

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOLOGIA DAS
RELAÇÕES PARASITO-HOSPEDEIRO

FERNANDO YANO ABRÃO

ATIVIDADE BIOLÓGICA DE ÓLEOS ESSENCIAIS EM
LEVEDURAS DO COMPLEXO *Cryptococcus neoformans*

Goiânia
2013

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☒ **Dissertação** ☐ **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor (a):	Fernando Yano Abrão		
E-mail:	yanobruce@gmail.com		
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página?	☒ Sim	☐ Não	
Vínculo empregatício do autor			
Agência de fomento:	Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior	Sigla:	Capes
País:	Brasil	UF: Go	CNPJ: 00889834/0001-08
Título:	ATIVIDADE BIOLÓGICA DE ÓLEOS ESSENCIAIS EM LEVEDURAS DO COMPLEXO <i>Cryptococcus neoformans</i>		
Palavras-chave:	Atividade antifúngica, <i>Cryptococcus neoformans</i> , Mecanismo de ação, Óleo essencial		
Título em outra língua:	BIOLOGICAL ACTIVITY OF ESSENTIAL OILS IN YEAST COMPLEX <i>Cryptococcus neoformans</i>		
Palavras-chave em outra língua:	Antifungal activity, Essential oil, <i>Cryptococcus neoformans</i> , Mechanism of Action		
Área de concentração:	Biologia da Relação Parasito Hospedeiro		
Data defesa: (24/06/2013)			
Programa de Pós-Graduação:	Biologia da Relação Parasito Hospedeiro		
Orientador (a):	Profa. Dra. Lúcia Kioko Hasimoto e Souza		
E-mail:	luciakioko@iptsp.ufg.br		
Co-orientador (a):*			
E-mail:			

*Necessita do CPF quando não constar no SisPG

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☐ SIM ☒ NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Assinatura do (a) autor (a) _____ Data: ____ / ____ / ____

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

FERNANDO YANO ABRÃO

**ATIVIDADE BIOLÓGICA DE ÓLEOS ESSENCIAIS EM
LEVEDURAS DO COMPLEXO *Cryptococcus neoformans***

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Biologia das Relações Parasito-
Hospedeiro da Universidade Federal de
Goiás para obtenção do Título de
Mestre em Biologia das Relações
Parasito-Hospedeiro

Orientadora: Lúcia Kioko Hasimoto e
Souza

**Auxílio financeiro Capes
Goiânia
2013**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação na (CIP)
GPT/BC/UFG**

A161a Abrão, Fernando Yano.
Atividade biológica de óleos essenciais em leveduras do
complexo *Cryptococcus neoformans* [manuscrito] /
Fernando Yano Abrão. - 2013.
xxi, 102 f. : il., figs, tabs.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lúcia Kioko Hasimoto e Souza
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás,
Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, 2013.

Bibliografia.

Inclui lista de figuras, abreviaturas, siglas e tabelas.

1. *Cryptococcus neoformans* – Infecção – AIDS
(doença). 2. Óleos essenciais – Atividade biológica. 3.
Cryptococcus – Atividade antifúngica. I. Título.

CDU: 616.992

**Programa de Pós-Graduação em Biologia das Relações Parasito-
Hospedeiro da Universidade Federal de Goiás**

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluno (a): Fernando Yano Abrão

Orientador (a): Lúcia Kioko Hasimoto e Souza

Membros:

1. Milton Adriano Pelli de Oliveira

2. José Realino de Paula

Data: 24/06/2013

À profa. Lúcia.

À minha família, tesouro de minha vida,

À minha mãe, tesouro de minha alma.

Para Sempre

*Por que Deus permite
que as mães vão-se embora?
Mãe não tem limite,
é tempo sem hora,
luz que não apaga
quando sopra o vento
e chuva desaba,
veludo escondido
na pele enrugada,
água pura, ar puro,
puro pensamento.*

*Morrer acontece
com o que é breve e passa
sem deixar vestígio.
Mãe, na sua graça,
é eternidade.*

*Por que Deus se lembra
- mistério profundo -
de tirá-la um dia?
Fosse eu Rei do Mundo,
baixava uma lei:
Mãe não morre nunca,
mãe ficará sempre
junto de seu filho
e ele, velho embora,
será pequenino
feito grão de milho.*

Carlos Drummond de Andrade

Soneto de Fidelidade

De tudo ao meu amor serei atento

Antes, e com tal zelo, e sempre, e tanto

Que mesmo em face do maior encanto

Dele se encante mais meu pensamento.

Quero vivê-lo em cada vão momento

E em seu louvor hei de espalhar meu canto

E rir meu riso e derramar meu pranto

Ao seu pesar ou seu contentamento

E assim, quando mais tarde me procure

Quem sabe a morte, angústia de quem vive

Quem sabe a solidão, fim de quem ama

Eu possa me dizer do amor (que tive):

Que não seja imortal, posto que é chama

Mas que seja infinito enquanto dure.

Vinicius de Moraes

Como é por dentro outra pessoa

Como é por dentro outra pessoa

Quem é que o saberá sonhar?

A alma de outrem é outro universo

Como que não há comunicação possível,

Com que não há verdadeiro entendimento.

Nada sabemos da alma

Senão da nossa:

As dos outros são olhares,

São gestos, são palavras,

Com a suposição de qualquer semelhança

No fundo.

Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

A Deus, essência e seguro refúgio em todas as circunstâncias.

À minha família, pelo companheirismo e amor incondicional, sempre um exemplo a ser seguido e meus amigos. Um agradecimento especial à minha segunda mãe Tia Maria, ao meu irmão Fabrício, ao meu pai Antônio e a minha querida prima Cristiane.

À querida Profa. Dra. Lúcia Kioko Hasimoto e Souza, pela convivência, confiança e ensinamentos (como boa japonesa que é) transmitidos através de gestos ao invés de palavras.

À Profa. Dra. Maria do Rosário Rodrigues Silva pela grande ajuda, emprestando um pouco de sua sabedoria e experiência em Micologia.

Ao Prof. Dr. Milton Adriano Pelli de Oliveira, primeiramente por tornar realidade um programa de Pós-graduação (Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro) que instiga o aluno um despertar para o conhecimento. Segundo, pelos auxílios imprescindíveis nas técnicas de citometria de fluxo e de citotoxicidade *in vitro*. Terceiro, pelos sábios conselhos na banca de qualificação. Milhares de agradecimentos, ainda não seriam o bastante.

Às Professoras Orionalda de Fátima Lisboa Fernandes e Carolina Rodrigues Costa pela agradável convivência e grande auxílio.

À Profa. Dra. Megmar Aparecida Carneiro pela importante participação na banca de qualificação.

Ao Prof. Dr. José Realino de Paula, por ter aceitado participar da banca de dissertação e pelos ensinamentos transmitidos a partir da disciplina Química de Produtos Naturais.

Às professoras Miriam Dorta e Patrícia Nagib pelos importantes auxílios no uso de equipamentos de uso comum do IPTSP.

À aluna de doutorado Lucilla Ávila, pelo auxílio no uso do citometro de fluxo.

À técnica Natália Brandão, pela ajuda na avaliação da citotoxicidade *in vitro*.

Aos Secretários José Clementino e Kariny pelo grande auxílio sempre que necessário.

Aos técnicos Alex e Elaine pela disponibilidade e ajuda na utilização dos laboratórios multi-usuários.

Ao farmacêutico Elviscley Silva por ter abrido as portas do Centro Analítico da Faculdade de Farmácia-UFG, auxiliando na técnica da quantificação do ergosterol.

Ao ilustrador e amigo Vinícius Yano, por emprestar seu talento para a composição desta dissertação.

Ao grande Marcelo Ramada, pelas conversas, conselhos e amizade. O Brasil se enriquece cientificamente, graças a pessoas como você.

À amiga Laís Carneiro, pelo companheirismo e auxílio na formatação e cálculos estatísticos. Valeu por me aguentar reclamando de tudo.

Aos amigos do Laboratório de Micologia, que sempre me ajudaram cada um de diferente forma, sendo nenhum menos importante: Kamila, Carolina, Flávio, Milton, Fernanda, Reginaldo, Thaísa, Hildene, Ana Flávia, Tayse, Cícero, Murilo, Núbia, Pedro, Natália, Fábio e Maysa.

A todos os meus queridos colegas e professores do programa de Pós-graduação Biologia da Relação Parasito Hospedeiro, um tempo que deixará saudades em meu coração.

À indústria Ferquima LTDA, por fornecer óleos essenciais de qualidade.

À Capes pelo auxílio financeiro.

A todos que contribuíram diretamente ou indiretamente para que este trabalho se tornasse realidade.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	ix
SUMÁRIO	xi
FIGURAS.....	xiv
TABELAS.....	xvii
SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS	xviii
RESUMO	xx
ABSTRACT	xxi
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 ESPÉCIES DO COMPLEXO <i>Cryptococcus neoformans</i>	1
1.1.1. Características gerais	1
1.1.2 Fatores de Virulência.....	5
1.1.3 Infecção causada por espécies do complexo <i>Cryptococcus neoformans</i>	7
1.1.4 Epidemiologia.....	10
1.1.5 Tratamento.....	11
1.2 PRODUTOS NATURAIS A PARTIR DE PLANTAS: ÓLEOS ESSENCIAIS.....	13
1.2.1 <i>Pelargonium graveolens</i>	17
1.2.2 <i>Cymbopogon flexuosus</i>	20
1.2.3 <i>Syzygium aromaticum</i>	23
1.3 ENSAIOS <i>in vitro</i> PARA A DETECÇÃO DE ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE NOVOS COMPOSTOS	26
1.4 ESTUDO DA TOXICIDADE	29
1.5 DETERMINAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO DOS OEs SOBRE AS CÉLULAS FÚNGICAS	30
1.5.1 Ensaios utilizando citometria de fluxo	30
1.5.2 Quantificação do ergosterol celular.....	34
2 JUSTIFICATIVA.....	35
3 OBJETIVO GERAL E OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
3.1 OBJETIVO GERAL	36
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
4 METODOLOGIA	37
4.1 ISOLADOS CLÍNICOS E CEPAS PADRÃO.....	37

4.2 ANTIFÚNGICOS	37
4.3 ÓLEOS ESSENCIAIS	37
4.3.1 Obtenção.....	37
4.3.2 Análise quantitativa e qualitativa dos OEs	37
4.4 TESTES DE SUSCETIBILIDADE <i>in vitro</i> PELO MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO	38
4.4.1 Preparo do óleo essencial	38
4.4.2 Preparo do inóculo	39
4.4.3 Procedimento do teste	39
4.4.4 Leitura	40
4.4.5 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)	41
4.5 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE CELULAR	41
4.6 ESTUDOS DO MECANISMO DE AÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS POR CF	42
4.6.1 Preparo do inóculo	42
4.6.2 Preparo do óleo essencial	42
4.6.3 Avaliação da ação do óleo essencial sobre a membrana celular	42
4.6.4 Ação do OE sobre o metabolismo celular	43
4.6.5 Leitura dos resultados	43
4.7 QUANTIFICAÇÃO DO ERGOSTEROL	44
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
5.1 PRINCIPAIS CONSTITUINTES DOS OEs	46
5.2 TESTES DE SUSCETIBILIDADE <i>in vitro</i>	51
5.3 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE.....	58
5.4 ESTUDOS DE MECANISMO DE AÇÃO.....	62
5.5 QUANTIFICAÇÃO DO ERGOSTEROL	74
6 CONCLUSÕES	79
REFERÊNCIAS.....	80
ANEXOS.....	96
1. Parecer do Comitê de Ética.....	96
2. Laudo Técnico Óleo essencial <i>Eugenia caryophyllus</i> (<i>Syzygium aromaticum</i>)	97
3. Análise por cromatografia gasosa da composição química e teor do Óleo essencial <i>Eugenia caryophyllus</i> (<i>Syzygium aromaticum</i>).....	98
4. Laudo Técnico Óleo essencial <i>Cymbopogon flexuosos</i>	99

5. Análise por cromatografia gasosa da composição química e teor do Óleo essencial <i>Cymbopogon flexuosus</i>	100
6. Laudo Técnico Óleo essencial <i>Pelargonium graveolens</i>	101
7. Análise por cromatografia gasosa da composição química e teor do Óleo essencial <i>Pelargonium graveolens</i>	102

FIGURAS

FIGURA 1- REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA LEVEDURA DE <i>C. NEOFORMANS</i> (LI & MODY 2010).	1
FIGURA 2- FOTOMICROGRAFIA DE LEVEDURAS DO COMPLEXO <i>C. NEOFORMANS</i> CORADAS COM TINTA DA CHINA REVELANDO A PRESEÇA DE CÁPSULA POLISSACARÍDICA (MA & MAY 2009).	2
FIGURA 3- SISTEMA DE CLASSIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES E VARIEDADES DO COMPLEXO <i>C. NEOFORMANS</i> BASEADO NA ANÁLISE DA SOROTIPOS E TIPOS MOLECULARES (LIN & HEITMAN 2006).....	3
FIGURA 4- MORFOLOGIA DE <i>C. GATTII</i> . MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA ILUSTRANDO A FORMA ASSEXUADA CONSTITUÍDA POR LEVEDURAS (A) E REPRODUÇÃO SEXUADA CONSTITUÍDA POR UM BASÍDIO COM QUATRO BASIDIÓSPOROS EMERGENTES (B) (BYRNES ET AL. 2011).	4
FIGURA 5- CICLO DE INFECÇÃO DE ESPÉCIES DO COMPLEXO <i>C. NEOFORMANS</i> (AMBIENTE E HOSPEDEIRO) (LIN & HEITMAN ADAPTADO 2006).	9
FIGURA 6- REPRESENTAÇÃO DAS ETAPAS DE EXTRAÇÃO DO OE POR ARRASTE A VAPOR (SOUZA ET AL. 2012 ADAPTADO). 14	
FIGURA 7- DIAGRAMA DE BLOCOS DE UM CROMATÓGRAFO A GÁS TÍPICO (SKOOG ET AL. 2006).....	15
FIGURA 8- ESTRUTURA QUÍMICA DO ISOPRENO CONSTITUÍDO POR 5 ÁTOMOS DE CARBONO (C ₅) - UNIDADE BÁSICA DE FORMAÇÃO DOS TERPENOIDES.....	16
FIGURA 9- MONOTERPENO GERANIOL, CONSTITUÍDO POR 10 ÁTOMOS DE CARBONO (C ₁₀) E DUAS UNIDADES DE ISOPRENOS.	16
FIGURA 10- ESTRUTURA QUÍMICA DO FENILPROPANO, CONSTITUÍDA POR UM ANEL AROMÁTICO LIGADA A UMA CADEIA DE 3 ÁTOMOS DE CARBONO (C ₆ C ₃), UNIDADE BÁSICA DOS FENILPROPANÓIDES.	16
FIGURA 11- ILUSTRAÇÃO DAS FLORES E FOLHAS DE <i>PELARGONIUM GRAVEOLENS</i>	19
FIGURA 12- CITRONELOL E GERANIOL - PRINCIPAIS CONSTITUINTES DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>P. GRAVEOLENS</i>	20
FIGURA 13- ILUSTRAÇÃO DAS FOLHAS DE <i>C. FLEXUOSUS</i>	22
FIGURA 14- GERANIAL E NERAL - PRINCIPAIS CONSTITUINTES DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>C. FLEXUOSUS</i>	23
FIGURA 15- ILUSTRAÇÃO DAS FOLHAS E FLORES DE <i>S. AROMATICUM</i>	24
FIGURA 16- <i>EUGENOL</i> - PRINCIPAL CONSTITUINTE DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>S. AROMATICUM</i>	25
FIGURA 17- ESQUEMA DE UM CITOMETRO DE FLUXO. A FOCALIZAÇÃO HIDRODINÂMICA DÁ ORIGEM À FORMAÇÃO DE UM FLUXO DE CÉLULAS QUE SEGUEM UMA A UMA (1). ESTAS CÉLULAS PASSAM POR UM FEIXE DE LASER EMITINDO SINAIS QUE REPRODUZEM SUAS CARACTERÍSTICAS PARTICULARES (2). O ESPALHAMENTO DA TRAJETÓRIA DA LUZ E PRODUÇÃO DE FLUORESCÊNCIA DE CADA CÉLULA É SEPARADO POR UM GRUPO DE FILTROS E ESPELHOS (SISTEMA ÓPTICO) (3). OS SINAIS SÃO RECOLHIDOS PELO SISTEMA DE DETECÇÃO, QUE É FORMADO POR UM CONJUNTO DE FOTODIÓDOS, DETECTORES DE FLUORESCÊNCIA EM DIFERENTES COMPRIMENTOS DE ONDA (FL1, FL2, FL3), (4). OS SINAIS SÃO ENVIADOS PARA UM COMPUTADOR QUE FORNECE A REPRESENTAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DA POPULAÇÃO EM RELAÇÃO AOS DIFERENTES PARÂMETROS (DÍAZ ET AL. 2010 ADAPTADO).	32
FIGURA 18- ESQUEMA DA PREPARAÇÃO DA PLACA PARA O TESTE DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO.	40
FIGURA 19- CROMATOGRAMA OBTIDO A PARTIR DA CG SEPARANDO O OE DE <i>P. GRAVEOLENS</i> EM 18 DIFERENTES COMPOENETES. PICOS MENORES DE 0,2% FORAM EXCLUÍDOS.	46
FIGURA 20- CROMATOGRAMA OBTIDO A PARTIR DA CG SEPARANDO O OE DE <i>C. FLEXUOSUS</i> EM 12 DIFERENTES COMPOENETES. PICOS MENORES DE 0,2% FORAM EXCLUÍDOS.	48
FIGURA 21- CROMATOGRAMA OBTIDO A PARTIR DA CG SEPARANDO O OE DE <i>S. AROMATICUMS</i> EM 4 DIFERENTES COMPOENETES. PICOS MENORES DE 0,2% FORAM EXCLUÍDOS.	49
FIGURA 22- FATORES QUE PODEM INFLUENCIAR A COMPOSIÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS NA PLANTA (GOBBO-NETO & LOPES 2007).	51
FIGURA 23- VALORES DE ATIVIDADE ANTIFÚNGICA (CIM E CFM) DO OE DE <i>C. FLEXUOSUS</i> AVALIADOS EM 16 DIFERENTES ISOLADOS DE <i>CRYPTOCOCCUS</i> . OS RESULTADOS FORAM EXPRESSOS EM PORCENTAGEM DO TOTAL NAS SEGUINTE CONCENTRAÇÕES: 128, 256 E 512 µg/mL. PARA A COMPARAÇÃO ESTATÍSTICA FOI UTILIZADO O TESTE DE FISHER, SENDO **p < 0.01 E ***p < 0.001.	53
FIGURA 24- VALORES DE ATIVIDADE ANTIFÚNGICA (CIM E CFM) DO OE DE <i>P. GRAVEOLENS</i> AVALIADOS EM 16 DIFERENTES ISOLADOS DE <i>CRYPTOCOCCUS</i> . OS RESULTADOS FORAM EXPRESSOS EM PORCENTAGEM DO TOTAL NAS	

SEGUINTE CONCENTRAÇÕES: 128, 256, 512 E 1024 µG/ML. PARA A COMPARAÇÃO ESTATÍSTICA FOI UTILIZADO O TESTE DE FISHER, SENDO ***p < 0.001.	53
FIGURA 25- VALORES DE ATIVIDADE ANTIFÚNGICA (CIM E CFM) DO OE DE <i>S. AROMATICUM</i> AVALIADOS EM 16 DIFERENTES ISOLADOS DE <i>CRYPTOCOCCUS</i> . OS RESULTADOS FORAM EXPRESSOS EM PORCENTAGEM DO TOTAL NAS SEGUINTE CONCENTRAÇÕES: 128, 256 E 512 µG/ML. PARA A COMPARAÇÃO ESTATÍSTICA FOI UTILIZADO O TESTE DE FISHER, SENDO **p < 0.01.	54
FIGURA 26- DETERMINAÇÃO DA CIM DO OE DE <i>S. AROMATICUM</i> SOBRE ISOLADO DE <i>C. NEOFORMANS</i> L5, OBTIDA PELO MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO. CC: CONTROLE DE CRESCIMENTO; CM: CONTROLE DO MEIO DE CULTURA.	54
FIGURA 27-VALORES DE ATIVIDADE ANTIFÚNGICA (CFM) DOS OEs DE <i>C. FLEXUOSUS</i> , <i>P. GRAVEOLENS</i> E <i>S. AROMATICUM</i> AVALIADOS EM 16 DIFERENTES ISOLADOS DE <i>CRYPTOCOCCUS</i> . OS RESULTADOS FORAM EXPRESSOS EM PORCENTAGEM DO TOTAL DOS VALORES DE CFM CORRESPONDENTES A CIM, 2X CIM E 4X CIM. PARA A COMPARAÇÃO ESTATÍSTICA FOI UTILIZADO O TESTE DE FISHER, SENDO *p < 0.05, **p < 0.01 E ***p < 0.001.	55
FIGURA 28- CONCENTRAÇÃO FUNGICÍDA MÍNIMA (CFM) DO OE DE <i>S. AROMATICUM</i> SOBRE O ISOLADO DE <i>C. NEOFORMANS</i> L5.	55
FIGURA 29- PORCENTAGEM DE CÉLULAS VIÁVEIS, EM RELAÇÃO AO CONTROLE, EM 8 DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO OE DE <i>P. GRAVEOLENS</i> . TODOS OS EXPERIMENTOS FORAM REALIZADOS EM DUPLICATA E REPETIDOS QUATRO VEZES. RESULTADOS EXPRESSOS EM MÉDIA±DESVIO E COMPARADOS ESTATISTICAMENTE USANDO ANOVA ONE-WAY, SEGUIDO PELO TESTE DE DUNNETT'S. O NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA FOI DE **p < 0.01, ***p < 0.001, COMPARADOS COM O CONTROLE.	59
FIGURA 30- PORCENTAGEM DE CÉLULAS VIÁVEIS, EM RELAÇÃO AO CONTROLE, EM 8 DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO OE DE <i>C. FLEXUOSUS</i> . TODOS OS EXPERIMENTOS FORAM REALIZADOS EM DUPLICATA E REPETIDOS QUATRO VEZES. RESULTADOS EXPRESSOS EM MÉDIA±DESVIO E COMPARADOS ESTATISTICAMENTE USANDO ANOVA ONE-WAY, SEGUIDO PELO TESTE DE DUNNETT'S. O NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA FOI DE *p < 0.05, ***p < 0.001, COMPARADOS COM O CONTROLE.	60
FIGURA 31- PORCENTAGEM DE CÉLULAS VIÁVEIS, EM RELAÇÃO AO CONTROLE, EM 8 DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO OE DE <i>S. AROMATICUM</i> . TODOS OS EXPERIMENTOS FORAM REALIZADOS EM DUPLICATA E REPETIDOS QUATRO VEZES. RESULTADOS EXPRESSOS EM MÉDIA±DESVIO E COMPARADOS ESTATISTICAMENTE USANDO ANOVA ONE-WAY, SEGUIDO PELO TESTE DE DUNNETT'S. O NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA FOI DE ***p < 0.001, COMPARADOS COM O CONTROLE.	61
FIGURA 32- ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO DE <i>C. GATTII</i> ATCC 24065 APÓS A EXPOSIÇÃO POR 1H COM DIFERENTES AGENTES. AS CÉLULAS FORAM MARCADAS COM PI E ANALISADAS COM 10.000 EVENTOS EM GRÁFICOS DE DENSIDADE, MOSTRANDO GRANULOSIDADE CELULAR (SIDE SCATTER-SSC-H) VERSUS FLUORESCÊNCIA VERMELHA (FL3-H). AS PERCENTAGENS DE CÉLULAS COM LESÃO DE MEMBRANA (QUADRANTE À DIREITA) FORAM DETERMINADAS NAS SEGUINTE CONDIÇÕES; A) CONTROLE DE CÉLULAS NÃO MARCADAS; B) CÉLULAS MARCADAS, MAS NÃO TRATADAS, REPRESENTANDO O CONTROLE DE VIABILIDADE; C) CONTROLE DE LESÃO DE MEMBRANA ÁLCOOL 70%; D) CONTROLE DE LESÃO DE MEMBRANA ANFOTERICINA B 2 µG/ML.	63
FIGURA 33- ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO DE <i>C. GATTII</i> ATCC 24065 APÓS A EXPOSIÇÃO POR 1H COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO OE DE <i>P. GRAVEOLENS</i> . AS CÉLULAS FORAM MARCADAS COM PI E ANALISADAS COM 10.000 EVENTOS EM GRÁFICOS DE DENSIDADE, MOSTRANDO GRANULOSIDADE CELULAR (SIDE SCATTER-SSC-H) VERSUS FLUORESCÊNCIA VERMELHA (FL3-H). AS PERCENTAGENS DE CÉLULAS COM LESÃO DE MEMBRANA (QUADRANTE À DIREITA) FORAM DETERMINADAS.	65
FIGURA 34- ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO DE <i>C. GATTII</i> ATCC 24065 APÓS A EXPOSIÇÃO POR 1H COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO OE DE <i>C. FLEXUOSUS</i> . AS CÉLULAS FORAM MARCADAS COM PI E ANALISADAS COM 10.000 EVENTOS EM GRÁFICOS DE DENSIDADE, MOSTRANDO GRANULOSIDADE CELULAR (SIDE SCATTER-SSC-H) VERSUS FLUORESCÊNCIA VERMELHA (FL3-H). AS PERCENTAGENS DE CÉLULAS COM LESÃO DE MEMBRANA (QUADRANTE À DIREITA) FORAM DETERMINADAS.	66
FIGURA 35- ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO DE <i>C. GATTII</i> ATCC 24065 APÓS A EXPOSIÇÃO POR 1H COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO OE DE <i>S. AROMATICUM</i> . AS CÉLULAS FORAM MARCADAS COM PI E ANALISADAS COM 10.000 EVENTOS EM GRÁFICOS DE DENSIDADE, MOSTRANDO GRANULOSIDADE CELULAR (SIDE SCATTER-SSC-H) VERSUS	

FLUORESCÊNCIA VERMELHO (FL3-H). AS PERCENTAGENS DE CÉLULAS COM LESÃO DE MEMBRANA (QUADRANTE À DIREITA) FORAM DETERMINADAS.	67
FIGURA 36- ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO DE <i>C. GATTII</i> ATCC 24065 APÓS A EXPOSIÇÃO COM DIFERENTES AGENTES. AS CÉLULAS FORAM MARCADAS COM FUN-1 E ANALISADAS COM 10.000 EVENTOS EM GRÁFICOS DE DENSIDADE, MOSTRANDO GRANULOSIDADE CELULAR (SIDE SCATTER-SSC-H) VERSUS FLUORESCÊNCIA VERMELHO/ALARANJADO (FL2-H). AS PERCENTAGENS DE CÉLULAS METABOLICAMENTE ALTERADAS (QUADRANTE À DIREITA) FORAM DETERMINADAS NAS SEGUINTE CONDIÇÕES; A) CONTROLE DE CÉLULAS NÃO MARCADAS; B) CÉLULAS MARCADAS, MAS NÃO TRATADAS, REPRESENTANDO O CONTROLE DE VIABILIDADE. C) CONTROLE DE INIBIÇÃO METABÓLICA FLUCONAZOL 64µg/ML; D) CONTROLE DE INIBIÇÃO METABÓLICA AZIDA 64MM.	69
FIGURA 37- ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO DE <i>C. GATTII</i> ATCC 24065 APÓS A EXPOSIÇÃO POR 1H COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO OE DE <i>S. AROMÁTICUM</i> . AS CÉLULAS FORAM MARCADAS COM FUN-1 E ANALISADAS COM 10.000 EVENTOS EM GRÁFICOS DE DENSIDADE, MOSTRANDO GRANULOSIDADE CELULAR (SIDE SCATTER-SSC-H) VERSUS FLUORESCÊNCIA VERMELHO/ALARANJADO (FL2-H). AS PERCENTAGENS DE CÉLULAS METABOLICAMENTE ALTERADAS (QUADRANTE À DIREITA) FORAM DETERMINADAS.	70
FIGURA 38- ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO DE <i>C. GATTII</i> ATCC 24065 APÓS A EXPOSIÇÃO POR 1H COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO OE DE <i>C. FLEXUOSUS</i> . AS CÉLULAS FORAM MARCADAS COM FUN-1 E ANALISADAS COM 10.000 EVENTOS EM GRÁFICOS DE DENSIDADE, MOSTRANDO GRANULOSIDADE CELULAR (SIDE SCATTER-SSC-H) VERSUS FLUORESCÊNCIA VERMELHO/ALARANJADO (FL2-H). AS PERCENTAGENS DE CÉLULAS METABOLICAMENTE ALTERADAS (QUADRANTE À DIREITA) FORAM DETERMINADAS.	71
FIGURA 39- ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO DE <i>C. GATTII</i> ATCC 24065 APÓS A EXPOSIÇÃO POR 1H COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO OE DE <i>P. GRAVEOLENS</i> . AS CÉLULAS FORAM MARCADAS COM FUN-1 E ANALISADAS COM 10.000 EVENTOS EM GRÁFICOS DE DENSIDADE, MOSTRANDO GRANULOSIDADE CELULAR (SIDE SCATTER-SSC-H) VERSUS FLUORESCÊNCIA VERMELHO/ALARANJADO (FL2-H). AS PERCENTAGENS DE CÉLULAS METABOLICAMENTE ALTERADAS (QUADRANTE À DIREITA) FORAM DETERMINADAS.	72
FIGURA 40- PERFIS DE ESTERÓIS ANALISADOS POR ESPECTROFOTOMETRIA UV (230-300NM) DE ISOLADOS DE <i>CRYPTOCOCCUS</i> SEM TRATAMENTO (CONTROLE) E NA PRESENÇA DE FLUCONAZOL.....	76
FIGURA 41- PERFIS DE ESTERÓIS ANALISADOS POR ESPECTROFOTOMETRIA UV (230-300NM) DE ISOLADOS DE <i>CRYPTOCOCCUS</i> SEM TRATAMENTO (CONTROLE) E NA PRESENÇA DE 64µg/ML DE <i>P. GRAVEOLENS</i>	76
FIGURA 42- PERFIS DE ESTERÓIS ANALISADOS POR ESPECTROFOTOMETRIA UV (230-300NM) DE ISOLADOS DE <i>CRYPTOCOCCUS</i> SEM TRATAMENTO (CONTROLE) E NA PRESENÇA DE 128µg/ML DE <i>C. FLEXUOSUS</i>	77
FIGURA 43- PERFIS DE ESTERÓIS ANALISADOS POR ESPECTROFOTOMETRIA UV (230-300NM) DE ISOLADOS DE <i>CRYPTOCOCCUS</i> SEM TRATAMENTO (CONTROLE) E NA PRESENÇA DE 4µg/ML DE <i>S. AROMATICUM</i>	77

TABELAS

TABELA 1- NOME POPULAR, PRINCIPAIS CONSTITUINTES DOS OES E USO TERAPÊUTICO DAS ESPÉCIES DE <i>P. GRAVEOLENS</i> , <i>C. FLEXUOSUS</i> E <i>S. AROMATICUM</i>	26
TABELA 2- COMPOSIÇÃO QUALITATIVA EQUANTITATIVA DO OE DE <i>P. GRAVEOLENS</i> LISTADOS POR ORDEM DE ELUIÇÃO E SUAS RESPECTIVAS PORCENTAGENS OBTIDOS POR CG USANDO DETECTOR FID.	47
TABELA 3- COMPOSIÇÃO QUALITATIVA EQUANTITATIVA DO OE DE <i>C. FLEXUOSUS</i> LISTADOS POR ORDEM DE ELUIÇÃO E SUAS RESPECTIVAS PORCENTAGENS OBTIDOS POR CG USANDO DETECTOR FID.	48
TABELA 4- COMPOSIÇÃO QUALITATIVA EQUANTITATIVA DO OE DE <i>S. AROMATICUM</i> LISTADOS POR ORDEM DE ELUIÇÃO E SUAS RESPECTIVAS PORCENTAGENS OBTIDOS POR CG USANDO DETECTOR FID.	49
TABELA 5- ATIVIDADE ANTIFÚNGICA (CIM E CFM) DOS OES DE <i>C. FLEXUOSUS</i> , <i>S. AROMATICUM</i> E <i>P. GRAVEOLENS</i> SOBRE DIFERENTES ISOLADOS DE <i>CRYPTOCOCCUS</i>	52
TABELA 6- ATIVIDADE ANTIFÚNGICA (CIM E CFM) DOS OES DE <i>P. GRAVEOLENS</i> , <i>C. FLEXUOSUS</i> E <i>S. AROMATICUM</i> SOBRE DIFERENTES ESPÉCIES DE FUNGOS, SEGUNDO DADOS DA LITERATURA.	57
TABELA 7- INIBIÇÃO DA BIOSÍNTESE DO ERGOSTEROL DE CÉLULAS DE <i>C. GATTII</i> ATCC 24065, EXPOSTAS AOS OES E FLUCONAZOL.	75

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

153BR	Linhagem celular de fibroblastos
A549	Linhagem celular de adenocarcinoma epitelial de pulmão
Aids	Acquired Immunodeficiency Syndrome
Anf	Anfotericina B
ATCC	American Type Culture Collection
BP	Band Pass
C5	5 átomos de Carbono
C6C3	6 átomos de Carbono e 3 átomos de Carbono
C10	10 átomos de Carbono
CF	Citometria de Fluxo
CG	Cromatografia Gasosa
CFM	Concentração Fúngica Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CSD	Caldo Sabouraud Dextrose
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute
DMSO	Dimetilsulfóxido
FID	Flame Ionization Detector
FL3	Detector de fluorescência (670nm)
FL2	Detector de fluorescência (585nm)
FSC	Forward Scatter
FUN-1	[[2-chloro-4-(2,3 -dihydro- 3-methyl- (benzo-1,3-thiazol-2-yl) -methylidene) -1-phenylquinolinium iodide]]
GalXM	Galactoxilomanana

GXM	Glicuronoxilomanana
Hep-2	Linhagem celular de câncer epidermoide
HNDF	Linhagem celular de células endoteliais
HIV	Human immunodeficiency virus infection
HT-29	Linhagem de células humanas de adenocarcinoma do cólon
IC 50	Concentração tóxica com 50% de morte celular
L929	Linhagem celular de fibroblastos
LP	Long Pass
MATa	Mating type a
MATα	Mating type α
MOPS	Ácido Morfolinopropanossulfônico
MRC-5	Linhagem celular de fibroblastos humanos de pulmão fetal
MTT	(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
OE	Óleo Essencial
PBS	Phosphate-Buffered Saline
qsp.	Quantidade suficiente para
PI	Iodeto de Propídio
rpm	Rotações por minuto
RPMI	Meio caldo Roswell Park Memorial Institute
SSC	Side Scatter
SNC	Sistema Nervoso Central
UFC	Unidade Formadora de Colônia
Ure-1	Urease

RESUMO

Espécies do complexo *Cryptococcus neoformans* causam infecção em indivíduos hígidos e imunodeprimidos, especialmente pacientes com aids, cuja principal manifestação clínica é a meningoencefalite. Poucos antifúngicos são disponíveis para o tratamento da criptococose e estes apresentam alta toxicidade e relatos de isolados resistentes a estes fármacos. Neste contexto, os produtos naturais são uma importante fonte na busca de novos compostos antifúngicos. Neste trabalho foi avaliado a atividade biológica dos óleos essenciais (OEs) de *Pelargonium graveolens*, *Syzygium aromaticum* e *Cymbopogon flexuosus*. A atividade antifúngica sobre isolados de *Cryptococcus* foi avaliada através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM), pela técnica de microdiluição em caldo. Uma vez determinada a atividade antifúngica, seu caráter citotóxico foi avaliado em estudo *in vitro* em de linhagens de fibroblastos L929. O mecanismo de ação dos OEs sobre as células fúngicas foi analisado através da citometria de fluxo (CF), utilizando os marcadores de fluorescência iodeto de propídio (PI) para verificar lesão de membrana celular e FUN-1 ([2-chloro-4-(2,3-dihydro-3-methyl-(benzo-1,3-thiazol-2-yl)-methylidene)-1-phenylquinolinium iodide]) para analisar a alteração do metabolismo celular. Além disso, a quantificação do ergosterol da membrana celular fúngica foi avaliada após exposição aos OEs. Todos os OEs avaliados apresentaram atividade antifúngica, com CIMs de *P. graveolens* e *S. aromaticum* variando entre 128 a 256 µg/mL, enquanto para *C. flexuosus* variou de 8 a 32 µg/mL. Nenhum OE apresentou citotoxicidade em células de fibroblastos L929, em valores correspondentes às CIMs. Como mecanismo de ação foi observado que todos os OEs promoveram inibição do metabolismo celular e lesão de membrana, mas a diminuição da quantidade de ergosterol na membrana fúngica foi detectada apenas para o OE de *S. aromaticum*. Este trabalho demonstra o potencial antifúngico do OE de *P. graveolens*, *S. aromaticum* e *C. flexuosus* devido à sua atividade em isolados de espécies de *Cryptococcus* e relativa segurança toxicológica.

ABSTRACT

Species of the complex *Cryptococcus neoformans* can cause infection in both healthy individuals and immunocompromised patients, especially in AIDS patients, in which meningoencephalitis is the main clinical manifestation. There are few available antifungals for cryptococcosis treatment and all of them present high toxicity, besides the reports of resistance. In this context, the natural products are important source in the search for new antifungal compounds. In this study, it was evaluated the biological activity of the essential oils (EO) of *Pelargonium graveolensis*, *Syzygium aromaticum* and *Cymbopogon flexuosus*. The antifungal activity against *Cryptococcus* isolates was determined by minimum inhibitory concentration (MIC) by microdilution broth. Once the antifungal activity was measured, its cytotoxic activity were evaluated in L929 fibroblastic cell line in an *in vitro* assay. The mechanism of action of the EOs was analyzed by flow cytometry, using propidium iodide as fluorescent marker for lesions in the cell membrane, and FUN-1 ([2-chloro-4-(2,3-dihydro-3-methyl-(benzo-1,3-thiazol-2-yl)-methylidene)-1-phenylquinolinium iodide]), to analyze alterations of the cellular metabolism. Furthermore, the amount of ergosterol in the fungal membrane was evaluated to ascertain if there were modifications on its synthesis due to the exposition to the EOs. All the EOs presented antifungal activity, *P. graveolensis* and *S. aromaticum* with MICs between 128 and 256 µg/mL, while *C. flexuosus* obtained MICs from 8 to 32 µg/mL, whereas for these values, none EO has shown cytotoxicity in L929 fibroblastic cell line. The metabolic inhibition of fungal cells and membrane lesion were observed as the mechanism of action of all the evaluated EOs, however, only the EO of *S. aromaticum* was able to decrease the ergosterol amount in the fungal membrane. This study reveals the antifungal potential of the EOs of *P. graveolens*, *S. aromaticum* e *C. flexuosus*, due to their activity in isolated samples of *Cryptococcus* and relative toxicological safety.

1 INTRODUÇÃO

1.1 ESPÉCIES DO COMPLEXO *Cryptococcus neoformans*

1.1.1. Características gerais

O gênero *Cryptococcus* inclui cerca de 39 espécies e apenas duas são patógenos importantes aos humanos e fazem parte do complexo *Cryptococcus neoformans*, sendo elas: *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* (Ma & May 2009, Barnett 2010, Li & Mody 2010, Chaturvedi & Chaturvedi 2011). Morfologicamente, estes microrganismos se apresentam como estruturas ovaladas unicelulares, denominadas leveduras, com diâmetro variando entre 4 a 10µm, e circundadas por uma cápsula polissacarídica. Através da microscopia eletrônica é possível visualizar os componentes celulares como cápsula, parede celular, membrana plasmática, núcleo, nucléolo, membrana nuclear, vacúolos, retículo endoplasmático, mitocôndria e ribossomos (Ma & May 2009, Barnett 2010, Chaturvedi & Chaturvedi 2011). Na Figura 1 estes elementos estão representados esquematicamente.

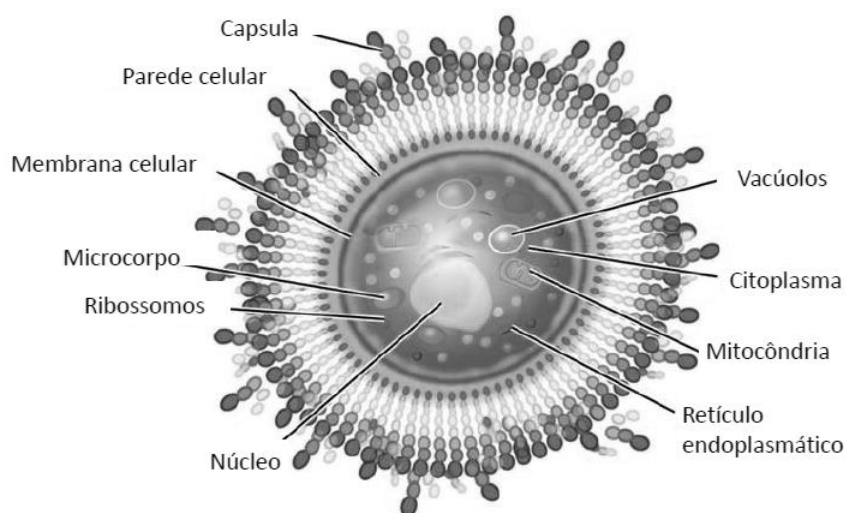


Figura 1- Representação esquemática da levedura de *C. neoformans* (Li & Mody 2010).

A cápsula das espécies do complexo *C. neoformans* é constituída pelos açúcares glicuronoxilomanana (GXM) e galactoxilomanana (GalXM) e manoproteínas, em menor quantidade. A disposição destes polissacarídeos permitem a classificação de *Cryptococcus* em quatro sorotipos A, B, C e D (Vecchiarelli & Monari 2012). A figura 2 mostra a fotomicrografia ótica das leveduras de *Cryptococcus* em tinta da China, que permite a visualização da cápsula.

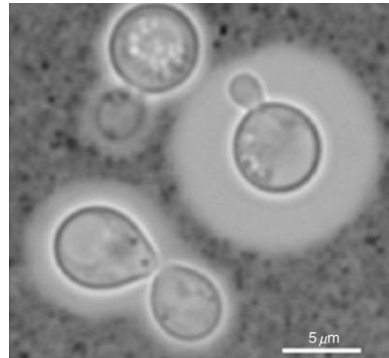


Figura 2- Fotomicrografia de leveduras do complexo *C. neoformans* coradas com tinta da China revelando a presença de cápsula polissacarídica (Ma & May 2009).

Atualmente o complexo *C. neoformans* é constituído por duas espécies: *C. neoformans*, com duas variedades (var. *grubii* e var. *neoformans*) e *C. gattii*. Através da biologia molecular este complexo poder ser classificado em 9 tipos moleculares. A figura 3 mostra a classificação das leveduras do complexo *C. neoformans* em espécies, sorotipos e tipos moleculares (Ma & May 2009, Barnett 2010, Li & Mody 2010, Chaturvedi & Chaturvedi 2011, Vecchiarelli & Monari 2012)

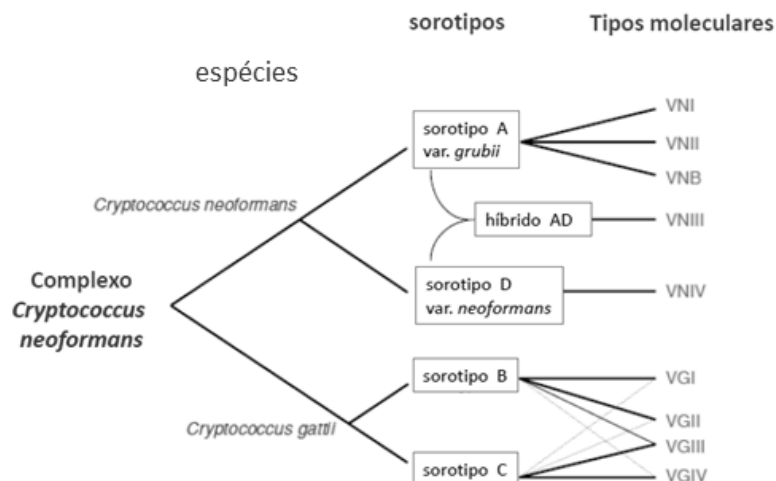


Figura 3- Sistema de classificação das espécies e variedades do complexo *C. neoformans* baseado na análise da sorotipos e tipos moleculares (Lin & Heitman 2006).

O ciclo de vida de *C. neoformans* e *C. gattii* envolve as formas assexuada (levedura) (Figura 4A) e sexuada (basidiósporos). Morfologicamente, na fase assexuada o fungo se apresenta como uma levedura encapsulada haploide, reproduzindo-se por brotamento (Bovers et al. 2008, Chayakulkeeree & Perfect 2008, Byrnes et al. 2011). Na fase sexuada (teleomorfa), *C. neoformans* e *C. gattii* são denominados respectivamente *Filobasidiella neoformans* e *Filobasidiella bacillospora*, ocorrendo em resposta à limitação de nutrientes, havendo *Mating type*. A reprodução por *Mating type* consiste na fusão de dois tipos opostos (MATa e MATα), resultando na produção de filamentos dicarióticos com basídios em sua extremidade. No basídio, ocorre a fusão dos núcleos e posteriormente uma divisão por meiose. Os produtos de meiose sofrem então mitoses formando basidiósporos, que são os elementos de dispersão (Figura 4 B) (Kozubowski & Heitman 2002, Bovers et al. 2008, Byrnes et al. 2011, Wang & Lin 2011).

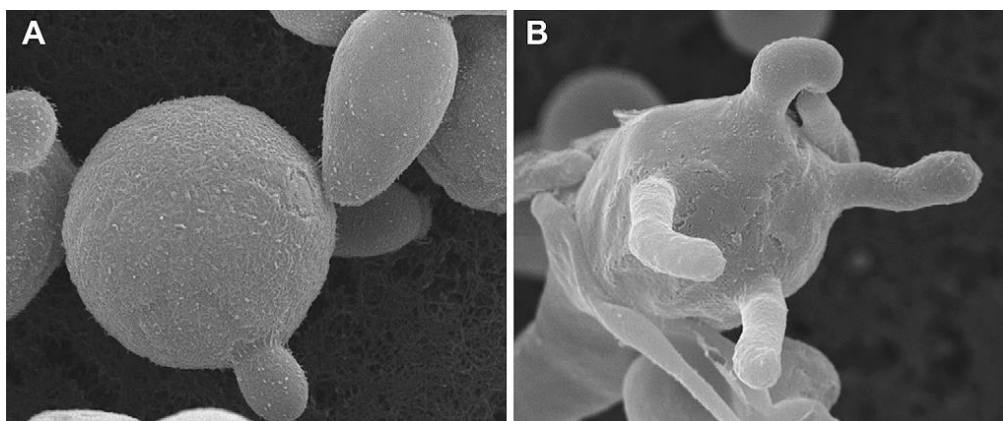


Figura 4- **Morfologia de *C. gattii*.** Microscopia eletrônica de varredura ilustrando a forma assexuada constituída por leveduras (A) e reprodução sexuada constituída por um basídio com quatro basidiósporos emergentes (B) (Byrnes et al. 2011).

Na ausência de um *mating type* oposto, pode ocorrer um evento denominado frutificação monocariótica, onde ocorre a fusão de dois *Mating types* iguais, principalmente entre os MAT α . A frutificação monocariótica poderia justificar a maior quantidade de isolados MAT α em relação a MAT α (Kozubowski & Heitman 2002, Chayakulkeeree & Perfect 2006, Bovers et al. 2008, Chayakulkeeree & Perfect 2008, Byrnes et al. 2011, Wang & Lin 2011).

No meio ambiente a espécie *C. neoformans* é um fungo ubíquo, presente em todo o mundo. Um importante reservatório são as excretas de aves, principalmente de pombos, depositadas no solo. A partir das excretas, as leveduras ou basidiósporos são suspensos no ar e desta forma podem entrar em contato com os humanos por inalação (Lin & Heitman 2006, Li & Mody 2010). Os pombos seriam então um elemento de propagação e disseminação do fungo, fornecendo um meio enriquecido para o crescimento de fungos através de suas excretas. Quase todos os adultos da cidade de Nova Iorque (EUA) têm anticorpos reativos a *C. neoformans*, sugerindo que a exposição e infecção assintomática são comuns em indivíduos saudáveis (Li & Mody 2010). Seu habitat parece estar também relacionado com as árvores e plantas, especificamente na biodegradação natural da madeira. (Lin & Heitman 2006, Lin 2009, Li & Mody 2010, Pfaller & Diekema 2010).

C. gattii é restrito a regiões tropicais e subtropicais, incluindo Austrália, Camboja, África central, Brasil, México e Paraguai. Mais recentemente, foi

encontrado também em regiões temperadas, como na Ilha de Vancouver, no Canadá. Este fungo é encontrado junto aos detritos de árvores, principalmente espécies de *Eucalyptus* e outras espécies como *Laurus L.* (Lauraceae), *Terminalia catappa L.* (Combretaceae) e *Guettarda acreana K. Krause* (Rubiaceae). Recentemente, foi observado que o solo é um importante reservatório deste microrganismo (Bovers et al. 2008, Lin 2009, Li & Mody 2010, Springer & Chaturvedi 2010, Byrnes et al. 2011, Bartlett et al. 2012). No Brasil, várias espécies de plantas são descritas como fonte: *Adenanthera pavonina L.* (Fabaceae), *Cassia grandis L. f* (Fabaceae), *Eucalyptus* spp. *L'Hér* (Myrtaceae), *Ficus* spp *L.* (Moraceae), *Guettarda acreana K. Krause* (Rubiaceae) e *Moquilea tomentosa Benth.* (*Chrysobalanaceae*) (Nucci et al. 2010).

Uma vez em contato com humanos, fungos do complexo *C. neoformans* necessitam de mecanismos que auxiliem no estabelecimento da infecção, sendo estes denominados fatores de virulência (Ma & May 2009).

1.1.2 Fatores de Virulência

Os fatores de virulência desempenham funções que auxiliam o fungo transpor defesas, promovendo a invasão e sobrevivência no hospedeiro, com consequente estabelecimento da doença (Casadevall & Pirofski 1999, Steenbergen & Casadevall 2003, Casadevall 2007). A cápsula, a produção de melanina, a capacidade de crescimento a 37°C e a produção de enzimas líticas são considerados os principais fatores de virulência em leveduras do complexo *C. neoformans* (Steenbergen & Casadevall 2003, Casadevall 2007, Ma & May 2009).

Uma das características essenciais para *C. neoformans* é a sua capacidade para crescer na temperatura corporal humana, permitindo assim causar infecção em humanos (Steenbergen & Casadevall 2003, Perfect 2006, Ma & May 2009) Um gene determinante para esta função é o CNA1, que codifica a subunidade catalítica A da calcinerina, uma fosfatase ativada pela

calmodulina, que auxilia na resposta a diversos estímulos ambientais para adaptação do fungo a diferentes tipos de estresses (Odom et al. 1997).

A cápsula é importante para a sobrevivência de *C. neoformans* no hospedeiro, fornecendo proteção direta para a levedura através da inibição da fagocitose e auxiliando na resistência à digestão no fagossoma. O material capsular é um potente imunomodulador, induzindo a produção da interleucina antiinflamatória IL-10 e inibindo a migração dos fagócitos do hospedeiro (neutrófilos). Além disso, induzem a apoptose de macrófagos, que por sua vez, induzem apoptose em células T (Pericolini et al. 2006, Monari et al. 2008, Zaragoza et al. 2009, Vecchiarelli & Monari 2012).

A melanina é um pigmento hidrofóbico de carga negativa, possui alto peso molecular e é formada pela polimerização de compostos fenólicos. A síntese de melanina é catalisada pela enzima lacase, na presença de compostos difenólicos, tais como 3,4-di-hidroxifenilalanina (L-Dopa). Em comparação com células não melanizadas de *C. neoformans*, as células melanizadas são menos suscetíveis a ação de antifúngicos como a caspofungina e anfotericina B. A melanina protege também as células fúngicas contra agentes oxidantes e fagocitose (Steenbergen & Casadevall 2003, Zhu & Williamson 2004, Ma & May 2009, Chen & Williamson 2011).

As proteinases são enzimas hidrolíticas fúngicas e degradam proteínas do hospedeiro, incluindo colágeno, elastina, fibrinogênio e imunoglobulinas, fornecendo nutrientes para o fungo e proteção contra o sistema imune do hospedeiro. A replicação de *C. neoformans* dentro dos macrófagos é acompanhada pela produção de enzimas, como as proteinases, que tem como função danificar a membrana do fagossoma (Steenbergen & Casadevall 2003, Ma & May 2009).

Fosfolipases são enzimas capazes de hidrolisar ésteres de glicerofosfolípidos, resultando na desestabilização das membranas e lise celular. Esta enzima auxilia na invasão pulmonar através da clivagem de seu principal surfactante dipalmitoil fosfatidilcolina e consequente adesão do fungo em células de pulmonares (Ghannoum 2000, Ma & May 2009).

A urease (Ure 1) tem um importante papel durante propagação do fungo para o SNC a partir da corrente sanguínea, facilitando o sequestro levedura presente nos leitos microcapilares para interior do cérebro (Steenbergen & Casadevall 2003, Ma & May 2009). O mecanismo através do qual a produção de urease facilita propagação do fungo no cérebro não é ainda bem estabelecido, mas pode envolver a produção de amoníaco, através da quebra da uréia, substância tóxica para as células endoteliais (Kronstad et al. 2011).

Estes fatores de virulência são importantes determinantes da patogenicidade, auxiliando no estabelecimento da infecção em humanos (Casadevall et al. 2003, Li & Mody 2010, Kronstad et al. 2011).

1.1.3 Infecção causada por espécies do complexo *Cryptococcus neoformans*

A infecção por *C. neoformans* é muito comum, mas a manifestação da doença é rara, uma vez que a presença de anticorpos é observada em indivíduos sem relatos de criptococose. Em geral, as crianças sofrem exposição antes do cinco anos de idade, tornando-se portadores assintomáticos. Acredita-se que a maioria dos casos de criptococose seja resultado da reativação de uma infecção assintomática latente, ocorrendo principalmente devido ao estabelecimento de um quadro de imunocomprometimento (Chayakulkeeree & Perfect 2006, Lin & Heitman 2006, Li & Mody 2010). Entre as espécies de *Cryptococcus*, a infecção por *C. neoformans* ocorre principalmente em hospedeiros imunocomprometidos, sendo assim denominada infecção oportunística. Enquanto infecções por *C. gattii* ocorrem geralmente em imunocompetentes expostos ao contato primário com o fungo (Vilchez et al. 2003, Lin 2009, Neofytos et al. 2010, Pappas et al. 2010, Pfaller & Diekema 2010, Byrnes et al. 2011, Liu et al. 2011).

A porta de entrada do *Cryptococcus* é através da inalação de basidiósporos ou leveduras provenientes de fontes saprofíticas ambientais, dispersas no ar atingindo os pulmões (Chayakulkeeree & Perfect 2006, Bovers et al. 2008). Ao chegar aos alvéolos pulmonares, a resposta ao patógeno se

difere pelas espécies em questão e o estado imunológico do hospedeiro. Em pacientes imunocompetentes, o contato com a espécie *C. neoformans* desencadeia uma resposta do hospedeiro através de seus mecanismos de defesa (Kawakami 2002). Na resposta inflamatória, os macrófagos representam a primeira linha de defesa e a morte do *Cryptococcus* pode ocorrer em conjunto com a presença de neutrófilos, monócitos e proteção específica, resultantes de células T e B. Estes fatores são suficientes para o controle da infecção, levando o fungo à morte ou algumas vezes permanecendo quiescente no pulmão. Após algum evento que leve à imunossupressão, o microrganismo se reativa podendo disseminar e causar uma infecção sistêmica. Já para *C. gattii*, o contato primário com em pacientes imunocompetentes ou imunocomprometidos pode ocasionar a sintomatologia, podendo se disseminar a partir do pulmão (Brummer 1999, Rodrigues et al. 1999, Lin & Heitman 2006).

Na criptococose pulmonar, pode ocorrer infecção assintomática, geralmente em hospedeiros imunocompetentes em contato com a espécie *C. neoformans*. A forma grave de pneumonina pode ser observada em pacientes imunocomprometidos ou imunocompetentes expostos ao *C. gattii*. Febre, tosse produtiva, dor torácica e perda de peso são os principais sintomas da criptococose pulmonar aguda, evoluindo para insuficiência respiratória aguda em imunossuprimidos (Chayakulkeeree & Perfect 2006, Li & Mody 2010).

Apesar dos macrófagos representarem a primeira linha de defesa no pulmão contra fungos do complexo *C. neoformans*, eles têm um papel importante na disseminação sistêmica. *Cryptococcus* fagocitados conseguem sobreviver fagossoma e se disseminam de forma hematogênica. O macrófago auxilia o fungo a atravessar a barreira hematoencefálica, através de um mecanismo conhecido como “cavalo de tróia”, posteriormente liberando o fungo viável no tecido cerebral (Kronstad et al. 2011).

Este fungo exibe um acentuado tropismo pelo SNC, levando a meningoencefalite, principal manifestação clínica da criptococose. Esta característica pode ser explicada por três principais fatores como: a) a presença de receptores específicos de células neuronais, b) a ausência de

resposta inflamatória e a presença de substratos como tiamina, ácido glutâmico, glutamina e carboidratos, c) nutrientes assimiláveis pelo fungo, assim como a presença de dopamina, precursor de melanina, um importante fator de virulência do fungo (Buchanan & Murphy 1998, Severo et al. 1998, Ikeda et al. 2002, Chayakulkeeree & Perfect 2006, Lin & Heitman 2006, Bovers et al. 2008, Li & Mody 2010, Kronstad et al. 2011).

Em pacientes imunocompetentes, o envolvimento do SNC é menos comum, enquanto em imunodeprimidos, como os HIV positivos, mais de 90% apresentam quadros de neurocriptococose (Pappalardo & Melhem 2003, Chayakulkeeree & Perfect 2006, Lin & Heitman 2006, Li & Mody 2010). As manifestações clínicas da criptococose do SNC incluem febre, dor de cabeça, neuropatia, letargia, perda de memória e sinais de irritação nas meninges. Como resultado da infecção, ocorre a formação de um denso exsudato leptomenigeo, composto por leveduras, fibras colágenas, linfócitos e plasmócitos (Buchanan & Murphy 1998, Severo et al. 1998, Chayakulkeeree & Perfect 2006, Lin & Heitman 2006, Bovers et al. 2008, Li & Mody 2010).

A figura 5 representa as vias de penetração e disseminação de *Cryptococcus* no tecido do hospedeiro.

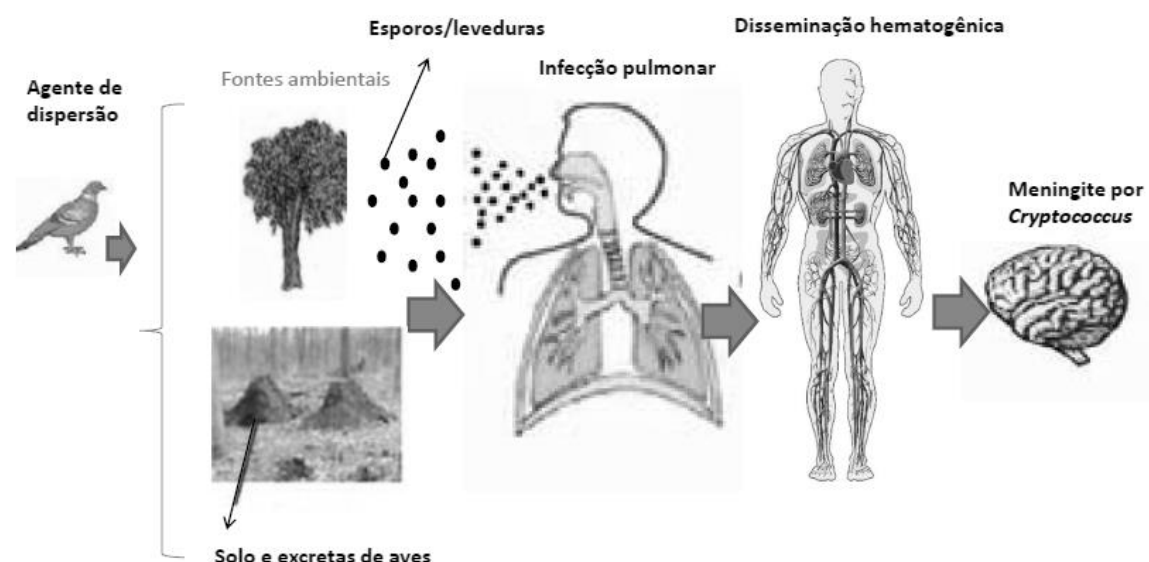


Figura 5- Ciclo de infecção de espécies do complexo *C. neoformans* (ambiente e hospedeiro) (Lin & Heitman adaptado 2006).

1.1.4 Epidemiologia

Antes da epidemia do HIV, a criptococose era uma infecção incomum, invariavelmente com baixo número de casos. A principal população suscetível era pacientes submetidos a transplantes de órgãos sólidos, terapia imunossupressora e portadores de câncer. Nos anos 80 e 90 com o aumento no número de casos de pacientes com a síndrome da imunodeficiência adquirida (aids), tanto em países desenvolvidos como em países em desenvolvimento, a criptococose emergiu como uma importante causa de morbidade e mortalidade (Vilchez et al. 2003, Warnock 2007, Neofytos et al. 2010, Pappas et al. 2010, Pfaller & Diekema 2010, Warkentien & Crum-Cianflone 2010, Chaturvedi & Chaturvedi 2011, Liu et al. 2011). O uso de antifúngicos profiláticos e a introdução da terapia antiretroviral por volta dos anos de 1995-1996 modificou o curso de doença criptocócica em pacientes com HIV, diminuindo a sua incidência principalmente em países desenvolvidos (Warnock 2007, Leimann & Koifman 2008, Park et al. 2009, Pfaller & Diekema 2010). Em países pobres e em desenvolvimento, com recursos limitados para o tratamento da aids, a criptococose ainda se apresenta altos índices (Warnock 2007, Warkentien & Crum-Cianflone 2010).

São descritos cerca de 957.900 casos de meningite criptocócica que ocorrem a cada ano em pacientes com aids, resultando em mais de 625.000 mortes. A região com o maior número de casos ainda é a África sub-saariana com 720.000 casos, seguido pelo Sul e Sudeste Asiático com 120.000 casos (Park et al. 2009). No Brasil, entre 1980 a 2002, 215.810 casos de aids foram registrados, sendo que 6% tinham criptococose (Pappalardo & Melhem 2003). Já no período de 1998 a 2006, Prado et al. (2009) relataram que 125.633 pacientes morreram de aids no Brasil, sendo a criptococose causa de 2,4% dos óbitos (aproximadamente 3000) (Prado et al. 2009).

C. neoformans é a principal espécie causadora de infecções em pacientes HIV positivos, sendo os sorotipos A e D responsáveis pela maioria dos casos. O sorotipo A (*C. neoformans* var *grubii*) representa mais de 95% de todos os casos de criptococose mundial, abrangendo 99% dos pacientes com HIV e criptococose. *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipo D) é mais comum

na Europa, onde 30% das infecções relatadas são causados por esta variedade, aumentando assim sua prevalência, quando comparado com outras regiões mundiais (Bovers et al. 2008, Lin 2009, Sifuentes-Osornio et al. 2012).

C. gattii é endêmico em regiões tropicais e subtropicais, sendo responsável por infecções principalmente em indivíduos imunocompetentes, podendo acometer em menor proporção em imunocomprometidos (Pappalardo & Melhem 2003, Bovers et al. 2008, Lin 2009). Os tipos moleculares VGI e VGII têm sido associados com a maioria dos surtos em hospedeiros saudáveis, em regiões como o território Norte da Austrália, na Nova Guiné e América do Norte. Por outro lado, os tipos moleculares VGIII e VGIV ocorre em pacientes imunocomprometidos, incluindo os portadores de HIV na África Subsaariana (VGIV) e nos Estados Unidos (VGIII), mostrando perfis epidemiológicos semelhantes aos observados na espécie de *C. neoformans* (Byrnes et al. 2011).

Em 1999 ocorreu um grande surto de infecção primária por *C. gattii* na América do Norte, começando na ilha de Vancouver, no Canadá, acometendo seres humanos e animais e expandindo para os EUA (Washington e Oregon). Este patógeno é endêmico em toda região e está associado à terra e uma variedade de espécies de árvores nativas. Mais de 50% dos pacientes infectados eram saudáveis e o tipo molecular VGII foi responsável por 95% dos casos, com uma alta incidência e mortalidade (Galanis & MacDougall 2010, Byrnes et al. 2011, Chaturvedi & Chaturvedi 2011, Heitman 2011). No Brasil, *C. gattii* é endêmico principalmente na região nordeste onde se concentra 70% dos casos no país (Pappalardo & Melhem 2003).

1.1.5 Tratamento

Os principais fármacos usados na terapia da criptococose são o poliênico anfotericina B, a fluocitosina que é um análogo de pirimidinas e o derivado azólico fluconazol (Perfect et al. 2010). A anfotericina B interage com ergosterol, principal componente da membrana celular fúngica, levando a formação de pequenos poros, aumentando sua permeabilidade e

consequentemente morte celular. A fluocitosina interfere na síntese de ácidos nucléicos dependentes da citosina permease, que converte o composto inicial em 5-fluorouracil, que se incorpora ao RNA alterando o funcionamento celular. O fluconazol inibe a enzima citocromo P-450, desta forma diminui a síntese do ergosterol, principal constituinte da membrana. Isto leva a um acúmulo de lanosterol, composto tóxico para o metabolismo celular e promove a alteração das propriedades e função da membrana celular fúngica (Lemke et al. 2005, Carrillo-Muñoz et al. 2006, Chen & Sorrell 2007, Cohen 2010).

O tratamento da meningite criptocócica inclui o regime fungicida de 2 semanas com anfotericina B e fluocitosina, seguido pela terapia de manutenção com fluconazol, no mínimo por 8 semanas. Este tratamento é indicado tanto em indivíduos imunocompetentes como imunocomprometidos. Em pacientes portadores de AIDS a dosagem indicada é a anfotericina B 0,7–1,0 mg/kg/dia por via intravenosa, fluocitosina 100mg/kg/dia via oral, subdividido em 4 doses e fluconazol 400 mg (6 mg/kg/dia) via oral (Bivanco et al. 2006, Perfect et al. 2010, Warkentien & Crum-Cianflone 2010, Vecchiarelli & Monari 2012).

Na associação da anfotericina B e fluocitosina o tratamento se torna mais eficiente, sendo rapidamente fungicida e com menor risco de falha terapêutica, obtendo resultados melhores quando comparados a anfotericina B administrada sozinha ou em combinação com o fluconazol. O uso da anfotericina B requer instalações adequadas para a administração de terapia intravenosa. Devido seu potencial de causar nefrotoxicidade, é importante também o acompanhamento da função renal (Perfect et al. 2010, Warkentien & Crum-Cianflone 2010, Vecchiarelli & Monari 2012).

Existem relatos do aparecimento de resistência à anfotericina B, fluconazol e fluocitosina em isolados de *C. neoformans* durante o tratamento. A maioria destes relatos envolve resistência ao fluconazol em pacientes com AIDS e meningite, após receberem um longo tratamento ou a profilaxia com fluconazol (Canuto & Gutierrez 2002, Kontoyiannis & Lewis 2002, Cannon et al. 2009, Pfaller & Diekema 2010).

A presença de isolados fúngicos resistentes ao tratamento convencional e a toxicidade dos fármacos presentes no mercado demonstram a necessidade da busca de novas moléculas com atividade antifúngica para enriquecer o pobre arsenal terapêutico. Dentre as fontes de pesquisa, podemos citar os produtos naturais como uma quase que infinita fonte de compostos farmacologicamente ativos, sendo que as plantas se destacam neste ambiente.

1.2 PRODUTOS NATURAIS A PARTIR DE PLANTAS: ÓLEOS ESSENCIAIS

É estimada a existência de 250 a 500 mil espécies de plantas no planeta, destas têm documentado cerca de 10 mil com uso medicinal. As plantas possuem uma capacidade quase ilimitada de sintetizar substâncias, com uma variedade de grupos funcionais. Os compostos farmacologicamente ativos são advindos principalmente dos metabólitos secundários. Atualmente 13.000 destes compostos já foram isolados, representando uma parcela de apenas 10% do total (Cowan 1999, McChesney et al. 2007, Arif et al. 2009, Silva & Júnior 2010). O metabolismo das plantas é devido em dois grandes grupos, sendo o primeiro os metabólitos primários, de ocorrência universal e essencial para a vida como aminoácidos, proteínas, carboidratos, nucleotídeos e lipídeos (Simões et al. 2007). Os metabólitos secundários, por sua vez, são de ocorrência restrita a certos grupos de plantas e estão relacionados à autodefesa e relações alelopáticas. São exemplos de metabólitos secundários os terpenos, flavonóides, alcaloides, fenilpropanóides, entre outros (Cowan 1999, Simões et al. 2007).

Os óleos essenciais (OEs) são compostos naturais de forte odor, advindos do metabolismo secundário das plantas aromáticas. Consistem de uma mistura complexa de diferentes substâncias, sendo estas, principalmente terpenos e felipropanóides. São líquidos, voláteis, límpidos, lipossolúveis e miscíveis em solventes orgânicos. Podem ser produzidos em todos os órgãos da planta como brotos, flores, folhas, caules, galhos, sementes, frutos, raízes, madeira ou casca e armazenadas em células secretoras, células epidérmicas ou tricomas glandulares (Bakkali et al. 2008, Reichling et al. 2009, Adorjan &

Buchbauer 2010). Na natureza, os OEs desempenham um papel importante na proteção das plantas como agentes antibacterianos, antivirais, antifúngicos, inseticidas e também ação contra o herbívorismo. Possuem a característica de atrair alguns insetos para favorecer a dispersão do pólen e sementes, ou repelir outros indesejáveis (Bakkali et al. 2008).

Uma das principais formas de obtenção dos OEs a partir das plantas é pela extração por arraste a vapor, uma técnica utilizada devido à economia, simplicidade e possibilidade de trabalhar com grandes quantidades. Este método baseia-se na capacidade de volatilização do composto, permitindo extrair substâncias imiscíveis em água. O vapor gerado em uma caldeira em contato com a matriz vegetal promove a volatilização do OE, que é separado posteriormente em um decantador (Figura 6) (Souza et al. 2012).

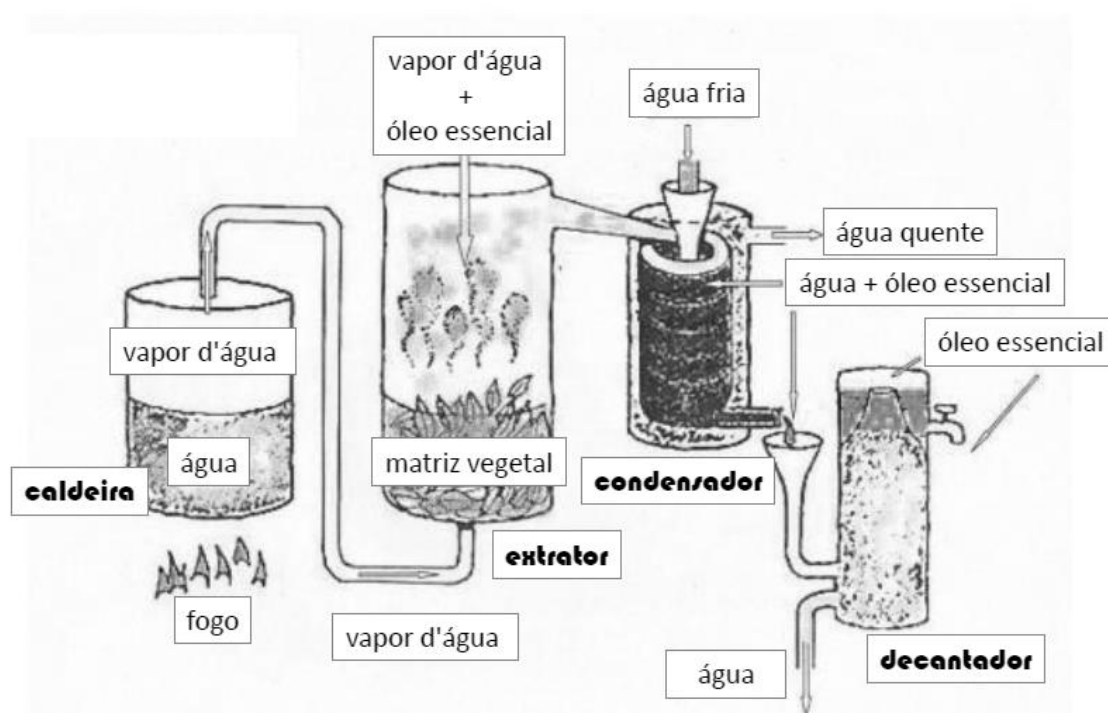


Figura 6- Representação das etapas de extração do OE por arraste a vapor (Souza et al. 2012 adaptado).

Uma vez extraído, é importante estabelecer a análise quantitativa e qualitativa do OE, determinando assim seus principais constituintes e sua porcentagem. O melhor e mais usado método de separação dos componentes

dos OEs é a Cromatografia Gasosa (CG), no qual a amostra vaporizada é injetada na cabeça da coluna cromatográfica. A eluição é feita por um fluxo de fase móvel gasosa inerte. Os componentes são separados em consequência de sua partição entre uma fase móvel gasosa e uma fase estacionária sólida, contida dentro de uma coluna (Skoog et al. 2006, Simões et al. 2007). Através do tempo de retenção, ou seja, o tempo que cada componente demorou em percorrer toda a coluna é possível identificar cada componente, quando comparado a padrões determinados. Para uma análise mais precisa é utilizado também o índice de Kovats, que compara o tempo de retenção com uma série de hidrocarbonetos homólogos (Simões et al. 2007).

Depois de separados, os componentes são quantificados pelo detector de ionização em chama (FID), um dos mais empregados em aplicações da CG em geral. O efluente da coluna é dirigido para uma pequena chama de ar/hidrogênio. A maioria dos compostos orgânicos produz íons e elétrons quando pirolizados à temperatura de uma chama. A detecção envolve o monitoramento da corrente produzida pela coleta desses portadores de carga (Skoog et al. 2006). A figura 7 esquematiza as partes de um CG através de um diagrama de blocos.

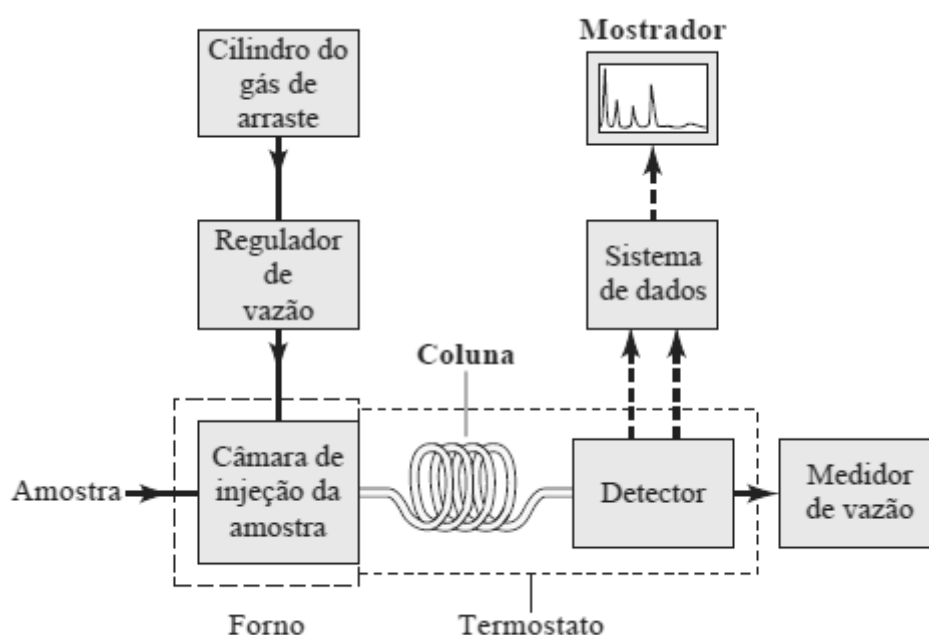


Figura 7- Diagrama de blocos de um cromatógrafo a gás típico (Skoog et al. 2006).

Os OEs são uma mistura complexa de vários componentes oriundos do metabolismo secundário das plantas. Alguns de seus principais componentes são os terpenoides e fenilpropanóides. Os terpenóides são biossintetizados a partir da via do mevalonato e methilerithritol fosfato, sendo que estruturalmente são constituídos basicamente por unidades de isoprenos C5 (Figura 8). Dentre estes, os monoterpenos (C10) estão presentes em grandes quantidades nos OEs, seu esqueleto é constituído por dois isoprenos formando moléculas com 10 átomos de carbono (Figura 9). Os fenilpropanóides, por sua vez, são constituídos pela forma básica de fenilpropanos C6C3 (Figura 10), tem origem a partir da via do chiquimato, uma importante rota para a obtenção de aminoácidos aromáticos essenciais (Dewick 2009).

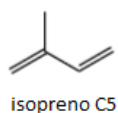


Figura 8- Estrutura química do isopreno constituído por 5 átomos de carbono (C5) - unidade básica de formação dos terpenoides.

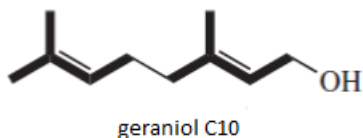


Figura 9- Monoterpeno geraniol, constituído por 10 átomos de carbono (C10) e duas unidades de isoprenos.

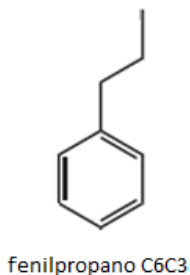


Figura 10- Estrutura química do fenilpropano, constituída por um anel aromático ligada a uma cadeia de 3 átomos de carbono (C6C3), unidade básica dos fenilpropanóides.

Atualmente, aproximadamente 3000 OEs são conhecidos, 300 dos quais são comercialmente importantes, especialmente para a indústria farmacêutica, alimentos, agronômica, sanitária, cosméticos e perfumes (Bakkali et al. 2008, Adorjan & Buchbauer 2010). No que se diz respeito à avaliação do potencial antimicrobiano de OEs, bons resultados têm sido relatados, levando a descoberta de compostos ativos até contra microrganismos resistentes à terapia convencional (Maciel et al. 2002, Mulyaningsih et al. 2010, Freire et al. 2011, Lang & Buchbauer 2011, Noumi et al. 2011, Silva et al. 2011, Wagner 2011, Zore et al. 2011, Shreaz et al. 2011b). A possível descoberta de novos compostos antifúngicos a partir de plantas se mostra importante, na tentativa de modificar o cenário atual que corresponde a um pobre arsenal terapêutico disponível para o tratamento das doenças causadas por fungos (Arif et al. 2009).

Levantamentos realizados sobre OEs documentados na literatura com atividade antifúngica, levou a escolha de sete plantas: *Mentha × piperita* L. (Lamiaceae), *Melaleuca alternifolia* Cheel (Myrtaceae), *Citrus × paradisi* Macfad. (Rutaceae), *Eucalyptus globulus* Labill. (Myrtaceae), *Pelargonium graveolens* L'Hér. ex Aiton (Geraniaceae), *Cymbopogon flexuosus* (Nees ex Steud.) Will. Watson (Poaceae) e *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M. Perry (Myrtaceae) para a avaliação de sua ação fungicida. Sendo que apenas as espécies de *P. graveolens*, *C. flexuosus* e *S. aromaticum* demonstraram boa atividade (Iskan et al. 2002, Tampieri et al. 2005, Viuda-Martos et al. 2008, Pinto et al. 2009, Rosato et al. 2009, Noumi et al. 2011).

1.2.1 *Pelargonium graveolens*

P. graveolens, espécie pertence à família Geraniaceae, é composta por 11 gêneros e 700 espécies presentes principalmente em regiões temperadas e tropicais, crescendo em solo pedregoso. A importância econômica desta família inclui o cultivo para uso ornamental (*Geranium sp* e *Pelargonium sp*) e a

produção de óleos essenciais (*Pelargonium* sp) (Mativandlela et al. 2006, Simpson 2006).

O gênero *Pelargonium* possui aproximadamente 270 espécies de pequenos arbustos perenes, sendo que 80% estão limitadas ao sul da África, enquanto outras estão presentes na Austrália, Nova Zelândia e Extremo Oriente. Algumas espécies são aromáticas como *P. capitatum*, *P. graveolens* e *P. radens*, sendo cultivadas para produção de OEs. O OE de *Pelargonium* sp. faz parte da composição de perfumes de alta qualidade, como o masculino Kouros (Yves Saint Laurent-1981), Polo Blue (Ralph Lauren-2003) e perfumes femininos como o Aromatics Elixir (Clinique-1975), Dioressence (Dior-1979), Paris (Yves Saint Laurent-1983) e Paul Smith Women (Paul Smith-2000) (Miller 2002, Mativandlela et al. 2006, Simpson 2006, Gomes et al. 2007, Cavar & Maksimovic 2012).

Espécies de *Pelargonium* são utilizadas na medicina popular para tratamento de feridas, febre, cólica e como anti-helmíntico. Na aromaterapia é utilizado para diminuir os sintomas da menopausa, tensão nervosa e ansiedade. Na homeopatia chinesa é usado para promover a expulsão de toxinas que inibem o equilíbrio do organismo (Lis-Balchin & Deans 1996, Peterson et al. 2006).

P. graveolens, vulgarmente conhecido como o gerânio é nativo da Província do Cabo (África do Sul) e foi introduzido na Europa através do comércio de especiarias e coleta de plantas medicinais por marinheiros, no início do século XVII. É um arbusto ramificado de até 1,3 m de altura, possui folhas fortemente recortadas, de textura aveludada, devido à presença dos pelos glandulares. Os caules são herbáceos quando jovem, tornando-se lenhoso com a idade (Figura 11) (Miller 2002, Rana et al. 2002, Peterson et al. 2006, Cavar & Maksimovic 2012, Boukhris et al. 2012a).



Figura 11- Ilustração das flores e folhas de *Pelargonium graveolens*.

O OE de gerânio é composto por uma mistura de odores (rosáceo, de frutas, mentolado) podendo ser identificados mais de 120 constituintes. Os principais componentes do óleo são monoterpenos oxigenados, sendo citrônolol e geraniol os principais (Figura 12) (Inouye et al. 2001, Rana et al. 2002, Lorenzi et al. 2009, Swamy & Rao 2009, Cavar & Maksimovic 2012, Boukhris et al. 2012a).

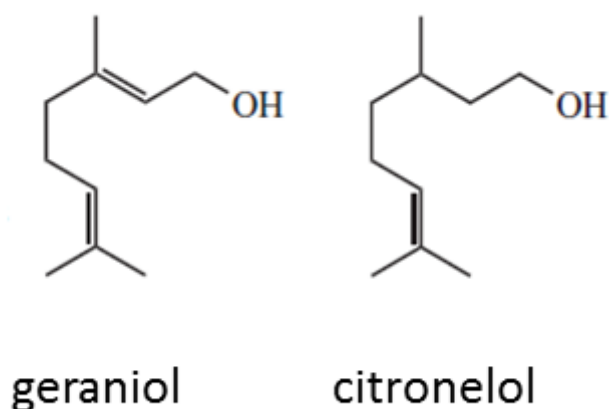


Figura 12- Citrônolol e geraniol - principais constituintes do óleo essencial de *P. graveolens*.

O OE é utilizado na aromaterapia e na produção de perfumes e produtos cosméticos, sendo um dos melhores óleos para o tratamento da pele promovendo abertura dos poros. É utilizado também como agente aromatizante de bebidas alcoólicas e refrigerantes. Na medicina tradicional destacamos seu uso como antiasmático, antialérgico, antioxidante, anti-diarréico, antihepatotóxico, diurético e antidiabéticos. Estudos mais recentes demonstram atividades ansiolítica, hipoglicemiante, antimicrobiana, antioxidante e acaricida (Miller 2002, Abe et al. 2004, Maruyama et al. 2006, Chen & Viljoen 2010, Tajkarimi et al. 2010, Dobetsberger & Buchbauer 2011, Zore et al. 2011, Cavar & Maksimovic 2012, Boukhris et al. 2012a, Boukhris et al. 2012b).

1.2.2 *Cymbopogon flexuosus*

C. flexuosus pertence a família Poaceae. O gênero *Cymbopogon*, com aproximadamente 180 espécies e variedades nativas de regiões tropicais do

velho mundo e Oceania. As plantas deste gênero são perenes e não ultrapassam 1 metro, folhas longas e estreitas contendo pelos glandulares. Algumas espécies aromáticas são valorizadas comercialmente sendo fonte da extração de OE como: *C. martinii*, *C. citratus* e *C. flexuosus*, utilizados na indústria de perfumes, cosméticos e farmacêuticos (Carlson et al. 2001, Schaneberg & Khan 2002, Khanuja et al. 2005, Rauber et al. 2005, Akhila 2010, Desai & Parikh 2012).

C. flexuosus (Figura 13) é popularmente conhecida como lemongrass ou capim limão, sendo nativa da Índia, mas cultivada em várias partes do mundo para a obtenção do seu OE. Na medicina popular esta planta é usada como anti-hipertensivo, anti-inflamatório e útil no tratamento da irritabilidade gástrica. Estudos recentes demonstram atividade anticâncer e atividade repelente contra mosquitos (Jayasinha 1999, Natha et al. 2002, Evans 2008, Caballero-Gallardo et al. 2012, Desai & Parikh 2012).



Figura 13- Ilustração das folhas de *C. flexuosus*.

O óleo essencial de *C. flexuosus* tem como principal componente o citral (3,7-dimetil-2,6-octadienal) (Figura 14), um aldeído alifático composto por uma mistura dos isômeros neral e geranial. Por causa de seu odor de limão, citral é amplamente utilizado como um aromatizante de alimentos, bebidas, doces, perfumes e produtos de higiene pessoal. Além disso, pode ser usado como ponto de partida para a síntese do mentol, vitamina A e beta caroteno. Citral exibe também atividade farmacológica importante como sedativo, antidepressivo, antiviral, antifúngico e antitumoral (Komori et al. 1995, Sharma et al. 1996, Carlson et al. 2001, Schaneberg & Khan 2002, Filho et al. 2003, Trasarti et al. 2004, Rauber et al. 2005, Akhila 2010, Desai & Parikh 2012).

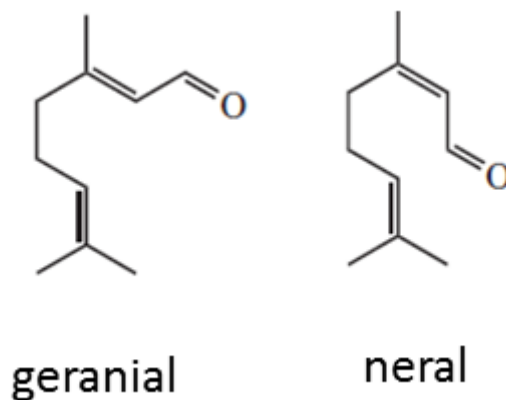


Figura 14- Geranial e neral - principais constituintes do óleo essencial de *C. flexuosus*.

1.2.3 *Syzygium aromaticum*

S. aromaticum pertence a família Myrtaceae que se apresentam como árvores perenes, de 10 a 20 metros de altura com folhas rosadas a verdes escuras, flores e frutos vermelhos, conhecida no Brasil como cravo da Índia (Figura 15). É nativa da ilha de Moluca, localizada no sul da Indonésia, mas atualmente cultivada em muitas áreas tropicais, Incluindo, África (Madagascar e Tanzânia), Brasil, Indonésia, Malásia e Sri Lanka (WHO 1999, Srivastava et al. 2005, Chaieb et al. 2007, Bassolé & Juliani 2012, Rozza & Pellizzon 2013).

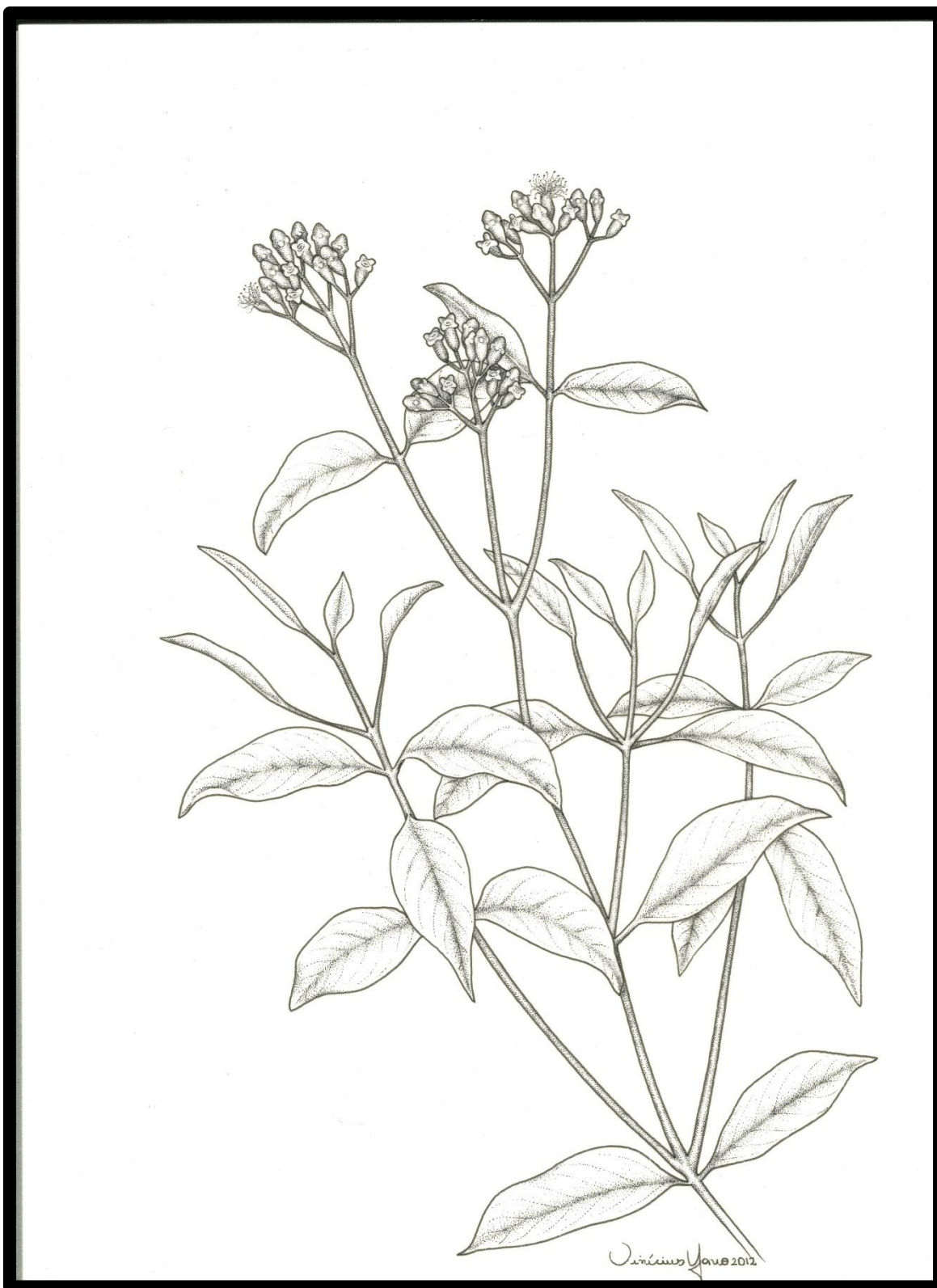


Figura 15- Ilustração das folhas e flores de *S. aromaticum*

A partir dos botões florais de *S. aromaticum* é possível a obtenção do seu OE contendo uma mistura volátil de terpenos cíclicos, alifáticos e

principalmente de fenilpropanoides. O componente principal é o fenilpropanóide eugenol (4-allyl-1-hydroxy-2-methoxybenzene) (60-95%) (Figura 16), seguido por acetato de eugenol e β -cariofileno (WHO 1999, Chaieb et al. 2007, Dewick 2009, Rozza & Pellizzon 2013).

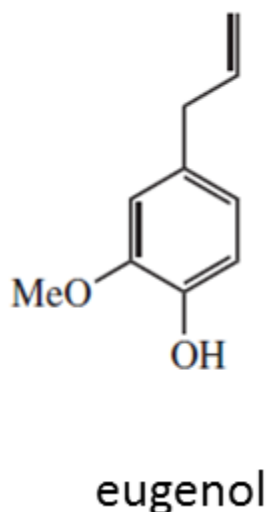


Figura 16- **Eugenol** - principal constituinte do óleo essencial de *S. aromaticum*.

O OE é utilizado em cremes dentais, sabonetes, enxaguantes bucais, devido a ação antimicrobiana em bactérias bucais causadoras de cárie, e também possui ação analgésica. Tem indicação etnofarmacológica em distúrbios gastrointestinais, tosse, resfriados, bronquite, sinusite, asma e processos inflamatórios (Baratta et al. 1998, Dorman et al. 2000, Friedman et al. 2002, Gayoso et al. 2005, Chaieb et al. 2007, Halder et al. 2011, Bassolé & Juliani 2012) .

Várias propriedades farmacológicas do OE de cravo ou o seu principal componente, eugenol, foram demonstradas incluindo atividades como anestésicas, analgésicas, anti-oxidante, anti-inflamatória, anti-carcinogênica, anti-mutagênica, gastroprotetora, inseticida e também atividade antimicrobiana (Lee & Shibamoto 2001, Guenette et al. 2006, Nangle et al. 2006, Ou et al. 2006, Chaieb et al. 2007, Pinto et al. 2009, Bassolé & Juliani 2012, Rozza & Pellizzon 2013).

A tabela 1 resume as características de cada planta citada anteriormente:

Tabela 1- Nome popular, principais constituintes dos OEs e uso terapêutico das espécies de *P. graveolens*, *C. flexuosus* e *S. aromaticum*.

Planta	Nome Popular	Componentes OE	Uso terapêutico
<i>P. graveolens</i>	Gerânio	Citronelol geraniol	antiasmático, antialérgico, antioxidante, antidiarreico, antihepatotóxico
<i>C. flexuosus</i>	Capim-limão	Citral	anti-hipertensivo, anti-inflamatório
<i>S. aromaticum</i>	Cravo	Eugenol	antiasmático anti-inflamatório

1.3 ENSAIOS *in vitro* PARA A DETECÇÃO DE ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE NOVOS COMPOSTOS

Produtos naturais, a base de plantas, são uma rica fonte na pesquisa de novos candidatos a fármacos. Para determinar a ação antifúngica de um novo composto é preciso submetê-lo a ensaios *in vitro*, com células fúngicas (Clardy & Walsh 2004, Cordell & Colvard 2005, Gulluce et al. 2006, Liu et al. 2007, Scorzoni et al. 2007, Scorzoni et al. 2007b). Atualmente há uma diversidade de metodologias para a determinação da atividade antifúngica, a inexistência de padronização destes testes não contribui para a reprodutibilidade dos ensaios e dificultam a comparação dos resultados obtidos. Diferentes estudos, com princípios e sensibilidades diferentes, mostram que os resultados sofrem influência da metodologia utilizada. Alguns dos ensaios mais usados são os discos difusão, a técnica de difusão em ágar e os testes de microdiluição em

caldo (Clardy & Walsh 2004, Cordell & Colvard 2005, Gulluce et al. 2006, Liu et al. 2007, Scorzoni et al. 2007, Scorzoni et al. 2007b).

A técnica de disco difusão consiste na utilização de disco de papel de filtro impregnado com o composto da planta, depositados na superfície de uma placa de Petri, contendo um meio sólido com inóculo fúngico. A atividade antifúngica é observada pela formação de halos de inibição do crescimento ao redor do disco (Pfaller & Yu 2001, Scorzoni et al. 2007, Scorzoni et al. 2007b, Adorjan & Buchbauer 2010, Lang & Buchbauer 2011). O teste de disco difusão tem como vantagem o fácil manuseio e baixo custo, além de necessitar de pouca quantidade do composto avaliado. Apesar da facilidade do método, alguns importantes problemas são observados. Primeiramente o teste se limita a substâncias polares, pois as apolares dificilmente conseguem difundir no meio sólido, enquanto que as voláteis tem seu desempenho diminuído devido a perda de substâncias. Os OEs por serem substâncias apolares e voláteis, não são adequados para serem avaliados nesta técnica (Pfaller & Yu 2001, Scorzoni et al. 2007, Scorzoni et al. 2007b, Adorjan & Buchbauer 2010, Lang & Buchbauer 2011).

A diluição em ágar consiste na diluição seriada de diferentes concentrações do composto da planta incorporadas ao meio sólido que é colocado em placas de Petri onde é inoculado o fungo (Silva et al. 2005). A ausência de crescimento demonstra a atividade do composto sobre o microrganismo avaliado (Passos et al. 2002). Esta metodologia é quantitativa por permitir a determinação da concentração inibitória mínima (CIM), que é a menor concentração do agente que impede o crescimento visível do microrganismo (Souza et al. 2003, Lemos et al. 2005). A desvantagem deste método é o uso de grandes quantidades tanto do meio de cultura quanto do composto teste.

O teste de microdiluição em caldo é realizado em meio líquido Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI), tamponado com ácido morpholinepropanesulfônico (MOPS) pH 7,0. Em placas de poliestireno contendo 96 poços são colocadas dez concentrações seriadas do composto da planta ($\mu\text{g/mL}$), ao quais são adicionados 10^3 células/mL de fungo. Após incubação a 35°C é realizada a leitura da CIM. O teste de microdiluição em

caldo é o mais adequado para determinar a atividade antifúngica de produtos naturais à base de plantas. Scorzoni et al. (2007) compararam a técnica de disco de difusão com a de microdiluição em caldo, onde foram avaliados 16 extratos brutos, 27 frações e 26 substâncias purificadas a partir de plantas das famílias *Piperaceae*, *Rubiaceae*, *Clusiaceae*, *Fabaceae* e *Lauraceae*. Foram avaliados espécies de *Candida* e *Cryptococcus* e observaram que a técnica de microdiluição em caldo apresentou maior sensibilidade e, portanto deve ser o método de escolha para a detecção da atividade farmacológica (Scorzoni et al. 2007, Scorzoni et al. 2007b).

Além da alta sensibilidade, outra vantagem desta técnica é uma boa reprodutibilidade, utilizando pouca quantidade do composto e meio de cultura, além de ser um teste quantitativo que determina a CIM. Além das vantagens citadas anteriormente, podemos destacar a presença do documento M27-A3 do Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI 2008), que descreve detalhadamente a metodologia deste teste, assim como os meios de cultura a serem usados, contribuindo assim para a obtenção de resultados confiáveis e reprodutíveis (Hadacek & Greger 2000, Pfaller 2005, Scorzoni et al. 2007, Lass-Flörl et al. 2009, Lang & Buchbauer 2011).

O CLSI é uma instituição internacional constituída por membros voluntários com o intuito de produzir documentos, normas ou diretrizes consensuais que auxiliam em questões relacionadas à saúde.(CLSI 2002, Pfaller 2005, Lass-Flörl et al. 2009). O documento M27-A3 intitulado: Método de Referência para testes de suscetibilidade de leveduras a antifúngicos foi padronizado para espécies de *Candida* e *C. neoformans*. O principal objetivo deste protocolo foi validar uma metodologia padrão ouro, para avaliar isolados causadores de infecções fúngicas, determinando seu perfil de suscetibilidade aos fármacos avaliados e assim permitindo a detecção de cepas resistentes aos antifúngicos utilizados no tratamento (CLSI 2008, Lass-Flörl et al. 2009). Além disso, este protocolo pode servir como ponto de partida para outras análises e abordagens, podendo assim então, ser utilizado como ferramenta para a busca e descoberta de novos compostos com atividade antifúngica (Scorzoni et al. 2007, Scorzoni et al. 2007b).

1.4 ESTUDO DA TOXICIDADE

Compostos que apresentam atividade antifúngica *in vitro*, como etapa imprescindível, deve ser submetida à avaliação de sua toxicidade, com a importante função de determinar efeitos nocivos, promovendo a segurança na sua administração com fins terapêuticos (Correa et al. 2009).

De modo geral, na trajetória de avaliação da toxicidade de um composto que se tornará um medicamento, inicialmente são feitos os ensaios a partir de técnicas *in vitro*, posteriormente são feitos ensaios *in vivo* em animais de laboratório e só então avaliados em humanos (Simões et al. 2007, Correa et al. 2009). O primeiro passo ao analisar a toxicidade é a avaliação *in vitro*, onde são utilizadas culturas de células para avaliar o potencial citotóxico. A técnica empregada apresenta vantagens como uma grande variedade de linhagens disponíveis para análise, o baixo custo, pequeno espaço físico necessário para o desenvolvimento do estudo, não necessitam de aprovação no comitê de ética, apresentam uma boa sensibilidade e reprodutibilidade (Pinto et al. 2010).

Partindo de uma quantidade conhecida de células, os testes de citotoxicidade medem a proporção de células viáveis após a exposição de um agente químico (Freshney 2005). Após o tratamento com o agente, as células são avaliadas com um indicador de viabilidade, sendo que um dos mais utilizados é o corante MTT, que mede a competência metabólica com base na avaliação da atividade mitocondrial. Em células vivas a cor amarela do MTT é reduzida a cristais de formazana pelo sistema citocromo das células viáveis (enzima succinato desidrogenase), sendo a cor púrpura resultante, uma medida direta de viabilidade celular (Mosmann 1983, Baltrop & Owen 1991). A intensidade da produção de cor é então avaliada em espectrofotometria.

Após a determinação da atividade antifúngica e baixo potencial citotóxico, o estudo do mecanismo de ação dos OEs se torna necessário para o entendimento melhor sobre sua ação específica nas células fúngicas.

1.5 DETERMINAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO DOS OEs SOBRE AS CÉLULAS FÚNGICAS

O estudo do mecanismo de ação dos OEs sobre as células fúngicas é importante para o conhecimento mais detalhado sobre sua ação farmacológica e antifúngica. Algumas metodologias são interessantes estratégias para o enriquecimento deste estudo, entre elas se destaca o equipamento citometro de fluxo, que a partir do uso de diferentes marcadores, possibilita analisar a ação antifúngica por vários aspectos (Pina-Vaz et al. 2001, Pinto et al. 2009, Vale-Silva et al. 2012). Já a quantificação do ergosterol é uma técnica simples que permite a visualização da inibição deste importante constituinte da membrana celular fúngica, através da espectrofotometria (Arthington-Skaggs et al. 1999, Pinto et al. 2009).

1.5.1 Ensaios utilizando citometria de fluxo

A Citometria de fluxo (CF) é um método analítico que permite a rápida medição de parâmetros óticos produzidos por partículas submetidas à luz. Esta tecnologia permite a contagem e caracterização de populações celulares suspensas em um fluido, através da dispersão da luz e a produção de fluorescência. Tais parâmetros são utilizados para uma análise da estrutura e função da célula. A principal característica do citometro de fluxo é a sua capacidade de medir um grande número de células por múltiplos parâmetros, uma vez que as células são analisadas separadamente, os resultados representam características cumulativas individuais (Alvarez-Barrientos et al. 2000, Ibrahim & Engh 2007, Díaz et al. 2010).

Além da fonte de luz, o citômetro de fluxo é formado por três unidades operacionais: o sistema hidráulico, ótico e eletrônico. A parte hidráulica é composta por um sistema de fluidos que tem como objetivo promover a focalização hidrodinâmica das células a serem analisadas. Este fluido conduz a amostra de maneira que as células sigam em fila indiana, passando uma de cada vez, em velocidade constante no ponto de detecção, sendo este estado

denominado fluxo laminar (Figura 17) (Alvarez-Barrientos et al. 2000, Ibrahim & Engh 2007, Díaz et al. 2010).

O ponto de detecção ou ponto de questionamento é o lugar de encontro entre a célula e o feixe de luz monocromático de alta energia, geralmente produzido por um laser. Este momento é denominado evento e gera fenômenos que permitem a análise celular. O espalhamento da luz incidente, quando coletada na mesma direção (ângulos de 0 a 10°) permite determinar o tamanho da célula, enquanto que a luz dispersa analisada em um ângulo de 90°, fornece dados sobre a complexidade celular, como rugosidade superficial e o número de organelas presentes. Tamanho e complexidade são considerados parâmetros intrínsecos celulares, uma vez que podem ser obtidos sem a marcação da amostra com fluoróforos (Alvarez-Barrientos et al. 2000).

Para obter informações adicionais como análise da viabilidade e do metabolismo, entre outros, as células são marcadas utilizando fluorocromos, cujas moléculas irão absorver a luz incidente e reemitir-las em um comprimento de onda maior, em um fenômeno denominado fluorescência. Na fluorescência, um laser de luz emite energia necessária para transição do estado fundamental para o estado excitado da molécula, que posteriormente retorna ao estado fundamental liberando energia na forma de cor (Alvarez-Barrientos et al. 2000, Chaturvedi 2008, Diaz et al. 2010).

O sistema óptico recupera a luz dispersa e a fluorescência produzida, através de espelhos dicróicos e filtros, dirigindo-as para detectores (FL1, FL2 e FL3, Figura 17). Os detectores de luz são divididos para captar intervalos de comprimentos de ondas, de acordo com as diferentes cores emitidas (Alvarez-Barrientos et al. 2000, Chaturvedi 2008, Diaz et al. 2010).

O sistema eletrônico converte os sinais ópticos em sinais eletrônicos, que são então analisados por um software. Gráficos em forma de histogramas, gráficos de pontos ou dot-plot, são usados para caracterizar um, dois, ou vários parâmetros das populações celulares analisadas (Alvarez-Barrientos et al. 2000, Chaturvedi 2008, Diaz et al. 2010).

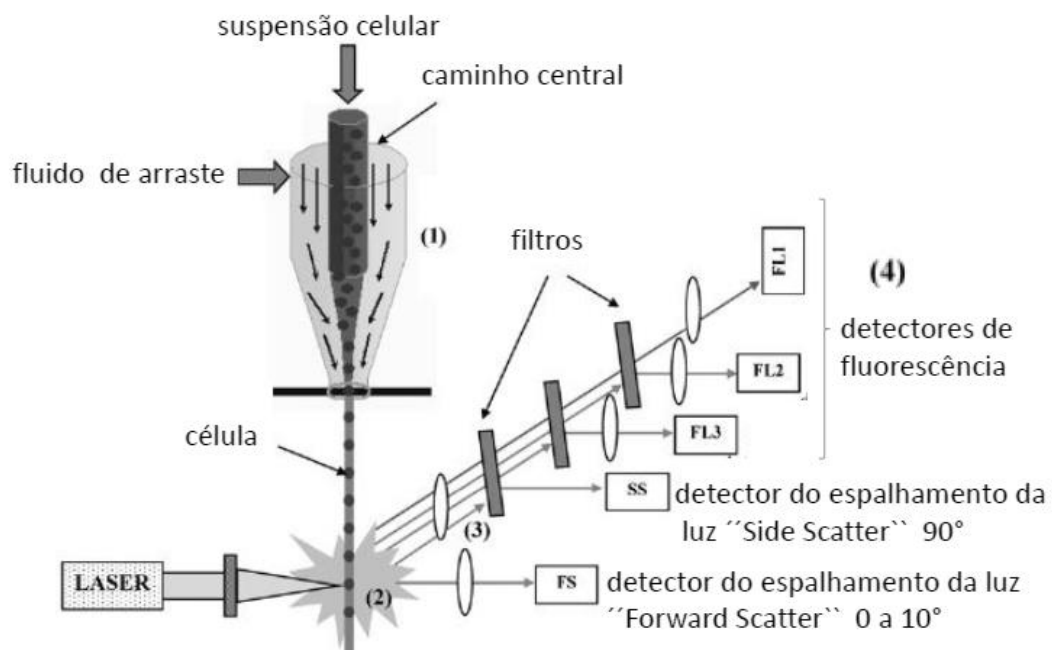


Figura 17- Esquema de um citômetro de fluxo. A focalização hidrodinâmica dá origem à formação de um fluxo de células que seguem uma a uma (1). Estas células passam por um feixe de laser emitindo sinais que reproduzem suas características particulares (2). O espalhamento da trajetória da luz e produção de fluorescência de cada célula é separado por um grupo de filtros e espelhos (sistema óptico) (3). Os sinais são recolhidos pelo sistema de detecção, que é formado por um conjunto de fotodiodos, detectores de fluorescência em diferentes comprimentos de onda (FL1, FL2, FL3), (4). Os sinais são enviados para um computador que fornece a representação da distribuição da população em relação aos diferentes parâmetros (Díaz et al. 2010 adaptado).

O estudo da apoptose celular, a análise do ciclo celular, a detecção de diferenciação de células do sistema imune, o monitoramento do HIV através da contagem de células T CD4, além da análise da população celular sanguínea são algumas das aplicações da CF (Alvarez-Barrientos et al. 2000, Ibrahim & Engh 2007, Zore et al. 2011, Zore et al. 2011b).

Na microbiologia, a CF se mostrou um importante instrumento de estudo, ampliando as ferramentas de análises que permitiu um passo além da microbiologia clássica. Sua aplicação é possível na avaliação da capacidade para distinguir diferentes estados fisiológicos, no estudo da viabilidade, na identificação de microrganismos patogênicos e até mesmo no estudo de mecanismo de resistência a fármacos (Miller & Quarles 1990, Alvarez-Barrientos et al. 2000, Davey 2002, Pina-Vaz et al. 2005, Pina-Vaz et al. 2005b, Page et al. 2006, Vale-Silva & Buchta 2006, Barbosa et al. 2008, Czechowska et al. 2008).

Esta técnica se mostra de grande importância no estudo da suscetibilidade a antimicrobianos, sendo rápida, sensível e reprodutível. Em apenas poucas horas é possível avaliar a suscetibilidade antifúngica, comparadas à metodologia padrão (microdiluição em caldo), que necessitam de até 72 horas. Essa maior rapidez na determinação no perfil de suscetibilidade auxilia na escolha correta do antifúngico e principalmente no rápido estabelecimento do tratamento (Ramani & Chaturvedi 2000, CLSI 2002, Chaturvedi et al. 2004, Rudensky et al. 2005).

Devido ao seu princípio, a metodologia de CF também permite o estudo do mecanismo de ação de compostos antifúngicos, utilizando principalmente os marcadores de fluorescência o iodeto de propídio (PI) e FUN-1 ([2-chloro-4-(2,3-dihydro-3-methyl-(benzo-1,3-thiazol-2-yl)-methylidene)-1-phenylquinolinium iodide]). O PI emite fluorescência ao se ligar aos ácidos nucleicos, sendo necessário para sua internalização o rompimento da membrana celular fúngica (Pina-Vaz et al. 2001, Pinto et al. 2006). A observação da fluorescência em curto período de incubação com o fármaco indica que o seu mecanismo de ação é inicialmente a lesão da membrana celular (Ahmad et al. 2011a, Ahmad et al. 2011b, Vale-Silva et al. 2012).

Por outro lado, o fluorocromo FUN-1 penetra nas células facilmente sendo um indicador da atividade metabólica. Nas células viáveis e metabolicamente ativas, este marcador é convertido em estruturas cilíndricas e intravacuolares vermelhas. Já células inativas, o marcador permanece no citoplasma, o que se traduz por um aumento da intensidade de fluorescência

verde (Millard et al. 1997). A análise se dá pela observação da mudança do padrão de intensidade de fluorescência, relacionando também com a dose-resposta do fármaco, em relação com a alteração do metabolismo (Pina-Vaz et al. 2005, Pinto et al. 2009, Vale-Silva et al. 2010).

1.5.2 Quantificação do ergosterol celular

Os esteróis são componentes essenciais das membranas celulares eucarióticas, sendo que o ergosterol é o principal componente das membranas das células fúngicas, com a função de auxiliar na manutenção e fluidez da membrana, consequentemente preservando a integridade celular (Bard et al. 1983, Rodriguez et al. 1985, Arthington-Skaggs et al. 1999, Kathiravan et al. 2012). Vários fármacos antifúngicos presentes no mercado têm como alvo o ergosterol ou sua cascata biosintética. A anfotericina B, por exemplo, age diretamente no ergosterol formando poros na membrana fúngica, enquanto os derivados azólicos, impedem a formação do ergosterol através da inibição da enzima 14 α demetilase, provocando assim alteração na fluidez da membrana e promovendo toxicidade metabólica (Lemke et al. 2005, Carrillo-Muñoz et al. 2006, Chen & Sorrell 2007, Cohen 2010, Kathiravan et al. 2012).

O mecanismo de ação de um composto antifúngico pode ser avaliado através da inibição da formação do ergosterol, demonstrado que através de sua quantificação por espectrofotometria (Pinto et al. 2009, Ahmad et al. 2011a, Ahmad et al. 2011b).

2 JUSTIFICATIVA

C. neoformans é um fungo oportunista de distribuição mundial, responsável pela maioria dos casos de criptococose, sendo que sua incidência é importante em pacientes portadores da aids. *C. gattii* acomete, principalmente, indivíduos imunocompetentes de regiões tropicais e subtropicais, onde o fungo é endêmico. Estas espécies compõem o complexo *C. neoformans* e são responsáveis por infecções que na sua forma grave exibem um quadro de meningoencefalite.

A terapia de escolha para o tratamento da criptococose é feita através da associação entre anfotericina B e fluocitosina, posteriormente administrado o fluconazol. O arsenal terapêutico é limitado e apresenta sérios problemas, devido à toxicidade associada à anfotericina B, além do aparecimento de isolados resistentes, principalmente ao fluconazol.

Neste contexto, torna-se necessário a busca de novos compostos com atividade antifúngica, sendo os produtos naturais uma rica fonte de pesquisa. A avaliação do potencial antimicrobiano de substâncias presentes em extratos e OEs de várias espécies de plantas têm sido objeto de vários estudos, levando a descoberta de novas moléculas antifúngicas.

Os OEs de *C. flexuosus*, *P. graveolens* e *S. aromaticum* em estudos anteriores demonstraram atividades biológicas, incluindo antimicrobiana. A inibição do crescimento de fungos filamentosos e leveduras têm sido descrito, no entanto não foi estabelecida sua ação sobre fungos do complexo *C. neoformans*, motivando assim o tema deste trabalho.

Após a determinação da atividade antifúngica, se torna importante a avaliação da toxicidade dos OEs em células de mamíferos, uma vez que moléculas com potencial uso terapêutico devem ter baixa toxicidade na concentração farmacologicamente ativa. Por sua vez, o estudo do mecanismo de ação ajuda no melhor entendimento das bases de ação dos OEs nas células fúngicas, além de auxiliar na escolha de associações entre compostos na busca do sinergismo para a melhor ação microbicida.

3 OBJETIVO GERAL E OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do trabalho foi avaliar a atividade antifúngica sobre isolados do complexo *C. neoformans* e avaliar a ação citotóxica em fibroblastos dos OEs das plantas *P. graveolens*, *C. flexuosus* e *S. aromaticum*

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar e quantificar os principais constituintes dos OEs de *P. graveolens*, *C. flexuosus* e *S. aromáticum* através da CG.
2. Verificar a atividade antifúngica dos OEs sobre fungos do complexo *C. neoformans* usando a técnica de microdiluição em caldo.
3. Determinar a Concentração Fungicida Mínima (CFM) dos OEs sobre os isolados de *Cryptococcus*.
4. Avaliar a atividade citotóxica dos OEs em células da linhagem L929 de fibroblastos.
5. Verificar o mecanismo de ação dos OEs em isolados de *Cryptococcus* através da CF, utilizando o marcador PI.
6. Avaliar as alterações provocadas pela exposição aos OEs no metabolismo celular fúngico, utilizando a CF pelo marcador FUN-1.
7. Quantificar o ergosterol presente nas células fúngicas normais e expostas aos OEs.

4 METODOLOGIA

4.1 ISOLADOS CLÍNICOS E CEPAS PADRÃO

Os isolados das espécies de *Cryptococcus* pertencem a Micoteca do Laboratório de Micologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás. Esses isolados foram obtidos de líquido de pacientes portadores de HIV, do Hospital de Doenças Tropicais Dr. Anuar Auad de Goiânia, Goiás, em um estudo aprovado pelo Comitê de bioética do Hospital de Doenças Tropicais (protocolo no. 004/03). Foram usados 10 *Cryptococcus neoformans*, 4 *Cryptococcus gattii* e 2 cepas padrão (american type culture collection) *C. neoformans* ATCC 28957, *C. gattii* ATCC 24065, estocadas a -70° C em Caldo Sabouraud Dextrose (CSD) com glicerol. Antes dos testes, os isolados eram previamente crescidos em Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) a 35°C por 72 horas.

4.2 ANTIFÚNGICOS

Anfotericina B (Sigma-Aldrich, Alemanha) e fluconazol (Pfizer, EUA) foram utilizadas como controle.

4.3 ÓLEOS ESSENCIAIS

4.3.1 Obtenção

Os OEs dos botões florais de *S. aromaticum* (*E. caryophyllus*), das folhas de *C. flexuosus* e das flores de *P. graveolens* foram adquiridos da Ferquima Indústria e Comércio Ltda (Vargem Grande Paulista, São Paulo, Brasil) (anexos 2 ao 7). A forma de obtenção dos óleos essenciais a partir das plantas foi através da extração por arraste a vapor.

4.3.2 Análise quantitativa e qualitativa dos OEs

Para a determinação e doseamento dos principais constituintes dos OEs avaliados, foi utilizado a Cromatografia Gasosa de Alta Resolução acoplada ao

detector por ionização de chama. O Cromatógrafo usado foi HP 5890, com coluna BP1 30m x 0,25mm (SGE). A temperatura da coluna variou de 60°C (0min), aumentando 3°C /min até 150°C. Os Injetores para a volatilização da amostra estavam na temperatura de 250°C e o detector FID foi mantido a 250°C. Para todas os OEs foi injetado um volume de amostra de 1 µL (1% em clorofórmio).

As análises e procedimentos cromatográficos foram realizados no Departamento de Química da UFMG, no Laboratório de Cromatografia e como responsável técnica a Dra. Vany Ferraz (anexos 3, 5, e 7).

4.4 TESTES DE SUSCETIBILIDADE *in vitro* PELO MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO

A avaliação da suscetibilidade de *Cryptococcus* foi realizada pela técnica de microdiluição em caldo, de acordo com o protocolo M27-A3 do CLSI em placas de microtitulação contendo 96 poços (CLSI 2008). Foram determinadas as CIMs dos óleos essenciais a partir da avaliação em diluições seriadas.

4.4.1 Preparo do óleo essencial

Os óleos essenciais foram primeiro solubilizados em Dimetilsulfóxido (DMSO) (1% volume final) (CLSI 2008) e Tween 80 (0,02% volume final) (Paula et al. 2012), posteriormente preparada uma solução estoque em RPMI-1640 que foi armazenado a -70 °C. A solução de uso foi preparada de forma a obter uma concentração de 2048µg/mL.

Nos primeiros orifícios da placa de microtitulação foram adicionados 200µL da solução de uso do OE e nos restantes adicionou-se 100µL de RPMI. Diluição seriada foi realizada até o décimo orifício de cada linha, de forma que se obtiveram concentrações variando de 4 a 2048µg/mL.

4.4.2 Preparo do inóculo

Uma suspensão dos isolados de *Cryptococcus* foi preparada em solução salina estéril (NaCl 0,85%), ajustada a 1×10^6 células/mL e em seguida diluições de 1/20 e 1/50 foram realizadas em RPMI-1640 tamponado com MOPS pH 7,0, de tal modo que a concentração final obtida variou entre 0,5 a $2,5 \times 10^3$ células/mL.

4.4.3 Procedimento do teste

Na placa de microtitulação contendo diluição seriada dos óleos essenciais foi adicionado 100µL do inóculo em cada orifício. Foram avaliados 7 isolados diferentes, sendo um em cada linha. A penúltima coluna foi utilizada para controle de crescimento do inóculo, não havendo a presença do composto teste. O controle de esterilidade do meio, contendo apenas RPMI foi realizado na última coluna. A última linha foi usada como controle da solução do óleo essencial. *Candida parapsilosis* ATCC 22019 foi utilizada como controle de qualidade, de acordo com o esquema representado na Figura 18. As placas foram incubadas a 35° C por 72 horas.

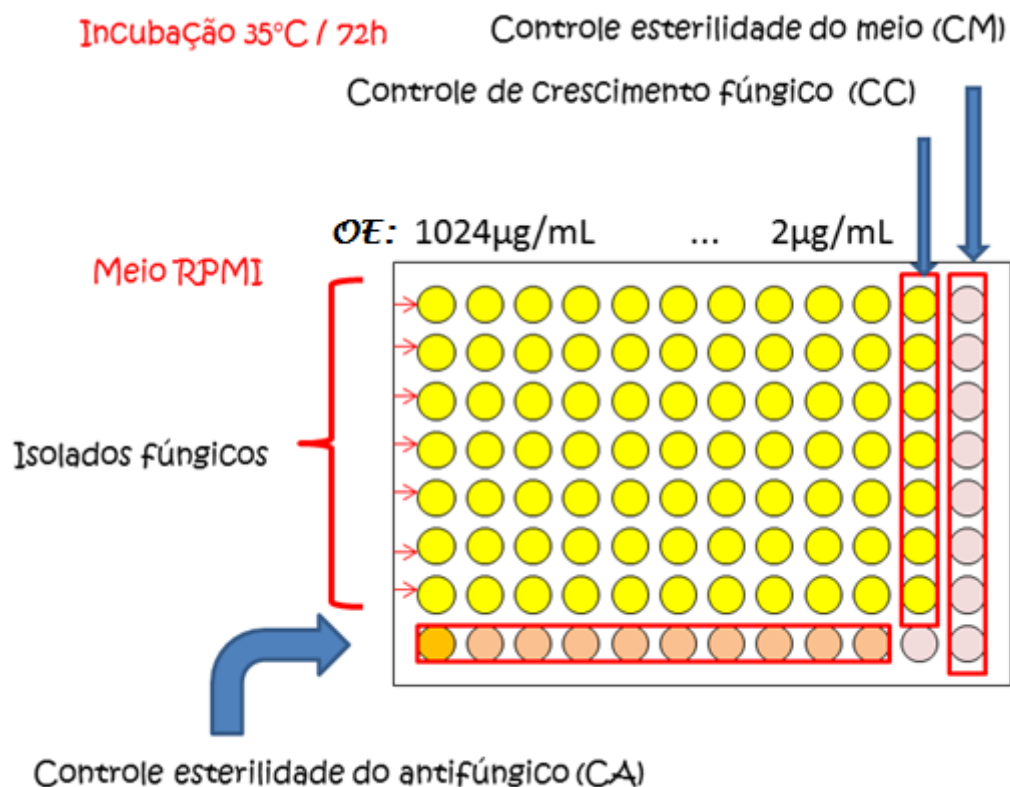


Figura 18- Esquema da preparação da placa para o teste de microdiluição em caldo.

4.4.4 Leitura

As placas foram submetidas à leitura visual comparada ao controle de crescimento. A CIM foi considerada a menor concentração capaz de inibir crescimento total do fungo. Atividade antifúngica do OE foi considerada como valores CIMs $\leq 256\mu\text{g/mL}$ (Scorzoni et al. 2007). Para a confirmação dos resultados foram realizados quatro experimentos em duplicata. A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism 5 (2007), utilizando teste de Fisher, o nível de significância foi de $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$.

4.4.5 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)

A determinação da CFM foi obtida pelo teste de microdiluição em caldo, de onde foram retirados 10 µL do meio contidos nos orifícios, nas concentrações correspondentes à CIM, 2x e 4x e inoculado em placa de Petri contendo Agar Sabouraud Dextrose (ASD). Após 72 horas de incubação a 35°C a CFM foi definida como a menor concentração que resultou no crescimento de menos de duas colônias, representando a morte de mais de 99% do inóculo original (De Logu et al. 2005).

4.5 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE CELULAR

A citotoxicidade foi avaliada de acordo com Santin et al. (2009), Oke e Aslim (2010), com modificações. Para examinar os seus efeitos citotóxicos em células normais, os OEs foram avaliados com fibroblastos da linhagem celular L929, subclone da linhagem parental L, derivada do tecido aureolar subcutâneo e adiposo de camundongos C3H/An. 50µL com 10^5 células suspensas em meio RPMI completo (10% soro bovino fetal, penicilina 200 U/mL e estreptomicina 200 µg/mL) foram semeadas em cada poço de placas contendo 96 orifícios. Após, adicionou-se 50µL das soluções de OEs em RPMI completo com até 0,1% de DMSO. Foram avaliadas 8 concentrações diferentes, dependendo dos resultados de CIM obtidas nos testes de suscetibilidade. *C. flexuosus* foi avaliada nas concentrações: 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 e 256µg/mL; *P. graveolens*: 32, 64, 128, 256, 512, 768 e 1024µg/mL e *S. aromaticum*: 32, 64, 128, 256, 384, 512 e 1024µg/mL. As células foram incubadas por 24 horas a 37° C em 5% CO₂. Como controle positivo de morte celular foi utilizado álcool 70%. A avaliação da viabilidade celular foi determinada adicionando 15µL de MTT (5 mg/mL em PBS), após 4 h de incubação. O meio foi removido e 100µL de DMSO foi adicionado para dissolver os cristais de formazan. A leitura dos resultados (absorbância) foi realizada em leitor ELISA a 550 nm. A viabilidade foi definida como a razão (em porcentagem) da absorbância de células tratadas com células não tratadas que serviram como controle. Para a confirmação dos resultados foram realizados quatro experimentos em duplicata.

A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism 5 (2007). Os resultados foram expressos em média±desvio e comparados com ANOVA one-way, seguido pelo teste de Dunnett's. O nível de significância foi de *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 (Tavares et al. 2008).

4.6 ESTUDOS DO MECANISMO DE AÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS POR CF

O estudo do mecanismo de ação foi realizado utilizando CF com os marcadores PI para verificar a ação sobre a membrana celular e FUN-1, utilizado para o estudo do metabolismo fúngico (Pina-Vaz et al. 2001, Pina-Vaz et al. 2001b, Pinto et al. 2009, Pina-Vaz & Rodrigues 2010, Vale-Silva et al. 2010, Ahmad et al. 2011b).

4.6.1 Preparo do inóculo

O estudo de mecanismo de ação foi avaliado com *C. gatti* ATCC 24065. O isolado foi cultivado em CSD a 100 rpm por 24h. As células foram então centrifugadas e lavadas com tampão fosfato (PBS). O inóculo de 10⁶ células/mL foi preparado em RPMI.

4.6.2 Preparo do óleo essencial

Os OEs foram avaliados nas concentrações de 2 a 4096µg/mL. Uma solução foi preparada em meio de RPMI 5X para cada concentração final.

4.6.3 Avaliação da ação do óleo essencial sobre a membrana celular

Para cada uma das concentrações avaliadas, foi utilizado um tubo de 1,5mL onde foi adicionando 400µL do inóculo e 100µL da solução de OE em RPMI. Após a incubação por 60 minutos a 35°C, as células foram lavadas, centrifugadas por 10 minutos a 3700 rpm e ressuspensas em tampão Hepes

(10 mM) com glicose (2%) pH 7,2. Adicionou-se então 5µL do marcador de fluorescência PI (100µg/mL), seguida de uma incubação a 35°C, por 30 minutos na ausência de luz. Como controle de autofluorescência foi utilizado células não marcadas. Amostras tratadas com o marcador, mas não submetida a incubação com os OEs foram utilizados como controle de viabilidade. Como controle positivo, células tratadas com anfotericina B (2 µg/mL) e álcool 70% foram incluídas no estudo.

4.6.4 Ação do OE sobre o metabolismo celular

Para cada uma das concentrações avaliadas, foi utilizado um tubo de 1,5mL onde foi adicionando 400µL do inóculo e 100µL da solução de OE em RPMI. Após a incubação por 60 minutos a 35°C, as células foram lavadas, centrifugadas por 10 minutos a 3700 rpm e ressuspensas em tampão Hepes (10 mM) com glicose (2%), FUN-1 (0,5mM) e pH 7,2. Foi realizada uma incubação a 35°C, por 30 minutos na ausência de luz. Como controle de autofluorescência foi utilizado células não marcadas. Amostras tratadas com o marcador, mas não submetida a incubação com os OEs foram utilizados como controle de viabilidade. Como controle positivo, células tratadas com azida sódica (64 mM) e fluconazol (64µg/mL) foram incluídas no estudo. A azida sódica é um controle de inibição de metabolismo que paralisa a cadeia respiratória celular, indicada pelo aumento da intensidade de fluorescência em FL2 (Pina-Vaz et al. 2001, Pina-Vaz et al. 2001b, Pina-Vaz et al. 2005).

4.6.5 Leitura dos resultados

O mecanismo de ação do OE sobre as células fúngicas foi avaliado pela análise da variação da intensidade de fluorescência no citometro de fluxo (Accuri C6) usando laser azul de argônio (488 nm). A mudança na intensidade de fluorescência foi analisada no detector de luz vermelha (FL3 670nm LP) para PI e na luz vermelho/laranja (FL2 585/40nm BP) para FUN-1. Foram também avaliados os parâmetros intrínsecos como complexidade celular e

tamanho celular. Um total de 10.000 eventos foi utilizado para analisar os parâmetros citados.

4.7 QUANTIFICAÇÃO DO ERGOSTEROL

A quantidade de ergosterol foi avaliada utilizando *C. gattii* ATCC 24065. O isolado foi incubado em 50 mL de CSD, contendo as concentrações correspondentes a 1/2CIM dos OEs de *S. aromaticum*, *P. graveolens* e *C. flexuosus*. Após 48 h à 35 °C em agitação, as células foram lavadas com água destilada, centrifugadas a 3700 rpm e o peso molhado do pellet foi determinado. Adicionou-se então 3 mL de solução alcoólica de potássio (25g KOH, 35mL água e álcool 100% qsp 100mL), agitados por 1 minuto e incubados por 4 horas a 85° C. Após resfriamento, a extração por partição foi feita com a adição de 1mL de água destilada e 3mL de n-heptano. A porção apolar contendo os esteróis (parte superior) foi então transferida e armazenada a -20°C por 24 horas. Esta fração foi diluída em álcool 100% (diluição 1/5) e lida em espectrofotometria de varredura em um intervalo de 230 a 300nm.

Como controle negativo foi utilizado a levedura em CSD sem tratamento antifúngico e como controle positivo as células foram tratadas com fluconazol (Arthington-Skaggs et al. 1999, Pinto et al. 2009). Para a determinação dos esteróis da membrana, foi avaliada a absorção espectral no intervalo de comprimento de onda variando de 230 a 300 nm. Esta técnica possibilita a extração de dois estróis: ergosterol e 24 (28) dehydroergosterol (componente da cascata bioquímica de formação do ergosterol). Ambos ergosterol e 24 (28) DHE absorvem a 281,5 nm, enquanto que apenas 24 (28) DHE mostra uma intensa banda de absorção em 230 nm. A porcentagem de ergosterol em relação ao peso úmido foi calculada com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ ergosterol} + \% 24(28)\text{DHE} = \frac{\left(\frac{A_{281,5}}{290}\right) X F}{\text{Peso pellet}}$$

$$\% 24(28)\text{DHE} = \frac{\left(\frac{A_{230}}{518}\right) X F}{\text{Peso pellet}}$$

$$\% \text{ ergosterol} = [\% \text{ ergosterol} + \% 24(28)\text{DHE}] - \% 24(28)\text{DHE}$$

Onde:

F = fator de diluição no etanol (=5).

290 e 518 = Valores de E1% em 1 cm de caminho ótico respectivamente para ergosterol e 24(28)DHE.

A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism 5 (2007). Os resultados foram expressos em média±desvio e comparados usando teste T de Student, sendo considerados valores significativos *p < 0.05 (Ahmad et al. 2011b).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PRINCIPAIS CONSTITUINTES DOS OEs

A análise dos OEs, que são constituídos por diversos compostos, foi realizada utilizando CG, seguido pela identificação dos componentes de acordo com o tempo de retenção e quantificada pelo detector FID. A figura 19 mostra o cromatograma obtido na análise do OE de *P. graveolens*, onde foram detectados 18 picos correspondentes a 18 diferentes substâncias identificadas. A Tabela 2 mostra cada constituinte e sua porcentagem correspondente. Um total de 77,6% da composição do OE foi identificado, os principais componentes foram citronelol (14,3%), isomentona (11,8%), linalol (9,6%), 10epi-Yeudesmol (9,3%) e geraniol (6,5%).

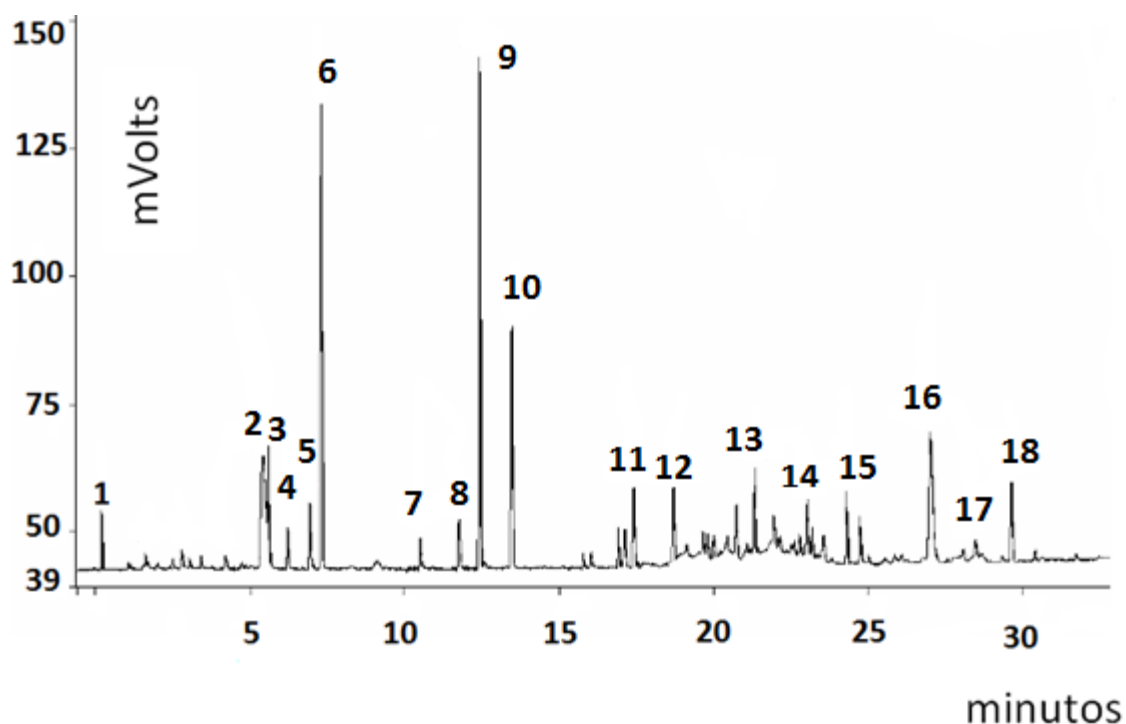


Figura 19- Cromatograma obtido a partir da CG separando o OE de *P. graveolens* em 18 diferentes compoenetes. Picos menores de 0,2% foram excluídos.

Tabela 2- Composição qualitativa equantitativa do OE de *P. graveolens* listados por ordem de eluição e suas respectivas porcentagens obtidos por CG usando detector FID.

Pico	Constituinte	%	
1	α -pineno	0,9	a
2	Linalol	9,6	b
3	cis óxido de rosa	3,6	b
4	trans óxido rosa	1,0	b
5	Mentona	1,9	b
6	Isomentona	11,8	b
7	citronelil formato	0,9	b
8	geranil formato	1,6	b
9	Citronelol	14,3	b
10	Geraniol	6,5	b
11	geranil acetato	2,4	b
12	β -cariofileno	2,7	c
13	Muuroleno	3,1	c
14	Elemol	2,0	d
15	2fenil tiglató	2,2	e
16	10epi-Yeudesmol	9,3	d
17	citronelil tiglató	1,3	d
18	geranil tiglató	2,5	d
Monoterpenos hidrocarbonetos(a)		0,9	
Monoterpenos oxigenados (b)		55,6	
Sesquiterpenos hidrocarbonetos(c)		5,8	
Sesquiterpenos oxigenados (d)		13,1	
Outros (e)		2,2	
Total identificado		77,6	

O OE de *C. flexuosus* apresentou 12 picos identificados como seus principais constituintes (Figura 20). Foi possível identificar 93,5% dos componentes deste OE, sendo que em sua grande maioria (87,3%) eram monoterpenos oxigenados. O citral, uma mistura de isômeros de neral e geranial, foi o principal constituinte (78,9%) do OE (Tabela 3).

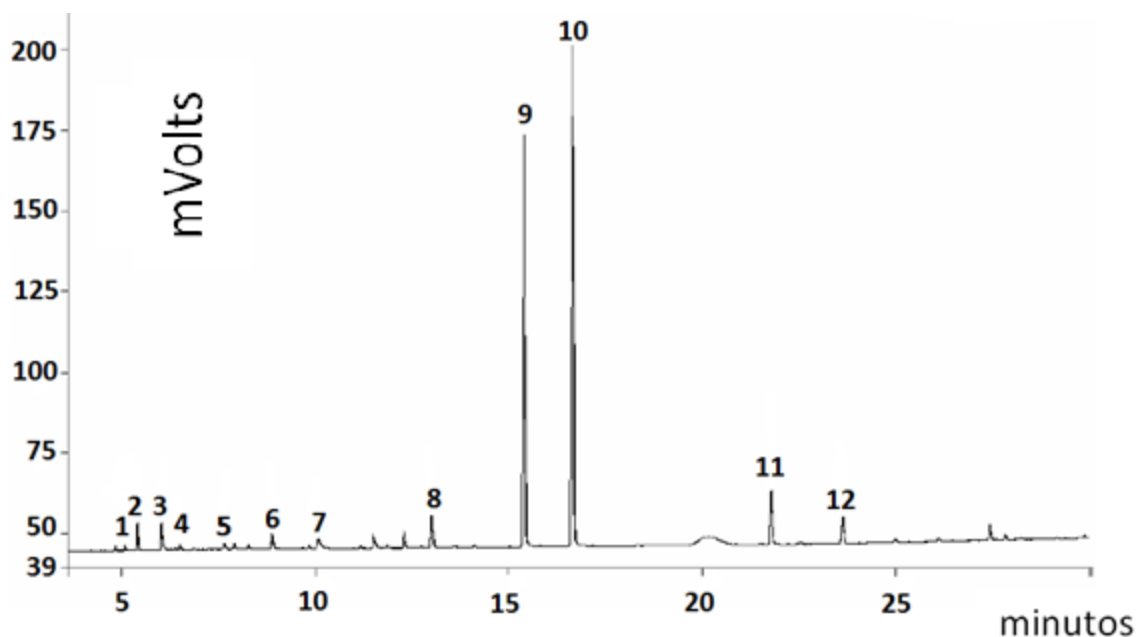


Figura 20- Cromatograma obtido a partir da CG separando o OE de *C. flexuosus* em 12 diferentes compoenetes. Picos menores de 0,2% foram excluídos.

Tabela 3- Composição qualitativa equantitativa do OE de *C. flexuosus* listados por ordem de eluição e suas respectivas porcentagens obtidos por CG usando detector FID.

Pico	Constituinte	%	
1	α -pineno	0,2	a
2	Canfeno	1,1	a
3	β -pineno	1,5	a
4	Mirceno	0,3	b
5	Limoneno	0,3	a
6	Y-terpineno	0,9	a
7	Linalol	1,2	b
8	Citronelal	2,4	b
9	Neral	34,3	b
10	Geranial	44,6	b
11	Acetato de geranila	4,5	b
12	Cariofileno	2,2	c
Monoterpenos hidrocarbonetos(a)		4	
Monoterpenos oxigenados (b)		87,3	
Sesquiterpenos hidrocarbonetos(c)		2,2	
Total identificado		93,5	

Na análise do OE de *S. aromaticum* foram detectados apenas 4 picos (Figura 21), determinando 4 substâncias diferentes, cujo componente majoritário foi o fenilpropanóide eugenol, representado 92,3% do total (Tabela 4).

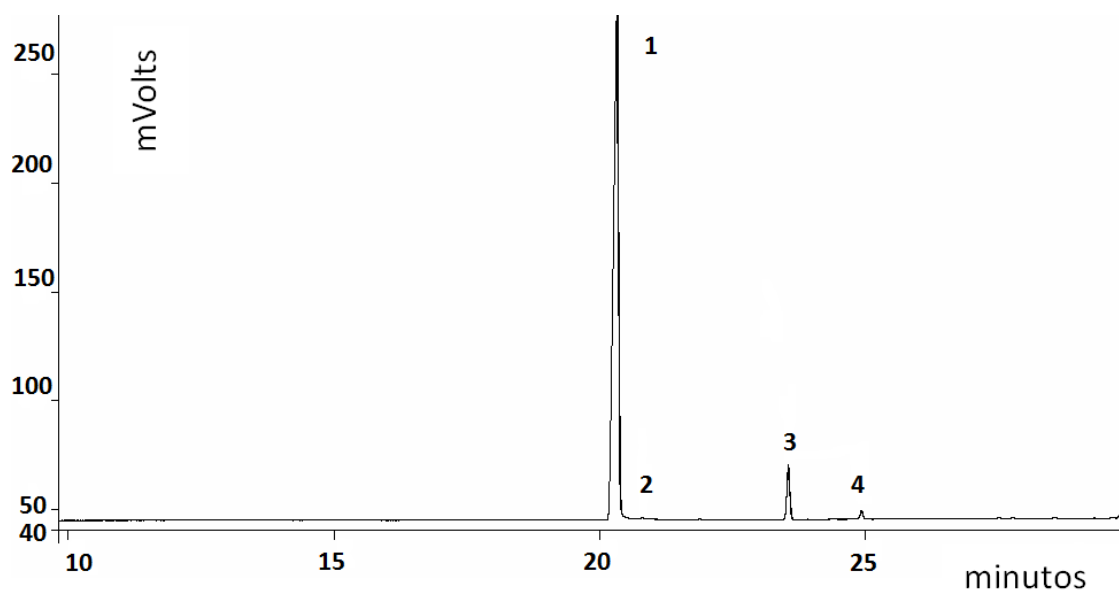


Figura 21- Cromatograma obtido a partir da CG separando o OE de *S. aromaticums* em 4 diferentes compoenetes. Picos menores de 0,2% foram excluídos.

Tabela 4- Composição qualitativa equantitativa do OE de *S. aromaticum* listados por ordem de eluição e suas respectivas porcentagens obtidos por CG usando detector FID.

Pico	Constituinte	%	
1	Eugenol	92,3	a
2	Acetileugenol	0,2	a
3	Cariofileno	5,5	b
4	α -humuleno	0,9	b
Fenilpropanóide (a)		92,5	
Sesquiterpenos hidrocarbonetos(b)		6,4	
Total identificado		98,9	

De maneira geral, os OEs apresentam um ou alguns principais componentes majoritários e vários outros em menor quantidade. Em nossos resultados, o OE de *C. flexuosus* teve como principal componente o monoterpreno oxigenado citral, constituído por uma mistura de isômeros, responsável por 78% do volume total. Vários outros estudos de composição deste OE mostraram resultados próximos, sendo o citral responsável de 62 a 80% do total do OE (Pandey et al. 2003, Kumar et al. 2009, Ottavioli et al. 2009, Adukwu et al. 2012).

Eugenol, um fenilpropanóide, foi o principal componente detectado do OE de *S. aromaticum* representado mais de 92% do total, de acordo com trabalhos que o detectaram variando de 70 a 90% (Chaieb et al. 2007, Pinto et al. 2009, Khan & Ahmad 2011, Machado et al. 2011, Singh et al. 2012).

Em estudos recentes demonstram que OE de *P. graveolens* tem como principais constituintes o citrônolol (21 a 36%) e geraniol (10 a 25%) (Fayed 2009, Ghannadi et al. 2012, Hsouna & Hamdi 2012, Boukhris et al. 2012a, Boukhris et al. 2012b). *P. graveolens* avaliado neste trabalho apresentou uma quantidade um pouco menor de citrônolol (14,3%), sendo geraniol (6,5%) o quinto o componente em quantidade, após de citrônolol, isomentona (11,8%), linalol (9,6%) e 10epi-Yeudesmol (9,3%). A variação na quantidade entre os componentes de OEs de uma mesma espécie é comum, pois os metabólitos secundários representam uma interface química entre as plantas e o ambiente circundante, portanto, sua proporção pode variar de acordo com as condições ambientais (Figura 22) (Gobbo-Neto & Lopes 2007). Características climáticas e do relevo, assim como a época do ano em que a planta foi colhida, são alguns exemplos (Gobbo-Neto & Lopes 2007).

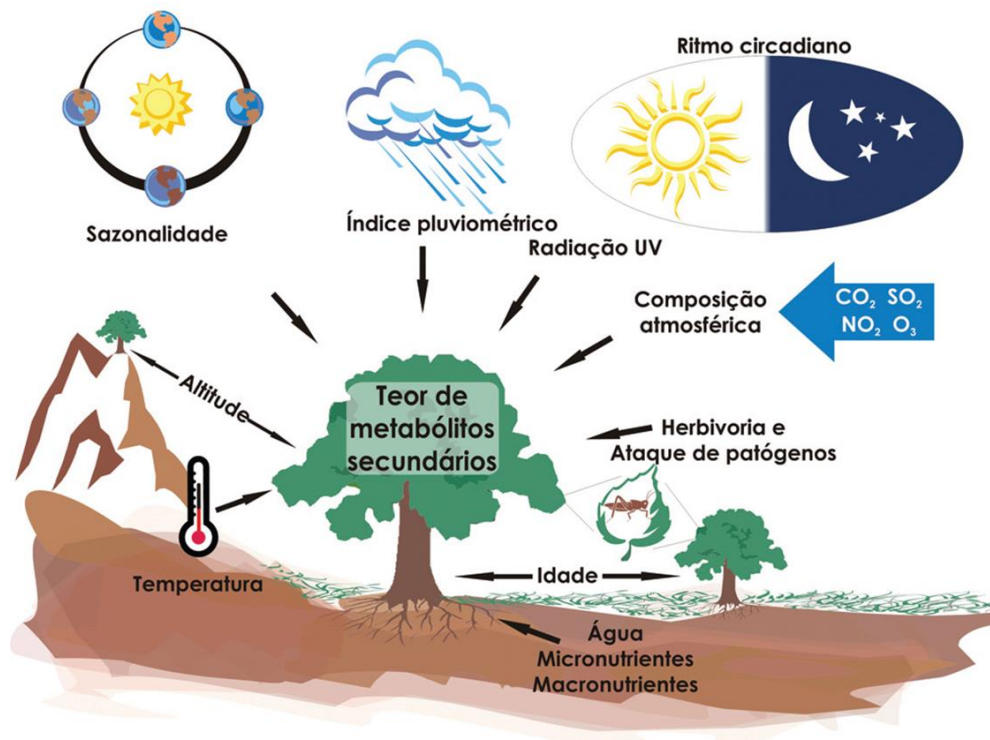


Figura 22- Fatores que podem influenciar a composição de metabólitos secundários na planta (Gobbo-Neto & Lopes 2007).

5.2 TESTES DE SUSCETIBILIDADE *in vitro*

Os resultados de suscetibilidade de espécies de *Cryptococcus* ao OEs de *C. flexuosus*, *S. aromaticum* e *P. graveolens* avaliados mostraram que todos apresentaram atividade antifúngica, inibindo o crescimento dos isolados em concentrações que variaram de 8 a 256µg/mL (Tabela 5).

Tabela 5- Atividade antifúngica (CIM e CFM) dos OEs de *C. flexuosus*, *S. aromaticum* e *P. graveolens* sobre diferentes isolados de *Cryptococcus*.

	<i>P. graveolens</i>		<i>C. flexuosus</i>		<i>S. aromaticum</i>	
Isolados	CIM (µg/mL)	CFM (µg/mL)	CIM (µg/mL)	CFM (µg/mL)	CIM (µg/mL)	CFM (µg/mL)
<i>C. neoformans</i>						
L02	256	512	16	16	256	256
L03	256	1024	16	32	256	256
L04	256	512	16	32	256	512
L05	256	512	16	32	128	256
L14	256	512	16	16	128	256
L15	256	512	16	32	256	512
L18	256	512	16	32	256	256
L21	256	512	16	32	128	256
L23	256	512	16	32	256	256
L30	256	512	16	64	256	256
<i>C. gattii</i>						
L01	256	256	8	16	128	256
L09	256	512	16	64	256	512
L20	256	512	16	32	256	256
L48	256	512	32	32	256	256
Cepas Padrão						
<i>C. neoformans</i> ATCC 28957	128	256	8	16	128	256
<i>C. gattii</i> ATCC 24065	256	512	8	16	128	256

Os menores valores de CIM foram obtidos pelo OE de *C. flexuosus* que inibiu o crescimento do fungo em concentrações entre 8 a 32µg/mL, sendo que a maioria dos isolados (75%) foi inibida na concentração de 16µg/mL (Figura 23). Os OEs de *S. aromaticum* e *P. graveolens* apresentaram atividade sobre o crescimento de espécies de *Cryptococcus* em maiores concentrações, com CIM variando entre 128 a 256µg/mL e para *P. graveolens* 94% dos isolados foram inibidos em 256µg/mL ($p= 0,0001$). Para *S. aromaticum* não houve diferença estatística entre os dois valores obtidos na determinação da CIM ($p= 0,298$) (Figuras 24 e 25). A figura 26 mostra a leitura do resultado da CIM do isolado de *C. neoformans* L5 do OE de *S. aromaticum*.

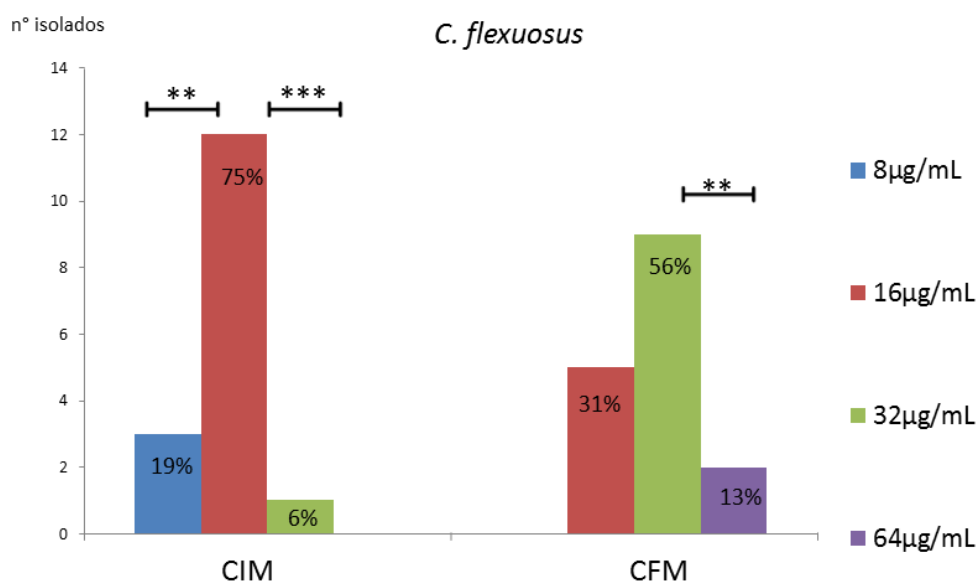


Figura 23- Valores de atividade antifúngica (CIM e CFM) do OE de *C. flexuosus* avaliados em 16 diferentes isolados de *Cryptococcus*. Os resultados foram expressos em porcentagem do total nas seguintes concentrações: 128, 256 e 512 µg/mL. Para a comparação estatística foi utilizado o teste de Fisher, sendo ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$.

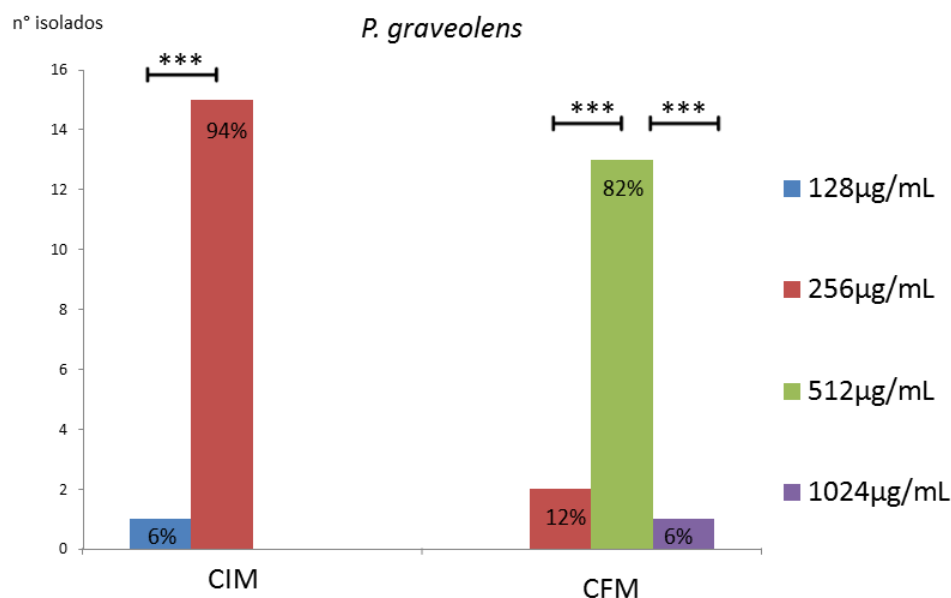


Figura 24- Valores de atividade antifúngica (CIM e CFM) do OE de *P. graveolens* avaliados em 16 diferentes isolados de *Cryptococcus*. Os resultados foram expressos em porcentagem do total nas seguintes concentrações: 128, 256, 512 e 1024 µg/mL. Para a comparação estatística foi utilizado o teste de Fisher, sendo *** $p < 0.001$.

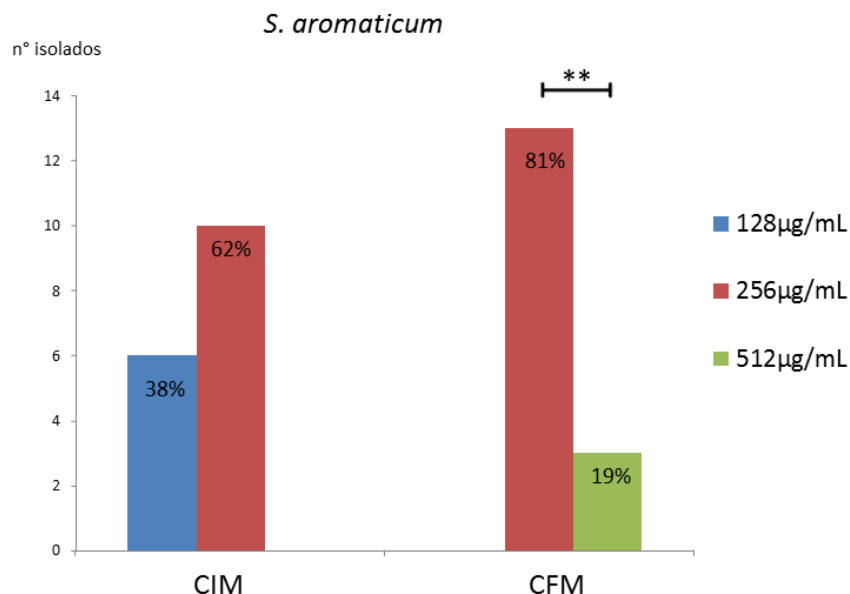


Figura 25- Valores de atividade antifúngica (CIM e CFM) do OE de *S. aromaticum* avaliados em 16 diferentes isolados de *Cryptococcus*. Os resultados foram expressos em porcentagem do total nas seguintes concentrações: 128, 256 e 512 µg/mL. Para a comparação estatística foi utilizado o teste de Fisher, sendo $**p < 0.01$.

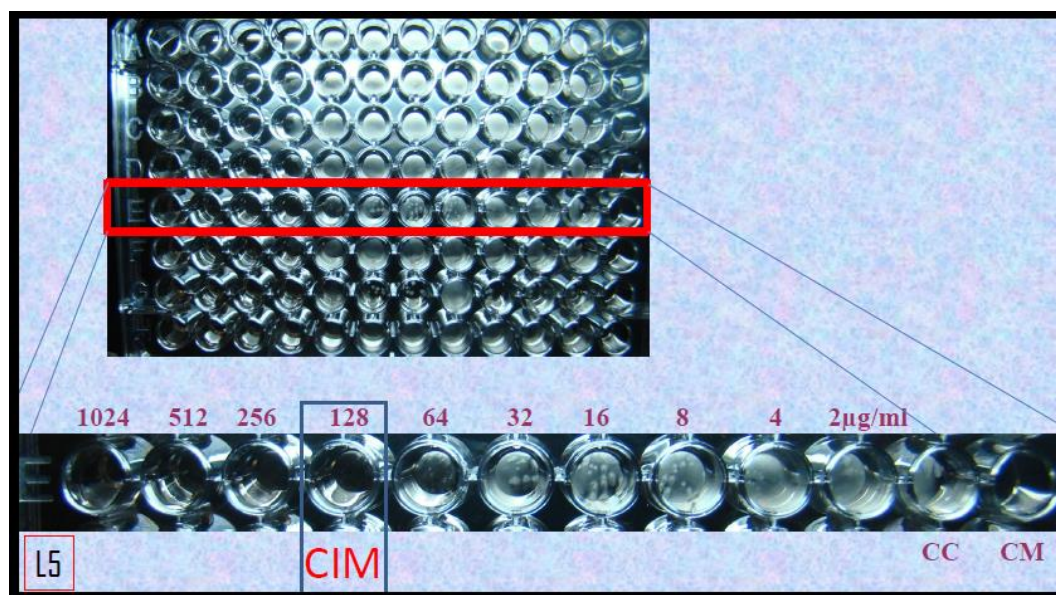


Figura 26- Determinação da CIM do OE de *S. aromaticum* sobre isolado de *C. neoformans* L5, obtida pelo método de microdiluição em caldo. CC: controle de crescimento; CM: controle do meio de cultura.

A CFM foi avaliada em valores a partir da CIM de cada isolado. Para *P. graveolens* e *C. flexuosus*, o resultado de CFM equivalente a 2X CIM foi estaticamente prevalente (Figura 27), representando 88% e 69% do total

respectivamente. Já para *S. aromaticum* apesar da maioria dos resultados de CFM (56%) corresponderem a 2X CIM, não houve diferença significativa quando comparada com os resultados de CFM = CIM ($p= 0,289$). A figura 28 mostra o resultado do isolado *C. neoformans* L5 após exposição ao OE de *S. aromaticum*, com CFM correspondendo a 2X CIM.

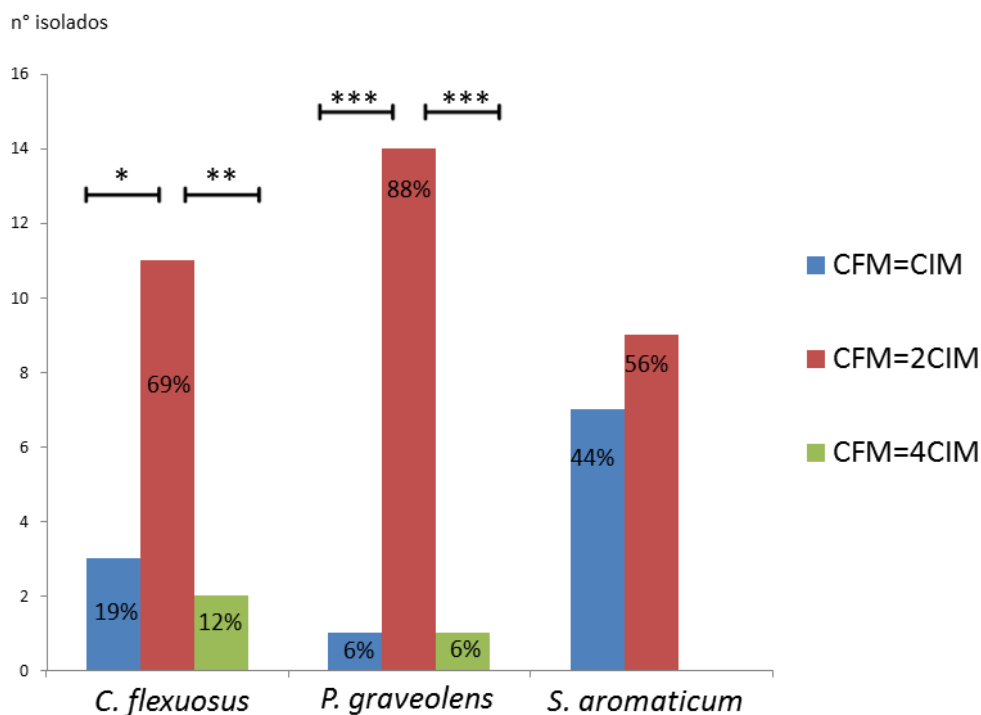


Figura 27-Valores de atividade antifúngica (CFM) dos OEs de *C. flexuosus*, *P. graveolens* e *S. aromaticum* avaliados em 16 diferentes isolados de *Cryptococcus*. Os resultados foram expressos em porcentagem do total dos valores de CFM correspondentes a CIM, 2X CIM e 4X CIM. Para a comparação estatística foi utilizado o teste de Fisher, sendo * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$.

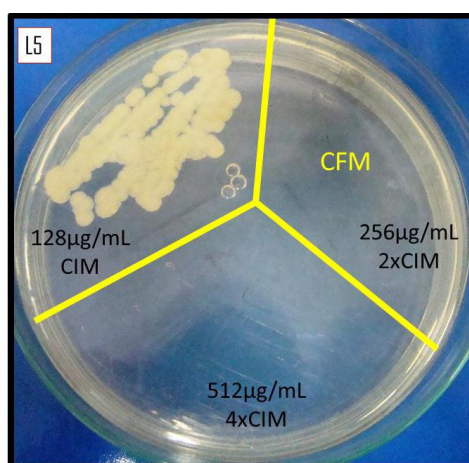


Figura 28- Concentração Fungicida Mínima (CFM) do OE de *S. aromaticum* sobre o isolado de *C. neoformans* L5.

A atividade de OEs tem sido objeto de estudo de vários pesquisadores, como apresentada na tabela 5, no entanto a atividade antifúngica de *P. graveolens*, *S. aromaticum* e *C. flexuosus* sobre isolados de *Cryptococcus* ainda é pouco reportada. Viollon e Chaumont (1994) avaliaram 27 OEs de várias plantas, dentre elas *S. aromaticum*, demonstrando a atividade em um isolado de *C. neoformans*, determinando a CIM de 200 µL/L (aproximadamente 200 µg/mL). Nossos resultados se mostraram similares, com CIMs entre 128 a 256 µg/mL.

O OE de *S. aromaticum* foi também avaliado em sua capacidade de inibir o crescimento de algumas espécies de fungos. A atividade antifúngica em 53 isolados de *Candida* foi avaliada por Chaieb et al. (2007b) pelo método de disco de difusão em placas de ASD. Todos os isolados apresentaram um halo de inibição ao redor do disco, demonstrando atividade deste OE sobre os isolados de *Candida*. Utilizando outra metodologia, microdiluição em CSD, Nzeako & Lawati (2008) avaliaram a atividade antifúngica do OE de *S. aromaticum* em 11 isolados de *C. albicans*, obtendo CIMs entre 1.000-2.500 µg/mL e CFM 2500 µg/mL (Nzeako & Lawati 2008).

Pinto et al.(2009) avaliaram a atividade biológica do OE de *S. aromaticum* em fungos patogênicos humanos, através da técnica de macrodiluição em caldo, utilizando protocolos M27-A3 e M38-A2. Nos 9 isolados de *Candida*, as CIMs e CFMs do OE variaram respectivamente entre 0,32 a 0,64 µL/mL (aproximadamente 320 a 640 µL/mL) e 0,64 a 1,25 µL/mL (aproximadamente 640 a 1250 µg/mL). Os isolados de dermatófitos mostraram CIMs entre 0,08 a 0,16 µL/mL (aproximadamente 80 a 160 µg/mL) e CFMs entre 0,16 a 0,32 µL/mL (aproximadamente 160 a 320µg/mL) e para as 3 cepas de *Aspergillus* variou de 0,32 a 0,64 µL/mL (aproximadamente 320 a 640µg/mL) e 1,25µL/mL (aproximadamente 1250 µg/mL) (Pinto et al. 2009).

Tabela 6- Atividade antifúngica (CIM e CFM) dos OEs de *P. graveolens*, *C. flexuosus* e *S. aromaticum* sobre diferentes espécies de fungos, segundo dados da literatura.

OE	Fungos	CIM	CFM	Fonte
1	<i>Trichophyton sp.</i>	250-1000µg/mL	500-2000µg/mL	(Shin & Lim 2004)
1	<i>Aspegillus flavus</i>	1250µg/mL	10000µg/mL	(Hsouna & Hamdi 2012)
1	<i>Aspergillus niger</i>	625µg/mL	5000µg/mL	(Hsouna & Hamdi 2012)
1	<i>Candida sp.</i>	60-120µg/mL	-----	(Rosato et al. 2009)
2	<i>T. mentagrophytes</i>	0,39µL/mL	-----	(Pandey et al. 2003)
2	<i>F. oxyporum</i>	1,56µL/mL	-----	(Pandey et al. 2003)
	<i>C. albicans</i>	500ppm	-----	(Trasarti et al. 2004)
2	<i>A. fumigatus</i>	1,2µL/mL	-----	(kumar et al. 2009)
2	<i>A. niger</i>	1,9µL/mL	-----	(Kumar et al. 2009)
2	<i>A. terreus</i>	1,3µL/mL	-----	(Kumar et al. 2009)
2	<i>F. oxysporum</i>	1,1µL/mL	-----	(kumar et al. 2009)
3	<i>C. neoformans</i>	200µL/mL	400µL/mL	(Viollon & Chaumont 1994)
3	<i>Candida sp.</i>	1000-2500µg/mL	2500µg/mL	(Nzeako & Lawati 2008)
3	<i>Candida sp.</i>	0,32-0,64µL/mL	0,64-1,25µL/mL	(Pinto et al. 2009)
3	Dermatófitos	0,08-0,16µL/mL	0,16-0,32µL/mL	(Pinto et al. 2009)
3	<i>Aspergillus sp.</i>	0,32-0,64µL/mL	1,25µL/mL	(Pinto et al. 2009)

1- *P. graveolens*; 2-*C. flexuosus*; 3- *S. aromaticum*.

O estudo de *P. graveolens* como potencial antifúngico tem sido realizado sobre diferentes fungos, demonstrando atividade promissora segundo alguns autores (Shin & Lim 2004, Rosato et al. 2009, Zore et al. 2011, Hsouna & Hamdi 2012, Boukhris et al. 2012a). Shin & Lim (2004) avaliaram a atividade do OE de *P. graveolens* avaliando seis isolados de *Trichophyton*, através da técnica de microdiluição em caldo. O óleo apresentou CIM de 250 a 1000µg/mL, enquanto a CFM variou de 500 a 2000µg/mL. Neste trabalho os autores demonstraram a presença de sinergismo do OE com o antifúngico cetoconazol.

Hsouna & Hamdi (2012) avaliaram o OE de *P. graveolens* em isolados *Aspergillus* através da técnica de microdiluição em caldo. Para *A. niger* a CIM foi igual a 625 µg/mL e CFM de 5.000 µg/mL, enquanto *A. flavus* os valores foram de 1250µg/mL (CIM) e 10.000 µg/mL (CFM).

Candida sp é o principal fungo usado para avaliar atividade antifúngica de novos compostos. Rosato et al. (2009) estudaram OE de *P. graveolens* sobre 10 isolados de *Candida* através do teste de microdiluição em caldo (CLSI) e as CIMs variaram entre 60 a 120µg/mL.

A atividade do OE de *C. flexuosus* já foi avaliada para isolados de *T. mentagrophytes*, um importante causador de dermatofitoses e o fungo oportunista *Fusarium oxysporum* (Pandey et al. 2003). A CIM para *T. mentagrophytes* foi de 0,39µL/mL (aproximadamente 390 µg/mL), enquanto para *F. oxysporum* a concentração de inibição foi de 1,56 µL/mL (aproximadamente 1560 µg/mL). Tampieri et al. (2005) avaliaram a atividade antifúngica de 16 OEs e seus principais componentes, demonstrando que *C. flexuosus* inibiu o crescimento de *C. albicans* em 500ppm (aproximadamente 500µg/mL).

Os resultados deste trabalho demonstram que os 3 OEs avaliados, apresentaram boa atividade antifúngica sobre isolados de *C. neoformans*, tornando este estudo de grande importância, por ser o primeiro relato de atividade anti-*Cryptococcus* dos OEs de *C. flexuosus* e *P. graveolens*.

5.3 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE

A avaliação da atividade tóxica é um importante passo para selecionar entre moléculas com atividade farmacológica, as que têm potencial de se tornarem fármacos. É esperado que resultados satisfatórios determinassem ação antifúngica sem necessariamente causar toxicidade para células ou no organismo do indivíduo tratado. O ensaio de toxicidade utilizado inicialmente é a citotoxicidade *in vitro*. Em nosso estudo foi avaliado a atividade citotóxica dos OEs de *P. graveolens*, *C. flexuosus* e *S. aromaticum* em concentrações próximas às CIMs. Através da técnica colorimétrica com MTT, foi determinada a porcentagem de células vivas em diferentes concentrações dos OEs, comparados com um controle não tratado.

A atividade citotóxica do OE de *P. graveolens* foi avaliada em 8 concentrações variando de 16 a 1024 µg/mL, como mostrado na figura 31. Até a concentração de 256 µg/mL (a maioria dos resultados de CIM), não houve diferença estatisticamente significativa entre a quantidade de células vivas, quando comparada com o controle (Figura 29). Isto demonstra que nesta concentração, o OE não é tóxico para células de fibroblastos. Porém, na concentração correspondente a 2 X CIM (512 µg/mL), foi observada morte celular, e que em concentrações > 768 µg/mL, mais de 50% das células não estavam viáveis.

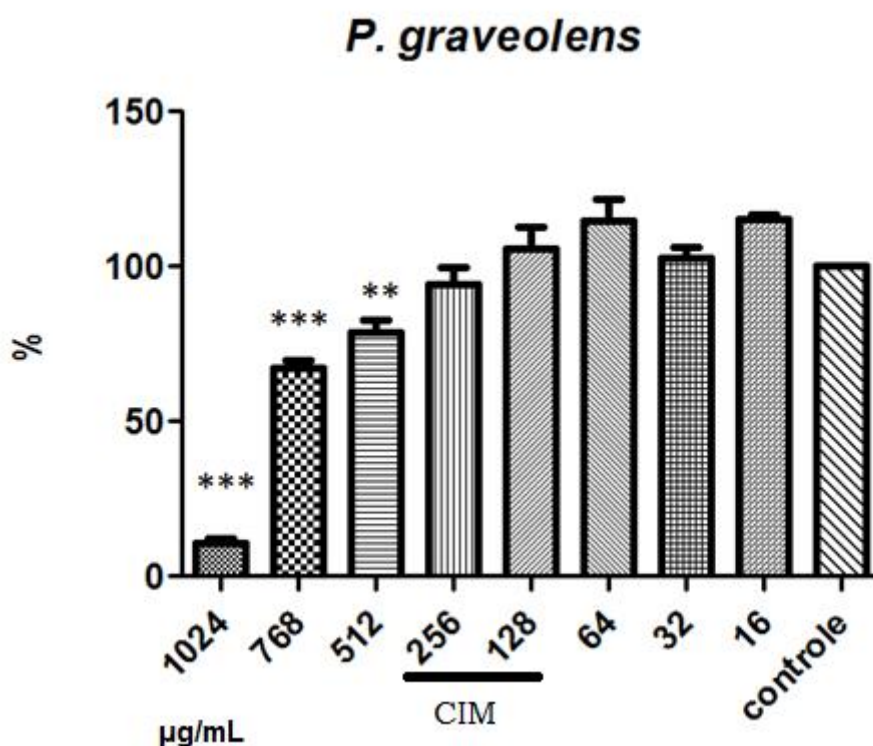


Figura 29- Porcentagem de células viáveis, em relação ao controle, em 8 diferentes concentrações do OE de *P. graveolens*. Todos os experimentos foram realizados em duplicata e repetidos quatro vezes. Resultados expressos em média±desvio e comparados estatisticamente usando ANOVA one-way, seguido pelo teste de Dunnett's. O nível de significância foi de **p < 0.01, ***p < 0.001, comparados com o controle.

Nossos resultados demonstram que *C. flexuosus* foi o que apresentou menores valores de CIMs, sendo que a concentração de 16 µg/mL inibiu a

maioria dos isolados do complexo *C. neoformas*. Na sua avaliação da citotoxicidade em fibroblastos, quando comparada com o controle, não houve alteração estatisticamente significativa até a concentração de 64µg/mL, sendo que até a concentração 256µg/mL, não se observou diminuição da viabilidade superior a 50% das células (Figura 30).

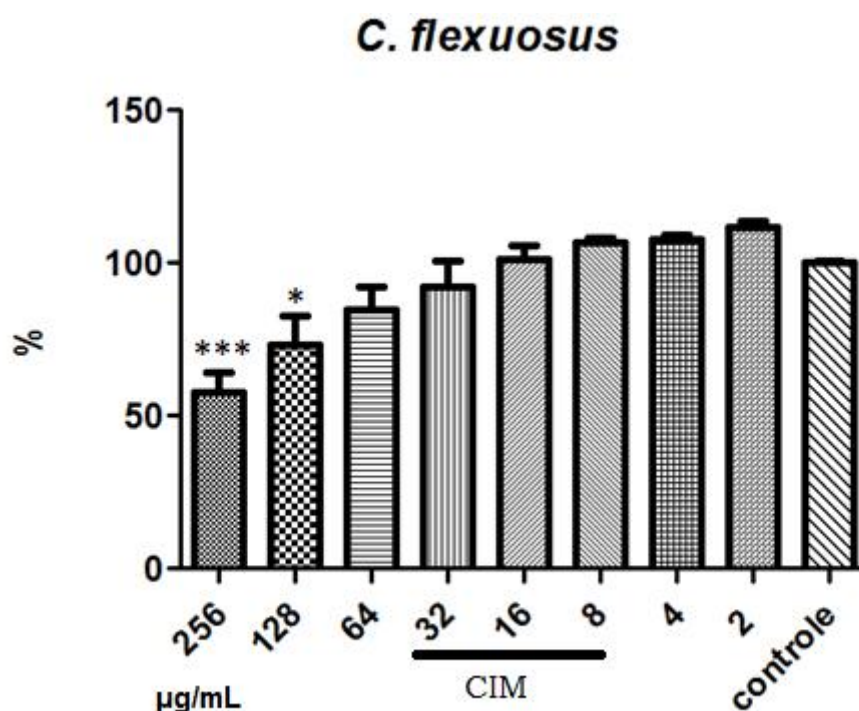


Figura 30- Porcentagem de células viáveis, em relação ao controle, em 8 diferentes concentrações do OE de *C. flexuosus*. Todos os experimentos foram realizados em duplicata e repetidos quatro vezes. Resultados expressos em média±desvio e comparados estatisticamente usando ANOVA one-way, seguido pelo teste de Dunnett's. O nível de significância foi de * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, comparados com o controle.

O OE de *S. aromaticum* não provocou alteração significativa na viabilidade celular até a concentração de 384 µg/mL, sendo que a maioria dos valores de CIM em *Cryptococcus* foi de 256 µg/mL, demonstrando que *S. aromaticum* também não foi tóxico em sua concentração antifúngica (Figura 31).

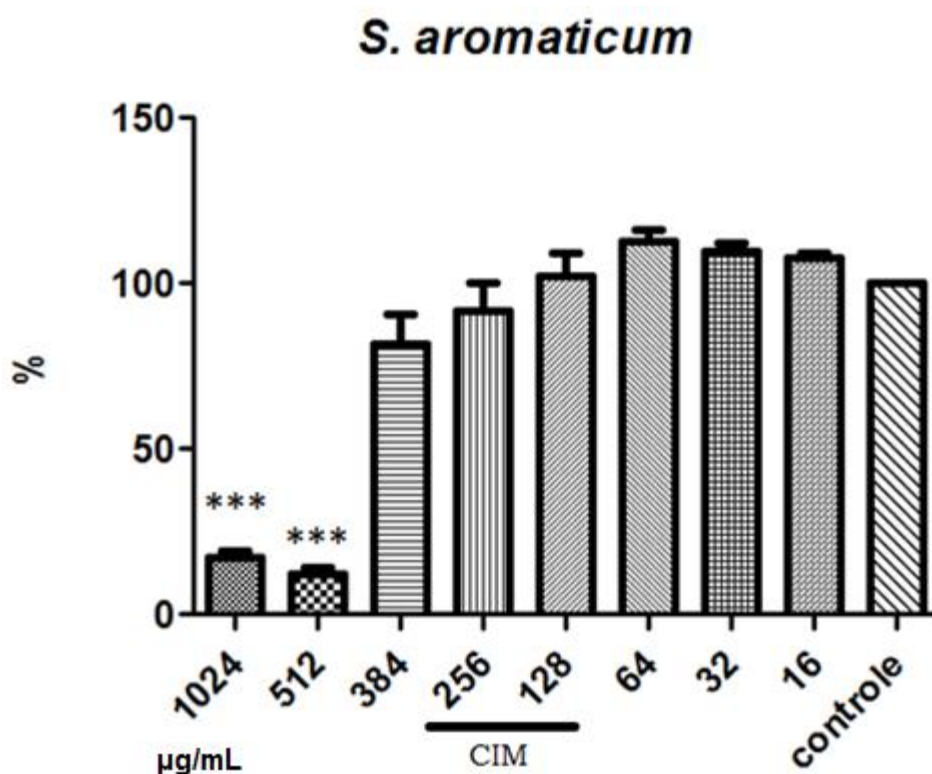


Figura 31- Porcentagem de células viáveis, em relação ao controle, em 8 diferentes concentrações do OE de *S. aromaticum*. Todos os experimentos foram realizados em duplicata e repetidos quatro vezes. Resultados expressos em média±desvio e comparados estatisticamente usando ANOVA one-way, seguido pelo teste de Dunnett's. O nível de significância foi de *** $p < 0.001$, comparados com o controle.

Geralmente é observado que os OEs apresentam atividade tóxica elevada, podendo provocar toxicidade aguda, crônica, fototoxicidade e alergia de contato, com maiores riscos quando administrados por via oral (Simões et al. 2007). Devido a este caráter citotóxico, a atividade contra células tumorais de *S. aromaticum* e *C. flexuosus* já foi estudada e comprovada em alguns trabalhos (Yoo et al. 2005, Sharma et al. 2009, Kouidhi et al. 2010). A atividade citotóxica do OE de *S. aromaticum* foi avaliada em várias linhagens celulares através da determinação do IC₅₀ que é a menor concentração onde 50% das células são mortas quando expostas a um agente (Kouidhi et al. 2010). Estes autores observaram que em linhagens de células humanas de adenocarcinoma do cólon (HT-29), o IC₅₀ foi de 30 µg/mL, enquanto para células de câncer epidermoide (Hep-2) foi de 500 µg/ml, 112 µg/ml para células de adenocarcinoma epitelial de pulmão humano (A549) e 15 µg/ml para células de

fibroblastos humanos de pulmão fetal (MRC-5). Prashar et al. (2006) avaliando linhagens celulares de células endoteliais (HNDF) e fibroblastos (153BR) encontrou valores de IC50 entre 0,016 e 0,032% (aproximadamente 170 e 320 µg/mL) .

Nossos resultados mostram que nas concentrações antifúngicas, correspondendo a CIM, os 3 OEs avaliados não são tóxicos para fibroblastos da linhagem L929, mostrando assim relativa especificidade, apenas provocando ambiente tóxico para as células fúngicas de espécies de *Cryptococcus* em menores concentrações. Entretanto, os resultados *in vitro* nos mostra um pequeno intervalo entre a concentração tóxica e a concentração farmacologicamente ativa, principalmente para o OE de *S. aromaticum* (Figura 31), que apresentou alta atividade citotóxica com 88% de morte celular na concentração correspondente a 2 CIM (512µg/mL).

Com estes estudos preliminares de toxicidade, podemos vislumbrar os OEs estudados como promissores candidatos a fármacos antifúngicos, principalmente por não apresentarem citotoxicidade na sua concentração antifúngica. Estudos de toxicidade *in vivo* seriam importantes para avaliar a toxicidade de forma sistêmica.

5.4 ESTUDOS DE MECANISMO DE AÇÃO

O mecanismo de ação dos OEs sobre as células de *Cryptococcus* foi analisado em CF, utilizando dois marcadores PI e FUN-1. Quando ligado ao DNA celular, PI produz fluorescência, emitindo luz vermelha que é captada pelo detector FL3. A internalização deste marcador ocorre apenas em situações de grande lesão na membrana, indicando morte celular. A figura 32 apresenta gráficos de dots plots com 10.000 eventos, comparando a intensidade de fluorescência das células de *C. gattii* ATCC 24065 em relação à complexidade da superfície celular (SSC). O controle marcado (Figura 32 B) foi utilizado como controle de viabilidade, a partir dele, o aumento da intensidade de fluorescência, indica morte celular, como mostrado nas figuras 32C e 32D, que representam os controles positivos de lesão. O álcool 70% (Figura 32 C)

causou morte em 99,9% da população celular analisada enquanto anfotericina B (Figura 32 D) lesionou menos de 9%, quando comparadas com o controle de viabilidade.

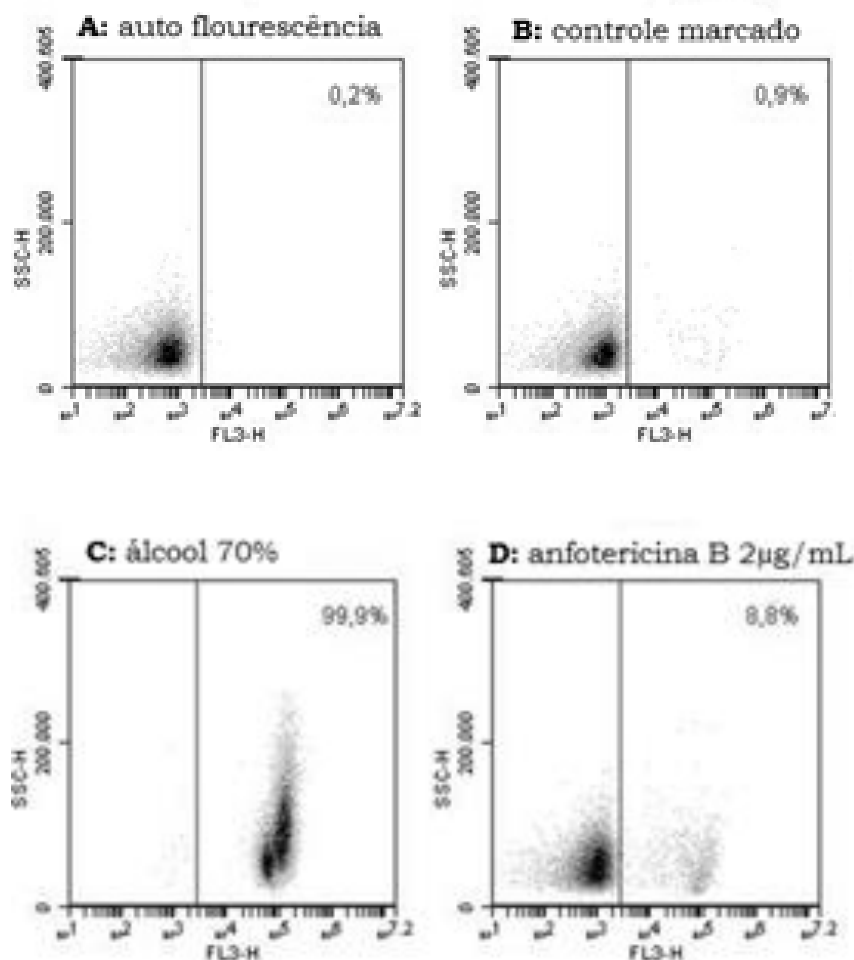


Figura 32- Análise por citometria de fluxo de *C. gattii* ATCC 24065 após a exposição por 1h com diferentes agentes. As células foram marcadas com PI e analisadas com 10.000 eventos em gráficos de densidade, mostrando granulidade celular (side scatter-SSC-H) versus fluorescência vermelho (FL3-H). As percentagens de células com lesão de membrana (quadrante à direita) foram determinadas nas seguintes condições; A) controle de células não marcadas; B) células marcadas, mas não tratadas, representando o controle de viabilidade; C) controle de lesão de membrana álcool 70%; D) controle de lesão de membrana anfotericina B 2 µg/mL.

Apesar da anfotericina B ser um controle positivo para lesão de membrana, em um curto período de tempo, na CF não se observou aumento da intensidade de fluorescência significativo. Isso pode ser devido ao pequeno

tamanho dos poros formados, impedindo a penetração do marcador PI (Lemke et al. 2005, Carrillo-Muñoz et al. 2006, Pinto et al. 2009, Cohen 2010, Ahmad et al. 2011b, Vale-Silva et al. 2012, Zuzarte et al. 2012). Nos testes de suscetibilidade *in vitro*, por exemplo, a dificuldade de internalização celular do PI, em presença de anfotericina B é contornada com o uso de desoxicolato de sódio (Ramani et al. 1997, Ramani & Chaturvedi 2000). Este detergente que tem como função facilitar a difusão do PI nos poros formados pela anfotericina B, desta maneira melhorando a internalização celular do marcador e permitindo o aumento da intensidade de fluorescência, em um período de incubação significativamente menor (4 horas). Segundo Vale-Silva et al. (2012), somente com 24 horas de incubação com este fármaco, é possível observar um significativo aumento (aproximadamente 90%) da intensidade de fluorescência em FL3, sem o auxílio do desoxicolato.

Em nossos resultados, o OE de *P. graveolens* provocou lesão na membrana fúngica. Na CFM, 16,1% das células estavam mortas, sendo observado o aumento da morte celular de maneira dose dependente, até 97,3% na concentração de 4096µg/mL (Figura 33).

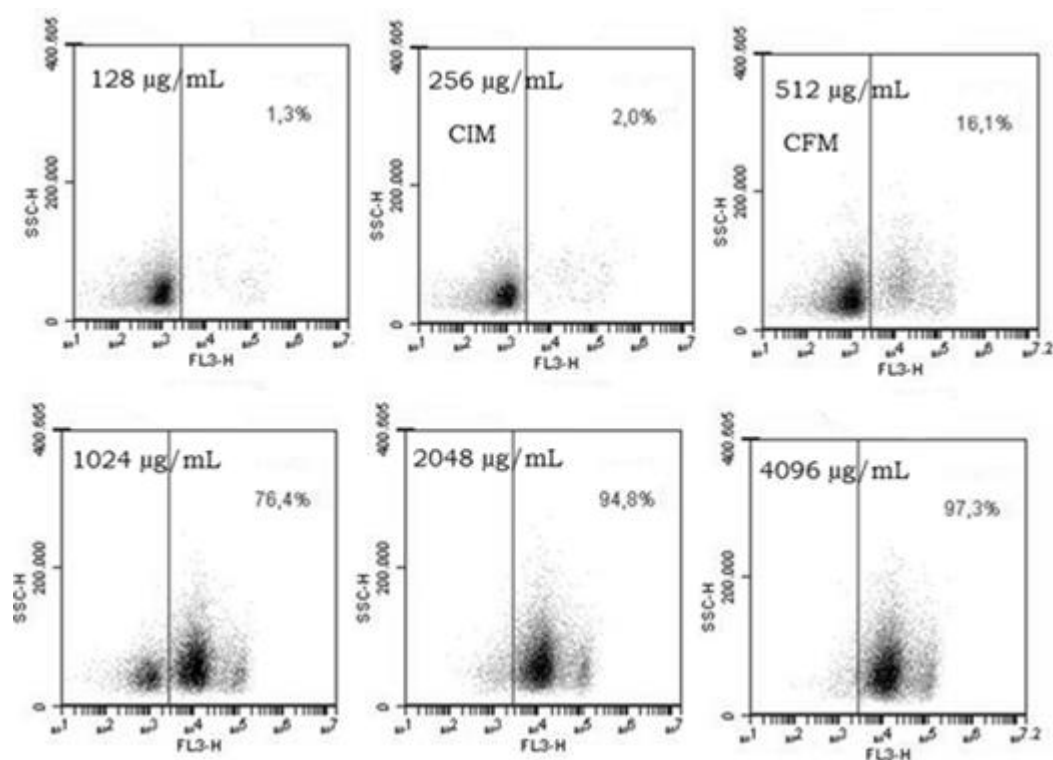


Figura 33- Análise por citometria de fluxo de *C. gattii* ATCC 24065 após a exposição por 1h com diferentes concentrações do OE de *P. graveolens*. As células foram marcadas com PI e analisadas com 10.000 eventos em gráficos de densidade, mostrando granulosidade celular (side scatter-SSC-H) versus fluorescência vermelho (FL3-H). As percentagens de células com lesão de membrana (quadrante à direita) foram determinadas.

O OE de *C. flexuosus* também promoveu lesão de membrana fúngica como mecanismo de ação, mas apenas em concentrações bem acima das CIM e CFM. Em 512 $\mu\text{g/mL}$, 16,2% das células estavam marcadas com PI indicando morte celular, enquanto em 1024 $\mu\text{g/mL}$ 98,6% estavam mortas (Figura 34).

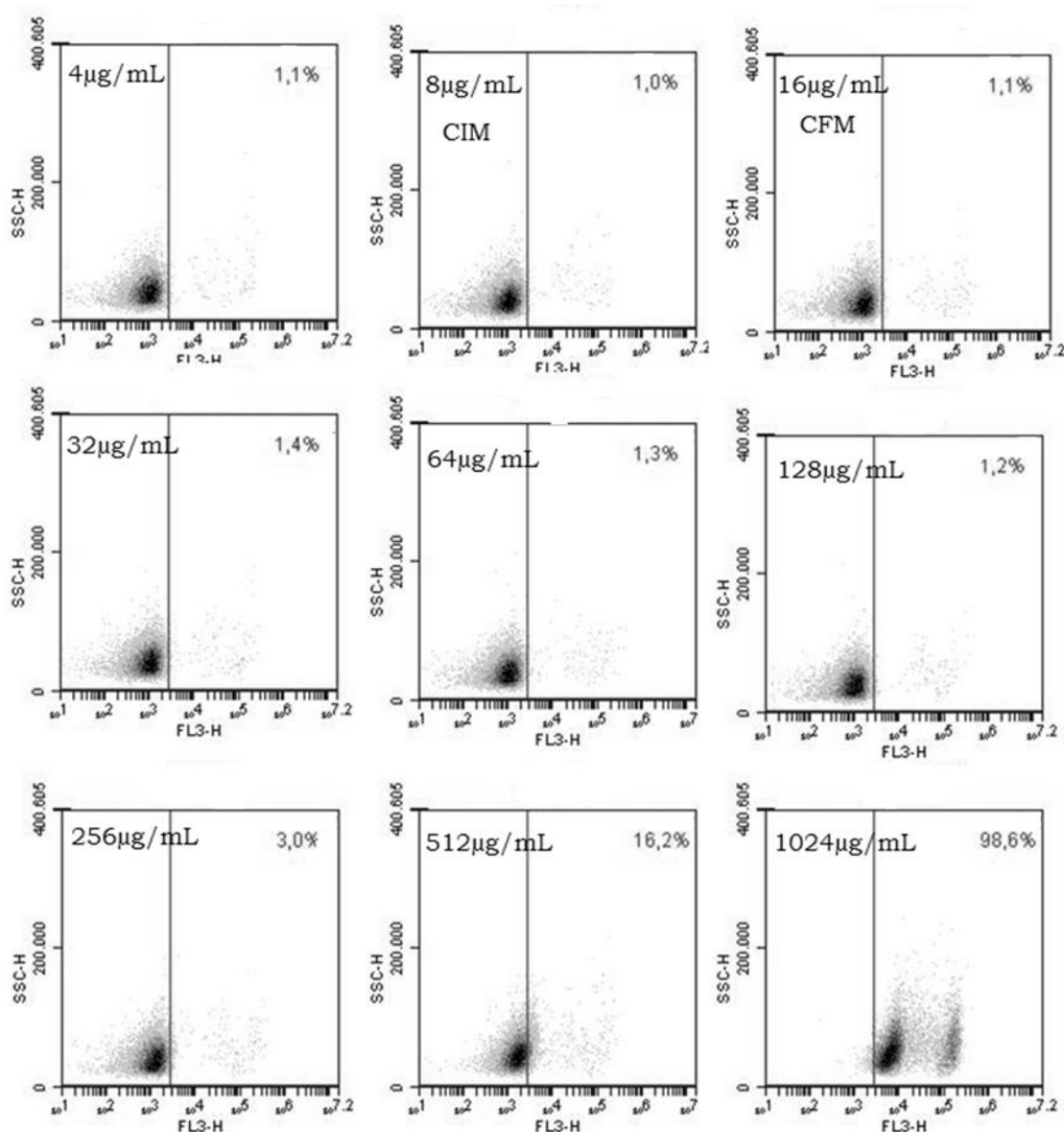


Figura 34- Análise por citometria de fluxo de *C. gattii* ATCC 24065 após a exposição por 1h com diferentes concentrações do OE de *C. flexuosus*. As células foram marcadas com PI e analisadas com 10.000 eventos em gráficos de densidade, mostrando granulosidade celular (side scatter-SSC-H) versus fluorescência vermelho (FL3-H). As percentagens de células com lesão de membrana (quadrante à direita) foram determinadas.

Da mesma forma, o OE de *S. aromaticum* mostrou como mecanismo de ação a lesão da membrana celular, porém apenas na concentração de 4096 µg/mL foi detectada morte celular em 95,2% das células (Figura 35).

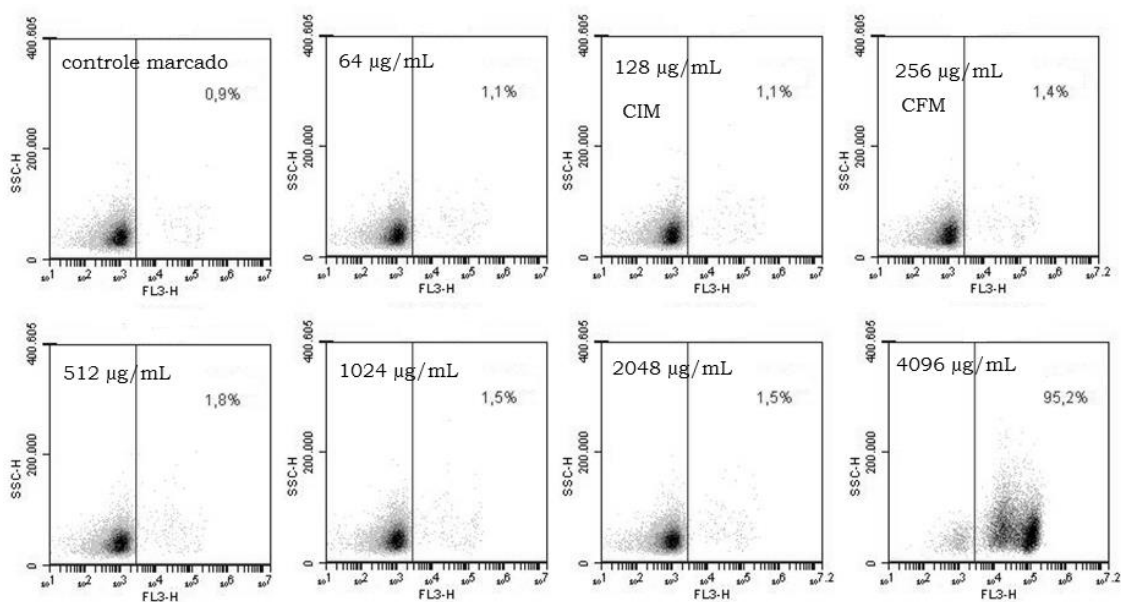


Figura 35- Análise por citometria de fluxo de *C. gattii* ATCC 24065 após a exposição por 1h com diferentes concentrações do OE de *S. aromaticum*. As células foram marcadas com PI e analisadas com 10.000 eventos em gráficos de densidade, mostrando granulosidade celular (side scatter-SSC-H) versus fluorescência vermelho (FL3-H). As percentagens de células com lesão de membrana (quadrante à direita) foram determinadas.

Vários OEs têm atividade antifúngica relatada, sendo o mecanismo de ação relacionado com a lesão da membrana celular. De modo geral, os OEs são tóxicos para os microrganismos devido a seu caráter apolar, que promove danos em suas membranas (Tajkarimi et al. 2010). A internalização do fluorocromo PI, após curtos períodos de incubação (1h), indica que o mecanismo de ação envolve lesão primária da membrana celular fúngica, levando a sua morte (Ahmad et al. 2011b). Pinto et al. (2009) determinaram o mecanismo de ação de *S. aromaticum* no isolado *C. albicans* ATCC 10231, usando o marcador PI. Este fungo foi avaliado em diferentes concentrações do óleo, observando que com apenas 15 minutos de incubação, houve lesão da membrana fúngica na concentração de 2,5 µL/mL (aproximadamente 2500 µg/mL), onde 98,5% das células estavam mortas. Porém na CIM (aproximadamente 640µg/mL) apenas 4,9% das células estavam mortas. Em nossos resultados, a CIM do OE de *S. aromaticum* variou entre 128-256 µg/mL em *Cryptococcus*, mas lesão de membrana foi detectada apenas na concentração de 4096µg/mL. Portanto, comparando com os resultados obtidos

por Pinto et al. (2009), o OE de *S. aromaticum* demonstrou melhor atividade antifúngica em isolados de *Cryptococcus*. No entanto, na análise do mecanismo de ação a lesão de membrana foi observada em concentrações maiores quando comparada com *Candida*. Isto pode ter ocorrido devido uma maior dificuldade na formação de poros ou pela menor penetração do marcador em células de *Cryptococcus*, devido a presença da cápsula polissacarídica

Quando avaliado o seu mecanismo de ação do OE de *Thymus pulegioides* por PI, observou-se que na CFM (0,64 µL/mL, aproximadamente 640µg/mL) com uma incubação de 5 minutos, 95% das células de *C. albicans* ATCC 10231 já se encontravam mortas, devido à lesão da membrana celular (Pinto et al. 2006). Já o OE de *Lavanda multifida*, apesar de causar lesão na membrana celular fúngica, visualizada com PI, foi necessário um período de incubação maior entre a célula e o óleo (3h). Neste caso, a presença de lesão da membrana celular é provavelmente consequência da alteração do metabolismo fúngico. Em nossos resultados, apesar de necessitar altas concentrações para a visualização da lesão na membrana, em um período curto de incubação (1h), todos os OEs apresentaram como mecanismo de ação a formação de poros na membrana celular fúngica.

O FUN-1 é um marcador que avalia a atividade metabólica de leveduras, promovendo a produção de fluorescência vermelha/laranja, captada em FL2. A figura 36 apresenta dots plots com perfil de fluorescência das células de *C. gattii* ATCC 24065 em quatro situações diferentes; autofluorescência (células não marcadas); controle marcado FUN-1 (utilizado como controle de viabilidade) e controle positivo de inibição metabólica (azida e fluconazol). Quando comparada ao controle de viabilidade, a variação da fluorescência, determinada pelo aumento de sua intensidade (%) indica alteração metabólica. A azida sódica aumentou a intensidade de fluorescência em 95,5% enquanto o fluconazol 70,3%, indicando alteração metabólica.

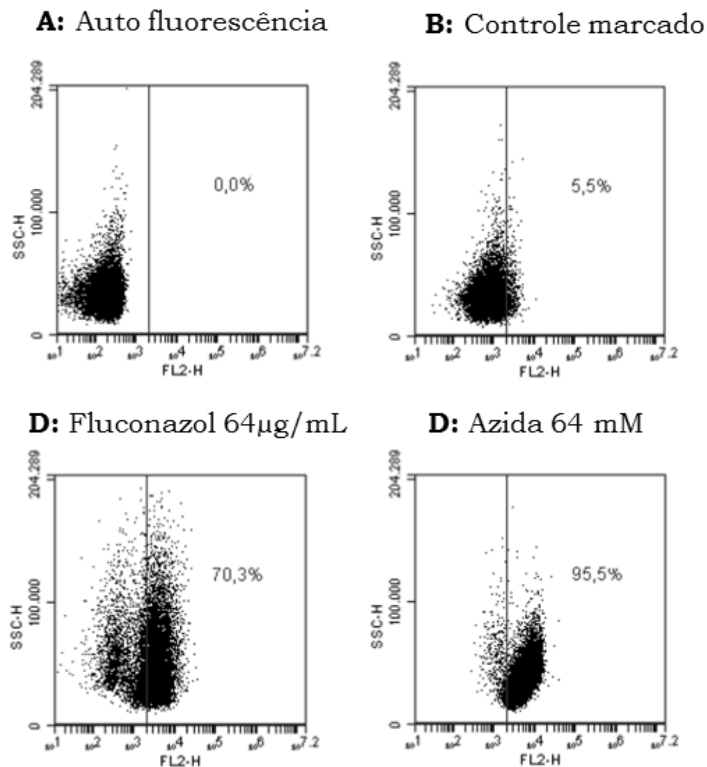


Figura 36- Análise por citometria de fluxo de *C. gattii* ATCC 24065 após a exposição com diferentes agentes. As células foram marcadas com FUN-1 e analisadas com 10.000 eventos em gráficos de densidade, mostrando granulosidade celular (side scatter-SSC-H) versus fluorescência vermelho/alaranjado (FL2-H). As percentagens de células metabolicamente alteradas (quadrante à direita) foram determinadas nas seguintes condições; A) controle de células não marcadas; B) células marcadas, mas não tratadas, representando o controle de viabilidade. C) controle de inibição metabólica fluconazol 64µg/mL; D) controle de inibição metabólica azida 64mM.

Todos os OEs avaliados neste trabalho alteraram de modo significativo o metabolismo celular fúngico, indicado pelo aumento de intensidade de fluorescência em FL2, quando comparado com o controle de viabilidade. A alteração foi observada de forma dose-dependente. O OE de *S aromaticum* na concentração de 1024µg/mL alterou 39,3% das células de *Cryptococcus*, enquanto em 2048µg/mL, mais de 90% das células mostraram alteração em seu metabolismo (Figura 37).

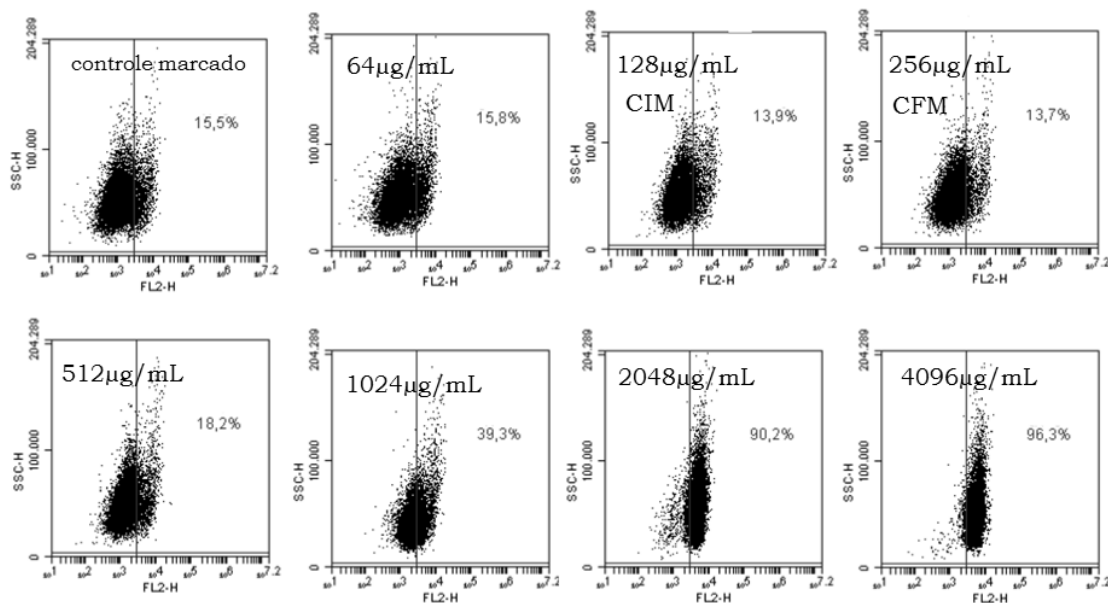


Figura 37- Análise por citometria de fluxo de *C. gattii* ATCC 24065 após a exposição por 1h com diferentes concentrações do OE de *S. aromáticem*. As células foram marcadas com FUN-1 e analisadas com 10.000 eventos em gráficos de densidade, mostrando granulosidade celular (side scatter-SSC-H) versus fluorescência vermelho/alaranjado (FL2-H). As percentagens de células mtabólicamente alteradas (quadrante à direita) foram determinadas.

A partir da CIM o OE de *C. flexuosus* interferiu no metabolismo das células, havendo um aumento progressivo até a concentração de 4096µg/mL, onde 96,3% das células estavam alteradas (Figura 38).

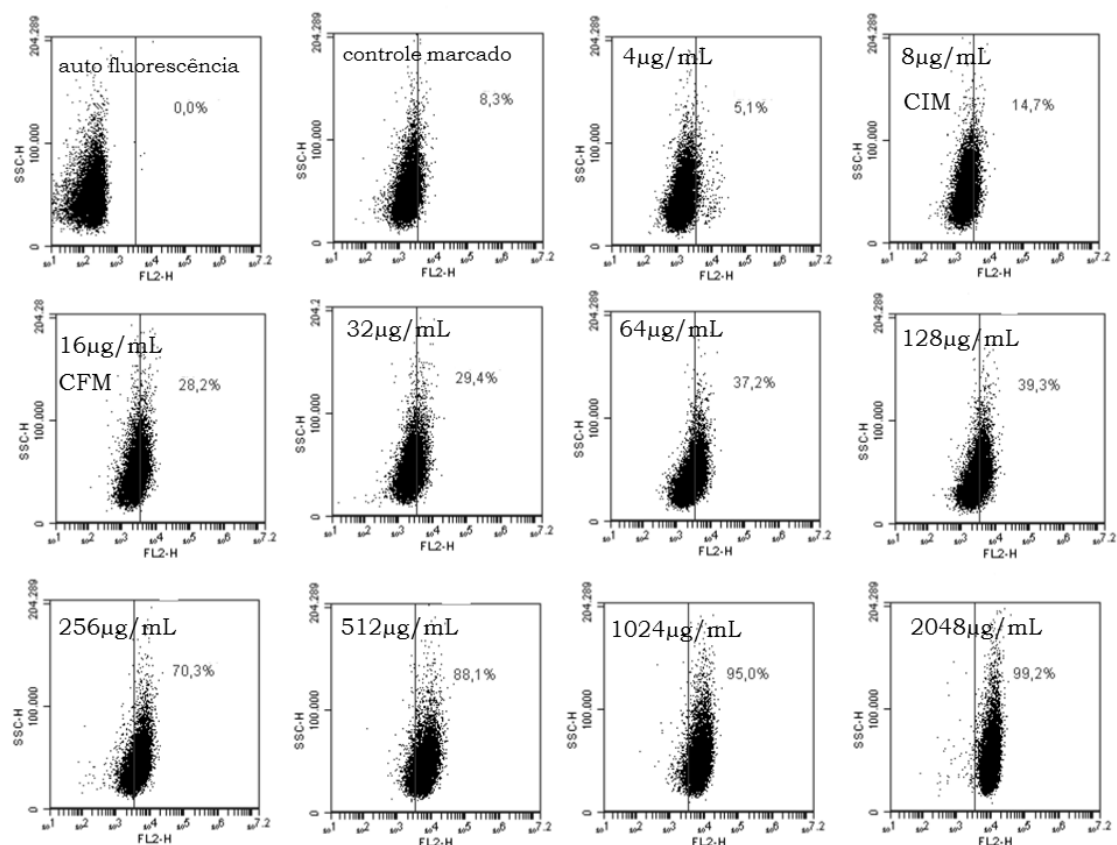


Figura 38- Análise por citometria de fluxo de *C. gattii* ATCC 24065 após a exposição por 1h com diferentes concentrações do OE de *C. flexuosus*. As células foram marcadas com FUN-1 e analisadas com 10.000 eventos em gráficos de densidade, mostrando granulosidade celular (side scatter-SSC-H) versus fluorescência vermelho/alaranjado (FL2-H). As percentagens de células mtabólicamente alteradas (quadrante à direita) foram determinadas.

O OE de *P. graveolens* também alterou o metabolismo fúngico, desde CIM (20,4%), aumentando para 52,6% na CFM e atingindo 95,1% em 4096µg/mL (Figura 39).

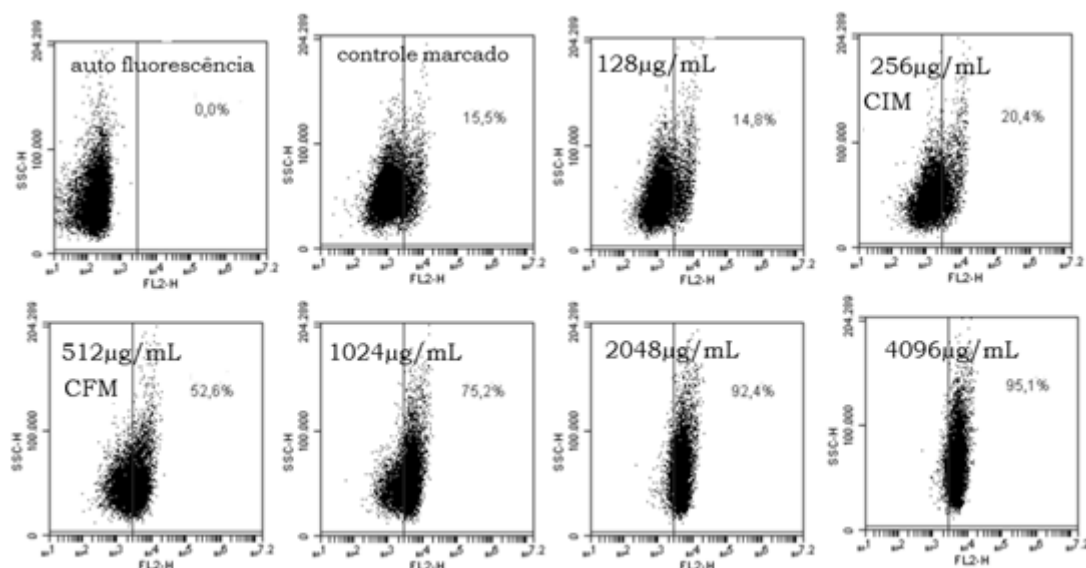


Figura 39- Análise por citometria de fluxo de *C. gattii* ATCC 24065 após a exposição por 1h com diferentes concentrações do OE de *P. graveolens*. As células foram marcadas com FUN-1 e analisadas com 10.000 eventos em gráficos de densidade, mostrando granulosidade celular (side scatter-SSC-H) versus fluorescência vermelho/alaranjado (FL2-H). As percentagens de células metabolicamente alteradas (quadrante à direita) foram determinadas.

Dados da literatura demonstram que na determinação da alteração do metabolismo celular, podem-se encontrar resultados evidenciando tanto o aumento quanto a diminuição da intensidade de fluorescência. Millard et al. (1997) avaliaram a eficácia do FUN-1, na análise do metabolismo de leveduras utilizando *Saccharomyces cerevisiae*. Foi observando que em contato com células metabolicamente viáveis, este marcador penetra no citosol, é metabolizado e assim há a emissão da fluorescência vermelha dentro dos cilindros intravacuolares. Distinguindo das células alteradas, onde há a formação da fluorescência verde difusa (Millard et al. 1997). Ao contrário, Prudencio et al. (1998) observaram que em células com metabolismo alterado, o FUN-1 permanece no citosol celular, emitindo luz vermelho difusa, que apresenta uma intensidade de fluorescência maior, quando comparadas às produzidas pelo cilindros intravacuolares, das células metabolicamente ativas.

Os antifúngicos sintéticos utilizados no tratamento das infecções fúngicas, também demonstram diferentes perfis quando submetidos à marcação pelo FUN-1. A anfotericina B demonstra sua ação na diminuição da intensidade de fluorescência em FL2 (Wenisch et al. 1997, Pina-Vaz et al. 2001b, Parisi-

Duchene et al. 2006), enquanto os derivados azólicos como o voriconazol e o fluconazol, tem sua atividade no metabolismo celular demonstrada por um aumento na intensidade de fluorescência vermelho/laranja(Pina-Vaz et al. 2001, Pina-Vaz et al. 2005). Pina Vaz et al. (Pina-Vaz et al. 2000) verificaram a presença da atividade antifúngica em anestésicos locais como benzidamina, lidocaína e bupivacaina em leveduras do gênero *Candida*, além de determinar também o seu mecanismo de ação. Segundo os autores a ação antimicrobiana se dá inicialmente pela lesão da membrana celular, levando à alteração metabólica, sendo este parâmetro de viabilidade observado pelo aumento em FL2.

Pina-Vaz et al. (2004) buscando um método alternativo para a avaliação da suscetibilidade *in vitro* de OEs (*Thymus vulgaris*, *T. zygis* e *T. mastichina*) em leveduras do gênero *Candida*, usaram a CF com o FUN-1. A determinação da CIM foi observada pelo aumento da intensidade de fluorescência em FL2, quando comparada com o controle de viabilidade (Pina-Vaz et al. 2004). Ao contrário, uma diminuição na intensidade de fluorescência foi observado por Vale-Silva et al. (2010), ao analisar o perfil de alteração metabólica provocado pelo OE de *Thymus x viciosoi* em diferentes concentrações sobre *C. albicans* (Vale-Silva et al. 2010).

Em um estudo mais recente, Vale-Silva et al. (2012) avaliaram o mecanismo de ação do OE de *Origanum vulgare* subsp. *virens* sobre *C. albicans*. À medida que se aumentava a concentração do OE, havia um aumento na inibição metabólica, observada através da diminuição da produção de fluorescência em FL2 (0,32; 0,64; 1,25; 2,5 e 5,0µL/mL). Porém, na última concentração (10µL/mL, aproximadamente 10.000µg/mL), a intensidade de fluorescência ao invés de diminuir, quando comparada com a fluorescência da concentração anterior (5,0µL/mL, aproximadamente 5.000µg/mL), apresentou um grande aumento. Para confirmar este resultado a amostra foi submetida a análise por microscopia de epifluorescência, que permitiu observar uma maior quantidade de fluorescência verde difusa no citosol das células tratadas com 10µL/mL do OE e uma diminuição de estruturas vermelhas cilíndricas intravacuolares. O aumento da fluorescência em FL2 neste caso foi devido à

presença artefatos, frutos do aumento do brilho verde difuso nas células (Vale-Silva et al. 2012).

A determinação da alteração metabólica das células fúngicas produzidas pelo FUN-1, demonstram que resultados diferentes em vários trabalhos. Tanto o aumento da intensidade de fluorescência, quanto a diminuição em FL2 pode ser considerado como indicativo de dano metabólico. Em nossos resultados foi verificado um aumento na intensidade da fluorescência vermelho/laranja, indicando alteração metabólica. Estes dados são semelhantes aos histogramas apresentados nos trabalhos de Pina-Vaz et al. (2000, 2004) citados e na análise da inibição metabólica pela azida sódica (Pina-Vaz et al. 2001, Pina-Vaz et al. 2001b, Pina-Vaz et al. 2005). Provavelmente isto ocorreu devido ao aumento na produção de fluorescência vermelha difusa no citosol, encontrada nas células alteradas metabolicamente (Prudencio et al. 1998).

Neste trabalho foi possível determinar a capacidade dos OEs promoverem alteração no metabolismo celular e atuaram diretamente sobre a estrutura da membrana, levando a morte celular, obtendo assim importantes informações sobre o mecanismo de ação destes OEs sobre as células fúngicas.

5.5 QUANTIFICAÇÃO DO ERGOSTEROL

A fim de determinar a ação do OEs na membrana celular, foi avaliado o efeito destes compostos sobre o conteúdo do ergosterol, principal esterol da membrana fúngica. Isolado de *Cryptococcus gattii* ATCC 24065 foi analisado na presença de concentrações correspondentes a $\frac{1}{2}$ CIM dos OEs, sob a ação do fluconazol como controle positivo nas concentrações de 8, 16 e 32 $\mu\text{g/mL}$ e como controle de crescimento foi avaliado sem tratamento. Como mostrado na tabela 7, apenas o OE de *S. aromaticum* promoveu a inibição da síntese de ergosterol quando comparada ao controle ($p=0,0228$). O crescimento sob a ação de *C. flexuosus* e *P. graveolens* não promoveram alteração na quantidade de esterol presente na membrana de *C. gattii*.

Tabela 7- Inibição da biossíntese do ergosterol de células de *C. gattii* ATCC 24065, expostas aos OEs e fluconazol.

Composto	Quantidade ergosterol* extraídas de <i>Cryptococcus</i>
Controle	0,0120 ± 0,0017 (0%)
<i>P. graveolens</i> 128µg/mL	0,01137 ± 0,001228 (5%)
<i>C. flexuosus</i> 4µg/mL	0,0115 ± 0,001836 (4%)
<i>S. aromaticum</i> 64µg/mL	0,0038 ± 0,001039 (68%)**
Fluconazol	
8µg/mL	0,00293 ± 0,0004978 (75%)**
16µg/mL	0,0015 ± 0,0007638 (87%)**
32µg/mL	(100%)**

*Expressa como a percentagem do peso húmido (média ± desvio) das células, seguido entre parênteses pela redução (%) do ergosterol em comparação com o controle.

**Redução significativa comparada com controle após Teste t de Student

As figuras 40, 41, 42 e 43 mostram respectivamente os perfis espectrofotométricos do fluconazol, *P. graveolens*, *C. flexuosus* e *S. aromaticum* comparadas com o controle de crescimento.

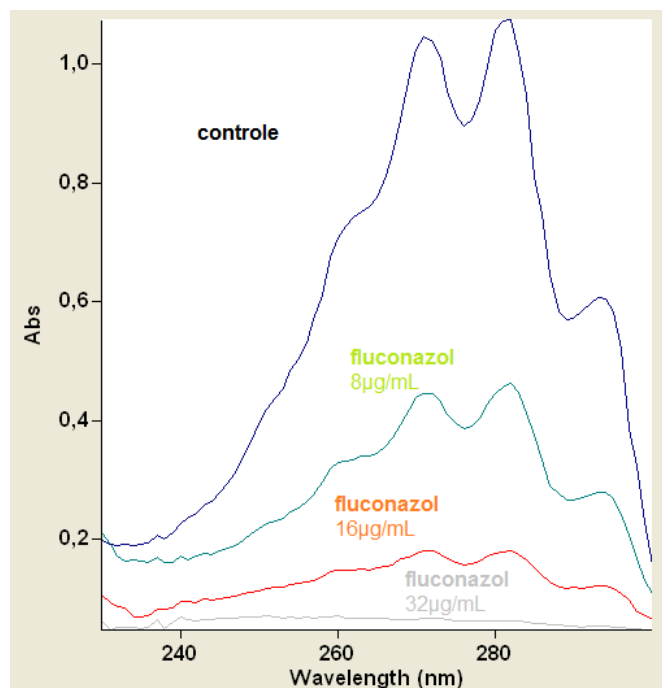


Figura 40- Perfis de esteróis analisados por espectrofotometria UV (230-300nm) de isolados de *Cryptococcus* sem tratamento (controle) e na presença de fluconazol.

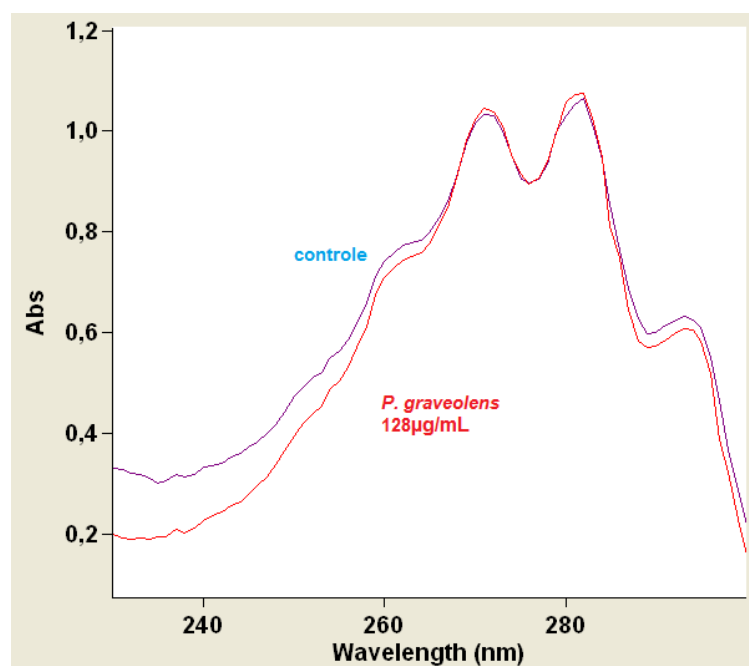


Figura 41- Perfis de esteróis analisados por espectrofotometria UV (230-300nm) de isolados de *Cryptococcus* sem tratamento (controle) e na presença de 64 µg/mL de *P. graveolens*.

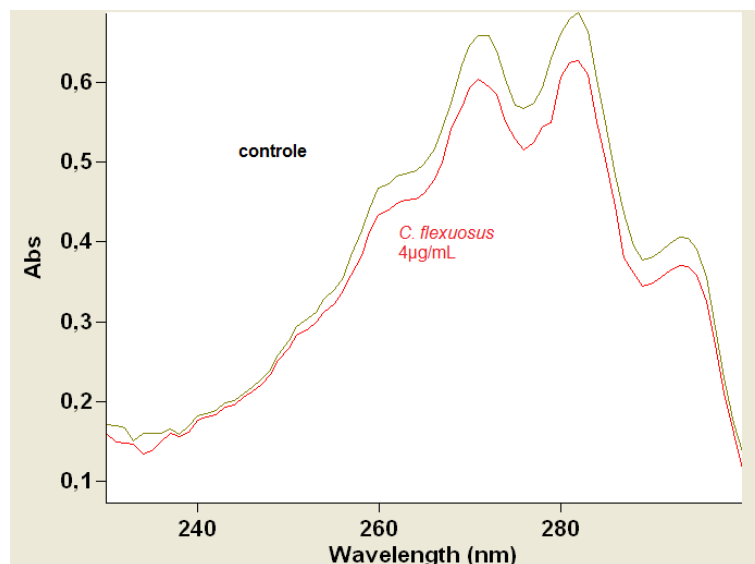


Figura 42- Perfis de esteróis analisados por espectrofotometria UV (230-300nm) de isolados de *Cryptococcus* sem tratamento (controle) e na presença de 128µg/mL de *C. flexuosus*.

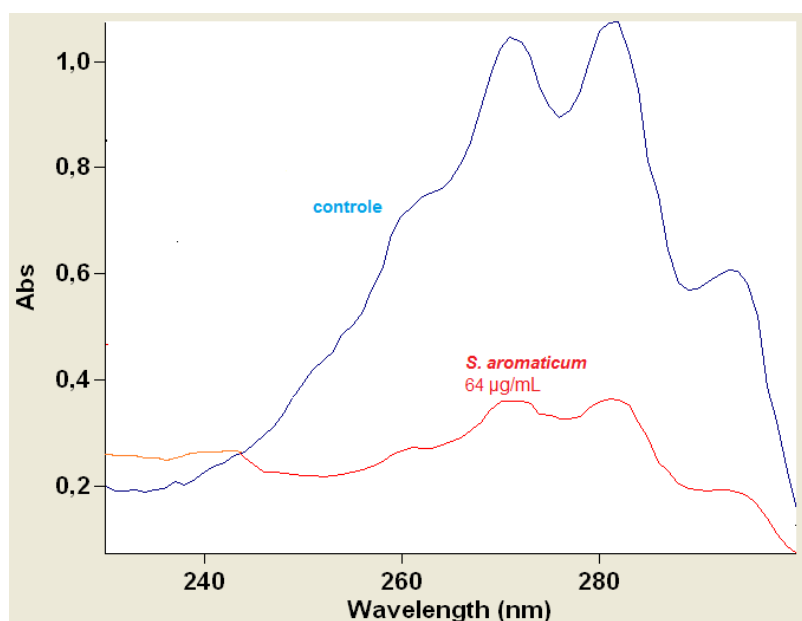


Figura 43- Perfis de esteróis analisados por espectrofotometria UV (230-300nm) de isolados de *Cryptococcus* sem tratamento (controle) e na presença de 4µg/mL de *S. aromaticum*.

O fluconazol é um fármaco fungistático e tem como mecanismo de ação a inibição da síntese do ergosterol da célula fúngica, provocando consequente alteração em sua fluidez e alteração no metabolismo celular (Kathiravan et al. 2012). Em nossos resultados somente o OE de *S. aromaticum* inibiu a síntese de ergosterol, dessa forma seu mecanismo de ação se assemelha ao do

fluconazol. A este fato pode ser acrescentado a alteração metabólica que este OE apresentou quando avaliado por FUN-1. No entanto, *S. aromaticum* induziu também a formação de poros membrana fúngica, mostrando sua ação fungicida, reforçada por valores de CFM próximos ou equivalentes à CIM.

Pinto et al. (2009) determinaram a inibição da formação de ergosterol pelo OE de *S. aromaticum* em *C. albicans*, da mesma forma que Ahmad et al. (2009) correlacionaram o eugenol, principal constituinte do OE de *S. aromaticum*, como um potente inibidor da cascata biossintética deste esterol (Ahmad et al. 2010). Vários outros estudos determinaram como mecanismo de ação de OEs e alguns compostos voláteis a inibição do ergosterol, sendo que em sua estrutura química, seja dos compostos isolados ou do principal constituinte dos OEs, havia como semelhança, moléculas de baixo peso molecular e a presença de um anel aromático, podendo este estar relacionado com a atividade farmacológica (Ahmad et al. 2010, Khan et al. 2010, Shreaz et al. 2011, Ahmad et al. 2011a, Shreaz et al. 2011b).

No estudo do mecanismo de ação dos OEs, podemos concluir que o OE de *S. aromaticum* promoveu alteração do metabolismo celular da mesma forma que danificou a membrana celular fúngica, lesionando-a e diminuindo a quantidade do ergosterol, um importante constituinte. Já os OEs de *P. graveolens* e *C. flexuosus* foram capazes de alterar o metabolismo fúngico e promover lesão na membrana celular fúngica.

Após a análise dos resultados obtidos a partir da metodologia deste trabalho, podemos concluir que os OEs de *P. graveoles*, *S. aromaticum* e *C. flexuosus* se mostraram com potencial de se tornarem novos fármacos antifúngicos. Foi possível determinar a atividade antifúngica e baixa toxicidade *in vitro* destes produtos naturais e devido a isso, estudos futuros são encorajados. A estrutura química dos principais componentes dos OEs pode ser ponto de partida para o desenho de protótipos na construção de novas moléculas, assim como a avaliação da atividade biológica por testes *in vivo* e estudos de farmacotécnicos, contribuindo na descoberta de novas moléculas antifúngicas.

6 CONCLUSÕES

1. Foi possível identificar 18 componentes do OE de *P. graveolens*, 12 de *C. flexuosus* e 4 de *S. aromaticum*. Como principal componente foi detectado o citrionelol (*P. graveolens*), citral (*C. flexuosus*) e eugenol (*S. aromaticum*).
2. Os 3 OEs demonstraram atividade antifúngica sobre todos os isolados de *Cryptococcus*. Os CIMs variaram entre 8 a 256µg/mL, sendo que *C. flexuosus* obteve menores valores de inibição (8-32µg/mL).
3. Valores de CFM dos OEs avaliados foram em sua maioria iguais a 2 vezes a CIM.
4. Os OEs apresentaram atividade citotóxica nas células da linhagem L929 de fibroblastos em concentrações maiores que a CIM.
5. No estudo do mecanismo de ação dos 3 OEs sobre *Cryptococcus*, foi possível detectar como forma de dano celular a lesão da membrana fúngica.
6. Todos os OEs avaliados provocaram alteração no metabolismo fúngico, de forma dose dependente.
7. Na quantificação do ergosterol, foi possível observar que apenas o OE de *S. aromaticum* diminuiu a quantidade deste esterol na membrana celular, promovendo alteração na funcionalidade celular.

REFERÊNCIAS

- Abe S, Maruyama N, Hayama K, Inouye S, Oshima H, Yamaguchi H. Suppression of neutrophil recruitment in mice by geranium essential oil. *Mediators of Inflammation* 13 (1): 21-4, 2004.
- Adorjan B, Buchbauer G. Biological properties of essential oils: an updated review. *Flavour and Fragrance Journal* 25 (6): 407-426, 2010.
- Adukwu EC, Allen SCH, Phillips CA. The anti-biofilm activity of lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*) and grapefruit (*Citrus paradisi*) essential oils against five strains of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Applied Microbiology* 113: 1217-1227, 2012.
- Ahmad A, Khan A, Akhtar F, Yousuf S, Xess I, Khan LA, Manzoor N. Fungicidal activity of thymol and carvacrol by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 30: 41-50, 2011a.
- Ahmad A, Khan A, Kumar P, Bhatt RP, Manzoor N. Antifungal activity of *Coriaria nepalensis* essential oil by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*. *Yeast* 28 (8): 611-617, 2011b.
- Ahmad A, Khan A, Manzoor N, Khan LA. Evolution of ergosterol biosynthesis inhibitors as fungicidal against *Candida*. *Microbial Pathogenesis* 48 35-41, 2010.
- Akhila A, *Essential Oil-Bearing Grasses: The Genus Cymbopogon* 2010.
- Alvarez-Barrientos A, Arroyo J, Canton R, Nombela C, Sanchez-Perez M. Applications of flow cytometry to clinical microbiology. *Clinical Microbiology Reviews* 13 (2): 167-95, 2000.
- Arif T, Bhosale JD, Kumar N, Mandal TK, Bendre RS, Lavekar GS, Dabur R. Natural products--antifungal agents derived from plants. *Journal of Asian Natural Product Res* 11 (7): 621-38, 2009.
- Arthington-Skaggs BA, Jradi H, Desai T, Morrison CJ. Quantitation of ergosterol content: Novel method for determination of fluconazole susceptibility of *Candida albicans*. *Journal of Clinical Microbiology* 37 (10): 3332-3337, 1999.
- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Waomar M. Biological effects of essential oils - A review. *Food and Chemical Toxicology* 46 (2): 446-475, 2008.
- Baltrop JA, Owen TC. 5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethylthiazolyl)-3-(-4-sulphophenyl) tetrazolium, inner salt (MTS) and related analogs of 3-(4,5-dimethnthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reducing to purple water-soluble formazans as cell-viability indicators *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 1 (1): 611-614, 1991.
- Baratta MT, Dorman HJD, Deans SG, Figueiredo AC, Barroso JG, Ruberto G. Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. *Flavour and Fragrance Journal* 13 (4): 235-244, 1998.

- Barbosa JMM, Costa-De-Oliveira S, Rodrigues AG, Hanscheid T, Shapiro H, Pina-Vaz C. A flow cytometric protocol for detection of *Cryptosporidium* spp. *Cytometry Part A* 73A (1): 44-47, 2008.
- Bard M, Lees ND, Burrows LS, Kleinhans FW. Differences in crystal violet uptake and cation-induced death among yeast sterol mutants. *Journal of Bacteriology* 135: 1146–1148, 1983.
- Barnett JA. A history of research on yeasts 14: medical yeasts part 2, *Cryptococcus neoformans*. *Yeast* 27 (11): 875-904, 2010.
- Bartlett KH, Cheng PY, Duncan C, Galanis E, Hoang L, Kidd S, Lee MK, Lester S, MacDougall L, Mak S, Morshed M, Taylor M, Kronstad J. A decade of experience: *Cryptococcus gattii* in British Columbia. *Mycopathologia* 173 (5-6): 311-9, 2012.
- Bassolé IHN, Juliani HR. Essential Oils in Combination and Their Antimicrobial Properties. *Molecules* 17: 3989-4004, 2012.
- Bivanco FC, Machado CAS, Martins EL. Cutaneous cryptococcosis. *Arquivos Médicos ABC* 31: 7, 2006
- Boukhris M, Bouaziz M, Feki I, Jemai H, El Feki A, Sayadi S. Hypoglycemic and antioxidant effects of leaf essential oil of *Pelargonium graveolens* L'Her. in alloxan induced diabetic rats. *Lipids and Healthy Disease* 11: 81, 2012b.
- Boukhris M, Simmonds MSJ, Sayadi S, Bouaziz M. Chemical composition and biological activities of polar extracts and essential oil of rose-scented geranium, *Pelargonium graveolens*. *Phytotherapy Research*: 2012a.
- Bovers M, Hagen F, Boekhout T. Diversity of the *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* species complex. *Revista Iberoamericana de Micologia* 25 (1): S4-12, 2008.
- Brummer E. Human defenses against *C. neoformans*. *Mycopathologia* 143: 121-125, 1999.
- Buchanan KL, Murphy JW. What makes *Cryptococcus neoformans* a pathogen? *Emerging Infectious Disease* 4 (1): 71-83, 1998.
- Byrnes EJ, Bartlett KH, Perfect JR, Heitman J. *Cryptococcus gattii*: an emerging fungal pathogen infecting humans and animals. *Microbes and Infection* 13 (11): 895-907, 2011.
- Caballero-Gallardo K, Olivero-Verbel J, Stashenko EE. Repellency and toxicity of essential oils from *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon flexuosus* and *Lippia origanoides* cultivated in Colombia against *Tribolium castaneum*. *Journal of Stored Products Research* 50: 62-65, 2012.
- Cannon RD, Lamping E, Holmes AR, Niimi K, Baret PV, Keniya MV, Tanabe K, Niimi M, Goffeau A, Monk BC. Efflux-Mediated Antifungal Drug Resistance. *Clinical Microbiology Reviews* 22 (2): 291+, 2009.
- Canuto MM, Gutierrez F. Antifungal drug resistance to azoles and polyenes. *Lancet Infectious Diseases* 2 (9): 550-563, 2002.

- Carlson LHC, Machado RAF, Spricigo CB, Pereira LK, Bolzan A. Extraction of lemongrass essential oil with dense carbon dioxide. *Journal of Supercritical Fluids* 21 (1): 33-39, 2001.
- Carrillo-Muñoz AJ, Giusiano G, Ezkurra PA, Quindós G. Antifungal agents: Mode of action in yeast cells. *Revista Española de Quimioterapia* 19 (2): 130-139, 2006.
- Casadevall A. Determinants of virulence in the pathogenic fungi. *Fungal Biology Reviews* 21 (4): 130-132, 2007.
- Casadevall A, Pirofski LA. Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infection and Immunity* 67 (8): 3703-13, 1999.
- Casadevall A, Steenbergen JN, Nosanchuk JD. 'Ready made' virulence and 'dual use' virulence factors in pathogenic environmental fungi--the *Cryptococcus neoformans* paradigm. *Current Opinion in Microbiology* 6 (4): 332-7, 2003.
- Cavar SE, Maksimovic M. Antioxidant activity of essential oil and aqueous extract of *Pelargonium graveolens* L'Her. *Food Control* 23 (1): 263-267, 2012.
- Chaieb K, Hajlaoui H, Zmantar T, Ben Kahla-Nakbi A, Rouabhia M, Mahdouani K, Bakhrouf A. The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzigium aromaticum* L. myrtaceae): A short review. *Phytotherapy Research* 21 (6): 501-506, 2007.
- Chaturvedi V. The role of flow cytometry in medical mycology. *Current Fungal Infection Reports* 2: 143-148, 2008.
- Chaturvedi V, Chaturvedi S. *Cryptococcus gattii*: a resurgent fungal pathogen. *Trends in Microbiology* 19 (11): 564-571, 2011.
- Chaturvedi V, Ramani R, Pfaller MA. Collaborative study of the NCCLS and flow cytometry methods for antifungal susceptibility testing of *Candida albicans*. *Journal of Clinical Microbiology* 42 (5): 2249-51, 2004.
- Chayakulkeeree M, Perfect JR. Cryptococcosis. *Infectious Disease Clinics of North America* 20 (3): 507-44, v-vi, 2006.
- Chayakulkeeree M, Perfect JR, *Diagnosis and Treatment of Human Mycoses in Cryptococcosis*. 2008, Humana Press Inc.
- Chen S, Williamson PR. Lessons from Cryptococcal Laccase: From Environmental Saprophyte to Pathogen. *Current Fungal Infection Reports* 5: 233-244, 2011.
- Chen SC, Sorrell TC. Antifungal agents. *Medical Journal of Australia* 187 (7): 404-9, 2007.
- Chen W, Viljoen AM. Geraniol - A review of a commercially important fragrance material. *South African Journal of Botany* 76 (4): 643-651, 2010.
- Clardy J, Walsh C. Lessons from natural molecules. *Nature* 432 (7019): 829-837, 2004.

- CLSI CLSI. *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts M27-A2*, Wayne: 2002.
- CLSI CLSI. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts M27-A3*, 2008.
- Cohen BE. Amphotericin B membrane action: role for two types of ion channels in eliciting cell survival and lethal effects. *J Membr Biol* 238 (1-3): 1-20, 2010.
- Cordell GA, Colvard MD. Some thoughts on the future of ethnopharmacology. *Journal of Ethnopharmacology* 100 (1-2): 5-14, 2005.
- Correa CL, Leminica IP, Zambrone FAD, Camargo JLV, *Bases científicas para avaliação da toxicidade de agrotóxicos*, I.-B.-I.L.S.I. Brasil, Editor. 2009: São Paulo.
- Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* 12 (4): 564-+, 1999.
- Czechowska K, Johnson DR, van der Meer JR. Use of flow cytometric methods for single-cell analysis in environmental microbiology. *Current Opinion in Microbiology* 11 (3): 205-212, 2008.
- Davey HM. Flow cytometric techniques for the detection of microorganisms. *Methods in Cell Science* 24 (1-3): 91-7, 2002.
- De Logu A, Saddi M, Cardia MC, Borgna R, Sanna C, Saddi B, Maccioni E. In vitro activity of 2-cycohexylidenhydrazo-4-phenyl-thiazole compared with those of amphotericin B and fluconazole against clinical isolates of *Candida* spp. and fluconazole resistant *Candida albicans*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 55: 692-698, 2005.
- Desai MA, Parikh J. Hydrotropic Extraction of Citral from *Cymbopogon flexuosus* (Steud.) Wats. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 51 (9): 3750-3757, 2012.
- Dewick PM, ed. *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*. 3 ed. 2009, John Wiley & Sons.
- Diaz M, Herrero M, Garcia LA, Quiros C. Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses. *Biochemical Engineering Journal* 48 (3): 385-407, 2010.
- Dobetsberger C, Buchbauer G. Actions of essential oils on the central nervous system: An updated review. *Flavour and Fragrance Journal* 26 (5): 300-316, 2011.
- Dorman HJD, Surai P, Deans SG. In vitro antioxidant activity of a number of plant essential oils and phytoconstituents. *Journal of Essential Oil Research* 12 (2): 241-248, 2000.
- Evans WC, ed. *Trease and Evans Pharmacognisys* Saunders ed. Vol. 15. 2008.
- Fayed AS. Antioxidant and Anticancer Activities of Citrus reticulate (*Petitgrain Mandarin*) and *Pelargonium graveolens* (Geranium) Essential Oils. *Journal of Agriculture and Biological Sciences* 5 (5): 740-747, 2009.

- Filho CA, Silva CM, Quadri MB, Macedo EA. Tracer diffusion coefficients of citral and D-limonene in supercritical carbon dioxide. *Fluid Phase Equilibria* 204 (1): 65-73, 2003.
- Freire MM, Jham GN, Dhingra OD, Jardim CM, Barcelos RC, Valente VMM. Composition, antifungal activity and main fungitoxic components of the essential oil of *Mentha piperita*. *Journal of Food Safety*: 2011.
- Freshney RI, ed. *Culture of animal cells: a manual of basic technique*. 5 ed. 2005, Wilwy.
- Friedman M, Henika PR, Mandrell RE. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. *Journal of Food Protection* 65 (10): 1545-1560, 2002.
- Galanis E, MacDougall L. Epidemiology of *Cryptococcus gattii*, British Columbia, Canada, 1999-2007 (vol 16, pg 251, 2010). *Emerging Infectious Diseases* 16 (4): 750-750, 2010.
- Gayoso CW, Lima EO, Oliveira VT, Pereira FO, Souza EL, Lima IO, Navarro DF. Sensitivity of fungi isolated from onychomycosis to *Eugenia caryophyllata* essential oil and eugenol. *Fitoterapia* 76 (2): 247-249, 2005.
- Ghannadi A, Bagherinejad M, Abedi D, Jalali M, Absalan B, Sadeghi N. Antibacterial activity and composition of essential oils from *Pelargonium graveolens* L'Her and *Vitex agnus-castus* L. *Iran J Microbiol* 4 (4): 171-6, 2012.
- Ghannoum MA. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clinical Microbiology Reviews* 13 (1): 122-+, 2000.
- Gobbo-Neto L, Lopes NP. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova* 30 (2): 374-381, 2007.
- Gomes PB, Mata VG, Rodrigues AE. Production of rose geranium oil using supercritical fluid extraction. *Journal of Supercritical Fluids* 41 (1): 50-60, 2007.
- Guenette SA, Beaudry F, Marier JF, Vachon P. Pharmacokinetics and anesthetic activity of eugenol in male Sprague-Dawley rats. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 29 (4): 265-270, 2006.
- Gulluce M, Aslan A, Sokmen M, Sahin F, Adiguzel A, Agar G, Sokmen A. Screening the antioxidant and antimicrobial properties of the lichens *Parmelia saxatilis*, *Platismatia glauca*, *Ramalina pollinaria*, *Ramalina polymorpha* and *Umbilicaria nylanderiana*. *Phytomedicine* 13 (7): 515-521, 2006.
- Hadacek F, Greger H. Testing of antifungal natural products: Methodologies, comparability of results and assay choice. *Phytochemical Analysis* 11 (3): 137-147, 2000.
- Halder S, Mehta AK, Mediratta PK, Sharma KK. Essential Oil of Clove (*Eugenia caryophyllata*) augments the Humoral Immune Response but Decreases Cell Mediated Immunity. *Phytotherapy Research* 25 (8): 1254-1256, 2011.
- Heitman J. Microbial Pathogens in the Fungal Kingdom. *Fungal Biol Rev* 25 (1): 48-60, 2011.

- Hsouna AB, Hamdi N. Phytochemical composition and antimicrobial activities of the essential oils and organic extracts from *Pelargonium graveolens* growing in Tunisia. *Lipids Health Dis* 11: 167, 2012.
- Ibrahim SF, Engh G. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. *Flow Cytometry and Cell Sorting* 106: 13-39, 2007.
- Ikeda R, Sugita T, Jacobson ES, Shinoda T. Laccase and melanization in clinically important *Cryptococcus* species other than *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Clinical Microbiology* 40 (4): 1214-1218, 2002.
- Inouye S, Takizawa T, Yamaguchi H. Antibacterial activity of essential oil and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *Journal of Antimicrobials and Chemotherapy* 47: 565–573, 2001.
- Iscan G, Kirimer N, Kurkcuglu M, Baser KH, Demirci F. Antimicrobial screening of *Mentha piperita* essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (14): 3943-6, 2002.
- Jayasinha P, ed. *Lemongrass (Cymbopogon)*. ed. M.a.A.P. Series. Vol. 9. 1999, Industrial Technology Institute, Sri Lanka.
- Kathiravan MK, Salake AB, Chothe AS, Dudhe PB, Watode RP, Mukta MS, Gadhwe S. The biology and chemistry of antifungal agents: A review. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 20 (19): 5678-5698, 2012.
- Kawakami K. Role of natural killer T cells in host defence against cryptococcal infection. *Revista Iberoamericana de Micologia* 19 (3): 149-54, 2002.
- Khan A, Ahmad A, Akhtar F, Yousuf S, Xess I, Khan LA, Manzoor N. *Ocimum sanctum* essential oil and its active principles exert their antifungal activity by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity. *Research in Microbiology* 161: 816-823, 2010.
- Khan MSA, Ahmad I. Antifungal activity of essential oils and their synergy with fluconazole against drug-resistant strains of *Aspergillus fumigatus* and *Trichophyton rubrum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 90 (3): 1083-1094, 2011.
- Khanuja SPS, Shasany AK, Pawar A, Lal RK, Darokar MP, Naqvi AA, Rajkumar S, Sundaresan V, Lal N, Kumar S. Essential oil constituents and RAPD markers to establish species relationship in *Cymbopogon* Spreng. (Poaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 33 (2): 171-186, 2005.
- Komori T, Fujiwara R, Tanida M, Nomura J. Potential Antidepressant Effects of Lemon Odor in Rats. *European Neuropsychopharmacology* 5: 477-479, 1995.
- Kontoyiannis DP, Lewis RE. Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. *THE LANCET* 359: 2002.
- Kouidhi B, Zmantar T, Bakhrouf A. Anticariogenic and cytotoxic activity of clove essential oil (*Eugenia caryophyllata*) against a large number of oral pathogens. *Annals of Microbiology* 60 (4): 599-604, 2010.

- Kozubowski L, Heitman J. Profiling a killer, the development of *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Microbiology Reviews* 36 (78-94): 2002.
- Kronstad JW, Attarian R, Cadieux B, Choi J, D'Souza CA, Griffiths EJ, Geddes JMH, Hu GG, Jung WH, Kretschmer M, Saikia S, Wang J. Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. *Nature Reviews Microbiology* 9 (3): 193-203, 2011.
- Kumar A, Shukla R, Singh P, Dubey NK. Biodeterioration of some herbal raw materials by storage fungi and aflatoxin and assessment of *Cymbopogon flexuosus* essential oil and its components as antifungal. *International Biodeterioration & Biodegradation* 63 (6): 712-716, 2009.
- Lang G, Buchbauer G. A review on recent research results (2008–2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review. *Flavour and Fragrance Journal* 27 (13-39): 2011.
- Lass-Flörl C, Perkhofer S, Mayr A. In vitro susceptibility testing in fungi: a global perspective on a variety of methods. *Mycoses* 53: 1-11, 2009.
- Lee KG, Shibamoto T. Antioxidant property of aroma extract isolated from clove buds [*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. et Perry]. *Food Chemistry* 74 (4): 443-448, 2001.
- Leimann BCQ, Koifman RJ. Cryptococcal meningitis in Rio de Janeiro State, Brazil, 1994-2004. *Caderno de Saúde Pública* 24 (11): 2582-2592, 2008.
- Lemke A, Kiderlen A, Kayser O. Amphotericin B. *Applied Microbiology and Biotechnology* 68 (2): 151-162, 2005.
- Lemos JD, Passos XS, Fernandes ODL, de Paula JR, Ferri PH, Souza LKHE, Lemos AD, Silva MDR. Antifungal activity from *Ocimum gratissimum* L. towards *Cryptococcus neoformans*. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 100 (1): 55-58, 2005.
- Li SS, Mody CH. *Cryptococcus*. *Proceedings of the American Thoracic Society* 7: 186-196, 2010.
- Lin X. *Cryptococcus neoformans*: morphogenesis, infection, and evolution. *Infection, Genetics and Evolution* 9 (4): 401-16, 2009.
- Lin X, Heitman J. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *Annual Review of Microbiology* 60: 69-105, 2006.
- Lis-Balchin M, Deans SG. Antimicrobial effects of hydrophilic extracts of *Pelargonium* species (Geraniaceae). *Letters in Applied Microbiology* 23: 205-207, 1996.
- Liu M, Seidel V, Katerere DR, Gray AI. Colorimetric broth microdilution method for the antifungal screening of plant extracts against yeasts. *Methods* 42 (4): 325-329, 2007.
- Liu X, Ling ZX, Li LJ, Ruan B. Invasive fungal infections in liver transplantation. *International Journal of Infectious Diseases* 15 (5): E298-E304, 2011.
- Lorenzi V, Muselli A, Bernardini A. Geraniol restores antibiotic activities against multidrug-resistant isolates from gram-negative species. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 53: 2209–2211, 2009.

- Ma H, May RC. Virulence in *Cryptococcus* species. *Advances in Applied Microbiology* 67: 131-90, 2009.
- Machado M, Dinis AM, Salgueiro L, Custodio JBA, Cavaleiro C, Sousa MC. Anti-Giardia activity of *Syzygium aromaticum* essential oil and eugenol: Effects on growth, viability, adherence and ultrastructure. *Experimental Parasitology* 127 (4): 732-739, 2011.
- Maciel MAM, Pinto AC, Veiga JVF, Grynberg NF. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova* 25: 2002.
- Maruyama N, Ishibashi H, Hu W. Suppression of carrageenan and collagen II-induced inflammation in mice by geranium oil
Mediators of Inflammation 53: 625–637, 2006.
- Mativandlela SPN, Lall N, Meyer JJM. Antibacterial, antifungal and antitubercular activity of (the roots of) *Pelargonium reniforme* (CURT) and *Pelargonium sidoides* (DC) (Geraniaceae) root extracts. *South African Journal of Botany* 72 (2): 232-237, 2006.
- McChesney JD, Venkataraman SK, Henri JT. Plant natural products: Back to the future or into extinction? *Phytochemistry* 68: 2015–2022, 2007.
- Millard PJ, Roth BL, Thi HPT, Yue ST, Haugland RP. Development of the FUN-1 family of fluorescent probes for vacuole labeling and viability testing of yeasts. *Applied and Environmental Microbiology* 63 (7): 2897-2905, 1997.
- Miller DM, *Medicinal and aromatic plants-industrial profiles*, in *The taxonomy of Pelargonium species and cultivars, their origins and growth in the wild. Geranium and Pelargoniums*, M. Lis-Balchin, Editor. 2002, Taylor and Francis: London.
- Miller JS, Quarles JM. Flow Cytometric Identification of Microorganisms by Dual Staining with Fitch and Pi. *Cytometry* 11 (6): 667-675, 1990.
- Monari C, Paganelli F, Bistoni F, Kozel TR, Vecchiarelli A. Capsular polysaccharide induction of apoptosis by intrinsic and extrinsic mechanisms. *Cellular Microbiology* 10 (10): 2129-37, 2008.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival, application to proliferation and cytotoxicity assay. *Journal of Immunological Methods* 65: 55–63, 1983.
- Mulyaningsih S, Sporer F, Zimmermann S, Reichling J, Wink M. Synergistic properties of the terpenoids aromadendrene and 1,8-cineole from the essential oil of *Eucalyptus globulus* against antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant pathogens. *Phytomedicine* 17 (13): 1061-6, 2010.
- Nangle MR, Gibson TM, Cotter MA, Cameron NE. Effects of eugenol on nerve and vascular dysfunction in streptozotocin-diabetic rats. *Planta Medica* 72 (6): 494-500, 2006.

- Natha SC, Sarma KK, Vajezikova I, Leclercq PA. Comparison of volatile inflorescence oils and taxonomy of certain *Cymbopogon* taxa described as *Cymbopogon flexuosus* (Nees ex Steud.) Wats. *Biochemical Systematics and Ecology*. 30 (151-162): 2002.
- Neofytos D, Fishman JA, Horn D, Anaissie E, Chang CH, Olyaei A, Pfaller M, Steinbach WJ, Webster KM, Marr KA. Epidemiology and outcome of invasive fungal infections in solid organ transplant recipients. *Transplant Infectious Disease* 12: 220-229, 2010.
- Noumi E, Snoussi M, Hajlaoui H, Trabelsi N, Ksouri R, Valentin E, Bakhrouf A. Chemical composition, antioxidant and antifungal potential of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) and *Eucalyptus globulus* essential oils against oral *Candida* species. *Journal of Medicinal Plants Research* 5 (17): 4147-4156, 2011.
- Nucci M, Queiroz-Telles F, Tobon AM, Restrepo A, Colombo AL. Epidemiology of Opportunistic Fungal Infections in Latin America. *Clinical Infectious Diseases* 51 (5): 561-570, 2010.
- Nzeako BC, Lawati BA. Comparative studies of antimycotic potential of thyme and clove oil extracts with antifungal antibiotics on *Candida albicans*. *African Journal of Biotechnology* 7 (11): 1612-1619, 2008.
- Odom A, Muir S, Lim E, Toffaletti DL, Perfect J, Heitman J. Calcineurin is required for virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Embo Journal* 16 (10): 2576-2589, 1997.
- Oke F, Aslim B. Biological potentials and cytotoxicity of various extracts from endemic *Origanum minutiflorum* O. Schwarz & PH Davis. *Food and Chemical Toxicology* 48 (6): 1728-1733, 2010.
- Ottavioli J, Bighelli A, Casanova J, Bui TB, Pham VY. GC(Retention Indices), GC-MS, and ¹³C NMR of Two Citral-Rich *Cymbopogon* Leaf Oils: *C. flexuosus* and *C. tortilis*. *Spectroscopy Letters* 42 (8): 506-512, 2009.
- Ou HC, Chou FP, Lin TM, Yang CH, Sheu WHH. Protective effects of eugenol against oxidized LDL-induced cytotoxicity and adhesion molecule expression in endothelial cells. *Food and Chemical Toxicology* 44 (9): 1485-1495, 2006.
- Page BT, Shields CE, Merz WG, Kurtzman CP. Rapid identification of ascomycetous yeasts from clinical specimens by a molecular method based on flow cytometry and comparison with identifications from phenotypic assays. *Journal of Clinical Microbiology* 44 (9): 3167-3171, 2006.
- Pandey AK, Rai MK, Acharya D. Chemical composition and antimycotic activity of the essential oils of corn mint (*Mentha arvensis*) and lemon grass (*Cymbopogon flexuosus*) against human pathogenic fungi. *Pharmaceutical Biology* 41 (6): 421-425, 2003.
- Pappalardo MC, Melhem MS. Cryptococcosis: a review of the Brazilian experience for the disease. *Revista do Instituto de Medicins Tropical de Sao Paulo* 45 (6): 299-305, 2003.
- Pappas PG, Alexander BD, Andes DR, Hadley S, Kauffman CA, Freifeld A, Anaissie EJ, Brumble LM, Herwaldt L, Ito J, Kontoyiannis DP, Lyon GM, Marr KA, Morrison VA, Park BJ, Patterson TF, Perl TM, Oster RA, Schuster MG, Walker R, Walsh TJ, Wannemuehler KA, Chiller TM. Invasive Fungal Infections among Organ Transplant Recipients: Results of

- the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET). *Clinical Infectious Diseases* 50 (8): 1101-1111, 2010.
- Parisi-Duchene E, Reibel C, Grawey I, Heller R, Mazurier I, de Briel DA, Moskovtchenko P. Rapid antifungal susceptibility testing of fluconazole and amphotericin B by flow cytometry using FUN-1 (R): a preliminary study. *Journal De Mycologie Medicale* 16 (3): 126-133, 2006.
- Park BJ, Wannemuehler KA, Marston BJ, Govender N, Pappas PG, Chiller TA. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *Aids* 23 (4): 525-530, 2009.
- Passos XS, Santos Sda C, Ferri PH, Fernandes Ode F, Paula Tde F, Garcia AC, Silva Mdo R. Antifungal activity of *Caryocar brasiliensis* (Caryocaraceae) against *Cryptococcus neoformans*. *Rev Soc Bras Med Trop* 35 (6): 623-7, 2002.
- Paula JAM, Silva MRR, Costa MP, Diniz DGA, Fabyola ASS, Alves SF, Costa EA, Lino RC, Paula JR. Phytochemical Analysis and Antimicrobial, Antinociceptive, and Anti-Inflammatory Activities of Two Chemotypes of *Pimenta pseudocaryophyllus* (Myrtaceae). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*: 2012.
- Perfect JR. *Cryptococcus neoformans*: the yeast that likes it hot. *Fems Yeast Research* 6 (4): 463-468, 2006.
- Perfect JR, Dismukes WE, Dromer F, Goldman DL, Graybill JR, Hamill RJ, Harrison TS, Larsen RA, Lortholary O, Nguyen MH, Pappas PG, Powderly WG, Singh N, Sobel JD, Sorrell TC. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the infectious diseases society of america. *Clinical Infectious Diseases* 50 (3): 291-322, 2010.
- Pericolini E, Cenci E, Monari C, Jesus M, Bistoni F, Casadevall A, Vecchiarelli A. *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharide component galactoxylomannan induces apoptosis of human T-cells through activation of caspase-8. *Cellular Microbiology* 8 (2): 267-275, 2006.
- Peterson A, Machmudah S, Roy BC, Goto M, Sasaki M, Hirose T. Extraction of essential oil from geranium (*Pelargonium graveolens*) with supercritical carbon dioxide. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 81 (2): 167-172, 2006.
- Pfaller MA. Antifungal susceptibility testing methods. *Current Drug Targets* 6 (8): 929-943, 2005.
- Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of Invasive Mycoses in North America. *Critical Reviews in Microbiology* 36 (1): 1-53, 2010.
- Pfaller MA, Yu WL. Antifungal susceptibility testing - New technology and clinical applications. *Infectious Disease Clinics of North America* 15 (4): 1227-+, 2001.
- Pina-Vaz C, Costa-de-Oliveira S, Rodrigues AG, Espinel-Ingroff A. Comparison of two probes for testing susceptibilities of pathogenic yeasts to voriconazole, itraconazole, and caspofungin by flow cytometry. *Journal of Clinical Microbiology* 43 (9): 4674-4679, 2005.

- Pina-Vaz C, Rodrigues AG. Evaluation of Antifungal Susceptibility Using Flow Cytometry. *Methods in Molecular Biology* 9: 2010.
- Pina-Vaz C, Rodrigues AG, Costa-de-Oliveira S, Ricardo E, Mardh PA. Potent synergic effect between ibuprofen and azoles on *Candida* resulting from blockade of efflux pumps as determined by FUN-1 staining and flow cytometry. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 56 (4): 678-685, 2005b.
- Pina-Vaz C, Rodrigues AG, Pinto E, Costa-de-Oliveira S, Tavares C, Salgueiro L, Cavaleiro C, Goncalves MJ, Martinez-de-Oliveira J. Antifungal activity of *Thymus* oils and their major compounds. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 18 (1): 73-78, 2004.
- Pina-Vaz C, Rodrigues AG, Sansonetty F, De-Oliveira M, Fonseca AF, Mardh PA. Antifungal Activity of Local Anesthetics Against *Candida* Species. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology* 8: 124-137, 2000.
- Pina-Vaz C, Sansonetty F, Rodrigues AG, Costa-De-Oliveira S, Martinez-De-Oliveira J, Fonseca AF. Susceptibility to fluconazole of *Candida* clinical isolates determined by FUN-1 staining with flow cytometry and epifluorescence microscopy. *Journal of Medical Microbiology* 50 (4): 375-382, 2001b.
- Pina-Vaz C, Sansonetty F, Rodrigues AG, Costa-Oliveira S, Tavares C, Martinez-de-Oliveira J. Cytometric approach for a rapid evaluation of susceptibility of *Candida* strains to antifungals. *Clinical Microbiology and Infection* 7 (11): 609-618, 2001.
- Pinto E, Pina-Vaz C, Salgueiro L, Goncalves MJ, Costa-de-Oliveira S, Cavaleiro C, Palmeira A, Rodrigues A, Martinez-De-Oliveira J. Antifungal activity of the essential oil of *Thymus pulegioides* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *Journal of Medical Microbiology* 55 (10): 1367-1373, 2006.
- Pinto E, Vale-Silva L, Cavaleiro C, Salgueiro L. Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *Journal of Medical Microbiology* 58 (11): 1454-1462, 2009.
- Pinto TJA, Kaneko TM, Pinto AF, eds. *Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, correlatos e cosméticos*. 3 ed. 2010, Attheneu
- Prado M, da Silva MB, Laurenti R, Travassos LR, Taborda CP. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 104 (3): 513-521, 2009.
- Prashar A, Locke IC, Evans CS. Cytotoxicity of clove (*Syzygium aromaticum*) oil and its major components to human skin cell. *Cell Proliferation* 39 (4): 241-248, 2006.
- Prudencio C, Sansonetty F, Corte-Real M. Flow cytometric assessment of cell structural and functional changes induced by acetic acid in the yeasts *Zygosaccharomyces bailii* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Cytometry* 31 (4): 307-313, 1998.

- Ramani R, Chaturvedi V. Flow cytometry antifungal susceptibility testing of pathogenic yeasts other than *Candida albicans* and comparison with the NCCLS broth microdilution test. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44 (10): 2752-2758, 2000.
- Ramani R, Ramani A, Wong SJ. Rapid flow cytometric susceptibility testing of *Candida albicans* (vol 35, pg 2321, 1997). *Journal of Clinical Microbiology* 35 (11): 3013-3013, 1997.
- Rana VS, Juyal JP, Blazquez MA. Chemical constituents of essential oil of *Pelargonium graveolens* leaves. *International Journal of Aromatherapy* 12: 216–218, 2002.
- Rauber CD, Guterres SS, Schapoval EES. LC determination of citral in *Cymbopogon citratus* volatile oil. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 37 (3): 597-601, 2005.
- Reichling J, Schnitzler P, Suschke U, Saller R. Essential Oils of Aromatic Plants with Antibacterial, Antifungal, Antiviral, and Cytotoxic Properties - an Overview. *Forschende Komplementarmedizin* 16 (2): 79-90, 2009.
- Rodrigues ML, Alviano CS, Travassos LR. Patogenicity of *Cryptococcus neoformans*: virulence factors and immunologic mechanisms. *Microbes and Infection* 1 (293-301): 1999.
- Rodriguez RJ, Low C, Bottema CDK, Parks LW. Multiple functions for sterols in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 112: 47–54, 1985.
- Rosato A, Vitali C, Piarulli M, Mazzotta M, Argentieri MP, Mallamaci R. In vitro synergic efficacy of the combination of Nystatin with the essential oils of *Origanum vulgare* and *Pelargonium graveolens* against some *Candida* species. *Phytomedicine* 16 (10): 972-975, 2009.
- Rozza AL, Pellizzon CH. Essential oils from medicinal and aromatic plants: a review of the gastroprotective and ulcer-healing activities. *Fundam Clin Pharmacol* 27 (1): 51-63, 2013.
- Rudensky B, Broidie E, Yinnon AM, Weitzman T, Paz E, Keller N, Raveh D. Rapid flow-cytometric susceptibility testing of *Candida* species. *J Antimicrob Chemother* 55 (1): 106-9, 2005.
- Santin MR, Santos AO, Nakamura CV, Filho BPD, Ferreira ICP, Nakamura TU. In vitro activity of the essential oil of *Cymbopogon citratus* and its major component (citral) on *Leishmania amazonenses*. *Parasitology Research* 105: 1489–1496, 2009.
- Schaneberg BT, Khan IA. Comparison of Extraction Methods for Marker Compounds in the Essential Oil of Lemongrass by GC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59: 1345, 2002.
- Scorzoni L, Benaducci T, Almeida AMF, Silva DHS, Bolzani VD, Gianinni MJSM. The use of standard methodology for determination of antifungal activity of natural products against medical yeasts *Candida* sp and *Cryptococcus* sp. *Brazilian Journal of Microbiology* 38 (3): 391-397, 2007.
- Scorzoni L, Benaducci T, Almeida AMF, Silva DHS, Bolzani VS, Mendes-Giannini MJS. Comparative study of disk diffusion and microdilution methods for evaluation of antifungal activity of natural compounds against medical yeasts *Candida* spp and

- Cryptococcus* sp. . *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada* 18: 25-34, 2007b.
- Severo LC, Oliveira FM, Da Silva VB. Diferenças clínicas, epidemiológicas e ecológicas entre as duas variedades de *Cryptococcus neoformans*. . *Revista Médica da Santa Casa de Porto Alegre* 9: 1672-1686, 1998.
- Sharma JR, Sharma A, Singh AK, Kumar S. Economic, potential and improved varieties of aromatic plants of India. *Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences* 18: 512-522, 1996.
- Sharma PR, Mondhe DM, Muthiah S, Pal HC, Shahi AK, Saxena AK, Qazi GN. Anticancer activity of an essential oil from *Cymbopogon flexuosus*. *Chemico-Biological Interactions* 179: 160-168, 2009.
- Shin S, Lim S. Antifungal effects of herbal essential oils alone and in combination with ketoconazole against *Trichophyton* spp. *The Journal of Applied Microbiology* 97 (6): 1289-96, 2004.
- Shreaz S, Bhatia R, Khan N, Muralidhar S, Basir SF, Manzoor N, Khan LA. Exposure of *Candida* to p-anisaldehyde inhibits its growth and ergosterol biosynthesis. *The Journal of General and Applied Microbiology* 57: 129–136, 2011.
- Shreaz S, Bhatia R, Khan N, Muralidhar S, Basir SF, Manzoor N, Khan LA. Spice oil cinnamaldehyde exhibits potent anticandidal activity against fluconazole resistant clinical isolates. *Fitoterapia* 82 (7): 1012-20, 2011b.
- Sifuentes-Osornio J, Corzo-León DE, Ponce-de-León LA. Epidemiology of Invasive Fungal Infections in Latin America. *Current Fungal Infection Reports* 6: 23–34, 2012.
- Silva F, Ferreira S, Duarte A, Mendonca DI, Domingues FC. Antifungal activity of *Coriandrum sativum* essential oil, its mode of action against *Candida* species and potential synergism with amphotericin B. *Phytomedicine* 19 (1): 42-47, 2011.
- Silva MR, Oliveira JG, Jr., Fernandes OF, Passos XS, Costa CR, Souza LK, Lemos JA, Paula JR. Antifungal activity of *Ocimum gratissimum* towards dermatophytes. *Mycoses* 48 (3): 172-5, 2005.
- Silva NCC, Júnior AF. Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. 16 (3): 402-413, 2010.
- Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann GM, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR, eds. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6 ed. 2007: Porto Alegre.
- Simpson MG, *Plant Systematics*. 2006, Elsevier Academic Press
- Singh J, Baghotia A, Goel SP. *Eugenia caryophyllata* Thunberg (Family Myrtaceae): A Review. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences* 3 (4): 2012.

- Skoog DA, West DM, Holler FJ, eds. *Fundamentos de Química Analítica* 2006, Thomson: New York.
- Souza GHB, Mello JCP, Lopes NP, *Revisões em Processos Técnicos Avançados de Isolamento e Determinação Estrutural de ativos de Plantas.*, UFOP, Editor. 2012: Ouro Preto
- Souza LK, de Oliveira CM, Ferri PH, de Oliveira Junior JG, de Souza Junior AH, Fernandes Ode F, Silva Mdo R. Antimicrobial activity of *Hyptis ovalifolia* towards dermatophytes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98 (7): 963-5, 2003.
- Springer DJ, Chaturvedi V. Projecting global occurrence of *Cryptococcus gattii*. *Emerg Infect Dis* 16 (1): 14-20, 2010.
- Srivastava AK, Srivastava SK, Syamsundar KV. Bud and leaf essential oil composition of *Syzygium aromaticum* from India and Madagascar. *Flavour and Fragrance Journal* 20 (51-53): 2005.
- Steenbergen JN, Casadevall A. The origin and maintenance of virulence for the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Microbes and Infection* 5 (7): 667-675, 2003.
- Swamy KN, Rao SSR. Effect of 24-Epibrassinolide on Growth, Photosynthesis, and Essential Oil Content of *Pelargonium graveolens* (L.) Herit. *Russian Journal of Plant Physiology* 56 (5): 616-620, 2009.
- Tajkarimi MM, Ibrahim SA, Cliver DO. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control* 21 (9): 1199-1218, 2010.
- 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* 159 (3): 339-345, 2005.
- Tavares AC, Gonçalves MJ, Cavaleiro C, Cruz MT, Lopes MC, Canhoto J, Salgueiro LR. Essential oil of *Daucus carota* subsp. *halophilus*: Composition, antifungal activity and cytotoxicity. *Journal of Ethnopharmacology* 119: 129–134, 2008.
- Trasarti AF, Marchi AJ, Apesteguia CR. Highly selective synthesis of menthols from citral in a one-step process. *Journal of Catalysis* 224 (2): 484-488, 2004.
- Vale-Silva L, Silva MJ, Oliveira D, Goncalves MJ, Cavaleiro C, Salgueiro L, Pinto E. Correlation of the chemical composition of essential oils from *Origanum vulgare* subsp *virens* with their in vitro activity against pathogenic yeasts and filamentous fungi. *Journal of Medical Microbiology* 61 (2): 252-260, 2012.
- Vale-Silva LA, Buchta V. Antifungal susceptibility testing by flow cytometry: is it the future? *Mycoses* 49 (4): 261-273, 2006.
- Vale-Silva LA, Goncalves MJ, Cavaleiro C, Salgueiro L, Pinto E. Antifungal Activity of the Essential Oil of *Thymus x viciosoi* against *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* and Dermatophyte Species. *Planta Medica* 76 (9): 882-888, 2010.

- Vecchiarelli A, Monari C. Capsular Material of *Cryptococcus neoformans*: Virulence and Much More. *Mycopathologia* 173 (5-6): 375-386, 2012.
- Vilchez R, Shapiro R, McCurry K, Kormos R, Abu-Elmagd K, Fung J, Kusne S. Longitudinal study of cryptococcosis in adult solid-organ transplant recipients. *Transplant International* 16 (5): 336-340, 2003.
- Viollon C, Chaumont JP. Antifungal Properties of Essential Oils and Their Main Components Upon *Cryptococcus-Neoformans*. *Mycopathologia* 128 (3): 151-153, 1994.
- Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernandez-Lopez J, Perez-Alvarez J. Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. *Food Control* 19 (12): 1130-1138, 2008.
- Wagner H. Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Fitoterapia* 82 (1): 34-37, 2011.
- Wang LQ, Lin XR. Mechanisms of unisexual mating in *Cryptococcus neoformans*. *Fungal Genetics and Biology* 48 (7): 651-660, 2011.
- Warkentien T, Crum-Cianflone NF. An update on *Cryptococcus* among HIV-infected patients. *International Journal of STD & AIDS* 21: 679-684, 2010.
- Warnock DW. Trends in the epidemiology of invasive fungal infections. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi* 48 (1): 1-12, 2007.
- Wenisch C, Linnau KF, Parschalk B, ZedtwitzLiebenstein K, Georgopoulos A. Rapid susceptibility testing of fungi by flow cytometry using vital staining. *Journal of Clinical Microbiology* 35 (1): 5-10, 1997.
- WHO WHO. *Monographs on selected medicinal plants*, World Health Organization: 1999.
- Yoo CB, Han KT, Cho KS, Ha J, Park HJ, Nam JH, Kil UH, Lee KT. Eugenol isolated from the essential oil of *Eugenia caryophyllata* induces a reactive oxygen species-mediated apoptosis in HL-60 human promyelocytic leukemia cells. *Cancer Letters* 225 (1): 41-52, 2005.
- 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* 68: 133, 2009.
- Zhu XD, Williamson PR. Role of laccase in the biology and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Fems Yeast Research* 5 (1): 1-10, 2004.
- Zore GB, Thakre AD, Jadhav S, Karuppayil SM. Terpenoids inhibit *Candida albicans* growth by affecting membrane integrity and arrest of cell cycle. *Phytomedicine* 18 (13): 1181-1190, 2011b.
- Zore GB, Thakre AD, Rathod V, Karuppayil SM. Evaluation of anti-*Candida* potential of geranium oil constituents against clinical isolates of *Candida albicans* differentially sensitive to fluconazole: inhibition of growth, dimorphism and sensitization. *Mycoses* 54 (4): E99-E109, 2011.

Zuzarte M, Vale-Silva L, Goncalves MJ, Cavaleiro C, Vaz S, Canhoto J, Pinto E, Salgueiro L. Antifungal activity of phenolic-rich *Lavandula multifida* L. essential oil. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 31 (7): 1359-66, 2012.

ANEXOS

1. Parecer do Comitê de Ética

COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA / HDT

PARECER

PROJETO: Variabilidade fenotípica e genotípica de *Cryptococcus neoformans* obtidos do meio ambiente e de amostras clínicas da cidade de Goiânia-GO.

AUTORA: Lúcia Kioko Hashimoto e Souza **ORIENTADORA:** Maria do Rosário R. Silva

Avaliamos o projeto supracitado e consideramos que o mesmo atende as normas preconizadas pelo CONEP e os preceitos preceitos éticos vigentes, não havendo, portanto impedimentos para sua condução nesta instituição.
Este é o nosso parecer, salvo melhor juízo.

Goiânia, 25 de Abril de 2003.


Dr. João Alves de Araújo Filho

2. Laudo Técnico Óleo essencial *Eugenia caryophyllus* (*Syzygium aromaticum*)



FERQUIMA

LAUDO TÉCNICO Óleo Essencial de Cravo Talo (*Eugenia caryophyllus*)

Lote: 202	CAS Number: 8000-34-8
Fabricação: Março/2012	Validade: Março/2014

Ítems Controlados	Resultados	Especificações
Aparência	Líquido	Líquido
Cor	Amarelo Palha	Amarelo Palha a Alaranjado
Impurezas	Isento	Isento
Odor	Típico - Spice	Típico - Spice
Densidade (20°C)	1,053	1,041 – 1,059
Índice de Refração (20°C)	1,536	1,520 – 1,540
Rotação Ótica		[-1° ; +1°]
Data da Análise	06/06/2012	
Resultado	Aprovado	
Origem	Indonésia	
Principais componentes (aprox)	Eugenol = 90 % Acetato de Eugenila = 1 % Beta-Cariofileno = 8%	

Recomendações Especiais	
Manuseio	Não ingerir. Evitar contato com a pele, olhos e mucosa. Se isso ocorrer, lavar imediatamente com água limpa em abundância. Em caso de derramamento, absorver o material derramado com material absorvente (areia, terra).
Incêndio	Caso haja fogo, utilizar extintor de pó químico seco e água em forma de neblina, não utilizando jatos de água para não espalhar o produto.
Explosividade	Nenhum perigo em condições normais.
Uso	Este produto destina-se exclusivamente ao uso profissional / industrial e como é elaborado a partir de substâncias naturais pode apresentar pequenas variações de cor e cromatografia sem causar qualquer problema na performance do produto.
Armazenamento	Armazenar em local seco, longe de umidade e do calor, protegido da luz, em recipiente original bem vedado. Não reutilizar a embalagem vazia.
Transporte	Produto não enquadrado na portaria 204/97 em vigor sobre transporte de produtos perigosos.

As informações contidas nesta publicação representam o melhor de nosso conhecimento. Entretanto, nada aqui mencionado deve ser entendido como garantia de uso. Os consumidores devem efetuar seus próprios ensaios para determinar a viabilidade da aplicação.

Engenheira Química Responsável: Alice Lasthaus CRQ: IV 04330754

Estrada Mineração Ouro Branco, 2017 • Vargem Grande, Paulista • SP • CEP: 06730-000
Tel.: 11.4159.1784 / 11.4158.3544 - Fax: 11.4158.3420
msn / e-mail: atendimento@ferquima.com.br
www.ferquima.com.br

FERQUIMA
Ind. e Com. Ltda

3. Análise por cromatografia gasosa da composição química e teor do Óleo essencial *Eugenia caryophyllus* (*Syzygium aromaticum*)



Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Exatas
Departamento de Química / Colegiado de Extensão
Telefax : (31) 3409-5724 – e-mail: núcleo@qui.ufmg.br

UFMG

CERTIFICADO DE ANÁLISE QUÍMICA

Solicitante: FERQUIMA IND. COM. LTDA. CNPJ: 51.699.205/0001-48

ÓLEO ESSENCIAL DE CRAVO TALO

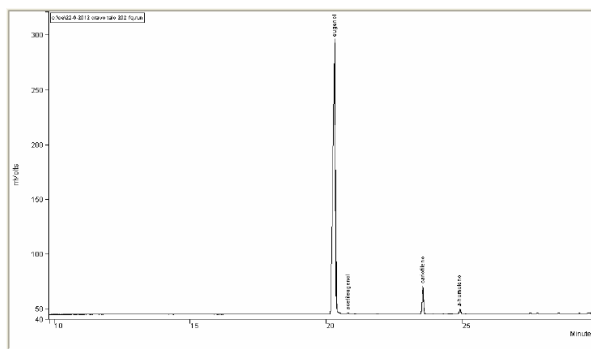
Nome comercial: Óleo essencial de cravo talo

Lote: 202 (fab: mar/2012 val: mar/2014)

Nomenclatura botânica: eugenia caryophyllata

Composição Química:

Pico	Constituinte ID	%
1	eugenol	92,3
2	acetileugenol	0,2
3	cariofileno	5,5
4	a-humuleno	0,9



Dra. Vany Ferraz
Laboratório de Cromatografia
Departamento de Química – UFMG
vanyferraz@ufmg.br
Belo Horizonte, 25/06/2012

Método de análise:
Cromatografia Gasosa de Alta Resolução. Cromatógrafo a Gás HP 5890.
Coluna: BP1 30m x 0,25mm (SGE). Temp.: Coluna: 60°C (0min), 3°C/min, até 150°C. Injetor: 250°C Split: 1/50. Detector FID: 250°C. Volume de injeção: 1 µl (conc 1,0 % em clorofórmio)

Av. Antônio Carlos, 6627 – Campus – Pampulha – Belo Horizonte/MG-Brasil - Cep: 31.270-901

4. Laudo Técnico Óleo essencial *Cymbopogon flexuosus*



FERQUIMA

LAUDO TÉCNICO Óleo Essencial de Lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*)

Lote: 189	CAS Number: 91844-92-7
Fabricação: Abril/2012	Validade: Abril/2014

Itens Controlados	Resultados	Especificações
Aparência	Líquido Límpido	Líquido Límpido
Cor	Amarelo a Alaranjado	Amarelo a Alaranjado
Impurezas	Isento	Isento
Odor	Fresco, encorpado, limão	Fresco, encorpado, limão
Densidade (20°C)	0,892	0,875 – 0,905
Índice de Refração (20°C)	1,485	1,475 – 1,495
Rotação Ótica		[-4° ; +1°]
Data da Análise	06/06/2012	
Resultado	Aprovado	
Origem	Índia	
Principais Componentes (aprox.)	Citral = 69 % (geranial = 37 %; neral = 31 %)	

Recomendações Especiais	
Manuseio	Perigos mínimos, máscara e luvas recomendável. Não ingerir. Evitar contato com a pele, olhos e mucosa. Se isso ocorrer, lavar imediatamente com água límpida em abundância. Em caso de derramamento, absorver o material derramado com material absorvente (areia, terra).
Incêndio	Caso haja fogo, utilizar extintor de pó químico seco e água em forma de neblina, não utilizando jatos de água para não espalhar o produto.
Explosividade	Nenhum perigo em condições normais.
Uso	Este produto destina-se exclusivamente ao uso industrial e como é elaborado a partir de substâncias naturais pode apresentar pequenas variações de cor e cromatografia sem causar qualquer problema na performance do produto.
Armazenamento	Armazenar em local seco, longe de umidade e do calor, protegido da luz, em recipiente original bem vedado. Não reutilizar a embalagem vazia.
Transporte	Produto não enquadrado na portaria 204/97 em vigor sobre transporte de produtos perigosos.

As informações contidas nesta publicação representam o melhor de nosso conhecimento. Entretanto, nada aqui mencionado deve ser entendido como garantia de uso. Os consumidores devem efetuar seus próprios ensaios para determinar a viabilidade da aplicação.

Engenheira Química Responsável: Alice Lasthaus CRQ: IV 04330754

5. Análise por cromatografia gasosa da composição química e teor do Óleo essencial *Cymbopogon flexuosus*



Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Exatas
Departamento de Química / Colegiado de Extensão
Telefax : (31) 3409-5724 – e-mail: núcleo@qui.ufmg.br

UFMG

CERTIFICADO DE ANÁLISE QUÍMICA

Solicitante: FERQUIMA IND. COM. LTDA. CNPJ: 51.699.205/0001-48

ÓLEO ESSENCIAL DE LEMONGRASS

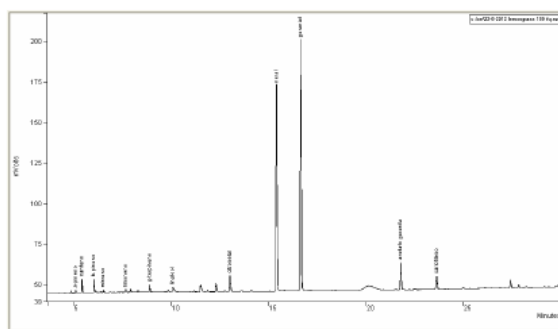
Nome comercial: Óleo essencial de lemongrass

Lote: 189 (fab: abr/2012 val: abr/2014)

Nomenclatura botânica: *cymbopogon flexuosus*

Composição Química:

Pico	Constituinte ID	%
1	α -pineno	0,2
2	canfeno	1,1
3	β -pineno	1,5
4	mirreno	0,3
5	limoneno	0,3
6	γ -terpineno	0,9
7	linalool	1,2
8	citronelal	2,4
9	neral	34,3
10	geranial	44,6
11	acetato geranila	4,5
12	cariofileno	2,2



Dra. Vany Ferraz
Laboratório de Cromatografia
Departamento de Química – UFMG
vanyferraz@ufmg.br
Belo Horizonte, 25/08/2012

Método de análise:
Cromatografia Gasosa de Alta Resolução. Cromatógrafo a Gás HP 5890.
Coluna: BP1 30m x 0,25mm (SIGE). Temp.: Coluna: 60°C (0min), 3°C/min, até 150°C. Injetor: 250°C Split:
1/50. Detector FID: 250°C. Volume de injeção: 1 μ l (conc 1,0 % em clorofórmio)

Av. Antônio Carlos, 6627 – Campus – Pampulha – Belo Horizonte/MG-Brasil - Cep: 31.270-901

6. Laudo Técnico Óleo essencial *Pelargonium graveolens*



FERQUIMA

LAUDO TÉCNICO **Óleo Essencial de Gerânio África** (*Pelargonium graveolens*)

Lote: 123	CAS Number: 8000-46-2
Fabricação: Março/2012	Validade: Março/2014

Ítems Controlados	Resultados	Especificações
Aparência	Líquido	Líquido
Cor	Esverdeado	Amarelo Castor a Esverdeado
Impurezas	Isento	Isento
Odor	Característico	Característico
Densidade (20°C)	0,894	0,885 – 0,905
Índice de Refração (20°C)	1,468	1,461 – 1,475
Refração Ótica		[-14° ; -8°]
Data da Análise	06/06/2012	
Resultado	Aprovado	
Origem	Egito	
Principais Componentes (aprox.)	Citronelol 34 % Geraniol 17%	

Recomendações Especiais	
Manuseio	Não ingerir. Evitar contato com a pele, olhos e mucosa. Se isso ocorrer, lavar imediatamente com água límpida em abundância. Em caso de derramamento, absorver o material derramado com material absorvente (areia, terra).
Incêndio	Caso haja fogo, utilizar extintor de pó químico seco e água em forma de neblina, não utilizando jatos de água para não espalhar o produto.
Explosividade	Nenhum perigo em condições normais.
Uso	Este produto destina-se exclusivamente ao uso profissional / industrial e como é elaborado a partir de substâncias naturais pode apresentar pequenas variações de cor e cromatografia sem causar qualquer problema na performance do produto.
Armazenamento	Armazenar em local seco, longe de umidade e do calor, protegido da luz, em recipiente original bem vedado. Não reutilizar a embalagem vazia.
Transporte	Produto não enquadrado na portaria 204/97 em vigor sobre transporte de produtos perigosos.

As informações contidas nesta publicação representam o melhor de nosso conhecimento. Entretanto, nada aqui mencionado deve ser entendido como garantia de uso. Os consumidores devem efetuar seus próprios ensaios para determinar a viabilidade da aplicação.

Engenheira Química Responsável: Alice Lasthaus CRQ: IV 04330754

7. Análise por cromatografia gasosa da composição química e teor do Óleo essencial *Pelargonium graveolens*



Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Exatas
Departamento de Química / Colegiado de Extensão
Telefax : (31) 3409-5724 – e-mail: núcleo@qui.ufmg.br

UFMG

CERTIFICADO DE ANÁLISE QUÍMICA

Solicitante: FERQUIMA IND. COM. LTDA. CNPJ: 51.699.205/0001-48

Composição Química:

ÓLEO ESSENCIAL DE GERANIO AFRICA

Nome comercial: óleo essencial de geranio africa

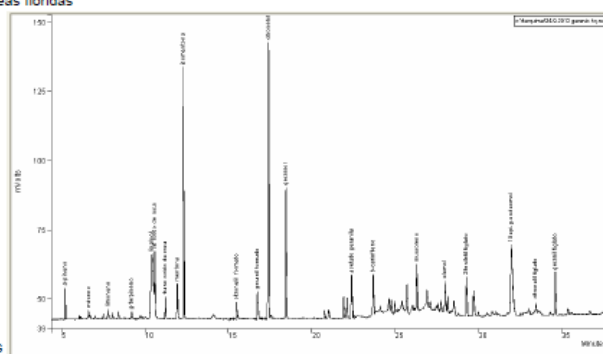
Lote: 123 fab: mar/2012 val: mar/2014

Nomenclatura botânica: *pelargonium graveolens*

Extração: destilação por arraste a vapor

Parte da planta: partes aéreas floridas

Pico	Constituinte ID	%
1	α -pineno	0,9
2	linalool	9,6
3	cis óxido de rosa	3,6
4	trans óxido de rosa	1,0
5	mentona	1,9
6	isomentona	11,8
7	citronelil formato	0,9
8	geranil formato	1,6
9	citronelol	14,3
10	geraniol	6,5
11	geranil acetato	2,4
12	β -cariofileno	2,7
13	muuroleno	3,1
14	elemol	2,0
15	2feniletil tigolato	2,2
16	10epi-y-eudesmol	9,3
17	citronelil tigolato	1,3
18	geranil tigolato	2,5



Dra. Vany Ferraz
Laboratório de Cromatografia
Departamento de Química – UFMG
vanyferraz@ufmg.br
Belo Horizonte, 01/10/2012

Método de análise:
Cromatografia Gasosa de Alta Resolução. Cromatógrafo a Gás HP 5890.
Coluna: BP1 30m x 0,25mm (HP). Temp.: Coluna: 60°C (0min), 3°C/min, até 280°C. Injetor: 280°C
Split: 1/50. Detector FID: 280°C. Volume de Injeção: 1 μ l (cono 1,0 % em clorofórmio)

Obs: Picos menores que 0,2% foram excluídos

Av. Antônio Carlos, 6627 – Campus – Pampulha – Belo Horizonte/MG-Brasil – Cep: 31.270-901