológica com prevalente em pacientes brasileiros com AIDS (Vidotto *et al.*, 2006; Martins *et al.*, 2007; Pappalardo *et al.*, 2007). A cultura de líquido é positiva em 89% dos pacientes sem infecção por HIV e em 95% a 100% dos pacientes com AIDS. A hemocultura pode revelar a presença do fungo no sangue em caso de doença disseminada. O índice de mortalidade da criptococose no SNC é de 15 a 30%, mesmo com o tratamento (Charlier *et al.*, 2008).

Mundialmente estima-se que a cada ano ocorra o óbito de aproximadamente dois milhões de pessoas em função de doenças relacionadas à AIDS. À medida que a epidemia do HIV foi se espalhando nos anos 80, a criptococose emergiu como uma importante infecção oportunista nos EUA, Europa e Austrália, ocorrendo em 5% a 10% dos indivíduos com AIDS. A criptococose associada ao HIV é atualmente um problema nos países em desenvolvimento, cujos indivíduos se apresentam muitas vezes no último estágio da infecção pelo HIV, devido ao limitado acesso aos recursos de saúde. Os casos de criptococose diminuíram ao longo dos anos 90, primeiramente pela introdução dos azóis (antifúngicos utilizados no tratamento de infecções fúngicas graves) e seguidamente pela introdução da Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART), uma combinação de várias drogas antirretrovirais, utilizadas no tratamento da AIDS, conhecido popularmente como “coquetel antirretroviral” (Pinto, 2010; Costa *et al.*, 2014).

Cryptococcus spp são leveduras, capsuladas, saprófitas do ambiente, sendo isoladas principalmente de excretas de aves e ocos de árvores, como por exemplo, eucalipto e *Senna sp.* (Costa *et al*, 2009). *C. neoformans* é constituído pelos sorotipos A, D e o híbrido AD (Kwon-Chung & Varma, 2006). Para produzirem infecções dispõem de numerosos fatores de virulência, como a presença de cápsula polissacarídica, a habilidade de produzir melanina, urease, capacidade de crescimento a 37°C e outros fatores como dimorfismo e produção de exoenzimas, (D'Souza & Heitman 2001; Steenbergen & Casadevall 2003; Casadevall 2006; Leach & Cowen 2013)

Exoenzimas têm sido implicadas tanto à virulência como nas propriedades antifagocíticas (Perfect & Casadevall, 2002) descritas anteriormente com intensa atividade na produção destas exoenzimas (Coutinho, 2006; Campos & Baroni, 2010).

Atividade enzimática

A produção de exoenzimas reflete o grau de virulência de um microrganismo. A exoenzima proteinase degrada tecidos do hospedeiro e destroem queratina, colágeno, albumina, fibronectina, hemoglobina e proteínas da matriz extracelular bem como proteínas importantes para o sistema imune, digerindo as imunoglobulinas e parte do sistema complemento no local da infecção (Casadevall & Perfect, 1998). Campos & Baroni (2010), relatam que quanto maior o potencial de virulência manifestado nos diferentes mecanismos dessa virulência utilizados pelo microrganismo, associado a quadros de imunodepressão do hospedeiro, aumenta a possibilidade de penetração da levedura e conseqüente infecção dos diferentes tecidos do paciente. 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 de proteinase (Baroni, 2001). Em um estudo com 116 amostras de *C. neoformans* isoladas do sistema nervoso central de cães, todas foram produtoras de proteinase e fosfolipase (Campos & Baroni, 2010).

A exoenzima fosfolipase atua na hidrólise dos fosfolipídios dando origem a lisofosfolipídios que causam dano à célula epitelial levando a lise celular (Santangelo *et al.*, 1999). Além disso, destrói substâncias surfactantes nos pulmões, facilitando a adesão da levedura (Vidotto *et al.*, 1996; Karkowska-Kuleta *et al.*, 2009). 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 glicerofosfolipídios. Ainda não está claro como essas enzimas contribuem na patogênese, mas é sabido que elas facilitam a invasão das barreiras ricas em fosfolipídios, 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 a degradação da membrana celular (Schmiel & Miller, 1999).

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. *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 enzima fosfolipase foi positiva em 90% das cepas de *C. neoformans* isoladas de excretas de pombos.

A produção de proteinase e fosfolipase foram avaliadas antes e após contato com os óleos essenciais de *E. caryophyllus*, *Thymus vulgaris* e seus respectivos compostos químicos majoritários.

Após contato com os óleos essenciais e seus respectivos compostos químicos majoritários, a pesquisa da produção de exoenzimas foi realizada nas concentrações sub-inibitórias das cepas padrão de *C. neoformans* ICB 163 D, ATCC 90112 e de cada isolado testado. Como controle de produção das exoenzimas, isolados sem o contato com os óleos essenciais e seus respectivos compostos foram avaliados simultaneamente.

Neste estudo os óleos essenciais de *E. caryophyllus*, *T. vulgaris* e seus compostos químicos majoritários, inibiram a produção destas exoenzimas, nas cepas padrão de *C. neoformans* ICB 163, ATCC 90112 e em todos os isolados testados.

Khan *et al* (2014) destacaram a atividade de óleos de *Carum copticum* e *T. vulgaris* sobre os fatores de virulência como a produção de proteinase e hemolisina e a formação de biofilmes produzido por cepas de *Candida spp* resistentes a medicamentos. Os autores utilizaram 18 isolados biológicos de origem humana e quatro cepas padrão e após os testes observaram que os óleos essenciais testados foram capazes de reduzir a produção de proteinases em 70% dos isolados analisados, assim como a produção de hemolisina e formação de biofilme. Os autores relatam que a atividades destes óleos pode ser devido principalmente ao composto timol presente em ambos os óleos essenciais testados.

A importância de se estudar as exoenzimas proteinase e fosfolipase está relacionada com o fato destas estarem envolvidas com a patogênese da infecção produzidas pelas leveduras. Porém, são poucos os pesquisadores que estudam a produtos naturais com atividade inibitória ou promotora da produção destas enzimas sobre *C. albicans*. (Polachini, 2004; Abrahão, 2007; Oliveira 2007, Silva, 2007 e Araújo, 2015). Quanto a *C. neoformans* não foram encontrados estudos sobre este tema sendo este um dos primeiros e com resultados promissores quando expostos aos óleos essenciais de *E. caryophyllus* e *T. vulgaris* e seus compostos químicos majoritários.

Pesquisa de Cápsula

Há um consenso entre a comunidade científica de que a cápsula é o principal fator de virulência de *Cryptococcus spp.* com base no fato de que

cepas mutantes não-encapsuladas são não-virulentas (Chang & Kwon-Chung, 1994).

Ao serem inalados, os propágulos fúngicos de maneira geral não apresentam cápsula, mas ao serem depositados nos alvéolos, ocorre rapidamente a síntese capsular (Giles *et al.*, 2009; Velagapudi *et al.*, 2009) seguido do aumento de tamanho, o que confere vantagens para sobrevivência do fungo, frente ao hospedeiro (Zaragoza *et al.*, 2009; Coelho *et al.*, 2014).

No hospedeiro, os componentes polissacarídeos da cápsula, sobretudo GXM, desempenham papel fundamental na modulação da resposta imune por diversos mecanismos tais como, inibição da fagocitose pelos macrófagos, alteração de citocinas, neutralização de opsoninas, bloqueio da quimiotaxia de células de defesa, inativação da via clássica do sistema complemento, inibição da produção de anticorpos e interferência na apresentação de antígenos (Casadevall 1998; McFadden *et al.*, 2006; Mershon-Shier *et al.*, 2011; Vecchiarelli *et al.*, 2013; Coelho *et al.*, 2014).

No meio ambiente, a cápsula confere proteção contra desidratação e predadores naturais (McFadden *et al.*, 2006; O'Meara & Alspaugh, 2012). Durante uma infecção, reduz a resposta imune do hospedeiro, inibe a migração de leucócitos e a apresentação de antígenos por monócitos, dificulta a fagocitose e atua como proteção frente a espécies reativas de oxigênio (Zaragoza *et al.*, 2003; Zaragoza & Casadevall, 2004; McFadden *et al.*, 2006; O'Meara & Alspaugh, 2012). Isolados ambientais apresentam tamanho de cápsula reduzido, mesmo em condições padronizadas em laboratório, com cultivo em meio rico em nutrientes (Zaragoza & Casadevall, 2004; McFadden *et al.*, 2006). No hospedeiro, as células de *Cryptococcus* spp. apresentam grande aumento de tamanho da cápsula e observa-se diferença de tamanho conforme órgão analisado em indivíduo acometido, assim como células isoladas de pulmão apresentam cápsulas maiores do que as células isoladas de cérebro (Zaragoza *et al.*, 2003). Isso demonstra a dinâmica desta estrutura e sua aprimorada regulação a diferentes ambientes (O'Meara & Alspaugh, 2012).

A pesquisa da cápsula foi realizada com tinta nanquim e observada ao microscópio de luz. Esta é uma técnica amplamente utilizada, rápida, de baixo custo e que não exige tecnologia avançada (Severo *et al.*, 2009). Neste estudo todas as leveduras apresentavam cápsula, mas após contato com os óleos

essenciais de *E. caryophyllus*, *T. vulgaris* e seus compostos químicos majoritários, a cápsula foi reduzida ou inibida, assim como as células apresentaram alteração no tamanho e na forma, nas cepas padrão de *C. neoformans* ICB 163 D, ATCC 90112 e em todos os isolados testados. Não foram encontradas pesquisas sobre a atividade de produtos naturais sobre a produção de cápsula.

Óleos essenciais

Estudos vêm apontando as valiosas propriedades terapêuticas de óleos essenciais de plantas sobre as leveduras patogênicas (Villon & Chaumont, 1994; Carmo *et al.*, 1998; Alves *et al.*, 2000; Araujo, 2004; Lemos *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2008; Araujo *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2009; Zuzarte *et al.*, 2011).

Os óleos essenciais constituem os elementos voláteis contidos em diferentes órgãos da planta e estão relacionados com diversas funções necessárias à sua sobrevivência (Oliveira *et al.*, 2006). Bhavanani & Ballou (1992), relataram que cerca de 60% dos óleos essenciais possuem propriedades antifúngicas e 35% exibem propriedades antibacterianas. Os óleos essenciais são originários do metabolismo secundário das plantas e possuem composição química complexa, destacando-se a presença de terpenos e fenilpropanóides (Gonçalves *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2003).

A crescente preocupação com a resistência e com a toxicidade dos antifúngicos, fez surgir importantes estudos relacionados com atividade antifúngica de produtos de origem vegetal, destacando-se entre eles os realizados por Coutinho *et al.*, 2009, Zapata *et al.*, 2010, Yaya *et al.*, 2011, Oliveira *et al.*, 2011; os quais testaram compostos derivados de produtos naturais contra várias espécies fúngicas. A tendência atual nas pesquisas com produtos naturais é a obtenção de princípios ativos contidos nas espécies vegetais para uma possível aplicação no tratamento de infecções causadas por microrganismos, entre eles, os fungos.

Os óleos essenciais são compostos químicos oriundos do metabolismo secundário das espécies vegetais, constituindo uma rica fonte de compostos biologicamente ativos. São conhecidos desde a antiguidade por possuir propriedades antifúngicas cuja utilização pode representar um avanço contra

os mecanismos de resistência que inativam antifúngicos padrões (Castro, 2010; Saad *et al.*, 2010). Assim, a descoberta de produtos naturais com princípios ativos de atividade antifúngica pode representar uma nova ferramenta à produção e o uso de fitoterápicos no combate aos agentes infecciosos (Silva *et al.*, 2009; Khan *et al.*, 2012).

A maioria dos óleos essenciais e seus metabólitos secundários de plantas foram estudados apenas no aspecto do aroma e química das fragrâncias para uso exclusivo em alimentos aromáticos e bebidas. Atualmente, os óleos essenciais e seus compostos vêm ganhando destaque devido à sua posição como produto natural, grande aceitação pelos consumidores, potencial de utilização multifuncional e aos riscos que os aditivos sintéticos possam causar. Estudos têm relatado propriedades antioxidantes de óleos essenciais, referindo-os como potenciais substitutos para os antioxidantes sintéticos e em alguns casos, sugerindo-os para uma aplicação direta em alimentos, lavouras, produtos farmacêuticos e cosméticos (Andrade *et al.*, 2012).

Os óleos essenciais são conhecidos pelo caráter hidrofóbico, o que permite interação com estruturas lipídicas, aumentando a permeabilidade celular, provocando danos irreversíveis à célula (Nascimento *et al.*, 2007).

Há alguns anos já se tem relatos de estudos envolvendo óleos essenciais e seus compostos com potencial atividade antimicrobiana. Óleos essenciais como *E. caryophyllus* e *T. vulgaris* apresentam esse potencial.

Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais

Os óleos essenciais são constituídos por uma mistura complexa de diversas classes de substâncias pertencentes ao metabolismo secundário das plantas. O metabolismo secundário por sua vez pode ser influenciado, dentre outros, por fatores genéticos, climáticos (temperatura, intensidade de luz, efeito sazonal, etc.) e edáficos (Morais, 2009).

Óleos essenciais são frequentemente extraídos das partes vegetais através de arraste a vapor d' água, hidro destilação ou expressão de pericarpo de frutos cítricos, porém há outros métodos de extração como a enfleurage ou

enfloração, extração por CO₂ supercrítico (muito utilizado na indústria) e por solventes orgânicos apolares (não apresentam valor comercial).

Como já relatado a composição química dos óleos essenciais é determinada por fatores genéticos, porém, outros fatores podem acarretar alterações significativas na produção dos metabólitos secundários. Os metabólitos secundários representam uma interface química entre as plantas e o ambiente. Os estímulos decorrentes do ambiente, no qual a planta se encontra, podem redirecionar a rota metabólica, ocasionando a biossíntese de diferentes compostos. Dentre estes fatores, ressaltam-se as interações planta/microrganismos, planta/insetos e planta/planta; idade e estágio de desenvolvimento, fatores abióticos como luminosidade, temperatura, pluviosidade, nutrição, época e horário de coleta, bem como técnicas de colheita e pós – colheita. Estes fatores podem apresentar correlações entre si, não atuando isoladamente, podendo exercer influência conjunta no metabolismo secundário (Morais, 2009).

A temperatura e a luminosidade são relevantes na fotossíntese, pois a interação destes fatores garante um ambiente ideal para o processo fisiológico (Souza et al., 2008). As variações de temperatura são responsáveis pelas alterações na produção de metabólitos secundários. Os óleos essenciais, na maioria das vezes, apresentam um aumento em seu teor quando as plantas produtoras se encontram em ambientes com temperatura elevada, porém, em dias muito quentes, pode-se observar perda excessiva dos mesmos.

A intensidade luminosa influencia a concentração bem como a composição dos óleos essenciais. Como exemplo, o desenvolvimento dos tricomas glandulares (estruturas vegetais que biossintetizam e armazenam o óleo essencial) de *T. vulgaris* são processos dependentes de luz (Morais, 2009).

A sazonalidade pode interferir na composição química e no teor de óleo essencial. Kapur *et al.* (1982) observaram que ao destilarem folhas de *E. citriodora* Hk. durante um ano, a intervalos mensais, que a produção de óleo essencial foi mínima durante os meses de inverno (junho e julho), mas que aumentou gradualmente e permaneceu assim até os meses de setembro, outubro e novembro e alcançou o máximo de produção durante os meses mais

quentes (dezembro a fevereiro). Observaram que houve um pequeno declínio nos meses de março e abril.

A idade e o estágio de desenvolvimento da planta podem influenciar não apenas a quantidade total de metabólitos secundários produzidos, mas a proporção relativa destes compostos. Tecidos mais jovens geralmente apresentam grande atividade biossintética, aumentando a produção de vários compostos, dentre estes, os óleos essenciais (Morais, 2009).

Com relação ao horário de coleta, ao longo do dia, pode-se observar que o aroma característico de cada planta torna-se mais acentuado, sendo possível acreditar que a concentração de óleos essenciais seja maior naquele período, ou que esteja ocorrendo alteração na proporção relativa entre os componentes deste mesmo óleo essencial. Assim, o horário de coleta das plantas torna-se um aspecto relevante na produção de óleos essenciais. A colheita torna-se o ponto crítico, pois se faz necessário que se defina o momento ideal para a mesma. Todas as pesquisas na área de metabólitos secundários de plantas medicinais deveriam ter como o principal objetivo, coincidir o momento de maior expressão de princípio ativo, neste caso, dos óleos essenciais, com o momento de maior rendimento de fitomassa, obtendo-se assim, o tão esperado sucesso (Mattos, 1996).

Por ser a água essencial à vida e ao metabolismo das plantas, pressupõe-se que em ambientes mais úmidos a produção de metabólitos secundários seja maior, porém, isto nem sempre ocorre. A deficiência hídrica, caracterizada por diferentes formas e intensidades, é a principal causa de perda de produtividade (Ortolani & Camargo, 1987), porém, apresenta correlação direta na concentração de metabólitos secundários, havendo relatos na literatura de que o estresse hídrico geralmente induz um aumento na produtividade de alguns terpenóides.

Estudos realizados com o objetivo de avaliar a influência do estresse hídrico sobre a composição do óleo essencial de *Ocimum basilicum* demonstraram que, sob condições de estresse, houve redução no rendimento de massa seca total, ocorrendo, porém, um rendimento de óleo essencial duas vezes maior. Os componentes do óleo essencial apresentaram alterações significativas, havendo redução no percentual de sesquiterpenos e aumento no percentual de linalol e metilchavicol (Simon *et al.*, 1992).

Martins *et al.* (1995), relata que a nutrição é um dos fatores que requerem maior atenção, pois o excesso ou a deficiência de nutrientes pode estar diretamente correlacionado à variação na produção de substâncias ativas. Como exemplo desta variação pode-se citar o fósforo que contribui para o aumento da concentração de óleos essenciais em coentro (*Coriandrum sativum*) e funcho (*Foeniculum vulgare*) Corrêa Jr. *et al.* (1994).

Morais, 2009 observa que a alteração dos compostos majoritários nos óleos essenciais, sejam por fatores genéticos, técnicos bióticos ou abióticos, pode influenciar diretamente na qualidade e, conseqüentemente, nos resultados de tratamentos e de testes biológicos sobre patógenos humanos ou fitopatógenos, podendo levar entre os autores, divergência entre resultados provenientes de ensaios realizados com as mesmas espécies vegetais e patogênicas. Para minimizar estes equívocos nos resultados e evitar que dados não conclusivos sejam publicados, o ideal é que, juntamente com os ensaios para verificação da atividade biológica, seja realizada a análise química dos óleos essenciais avaliados, para que se possa obter a caracterização fitoquímica destes.

Pelo exposto neste trabalho fez-se opção por adquirir óleos essenciais comercializados por uma empresa que mostrou se preocupar com a obtenção de matérias-primas vegetais de qualidade, no país de origem da planta, possibilitando com isso a obtenção de óleos essenciais com composição química constante, e com resultados de atividades biológicas confiáveis.

Técnicas para os ensaios com óleos essenciais e compostos químicos

São várias as metodologias empregadas para a pesquisa da CIM dos óleos essenciais frente às leveduras tais como: difusão em ágar, difusão em disco, macrodiluição e microdiluição em caldo e as variações individuais como: tamanho do inóculo, temperatura, tempo de incubação e meio de cultura. Pelo exposto a comparação dos valores de CIM entre alguns estudos é dificultada.

A escolha do método de microdiluição em caldo para esta pesquisa deve-se ao fato deste método ser de baixo custo, sem necessidade de equipamentos complexos para leitura, ser mais sensível que outros métodos usados na literatura, requerem pequena quantidade de óleos essenciais, assim

como para seus respectivos compostos químicos majoritários testados, e ter boa reprodutibilidade (Ostrosky *et al.*, 2008).

Tensoativos e solventes

Nascimento *et al.* em 2007 relata que para uma boa qualidade das análises com óleos essenciais, tornou-se comum a utilização de solventes, detergentes ou agentes emulsificadores como o Tween 20, Tween 80, DMSO e o etanol, para dispersão dos óleos essenciais no meio de cultura. As propriedades deste agente auxiliam na visualização dos resultados da atividade antimicrobiana dos óleos, entretanto podem conduzir a possíveis interações com a substância testada, bem como produzirem atividade antimicrobiana.

Neste trabalho foram testados dois tensoativos polissorbatos (Tween 20, Tween 80) e um solvente dimetilsulfóxido (DMSO).

Tween (20 e 80): conhecidos como polissorbatos, são tensoativos hidrofílicos solúveis em água e empregados para obter emulsões do tipo óleo e água, como dispersantes ou solubilizantes de óleos. São surfactantes não iônicos, pouco tóxico para as membranas biológicas, constituídos por ésteres de ácidos graxos de polioxietileno sorbitol. Por outro lado, Giese *et al.*, 2004 relatam que estimulam a secreção de proteínas em microrganismos, além de alterar a morfologia e as superfícies da parede celular tanto de bactérias como de fungos. Fato esse observado neste estudo.

DMSO: conhecido como dimetil sulfóxido, composto que age como receptor de prótons em ligações de hidrogênio confere sua afinidade com a água. Por essa razão é considerado um solvente atrópico, um subproduto da madeira sendo comercializado como um solvente comercial desde 1953. Para substâncias como proteínas e esteroides, o DMSO atua consideravelmente melhor como solvente quando comparado com a água. Em concentrações a 20% ou menores, também pode ser utilizado como anti-congelante, já que sua ligação com o hidrogênio tende a formar uma matriz cristalina. Quando combinados com agentes tóxicos, a toxicidade do DMSO (que é relativamente baixa) aumenta significativamente. Facilita a penetração de substâncias

através das membranas biológicas. O DMSO é de fácil penetração na pele não causando danos irreversíveis na membrana, o que o faz ser diferente dos outros solventes penetrantes (Gaylord Chemical Company, LLC – Technical Bulletin reaction solvent dimethyl sulfoxide - DMSO, 2006).

Neste trabalho, os tensoativos Tween 20, Tween 80 e o solvente DMSO apresentaram atividade fungistática frente ao *C. neoformans*, conforme também relatado por Nascimento et al., 2007.

A pesquisa de cápsula foi realizada para os dois tensoativos e para o solvente. Embora sejam amplamente utilizados em estudos de sensibilidade antimicrobiana, foram observadas mudanças morfológicas nas células de levedura, assim como redução a inibição da produção de capsula polissacarídica das leveduras na presença dessas substâncias.

Também foi observada diferenças em relação à CIM dos emulsificadores, escolhendo-se o tensoativo Tween 20 para todos os ensaios, pelo fato da concentração ser a menor entre os dois emulsificadores (20% de polissorbatato), pela facilidade de homogeneização no meio de cultura, por não apresentar atividade fungicida. Apesar do Tween 80 apresentar os mesmos resultados que o Tween 20, não foi escolhido por ser mais concentrado e com isso ser de difícil homogeneização no meio de cultura. Nascimento, *et al* em 2007 recomenda a utilização do Tween 20 a 0,02% como emulsificador para os testes com óleo essencial.

Não foram encontrados trabalhos que relatassem a interferência destes tensoativos e solventes na produção de exoenzimas e da cápsula polissacarídica.

Ensaio com óleos essenciais e seus compostos químicos

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais e de seus compostos químicos isolados tem sido objeto de muitas pesquisas nos últimos anos e está relacionada com as características químicas, grupos funcionais e estereoquímica dos constituintes e os compostos oxigenados presentes nos óleos essenciais, em particular aqueles com estrutura fenólica (carvacrol, eugenol, timol), terpenóides alifáticos com grupamento éster (acetato de

geranila), álcool (linalol) ou aldeído (cinamaldeído) se destacam por apresentarem um bom potencial antimicrobiano (Henriques *et al.*, 2009).

Os terpenos ou terpenóides representam a maior classe de constituintes ativos em plantas, tendo mais de 30.000 substâncias descritas (Raven, 2001; Verpoeter & Maraschin; 2001). A classificação dos terpenos decorre do número de unidades isoprênicas que são formadas por átomos de carbono. Os monoterpenos contêm duas unidades isoprênicas (10 átomos de carbonos) são voláteis e encontrados frequentemente nos óleos essenciais (Larcher, 2000; Raven, 2001) assim como os sesquiterpenos que constituem uma classe de substâncias naturais com diversos núcleos estruturais (Brochini *et al.*, 1999). Os fatores ambientais na variabilidade de monoterpenos são de grande importância pelo fato dessas substâncias terem significado biossistemático, ecológico e evolutivo no organismo vegetal (Lima *et al.*, 2003).

Os compostos fenólicos de plantas se enquadram em diversas categorias, como fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados de ácidos benzóico e cinâmico), cumarinas, flavonóides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas (Souza *et al.*, 2007).

Chami *et al* (2005), estudaram o mecanismo de atividade anti-*Candida* dos principais componentes fenólicos de orégano e óleo essencial de cravo - carvacrol e eugenol. Avaliaram a eficácia terapêutica no tratamento da candidíase bucal experimental induzida por *C. albicans* em ratos imunossuprimidos. Carvacrol e eugenol foram fungicidas. Os resultados *in vitro* mostraram que tanto o carvacrol quanto o eugenol exerceram um efeito anti-*Candida* importante com danos a levedura. Esses compostos foram considerados eficazes no tratamento *in vivo* de candidíase bucal experimental, considerados como possíveis agentes antifúngicos.

Satureja timbra L. conhecido na Itália pelo nome popular de "Santoreggia sarda", apresentou na sua composição fenóis, monoterpenos e sesquiterpenos: timol, gama-terpineno, beta-cariofileno, p-cimeno, carvacrol e borneol como componentes principais. A pesquisa da CIM e a concentração letal mínima (CLM) foi avaliada sobre *Candida spp*, *Trichophyton spp*, *Microsporum spp*, *Epidermophyton floccosum* e *Aspergillus spp*. E apresentou atividade fungicida contra leveduras, dermatófitos e para *Aspergillus*, com CIMs que variam de 0,16 a 0,32 g/mL (Piras *et al.*, 2011).

Sharifzadeh *et al.*, 2016 estudando a composição química de *Satureja hortensis* L. encontraram os seguintes compostos químicos majoritários: timol (45,9%), gama-terpineno (16,71%), o carvacrol (12,81%) e p-cimeno (9,61%). Para a pesquisa da atividade antifúngica de *Satureja hortensis* L. sobre isoladas de *C. albicans* provenientes de pacientes HIV positivos, com formação de biofilme e lesões bucais utilizando o método de microdiluição em caldo encontraram CIM entre 250-400 µg/ml e CFM entre 350-500 µg/ml. A análise microscópica revelou deformidade de estruturas tridimensionais do biofilmes e retração nas membranas celulares das células (Sharifzadeh *et al.*, 2016).

Este estudo inicia-se com 02 óleos essenciais: óleo essencial de *E. caryophyllus*, seus compostos químicos majoritários Eugenol e β-cariofileno e óleo essencial de *T. vulgaris* e seus compostos químicos majoritários Linalol, P-Cimeno, Carvacrol, Timol; com promissora atividade anti- *Cryptococcus*, para os isolados analisados.

Os óleos essenciais escolhidos já haviam sido referidos na literatura com atividade antifúngica, associada ao fato de terem sido extraídos de plantas naturais do país de origem (Santos 2011).

Neste estudo foram estudados os óleos essenciais de *E. caryophyllus* e *T. vulgares* e seus compostos químicos majoritários nas concentrações acima 5,08%.

***E. caryophyllus* e seus compostos químicos majoritários.**

Conhecido como óleo de cravo *E. caryophyllus*, é rico em eugenol, um derivado do grupo dos fenóis. Os compostos químicos do óleo essencial de *E. caryophyllus* são: eugenol (84,10%), β-cariofileno (12,67%), α-cariofileno (1,51%) e acetato de isoeugenol (1,08%) (Anexo 3). O eugenol pertence ao grupo dos fenóis com atividade antimicrobiana e os compostos cariofilenos pertencem ao grupo dos sesquiterpenos com atividade antiinflamatória.

No óleo essencial de *E. caryophyllus* foram estudados os compostos químicos eugenol e β-cariofileno.

As menores CIM e CFM do óleo essencial de *E. caryophyllus* ocorreram nos isolados de pacientes HIV positivo em relação aos isolados de pacientes

com sorologia desconhecida para o HIV e os isolados de origem ambiental

Thirach *et al.*, 2003 utilizando extrato de plantas de *E. caryophyllus* e o composto eugenol demonstraram eficácia contra *C. albicans* e *C. neoformans*. He *et al.*, 2007 mostraram que o eugenol apresentou *in vitro* atividade contra biofilmes de *C. albicans*, com baixa citotoxicidade e potencial terapêutico para infecções por *Candida* associadas a biofilme.

Pinto *et al.* (2009) observaram a atividade antifúngica do óleo de cravo e eugenol sobre *C. albicans* e outros dermatófitos. Observaram também em *C. albicans* que a formação de tubo germinativo foi completamente ou quase completamente inibida na presença do óleo essencial bem como do eugenol.

- **Eugenol**

É um composto fenólico denominado 4-allyl-2-methoxyphenol. Sua fórmula molecular $C_{10}H_{12}O_2$ e peso molecular de 162,2g/mol. (Mazzafera, 2003). Noventa e cinco por cento do óleo extraído das folhas do cravo-da-índia contém eugenol (Raina *et al.*, 2001) e principal componente do óleo, variando de 70 a 85% (Brown & Morra, 1995; Brown *et al.*, 1991).

Entre os fenóis, poucos são voláteis como o eugenol. É uma substância aromática natural, farmacologicamente muito ativa, insolúvel em água, presente em óleos essenciais de plantas. Dentre estas plantas destacam-se: *Eugenia caryophyllus*, o “cravo-da-índia”; *Dicypelium cariophyllatum*, “o craveiro do Maranhão ou cravinho”; *Ocimum gratissimum*, a “alfavaca-cravo”; e o *Croton zenhtneri*, a “canela-de-cunha” (Wu *et al.*, 1994).

Também conhecido como ácido eugênico ou cariofílico, o eugenol é um fenol arilpropanóide, popularmente denominado de essência de cravo (Escobar, 2002). O eugenol possui diversas ações farmacológicas comprovadas, sendo utilizado na odontologia como componente de seladores e outros produtos antissépticos de higiene bucal, tendo comprovado efeito bactericida, efeito anestésico e analgésico (Markowitz *et al.*, 1992; Cai & Wu 1996; Chong *et al.* 1997; Kaplan *et al.* 1999; Shapiro *et al.* 1994; Escobar, 2002). Também é utilizado como cimento provisório em cavidades dentárias, quando associado ao óxido de zinco. Além disso, o eugenol tem sido

empregado para a produção de outros compostos fenólicos, tal como a vanilina (Priefert *et al.* 2001).

Alguns trabalhos mostraram que eugenol ou extratos de *Syzygim. aromaticum* L. apresentam atividade nematocida (Tsao & Yu 2000, Walker & Melin 1996), inseticida (El-Hag *et al.* 1999), antiviral (Yukawa *et al.* 1996), bactericida (Dorman & Deans 2000, Nascimento *et al.* 2000, Ouattara *et al.* 1997) e fungicida (Delespaul *et al.* 2000).

Derivados do eugenol como acetileugenol, isoeugenol, e metileugenol possuem atividade atinfúngica contra os fungos de podridão branca da madeira (*Betulina* L.) e fungos da podridão marrom da madeira (*Sulphureus* L.) (Sen-Sung *et al.*, 2008). Além de antifúngico, também possui atividade para combater a biodegradação de madeira provocada por fungos e controle biológico contra infestações de cupins. Assim, o óleo de cravo e o eugenol têm potencial para o desenvolvimento de conservante natural de madeira (Xie *et al.*, 2015).

O óleo essencial de *Ocimum gratissimum*, popularmente conhecida como alfavaca, e o eugenol, principal constituinte do óleo essencial desta planta, foram estudados para verificar a atividade antifúngica sobre *C. neoformans*, *Paracoccidioides brasiliensis* e *Histoplasma capsulatum*, utilizando a técnica de diluição em ágar. Como resultados foi observada a atividade sobre *C. neoformans* e *P. brasiliensis*. A análise química desse óleo é constituída por eugenol, timol e terpenóides entre outras substancias. A fração clorofórmica desta planta na concentração de 62,5µg/mL inibiu 92% dos isolados de *C. neoformans* e o óleo essencial mostrou inibição de 8% desses isolados a uma concentração de 125µg/mL (Lemos, 2004).

Possui atividade antifúngica contra *Candida albicans* (Rakotonirainy & Lavédrine, 2005), antiviral, contra HSV-2 (vírus do herpes simples tipo 2) (Bourne *et al.*, 1999), apresenta também efeito anti-edematogênico local, anti-inflamatório e antinociceptivo (Wright *et al.*, 1995). Em tecido nervoso, apresenta ação anestésica geral, pois bloqueia tanto a condução do potencial de ação em nervos periféricos quanto na junção neuromuscular (Cruz, 2001).

- ***β-cariofileno***

Possui fórmula molecular $C_{15}H_{24}$ e peso molecular de 204,36g/mol. É um constituinte importante em várias espécies de óleos essenciais de plantas medicinais utilizadas no Brasil e o seu percentual varia de acordo com a parte da planta em que foi retirado (Bocardi, 2008; Silva, 2010). O β -cariofileno tem sido largamente utilizado para dar aroma aos cosméticos e sabonetes, além de muitas outras preparações técnicas, podendo ser encontrado em muitas famílias (Anonaceae, Euforbiaceae, Verbenaceae, Anacardiaceae, Burseraceae, etc.) de plantas que contêm espécies com conhecidas propriedades terapêuticas na medicina popular (Tappin, 2004).

Este composto é capaz de modular os processos inflamatórios nos seres humanos. β -cariofileno mostrou ser agonista seletivo do receptor canabinoide do tipo 2 (CB2) e exercem efeitos anti-inflamatórios *Cannabis sativa* em ratos. Óxido de cariofileno é o componente responsável pela identificação de cannabis por cães farejadores de drogas (Gertsch *et al*, 2008).

β -cariofileno também possui características capazes de induzir efeitos que o tornam um potencial candidato ao tratamento/prevenção dos processos envolvidos na neurodegeneração, apresentando efeitos benéficos em modelos celulares de Parkinson, Huntington e Alzheimer para estudos de neurotoxicidade (Ferreira, 2014).

Encontrado em óleos-resina das diversas espécies de copaíba e em muitos óleos essenciais de varias famílias botânicas e pode ser utilizado como marcador químico. É um constituinte importante em várias espécies de óleos essenciais de plantas medicinais utilizadas no Brasil e o seu percentual varia de acordo com a parte da planta em que foi retirado (Romero, 2007). O óleo essencial rico em cariofileno pode ser empregado na medicina tradicional como remédio, para o tratamento de diversas enfermidades.

O β - cariofileno vem sendo estudado principalmente sobre sua ação anti-inflamatória em diversos óleos essenciais de diferentes plantas como, por exemplo, no óleo essencial de *Hyptis fruticosa*, um dos constituintes majoritários e que apresentou efeito anti-inflamatório e baixa toxicidade em camundongos. (Menezes *et al*. 2007). Bandeira *et al*. (2011) verificaram que β -cariofileno é um dos principais constituintes químicos encontrados em

diferentes espécies do gênero *Plectranthus* (*P. rugosus*, *P. fruticosus*, *P. coleoides*, *P. tenuiflorus*, *P. incanus* e *P. defoliatus*).

Neste estudo os isolados biológicos testados não apresentaram sensibilidade aos compostos majoritários de *E. caryophyllus*, *eugenol* e β -cariofileno isolados ou misturados em relação ao óleo essencial total. Dentre os grupos estudados os isolados de pacientes com sorologia positiva para o HIV foram os que apresentaram as menores CIM e CFM.

***T. vulgaris* Lin. e seus compostos químicos:**

A composição do óleo essencial de *T. vulgaris* inclui fenóis, álcoois e os monoterpenos. Hudaib *et al.*, 2002 relatam que entre estes compostos está o timol e carvacrol que é um dos principais monoterpenos existentes no óleo essencial de tomilho. Entre os compostos químicos do óleo essencial de *T. vulgaris*, os principais são: cimeno (14,43%), linalol (8,49%), carvacrol (5,08%) e timol (62,13%), entre outros (Anexo 04).

Neste estudo os isolados biológicos testados contra o óleo essencial de *T. vulgaris* apresentaram as menores CIM e CFM. Sendo os isolados de pacientes com sorologia desconhecida para o HIV os mais sensíveis.

- ***Linalol***

Quimicamente, o linalol, (3,7-Dimethyl-1,6-octadien-3-ol) apresenta-se como um monoterpeno alcoólico terciário de cadeia aberta com fórmula molecular C₁₀H₁₈O. Possui peso molecular 154,3 g/mol com densidade 0,86 g/ml, tendo ponto de ebulição de aproximadamente 198° a 199°C (Lapczynski *et al.*, 2008a; 2009b; Letizia *et al.*, 2003). Esse álcool é encontrado naturalmente como componente majoritário de óleos essenciais de muitas espécies de plantas aromáticas, com teor superior a 70% no óleo essencial (Kamatou & Viljoen, 2008; (Lapczynski *et al.*, 2008a; 2009b; Letizia *et al.*, 2003).

O linalol é largamente utilizado na indústria de alimentos, cosméticos e perfumes e faz parte da lista de substâncias classe A do Conselho Europeu,

por causa de sua importância como matéria-prima para síntese de compostos de alto valor agregado (Letizia *et al.*, 2003; Bakkali *et al.*, 2008).

A literatura cita o linalol (Luz *et al.*, 2009), dentre inúmeras substâncias obtidas de plantas medicinais, como fitoconstituintes potencialmente antimicrobianos. O linalol, por sua vez, é um monoterpeneo muito utilizado na indústria de perfumaria, cosmética e culinária, cujo ponto de ebulição é de 199°C e a solubilidade em água está em torno dos 1,5 g/L.

Por estar presente no óleo de manjeriço, tem sido usado como composto de partida para várias sínteses importantes, como a do acetato de linalila. É utilizado com sucesso como sedativo e suas propriedades anticonvulsivas, hipnóticas, hipotérmicas e efeito depressor do sistema nervoso central estão sendo analisadas, assim como as propriedades acaricidas, bactericida e fungicida. (Julião *et al.*, 2003, Luz *et al.*, 2009).

No que se refere à toxicidade do linalol sua dose letal é baixa, quando comparada a outros constituintes dos OEs, tornando-se, por este motivo, alvo de estudos para aplicabilidade terapêutica. As pesquisas dos efeitos tóxicos das substâncias estão relacionadas com via de administração, tempo, duração e frequência da dose, o que foi demonstrado por Venâncio (2006).

Além de sua importante utilização na indústria alimentícia e cosmética, o linalol também apresenta efeito anestésico local inibindo neurônios do sistema nervoso central e sensorial (Narusuye *et al.*, 2005).

Linalol age no sistema sensorial somático bloqueando canais de sódio dependente de voltagem em nervo ciático de ratos (Cardoso *et al.*, 2010), como também em nervo ciático de rãs (Zalachoras, *et al.*, 2010).

Outros efeitos também foram listados para o linalol tais como: anti-leishmaniose (Rosa *et al.*, 2003) e antimicrobiano, podendo ser utilizado no combate aos microrganismos causadores de infecções hospitalares, principalmente em pacientes imunocomprometidos, destacando-se neste grupo os portadores de HIV e transplantados (Alviano *et al.*, 2005).

Bezerra *et al* (2013) observaram atividade antibacteriana para o linalol. Como antifúngico, Hsu *et al* (2013) pesquisou linalol sobre o crescimento de biofilme de *C. albicans*, indicando que o linalol pode ter potencial terapêutico no tratamento de candidíase associada a dispositivos médicos pois interfere com a morfologia e modifica a formação de biofilme de *C. albicans*.

Neste estudo, os isolados de *C. neoformans* apresentaram resistência ao Linalol. Quanto à mistura, associado ao composto timol, apresentou as menores CIMs e CFMs em relação às associações com os demais compostos. Os isolados de sorologia desconhecida para HIV apresentaram menor média de CIM para este composto.

- **P-Cimeno**

O p-cimeno é um composto químico do grupo dos monoterpenos e possui atividade antimicrobiana contra *Salmonella enteritidis* (Silva *et al.*, 2010). Segundo Burt (2004), o p-cimeno facilita o transporte do carvacrol através da membrana citoplasmática para o interior da célula bacteriana.

O p-cimeno é um monoterpeno quimicamente denominado 1-metil-4-isopropil benzeno ou metilpropil benzeno, possui fórmula molecular $C_{10}H_{14}$ e peso de 131,21 g/mol. Em temperatura ambiente, apresenta-se na forma líquida sem coloração e com densidade igual a 0,86 g/ml. É uma substância lipofílica praticamente insolúvel em água, com ponto de fusão de $-67,9^{\circ}C$ e seu ponto de ebulição e de $177^{\circ}C$ e sua DL50 é igual a 4750 mg/Kg.

Apresenta-se como um dos principais constituintes do óleo essencial de *Cuminum cyminum* e *Thymus vulgaris*, dentre outros, é um precursor biológico do carvacrol (Wang, *et al.*, 2008).

Não possui efeito bactericida efetivo quando utilizado sozinho, mas quando associado com o carvacrol, torna-se bastante efetivo contra *Bacillus cereus in vitro*, e esse efeito deve-se provavelmente ao fato do p-cimeno ser incorporado na bicamada lipídica de *B. cereus*, facilitando o transporte de carvacrol através da membrana plasmática (Ultee *et al.*, 2002). Em contrapartida, o p-cimeno possui atividade antimicrobiana contra *Salmonella enteritidis* (Silva *et al.*, 2010).

Pouco estudado como antimicrobiano e apesar do mecanismo de sinergia ainda ser desconhecido cepas de bactérias Gram-negativas, como *Salmonella enterica* sorovar Typhi, *Escherichia coli* e *Shigella dysenteriae* foram inibidas pela sua combinação com nisina, uma bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis*, (Rattanachaikunsopon e Phumkhachorn, 2010).

Em outro estudo, Baydar *et al.* (2004) testaram o óleo essencial de orégano com 53% de carvacrol e timol e outro óleo essencial de orégano com

87% desses mesmos componentes e, como resultado, verificaram que o primeiro óleo essencial de orégano mesmo tendo menos carvacrol e timol, apresentaram uma atividade antimicrobiana mais efetiva devido a presença de p-cimeno e γ -terpineno.

Dos isolados testados, 96% foram resistentes ao composto p-cimeno, também não apresentaram sensibilidade quando submetido à pesquisa de mistura como os outros compostos químicos majoritários linalol, carvacrol e timol. Os isolados biológicos de origem ambiental apresentaram as menores CIM e CFM para este composto químico.

- **Carvacrol**

Denominado como um fenol monoterpeneo, o carvacrol apresenta nomenclatura química 2-metil-5-(1-metiletil)-fenol ou isopropyl-0-cresol, possui fórmula molecular $C_6H_{12}O_6$, $C_6H_3(OH)(C_3H_7)$ e peso de 150,22 g/mol. Apresenta-se na forma líquida de coloração amarelo claro com densidade igual a 0,975 g/ml em temperatura ambiente. Possui característica e odor aromático semelhante ao orégano. É uma substância lipofílica com pouca solubilidade em água (coeficiente de solubilidade igual a 0,04%). Seu ponto de fusão e de 2° C e seu ponto de ebulição e de 234° C. Sua DL50 e igual a 100 mg/Kg (Carvalho *et al.*, 2003).

Carvacrol é um componente importante de vários óleos essenciais de plantas, tais como *Origanum* spp., *Satureja hortensis*, *Thymus* spp. e *Timbra capitata*. O mecanismo de ação de alguns compostos como o carvacrol, pode estar relacionado com a inibição da biossíntese do ergosterol (Arias *et al.*, 2011).

São descritas por diversos autores a propriedade antifúngica do carvacrol em estudos *in vitro* e *in vivo* sobre *C. albicans* (Manohar *et al.*, 2001; Chami *et al.*, 2004; Ahmad *et al.*, 2011).

Alguns trabalhos relatam a promissora atividade anti-*Candida* do composto químico carvacrol (Chami *et al.*, 2004; Tampieri *et al.*, 2005; Dalleau *et al.*, 2008), mesmo contra isolados de *Candidas* spp resistentes ao fluconazol. Oliveira *et al.*, 2009 relataram que o carvacrol e outros compostos mostraram atividade *in vitro* contra isolados de *C. krusei* resistentes e isolados

de *C. glabrata* sensíveis a fluconazol. Além disso em *C. albicans*, o carvacrol inibiu *in vitro* a formação de tubos germinativos e filamentação (Oliveira *et al.*, 2009).

Atividade antifúngica do carvacrol contra cepas de *C. albicans* foi evidenciada principalmente sobre o ergosterol, na ligação de esteróis na membrana da levedura e não atua na modificação da parede da célula fúngica (Lima *et al.*, 2013).

Neste estudo, apenas três isolados de *C. neoformans* apresentaram resistência a este composto. Quando associado ao composto químico majoritário timol, nenhum dos isolados foram resistentes a esta mistura. Diferentemente do observado quando misturado com o p-cimeno ou com o linalol onde todos os isolados apresentaram resistência. As CIMs e CFMs apresentadas por este composto foram superiores aos resultados apresentados quando utilizado o óleo essencial total. Isolados biológicos com sorologia desconhecida para o HIV apresentaram as menores de CIM e CFM em relação ao composto químico majoritário carvacrol.

- **Timol**

O timol é um monoterpeneo fenol, sendo um componente importante em várias espécies de plantas, em particular *T. vulgaris*, e reconhece-se por ter um número de propriedades farmacológicas, incluindo a atividade antimicrobiana e antifúngica, o que pode envolver efeitos sobre a membrana celular (Sánchez *et al.*, 2004; Braga, 2011). Apresenta nomenclatura química de 5-metil-2-(1-metiletil)-fenol, fórmula molecular $C_{10}H_{14}O$ e peso molecular de 150,22 g/mol. Seu ponto de fusão é 52° C, permanecendo líquido em temperaturas consideravelmente mais baixas, enquanto que seu ponto de ebulição é 233° C. O timol pode ser utilizado como conservante alimentar, enfatizando a efetividade antimicrobiana dos revestimentos ativos de timol, eficaz em aumentar a validade de camarões descascados e diminuindo a perda de qualidade do produto (Mastromatteo *et al.*, 2010). A combinação dos efeitos do timol e baixa temperatura permite a preservação da qualidade, sem a percepção de odor, de produtos à base de carne durante os primeiros 4 dias de armazenamento (Mastromatteo *et al.*, 2009).

O timol, monoterpeneo derivado das plantas da família Lamiaceae, pode ser encontrado na forma de cristais incolores com odor irritante e pouco solúvel em água. Scoralik *et al.*, (2012) relataram que vários artigos têm descrito o potencial desta monoterpeneo como bactericida, fungicida, nematocida, moluscicida, inseticida e acaricida contra diferentes espécies e com formulações diferentes.

Apresenta-se sob a forma de cristais incolores ou pó cristalino branco com aroma irritante, lembrando tomilho. Pouco solúvel em água. É irritante da mucosa gástrica e a presença de gordura e álcool aumentam sua absorção. Possui atividade antimicrobiana, que é diminuída na presença de proteínas (Botelho *et al.*, 2007). Este composto é absorvido no trato gastrointestinal e excretado na urina em sua forma pura e como glicuronídeo. Tem efeito antisséptico e é o mais potente dos fenóis, porém seu uso é limitado por causa da sua pouca solubilidade em água e sua ação irritante (Botelho *et al.*, 2007), sendo usado principalmente como antisséptico bucal. O timol tem sido utilizado no tratamento de enfermidades da pele e por inalação, associado a outras substâncias voláteis, para tratar enfermidades respiratórias (Kordali *et al.*, 2008).

O timol já foi estudado como leishmanicida *in vitro* e *in vivo* (Robledo *et al.*, 2005), demonstrando que tem capacidade de matar as formas promastigotas do parasita *Leishmania (Viannia) panamensis* em cultura de células e em hamsters Golden (*Mesocricetus auratus*) por via oral.

O timol tem sido utilizado com sucesso em estudos *in vitro* contra fungos patogênicos, incluindo *C. albicans* e *Aspergillus* (Giordani *et al.*, 2004). Estes autores avaliaram o efeito antifúngico dos óleos essenciais de diversas espécies de plantas sobre o crescimento de *C. albicans* e dentre os diversos óleos destacou-se o óleo essencial de *T. vulgaris* adicionado em meio de cultura inibindo 80% do crescimento das leveduras, observando também como potencializador na atividade antifúngica da anfotericina B, sugerindo uma possível utilização deste óleo essencial além dos medicamentos já existentes para o tratamento de micoses. E podem também ser testados na supressão de fungos sobre superfícies de resina acrílica que imitam a superfície interior das próteses, para ser avaliado como uma substância para a limpeza de dispositivos protéticos.

Fontenelle *et al.* (2007) avaliaram o efeito do óleo essencial de *Lippia sidoides* (teor de timol de 59,65%) sobre cepas de *C. albicans* e *C. tropicalis* por método de microdiluição em caldo, obtendo melhores resultados de CIM e CFM para *C. albicans*.

Pina- Vaz *et al.* (2004) estudaram os óleos essenciais de diferentes espécies de *Thymus* (*Thymus vulgaris*, *T. zygis* subespécie *zygis* e *T. mastichina* subespécie *mastichina*) e seus compostos químicos majoritários (carvacrol, timol, p-cimeno e 1,8-cineol) e observaram possíveis interações entre os compostos e atividade antifúngicos para *Candida* spp.

Recentemente, Brito *et al.* (2015) avaliaram a atividade antifúngica do óleo essencial de *L. sidoides* Cham e seu composto químico majoritário timol, sobre cepas de *Candida* ssp. avaliando tanto o potencial antifúngico quanto a neutralização, provocando inibição ou redução da emissão de hifas e pseudohifas, um de seus principais fatores de virulência, responsável por sua potencial invasão de tecidos.

Nesta pesquisa, o timol foi o que apresentou as menores CIM e CFM isoladamente ou quando associado ao carvacrol.

Os isolados de sorologia desconhecida para HIV (N=11) obtiveram a menor CIM quando submetidos ao timol.

Mistura entre os compostos químicos majoritários de E. caryophyllus

A resistência apresentada pelos isolados frente aos compostos químicos majoritários isolados ou não de eugenol e β -cariofileno e não observada no óleo total sugerem que os compostos químicos minoritários tenham provavelmente importância na atividade antifúngica do óleo essencial total de *E. caryophyllus*.

Mistura entre os compostos químicos majoritários de T. vulgaris

Quando observamos os resultados obtidos na mistura dos compostos químicos majoritários do óleo essencial de *T. vulgaris*, é evidente a atividade inibitória para a mistura carvacrol e timol. Submetidos individualmente ou

misturados, observa-se a promissora atividade antifúngica destes compostos, em relação ao óleo essencial total de *T. vulgaris*.

Os resultados obtidos com esses dois compostos químicos majoritários, carvacrol e timol sugere, que estes sejam os principais compostos do óleo essencial de *T. vulgaris* com atividade antifúngica em relação aos compostos químicos majoritários p-cimeno e linalol. Por outro lado, estes últimos possam ser facilitadores para a entrada do óleo na célula fúngica, como já relatado para p-cimeno.

Ferreira (1998) relatou que, o extrato de uma planta medicinal sendo uma mistura de substâncias, quando há a separação em substâncias isoladas pode levar a perda do efeito farmacológico esperado.

Mesmo que óleos essenciais diferentes apresentem os mesmos compostos químicos, diferenças quantitativas farão com que um determinado óleo essencial tenha propriedades químicas e biológicas diferentes dos demais (Trombetta *et. al*, 2005, Edris, 2007).

6. CONCLUSÕES

- ✓ Os polissorbatos Tween 20, Tween 80 e o solvente dimetilsufóxido DMSO na concentração a 0,02% reduziram a produção da cápsula de *C. neoformans*. Tween 80 e DMSO alteram a morfologia das células. O polissorbato Tween 20 a 0,02% foi o de escolha para o estudo.
- ✓ Os óleos essenciais de *Eugenia caryophyllus* e *Thymus vulgaris*, apresentaram atividade fungicida sobre isolados de *C. neoformans*
- ✓ Após exposição aos óleos essenciais de *E. caryophyllus* e *T. vulgaris* e seus compostos químicos majoritários ocorreu morfologicamente nas doses sub inibitórias redução ou ausência da cápsula e as células tenderam a se agrupar em número de 2, 4 ou mais com aumento de tamanho das leveduras.
- ✓ Os óleos essenciais de *E. caryophyllus* e *T. vulgaris* e seus compostos químicos majoritários inibiram a produção das exoenzimas proteinase e fosfolipase de *C. neoformans*.
- ✓ Os compostos químicos majoritários carvacrol e o timol, presentes no óleo essencial de *T. vulgaris* apresentaram isoladamente e/ou misturados a menor CFM50 e CFM90.
- ✓ A mistura dos compostos químicos majoritários carvacrol e timol, p-cimeno e linalol do óleo essencial de *T. vulgaris* apresentaram a menor CFM50 e CFM90.
- ✓ Os isolados biológicos de origem ambiental foram os mais resistentes aos óleos essenciais de *E. caryophyllus* e *T. vulgaris*.
- ✓ Cada composto químico majoritário isolado bem como as misturas desses compostos frente aos isolados biológicos,

apresentaram concentrações superiores aos óleos essenciais total.

- ✓ Pelo exposto conclui-se que os óleos essenciais de *E. caryophyllus* e *T. vulgaris* e os compostos químicos majoritários carvacrol e timol são promissores agentes com atividade anti-*Cryptococcus*.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abrahão DS. Atividade dos extratos de própolis sobre o comportamento morfológico de *Candida albicans* e como medicação intracanal [Dissertação]. São Paulo: Coordenadoria de Controle de Doenças – Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, 2007.

Ahmad A, *et al.* Fungicidal activity of thymol and carvacrol by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2011; 30: 41- 50.

Alvarez, M., Casadevall, A. Cell-to-cell spread and massive vacuole formation after *Cryptococcus neoformans* infection of murine macrophages. *BMC Immunol*. 2007; 8-16.

Alves TMA, Silva AF, Brandão M, Grandi TSM, Sâmânia EFA, Sâmânia Jr A Zani CL. Biological screening of Brazilian medicinal plants. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2000; 98: 367-373.

Alviano WS, *et al.* Antimicrobial activity of *Croton cajucara* Benth linalool-rich essential oil on artificial biofilms and planktonic microorganisms. *Oral Microbiology and Immunology*. 2005; 20(2): 101-5.

Anaissie EJ, McGinnis MR, Pfaller MA. *Clinical Mycology*. Churchill Livingstone. Elsevier. 2 ed; 2009.

Andrade MA *et al.* Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. *Revista Ciência Agronômica*, Fortaleza, 2012; v.43, n.2, 399 – 408.

Aoki S. *et al.* Extracellular proteolytic of *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia*. 1994; v. 128, p. 143-50.

Araújo FM *et al.* Composition and antimicrobial activity of essential oils from *Poiretia bahiana* C. Müller (Papilionoideae – Leguminosae). J. Braz. Chem. Soc. 2009; v. 00, n. 00, 1-6.

Araújo JCLV, Lima EO, Ceballos BSO, Freire KRL, Souza EL, Filhos LS. Ação antimicrobiana de óleos essenciais sobre microrganismos potencialmente causadores de infecções oportunistas. Revista de Patologia Tropical. 2004; 33(1): 55-64.

Araújo ALM. Avaliação *in vitro* da atividade de óleos essenciais sobre *Candida albicans* e seus fatores de virulência [Dissertação]. São Paulo: Coordenadoria de Controle de Doenças – Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, 2015.

Arias CM, Eraso E, Madariaga L, Quindós G. *In vitro* activities of natural products against oral *Candida* isolates from denture wearers. BMC Complementary and Alternative Medicine. 2011; 11:119.

Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils – A review. Food and Chemical Toxicology. 2008; 46, 446–47.

Bandeira JM, Barbosa FF, Barbosa LMP *et al.* Composição do óleo essencial de quatro espécies do gênero *Plectranthus*. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais. 2011; 13(2): 157-164.

Banerjee A, Dasgupta N, De B. *In vitro* study of antioxidant activity of *Syzygium cumini* fruit. Food Chem. 2005; 90:727-33.

Baroni, FA. Espécies de *Cryptococcus neoformans* isoladas de torres de igrejas na cidade do Rio de Janeiro, RJ, Brasil. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Núcleo de Pós-graduação em Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2001.

Baydar, H. et al. Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. *Food Control*. 2004; v. 15, n. 3, p. 169-172.

Behnia M, et al. Inhibitory effects of Iranian *Thymus vulgaris* Extracts on in vitro growth of *Entamoeba histolytica*. *Korean Journal of Parasitology*. 2008; 46(3): 153-156.

Bezerra LMD, Ferreira GLS, Silva ICG, Castro RD. Atividade Antibacteriana *In Vitro* de Fitoconstituintes Sobre Micro-organismos do Biofilme Dentário. *Rev Bra de Ciências da Saúde*. 2013; v 17 (1), p. 79-84.

Bhavanani SM, Ballow CH. New agents for Gram-positive bacteria. *Curr Opin Microbiol*. 1992; 13: 528-534.

Bicanic T, Harrison TS. *Cryptococcal meningitis*. *Br Med Bull*. 2004; 72: 99-118.

Bien CM, Chang YC, Nes, WD, Kwon-Chung KJ, Espenshade PJ. *Cryptococcus neoformans* site-2 protease is required for virulence and survival in the presence of azole drugs. *Mol. Microbiol*. 2009; 74, 672–690.

Bocardi JMB. Etnofarmacologia das plantas medicinais de céu azul e composição química do óleo essencial de *Plectranthus neochilus* Schltr. Dissertação (Mestrado em Química Aplicada) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2008.

Bose I, Reese AJ, Ory JJ, Janbon G, Doering TL. A yeast under cover: the capsule of *Cryptococcus neoformans*. *Euk Cell*. 2003; 2(4): 655-663.

Botelho MA, Bastos GM, Fonseca SGC, Matos FJA, Montenegro D, Rao VS, Brito GAC. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, cavacrol and thymol against oral pathogens. *Braz J. Med. Biol. Res*. 2007; v. 40, p. 349-356.

Bourne KZ, Bourne N, Reising SF, Stanberry LR. Plant products as topical microbicide candidates: assessment of in vitro and in vivo activity against herpes simplex virus type 2. *Antiviral Research*. 1999; v. 42, p.219-236.

Bovers M, Hagen F, Boekhout T. Diversity of the *Cryptococcus neoformans* – *Cryptococcus gattii* species complex. *Rev. Iberoamer. Micol.* 2008; 25, 4–12.

Braga PC, Ricci D. Thymol-induced alterations in *Candida albicans* imaged by atomic force microscopy. *Methods Mol Biol.* 2011; 736:401- 410.

Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*. 1998; v.56, n.11, p. 317-38.

Brito DIV, *et al.* Análise fitoquímica e atividade antifúngica do óleo essencial de folhas de *Lippia sidoides* Cham. e do Timol contra cepas de *Candida* spp. *Rev. Bras. Plantas Med.* 2015; vol.17 n.4, 836-844.

Brochini CB, Nunez CV, Moreira IC, Roque NF, Chaves MH, Martins D. Identificação de componentes de óleos voláteis: análise espectroscópica de misturas de sesquiterpenos. *Quim Nova.* 1999; 22: 37-40.

Brown PD, Morra MJ, McCaffrey JP, Auld DL, Williams III, L. Allelochemicals produced during glucosinolate degradation in soil. *Journal of Chemical Ecology* 1991; 17: 2021-2034.

Brown PD, Morra MJ. Glucosinolate containing plant tissues as bioherbicides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1995; 43:3070-3074.

Burt, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *International Journal of Food Microbiology*. 2004; v.94, n.3, p. 223-53.

Byrnes EJ, Marr KA. The outbreak of *Cryptococcus gattii* in Western North America: Epidemiology and Clinical Issues. *Curr Infect Dis Rep.* 2011; 13 (3) 256-261.

Cabral Passoni LF. Wood, animals and human beings as reservoirs for human *Cryptococcus neoformans* infection. Rev Iberoam Micol. 1999; 16(2):77-81.

Cai LN, Wu CD. Compounds from *Syzygium aromaticum* possessing growth inhibitory activity against oral pathogens. Journal of Natural Products. 1996; 59:987-990.

Campos FL, Baroni FA. Isolados de *Cryptococcus neoformans*, *C. gatti* e *C. laurentii* produtores de Protease e Fosfolipase. Rev de Patologia Tropical. 2010; 39(2): 83–89.

Cardoso JHL, Lahlou S. 1-Nitro-2-phenylethane, the main constituent of the essential oil of Aniba canelilla, elicits a vago-vagal bradycardiac and depressor reflex in normotensive rats. *Eur. J. Pharmacol.* 2010; 638: 90-98.

Carmo CMF, Lima EO, Milan EP. Atividade antifúngica de extratos de óleos essenciais contra *Candida albicans* isolada de pacientes com Aids. Ver Bras Farm. 1998; 79: 108 – 111.

Carreto CFP, Navas EAFA, Paradella TC, Oliveira LD, Junqueira JC, Jorge AOC. Efeitos do chá de tomilho sobre a aderência in vitro de *Streptococcus mutans* ao esmalte dentário e *Candida albicans* à resina acrílica. Ver Odont UNESP. 2007; 36(3): 281–286.

Carvalho JCT. Fitoterápicos – aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. Editora Tecmedd; 2004.

Casadevall A. Cards of Virulence and the Global Virulome for Humans. Microbe. 2006; 01, n. 8, p. 359.

Casadevall, A, Perfect J R. *Cryptococcus neoformans*. Washington, DC. ASM Press; 1998.

Casali AK, Staats CC, Schrank A, Vainstein MH. *Cryptococcus neoformans*: aspectos moleculares e epidemiológicos. Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento. 2001; v.20: 34-37.

Castro DP, Cardoso MG, Moraes JC, Guerreiro MC, Muniz FR, Baliza DP. Identificação química do óleo essencial de *Achillea millefolium* e *Thymus vulgaris*. Congresso Brasileiro de Química, Ouro Preto. 2003; 63: 432.

Castro RD. Atividade antifúngica do óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Canela) e de sua associação com antifúngicos sintéticos sobre espécies de *Candida*. Tese. Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa. 2010; 169p.

Cerikã N. Mating types, sexual reproduction and ploidy in fungi: effects on virulence. *Mikrobiyol Bul.* 2009; 43(3): 507-13.

Chami F, Chami N, Bennis S, Trouillas J, Remmal A: Evaluation of carvacrol and eugenol as prophylaxis and treatment of vaginal candidiasis in an immunosuppressed rat model. *J Antimicrob Chemother.* 2004; 54: 909-914.

Chami N, Bennis S, Chami F, Aboussekhra A, Remmal A. Study of anticandidal activity of carvacrol and eugenol *in vitro* and *in vivo*. *Oral Microbiology and Immunology.* 2005; v 20 (2), p. 106–111.

Chan MY, Tay ST. Enzymatic characterisation of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii* and other environmental *Cryptococcus* spp. *Mycoses.* 2010; 53 1: 26-31.

Chang YC, Kwon-Chung KJ. Complementation of a capsule-deficient mutation of *Cryptococcus neoformans* restores its virulence. *Mol Cell Biol.* 1994; 14: 4912–4919.

Chang YC, Kwon-Chung KJ. Isolation of the third capsule-associated gene, *CAP60*, required for virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Infection and Immunity*. 1998; 66: 2230-2236.

Chang YC, Wickes BL, Meller GF, Penoyer LA, Kwon-Chung KJ. *Cryptococcus neoformans* STE12a Regulates Virulence but Is Not Essential for Mating. *The Journal of Experimental Medicine*. 2000; 191(5): 871–881.

Chang YC; Penoyer LA, Kwon-Chung KJ. The second capsule gene of *Cryptococcus neoformans*, *CAP64*, is essential for virulence. *Infection and Immunity*. 1996; 64:1977-1983.

Charlier C, Nielsen K, Daou S, Brigitte M, Chretien F, Dromer F. Evidence of a role for monocytes in dissemination and brain invasion by *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*. 2008; v. 77(1). p. 120-7.

Chayakulkeeree M, Johnston SA, Oei JB, Lev S, Williamson PR, Wilson CF, Zuo X, Leal AL, Vainstein MH, Meyer W, Sorrell TC, May RC, Djordjevic JT. SEC14 is a specific requirement for secretion of phospholipase B1 and pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*. *Mol. Microbiol*. 2011; 80, 1088–1101.

Chayakulkeeree M, Perfect JR. Cryptococcosis. *Infect Dis Clin North Am*. 2006; 20 3: 507-544.

Chen L, Blank ES, Casadevall, A. Extracellular proteinase activity of *Cryptococcus neoformans*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol*. 1996; 3, 570–574.

Chen MS. Inducible direct plant defence against insect herbivores: A review. *Insect Science*. 2008; 15: 101-114.

Chen SCA, O'Donnell M, Gordon S, Gilbert GL. Antifungal susceptibility testing using the E test: comparison with the broth macrodilution technique. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1996; 37, 265-273.

Choi YM, Noh DO, Cho SY, Suh HJ, Kim KM, Kim JM. Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. LWT. 2006; 39:756-61.

Chong BS, Ford TRP, Kariyawasam SP. Short-term tissue response to potential root-end filling materials in infected root canals. International Endodontic Journal. 1997; 30:240-249.

Chuang YM, Ku SC, Liaw SJ, Wu SC, Ho YC, Yu CJ, Hsueh PR. Disseminated *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* infections in intensive care units. Revista: Epidemiol Infect. 2009; 10(2): 1- 8.

Coelho C, Bocca AL, Casadevall A. The Intracellular Life of *Cryptococcus neoformans*. Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease. 2014; v. 9: 219-238.

Corrêa-Junior C, Ming LC, Scheffer MC. Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas. Jaboticabal: FUNEP. 2a . ed.1994; 162 p.

Costa ACBP, Pereira CA, Freire F, Junqueira JC, Jorge AOC. Atividade antifúngica dos extratos glicólicos de *Rosmarinus officinalis* Linn. e *Syzygium cumini* Linn. sobre cepas clínicas de *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida tropicalis*. Revista de Odontologia da UNESP. 2009; 38(2): 111-116.

Costa ACBP, Rodrigues TG, Ferreira TM, Silva FS, Aguida M, Khouri S. Atividade antifúngica do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* sobre leveduras isoladas de candidíase bucal de gestantes HIV positivas. Rev Inst Adolfo Lutz. 2010; 69(3): 403 – 407.

Costa AKF, Sidrim JJC, Cordeiro RA, Brilhante RSN, Monteiro AJ, Rocha MFG. Urban pigeons (*Columba livia*) as a potential source of pathogenic yeast: a focus on antifungal susceptibility of *Cryptococcus* strains in Northeast Brazil. Mycopathologia. 2010; 169, 207– 213.

Costa SPSE, *et al.* First isolation of *Cryptococcus gattii* molecular type VGII and *Cryptococcus neoformans* molecular type VNI from environmental sources in the City of Belém, Pará, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009.

Costa RC, Luli FBD, Carneiro JR, Cardoso AM. Infecções fúngicas em pacientes HIV positivos: Revisão da literatura sobre criptococose e histoplasmoze. Estudos. PUC-Goiás. Goiânia. 2014; v.41, n.4, p. 843-854.

Coutinho G. Fatores de virulência e resistência a antifúngicos de amostras clínicas e ambientais de *Cryptococcus neoformans* [dissertação]. São Paulo (SP): Secretaria da Saúde, Coordenadoria de Controle de Doenças; 2006.

Coutinho HDM, Costa JGM, Lima EO, Silva VSF, Siqueira Jr JP, Potentiating effect of *Mentha arvensis* and chlorpromazine in the resistance to aminoglycosides of methicillin – resistant *Staphylococcus aureus*. In vivo. 2009; 23: 287- 290.

Cox GM *et al.* Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*. Molecular Microbiology. 2001; vol.39, 1 (166-175).

Cox GM, Mukherejee J, Cole GT, Casadevall A, Perfect JR. Urease as a Virulence factor in Experimental Cryptococcosis. Infect. Immun. 2000; 68(2): 443-448.

Craveiro AA, Matos FJA, Alencar JW. A simple and inexpensive steam generator for essential oils extraction. *J Chem Edu.* 1976; v. 53, p. 652.

Craveiro AA, Queiroz DC. Óleos essenciais e Química Fina. Química Nova. 1993; 16(3): 224-228.

Croteau R, Kutchan TM, Lewis NG. Natural Products (Secondary Metabolites). In: BUCHANAN B, Grissem W, Jones R (Eds.). Biochemistry & Molecular Biology of Plants. Rockville: Courier Companies, Inc. 2000; 1250-318.

Cruz GMP. Efeito do eugenol e do metil-eugenol sobre o potencial composto do nervo ciático do rato, Dissertação de mestrado. Universidade Estadual do Ceará, 2001.

Cury AE, Hirschfeld MPM. Interactions between amphotericin B and nitroimidazoles against *Candida albicans*. *Mycosesv*. 1997; 40, p. 187-192.

Cutler JE. Putative virulence factors of *Candida albicans*. *Annu. Rev. Microbiol*. 1991; 45: 187-218.

Dalleau S, Cateau E, Bergès T, Berjeaud JM, Imbert C. In vitro activity of terpenes against *Candida* biofilms. *Int J Antimicrob Agents*. 2008; 31: 572-576.

Dambrós BP. Variabilidade genética de *Cryptococcus neoformans* isolado de pacientes HIV positivos atendidos no Hospital Nereu Ramos de Florianópolis, Santa Catarina. [Dissertação]. Santa Catarina: Universidade Federal de Santa Catarina; 2005.

Delespaul Q, Billerbeck VG, Roques CG, Michel G, Marquier-Vinuales C, Bessiere JM. The antifungal activity of essential oils as determined by different screening methods. *Journal of Essential Oil Research*. 2000; 12: 256-266.

Derengowski LS, De-Souza-Silva C, Braz SV, Mello-De-Sousa TM, Ba' o SN, Kyaw CM, Silva-Pereira I. Antimicrobial effect of farnesol, a *Candida albicans* quorum sensing molecule, on *Paracoccidioides brasiliensis* growth and morphogenesis. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob*. 2009; 8-13.

Di Pasqua R *et al*. Changes in the proteome of *Salmonella enterica* serovar Thompson os stress adaptation to sublethal concentrations of thymol. *Proteomics*. 2010; v.10, n.5, p. 1040-9.

Dias ALT, Brigagão MRPL, Colepicolo P, Siqueira AM, Silva EG, Paula CR. Superoxide dismutase in *Cryptococcus neoformans* varieties *gattii*, *grubii*, and *neoformans*. 2006; 101(1): 107-109.

Dorman HJD, Deans SG. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*. 2000; 88: 308-316.

D'Souza CA, Heitman J. Dismantling the *Cryptococcus* coat. *Trends Microbiol*. 2001; v. 9, (3) 112–1139.

Duarte MTC. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. *Multi Ciência: Construindo a história dos produtos naturais*: 2006; 1-16.

Edris AE. Pharmaceutical and therapic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytotherapy Reserch*. 2007; v.21, p.308-323.

Einbond LS, Reynertson KA, Luo XD, Basile MJ, Kennelly EJ. Anthocyanin antioxidants from edible fruits. *Food Chem*. 2004; 84:23-8.

Eisenman HC, Frases S, Nicola AM, Rodrigues ML, Casadevall A. Vesicle-associated melanization in *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology*. 2009; 155: 3860-3867.

El-Hag EA, El-Nadi AH, Zaitoon AA. Toxic and growth retarding effects of three plant extracts on *Culex pipiens* larvae (Diptera: Culicidae). *Phytotherapy Research*. 1999; 13:388-392.

Escobar RG. Eugenol: propiedades farmacológicas y toxicológicas, Ventajas y desventajas de su uso. *Review Cubana Estomatology*. 2002; v. 39, n.2.

Ferreira DAS. Avaliação do efeito protetor do β -cariofileno em modelos celulares de doenças neurodegenerativas. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Ferreira SH, Medicamentos a Partir de Plantas Medicinais no Brasil. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1998.

Figueiredo AC *et al.* Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*. 2008; v.23, n.4, p. 213-26.

Filippin FB, Souza LC. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 2006; 42(2): 167-194.

Foglio MA. Estudo químico da *Artemisia annua L. aclimatada* no Brasil. Campinas, Tese de Doutorado - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas. 2003; 475p.

Fontenelle ROS *et al.* Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2007; v. 59, p. 934-940.

Franzot SP, Salkin IF, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: Separate Varietal Status for *Cryptococcus neoformans* Serotype A Isolates. *J. Clin. Microbiol.* 1999; 37(3): 838–840.

Galindo, LA, Pultrini, AM, Costa, M. Biological effects of *Ocimum gratissimum* L. are due to synergic action among multiple compounds present in essential oil. *Journal of Natural Medicines*. 2010; v.64, n.4, p. 436-41.

Gates-Hollingsworth MA, Kozel TR. Phenotypic heterogeneity in expression of epitopes in the *Cryptococcus neoformans* capsule. *Mol Microbiol.* 2009; 74(1): 126-38.

Gaylord Chemical Company, LLC. Technical Bulletin Reaction Solvent Dimethyl Sulfoxide (DMSO). Slidell, LA. USA. [acesso em 15 maio 2016]. Disponível em: <http://www.gaylordchemical.com/bulletins/bulletin105b/index.php>

Gazim ZC, Rezende CM, Fraga SR, Svidzinski TIE. Antifungal activity of the essential oil from *Calendula officinalis* L. (asteraceae) growing in Brazil. *Braz J Microbiol.* 2008; 39(1): 61-63.

Gertsch J, Leonti M, Raduner S, et al. "Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2008; 105 (26): 9099–104.

Ghannoum MA, Radwan SS. *Candida* adherence to epithelial cells. CRC Press – Boston, 1990.

Ghannoum MA. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Micro Rev.* 2000; 13: 122-143.

Giese EC, Covizzi LG, Dekker RFH, Barbosa AM. Influência de Tween na produção de lacases constitutivas e indutivas pelo *Botryosphaeria* sp. *Acta Scientiarum. Biological Sciences.* 2004; 26(4): 463-470.

Giles SS, Dagenais TR, Botts MR, Keller NP, Hull CM. Elucidating the pathogenesis of spores from the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun.* 2009; v. 77, p. 3491-3500.

Giordani R, Regli P, Kaloustian J, Mikail C, Abou L, Portugal H. Antifungal effect of various essential oils against *Candida albicans*. Potentiation of antifungal action of amphotericin B by essential oil from *Thymus vulgaris*. *Phytother Res.* 2004; 18:990-995.

Gobbo-Neto, L & Lopes, NP. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova.* 2007; v.30, n.2, p. 374-81.

Gonçalves LA, Barbosa LCA, Azevedo AA, Casali VWD, Nascimento EA. Produção e composição do óleo essencial de alfavaquinha (*Ocimum selloi*

Benth.) em resposta a dois níveis de radiação solar. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. 2003; 6:8-14.

González-Lamothe, R *et al.* Plant antimicrobial agents and their effects on plant and human pathogens. *International Journal of Molecular Sciences*. 2009; v.10, n.8, p. 3400-19.

Greay SJ, Hammer KA. Recent developments in the bioactivity of mono- and diterpenes: anticancer and antimicrobial activity. *Phytochemistry Reviews*. 2011; v.14, (1) 1-6.

Groll AH, Kolve H. Antifungal Agents: In Vitro Susceptibility Testing, Pharmacodynamics, and Prospects for Combination Therapy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2004; 23: 256–270.

He M, Du M, Fan M, Bian Z. In vitro activity of eugenol against *Candida albicans* biofilms. *Mycopathologia*. 2007; v 163(3), 137-143.

Hemaiswarya S, Kruthiventi AK, Doble M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases.- *Phytomedicine*. 2008; 15: 639-652.

Henriques AT *et al.* Óleos essenciais: importância e perspectivas terapêuticas. In: Yunes RA, Cechimel Filho V. (orgs.). *Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia*. 2.ed. Itajaí: Universidade do Vale do Itajaí. 2009; 219-256.

Hoog G. *Atlas of Clínical Fungi*. 2nd ed. Washington, DC; American Society for Microbiology Press, 2001. In: Kaufman CA, Pappas PG, Sobel JD, Dismukes WE. *Source: Essential of Clinical Mycology*, 2^a ed, Springer, New York; 2011.

Hsu CC, Lai WL, Chuang KC, Lee Mh, Tsai YC. The inhibitory activity of linalool against the filamentous growth and biofilm formation in *Candida albicans*. *Medical Mycology*. 2013; 51, 473–482.

Hudaib M, Speroni E, Di Pietra, AM, Cavrini, V. GC/MS evaluation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil composition and variations during the vegetative cycle. J Pharm Biomed Anal. 2002; 29 (4): 691–700.

Huston SM, Mody CH. Cryptococcosis: an emerging respiratory mycosis. Clin Chest Med. 2009; 30 (2): 253-264.

Jabra-Rizk MA, Shirliff M, James C, Meiller T. Effect of farnesol on *Candida dubliniensis* biofilm formation and fluconazole resistance. FEMS Yeast Res. 2006; (6) 1063–1073.

Jang YH, Lee SJ, Lee JH, Chae HS, Kim SH, Choe NH. Prevalence of yeast-like fungi and evaluation of several virulence factors from feral pigeons in Seoul, Korea. Lett Appl Microbiol. 2011; 52 (4): 367-371.

Jianmin Fu, Ian R, Morris, Brian L, Wickes. The Production of Monokaryotic Hyphae by *Cryptococcus neoformans* can be induced by high temperature arrest of the cell cycle and is independent of same-sex Mating. PLOS Pathogens. 2013; vol. 09, 5^a ed.

Julião LS, Tavares ES, Lage CLS, Leitão SG. Cromatografia em camada fina de extratos de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill) N.E.Br. (erva-cidreira). Revista Brasileira de Farmacognosia. 2003; 13: 36-38.

Junior VLP. *et al.*, Criptococose associada à AIDS. A importância do cultivo da urina no seu diagnóstico. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2006; v. 39, 230-232.

Kamatou GPP, Viljoen AM. Linalol – a review of biologically active compound of commercial importance. Natural Product Communications. 2007; v3, n.7, 1183-1102.

Kaplan AE, Picca M, Gonzalez MI, Macchi RL, Molgatini SL. Antimicrobial effect of six endodontic sealers: an in vitro evaluation. *Endodontics and Dental Traumatology*. 1999; 15: 42-45.

Karkowska-Kuleta J, Rapala-Kozik M, Kozik A. Fungi pathogenic to humans: molecular base of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. *Acta Biochim Pol*. 2009; 56, 2: 211-224.

Kaufman CA, Pappas PG, Sobel JD, Dismukes WE. *Essential of Clinical Mycology*, 2^a ed, Springer, New York; 2011.

Khan SMA, Ahmad I, Cameotra SS, Botha F. Sub-MICs of *Carum copticum* and *Thymus vulgaris* influence virulence factors and biofilm formation in *Candida* spp. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2014; 14: 337.

Khan SMA, Malik A, Ahmad I. Anti-candidal activity of essential oils alone and in combination with amphotericin B or fluconazole against multi-drug resistant isolates of *Candida albicans*. *Medical Mycology*. 2012; 50: 33–42.

Klaric MS, Kosalec I, Mastelic J, Pieckova E, Pepeljnak S. Antifungal activity of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil and thymol against moulds from amp dwellings. *The Society for Applied Microbiology, Letters in Applied Microbiology*. 2007; 44: 36–42.

Kon AS *et al.*, Consenso em Criptococose. *Rev Socied Brasileira de Med Trop*. 2008; 41(5): 524-544.

Kordali S, Cakir A, Ozer H, Cakmakci R, Kesdek M, Mete E. Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish *Origanum acutidens* and its three components, cavacrol, thymol and p-cymene. *Bioresource Technology*. 2008; v. 99 (18): 8788–8795.

Kronstad J, Saikia S, Nielson ED, Kretschmer M, Jung W, Hu G, Geddes JM, Griffiths EJ, Choi J, Cadieux B, Caza M, Attarian R. Adaptation of *Cryptococcus neoformans* to mammalian hosts: integrated regulation of metabolism and virulence. *Eukaryot Cell*. 2012; 11 (2): 109-118.

Kronstad JW, Attarian R, Cadieux B, Choi J, D'Souza CA, Griffiths EJ, Geddes JMH, Hu G, Jung WH, Kretschmer M, Saikia S, Wang J. Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. *Nat. Rev. Microbiol*. 2011; 9: 193–203.

Kurtzman CP, Fell JW. *The Yeast, a taxonomic study*. 4^a edition. Elsevier, 1998.

Kwon-Chung KJ, Varma A. Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? *FEMS Yeast Res*. 2006; 6: 574–587.

Lapczynski A, Bhatia SP, Letizia CS, Api AM. Fragrante material review on *l*-linalool. *Food and Chemical Toxicology*. 2008b. v.46, p. 195-196.

Lapczynski A, Letizia CS, Api AM. Fragrante material review on *α*-linalool. *Food and Chemical Toxicology*. 2008^a; v.46, p. 193-194.

Larcher W. *Ecologia vegetal*, São Carlos: RiMa Artes e Textos. 2000; p.33-40.

Leach MD, Cowen LE. Surviving the heat of the moment: a fungal pathogens perspective. *PLoS Pathog*. 2013; vol.9, 3.

Lee JH, Byung KL, Jong HK, Sang HL, Soon KH. Comparison of Chemical Compositions and Antimicrobial Activities of Essential Oils from Three *Conifer Trees*; *Pinus densiflora*, *Cryptomeria japonica*, and *Chamaecyparis obtusa*. *J. Microbiol. Biotechnol*. 2009; 19(4), 391 – 396.

Lemos, JA. Propriedades antifúngicas de *Ocimum gratissimum* sobre *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum* e *Paracoccidioides brasiliensis*. [Dissertação]. Goiás: Universidade Federal de Goiás; 2004.

Lengeler KB, Cox GM, Heitman J. Serotype AD strains of *Cryptococcus neoformans* are diploid or aneuploid and are heterozygous at the mating-type locus. *Infect Immun*. 2001; 69(1): 115–122.

Lester SJ, Malik R, Bartlett KH, Duncan CG. *Cryptococcosis*: update and emergence of *Cryptococcus gattii*. *Vet. Clin. Pathol*. 2011; 40, 4–17.

Letizia CS, Cocchiara J, Lalko J, Api AM. Fragrante material review on linalool. *Food and Chemical Toxicology*. 2003; v.41, p. 943-964.

Levitz SM, Specht CA. The molecular basis for the immunogenicity of *Cryptococcus neoformans* mannoproteins. *FEMS Yeast Res*. 2006; 6513-524.

Liaw SJ, Wu HC, Hsueh PR. Microbiological characteristics of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* in Taiwan: serotypes, mating types, molecular types, virulence factors, and antifungal susceptibility. *Clin Microbiol Infect*. 2010; 16(6): 696 – 703.

Lima HRP, Kaplan MAC, Cruz AVM. Influência dos fatores abióticos na produção e variabilidade de terpenóides em plantas. *Rev Floresta e Ambiente*. 2003; v.10, n. 2, p. 71-77.

Lima IG, *et al*. Antifungal activity and mode of action of carvacrol against *Candida albicans* strains. *Journal of Essential Oil Research*. 2013; v. 25, (2), p. 138-142.

Lima IO, Oliveira RAG, Lima EO, Farias NMP, Souza EL. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. *Rev. Bras. Farmacogn*. 2006; 16(2): 197-201.

Lin X, Heitman J. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *Annu. Rev. Microbiol*. 2006; 8, 69–105.

Lindenberg ADES; Chang MR; Paniago AM; Lazéra MDOSS; Moncada PM; Bonfim GF; Nogueira SA; Wanke B. Clinical and epidemiological features of 123 cases of cryptococcosis in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2008; v. 50(2). p. 75-8.

Litvintseva AP, Thakur R, Vilgalys R, Mitchell TG. Multilocus Sequence Typing Reveals Three Genetic Subpopulations of *Cryptococcus neoformans var. grubii* (Serotype A), Including a Unique Population in Botswana. *Genetics*. 2006; 172: 2223–2238.

Liu GY, Nizet V. Color me bad: microbial pigments as virulence factors. *Trends Microbiol*. 2009; 17 (9): 406-13.

Luz JMQ, Morais TPS, Blank AF, Sodré ACB, Oliveira GS. Teor, rendimento e composi o química do óleo essencial de manjeriço sob doses de cama de frango. *Horticultura Brasileira*. 2009; 27(3): 349-353.

Ma H, May RC. Virulence in *Cryptococcus* Species. *Advances in Applied Microbiology*. Elsevier Inc. 2009; 67: 131-190.

Maciel MAM, Pinto AC, Veiga VFJr. Plantas Medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova*. 2002; v. 25, p. 429-438.

Magalhães DV. Atividade antifúngica de derivados sintéticos do eugenol e timol frente a cepas de *Candida spp.* e *Microsporium canis*. [Disserta o]. Fortaleza: Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará; 2009.

Manohar V, *et al.* Antifungal activities of origanum oil against *Candida albicans*. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2001; 228: 111-117.

Markowitz K, Moynihan M, Liu M, Kim S. Biologic proprieties of eugenol and zinc oxido-eugenol. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1992; v. 73, p. 729-737.

Martinez LR, Casadevall A. Specific antibody can prevent fungal biofilm formation and this effect correlates with protective efficacy. *Infection and Immunity*. 2005; v 73, p. 6350-6362.

Martins ER, Castro DM, Castellani DC, Dias JE. *Plantas medicinais*. Viçosa: UFV, Imprensa universitária. 1995; 22p.

Martins MA, Pappalardo MC, Melhem MS, Pereira-Chioccola VL. Molecular diversity of serial *Cryptococcus neoformans* isolates from AIDS patients in the city of São Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007; v. 102(7). p.777-8.

Mastromatteo M, Danza A, Conte A, Muratore G, Matteo AN. Shelf life of ready to use peeled shrimps as affected by thymol essential oil and modified atmosphere packaging. *International Journal of Food Microbiology*. 2010; 144: 250-256.

Mastromatteo M, Lucera A, Sinigaglia M, Corbo MR. Combined effects of thymol, carvacrol and temperature on the quality of non conventional poultry patties. *Meat Science*. 2009; 83: 246-254.

Mattos JKA. *Plantas medicinais: aspectos agrônômicos*. Brasília: Edição do autor. 51 p. 1996.

Mazzafera P. Efeito alelopático do extrato alcoólico do cravo-da-índia e eugenol. *Revista Brasil. Bot.* 2003; v.26, n.2, p. 231-238.

McCarthy KM; Cohen C; Schneider H; Gould SM; Brandt ME; Hajjeh RA; Gauteng Cryptococcal Surveillance Initiative Group. Cryptococcosis in Gauteng: implications for monitoring of HIV treatment programmes. *S Afr Med J*. 2008; v. 98(6). p. 452, 454.

McFadden DC, Jesus M, Casadevall. The physical properties of the capsular polysaccharides from *Cryptococcus neoformans* suggest features for capsule construction. *The Journal of Biological Chemistry*. 2006; 281, 1868-1875.

Menezes IAC, Marques MS, Santos TC et al. Antinociceptive effect and acute toxicity of the essential oil of *Hyptis fruticosa* in mice. *Fitoterapia*. 2007; 78: 192- 195.

Menezes TOA, Alves ACBA, Vieira JMS, Menezes SAF, Alves BP; Mendonça LCV. Avaliação in vitro da atividade antifúngica de óleos essenciais e extratos de plantas da região Amazônica sobre cepa de *Candida albicans*. *Revista de Odontologia da UNESP*. 2009; 38(3): 184-91.

Mershon-Shier KL, Vasuthasawat A, Takahashi K, Morrison SL, Beenhouwer DO. *In vitro* C3 deposition on *Cryptococcus* capsule occurs via multiple complement activation pathways. *Mol Immun*. 2011; v. 48, p. 2009-2018.

Mitchell TG, Perfect JR. Cryptococcosis in the era of AIDS — 100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol Rev*. 1995; 8: 515–548.

Morais, LAS. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. *Horticultura Brasileira*. 2009; v. 27 (2): 4050 – 63.

Moyrand F, Klapproth B, Himmelreich U, Dromer F, Janbon G. Isolation and characterization of capsule structure mutant strains of *Cryptococcus neoformans* *Mol Microbiol*. 2002; 45(3): 837-849.

Narusuye K, Kawai F, Matsuzaki K, Miyachi E. Linalool suppresses voltage-gated currents in sensory neurons and cerebellar Purkinje cells. *Journal of Neural Transmission*. 2005; 112(2): 193-203.

Nascimento GGF, Locatelli J, Freitas PC, Silva GL. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2000; 31: 247-256.

Nascimento PFC, Nascimento AC, Rodrigues CS, Antonioli AR, Santos PO, Junior AMB, Trindade R. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: Uma

abordagem multifatorial dos métodos. Revista Brasileira de Farmacognosia. 2007; 17(1) 108-11.

Negróni R. Cryptococcosis. Clin Dermatol. 2012; 30, 6: 599-609.

Nishikawa MM, Lazera MS, Barbosa GG, Trilles L, Balassiano BR, Macedo RC *et al.* Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* isolates from clinical and environmental sources in Brazil: analysis of host and regional patterns. J Clin Microb. 2003; 41(1): 73-77.

Nucci M, Queiroz-Telles F, Tobon AM, Restrepo A, Colombo AL. Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. Clin Infect Dis. 2010; 51 5: 561-570.

Odds FC. *Candida albicans*, the times of a pathogenic yeast. J Med Vet Mycol. 1994; 32:1-8.

Oliveira AP, Salgueiro L, Oliveira RP, Oliveira JM, Vaz CP, Queiroz JA, Rodrigues AG: Anti-Candida activity of essential oils. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry. 2009; 9:1292-1305.

Oliveira RAG *et al.* Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. Rev. Bras. Farmacognosia. 2006; 16(1): 77-82.

Oliveira RAG, Lima, EO, Souza EL, Vieira WL, Freire KRL, Trajano VN *et al.* Interference of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng essential oil on the anti-Candida activity of some clinically used antifungals. Rev Bras Farmacogn. 2007; 17(2): 186 -190.

Oliveira WA, Pereira FO, Luna GCDG, Lima IO, Wanderley PA, Lima RB, Lima EO. Antifungal activity of *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor against *Candida albicans*. Brazilian Journal of Microbiology. 2011; 42(2):433-41.

Oliveira, GF. Avaliação da atividade antimicrobiana, in vitro, do extrato hidroalcoólico bruto das folhas de *Syzygium cumini* (L.) SKEELS (Jambalão). [Dissertação]. São Paulo: Universidade de Franca; 2005.

Oliveira, LE. Atividade do extrato de própolis verde sobre o comportamento morfológico de *Candida albicans* isoladas da mucosa bucal de pacientes HIV positivo e de pacientes com sorologia desconhecida para o HIV. [Dissertação]. São Paulo: Coordenadoria de Controle de Doenças – Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, 2007.

OMS. Manual de segurança biológica em laboratório – 3a edição. Genebra, Suíça. 2004.

O'Meara TR, Alspaugh JA. The *Cryptococcus neoformans* capsule: a sword and a shield. Clin Microbiol Ver. 2012; v. 25, n. 3.

Ortolani AA, Camargo MBP. Influência dos fatores climáticos na produção. In: Castro RC *et al.* Ecofisiologia da produção agrícola. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato. 1987; p. 71-81.

Ostrosky EA *et al.* Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. Brazilian Journal of Pharmacognosy. 2008; 18(2): 301-307.

Ouattara B, Simard RE, Holley RA, Piette GJP, Begin A. Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. International Journal of Food Microbiology. 1997; 37: 155-162.

Pammi M, Liang R, Hicks JM, Barrish J, Versalovic J. Farnesol decreases biofilms of *Staphylococcus epidermidis* and exhibits synergy with nafcillin and vancomycin. Pediatr. Res. 2011; 70, 578–583.

Pappalardo MC; Paschoal RC; Melhem MS. AIDS-associated central nervous system cryptococcosis: a Brazilian case study. *AIDS*. 2007; v. 12;21(14), p. 971-2.

Park BJ, Wannemuehler KA, Marston B, Govender N, Pappas PG, Chiller TM. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *AIDS*. 2009; 23: 525–30.

Perfect JR, Casadevall A. Cryptococcosis. *Infect Dis Clin North Am*. Dec; 2002; 16(4): 837-74.

Pfaller MA *et al*. Multicenter evaluation of four methods of yeast inoculum preparation. *J. Clin. Microbiol*. 1988; v.26, p.1437-1441.

Pfaller MA, Messer AS, Karlsson A, Bolmstrom A. Evaluation of the Etest method for determining fluconazole susceptibilities of 402 clinical yeast isolates by using three different agar media. *J. Clin. Microbiol*. 1998; 63: 2586 – 2589.

Pina-Vaz C *et al*. Antifungal activity of Thymus oils and their major compounds. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venerology*. 2004; v. 18, n. 1, p. 73-78.

Pinto E, Silva LV, Cavaleiro C, Salgueiro L. Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *J. Med. Microbiol.*, November. 2009; 58: 1454-1462.

Piras *et al*. Isolation of the volatile oil from *Satureja thymbra* by supercritical carbon dioxide extraction: chemical composition and biological activity. *Nat Prod Commun*. 2011; (10):1523-6.

Pires MFC, Correa B, Gambale W, Paula CR. Experimental model of *Candida albicans* (serotypes A and B) adherence in vitro. *Braz J Microbiol*. São Paulo. 2001; 32: 163-169.

Polachini CO. Avaliação *in vitro* de extratos de plantas e produtos diversos, frente a amostras de *Candida albicans*. [Dissertação]. São Paulo: Coordenadoria de Controle de Doenças – Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, 2004.

Price MF, Wilkinson ID, Gentry LO. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia*. 1982; 20(1): 7-17.

Priefert H, Rabenhorst J, Steinbuchel A. Biotechnological production of vanillin. *Applied Microbiology Biotechnology*. 2001; 56: 296-314.

Qiu J *et al.* Subinhibitory concentrations of perilla oil affect the expression of secreted virulence factor genes in *Staphylococcus aureus*. *PLoS ONE*. 2011; v.6, n.1.

Quideau S *et al.* Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angewandte Chemie International Ed*. 2011; v.50, n.3, p. 586-621.

Raina VK, Srivastava SK, Aggarwal KK, Syamasundar KV, Kumar S. Essential oil composition of *Syzygium aromaticum* leaf from Little Andaman, India. *Flavour Fragrance Journal*. 2001; 16:334-336.

Rakotonirainy MS, Lavedrine B. Screening for antifungal activity of essential oils and related compounds to control the biocontamination in libraries and archives storage areas. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2005; v. 55, p. 141-147.

Rattanachaikunsopon P, Phumkhachorn P. Assessment of factors influencing antimicrobial activity of carvacrol and cymene against *Vibrio cholerae* in food. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2010; 110: 614-619.

Raven PH, Evert RF, Eichhorn SE. *Biologia Vegetal*. 6ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A. 2001. 906p.

Ritter M, Goldman DL. Pharmacotherapy of cryptococcosis. *Expert Opin Pharmacother.* 2009; 10 (15): 2433-43.

Robledo S *et al.* I. In vitro and in vivo cytotoxicities and antileishmanial activities of thymol and hemisynthetic derivatives. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2005; 49: 1652-1655.

Rodrigues, VM. Determinação da solubilidade em sistemas ternários: cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllus*) + CO₂, gengibre (*Zingiber officinale*) + CO₂ e erva-doce (*Pimpinella anisum*) + CO₂. Universidade de Campinas, 2001.

Roilides E, Kontoyiannis DP, Walsh TJ. Host defenses against zygomycetes. *Clin Infect Dis.* 2012; 54, 61-66; 2012.

Romero AL. Contribuição ao conhecimento químico do óleo-resina de copaíba: Configuração Absoluta de Terpenos. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

Rosa MSS, *et al.* Antileishmanial Activity of a Linalool-Rich Essential Oil from *Croton cajucara*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2003; 47(6): 1895-901.

Ruchel R, Tegeler R, Trost MA. Comparison of secretory proteinases from different strains of *Candida albicans*, *Sabouraudia*. 1982; 20(3): 233-244.

Saad A, *et al.* Anticandidal activity of the essential oils of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* and their synergism with amphotericin B and fluconazol. *Phytomedicine.* 2010; 17(13): 1057–60.

Sakurai H, Kaji M, Seumasu K. Clinicopathological characteristics of pulmonary cryptococcosis. *Kyobu Geka.* 2009; 62(10): 863-7.

Sallé JL. O Totum em Fitoterapia. *Robe. Editorial.* 1996; 13 -14

Sánchez ME, Turina AV, García DA, Nolan MV, Perillo MA. Surface activity of thymol: implications for an eventual pharmacological activity. *Colloids Surf B: Biointerfaces*. 2004; 34:77-86.

Sangwan NS *et al.* Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regulation*. 2001; v.34, n.1, p. 3-21.

Santangelo RT, Nouri-Sorkhabi MH, Sorrell TC, Cagney M, Chen SCA, Kuchel PW & Wright LC Biochemical and functional characterisation of secreted phospholipase activities from *Cryptococcus neoformans* in their naturally occurring state. *J Med Microbiol*. 1999; 48: 731–740.

Santos PS. Avaliação in vitro da atividade antifúngica de óleos essenciais sobre *Cryptococcus neoformans* [Dissertação]. São Paulo: Coordenadoria de Controle de Doenças – Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, 2011.

Sautour M. *et al.* Antifungal Steroid Saponins from *Dioscorea cayenensis*. *Planta Médica*. 2004; 70: 90-92.

Schmiel DH & Miller VL. Bacterial phospholipases and pathogenesis. *Microbes Infect*. 1999; 1: 1103-1112.

Scoralik MG, Daemon E, Monteiro CMO, Maturano R. Enhancing the acaricide effect of thymol on larvae of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) by solubilization in ethanol. *Parasitol Res*. 2012; 110:645–648.

Semighini CP, Murray N, Harris SD. Inhibition of *Fusarium graminearum* growth and development by farnesol. *FEMS Microbiol. Lett*. 2008; 279, 259–264.

Sen-Sung C, Ju-Yun L, Ed-Haun C, Shang-Tzen C. Antifungal activity of cinnamaldehyde and eugenol congeners against wood-rot fungi. *Bioresource Technology*. 2008; 99, 5145–5149.

Severo CB, Gazzoni AF, Severo LC. Criptococose pulmonar – Capítulo 3 – Curso de Atualização – Micoses. J. Bras. Pneumol. 2009; v. 35, n. 11.

Shapiro S, Meier A, Guggenheim B. The antimicrobial activity of essential oils and essential oil components towards oral bacteria. Oral Microbiology Immunology. 1994; 9: 202-208.

Sharifzadeh A, Khosravi AR, Ahmadian S. Chemical composition and antifungal activity of *Satureja hortensis* L. essential oil against planktonic and biofilm growth of *Candida albicans* isolates from buccal lesions of HIV+ individuals. Microb Pathog. 2016; 96: 1-9.

Shoham S, Cover C, Donegan N, Fulnecky E, Kumar P. *Cryptococcus neoformans* meningitis at 2 hospitals in Washington, DC: adherence of health care providers to published practice guidelines for the management of cryptococcal disease. Clinical of Infectious Diseases. 2005; 40: 477-479.

Silva AF, Barbosa LCA, Silva EAM, Casali VWD, Nascimento EA. Composição química do óleo essencial de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. (Lamiaceae). Revista Brasileira de Plantas Mediciniais. 2003; 6: 1-7.

Silva AR. Tudo sobre aromaterapia. São Paulo: Roca. 624 p; 1998.

Silva FM, Paula JE, Espindola LS. Evaluation of the antifungal potential of Brazilian Cerrado medicinal plants. Mycoses. 2009; 52(6):511–17.

Silva JPL, Duarte-Almeida JM, Perez DV, Franco BDGM. Óleo essencial de orégano: interferência da composição na atividade frente à *Samonella Enteritidis*. Ciência e Tecnol. Aliment. Campinas. 2010; 30: 136-141.

Silva LP. Ação antiespasmódica do trans-cariofileno e o bloqueio de canais de Ca²⁺ em músculo liso traqueal de rato. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2010.

Silva MRO. Detecção da atividade antifúngica de extratos de plantas do manguezal de Vila Velha, Itamaracá-PE. [Dissertação]. Pernambuco: Universidade Federal de Pernambuco; 2004.

Silva TB, Rangel ET. Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato etanólico do Tomilho (*Thymus vulgaris* L.) in vitro. Revista Eletrônica de Farmácia. 2010; 7(2): 48 – 58.

Silva, RC. Comportamento morfológico de *Candida albicans* e *Candida dubliniensis*: sensibilidade a antifúngicos e ao extrato etanólico de própolis [Dissertação]. São Paulo: Coordenadoria de Controle de Doenças – Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, 2007.

Simon JE *et al.* Water stress-induced alterations in essential oil content and composition of sweet basil. Journal of Essential Oil Research. 1992; 4: 71-75.

Simões CC, Araújo DB, Araújo RPC. Estudo in vitro e ex vivo da ação de diferentes concentrações de extratos de própolis frente aos microrganismos presentes na saliva de humanos. Rev Bras Farmacogn. 2008; 18: 84-89.

Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. Da UFSC. 1999; p.387-415.

Simwami SP, Khayhan K, Henk DA, Aanensen DM, Boekhout T, et al. Low Diversity *Cryptococcus neoformans* Variety *grubii* Multilocus Sequence Types from Thailand Are Consistent with an Ancestral African Origin. PLoS Pathog. 2011; 7(4).

Solórzano-Santos, F & Miranda-Novales, MG. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. Current Opinion in Biotechnology. 2011; v.23, p.1-6.

Sousa MO, Matos MEO, Matos FJA, Machado MIL, Craveiro AA. Constituintes Químicos Ativos em Plantas Medicinais Brasileiras. Ed. Univer Fed Ceará, 1991.

Souza AB *et al.* Antimicrobial activity of terpenoids from *Copaifera langsdorffii* Desf. against cariogenic bacteria. *Phytotherapy Research*. 2011; v. 25, n.2, p. 215-20.

Souza CMM, Silva HR, Vieira Jr GM, Ayres MCC, Costa CLS, Araújo DS *et al.*, Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Quím Noca*. 2007; v. 30, n. 2, 351-355.

Steen BR, Lian T, Zuyderduyn S, MacDonald WK, Marra M, Jones SJ, Kronstad JW. Temperature-regulated transcription in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Genome Res*. 2002; 12, 9: 1386-1400.

Steenbergen JN & Casadevall A. The origin and maintenance of virulence for the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Microbes Infect*. 2003; 5: 667–675.

Tampieri MP, Galuppi R, Macchioni F, Carelle MS, Falcioni L, Cioni PL, Morelli I: The inhibition of *Candida albicans* by selected essential oils and their major components. *Mycopathologia*. 2005; 159:339-345.

Tappin MRR, *et al.* Análise química quantitativa para a padronização do óleo de copaíba por cromatografia em fases gasosa e alta resolução. *Química Nova*. 2004; 27(2): 236-40.

Tavares AC, Gonçalves MJ, Cruz MT, Cavaleiro C, Lopes MC, Canhoto J, *et al.* Essential oils from *Distichoselinum tenuifolium*: Chemical composition, cytotoxicity, antifungal and anti-inflammatory properties. *J. Ethnopharmacology*. 2010; 130(3): 593-598.

Thakur R; Sarma S; Kushwaha S. Prevalence of HIV-associated cryptococcal meningitis and utility of microbiological determinants for its diagnosis in a tertiary care center. *Indian J Pathol Microbiol.* 2008; v. 51(2) p. 212-4.

Thirach S, *et al.* Antifungal Activity of Some Medicinal Plant Extracts Against *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*. *Acta Hort (ISHS).* 2003; 597:217-221.

Torres-Rodriguez JM, Alvarado-Ramirez E, Gutiérrez-Gallego R. Urease activity in *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *Rev. Iberoam Micol.* 2008; 25, 27-31.

Trombetta, D. *et al.* Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2005; v.49, n.6, p.2474-2478.

Tsao R, Yu Q. Nematicidal activity of monoterpenoid compounds against economically important nematodes in agriculture. *Journal of Essential Oil Research.* 2000; 12: 350-354.

Ultee A, Bennink MHJ, Moezelaar R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology.* 2002; 68 (4): 1561 – 1568.

van Vuuren S, Viljoen A. Plant-based antimicrobial studies – methods and approaches to study the interaction between natural products. *Planta Medica.* 2011; v.77, n.11, p. 1168-82.

Vecchiarelli A *et al.* Elucidating the immunological function of the *Cryptococcus neoformans* capsule. *Future Microbiol.* 2013; v. 8, n. 9, p. 1107-1116.

Velagapudi R, Hsueh YP, Geunes-Boyer S, Wright JR, Heitman J. Spores as infectious propagules of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun.* 2009; v. 77, p. 4345-4355.

Venâncio, A M. Toxicidade aguda e atividade antinociceptiva do óleo essencial do *Ocimum basilium* L. (manjeriço), em *Mus musculus* (camundongos). Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Sergipe, Aracajú, 2006.

Verpoorte R, Maraschin M. Engenharia do Metabolismo de Plantas Medicinais. In: Yunes RA, Calixto, JB. Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna. Campus Chapecó, Santa Catarina: Argos- Ed. Universitária UNOESC. 2001; p. 381-432.

Vidotto V, Ito-Kuwas, Nakamura K, Aoki s, Melhem M, Fukushima K, Bollo E. Extracellular enzymatic activities in *Cryptococcus neoformans* strains isolated from AIDS patients in different countries. Rev Iberoam Micol. 2006; v. 23(4). p. 216-20.

Viollon C, Chaumont JP. Antifungal properties of essential oils and their main components upon *Cryptococcus neoformans*. Mycopathologia. 1994; 128: 151-153.

Vitti AS, Brito JO. Óleo Essencial de Eucalipto. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – Universidade de São Paulo. 2003; n.17.

Viviani MA, Tortorano AM. *Cryptococcus*. In: Anaissie EJ, McGinnis MR, Pfaller MA. Clinical Mycology. 2 eds. Churchill Livingstone. Elsevier. 2009.

Waksmundzka-Hajnos M, Sherma J, Kowalska T. Thin layer chromatography in phitochemistry. Chromatographic. Science Series, CRC Press. 2008; v. 99.

Walker JT, Melin JB. *Mentha x piperita*, *Mentha spicata* and effects of their essential oils on Meloidogyne in soil. Journal of Nematology. 1996; 28: 629-635.

Wang CY, Wang SY, Chen S. Increasing antioxidant activity and reducing decay of blueberries by essential oils. J. Agric. Food Chem. 2008; 56 (10): 3587–3592.

Weber K, Schulz B, Ruhnke M. The quorum-sensing molecule E, E-farnesol – its variable secretion and its impact on the growth and metabolism of *Candida* species. *Yeast*. 2010; 27, 727–739.

Williamson PR. Biochemical and molecular characterization of the diphenol oxidase of *Cryptococcus neoformans*: identification as a laccase. *J Bacteriol*. 1994; 176(3): 656-664.

Wright DE, White FA, Gerfen RW, Silos-Santiago I, Snider WD. The guidance molecule semaphoring III is expressed in regions of spinal cord and periphery avoided by growing sensory axons. *Journal of Comportamental Neurology*. 1995; v. 361, p. 321-333.

Wu BN, Hwang TL, Liao CF, Chen MIJ. Vanimolol: a new selective beta B-adrenergic antogonist derived from vanillin. *Biochemical Pharmacology*. 1994; v. 48, p. 101-109.

Xie Y, Yang Z, Cao D, Ding H, Zhang D. Antitermitic and antifungal activities of eugenol and its congeners from the flower buds of *Syzygium aromaticum* (clove). *Industrial Crops and Products*. 2015; 77: 780–786.

Xu J, Luo G, Vilgalys RJ, Brandt ME, Mitchell TG. Multiple origins of hybrid strains of *Cryptococcus neoformans* with serotype AD. *Microbiology*. 2002; 148, 203–212.

Yaya R, Han S, Yyong D, Jae-Kwan H. Atividade *in vitro* de Xanthorrhizol contra *Candida glabrata*, *C. guilliermondii* e *C. parapsilosis* isoladas de biofilmes. *Medical Mycology*. 2011; 49: 1–9.

Yukawa TA *et al.*, Prophylactic treatment of cytomegalovirus infection with traditional herbs. *Antiviral Research*. 1996; 32: 63-70.

Zalachora, I, Kagiava A, Vokou D, Theophilidis G. Assessing the Local Anesthetic Effect of Five Essential Oil Constituents. *Planta Med.*, 2010.

Zapata B, Duraín C, Stashenko E, Betancur-Galvis L, Arango ACM. Actividad antimicótica y citotóxica de aceites esenciales de plantas de la familia Asteraceae. *Revista Iberoamericana de Micología*. 2010; 27(2): 101–103.

Zapata Montoya, M; Galindo Zamora, V. Aislamiento de *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* en un felino domestico: reporte de caso: *Rev Med Vet*. 2009; (18): 53-62.

Zaragoza O, Casadevall A. Experimental modulation of capsule size in *Cryptococcus neoformans*. *Biol Proced*. 2004; v. 6, n. 1, p. 10-15.

Zaragoza O, Fries BC, Casadevall A. Induction of the capsule growth in *Cryptococcus neoformans* by mammalian serum and CO₂. *Infection and Immunity*. 2003; v.7. 6155-64.

Zaragoza O, Rodrigues ML, De Jesus M, Frases S, Dadachova E, Casadevall A. The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Advances in Applied Microbiology*. 2009; 68: 133-216.

Zatz C *et al*. *Compêndio de Micologia Médica*. 2ª Ed. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2010.

Zhu J, Kang Y, Uno J, Taguchi H, Liu Y, Ohata M, et al. Comparison of Genotypes Between Environmental and Clinical Isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* Based on Microsatellite Patterns. *Mycopathologia*. 2009; 8(14).

Zuzarte M, Gonçalves MJ, Cavaleiro C, Canhot J, Vale-Silva L, Silva MJ, Pinto E, Salgueiro L. Chemical composition and antifungal activity of the essential oils of *Lavandula viridis* L'Hér. *J Med Microbiol*. 2011; 60: 612-618.

8. ANEXOS

Anexo 01: Aprovação do Comitê de Ética do Instituto Adolfo Lutz



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
Comitê de Ética em Pesquisa - CEPIAL
Av. Dr. Arnaldo, 355 - Sala 83 - Cerqueira César - 01246-902
Fone: 3068-2859 e-mail: cepi@ial.sp.gov.br



São Paulo, 25 de outubro de 2010.

Protocolo: 083/ 2010

Projeto de Pesquisa: "Atividade de óleos essenciais sobre *Cryptococcus neoformans*"

Pesquisador Responsável: Maria de Fátima Costa Pires

Instituição: Instituto Adolfo Lutz

O Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz – CEPIAL analisou e deliberou, em reunião de 21 de outubro de 2010, que para o referido projeto **NÃO SE APLICA** a apreciação de acordo com a Resolução CNS 196/96 - que aprova as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. O CEPIAL considerou o protocolo de pesquisa descrito e documentado com rigor científico.

Luz Marina Trujillo
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
Instituto Adolfo Lutz - CEPIAL

1ª via – coordenador
2ª via – CEPIAL
LMT/dvmp

Anexo 02: Ficha de identificação de leveduras

Procedência: _____ Registro: _____

Observações: _____

1 Exame direto: _____

2 Crescimento em meios especiais _____

Crescimento em meio de ácido graxos _____

3 Microcultivo e tubo germinativo _____

PM () BL () AR () TG () MV () CL () Outras _____

PM-pseudomicélio; BL-blastoconídio; AR-artrósporos, TG: tubo germinativo, MV-micélio verdadeiro; CL-clamidoconídio;

4 Ascos e ascósporos _____

Positivo _____ Negativo _____ Forma _____ N° _____ localização _____

5 Outras provas:

Síntese de amido _____ Prod. Melanina _____ TTC _____

6 Auxanograma:

KNO₃ () Glicose () Inositol () Sacarose () Lactose () Dulcitol () Xilose ()

Rafinose () Celobiose () Melibiose () Treatose () Ramnose () Maltose ()

7 Zimograma:

Glicose () Maltose () Lactose () Sacarose ()

Diagnóstico: _____

Anexo 03: Cromatografia e composição química de *Eugenia caryophyllus*

Composição e quantificação relativa de óleos essenciais

Shimadzu 14B/QP5050A

Coluna: BPX5 (non polar 5% polysilphenylene)

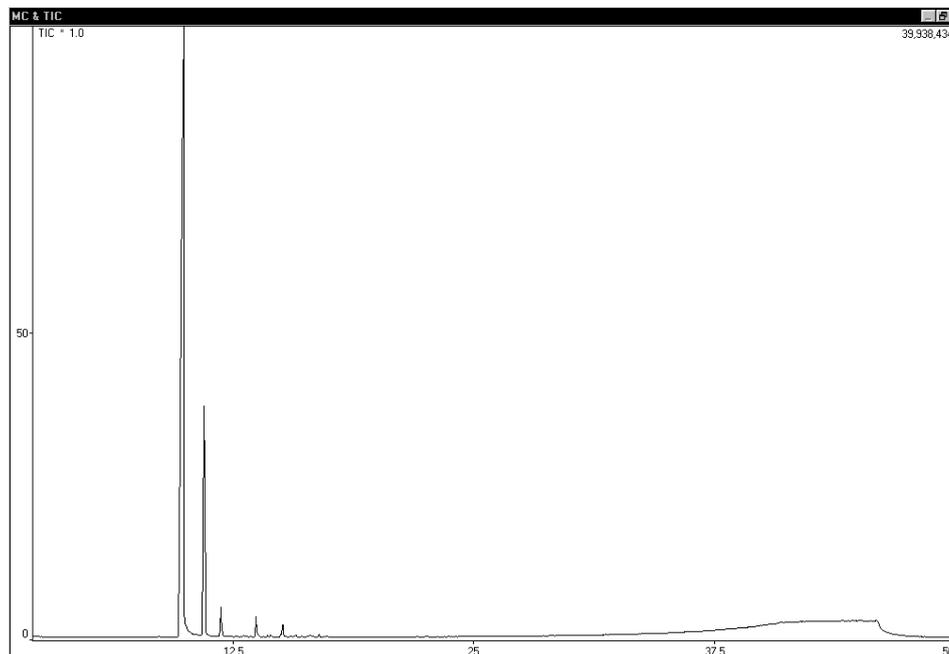
Temperatura inicial: 60 °C

Temperatura final: 280 °C

Gradiente: 5 °C/min

Eugenia caryophyllus Lote 4470310

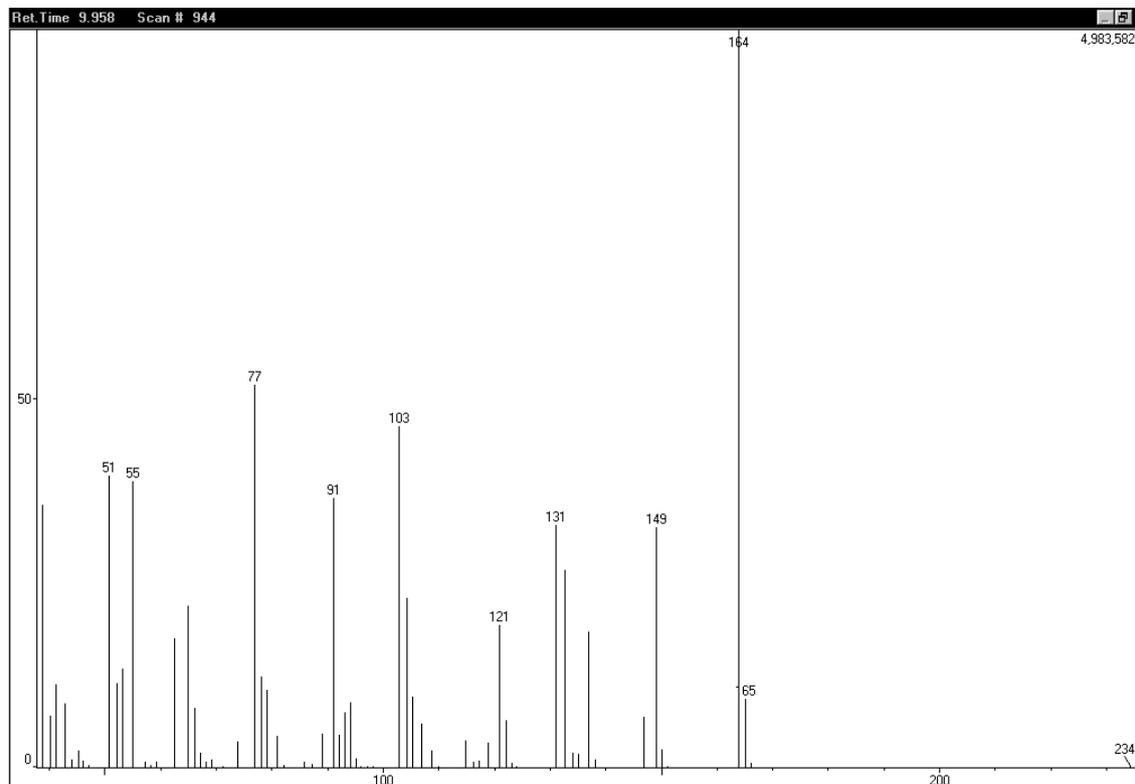
Composição	%
eugenol	84,10
β -cariofileno	12,67
α -cariofileno	1,51
acetato de isoeugenol	1,08



PKNO	R.TIME	I. TIME	F.TIME	A/H(sec)	AREA	HEIGHT	MARK	%Total	NAME
1	9.977	9.683	10.150	9.038	356267447	39419470		84.10	

2	11.021	10.900	11.150	3.606	53655609	14878157	12.67
3	11.898	11.825	12.000	3.424	64036711870451		1.51
4	13.740	13.658	13.850	3.570	45733991280917		1.08

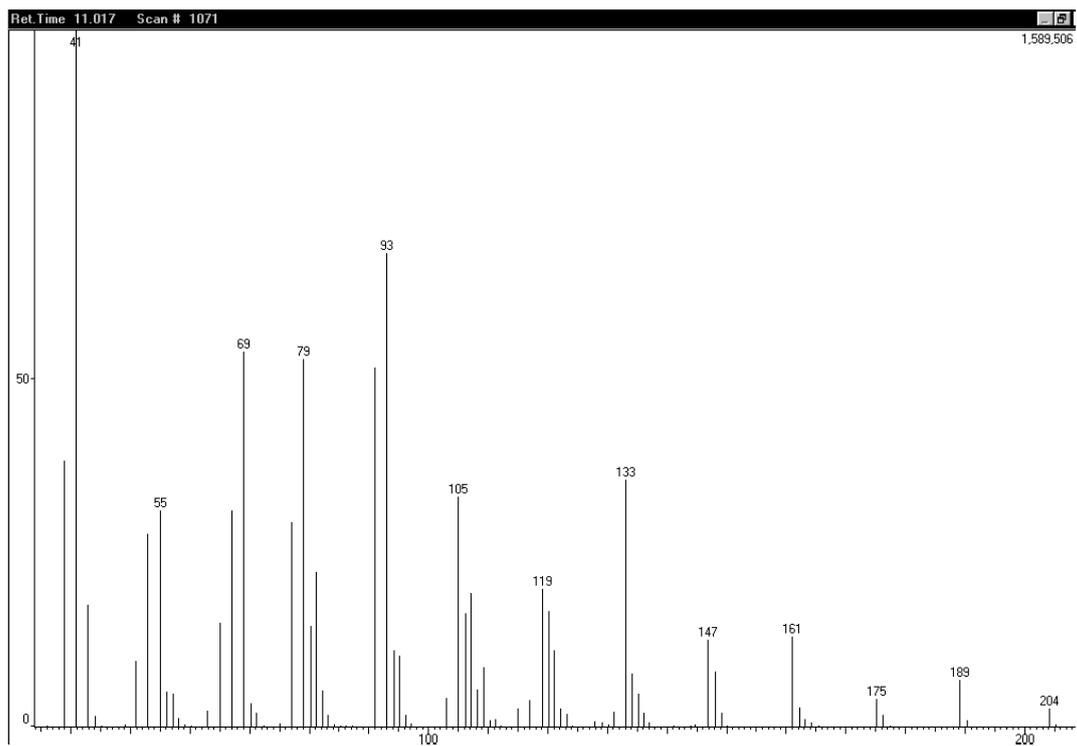
EUGENOL



38.75	35.58
40.10	7.05
41.10	11.40
42.90	8.71
44.10	1.17
45.20	2.32
46.05	1.01
47.05	0.33
50.70	39.56
52.10	11.49
53.10	13.43
55.00	38.76
57.15	0.83
58.20	0.39
59.15	0.88
62.50	17.52
64.95	21.95
66.15	8.07
67.20	2.07
68.15	0.86
69.15	1.12
70.15	0.13
71.15	0.25
73.95	3.56
76.90	51.96
78.20	12.46
79.15	10.56

80.90	4.28
82.15	0.38
83.20	0.12
84.25	0.13
85.85	0.88
87.20	0.57
89.05	4.61
91.05	36.50
92.20	4.54
93.20	7.46
94.15	8.85
95.15	1.33
96.05	0.28
97.25	0.16
98.15	0.26
99.15	0.09
102.95	46.32
104.20	22.96
105.20	9.67
106.90	6.07
108.80	2.33
110.05	0.26
111.10	0.06
112.10	0.03
114.90	3.76
116.20	0.78
117.20	0.98
118.85	3.43
121.00	19.34
122.10	6.52
123.10	0.75
124.05	0.21
125.10	0.03
127.20	0.11
127.95	0.11
130.95	32.83
132.75	26.84
134.15	1.99
135.15	1.92
137.00	18.46
138.10	1.20
139.00	0.12
140.15	0.02
143.15	0.04
143.95	0.03
146.85	6.92
149.00	32.60
150.20	2.44
151.20	0.25
152.55	0.03
163.95	100.00
165.15	9.30
166.20	0.75
167.55	0.03
234.50	0.03

β-CARIOFILENO:



34.90	0.08
36.00	0.23
38.95	38.25
40.90	100.00
42.80	17.58
44.15	1.67
45.15	0.28
47.30	0.10
48.15	0.11
49.05	0.40
50.90	9.42
52.90	27.72
54.95	31.05
56.15	5.14
57.20	4.84
58.15	1.25
59.20	0.44
60.30	0.18
61.15	0.07
62.85	2.42
65.00	15.02
67.00	31.03
69.00	53.85
70.20	3.34
71.20	2.01
72.35	0.21
73.35	0.15
74.10	0.11
75.10	0.58
77.05	29.37
78.95	52.74
80.20	14.44
81.20	22.23
82.25	5.27
83.15	1.82
84.15	0.45
85.20	0.21

86.25	0.18
87.25	0.22
91.00	51.60
92.90	68.07
94.20	10.98
95.15	10.28
96.15	1.68
97.15	0.46
98.20	0.11
99.20	0.07
101.00	0.08
103.05	4.16
105.05	33.02
106.20	16.38
107.20	19.28
108.20	5.44
109.20	8.58
110.30	1.06
111.20	1.10
112.20	0.20
113.15	0.14
115.05	2.67
117.00	3.92
119.05	19.89
120.15	16.60
121.15	10.94
122.20	2.73
123.15	1.97
124.10	0.30
126.15	0.13
127.90	0.88
129.20	0.66
130.15	0.43
131.15	2.20
133.00	35.51
134.20	7.70
135.20	4.74
136.20	2.00
137.10	0.62
138.10	0.12
140.10	0.06
141.10	0.22
142.10	0.09
143.10	0.10
144.00	0.16
144.75	0.33
146.95	12.48
148.20	8.05
149.25	2.07
150.15	0.28
151.00	0.10
161.00	13.00
162.20	2.80
163.20	1.10
164.25	0.74
165.45	0.16
173.40	0.11
175.10	4.01
176.25	1.77
177.45	0.18
189.10	6.74
190.30	0.96
191.45	0.08
204.20	2.68
205.30	0.38
206.45	0.09
207.45	0.07

Anexo 04: Cromatografia e composição química de *Thymus vulgaris*

Composição e quantificação relativa de óleos essenciais

Shimadzu 14B/QP5050A

Coluna: BPX5 (non polar 5% polysilphenylene)

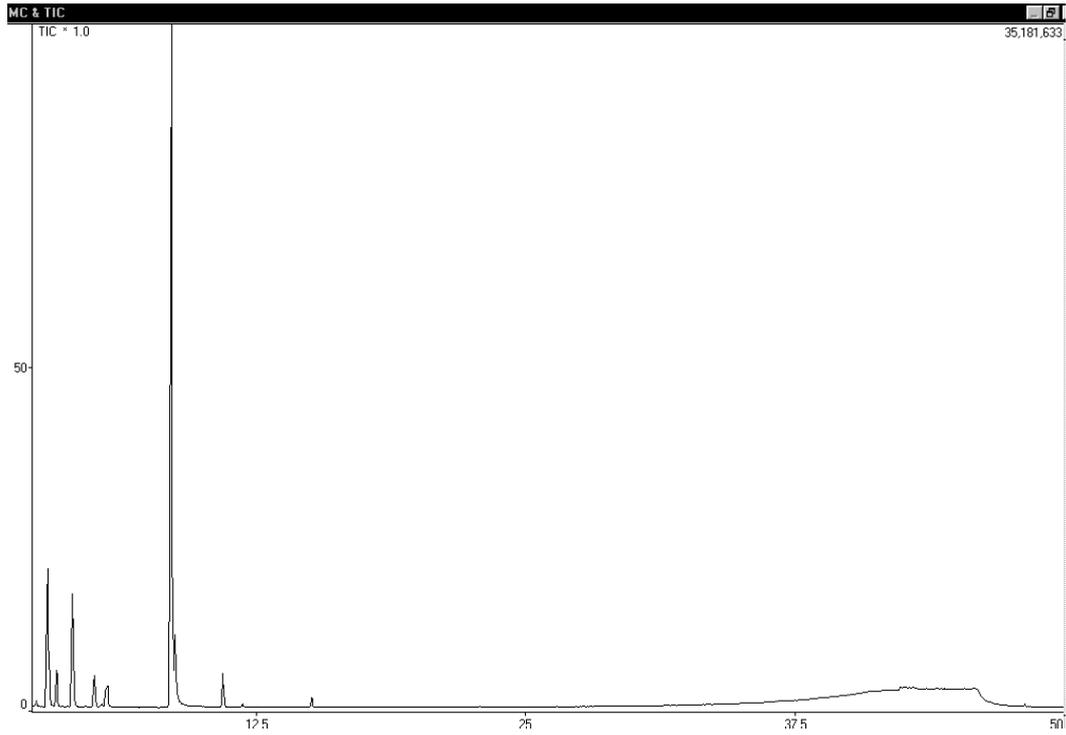
Temperatura inicial: 60 °C

Temperatura final: 280 °C

Gradiente: 5 °C/min

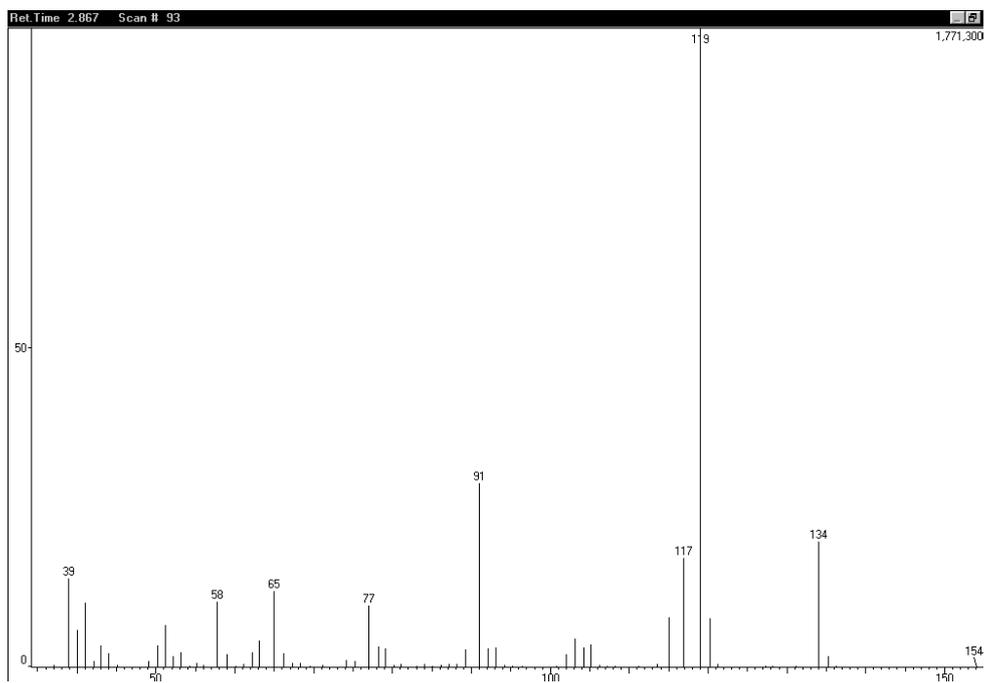
***Thymus vulgaris* Lote 10081009**

Composição	%
P-cimeno	14,43
γ -terpineno	2,55
linalool	8,49
canfora	2,37
borneol	1,34
terpineol	1,47
timol	62,13
carvacrol	5,08
β -cariofileno	2,15



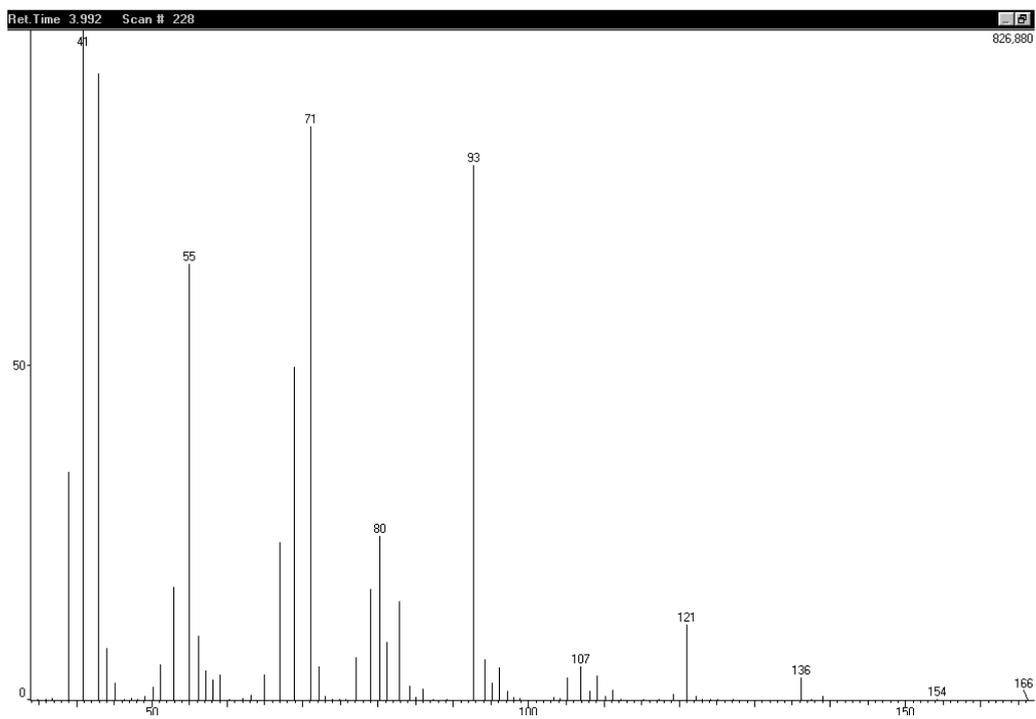
PKNO	R.TIME	I. TIME	F.TIME	A/H(sec)	AREA	HEIGHT	MARK	%Total	NAME
1	2.840	2.725	3.067	5.614	39556017	7046380		14.43	
2	3.265	3.192	3.392	4.012	6985823	1741140		2.55	
3	3.989	3.875	4.125	4.047	23269955	5750477		8.49	
4	5.005	4.925	5.117	4.002	6502017	1624724		2.37	
5	5.538	5.458	5.592	3.822	3670431	960349		1.34	
6	5.642	5.592	5.742	3.819	4026166	1054251	V	1.47	
7	8.610	8.467	8.708	4.889	170366118	34850028		62.13	
8	8.748	8.708	8.925	4.020	13942456	3468564	V	5.08	
9	10.978	10.900	11.083	3.494	5897194	1687764		2.15	

P- CIMENO



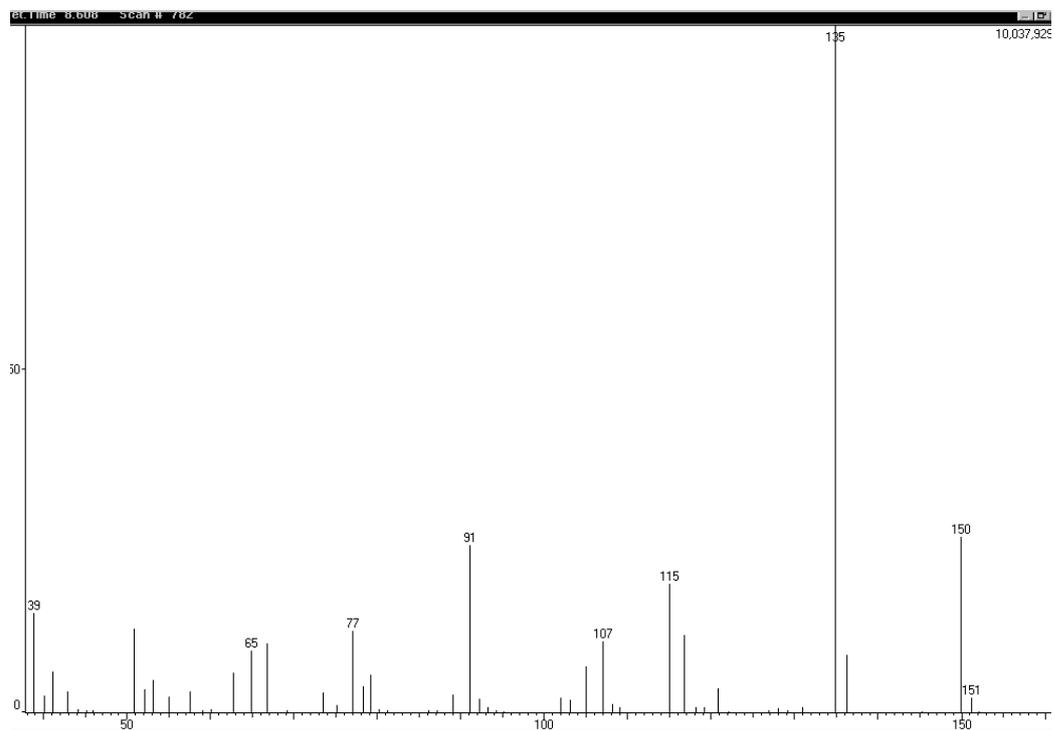
35.20	0.08	99.40	0.11
36.20	0.14	100.15	0.06
37.10	0.35	100.85	0.22
38.90	13.89	102.05	2.04
40.00	5.88	103.15	4.51
41.05	10.11	104.20	3.06
42.15	0.95	105.15	3.62
43.05	3.43	106.20	0.38
44.05	2.20	107.20	0.20
45.15	0.37	108.25	0.30
46.15	0.14	109.25	0.11
47.15	0.13	110.25	0.08
49.05	0.95	111.25	0.17
50.15	3.46	112.25	0.08
51.15	6.56	113.60	0.50
52.15	1.81	115.05	7.80
53.15	2.30	116.95	17.11
54.25	0.19	119.05	100.00
55.10	0.62	120.20	7.72
56.05	0.40	121.20	0.48
57.80	10.29	126.30	0.08
58.95	2.03	127.35	0.25
60.10	0.23	128.15	0.29
61.15	0.54	129.15	0.11
62.20	2.30	130.15	0.08
63.15	4.23	131.20	0.30
64.90	12.00	134.00	19.66
66.20	2.20	135.20	1.74
67.35	0.67	136.25	0.18
68.35	0.69	138.20	0.11
69.55	0.22	139.20	0.14
71.10	0.38	154.10	0.14
72.85	0.12		
74.15	1.10		
75.20	0.99		
77.00	9.72		
78.20	3.30		
79.15	3.03		
80.25	0.31		
81.10	0.50		
82.25	0.11		
83.05	0.23		
84.10	0.51		
85.05	0.27		
86.10	0.37		
87.10	0.50		
88.20	0.59		
89.20	2.86		
91.05	28.87		
92.15	2.93		
93.15	3.14		
94.25	0.31		
95.20	0.23		
96.40	0.15		
97.40	0.10		
98.40	0.14		

LINALLOOL



34.90	0.23	110.25	0.76
35.90	0.27	111.10	1.63
36.80	0.39	112.25	0.19
38.90	34.05	115.25	0.16
40.90	100.00	117.25	0.19
42.90	93.49	118.10	0.13
44.05	7.81	119.15	1.03
45.10	2.73	121.05	11.39
46.35	0.23	122.20	0.73
47.35	0.33	123.10	0.23
48.15	0.19	124.10	0.16
49.05	0.68	125.10	0.16
50.15	2.10	126.10	0.14
51.15	5.42	127.10	0.24
52.95	17.00	128.10	0.14
55.00	65.14	136.10	3.43
56.15	9.64	137.50	0.23
57.15	4.56	138.30	0.14
58.15	3.16	139.05	0.66
59.10	3.90	154.20	0.23
60.30	0.30	166.20	0.14
62.10	0.42		
63.10	0.87		
63.80	0.14		
65.00	3.90		
67.00	23.70		
68.90	49.76		
71.05	85.66		
72.15	5.16		
73.05	0.67		
73.95	0.27		
74.95	0.27		
75.70	0.19		
77.05	6.41		
79.05	16.64		
80.20	24.54		
81.20	8.74		
82.85	14.83		
84.15	2.21		
85.05	0.57		
85.95	1.78		
87.40	0.15		
89.15	0.27		
92.65	79.92		
94.20	6.14		
95.20	2.65		
96.15	4.94		
97.15	1.50		
98.00	0.47		
98.80	0.40		
103.30	0.56		
104.20	0.34		
105.15	3.36		
106.95	5.15		
108.10	1.43		
109.15	3.76		

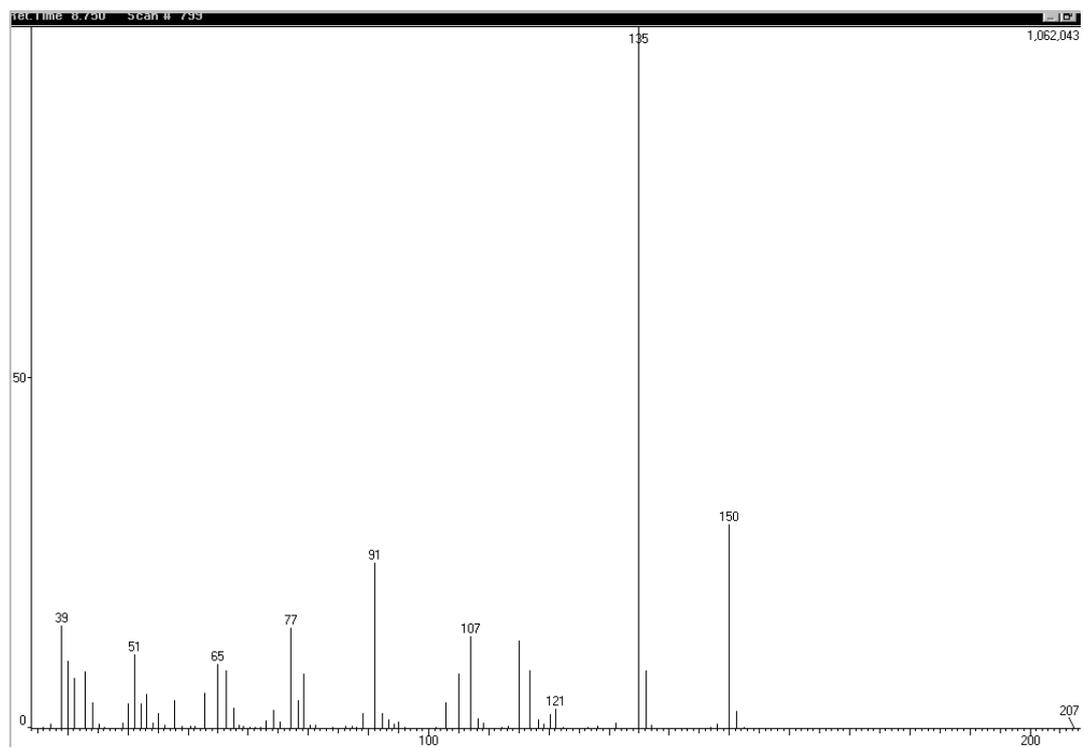
TIMOL



38.80	14.57
40.05	2.53
41.10	5.99
42.85	3.15
44.10	0.57
45.15	0.43
45.90	0.31
46.95	0.04
50.80	12.28
52.10	3.40
53.10	4.73
54.95	2.37
57.50	3.07
59.10	0.43
60.10	0.55
62.70	5.88
64.90	8.98
66.75	10.13
69.15	0.38
70.20	0.05
71.10	0.04
73.55	2.99
75.15	1.21
77.05	11.89
78.25	3.90
79.20	5.55
80.25	0.58
81.20	0.33
82.25	0.05
83.25	0.03
84.05	0.03
84.95	0.08
86.10	0.41
87.20	0.33
89.00	2.66
91.05	24.33
92.20	2.06
93.20	0.89
94.20	0.42
95.15	0.29
96.20	0.03
97.20	0.03
98.15	0.09
99.30	0.05
101.95	2.21
103.15	1.91
105.00	6.69
107.05	10.39
108.20	1.35
109.10	0.91
110.15	0.11
111.20	0.03
112.05	0.03
115.00	18.79
116.75	11.34
118.20	0.79
119.15	0.91
120.85	3.53
122.15	0.24
123.15	0.03

125.15 0.02
126.90 0.31
128.10 0.64
129.20 0.32
130.95 0.78
134.90 100.00
136.25 8.49
138.55 0.02
143.40 0.01
144.45 0.07
145.25 0.23
146.15 0.15
149.95 25.64
151.20 2.19
152.15 0.21
153.20 0.02
159.20 0.010

CARVACROL



34.95	0.11
35.95	0.21
37.10	0.75
38.90	14.60
40.05	9.60
41.10	7.18
42.90	8.17
44.10	3.66
45.25	0.65
46.15	0.16
46.95	0.14
47.95	0.14
49.10	0.78
50.10	3.64
51.15	10.52
52.15	3.50
53.10	4.93
54.15	0.89
55.15	2.27
56.20	0.54
57.70	4.10
59.10	0.39
60.40	0.42
61.10	0.40
62.80	5.06
64.90	9.15
66.35	8.29
67.60	3.02
68.50	0.51
69.30	0.39
70.25	0.18
71.25	0.18
72.05	0.28
72.95	1.09
74.15	2.64
75.25	1.00
77.05	14.33
78.30	4.01
79.20	7.85
80.25	0.54
81.15	0.48
82.15	0.14
84.15	0.26
85.20	0.13
86.20	0.34
87.25	0.38
88.10	0.30
89.15	2.15
91.05	23.64
92.25	2.15
93.30	1.35
94.20	0.65
95.05	1.05
96.05	0.19
101.20	0.27
102.85	3.71
105.05	7.78
107.05	13.15
108.30	1.50
109.15	0.77

110.20 0.12
112.20 0.20
113.30 0.38
115.05 12.48
116.80 8.30
118.30 1.32
119.20 0.73
120.20 2.03
121.20 2.75
122.45 0.30
123.45 0.10
126.45 0.16
127.35 0.12
128.20 0.34
129.25 0.15
131.15 0.79
134.90 100.00
136.15 8.35
137.15 0.50
145.10 0.15
146.10 0.12
147.00 0.26
147.90 0.62
150.00 29.12
151.25 2.58
152.55 0.17
207.50 0.15