

EGBERTO SANTOS CARMO

**SUSCEPTIBILIDADE DE FUNGOS DO GÊNERO
Aspergillus A ÓLEOS ESSENCIAIS**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA FARMACÊUTICA
“PROF. DELBY FERNANDES DE MEDEIROS”
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS
NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS**



JOÃO PESSOA – PB

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

EGBERTO SANTOS CARMO

**SUSCEPTIBILIDADE DE FUNGOS DO GÊNERO
Aspergillus A ÓLEOS ESSENCIAIS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde / Laboratório de Tecnologia Farmacêutica Prof. Delby Fernandes de Medeiros da Universidade Federal da Paraíba, para obtenção do grau de MESTRE EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS. Área de concentração: FARMACOLOGIA.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Edeltrudes de Oliveira Lima

JOÃO PESSOA – PB

2008

EGBERTO SANTOS CARMO

**SUSCEPTIBILIDADE DE FUNGOS DO GÊNERO
Aspergillus A ÓLEOS ESSENCIAIS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde / Laboratório de Tecnologia Farmacêutica Prof. Delby Fernandes de Medeiros da Universidade Federal da Paraíba, para obtenção do grau de MESTRE EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS. Área de concentração: FARMACOLOGIA.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Edeltrudes de Oliveira Lima
(Departamento de Farmácia/UFPB)

Prof^a. Dr^a. Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz
(Departamento de Farmácia/UFPB)

Prof^a. Dr^a. Lindomar de Farias Belém
(Departamento de Farmácia/UEPB)

Dedico aos meus pais pelo amor incondicional e apoio prestado em todos os momentos da minha vida, pois sem eles tudo que conquistei até hoje poderia ser apenas um sonho.

AGRADECIMENTOS

No plano metafísico a Deus pelo dom da vida e amparo nos momentos decisivos da minha existência.

A grande professora Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima pela orientação, disponibilidade, amizade e acima de tudo grande profissionalismo.

A meus pais Maria de Fátima e José Gilberto pelo afeto, força e muito incentivo para concretização de todos os meus sonhos.

As minhas irmãs Charlene Keslly e Shirlene Kelly pelo companherismo e amor fraternal.

A toda minha família pela presença e apoio em todos os momentos.

As minhas grandes amigas Cristiane Souza, Irani Lopes, Ana Carolina, Jahamunna Abrantes, Andréa Targino e Luiza Herbene que sempre trago no coração com respeito, carinho e gratidão.

Aos colegas de laboratório Ana Carolina, Giliara, Assuero, Nadabia, Vinícius, Filipe, Evandro, Zélia, Fátima e Neuza que sempre se mostraram presentes e dispostos a me ajudar.

A todos os colegas de turma do mestrado que contribuíram, dentro e fora de aula, para minha formação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pelo apoio financeiro.

Ao Professor Dr. Evandro Leite de Souza pela grande colaboração na implantação de novas e enriquecedoras técnicas para avaliação de atividade antifúngica.

Ao Professor Dr. Frederico Barbosa de Sousa, responsável pelo Laboratório de Microscopia e Imagem Biológica, pela grande colaboração na confecção das imagens utilizadas nessa dissertação e artigos publicados.

A banca examinadora nas pessoas de Dra. Lindomar de Farias Belém e Dra. Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz pela aceitação e grande contribuição para o enriquecimento deste trabalho científico.

Em especial a Tânia Alves, secretária do LTF, pela amizade e constante disposição para solucionar as mínimas necessidades durante o mestrado.

E aqueles que compõem a família LTF, como professores, técnicos, coordenação, diretoria, sempre preparados para conduzir da melhor maneira possível o processo ensinar-aprender, a todos meu reconhecimento e carinho.

Dentro de você já existe uma linda obra de arte, a mais bela do universo. Seu grande desafio é retirar o excesso de mármore e completá-la. Nós somos os artistas da nossa criação! A grande verdade é que você é a pessoa que escolhe ser. Todos os dias você decide se continua do jeito que é ou muda. A grande glória do ser humano é poder participar de sua autocriação (Anderson e Michelangelo).

RESUMO

CARMO, E. S. Susceptibilidade de Fungos do Gênero *Aspergillus* a Óleos Essenciais. [Dissertação-Mestrado]. João Pessoa (PB): LTF/UFPB, Universidade Federal da Paraíba, 116p., 2008.

O gênero *Aspergillus* inclui fungos filamentosos, com ampla distribuição na natureza e podem causar prejuízos na indústria de alimentos e a saúde humana, dependendo de condições favoráveis ao seu desenvolvimento. O objetivo desse estudo foi avaliar a interferência de óleos essenciais sobre o crescimento de *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. fumigatus*, *A. terreus*, *A. niger* e *A. ochraceos*. Os ensaios antimicrobianos foram realizados através do *screening* e determinação da concentração inibitória mínima – CIM, pela técnica de difusão em meio sólido; cinética de morte microbiana, medida do crescimento radial em diferentes intervalos de tempo; inibição da germinação de conídios e avaliação das alterações morfológicas. Dentre nove óleos essenciais testados, *Caryophyllus aromaticus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Origanum vulgare* exibiram potente atividade antifúngica produzindo inibição sobre as cepas ensaiadas. Os valores de CIM₅₀ e CIM₉₀ foram, respectivamente, 40 e 80 µL/mL para os três óleos essenciais. Nessas concentrações, foram observados efeitos fungicidas dos óleos de *C. zeylanicum* e *O. vulgare* sobre *A. flavus* LM-247, *A. fumigatus* ATCC 40640 e *A. niger* P-03, produzindo total inibição do crescimento micelial radial e inibição da germinação de conídios. Além disso, alterações morfológicas como diminuição da conidiação e degeneração da parede celular foram observadas nas cepas ensaiadas, após exposição ao óleo de *C. zeylanicum* nas CIM₅₀ e CIM₉₀, sob microscopia óptica. Devido à intensa atividade antifúngica dos referidos óleos, em especial, o de *C. zeylanicum*, suporta-se o uso deles como antifúngicos em sistemas de conservação de alimentos e em formulações farmacêuticas para tratamento de infecções oportunistas causadas por *Aspergillus* spp.

Palavras-chave: fungos, *Aspergillus* spp., óleos essenciais

ABSTRACT

CARMO, E. S. Susceptibility of fungi of the genus *Aspergillus* the Essential Oils. [Dissertação-Mestrado]. João Pessoa (PB): LTF/UFPB, Universidade Federal da Paraíba, 116p., 2008.

Aspergillus are filamentous fungi, with distribution wide in nature and can cause damage in food industry and human health, depending on favorable conditions for its development. This study aimed to evaluate the interference of essential oils on the growth of *A. Flavus*, *A. Parasiticus*, *A. Fumigatus.*, *A. Terreus*, *A. Niger* and *A. Ochraceos*. The antimicrobial tests conducted were *screening* and determination of the minimal inhibitory concentration - CIM, both by method of diffusion in solid medium; kinetics of microbial death, measure the radial growth at different intervals of time; inhibition of conidia germination and evaluation of morphological changes. Among nine essential oils tested, *Caryophyllus aromaticus*, *Cinnamomum zeylanicum* and *Origanum vulgare* exhibited potent antifungal activity producing inhibition on the strains tested. The values of CIM₅₀ and CIM₉₀ were, respectively, 40 and 80 µL/mL for the three essential oils. These concentrations were observed fungicides effects to oils *C. Zeylanicum* and *O. Vulgare* on *A. Flavus* LM-247, *A. fumigatus* ATCC-40640 and *A. Niger* P-03, producing total inhibition of radial mycelial growth and inhibition conidia germination. Moreover, morphological changes as conidiation decreased and degeneration of the cell wall were observed in the strains tested, after exposure to oil *C. Zeylanicum* in CIM₅₀ and CIM₉₀ under light microscopy. Due the intense antifungal activity of these oils, in particular, *C. Zeylanicum*, supports the use of them as antifungal systems in the food conservation and in pharmaceutical formulations for the treatment of opportunistic infections caused by *Aspergillus* spp.

Key-words: fungi, *Aspergillus* spp., essential oils.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Média dos resultados (mm) do <i>screening</i> da avaliação da atividade antifúngica dos óleos essenciais sobre fungos do gênero <i>Aspergillus</i>	55
Tabela 2 - Fitoconstituintes do óleo essencial das folhas de <i>C. zeylanicum</i> identificados por GC-MS.....	57
Tabela 3 - Fitoconstituintes do óleo essencial das folhas <i>C. aromaticus</i> identificados por GC-MS.....	59
Tabela 4 - Fitoconstituintes do óleo essencial das folhas <i>O. vulgare</i> identificados por GC-MS.....	60
Tabela 5 - Média dos resultados (n=2) da CIM, do óleo essencial de <i>Cinnamomum zeylanicum</i> B. sobre cepas de <i>Aspergillus</i>	63
Tabela 6 - Média dos resultados (n=2) da CIM, do óleo essencial de <i>Origanum vulgare</i> L. sobre cepas de <i>Aspergillus</i>	66
Tabela 7 - Média dos resultados (n=2) da CIM, do óleo essencial de <i>Caryophyllus aromaticus</i> L. sobre cepas de <i>Aspergillus</i>	70
Tabela 8 - Inibição da germinação dos conídios de <i>Aspergillus</i> pelo óleo essencial de <i>C. zeylanicum</i> (resultados expressos em porcentagem de inibição da germinação dos conídios em relação ao controle).....	81
Tabela 9 - Inibição da germinação dos conídios de espécies de <i>Aspergillus</i> pelo óleo essencial de <i>O. vulgare</i> (resultados expressos em porcentagem de inibição da germinação dos conídios em relação ao controle).....	83

LISTA DE FIGURAS E QUADRO

Figura 1 - Macromorfologia de <i>A. flavus</i>	24
Figura 2 - Micromorfologia de <i>A. flavus</i>	24
Figura 3 – <i>Cinnamomum zeylanicum</i>	38
Figura 4 - <i>Origanum vulgare</i>	40
Figura 5 - <i>Caryophyllus aromaticus</i>	42
Figura 6 - Fluxograma do <i>screening</i> microbiológico.....	46
Figura 7 - Fluxograma da determinação da concentração inibitória mínima....	49
Figura 8 - Fluxograma do ensaio de cinética de morte microbiana.....	50
Figura 9 - Fluxograma do ensaio de interferência dos óleos essenciais sobre a germinação de conídios de fúngicos.....	51
Figura 10 - Fluxograma do efeito do óleo essencial sobre a morfogênese de cepas de fungos filamentosos.....	52
Figura 11 - CIM do óleo essencial de <i>C. zeylanicum</i> nas concentrações de 320 a 5 µL/mL, sobre <i>A. niger</i> P-03.....	64
Figura 12 - CIM do óleo essencial de <i>O. vulgare</i> nas concentrações de 320 a 5 µL/mL, sobre <i>A. terreus</i> UP-03.....	67
Figura 13 – CIM do óleo essencial de <i>C. aromaticus</i> nas concentrações de 320 a 5 µL/mL, sobre <i>A. niger</i> P-03.....	71
Figura 14 - Resistência de <i>A. terreus</i> ATCC – 7860 a anfotericina B.....	73
Figura 15 – Cinética de morte microbiana de <i>A. fumigatus</i> exposto ao óleo essencial, respectivamente, de <i>C. zeylanicum</i> (40 µL/mL), ao cetoconazol (50µg/mL) e controle de crescimento fúngico, após 4 dias de interação.....	80
Figura 16 - Cinética de morte microbiana de <i>A. fumigatus</i> exposto ao óleo essencial, respectivamente, de <i>C. zeylanicum</i> (40 µL/mL), ao cetoconazol (50µg/mL) e controle de crescimento fúngico, após 10 dias de interação.....	80

Figura 17 - Efeito do óleo essencial de *C. zeylanicum* sobre a germinação de conídios de *A. niger*. a) controle positivo: *A. niger* na ausência do óleo. b) *A. niger* exposto a 40µL/mL do óleo. c) *A. niger* exposto a 20µL/mL do óleo.....82

Figura 18 - Micromorfologia do conidióforo de *A. niger* P-03 crescendo em ASD sem ou com óleo essencial de *C. zeylanicum*, durante 7 dias de incubação a 28-30 °C. (I) Controle positivo: cabeça conidial de *A. niger*, larga e radiada, desenvolvendo vesícula sobre conidióforo, conídios claramente visíveis, barra 100 µm. (II-III) Modificações da cabeça conidial induzida, respectivamente, por 80 e 40 µL/mL do óleo essencial de *C. zeylanicum*, demonstrando clara redução na conidiação, barra 100 µm.....86

Figura 19 – Micromorfologia da hifa vegetativa de *A. niger* P – 03 crescendo em ASD sem ou com óleo essencial de *C. zeylanicum* durante 7 dias de incubação a 28-30°C. (I) controle positivo: hifa vegetativa demonstrando estrutura homogênea e regular, barra 100µm. (II-III) modificações da hifa fúngica, induzidas por 80µL/mL do óleo essencial de *C. zeylanicum* demonstrando perda de pigmentação citoplasmática (a) perda de conteúdo citoplasmático (b) clara ruptura da célula fúngica, com conseqüente destruição da mesma, barra 100 µm.....87

Figura 20 – Micromorfologia do conidióforo de *A. flavus* LM-247 crescendo em ASD sem ou com óleo essencial de *C. zeylanicum*, durante 7 dias de incubação a 28-30 °C. (I) Controle positivo: cabeça conidial de *A. flavus*, larga e radiada, desenvolvendo vesícula sobre conidióforo, conídios claramente visíveis, barra 100 µm. (II-III) Modificações da cabeça conidial induzida, respectivamente, por 80 e 40 µL/mL do óleo essencial de *C. zeylanicum*, demonstrando clara redução na conidiação, barra 100 µm.....88

Figura 21 – Micromorfologia do conidióforo de *A. fumigatus* ATCC-40640 crescendo em ASD sem ou com óleo essencial de *C. zeylanicum*, durante 7 dias de incubação a 28-30°C. (I) Controle positivo: cabeça conidial de *A. flavus*, larga e radiada, desenvolvendo vesícula sobre conidióforo, conídios claramente visíveis, barra 100 µm. (II-III) Modificações da cabeça conidial induzida, respectivamente, por 80 e 40 µL/mL do óleo essencial de *C. zeylanicum*, demonstrando clara redução na conidiação, barra 100 µm.....89

Quadro 1. Espécies vegetais das quais foram obtidos os óleos essenciais.....45

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1: Efeito do óleo essencial de *C. zeylanicum* e cetoconazol sobre a cinética de morte microbiana de *A. flavus* LM-247. t-Tukey ($p < 0,05$).....75
- Gráfico 2: Efeito do óleo essencial de *C. zeylanicum* e cetoconazol sobre a cinética de morte microbiana de *A. fumigatus* ATCC-40640. t-Tukey ($p < 0,05$)....75
- Gráfico 3: Efeito do óleo essencial de *C. zeylanicum* e cetoconazol sobre a cinética de morte microbiana de *A. niger* P-03. t-Tukey ($p < 0,05$).....76
- Gráfico 4: Efeito do óleo essencial de *O. vulgare* e cetoconazol sobre a cinética de morte microbiana de *A. flavus* LM-247. t-Tukey ($p < 0,05$).....77
- Gráfico 5: Efeito do óleo essencial de *O. vulgare* e cetoconazol sobre a cinética de morte microbiana de *A. fumigatus* ATCC-40640. t-Tukey ($p < 0,05$).....77
- Gráfico 6: Efeito do óleo essencial de *O. vulgare* e cetoconazol sobre a cinética de morte microbiana de *A. niger* P-03. t-Tukey ($p < 0,05$).....78

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	17
FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	19
A) Generalidades.....	19
B) <i>Aspergillus</i>	21
C) Disposições gerais sobre fármacos antifúngicos.....	28
D) Produtos naturais.....	32
E) Óleos essenciais.....	33
F) Considerações à cerca das três principais espécies pesquisadas.....	34
OBJETIVOS.....	39
MATERIAL E MÉTODOS.....	40
1. Local de trabalho.....	40
2. Ensaio microbiológico	40
2.1 Material botânico.....	40
2.2 Antifúngico sintético.....	41
2.3 Espécies fúngicas.....	41
2.4 Meio de cultura.....	41
2.5 Inóculo.....	41
2.6 Metodologia: ensaios de atividade antifúngica.....	41
2.6.1 <i>Screening</i> microbiológico.....	42
2.6.2 Análise dos constituintes químicos dos óleos essenciais.....	43
2.6.3 Concentração inibitória mínima (CIM).....	44
2.6.4 Determinação da cinética de morte microbiana.....	46
2.6.5 Interferências dos óleos essenciais sobre a germinação de conídios fúngicos.....	46

2.6.6 Efeito do óleo essencial sobre a morfogênese de cepas de fungos filamentosos.....	48
ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	49
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	88
REFERÊNCIAS.....	90
ANEXOS	

INTRODUÇÃO

Os fungos são seres ubiqüitários e que se disseminam na natureza através de estruturas de reprodução chamadas esporos pelo ar, insetos, água, animais, etc. E dentre os milhares de microrganismos que compõe o reino Fungi estão os *Aspergillus*, fungos geralmente sapróbios, mas que podem causar grandes prejuízos à indústria alimentícia, pela capacidade de deterioração da matéria orgânica (MISHRA & DUBEY, 1994; NOVAK; ALMEIDA; SANTOS, 2002), bem como por produzir danos diretos à saúde do homem, quando este se encontra com o seu sistema imunológico debilitado (GAUR & FLYNN, 2001).

Aspergilose cutânea, otomicose, aspergilose pulmonar invasiva, sinusite aspergilar, aspergilose imunoalérgica, aspergiloma ou bola fúngica e micotoxicoses são algumas das principais manifestações clínicas causadas pelos *Aspergillus* (DUBEY et al., 2006; PASQUIER et al., 2006).

Os medicamentos usados para o tratamento de infecções microbianas tem sido motivo de preocupação e de numerosos estudos para pesquisadores e indústria farmacêutica, pois além do grande problema das inúmeras reações adversas que estes podem apresentar, ainda existe o aparecimento de microrganismos resistentes decorrentes do uso indiscriminado deste tipo de produto. De acordo com Curtis et al. (2005), espécies de *Aspergillus* resistentes a alguns antifúngicos têm causado preocupante prognóstico clínico em pessoas com diversas formas de aspergiloses.

Nesse sentido é impulsionada a busca por novas fontes de substâncias com ação antimicrobiana, com menos efeitos indesejáveis, ou seja, com maior segurança e eficácia para população, além de baixo custo. Sendo tal busca orientada para o uso de plantas medicinais, bem como de seus respectivos metabólitos secundários isolados (CIMANGA et al., 2002; DUARTE et al., 2005).

Dentro desse contexto estão os óleos essenciais, que são metabólitos secundários com comprovadas atividades biológicas, dentre elas antiviral (CHAO; YOUNG; OBERG, 2000), antibacteriana (NOSTRO et al., 2004) e antifúngica (SOUZA et al., 2007). E que além das características acima citadas, que

impulsionam o uso destes produtos, deve-se adicionar o fato deste apresentarem baixo risco de desenvolvimento de resistência microbiana (DAFERERA; ZIOGAS; POLISSIOU, 2003; NOSTRO et al. 2004).

Portanto, este trabalho possibilita contribuir para a pesquisa científica no que se refere à investigação farmacológica de novos antimicrobianos, de forma a proporcionar expectativas para a elaboração de um novo agente farmacológico mais eficaz, com amplo espectro de ação, pouco tempo de uso, mínimas reações adversas e que possam inibir o crescimento de fungos do gênero *Aspergillus*.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

A) Generalidades

Um grande número de doenças tem surgido ultimamente, quer sejam de origem bacteriana, viral ou fúngica. Constituindo sérias preocupações aos profissionais de saúde. O assunto vem despertando interesse dos estudiosos quanto aos aspectos microbiológicos, profiláticos e terapêuticos das infecções oportunistas, a partir do momento que ficou estabelecido que um microrganismo considerado saprófito, pode produzir um processo infeccioso (NOGUEIRA et al., 1988; CLIFT et al., 1988; CUCÉ et al., 1993). Uma preocupação especial tem sido a emergência de infecções causadas por fungos.

Os fungos, seres eucariontes, heterotróficos, possuem ampla distribuição na natureza, podendo ser encontrados em vários habitats, como: ar, água, terra, animais, alimentos. E suas espécies sofrem em sua incidência variações conforme a localidade, estação do ano, grau higroscópico do ar, entre outras (LACAZ; PORTO; MARTINS, 1991; SIDRIM & MOREIRA, 1999).

Primariamente são observados pela sua forma vegetativa. Sendo esta, unicelular como são conhecidas às leveduras, ou multicelular, caso dos filamentosos (mais abundantes na natureza). Ainda existem os dimórficos, ou seja, podem apresentar-se leveduriformes a temperatura de 37-39°C ou filamentosos a temperatura ambiente (SIDRIM & MOREIRA, 1999).

A identificação dos fungos dá-se graças as suas características morfológicas. Macromorfológicamente quanto ao tamanho, textura, bordos, pigmentação, relevo da colônia fúngica crescida em cultura e micromorfológicamente através de estruturas de frutificação e ornamentação (muitas vezes observadas através de microcultivo), sendo realizadas, quando necessário, provas nutricionais, bioquímicas, formação de tubo germinativo, entre outras (LACAZ et al., 1998; SIDRIM & MOREIRA, 1999).

Estes microrganismos geralmente não são patogênicos, mas atuam como patógenos oportunistas quando o hospedeiro apresenta algum tipo de debilitação

em decorrência de doença ou pelo uso de medicamentos imunossupressores. Nessas condições tais organismos podem multiplicar-se e causar doenças, muitas vezes com conseqüências fatais (KERN & BLEVINS, 1999).

De modo geral o diagnóstico da espécie fúngica é feito através de exame direto a fresco com hidróxido de potássio (10-40%) e/ou corado com Gram ou Giensa. Paralelo ao exame a fresco para auxiliar na identificação da espécie, é realizada uma cultura em meio ágar Sabouraud, Sabouraud dextrose ou batata, por exemplo, viabilizando assim a observação das características macro e micromorfológicas, pegando-se um fragmento da colônia e analisando-o entre lamina e lamínula. Cortes histológicos corados com hematoxilina-eosina, Gomori ou Ácido periódico de Schif (PAS), também podem ser requeridos mediante a suspeita clínica (SIDRIM & MOREIRA, 1999).

Várias espécies de fungos anemófilos apresentam grande importância em patologias médicas, tais como os pertencentes aos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Cladosporium*, *Alternaria*, entre outros, tornando-se elementos especialmente alergizantes, fator este bastante preocupante à clínica médica, pois tais microrganismos estão dispersos abundantemente no meio ambiente (GRUMACH, 2001).

Processos alérgicos como rinite, asma alérgica, alveolite alérgica extrínseca, sinusite e micoses pulmonares bem determinadas são algumas das manifestações eventualmente provocadas pela microbiota anemófila exógena (LACAZ, 1984).

As infecções fúngicas têm aumentado nos últimos anos e se tornado um importante problema de saúde pública, devido ao crescente número de pacientes com imunodeficiências inatas ou adquiridas (REX; WALSH; ANAISSIE, 1998; MENCACCI et al., 2000). Sendo as micoses invasivas associadas a uma alta morbidade e mortalidade em pacientes com câncer, quimioterapia intensiva, transplantados, neutropênicos e pacientes com aids (GARBER, 2001). Entre outros fatores de risco destaca-se uso prolongado de corticosteróides e tratamento com antibióticos (RICHARDSON & WARNOCK, 1997).

No ambiente hospitalar é freqüente a presença de microrganismos no ar,

piso, paredes. Estes, de forma oportunista, podem infectar preferencialmente os pacientes imunossuprimidos que fazem uso de cateteres e diálise, crianças, idosos, causando infecções intra-hospitalares severas (ZANON & NEVES, 1987; RICHARDSON & WARNOCK, 1993).

Colombo (2002) afirma que a septicemia por fungos é o tipo de infecção hospitalar com maior índice de mortalidade. Embora seja letal em 60% das ocorrências, pouco se sabe sobre o assunto e ainda não há um meio eficiente de erradicá-los. De acordo com seus estudos, pelo menos 10% dos casos de contaminação do sangue contraídos em internações hospitalares são causados diretamente por fungos. “Muitas vezes o paciente morre por infecção generalizada por fungo, sem que a causa verdadeira seja descoberta”. O mesmo autor afirma que a tendência para o aumento nos casos de infecção por fungo estaria ligada aos próprios procedimentos médicos. Os catéteres e as sondas que perfuram vasos sanguíneos dos pacientes podem fazer com que os fungos se espalhem pelo sistema circulatório. Tratamentos invasivos (como a diálise) e cirurgias no aparelho digestivo estão entre os principais riscos que os pacientes correm de serem atacados por infecções fúngicas.

E dentre os gêneros fúngicos que se destacam por promover enfermidades nos seres humanos, principalmente em indivíduos imunossuprimidos, estão os *Aspegillus*:

B) *Aspergillus*

Reino: Fungi

Divisão: Eumycota

Subdivisão: Deuteromycota

Classe: Hyphomycetes

Ordem: Hyphomycetales

Família: Moniliaceae

Gênero: *Aspergillus*

O gênero *Aspergillus* compreende fungos filamentosos, contaminantes comuns de alimentos, laboratórios e hospitais (OLIVEIRA; ARANTES; CAIUBY, 1999; TRABULSI et al., 2000).

Morfológicamente *Aspergillus* spp. apresentam uma colônia com verso branco, a qual assume tonalidade amarelada, verde, marrom ou preta, dependendo da espécie (figura 1); a textura é aveludada ou cotonosa e o reverso é branco, dourado ou marrom. Microscopicamente as hifas são hialinas, ramificadas e septadas; o conidióforo é ampliado (figura 2) na ponta formando uma vesícula protuberante, as quais são completamente ou parcialmente recobertas por fiáldes, que podem desenvolver-se diretamente sobre a vesícula (uniseriada) ou suportada por uma métula (bisseriada); as fiáldes formam os conídios (LARONE, 1994).

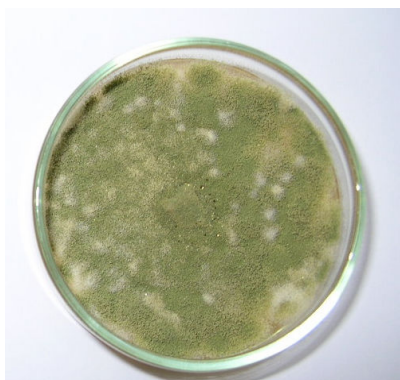


Figura 1 – Macromorfologia de *A. flavus*



Figura 2 – Micromorfologia de *A. flavus*

Algumas espécies de *Aspergillus* são causadores de contaminação de alimentos (KATTA; ESKRIDGE; BULLERMAN, 1995). Por exemplo, fungos como *Aspergillus niger*, saprófitos, capazes de crescer em uma larga gama de substratos orgânicos são freqüentemente responsáveis pela deterioração de alimentos armazenados (MISHRA & DUBEY, 1994).

A aquisição do *Aspergillus* para o ser humano se faz por inalação de conídios que se encontram disseminados de forma universal, podendo também ocorrer colonização de ferimentos, bem como a penetração nos tecidos por

ocasião de incisões cirúrgicas (SIDRIM & MOREIRA, 1999; CHAMILOS & KONTOYIANNIS, 2005; PASQUIER et al., 2006).

O gênero inclui aproximadamente 180 espécies, das quais 33 têm sido associadas com doenças humanas (PERFECT et al., 2001). As infecções causadas por esses fungos são denominadas de aspergiloses, cujas principais espécies envolvidas: *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus terreus* (RODRIGUES et al., 1997). A aspergilose raramente ocorre como doença primária em indivíduos normais, sendo considerada doença oportunística por excelência. A infecção pode se localizar nos pulmões, ouvido, sistema nervoso central, olhos e em outros órgãos (TRABULSI et al., 2000; CHAKRABARTI et al, 2006; DUBEY et al., 2006).

A aspergilose, geralmente começa como doença pulmonar produzindo lesões granulomatosas (tumoriais) nos pulmões ou nos brônquios, que podem disseminar-se do tecido pulmonar para os vasos sanguíneos vizinhos. Depois, a doença passa para o resto do corpo, afetando o encéfalo, o tubo digestivo e os rins. Essa forma pulmonar invasiva de aspergilose está sendo cada vez mais observada em pacientes debilitados, tratados com antibióticos ou submetidos a terapias imunossupressoras ou quimioterapia antineoplásica. A forma disseminada da doença geralmente é aguda e fatal. Em indivíduos sensibilizados, a inalação de conídios de *Aspergillus* spp. pode dar início a acessos de asma brônquica alérgica (KERN & BLEVINS, 1999).

Segundo Gaur e Flynn (2001) indivíduos em tratamento quimioterápico, transplantados, imunodeprimidos (ex. aids) são susceptíveis a inúmeras infecções fúngicas, em especial as invasivas. Espécies de *Aspergillus* estão entre os principais patógenos envolvidos nesse tipo de infecção, a qual é causa importante de morbidade e mortalidade.

Apesar da recente introdução de novos agentes antifúngicos com promissora atividade anti-*Aspergillus*, a mortalidade associada com aspergiloses invasivas é alta, aproximadamente de 80-90% de alto-risco em pacientes com leucemia e transplantados de medula óssea (CHILLER & STEVENS, 2000; KONTOYIANNIS & BODEY, 2002).

Fatores de risco em crianças incluem: neutropenia, imunossupressão, doença granulomatosa crônica, quimioterapia, uso de corticóides. Mas em adultos e pediátricos a granulocitopenia é o maior fator de risco de aspergilose invasiva (WAIMSLEY et al., 1993; ABBASI et al., 1999).

Sidrim e Moreira (1999) relatam que os principais quadros clínicos observados no homem podem ser assim sumariados: aspergilose cutânea, otomicose aspergilar, aspergiloma ou bola fúngica, aspergilose pulmonar invasiva, sinusite aspergilar, aspergilose imunoalérgica e micotoxicose.

ASPERGILOSE CUTÂNEA - A implantação do *Aspergillus* spp. em pele pode ser primária, resultando de um traumatismo em pele, como nos pacientes gravemente queimados, ou ainda, mais freqüentemente, a manifestação de uma disseminação hematogênica a partir de um foco primário, geralmente pulmonar. Ambas as formas de aquisição da doença estão relacionadas a pacientes severamente imunossuprimidos. O aspecto das lesões clínicas é bastante polimórfico, podendo ser evidenciados pápulas, pústulas, nódulos, abscessos subcutâneos, granulomas e mesmo lesões necrosantes (SIDRIM & MOREIRA, 1999).

OTOMICOSE ASPERGILAR - É geralmente uma infecção subaguda ou crônica caracterizada por inflamação exsudativa e prurido do conduto auditivo externo. A umidade e o calor são considerados os fatores predisponentes mais importantes (TRABULSI et al., 2000).

Essa patologia é observada mais freqüentemente como uma infecção secundária do conduto auditivo externo de pacientes que apresentam lesão eczematosa e que fizeram uso local de antimicrobianos e corticóides (NOVAK; ALMEIDA; SANTOS, 2002). Segundo Trabulsi et al. (1999), 90% dos casos de otomicoses são causadas por *Aspergillus niger*, sendo os 10% restantes por *Penicillium* spp.

ASPERGILOMA OU BOLA FÚNGICA - Corresponde a uma forma habitual de desenvolvimento de conídios fúngicos inalados, quase sempre, em uma

cavidade. Ao se instalarem na cavidade pulmonar, os conídios podem encontrar condições nutricionais adequadas, bem como uma boa aeração para o seu desenvolvimento. As espécies mais freqüentemente implicadas são *A. fumigatus*, seguida do *A. flavus* e *A. niger*. A ausência ou insuficiente defesa local permite o desenvolvimento abundante do fungo, podendo preencher cavidades preexistentes, por abscessos, tuberculose ou cistos, formando-se uma massa miceliana compacta conhecida como aspergiloma intracavitário (bola fúngica). Quando ocorre invasão das paredes dos vasos sanguíneos angéites e trombozes podem acontecer (SIDRIM & MOREIRA, 1999; TRABULSI et al., 2000).

ASPERGILOSE PULMONAR INVASIVA – caracteriza-se como uma das manifestações clínicas mais importantes. Foi uma das primeiras micoses viscerais descritas na literatura médica (TRABULSI et al., 2000).

Infecção de natureza, sobretudo nosocomial, vem apresentando um aumento significativo em sua freqüência nos últimos anos. A sintomatologia se traduz por febre, hemoptise, dor torácica, tosse e dispnéia. Ao Raio-X as alterações mais precoces são inespecíficas, caracterizando-se por um infiltrado pneumônico, consolidação lombar, broncopneumonia e cavitação. A evolução das lesões é rápida, observando-se diariamente novos padrões. As alterações radiológicas mais sugestivas, entretanto são, muitas vezes, de aparecimento tardio, fazendo-se presentes apenas no período *ante mortem*. Essas se traduzem por broncopneumonia necrosante, infarto hemorrágico, abscesso pulmonar e pneumonia lobar. Mesmo assim, os dois primeiros achados podem lembrar uma embolia pulmonar e os dois últimos abscesso bacteriano e pneumonia bacteriana, respectivamente (SIDRIM & MOREIRA, 1999).

SINUSITE ASPERGILAR - *Aspergillus* spp. pode causar lesão clínica nos seios paranasais com diversas apresentações, como aspergiloma, aspergilose invasiva, aspergilose localizada e aspergilose alérgica. O aspergiloma se traduz por massas micelianas semelhantes a “bolas fúngicas”, mais comumente localizados nos seios maxilares levando a um quadro de sinusite crônica ou obstrução nasal. O prognóstico é desfavorável, sobretudo, pela capacidade de

destruição óssea e extensão da infecção à base do crânio e órbita ocular. Essa infecção acomete principalmente os seios maxilares de pacientes que apresentam processo dentário, como granuloma apical, fístula buco-sinusal e, sobretudo, naqueles que se submeteram a mobilização dentária. O fungo mais freqüentemente encontrado nesses quadros é *A. fumigatus*, seguido de *A. flavus* e *A. niger* (SIDRIM & MOREIRA, 1999).

ASPERGILOSES IMUNOALÉRGICAS - Essa entidade subdivide-se em duas outras: a primeira é conhecida como aspergilose broncopulmonar alérgica, que se traduz pela formação, nos brônquios, de verdadeiros moldes mucosos contendo filamentos aspergilares. Esse quadro clínico é observado, sobretudo, em indivíduos atópicos, nos quais se observa eosinofilia associada a aumento de IgE total e específica; o segundo quadro denomina-se alveolite alérgica extrínseca e caracteriza-se por episódios de broncopneumopatias de repetição, levando a uma insuficiência respiratória por fibrose pulmonar. Esse quadro se faz presente em indivíduos não-atópicos, submetidos constantemente a uma contaminação maciça por inalação de conídios de *Aspergillus* spp., situação muito observada em pessoas que trabalham manipulando feno e outros resíduos orgânicos ricos em *Aspergillus* spp. (SIDRIM & MOREIRA, 1999).

MICOTOXICOSES - O termo micotoxina é usado para definir um grupo de compostos altamente tóxicos que são produzidos por certos fungos que infectam produtos e subprodutos agrícolas, tais como milho, amendoim, trigo, cevada e centeio (NOVAK; ALMEIDA; SANTOS, 2002).

No homem, a literatura tem mostrado vários relatos de micotoxicoses em pequenas comunidades que fazem uso, na alimentação, de cereais contaminados com esses fungos (SIDRIM & MOREIRA, 1999).

Os fungos produtores de micotoxinas são abundantes no solo, em moendas, silos, enfim, em todo e qualquer lugar onde se armazene e se processe o produto. O ataque dos grãos de milho pelos fungos produtores de micotoxinas começa ainda no campo, durante o desenvolvimento, maturação e colheita, ou pode ocorrer antes da secagem. Os fatores responsáveis pelo crescimento fúngico são a temperatura, umidade relativa, umidade do grão ou da ração pronta,

concentração de oxigênio, presença de fungo e tempo. A umidade é o principal fator do crescimento fúngico e conseqüentemente da deterioração de grãos e rações (NOVAK; ALMEIDA; SANTOS, 2002).

Dentre as principais toxinas de *Aspergillus* relacionadas com quadros de micotoxicoses estão as aflatoxinas, as quais são metabólitos secundários tóxicos produzidos por espécies de *Aspergillus*, especialmente *A. flavus* e *A. parasiticus*. A ocorrência de aflatoxinas em alimentos é considerada um risco potencial à saúde humana, principalmente pela presença destas contaminando diretamente grãos e sementes, assim como produtos derivados, carreando essas micotoxinas e outros metabólitos em tecidos animais, contaminando carnes, leite (KOTSONIS; BURDOCK; FLAMM, 2001).

As quatro maiores aflatoxinas de ocorrência natural conhecidas são aflatoxina B1 (AFB1), aflatoxina B2 (AFB2), aflatoxina G1 (AFG1) e aflatoxina G2 (AFG2). As aflatoxinas têm demonstrado ser potenciais causadoras de carcinogênese, mutagênese e teratogênese (KOTSONIS; BURDOCK; FLAMM, 2001). Sendo o tipo B1 o composto mais tóxico e potencialmente mais carcinogênico, de acordo com a International Agency for Research on Cancer (IARC) in 1987 (IARC, 1987). O alvo primário no organismo para toxicidade e carcinogenicidade é o sistema citocromo P450, que a transforma no composto altamente reativo chamado AFB1-8, 9-epoxide (PERAICA et al., 1999; WILLIAMS et al., 2004). Os efeitos das aflatoxinas incluem: inibição do DNA, RNA e síntese de proteínas, depressão do metabolismo da glicose, inibição da síntese de lipídios como fosfolipídios, colesterol, triglicerídios, entre outros ésteres (BUSHBY & WOGAN, 1981).

Ocratoxina A (OTA) é uma outra toxina produzida principalmente pelo *A. Ochraceus* e *Penicillium verrucosum*. Vários autores descrevem efeitos neurotóxicos, carcinogênicos e nefrotóxicos (BEDELE et al., 1985; THUVANDER et al., 1996; BRUININK & SIDLER, 1997). Assim como as aflatoxinas elas podem ser encontradas em alimentos como cereais, frutas e bebidas como a cerveja (VISCANTI; PASCALE; CENTONZE, 2000).

Fungos do gênero *Aspergillus* também são capazes de produzir uma toxina chamada gliotoxina, a qual é um composto de baixo peso molecular produzido por *A. fumigatus*, *A. chavalieri* e *A. terreus*. De acordo com estudos *in vitro* sobre o mecanismo molecular de infecção das vias aéreas, causado por *A. fumigatus* (provocando danos ao epitélio respiratório humano), considerou-se a gliotoxina como possível responsável pelo estabelecimento da patologia (AMITANI et al., 1995).

A gliotoxina tem demonstrado uma potente atividade imunossupressora *in vitro* e *in vivo*, inibindo a aderência de macrófagos a superfícies peritoneais e pulmonares, além de induzir apoptose nestas células entre outras da linhagem hematopoética (BAUER; ABBOTT; GEDEK, 1989).

Em experimentos *in vivo* observou-se que dependendo da concentração, essa toxina era capaz de diminuir os movimentos ciliares e causar danos ao epitélio e a mucosa respiratória (BELKACEMI et al., 1999).

C) Medicamentos antifúngicos

O termo antimicrobiano é utilizado, embora muitas vezes como sinônimo de antibiótico, para designar fármacos usados no tratamento de doenças infecciosas no geral, ou seja, infecções bacterianas, fúngicas e virais. Essa terminologia teve seu início com a descoberta da penicilina em 1929 por Fleming (ANDREAZZA, 2000; FRANCO, 2003).

Dentre as classes mais utilizadas, principalmente em se tratando de infecções por *Aspergillus* estão os polienos, como anfotericina B e os derivados imidazólicos, como cetoconazol.

Os polienos

Os polienos são fármacos que se ligam a esteróis na membrana celular e formam canais, permitindo que íons de K^+ e Mg^{2+} saiam da célula. Da seguinte forma: a droga liga-se ao esterol e se integra à membrana para formar um anel

com um poro no centro em cerca de 0,8 nm de diâmetro. A perda de eletrólitos, em especial de K^+ provoca uma perturbação no metabolismo celular, a qual se acredita que altere a atividade de enzimas da membrana. Os políenos possuem forte afinidade pelo ergosterol, substância abundante nas membranas fúngicas (BRODY, 1994).

Os principais efeitos adversos estão associados à administração endovenosa. Reações iniciais são febre de até 40°C, calafrios, cefaléia, náuseas e ocasionalmente hipotensão. A maioria dos pacientes desenvolve algum grau de nefrotoxicidade. Devido a uma diminuição inicial da taxa de filtração glomerular que resulta da ação vasoconstritora nas arteríolas aferentes. Pode ser acompanhada de um efeito no túbulo renal distal que causa perda de K^+ , hipomagnesemia, provocada por insuficiência na reabsorção de Mg^{2+} ou acidose tubular (BRODY, 1994; SIDRIM & MOREIRA, 1999).

Segundo Brody (1994) alterações patológicas induzidas por essas drogas nos rins incluem danos à membrana basal glomerular, hiper celularidade, fibrose e hialinização dos glomérulos com nefrocalcinose. O comprometimento renal diminui a produção de eritropoetina o que pode causar anemia normocrômica normocítica com hematócritos de 22 a 35%.

Outras formas de toxicidade envolvem rara neurotoxicidade, disritmias cardíacas, infiltrados pulmonares, exantema e anafilaxia. Segundo Fuchs, Wannmacher, Ferreira (2004) a anfotericina B é bastante tóxica, sendo rara a ausência de efeitos adversos com seu emprego. Anorexia, mal-estar generalizado, vertigens, dores difusas, choque anafilático, convulsões, insuficiência hepática aguda, arritmias, erupções cutâneas e surdez. Inibe a medula óssea, sobretudo a produção de células vermelhas (baixa eritropoetina). Mais de 80% dos usuários apresentam prejuízo da função renal reversível na maioria dos casos.

Ainda conforme o autor supracitado a administração intratecal pode produzir dor ao longo da distribuição dos nervos lombares, cefaléia, parestesias, paralisias nervosas, meningite química, dificuldade de micção, distúrbios visuais. Parkinsonismo transitório ou persistente. Reações respiratórias, como dispnéia e infiltrados pulmonares. Hepatotoxicidade grave, porém reversível.

Os imidazóis

O mecanismo de ação destes fármacos envolve inibição da síntese de esteróis da membrana por inibir a incorporação ou síntese de ergosterol. Ocorre uma interação com a 14- α -desmetilase dependente de citocromo P-450 e como resultado o ergosterol não é produzido. Em altas concentrações causa extravasamento de K^+ e outros componentes dos fungos, pela membrana plasmática. Além de inibir a síntese de ergosterol ocorre também inibição da síntese de colesterol e interfere na ação dos complexos enzimáticos citocromo P-450 em diversos tipos celulares de mamíferos, incluindo as células de Leydig. O resultado é uma queda das concentrações circulares de testosterona nos homens adultos (dependendo da dose empregada). As concentrações dos hormônios luteinizantes e folículo – estimulantes elevam-se em virtude da queda do feedback negativo da testosterona (BRODY, 1994).

Cerca 3 a 20% dos indivíduos tratados com cetoconazol apresentam náuseas e vômitos. Febre, prurido, icterícia, dor abdominal, cefaléia, tonturas, diarreia, apresentam uma incidência de 1% ou menos, e entre outros agravos toxicidade hepática e morte, podem acontecer. O indivíduo pode apresentar ainda ginecomastia transitória e hipersensibilidade dolorosa da mama devido ao bloqueio da síntese de testosterona; no caso de altas doses, podem levar a oligospermia, azoospermia, impotência, irregularidades menstruais, bloqueio da síntese de cortisol e supressão da resposta adrenal ao hormônio adrenocorticotrófico (BRODY, 1994; FUCHS; WANNMACHER; FERREIRA, 2004).

Resistência

Além dos efeitos indesejáveis que os fármacos antifúngicos podem proporcionar existe ainda outro grande problema atual que é o surgimento de cepas resistentes. A resistência de espécies de *Aspergillus* a alguns antifúngicos usados na clínica tem sido a causa de prognóstico clínico preocupante em pessoas acometidas por diferentes formas clínicas de aspergiloses (MOORE et al., 2000; CANUTO & RODERO, 2002; CURTIS et al., 2005).

Durante cinquenta anos os antibióticos têm sido usados para tratamento ou inibição da maioria das infecções e este amplo uso em ambas as medicinas humana e animal tem sido responsável pelo aparecimento de cepas resistentes na escala evolutiva microbiana (DESSELBERGER, 2000; KONTOYIANNIS & LEWIS, 2002).

A pressão seletiva induzida pelo uso de drogas antifúngicas profiláticas foi considerado como um fator contribuidor para o aparecimento de algumas infecções fúngicas incomuns ocasionadas por fungos: *Aspergillus terreus*, *Fusarium* spp. *Zygomycetes* (PAVIE et al., 2005). Mas, geralmente *Aspergillus fumigatus* é a espécie que se destaca nas ocorrências de aspergiloses invasivas, e sua sensibilidade atualmente esta bem menor aos agentes antifúngicos, principalmente em pacientes imunossuprimidos.

Poucos estudos clínicos têm apontado para a possibilidade da pré-exposição de pacientes com câncer a antifúngicos estar associada com o aumento da freqüência de resistência de espécies de *Aspergillus*. Espécies fúngicas de *Aspergillus* não-fumigatus, tipo *A. flavus*, *A. terreus* e *A. niger* são mais freqüentes em pacientes com câncer pré-expostos a anfotericina B ou triazóis (KONTOYIANNIS & LEWIS, 2002; LIONAKIS et al., 2005).

Pode-se observar de acordo com vários autores (KONTOYIANNIS & LEWIS, 2002; LIONAKIS et al., 2005; VAN et al., 2005) que a resistência fúngica está predominantemente associada com o uso profilático dos antifúngicos, em pacientes imunodeprimidos, como os portadores de câncer.

Formulações lipídicas de anfotericina B, caspofungin, micafungin, posaconazole são opções terapêuticas razoáveis para aspergilose progressiva ou refratária (HERBRECHT et al., 2005).

Graças ao aumento da importância clínica dada às infecções fúngicas e o progressivo desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos é que um grande número de pesquisas científicas enfatizando propriedades antifúngicas de produtos vegetais tem sido avaliada (SOUZA et al., 2007; ATANDA; AKPAN; OLUWAFEMI, 2007).

D) Produtos naturais

Os vegetais podem ser fonte de recursos terapêuticos em várias instâncias, podendo ser utilizados de diversas maneiras, com diferentes propósitos: *in natura*, com partes inteiras ou sob a forma rasurada para preparação de chás ou outras preparações sob a forma de drogas pulverizadas, extratos brutos ou frações, tinturas, comprimidos, cápsulas, etc.; e finalmente, podem ser submetidos a sucessivos processos de extração e purificação, para isolamento de substâncias de interesse (RATES, 2001).

Cientificamente está comprovado que inúmeros extratos vegetais apresentam atividade antimicrobiana devido a atividade de seus constituintes químicos que em baixas concentrações, exercem inibição sobre o crescimento de bactérias gram-positivas e negativas, além de micobactérias, leveduras e fungos filamentosos, confirmando a grande importância que tais produtos possuem como perspectivas para a produção de novos e eficientes produtos farmacêuticos, que possam ser usados na medicina para a terapêutica de processos infecciosos (LIMA, 2001).

De acordo com Organização Mundial de Saúde (OMS) cerca de 65 a 80% da população mundial não têm acesso ao atendimento primário de saúde e recorre à medicina tradicional, especialmente às plantas medicinais, na procura de alívio para muitas doenças (CALIXTO & YUNES, 2001). Grande parte (30% a 40%) dos medicamentos utilizados na medicina moderna são direta ou indiretamente derivados da natureza (CALIXTO et al., 1998). Certamente a terapêutica moderna composta por um grande número de medicamentos com ações específicas sobre receptores, enzimas e canais iônicos, não teria atingido o grau de desenvolvimento atual se não fosse o auxílio dos produtos naturais (CALIXTO, 2003).

As propriedades bacteriostáticas, bactericidas, fungistáticas e fungicidas a partir de produtos vegetais, têm sido comprovadas através de intensivas pesquisas em todo mundo (RASOOLI; REZAEI; ALLAMEH, 2006; SHARMA & TRIPATHI, 2006; SOUZA et al., 2007). Geralmente, são estudadas, avaliadas e

confirmadas através de ensaios biológicos *in vitro* – testes de susceptibilidade ou sensibilidade. Estes ensaios são realizados por meio de técnicas padronizadas, incluindo os métodos de diluição em tubos e difusão em meio sólido – disco, cavidade, cilindro (ALLEGRINI; BOUCHBERG; MAILLOLS, 1973; CASALS, 1979; MIMS et al., 1995).

Os microrganismos que incidem diretamente ao ser humano têm despertado grande interesse na procura constante de novos agentes químicos que provoquem a eliminação ou melhoria das doenças infecciosas inerentes. Isto leva, algumas vezes, ao desenvolvimento de novos agentes que combinem atividades antibacterianas e antifúngicas numa tentativa de melhor combater as enfermidades. E é nessa realidade, que o estudo de produtos de origem vegetal com a atividade antimicrobiana vem crescendo (BELEM et al., 1989; BELEM et al., 2002; CALIXTO et al. 1998; YUNES; PEDROSA; CECHINEL FILHO, 2001).

E) Óleos essenciais

Os óleos essenciais são líquidos voláteis, refringentes, de odor característico e se formam num grande número de plantas como subprodutos do metabolismo secundário. Estes se apresentam constituídos principalmente de monoterpenos, sesquiterpenos, fenil-propanóides, ésteres e outras substâncias de baixo peso molecular (CRAVEIRO & QUEIROZ, 1993).

As propriedades antimicrobianas e antioxidantes dos óleos essenciais de muitas plantas têm sido recentemente de grande interesse na academia e para indústria alimentícia, por causa do possível uso deles como elementos aditivos naturais, impulsionado pela tendência crescente para substituir agentes sintéticos com tais propriedades por um natural. O uso de combinações de antimicrobianos naturais é importante não só na preservação de comida, mas também no controle de doenças de origem microbiana que afetam tanto vegetais quanto o homem (BARATTA et al., 1998).

Os óleos essenciais como agentes antimicrobianos apresentam duas principais características: i) sua origem natural, o que significa mais segurança para os consumidores e para o meio ambiente; e ii) são considerados como possuidores de baixo risco de desenvolvimento de resistência microbiana frente a sua ação. A segunda característica citada toma como base o fato de que os óleos essenciais são compostos por misturas de componentes, que, aparentemente, apresentam diferentes mecanismos de atividade antimicrobiana, e desta forma torna mais difícil à adaptabilidade dos microrganismos (DAFERERA; ZIOGAS; POLISSIOU, 2000).

F) Considerações sobre as três principais espécies vegetais pesquisadas

Cinnamomum zeylanicum Blume (Família Lauraceae)

Cinnamomum zeylanicum Blume conhecida popularmente como canela ou canela-do-Ceilão é originária de algumas regiões da Índia e do Ceilão (figura 3). Sua árvore é caracterizada por apresentar uma altura de 6-12m; casca pálida e sem pêlos. Suas folhas são simples, opostas e lanceoladas. Suas flores são pequenas, de cores branco-amareladas, formando pequenas panículas. É cultivada em países tropicais da América, em especial, Brasil. Sendo as cascas e folhas as partes utilizadas com fins terapêuticos (ALONSO, 1998).

Certamente é uma das especiarias mais antigas de que se tem notícia, sendo mencionada no antigo testamento e era uma das drogas mais importantes da farmacopéia grega e romana (LAVABRE, 1992).

A presença do óleo essencial na planta apresenta uma variação em torno de 0,5 a 5%. O óleo é composto principalmente por aldeídos aromáticos (60 a 75%), destacando-se entre eles aldeído cinâmico, principal constituinte da casca. Em menor quantidade encontra-se eugenol, α -pineno, β -cariofilneo, entre outros (CARRICONDE et al., 1996; ALONSO, 1998).

A canela e o seu óleo essencial são empregados como corretivos do odor e sabor na preparação de alguns medicamentos (COSTA, 1975). As atividades farmacológicas de *C. zeylanicum* B. estão fundamentalmente relacionadas aos seus óleos essenciais, que incluem: espasmolítica, antiinflamatória, antipirética, carminativa, antibacteriana, antifúngica, larvicida, sedante, antihipertensiva (CARRICONDE et al., 1996).



Figura 3 - *Cinnamomum zeylanicum* B.

Uma considerável atividade antimicrobiana, produzida pelos óleos essenciais de *C. zeylanicum* B. tem sido evidenciada contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (CHAO; YOUNG; OBERG, 2000), vírus (MANCINI et al., 1999), fungos leveduriformes e filamentosos (BELÉM, 2002; GAYOSO et al., 2004; MOREIRA, 2006).

***Origanum vulgare* L. (Família Labiatae)**

Origanum vulgare L. conhecido popularmente como orégano (figura 4). Esta planta pertencente ao gênero *Origanum* é uma erva perene na forma de arbusto e nativa das regiões Euro-Siberiana e Irano-Siberiana (ALIGIANS et al., 2001).

É uma planta aromática essencial para uso médico e culinário desde a antiguidade, onde Teofrasto, Aristóteles e Hipócrates elogiavam sua ação benéfica nas doenças respiratórias, úlceras e queimaduras (LAVABRE, 1992).



Figura 4 – *Origanum vulgare*, obtido de http://www.rolv.no/images/planteleksikon/O/origanum_vulgare.jpg10

Devido sua ampla variedade de características químicas e de aroma é amplamente utilizado como insumo na indústria farmacêutica e cosmética, como

erva culinária, como flavorizante de alimentos, em bebidas alcoólicas e em perfumaria (NOVAK et al., 2000; ALIGIANIS et al., 2001).

Dentre as propriedades medicinais destacam-se: expectorante, analgésico, carminativo, antiviral, antiinflamatório, anti-séptico e tônico (LAVABRE, 1992; SAHIN et al., 2004).

O óleo essencial apresenta dentre outros fitoconstituintes *p*-cimeno, γ -terpineno, α -terpineol, cariofileno e timol. Sendo este último responsável por cerca de um terço da constituição do óleo (SARTORATTO et al., 2004; FALEIRO et al., 2005).

Na literatura encontram-se vários relatos sobre a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *O. vulgare* L. contra várias bactérias como *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes* (ZARGARI, 1990; LEUNG & FOSTER, 1996) e fungos como *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp. e *Fusarium* spp. (AKGUL & KIVANÇ 1988; DAFERERA; ZIOGAS; POLISSIOU, 2003).

***Caryophyllus aromaticus* L. (Família Myrtaceae)**

Caryophyllus aromaticus L. (*Eugenia caryophyllata*) conhecido popularmente como cravo da Índia é originário das ilhas Molucas (figura 5). É uma árvore verde em forma de coluna, que pode chegar a 15 metros de altura. Desenvolve-se melhor em lugares claros. A flor possui brotos de tonalidade marrom-avermelhadas. As folhas são pequenas e acinzentadas (CORREA, 1984; MAZZAFERA, 2003).

Possui aroma intenso e sabor picante devido à presença de 15-25% de óleo essencial incolor ou amarelado, sendo por isso, bastante utilizado na culinária e nas indústrias de perfumarias e licores (CORREA, 1984).

Popularmente o cravo é indicado como: analgésico, anestésico, antifúngico, antibacteriano, antiespasmódico além de estimulante do apetite (SELLAN, 2002). Alguns constituintes químicos (fitoconstituintes) do seu óleo essencial tipo eugenol

(70%), cariofileno, furfurool, salicilato de metila geralmente estão relacionados com suas propriedades antimicrobianas.



Figura 5 - *Caryophyllus aromaticus*, obtido de <http://pat.feldman.com.br/patblog/wp-content/uploads/2007/06/cravo.jpg>

Seu óleo é usado na odontologia como analgésico e antisséptico, com comprovada ação bactericida (LAVABRE, 1992). Muitos trabalhos relatam outras ações além de bactericida, como fungicida, antiviral, inseticida (NASCIMENTO et al., 2000; BELÉM, 2002; MOREIRA, 2006).

A busca por novas fontes terapêuticas alternativas (em especial os óleos essenciais) para tratamento de infecções por fungos do gênero *Aspergillus* é motivada não só pelas manifestações clínicas que estes provocam em indivíduos susceptíveis a sua colonização e infecção, mas também devido à toxicidade dos antifúngicos sintéticos disponíveis no mercado e principalmente pelo aparecimento de cepas resistentes a essas drogas.

OBJETIVOS

Geral:

- ❖ Estudar e avaliar a sensibilidade *in vitro* de fungos do gênero *Aspergillus* frente aos óleos essenciais de *Caryophyllus aromaticus* L., *Cinnamomum zeylanicum* Blume, *Cuminum cyminum* L., *Eucalyptus globulus* L., *Mentha piperita* L., *Ocimum basilicum* L., *Origanum majorana* L., *Origanum vulgare* L. e *Zingiber officinalis* Rosc.,

Específicos:

- ❖ Realizar um *screening* microbiológico dos óleos essenciais acima citados contra seis espécies de *Aspergillus*;
- ❖ Analisar quais os constituintes químicos presentes nos óleos essenciais com melhor atividade, baseado no resultado do *screening*;
- ❖ Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) dos óleos essenciais com melhor atividade;
- ❖ Estudar os efeitos desses produtos vegetais sobre a cinética de morte microbiana;
- ❖ Avaliar a interferência dos óleos essenciais sobre a germinação dos esporos fúngicos;
- ❖ Identificar as possíveis alterações morfológicas após exposição ao óleo essencial com melhor atividade sobre as cepas de *Aspergillus*.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Local de trabalho: o trabalho foi realizado no Laboratório de Micologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas, Laboratório de Microscopia e Imagem Biológica, ambos do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba – UFPB, Laboratório de Produtos Naturais do Instituto Agrônomo de Campinas e Laboratório de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco.

2. Ensaio Microbiológicos

2.1 Material Botânico:

As espécies vegetais, nativas ou adaptadas a região Nordeste brasileira foram selecionadas a partir de informações na literatura sobre seu uso na medicina popular; por sua atividade farmacológica antifúngica já comprovada e espécies em estudo no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (LTF).

Os óleos essenciais foram adquiridos na Ferquímica Indústria e Comércio Ltda./ Vargem Grande Paulista, São Paulo, Brasil. Os mesmos foram obtidos a partir das espécies vegetais relacionadas no quadro 1.

Quadro 1. Espécies vegetais das quais foram obtidos os óleos essenciais.

Espécie	Família	Nome popular	Parte utilizada
<i>Caryophyllus aromaticus</i> L.	Mirtaceae	Cravo	Folha
<i>Cinnamomum zeylanicum</i> B.	Lauraceae	Canela	Folha
<i>Cuminum cyminum</i> L.	Apiaceae	Cominho	Semente
<i>Eucalyptus globulus</i> L.	Mirtaceae	Eucalipto	Folha
<i>Mentha piperita</i>	Labiadas	Hortelã	folha
<i>Ocimum basilicum</i> L.	Lamiaceae	Basilicão	Folha
<i>Origanum majorana</i> L.	Labiataeae	Manjerona	Folha
<i>Origanum vulgare</i> L.	Labiataeae	Orégano	Folha
<i>Zingiber officinalis</i> Rosc.	Zingiberaceae	Gengibre	Raiz

2.2 Antifúngico sintético

Para o controle de avaliação da atividade antifúngica dos produtos naturais e sintéticos foram utilizados como padrão anfotericina B (100µg/mL) e o cetoconazol (50µg/mL) ambos do Centro de Controle e Produtos para Diagnósticos - CECON/SP.

2.3 Espécies fúngicas

Nos ensaios de atividade antifúngica foram selecionadas cepas de fungos do gênero *Aspergillus* de meio ambiente, isoladas em Laboratório de Micologia e cepas padrões da American Type Culture Collection – ATCC e do Northern Regional Research Laboratory - NRRL. As cepas foram mantidas em agar Sabouraud dextrose (ASD) a temperatura ambiente (28-30°) e a 4°C (refrigeração).

2.4 Meio de cultura

Nos ensaios de susceptibilidade foi utilizado o meio ágar Sabouraud dextrose - ASD (Difco Laboratórios Ltda), preparado conforme instruções do fabricante.

2.5 Inóculo

A partir das culturas recentes e mantidas em ágar Sabouraud dextrose, de 7 a 14 dias a temperatura ambiente, o inóculo foi preparado e padronizado em solução salina fisiológica estéril. Inicialmente foi preparada uma suspensão comparativa com a de sulfato de bário do tubo 0.5 da Escala de Mc Farland e contagem celular em câmara de Newbaeuer. A mesma ajustada no espectrofotômetro (Leitz-Photometer 340-800), para conter aproximadamente 10⁶ UFC/mL (CASALS, 1979; CLEELAND & SQUIRES, 1991; ODDS, 1989).

2.6 Metodologia: ensaios de atividade antifúngica

Os ensaios para avaliação de atividade antifúngica foram realizados pela técnica de difusão em meio sólido, ágar Sabouraud dextrose, tanto para o

screening quanto para a determinação da concentração inibitória mínima – CIM. Esses ensaios foram realizados conforme protocolo de Bauer, Kirby e Turck (1966); Holt (1975); Cleeland e Squires (1991); Hadacek e Greger (2000) e NCCLS (2000).

2.6.1 *Screening* microbiológico

O método utilizado foi macrodiluição por difusão em meio sólido (figura 6). Em placas de Petri (90x15mm), da marca Dispo Petri/ Interlab, esterilizadas, colocou-se 1mL da suspensão do microrganismo preparada como citado anteriormente. Em seguida, adicionou-se 21mL do meio de cultura fundido (50°C) e homogeneizado lentamente. Após solidificação foram depositados, na superfície do meio, discos de papel de filtro (CECON/SP) embebidos com 20 µL de cada óleo essencial *in natura*. O sistema foi então incubado a 28-30°C por 7-14 dias.

A presença da atividade antifúngica foi evidenciada pela formação de halos de inibição de crescimento em volta dos discos de papel. Cada ensaio foi realizado em duplicata e o resultado expresso pela média dos halos de inibição obtidos nos dois ensaios. A atividade antifúngica foi considerada positiva, quando a média dos resultados foi igual ou superior a 10 mm de diâmetro (SAKAR; TAMER; TOKUR, 1988; WONG-LEUNG, 1988; ALVES et al., 2000).

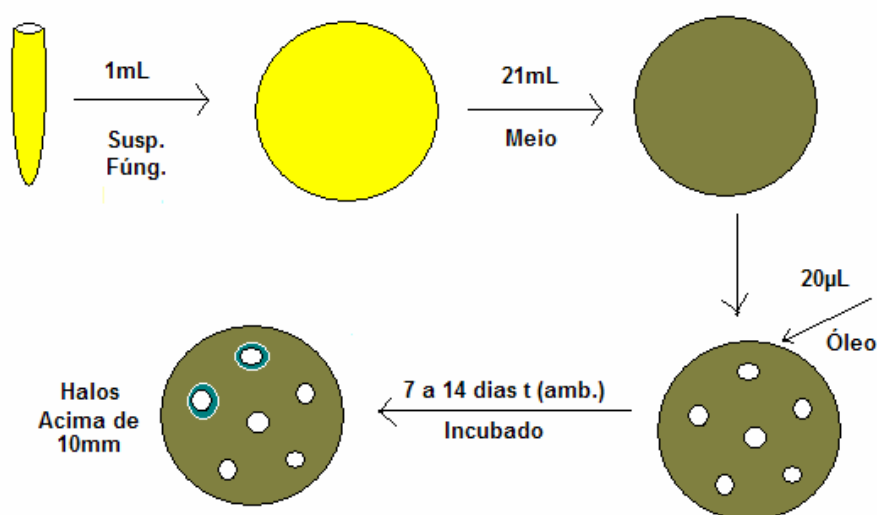


Figura 6 – Fluxograma do *screening* microbiológico.

2.6.2 Análise dos constituintes químicos dos óleos essenciais

A análise da composição das alíquotas dos óleos essenciais selecionados na triagem anterior foi realizada utilizando-se Cromatógrafo Gasoso (CG-A17) acoplado a espectrômetro de massa operando por impacto de elétrons.

Para a separação dos componentes do óleo essencial foram utilizadas as seguintes condições analíticas:

- Diluição da amostra: 1µL de óleo essencial: 1mL de Hexano;
- Volume de injeção da amostra: 1µL;
- Temperatura do injetor: 230 °C;
- Gás de arraste: hélio (He);
- Vazão do gás de arraste: 0,9 mL/min.;
- Taxa de *split*: 1:55;
- Pressão na cabeça da coluna: 48,9 psi;
- Temperatura do detector: 280 °C;
- Característica da coluna: coluna capilar apolar de sílica fundida OV de 30m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno, 0,25µm de diâmetro do filme da fase estacionária líquida;
- Programa de temperatura: temperatura inicial de 60°C; aumento de 3°C/min até 240°C permanecendo em 240°C por 10 minutos.

As condições de uso do espectrômetro para a detecção e identificação dos componentes do óleo essencial foram as seguintes:

- Temperatura da linha de transferência: 170°C;
- Voltagem de ionização: 70 eV;
- Faixa de *scanning* de massas: de 40-550 u.m.a. (unidade de massa atômica);
- Frequência de *scanning* (*scan time*): 0,5s;
- Demora no início de atuação do espectrômetro (*delay*): 1,5min.

A identificação dos constituintes do óleo essencial foi efetuada junto ao sistema de computação e processamento de dados (*workstation*) interligado ao GC-MS QP5050A (Shimadzu, Japão). O sistema é equipado com uma biblioteca do NIST 98 (NIST 98 *library*, *National Institute of Standards & Technology*, EUA) contendo aproximadamente um total de 150.000 espectros de referência e dados da literatura, de modo que uma comparação do espectro de um pico constando na amostra pela equiparação automática com os espectros de referência existentes fornecendo designação estrutural do composto (McLAFFERTY & STAUFFER, 1989; ADAMS, 1995).

A quantificação dos componentes do óleo essencial foi relacionada à percentagem de área do pico de cada componente em relação à área total de todos os picos normalizados no cromatograma.

2.6.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A determinação da CIM foi realizada usando-se os óleos essenciais que apresentaram melhor atividade antifúngica a partir do *screening* (figura 7). A técnica utilizada foi a de difusão em meio sólido, processo cavidade em placa. Em placas de Petri (90x15mm), da marca Dispo Petri/ Interlab, esterilizadas, colocou-se 1mL da suspensão do microrganismo preparada como citado anteriormente. Em seguida, adicionou-se 21mL do meio de cultura fundido (50°C) e homogeneizado lentamente. Após solidificação foram feitas cavidades com cânulas de vidro estéreis de 6x8mm de diâmetro, na superfície da cultura. Cada amostra a ser testada foi preparada da seguinte forma: em um tubo de ensaio (120x12mm de diâmetro) estéril foi adicionado 1,6mL do óleo, 0,04mL do TWEEN 80 (SIGMA CHEMICAL) e q.s.p. 5mL de água destilada estéril, sendo submetida a agitação no aparelho por cinco minutos. Efetuou-se diluições seriadas por adição de 2,5mL de cada concentração a ser diluída, em tubos estéreis contendo 2,5mL de água destilada estéril, seguida de agitação por cinco minutos. Obtendo-se concentrações contendo 320, 160, 80, 40, 20, 10, 5 µL/mL dos compostos

(ALLEGRINI; BOUCHBERG; MAILLOLS, 1973). Um volume de 50 μL dos produtos nas diferentes concentrações foi transferido para cavidades preparadas. Em seguida as placas foram encubadas a 28-30°C por um período de 7-14 dias (CLEELAND & SQUIRES,1991; ALVES et al. 2000).

Realizou-se controle de crescimento fúngico e com antifúngico padrão para cada microrganismo, anfotericina B (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e cetoconazol (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Os ensaios foram incubados a 28-30°C por 10-14 dias.

Cada ensaio foi realizado em duplicata e o resultado expresso pela média aritmética dos halos de inibição obtidos nos ensaios. No final do período de incubação, foram feitas as leituras dos resultados do ensaio microbiológico. Foi considerado como atividade antimicrobiana positiva, quando o produto testado produziu halo de inibição do crescimento microbiano com diâmetro igual ou superior a 10mm (SAKAR; TAMER; TOKUR, 1988; WONG-LEUNG, 1988; ALVES et al. 2000).

Valores de CIM₅₀, ou seja, concentração inibitória para 50% das cepas e de CIM₉₀, ou seja, concentração inibitória para 90% das cepas foram determinadas (SANTOS, et al., 1999).

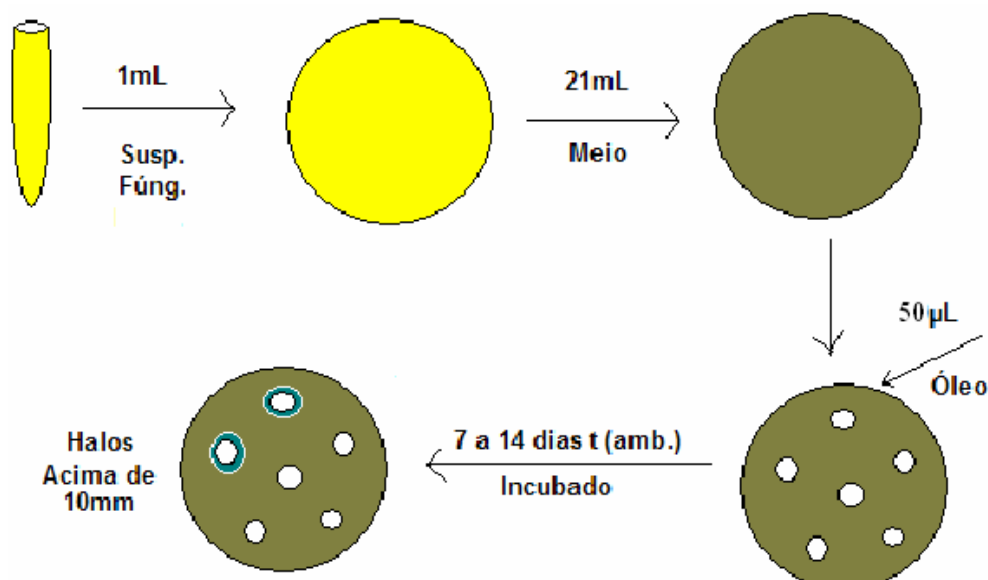


Figura 7 – Fluxograma da determinação da Concentração Inibitória Mínima.

2.6.4 Determinação da cinética de morte microbiana

O ensaio para determinação da cinética de morte microbiana pelos óleos essenciais foi realizado pela técnica de diluição em meio sólido (figura 8). Para execução da técnica, inicialmente foram preparadas placas de Petri (60x15mm), da marca Dispo Petri/ Interlab, com 8mL de meio ASD acrescido de cada óleo essencial nas concentrações de CIM₉₀, CIM₅₀ ou menos. Em seguida, retirou-se um fragmento de aproximadamente 2mm das cepas fungicas ensaiadas, de culturas mantidas a 28-30°C por 7-14 dias e colocou-o no centro da placa contendo o ASD mais óleo essencial na concentração determinada.

O controle incluído neste ensaio foi à observação do crescimento micelial radial da cepa fúngica em ágar Sabouraud sem adição do óleo essencial, bem como adicionado de cetoconazol a 50µg/mL. Após a montagem do sistema, a observação do crescimento micelial radial ou não em ASD, foi avaliada em diferentes intervalos de tempo (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 14 dias), sendo este crescimento micelial radial da colônia fúngica medido e o resultado expresso em milímetros (THYÁGARA & HOSONO, 1996; ADAM et al., 1998; DAFERERA; ZIOGAS; POLISSIOU, 2003).

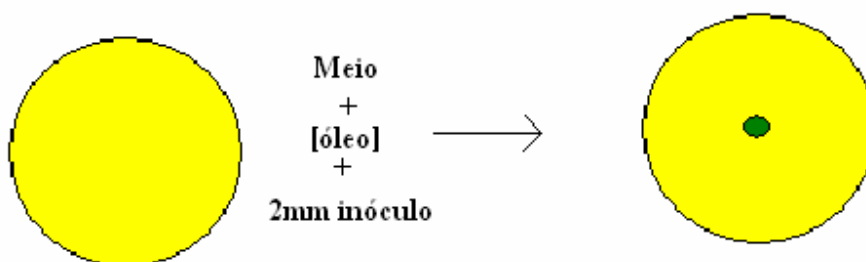


Figura 8 – Fluxograma do ensaio de cinética de morte microbiana

2.6.5 Interferências dos óleos essenciais sobre a germinação de conídios fúngicos

Foram preparadas emulsões de óleos essenciais com diferentes concentrações e testadas em relação ao seu poder de inibição sobre a

germinação dos conídios de *Aspergillus* (figura 9). Alíquotas de 0,1 mL de cada emulsão dos óleos essenciais foram homogeneamente misturadas com 0,1 mL de suspensões de conídios fúngicos (10^6 esporos/mL) obtidos de culturas com 7-14 dias de crescimento em ASD. Em seguida, 0,1mL do sistema foi posto no centro de lâminas para microscopia. As lâminas contendo a suspensão dos conídios fúngicos foram incubadas em uma câmara úmida a 28-30°C por 24 horas. Após este período, cada lâmina foi fixada com o corante azul lactofenol algodão e observada sob microscopia óptica para observação germinação de conídios (RANA; SINGH; TANEJA, 1997). O efeito dos óleos essenciais na inibição da germinação dos conídios fúngicos foi determinado através de comparação com a germinação dos conídios em experimento controle onde a emulsão dos óleos essenciais foi substituída por água destilada estéril.

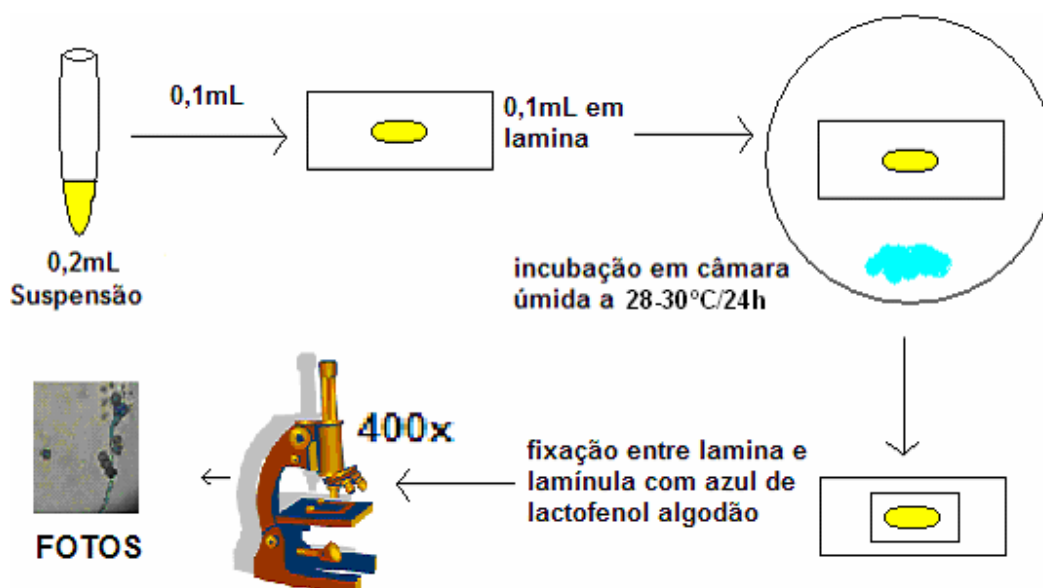


Figura 9 – Fluxograma do ensaio de Interferência dos óleos essenciais sobre a germinação de conídios de fungos.

2.6.6 Efeito do óleo essencial sobre a morfogênese de cepas de fungos filamentosos

Este ensaio viabiliza a observação de possíveis alterações morfológicas, apresentadas pelo fungo quando exposto a óleos essenciais. Inicialmente em placas de Petri (90x15mm), da marca Dispo Petri/ Interlab, estéreis foram adicionados 8mL de ASD acrescidos do óleo essencial nas concentrações de CIM₉₀ e CIM₅₀. Em seguida, um inóculo de aproximadamente 2mm foi adicionado em cima do sistema montado (ASD mais óleo). Por fim, fragmentos miceliais foram tomados da periferia das colônias dos fungos cultivados em ASD adicionado de diferentes concentrações dos óleos essenciais após cinco dias de incubação a 28-30°C. Paralelamente, o mesmo processo foi feito para as cepas fúngicas cultivadas em ASD sem adição do óleo essencial, as quais serviram como procedimento controle. As amostras miceliais coletadas foram fixadas em azul lactofenol algodão, e em seguida examinadas sob microscopia luminosa utilizando aumento de 400 vezes (figura 10), a fim de observação das características micromorfológicas das cepas fúngicas tratadas ou não (DE BILLERBECK et al., 2001; SHARMA e TRIPATHI, 2006).

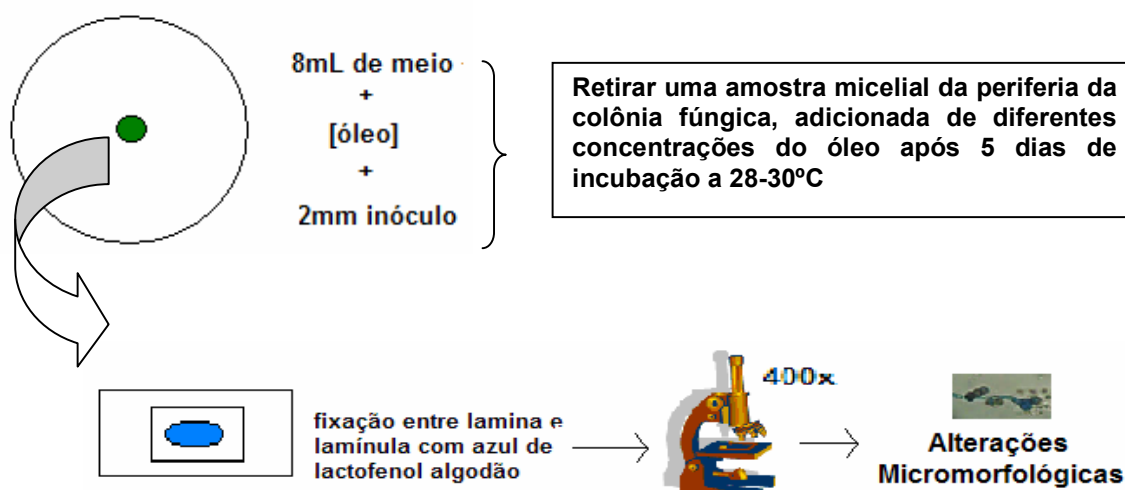


Figura 10 – Fluxograma do efeito do óleo essencial sobre a morfogênese de cepas de fungos filamentosos.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o teste de Tukey para determinação de diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) entre os tratamentos aplicados. Para a realização destas análises utilizou-se o Software Sigma Stat 2.03.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Screening microbiológico

O *screening* da atividade antifúngica de um óleo essencial é, geralmente, utilizado como teste preliminar do seu potencial antimicrobiano, e de acordo com os resultados obtidos pode-se elaborar uma seqüência de análises mais detalhadas com vistas à obtenção de maiores informações sobre a propriedade biológica do produto (LIMA, 2001).

Neste trabalho, foi feito o *screening* de 9 óleos essenciais, incluindo *Caryophyllus aromaticus* L., *Cinnamomum zeylanicum* Blume, *Cuminum cyminum* L., *Eucalyptus globulus* L., *Mentha piperita* L., *Ocimum basilicum* L., *Origanum majorana* L., *Origanum vulgare* L., e *Zingiber officinalis* Rosc. sobre cepas de fungos do gênero *Aspergillus* (Tabela 1). Observou-se que a maioria das cepas fúngicas ensaiadas apresentaram algum grau de sensibilidade aos óleos essenciais *in natura*. Os maiores halos de inibição foram observados nas interações dos óleos essenciais de *C. aromaticus* L., *C. zeylanicum* B. e *O. vulgare* L. com as cepas fúngicas, onde as médias dos halos de inibição foram, respectivamente, 23, 29 e 25mm de diâmetro. Por outro lado, os demais óleos avaliados apresentaram pouca ou nenhuma inibição sobre o crescimento desses fungos.

Os resultados obtidos nesse experimento estão compatíveis com aqueles realizados por Juglal, Govinden e Odhan (2002). Estes pesquisadores demonstraram a atividade de nove óleos essenciais para controlar o crescimento de fungos produtores de micotoxinas e notaram que o *C. aromaticus* L., *C. zeylanicum* B. e *O. vulgare* L. foram capazes de prevenir o crescimento de *A. parasiticus* e *Fusarium moniliforme*, enquanto que o *C. aromaticus* (moído e óleo essencial), marcadamente reduziu a síntese de micotoxinas em grãos infectados. E também no trabalho realizado por Velluti et al. (2003), foi observado significativo efeito inibitório dos óleos essências dessas espécies vegetais sobre o crescimento

de *Fusarium proliferatum* e *F. verticillioides*, bem como sobre a produção de fumonisina B₁, por tais cepas, em grãos de milho armazenado.

Tabela 1 – Média dos resultados (mm) do *screening* da avaliação da atividade antifúngica dos óleos essenciais sobre fungos do gênero *Aspergillus*.

Óleo essencial	Cepas de <i>Aspergillus</i>					
	<i>A. terreus</i> UP3	<i>A. niger</i> P-03	<i>A. fumigatus</i> ATCC-16913	<i>A. flavus</i> LM-247	<i>A. ochraceus</i> ATCC-22947	<i>A. parasiticus</i> ATCC-15517
<i>in natura</i> 20 µL/disco						
<i>C. aromaticus</i>	14	32	25	26	28	12
<i>C. zeylanicum</i>	28	30	35	28	30	26
<i>C. cyminum</i>	20	21	30	16	16	0
<i>E. globulus</i>	0	20	25	8	15	10
<i>M. piperita</i>	0	22	25	17	16	8
<i>O. basilicum</i>	16	15	12	10	12	0
<i>O. majorana</i>	0	0	25	0	0	0
<i>O. vulgare</i>	15	28	25	28	26	28
<i>Z. officinalis</i>	0	0	0	0	0	0

Levando-se em consideração os resultados de atividade antifúngica dos óleos essenciais neste estudo, os mesmos confirmam os dados registrados por Moreira (2006). Foi avaliando a atividade de oito óleos essenciais num ensaio de

screening de atividade antifúngica que a pesquisadora observou uma potente atividade dos óleos essenciais de *C. aromaticus* e *C. zeylanicum* entre os demais, contra fungos dermatíceos, exibindo halos de inibição, respectivamente, em torno de 18 e 20 mm (MOREIRA, 2006). Lima et al. (2005), observaram efeitos inibitórios do óleo essencial de *C. zeylanicum*, *in natura* pelo método de difusão em meio sólido, na inibição de dermatófitos dos gêneros *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*, além dos oportunistas *Aspergillus* e *Penicillium*, produzindo em média, halos de inibição com 25 mm de diâmetro.

Prabuseenivasan, Jayakumar e Ignacimuthu (2006), testando a atividade antibacteriana *in vitro* de vinte e um óleos essenciais encontraram que *C. zeylanicum* e *C. aromaticus* foram os que apresentaram a melhor atividade dentre os demais, contra bactérias Gram negativas: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris* e duas bactérias Gram positivas: *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*.

Partindo-se dos resultados do *screening*, seguiu-se a análise química e os ensaios microbiológicos para determinação das CIM's dos óleos essenciais *C. aromaticus*, *C. zeylanicum* e *O. vulgare*, os quais apresentaram melhor atividade antifúngica nessa etapa, quando comparados com os demais óleos, inibindo todas as cepas de *Aspergillus* ensaiadas.

Análise química dos óleos essenciais

O óleo essencial das folhas de *Cinnamomum zeylanicum*, após análise por cromatografia gasosa, revelou a presença de dezete constituintes (tabela 2), dos quais o eugenol foi o que apresentou maior porcentagem (73,27%), seguido por trans- β -cariofileno (5,38%), benzoato de benzila (4,04%) e linalol (3,31%).

Tabela 2 - Fitoconstituintes do óleo essencial das folhas *C. zeylanicum* identificados por GC-MS.

Picos	Tempo de retenção (min)	Composto	% no Óleo	Peso molecular	Relação carga/massa
1	5,644	α -pineno	1,31	136	93,15
2	6,017	Campheno	0,45	136	93,10
3	6,218	Benzaldeido	0,25	106	77,10
4	6,792	β -pineno	0,48	136	93,10
5	7,641	α - felandreno	1,29	136	93,15
6	8,293	p-cimeno	1,24	134	119,15
7	8,471	β - felandreno	1,57	136	93,10
8	11,164	Linalol	3,31	136	71,10
9	14,217	4-terpineol	0,12	154	71,10
10	19,133	Safrole	1,76	162	162,15
11	23,633	Eugenol	73,27	164	164,15
12	25,217	trans- β -cariofileno	5,38	204	41,05
13	26,133	Acetato de álcool cinâmico	2,53	176	43,00
14	26,498	α -humuleno	1,01	204	93,10
15	29,511	Acetato de eugenol	1,06	206	164,15
16	31,708	Óxido de cariofileno	0,92	177	43,05
17	38,655	Benzoato de benzila	4,04	212	105,10

No trabalho de Lima et al. (2005), foi verificado a constituição química do óleo essencial obtido das folhas de *C. zeylanicum*, coletada no Município de Manaus (AM), obteve resultado semelhante com relação aos constituintes majoritários como eugenol (60,0%), β -cariofileno (8,3%) e linalol (7,0%). Dados similares foram obtidos por Tomaino et al. (2005), que analisando o óleo de *C. zeylanicum* obtido da Adrian S.A. (Marseille, França), verificaram a presença de eugenol como composto majoritário (49,09%), seguido de aldeído cinâmico (45,84%) e β -cariofileno (34,18%). Portanto, os resultados registrados a partir da análise química de *C. zeylanicum*, vêm confirmar aqueles obtidos por Lima et al. (2005) e Tomaino et al. (2005), no que diz respeito aos fitoconstituintes eugenol e β -cariofileno. Já com relação aos demais constituintes os resultados foram bem diversificados.

O óleo essencial das folhas de *C. aromaticus*, após análise por cromatografia gasosa revelou a presença de dezoito constituintes (tabela 3), dos quais o eugenol também foi o composto majoritário apresentando uma porcentagem de 74,00%, seguido por α -humuleno (9,62%), d-cadineno (4,64) e trans- β -cariofileno (4,29%).

Estes resultados confirmam aqueles obtidos por Raina et al. (2001). Estes pesquisadores analisaram a constituição do óleo de *C. aromaticus*, proveniente de plantações da Índia, onde foi detectada a presença de 94,4% de eugenol, seguido por 2,9% de cariofileno. E ainda confirmam os resultados de Tullio et al. (2007), que analisaram quimicamente o óleo de *C. aromaticus* oriundo da fazenda agrícola Aboca (Sansepolcro, Arezzo), e reportaram as seguintes proporções de fitoconstituintes majoritários: eugenol (72%), eugenyl acetato (14%) e β -cariofileno (5%). Como também o de Jirovetz et al. (2006), que revelou uma constituição semelhante à obtida neste trabalho. Os autores detectaram como principal constituinte o eugenol (76,8%), seguido por β -cariofileno (17,4%) e α -humuleno (2,1%). Sendo o constituinte d-cadideno, não descrito em nenhum dos trabalhos citados.

Tabela 3 - Fitoconstituínes Óleo essencial das folhas de *C. aromaticus* identificados por GC-MS.

Picos	Tempo de retenção (min)	Composto	% no óleo	Peso molecular	Relação carga/massa
1	5,625	α -Pineno	0,04	136	93,10
2	8,522	Eucaliptol	0,97	154	43,00
3	11,008	Linalol	0,03	136	71,10
4	22,767	Eugenol	74,00	164	149,10
5	25,524	Trans- β -cariofileno	4,29	204	41,05
6	27,067	α –Humuleno	9,62	204	93,10
7	27,552	γ -Cadineno	0,86	204	161,20
8	28,552	Torreyol	0,62	204	105,10
9	28,881	Farneseno	0,44	204	93,10
10	29,609	d-Cadineno	4,64	204	164,10
11	30,633	Ciclohexano, 2,3-dimetil- 1,5-divinil	0,63	177	41,05
12	30,858	Bicyclo[3.3.1]nonan-2- one, 7-etenil-7-metil-eno	0,36	177	41,05
13	31,325	Palustrol	0,32	204	111,15
14	31,815	Óxido de Cariofileno	1,63	177	41,05
15	32,854	Óxido de humuleno	0,83	138	43,05
16	33,525	Carotol	0,33	204	81,10
17	33,825	Isolimoneno	0,18	178	136,15
18	34,617	Viridiflorol	0,22	204	41,05

Na literatura existem vários relatos de atividades antimicrobianas relacionadas ao eugenol (fitoconstituente majoritário em ambos os óleos de *C. zeylanicum* e *C. aromaticus*) como antifúngica (SELLAN, 2002; AMARAL & BARA, 2005; GAYOSO et al., 2005) e antibacteriana (NASCIMENTO et al., 2000).

Quanto à análise química do óleo de *Origanum vulgare*, foi observada a presença de 14 compostos (tabela 4), sendo o carvacrol o majoritário (68,06%), seguido pelo p-cimeno (15,91%) e α -pineno (2,56%), de acordo com Souza et al. (2006).

Os resultados da análise do óleo essencial, mostrou um perfil qualitativo de seus componentes similar aos achados de outros pesquisadores (PLAUSE; FLORES; ATAUCUSI, 2001; NAKATANI, 2003).

Tabela 4 – Fitoconstituintes do óleo essencial das folhas de *O. vulgare* identificados por GC-MS.

Compostos	Tempo de Retenção	% no Óleo
triciclono	925	0.28
α -pineno	932	2.56
canfeno	946	0.26
β -pineno	974	0.45
mirreno	988	2.03
<i>o</i> -cimeno	1014	0.48
<i>p</i> -cimeno	1020	15.91
limoneno	1026	1.28
1,8-cineol	1028	0.92
γ -terpineno	1055	1.87
borneol	1161	0.38
diidrocarveol	1185	0.29
carvacrol	1298	68.06
trans-cariofileno	1417	1.33

Entre os compostos identificados em maior percentual, alguns foram previamente relatados como possuidores de propriedades antimicrobianas, incluindo carvacrol (SALGUEIRO et al., 2003), *p*-cimeno (BURT, 2004), mirreno (DUARTE et al., 2005), dentre outros. A presença de carvacrol como componente majoritário do óleo essencial de *O. vulgare* suporta os resultados de outros estudos (BURT, 2004; NOSTRO et al., 2004; CHUN et al., 2005). O carvacrol tem recebido grande ênfase na pesquisa de atividade antimicrobiana de óleos essenciais, de forma que a sua presença tem sido reconhecida como marcador de

potencial antimicrobiano (FARIAS–ALVES et al., 2003). Em contrapartida, Sahin et al. (2004) detectaram a presença de tal composto em baixa concentração (0.6%), enquanto Marino, Bersani e Comi (2001) em análise da composição do óleo essencial de *O. vulgare* observaram ausência de carvacrol.

Uma particularidade encontrada na análise da composição do óleo essencial consiste na ausência do composto fenólico timol, o qual tem sido citado por alguns pesquisadores (MARINO; BERSANI; COMI, 2001) como um dos componentes majoritários do óleo essencial de *O. vulgare*.

Mas, sabe-se que a composição química de um óleo essencial pode sofrer interferência de diversos fatores como condições climáticas, geográficas, sazonais, período de coleta e técnica de extração (MARINO; BERSANI; COMI, 2001). Fato que pode justificar as diferenças quali-quantitativas dos óleos essenciais, quando comparados com outras análises, mesmo sendo obtidos da mesma espécie.

Concentração Inibitória Mínima

Na tabela 5 está registrado os resultados da CIM do óleo essencial de *C. zeylanicum* sobre cepas do gênero *Aspergillus*, determinada através da técnica de difusão em meio sólido, processo cavidade-placa. Todas as cepas fúngicas ensaiadas apresentaram sensibilidade, com halos de inibição oscilando entre 26 e 35 mm de diâmetro, quando o óleo foi utilizado *in natura* no *screening*. Verificou-se que, a CIM₅₀ e a CIM₉₀ foram respectivamente, de 40 e 80 $\mu\text{L}/\text{mL}$. E baseado na concentração que inibiu praticamente 100% (com halos de inibição variando de 11 a 18mm) das cepas de *Aspergillus* (CIM₉₀), apenas *A. parasiticus* ATCC-15517, demonstrou resistência com halo de inibição menor que 10mm. A figura 11, mostra a atividade do óleo essencial de *C. zeylanicum* em diferentes concentrações sobre cepas de *A. niger* P-03.

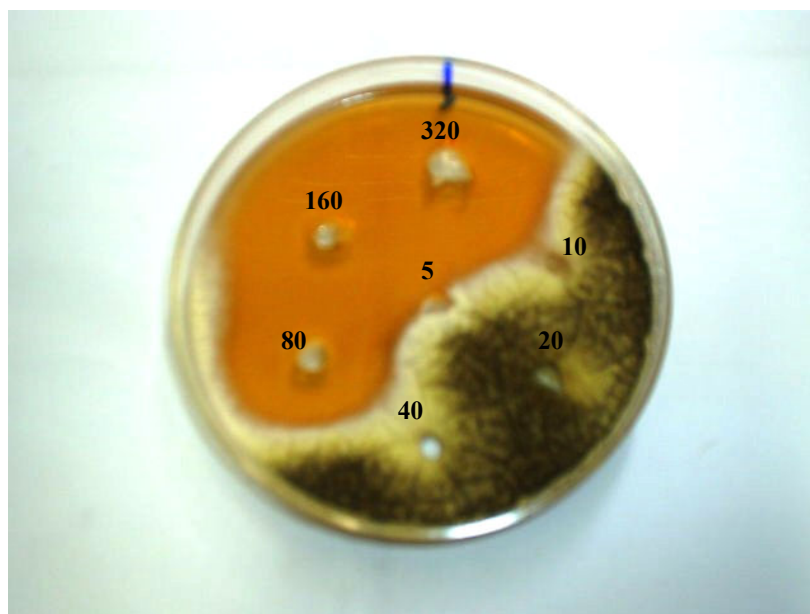


Figura 11 – CIM do óleo essencial de *C. zeylanicum* nas concentrações de 320 a 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$, sobre *A. niger* P-03.

Os resultados encontrados para o óleo de *C. zeylanicum* corroboram trabalhos anteriores sobre o potencial antimicrobiano deste produto vegetal. Por exemplo, CHAO; YOUNG; OBERG (2000) verificaram o efeito inibitório de quarenta e cinco óleos essenciais contra oito bactérias, dois fungos e dois

bacteriófagos. E dentre estes, o óleo da casca de *C. zeylanicum*, assim como o chá da árvore de *Melaleuca alternifolia*, demonstraram efeito inibitório sobre todos os organismos testados.

Tabela 5 – Média dos resultados (n=2) da CIM, do óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* B. sobre cepas *Aspergillus*.

Espécies	Óleo essencial (µL/mL)							Viabilidade	Controles	
	320	160	80	40	20	10	5		anfotericina B (100µg/mL)	cetoconazol (50µg/mL)
<i>A. fumigatus</i> ATCC-16913	22	20	18	12	8	0	0	+	8	18
<i>A. fumigatus</i> ATCC-40640	25	20	17	15	0	0	0	+	0	10
<i>A. niger</i> P-03	18	17	12	0	0	0	0	+	12	10
<i>A. niger</i> LM - 257	24	22	15	0	0	0	0	+	8	10
<i>A. flavus</i> ATCC-16013	20	15	11	10	0	0	0	+	0	24
<i>A. flavus</i> LM – 247	18	17	16	11	0	0	0	+	7	15
<i>A. parasiticus</i> ATCC-15517	14	11	8	0	0	0	0	+	8	20
<i>A. parasiticus</i> NRRL-2999	20	17	15	13	0	0	0	+	7	20
<i>A. terreus</i> UP-03	17	16	15	13	0	0	0	+	0	0
<i>A. terreus</i> ATCC-7860	20	19	15	11	0	0	0	+	0	20
<i>A. Ocharaceus</i> ATCC-22947	26	20	17	15	0	0	0	+	7	12
<i>A. Ocharaceus</i> LM-06	23	20	17	15	0	0	0	+	0	12

+ : Crescimento das cepas fúngicas no meio de cultura isento de produto antifúngico

A atividade antifúngica do óleo de *C. zeylanicum* pode ser atribuída ao fitoconstituente eugenol, não só pelo fato dele ter representado (73,27%) na análise química demonstrando ser o majoritário, mas pela sua reconhecida atividade antifúngica, relatada por muitos autores (SELLAN, 2002; AMARAL & BARA, 2005; GAYOSO et al., 2005).

De acordo com uma análise química do óleo essencial das folhas de *Cinnamomum zeylanicum* B., o eugenol foi o fitoconstituente de maior percentual encontrado, representando 60% da constituição do óleo (LIMA et al., 2005). Sendo o eugenol um composto responsável por uma considerável atividade antifúngica segundo Bullerman, Lieu e Seier (1977) e Gayoso et al. (2005).

Para JHAN et al. (2005), cinamaldeído ou aldeído cinâmico é o composto principal com atividade antifúngica tanto do óleo extraído com hexano quanto no óleo destilado da casca de canela.

Porém, outros trabalhos relacionam a atividade antifúngica desse óleo a outros constituintes. Segundo Kim, Park e Park (2004), o cinamaldeído a 500 µg/mL, diminuiu de $4,9 \cdot 10^6$ para $1,0 \cdot 10^2$ UFC/mL a população de *E. coli*, bactéria causadora de colite hemorrágica, durante 12h de exposição e foi bactericida a 1000 µg/mL após 2h de interação produto-microrganismo.

O óleo essencial de *C. zeylanicum*, a 80 µL/mL, inibiu o crescimento de 11 (92%) cepas de espécies de *Aspergillus*, onde o intervalo dos halos de inibição foi de 11 a 17mm de diâmetro. Sendo assim, esses resultados são similares e confirmam os resultados de outros estudiosos. A atividade do óleo essencial de *C. zeylanicum*, bem como dos fitoconstituintes α-pineno e β-pineno foi avaliada contra fungos isolados de onicomicoses, como *C. albicans*, *C. tropicallis* e *T. rubrum*. Foi observado uma intensa atividade antifúngica sobre a maioria das cepas testadas, com CIM's variando de 2% para o óleo e 4% para os fitoconstituintes (GAYOSO et al., 2004).

Misra et al. (2000), baseado nos resultados obtidos em seus estudos com o óleo de *C. zeylanicum*, puderam inferir que as atividades antifúngicas deste óleo

podem estar relacionadas à ação sinérgica de seus constituintes químicos (cinamaldeído, α -pineno e β -pineno).

Avaliando qual a concentração do óleo essencial de *C. zeylanicum* e de seu fitoconstituinte β -pineno necessária para inibir o crescimento de fungos dermatíceos como *C. herbarium*, *Curvularia* spp., *F. compacta* e *P. hortae*, Moreira et al. (2007) observaram que, a 125 $\mu\text{g/mL}$, o óleo essencial foi capaz de inibir 75% das cepas, enquanto o β -pineno na mesma concentração inibiu 62,5%.

Alguns trabalhos relatam a atividade antimicrobiana de *C. zeylanicum* contra outros microrganismos. Belém (2002), evidenciou a inibição de 50% das cepas de *Malassezia furfur*, agente etiológico da pitíriase versicolor, numa concentração de 8% pelo método de difusão em meio sólido, com halos variando de 13 a 24 mm. Sendo que acima de 4% todas demonstraram resistência. Pelo método de difusão em agar, o óleo essencial de *C. zeylanicum* a 8% inibiu 29 (100%) das cepas de *Trichosporon* (*T. inkin*, *T. ovóides*, *T. asahii*). E apresentou uma concentração inibitória mínima de 4%, com inibição de 70% dessas leveduras (PONTES, 2002).

Outro trabalho que já afirmava o grande potencial antimicrobiano do óleo essencial de *C. zeylanicum* foi realizado por Sá et al. (1995), onde tal produto demonstrou a melhor atividade, inibindo 100% das cepas de bactérias, potenciais causadores de conjuntivite, num ensaio que avaliou a efetividade de sete óleos.

Dentre os óleos essenciais testados, o de *O. vulgare* na sua forma *in natura*, também apresentou uma potente inibição sobre o crescimento de *Aspergillus*, produzindo halos de inibição entre 15 a 28 mm de diâmetro. A Tabela 6 mostra a CIM do óleo essencial de *O. vulgare* sobre fungos do gênero *Aspergillus* determinada através da técnica de difusão em meio sólido. A CIM₅₀ e CIM₉₀ assumiram os mesmos valores que o óleo essencial de *C. zeylanicum*, respectivamente, 40 e 80 $\mu\text{L/mL}$. Vale ressaltar que nenhuma cepa demonstrou resistência na CIM₉₀, onde halos de inibição oscilando entre 10 e 20 mm de diâmetro foram observados. A figura 12 ilustra o grau de sensibilidade da cepa de *A. terreus* UP-03 ao óleo essencial de *O. vulgare*.

Pesquisadores como Akgul e Kivanç (1988) e Paster et al. (1990), já relataram à capacidade tanto do *O. vulgare* em pó quanto do seu óleo essencial de inibir o crescimento de muitos fungos de interesse em alimentos e diretamente a saúde humana, incluindo fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. niger*, *A. ochraceus*).

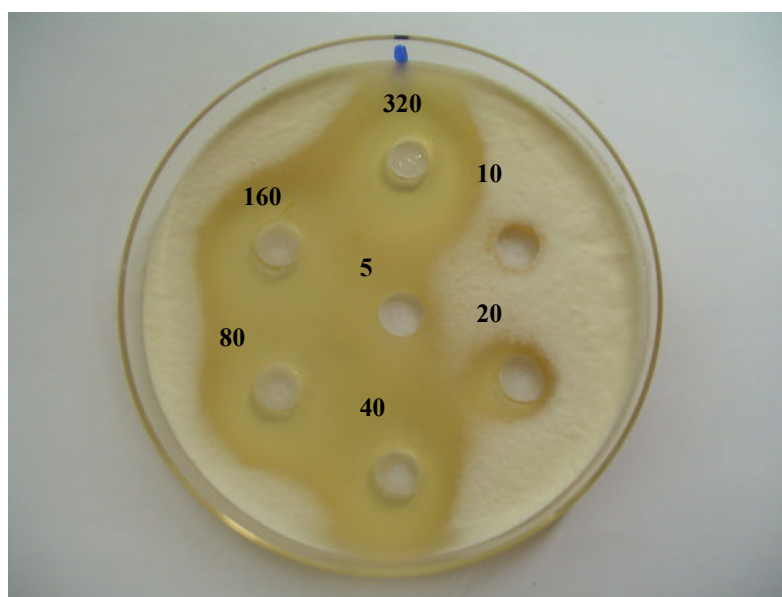


Figura 12 - CIM do óleo essencial de *O. vulgare* nas concentrações de 320 a 5 µL/mL sobre *A. terreus* UP-03.

O óleo de *O. vulgare* exibiu *in vitro* atividade contra fungos patogênicos humanos *M. furfur*, *T. rubrum* e *T. beigelli*. Dentro quatro óleos ensaiados por Adam et al. (1998), incluindo *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia* e *Salvia fruticosa*, o de *O. vulgare* apresentou os resultados mais destacáveis com CIM oscilando entre 10 e 2,5 µL/mL. Além disso, resultados promissores foram obtidos *in vivo* utilizando ratos infectados com *T. rubrum*.

Os resultados obtidos neste estudo com o óleo essencial de *O. vulgare* só vem acrescentar aqueles obtidos anteriormente por Souza (2006). Ele testando a ação do óleo de *O. vulgare* sobre fungos leveduriformes, dentre os quais representantes do gênero *Candida*, *R. rubra*, *S. cerevisiae*, verificou halos de

inibição da ordem de 32 a 42 mm. Além disso, estudou qual a menor concentração capaz de verificar ainda algum grau de inibição, notando que a 20 µl/mL, ocorreu inibição de todas as cepas fúngicas.

Tabela 6 – Média dos resultados (n=2) da CIM, do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. sobre cepas de *Aspergillus*.

Espécies	Óleo essencial (µL/mL)							Viabilidade	Controles	
	320	160	80	40	20	10	5		anfotericina B (100µg/mL)	cetoconazol (50µg/mL)
<i>A. fumigatus</i> ATCC-16913	25	20	20	9	0	0	0	+	8	18
<i>A. fumigatus</i> ATCC-40640	18	15	12	7	0	0	0	+	0	10
<i>A. niger</i> P-03	24	17	15	12	10	0	0	+	12	10
<i>A. niger</i> LM - 257	27	25	21	13	0	0	0	+	8	10
<i>A. flavus</i> ATCC-16013	15	13	10	0	0	0	0	+	0	24
<i>A. flavus</i> LM – 247	30	22	20	12	10	0	0	+	7	15
<i>A. parasiticus</i> ATCC-15517	16	15	14	12	0	0	0	+	8	20
<i>A. parasiticus</i> NRRL-2999	18	14	12	8	0	0	0	+	7	20
<i>A. terreus</i> UP-03	23	20	17	15	8	0	0	+	0	0
<i>A. terreus</i> ATCC-7860	24	20	17	10	7	0	0	+	0	20
<i>A. Ocharaceus</i> ATCC-22947	18	14	10	8	0	0	0	+	7	12
<i>A. Ocharaceus</i> LM-06	24	18	14	10	8	0	0	+	0	12

+ : Crescimento das cepas fúngicas no meio de cultura isento de produto antifúngico

Souza et al. (2006), realizando um *Screening* de atividade antimicrobiana com o óleo de *O. vulgare* na sua forma *in natura* evidenciaram um amplo espectro de ação contra vários microrganismos, incluindo bactérias como *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *L. monocytogenes* com halos de inibição variando de 30 a 37 mm. E através do método de difusão em ágar evidenciou-se valores de CIM, oscilando entre 20 e 40 µL/mL. E ainda existem dados na literatura que comprovam a atividade antimicrobiana deste óleo até mesmo contra linhagens de bactérias resistentes a antibióticos (HERSH-MARTINEZ et al., 2005).

Nostro et al. (2004) pesquisando a potencialidade antibacteriana do óleo essencial de *O. vulgare*, evidenciaram sensibilidade de cepas de *S. aureus* e *S. epidermidis* metilicina resistentes com CIM's oscilando entre 0.06 e 0.125% (v/v), sendo todas as cepas ensaiadas sensíveis a tal produto.

A efetividade antimicrobiana do óleo essencial de *O. vulgare* também foi comprovada, por Sahin et al. (2004), uma vez que eles observaram a inibição de bactérias patogênicas como *Bacillus macerans*, *B. subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *E. coli*, *P. vulgaris*, *S. aureus* e *S. pyogenes* (halos entre 10 e 18 mm).

O óleo de *O. vulgare* é rico em compostos fenólicos, os quais são possíveis responsáveis pela proeminente atividade antimicrobiana deste óleo. Sendo o carvacrol, timol, cariofileno, sabineno, *p*-cimene, alfa, beta e gama terpineno alguns dos compostos químicos encontrados neste óleo (MARINO; BERSANI; COMI, 2001; DAFERERA; ZIOGAS; POLISSIOU, 2003; SAHIN et al., 2004; VELLUTI et al., 2003). Sabe-se que compostos fenólicos são capazes de se dissolverem na membrana do microrganismo, penetrando no interior da célula, onde interagem com metabolismo celular, causando distúrbio da membrana citoplasmática, conseqüente perda de conteúdo citoplasmático e finalmente morte celular (CARSON; MEE; RILEY, 2002; CHUN et al., 2005).

Neste estudo, baseado na identificação química dos componentes químicos do óleo de *O. vulgare*, o carvacrol pode ser o responsável pela atividade antifúngica do óleo, uma vez que pesquisadores como Farias-Alves et al. (2003)

tem reconhecido a presença deste ficonstituinte como marcador de potencial antimicrobiano.

Outro óleo essencial que também apresentou bons resultados, estando, entre os 3 óleos com destacável atividade antifúngica, foi o de *C. aromaticus*. O mesmo, na sua forma *in natura*, apresentou potente inibição sobre o crescimento de *Aspergillus*, produzindo halos de inibição oscilando entre 12 a 35 mm de diâmetro. A Tabela 7 mostra a CIM do óleo essencial de *C. aromaticus* sobre fungos do gênero *Aspergillus* determinada através da técnica de difusão em meio sólido. A CIM₅₀ e CIM₉₀ assumiram, assim como para os ensaios anteriores dos outros óleos, valores 40 e 80 µL/mL respectivamente. Vale ressaltar que na CIM₉₀ todas as cepas apresentaram halos de inibição superiores a 10mm (compreendidos entre 15 e 25mm) não apresentando portanto, cepas resistentes nesta concentração. A figura 13 ilustra a atividade do óleo essencial de *C. aromaticus* sobre *A. niger* P-03.

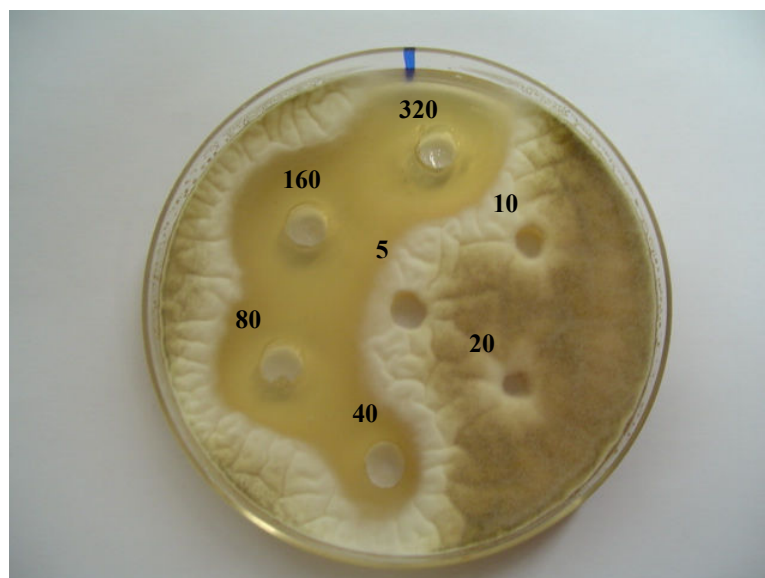


Figura 13 – CIM do óleo essencial de *C. aromaticus* nas concentrações de 320 a 5 µL/mL., sobre *A. niger* P-03.

Na concentração de 600 µg/mL o óleo de *C. aromaticus* inibiu o crescimento micelial de todos os fungos associados a contaminação de produtos de panificação incluindo cepas de *A. niger* (SOUZA et al., 2004).

Tabela 7 – Média dos resultados (n=2) da CIM, do óleo essencial de *Caryophyllus aromaticus* L. sobre cepas de *Aspergillus*.

Espécies	Óleo essencial (µL/mL)							Controles		
	320	160	80	40	20	10	5	Viabilidade	anfotericina B (100µg/mL)	cetoconazol (50µg/mL)
<i>A. fumigatus</i> ATCC-16913	28	24	18	10	0	0	0	+	8	18
<i>A. fumigatus</i> ATCC-40640	30	26	24	15	8	0	0	+	0	10
<i>A. niger</i> P-03	28	24	20	10	0	0	0	+	12	10
<i>A. niger</i> LM - 257	30	28	25	12	8	0	0	+	8	10
<i>A. flavus</i> ATCC-16013	26	22	20	8	0	0	0	+	0	24
<i>A. flavus</i> LM – 247	26	22	18	12	7	0	0	+	7	15
<i>A. parasiticus</i> ATCC-15517	27	24	20	15	7	0	0	+	8	20
<i>A. parasiticus</i> NRRL-2999	26	23	22	10	0	0	0	+	7	20
<i>A. terreus</i> UP-03	25	23	20	8	0	0	0	+	0	0
<i>A. terreus</i> ATCC-7860	30	24	22	0	0	0	0	+	0	20
<i>A. Ocharaceus</i> ATCC-22947	28	23	21	8	0	0	0	+	7	12
<i>A. Ocharaceus</i> LM-06	30	24	22	7	0	0	0	+	0	12

+ : Crescimento das cepas fúngicas no meio de cultura isento de produto antifúngico

O óleo essencial de *C. aromaticus* testado contra espécies de *Candida* e de fungos filamentosos (ambos isolados de pacientes com onicomicoses), através da técnica de difusão em meio sólido, apresentou uma CIM de 2% e quando testado o Eugenol (seu principal constituinte) contra os mesmos fungos, observou-se uma CIM de 4% (GAYOSO et al., 2005).

Bullerman, Liew e Seier (1977) observaram que na concentração de 250 µL/mL, o óleo de *C. aromaticus* foi capaz de inibir o desenvolvimento e a produção de aflatoxinas de *A. parasiticus* ao passo que o eugenol, seu constituinte majoritário apresentou efeito inibidor até a concentração de 125 µg/mL.

Belém (1997) testando o extrato etanólico de *C. aromaticus* sobre *A. flavus*, *A. niger* e *Penicillium*, fungos que afetam sementes de feijão armazenadas, obteve resultados semelhantes aos fungicidas benomyl® e captan®.

Os resultados encontrados para o ensaio biológico feito com o óleo de *C. aromaticus* respaldam outros trabalhos que avaliaram a sensibilidade de microrganismos frente a este produto vegetal. Por exemplo, Belém (2002) avaliando a sensibilidade de vinte cepas de *M. furfur* frente ao óleo essencial de *C. aromaticus*, observou que 65% das cepas foram inibidas na concentração de 4% (halos com 22 mm em média). Contudo, Pontes (2002) verificou que numa concentração de apenas 2% ocorreu inibição de 28 (97%) de leveduras do gênero *Trichosporon* (agente da Piedra branca).

Núñez, D' Aquino e Chirife (2001) avaliando as propriedades antifúngicas do óleo de *C. aromaticus* sobre *C. albicans*, observaram que estas foram semelhantes às desempenhadas por desinfetantes comumente utilizados em hospitais, como povidine-iodo e cloroxilenol. Apresentando sensibilidade numa concentração entre 0,2 e 0,8%. Além disso, atividade fungicida foi observada após 2 minutos de exposição da *C. albicans* ao óleo.

Nascimento et al. (2000) testando o extrato de *C. aromaticus* observaram que o mesmo inibia 64,2 % dos microrganismos (entre bactérias e fungos) sensíveis a antimicrobianos conhecidos e 83,3% dos resistentes.

O extrato etanólico de *C. aromaticus* apresentando uma CIM de 40 µL/mL, inibiu fortemente todas as linhagens de *Helicobacter pylori*, bactéria associada a processos de úlcera gástrica (LI et al., 2005).

O espectro de atividade do *C. aromaticus* se estende para outros organismos. Por exemplo, o extrato bruto de cravo produziu 100% de mortalidade da larva do coleóptero *Attagenes uicolor japonicus* numa concentração de 2.6 mg/cm² após 14 dias de tratamento (HAN; KIM & AHN, 2006).

O óleo essencial de *C. aromaticus*, numa concentração de 250 µL/mL, apresentou efeito inibitório contra 14 (94%) das cepas fungicas, dentre elas *A. brassicola*, *C. globosum*, *Curvularia*, *F. compacta*, com uma média de halos de 20 mm de diâmetro (MOREIRA, 2006).

Mariath (2004) estudando o poder inibitório do óleo essencial de *E. aromática* sobre fungos dermatíceos, através da técnica de difusão em meio sólido, encontrou valores de CIM entre 0,5 e 2%.

A análise química do óleo de *C. aromaticus* respalda não apenas que o eugenol foi o composto majoritário de acordo com a literatura, mas também o composto que segundo muitos pesquisadores pode ser o responsável pela atividade biológica do óleo, isolado ou em associação (SELLAN, 2002; GAYOSO et al., 2005).

Sellan (2002) descreve que estas propriedades estão relacionadas com as atividades farmacológicas, incluindo a atividade antimicrobiana de seus constituintes químicos eugenol, cariofileno, furfurool, salicilato de metila, entre outros.

Um dado importante e preocupante é mencionado nos resultados de CIM. O dado se refere à resistência demonstrada por algumas cepas de *Aspergillus* testadas frente aos antifúngicos comerciais, anfotericina B (100 µg/mL) e cetoconazol (50 µg/mL), os quais são indicados para o tratamento de infecções causadas por esses microrganismos.

Baseado na literatura, uma justificativa plausível para o aparecimento de cepas resistentes, pode ser pelo menos em parte explicada, pela quantidade de ergosterol presente na membrana plasmática destes. Segundo Sidrim e Moreira (1999) quanto menor a quantidade de ergosterol na membrana do fungo, maior é a resistência que este apresentará ao antifúngico.

Observando em particular o comportamento das cepas de *A. terreus* aos antifúngicos comerciais, vemos que estes demonstraram assim como os demais fungos grande sensibilidade aos óleos essenciais, porém apresentaram resistência a anfotericina B e apenas uma cepa demonstrou-se sensível ao cetoconazol (Como mostra a figura 14).

Vários estudos pré-clínicos documentam a resistência de *A. terreus* à anfotericina B (SUTTON et al., 1999; WALSH et al., 2003; LIONAKIS et al., 2005). Embora os mecanismos de resistência de *A. terreus* a anfotericina B não estejam elucidados, parece que este fungo tem muito menos ergosterol (o alvo molecular da droga) em sua membrana, que o mais susceptível a esta medicação, o *A. fumigatus* (WALSH et al., 2003).

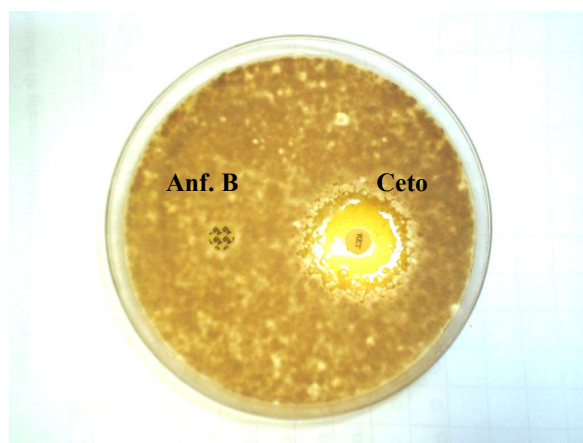


Figura 14 - Resistência de *A. terreus* ATCC – 7860 a anfotericina B.

Cinética de morte microbiana

O ensaio de cinética de morte microbiana foi feito com os óleos de *C. zeylanicum* e *O. vulgare* que obtiveram destacável atividade antifúngica (DAFERERA; ZIOGAS; POLISSIOU, 2003; ADAM et al., 1998). Os fungos selecionados tomando como critério uma maior patogenicidade entre as demais espécies foram *A. niger*, *A. flavus* e *A. fumigatus*. Este estudo realizou-se em diferentes intervalos de tempo (1, 2, 4, 6, 9 e 14 dias).

a) Crescimento micelial após exposição ao *C. zeylanicum*

O ensaio ocorreu utilizando a técnica de diluição em meio sólido, para avaliar o crescimento de *A. flavus* LM-247, *A. fumigatus* ATCC-40640 e *A. niger* P-03 (Gráficos 1, 2 e 3), sujeito as concentrações do óleo de *C. zeylanicum* a 20, 40 e 80 µL/mL. Sendo o cetoconazol a droga de escolha como antifúngico padrão. O óleo essencial, por sua vez demonstrou intenso efeito fumigante sobre todas as linhagens testadas, efeito esse percebido pela observação de nenhum ou mesmo um insignificante crescimento micelial ao longo dos 14 dias de exposição. O óleo promoveu significativa redução do crescimento micelial ($P < 0.05$) quando comparado com o grupo não tratado e tratado com cetoconazol (como mostra a figura 15 e 16). Dentre os fungos, apenas *A. niger* quando exposto ao óleo na concentração de 20 µL/mL demonstrou um pequeno aumento do micélio (alcançando 6 mm de diâmetro radial) após 8 dias de exposição e permanecendo estável até o termino da avaliação (14º dia).

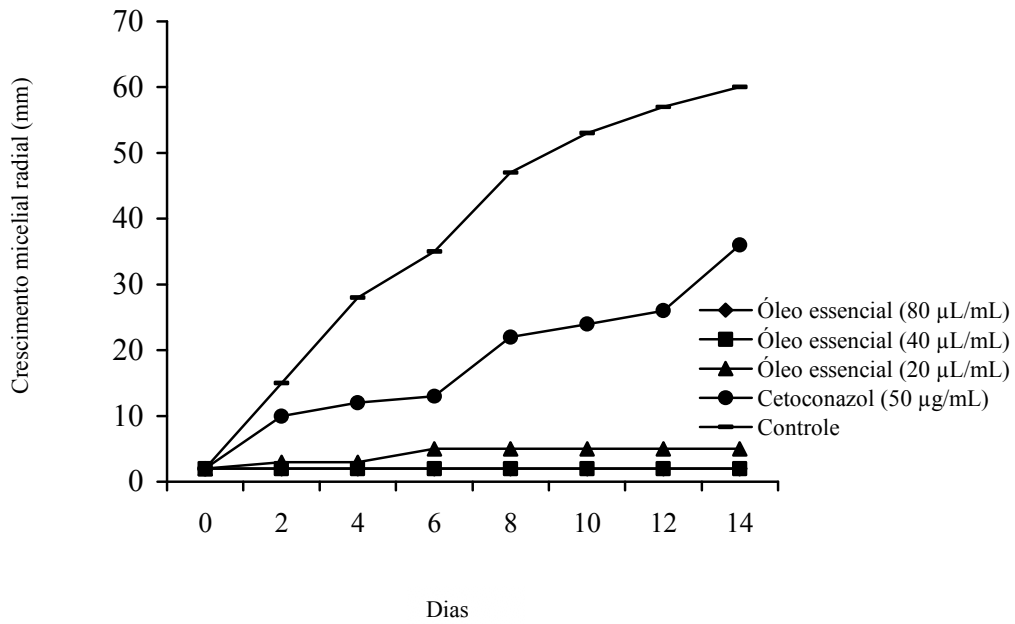


Gráfico 1: Efeito do óleo essencial de *C. zeylanicum* e cetoconazol sobre a cinética de morte microbiana de *A. flavus* LM-247. t-Tukey ($p < 0,05$)

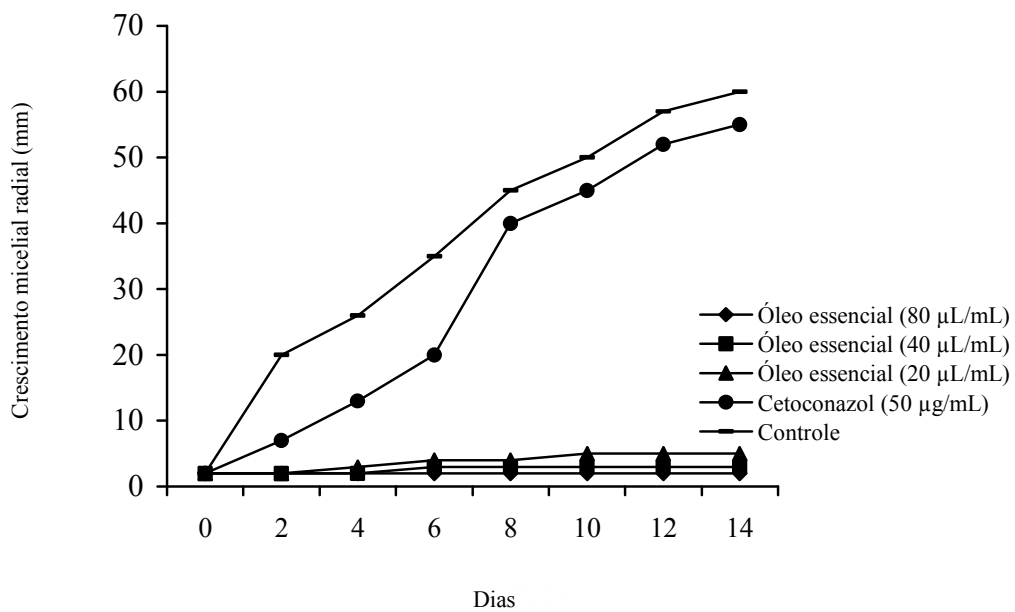


Gráfico 2: Efeito do óleo essencial de *C. zeylanicum* e cetoconazol sobre a cinética de morte microbiana de *A. fumigatus* ATCC-40640. t-Tukey ($p < 0,05$)

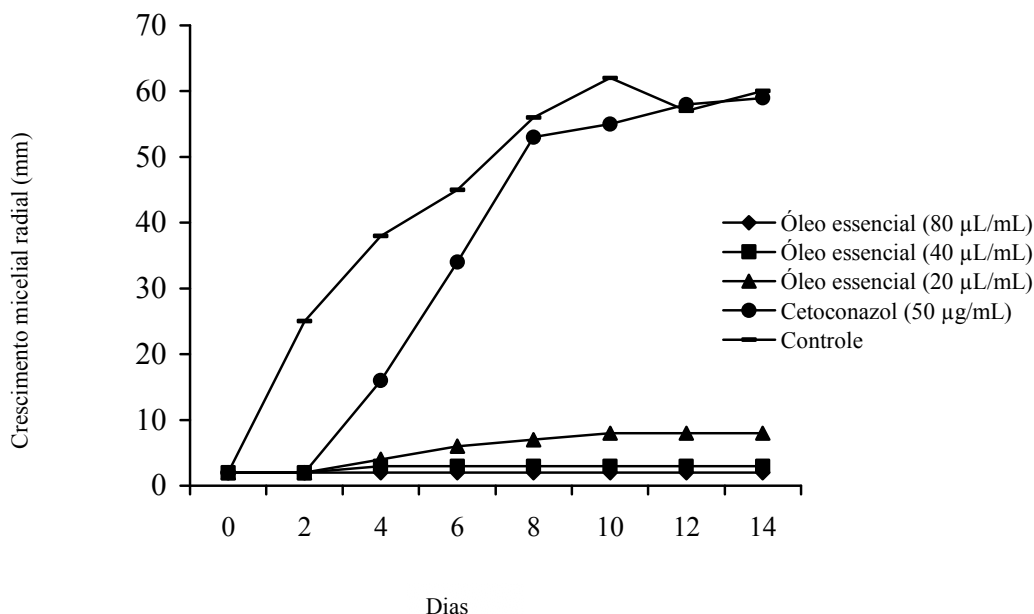


Gráfico 3: Efeito do óleo essencial de *C. zeylanicum* e cetoconazol sobre a cinética de morte microbiana de *A. niger* P-03. t-Tukey ($p < 0,05$).

b) crescimento micelial após exposição ao *O. vulgare*

O estudo da cinética de crescimento micelial ao longo de 14 dias de exposição ao óleo essencial de *O. vulgare* também foi verificado para as cepas *A. flavus* LM-247, *A. fumigatus* ATCC-40640 e *A. niger* P-03 (Gráficos 4, 5 e 6). Após os 14 dias do ensaio, observou-se um relevante efeito fungicida do óleo de *O. vulgare*, quando testado nas concentrações de 80 (valor da CIM₉₀) e 40 µl/mL (valor da CIM₅₀) sobre as cepas de *Aspergillus*. O óleo apresentou uma significativa redução do crescimento micelial dos fungos ($P < 0,05$) quando comparado com o grupo não tratado e aquele tratado com cetoconazol. O óleo de *O. vulgare* promoveu 100% de efeito letal, já após 2 dias de interação e nenhum crescimento micelial ocorreu nos tempos posteriores.

O cetoconazol em ambos os ensaios (com *C. zeylanicum* e *O. vulgare*) não demonstrou inibição significativa do crescimento micelial. Todas as linhagens testadas apresentaram um progressivo crescimento radial ao longo dos 14 dias de exposição a este antifúngico sintético.

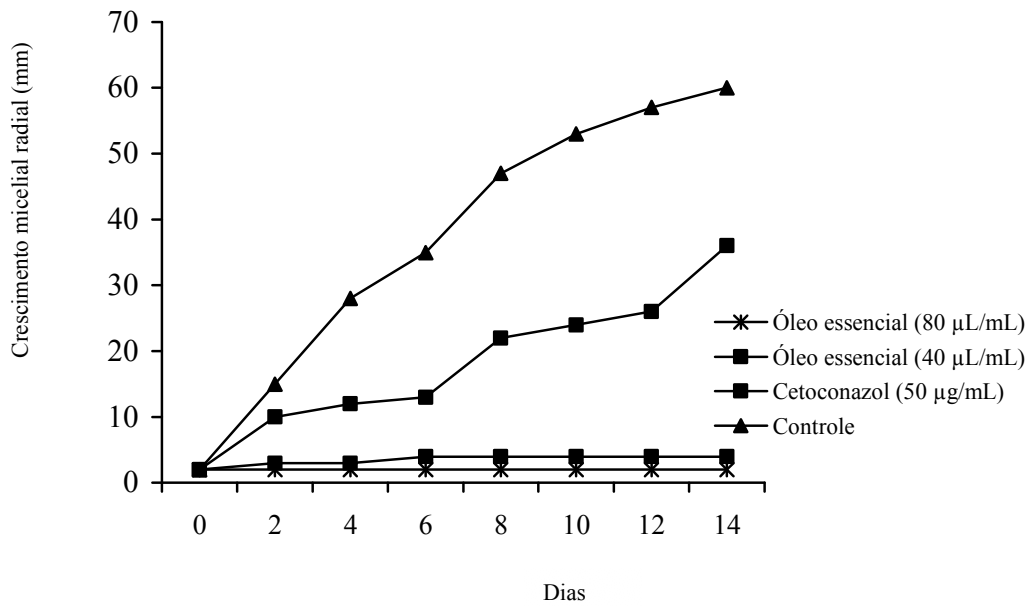


Gráfico 4: Efeito do óleo essencial de *O. vulgare* e cetoconazol sobre a cinética de morte microbiana de *A. flavus* LM-247. t-Tukey ($p < 0,05$).

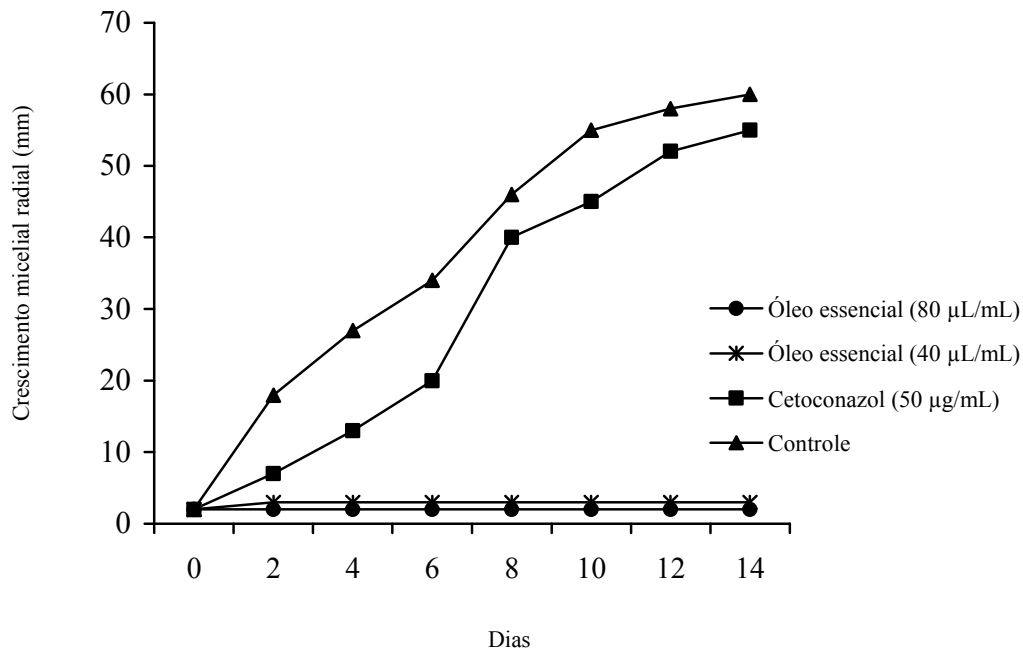


Gráfico 5: Efeito do óleo essencial de *O. vulgare* e cetoconazol sobre a cinética de morte microbiana de *A. fumigatus* ATCC-40640. t-Tukey ($p < 0,05$).

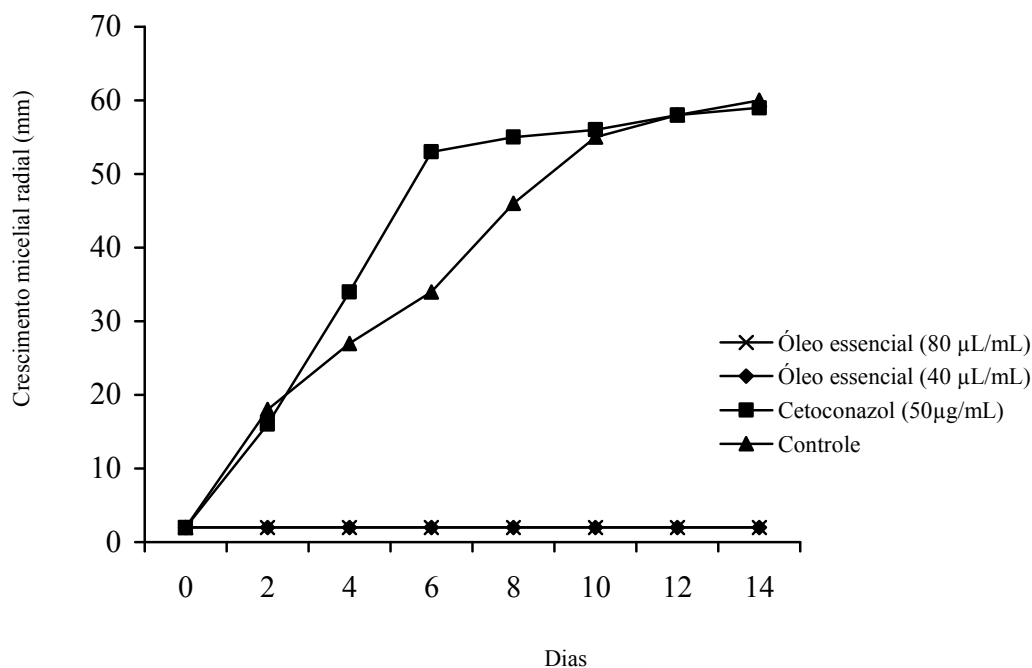


Gráfico 6: Efeito do óleo essencial de *O. vulgare* e cetoconazol sobre a cinética de morte microbiana de *A. niger* P-03. t-Tukey ($p < 0,05$).

Alguns trabalhos recentemente vêm explorando o potencial dos óleos essenciais (incluindo os óleos de *C. zeylanicum* e *O. vulgare*) de inibir o crescimento micelial de fungos patogênicos.

Por exemplo, Moreira (2006) avaliando a cinética de crescimento micelial dos fungos dermatíceos *C. cladosporioides* e *F. compacta*, frente ao óleo essencial de *C. zeylanicum* na concentração de 125 µL/mL, observou total inibição do crescimento radial ao longo de 14 dias de exposição. Quando comparado ao controle sem antifúngico e aquele com anfotericina B (100 µg/mL) essa atividade fungicida apresentou-se bastante significativa ($p < 0,001$).

Basílico e Basílico (1999) verificaram a eficiência antifúngica do óleo essencial de *O. vulgare* (100ppm) através da inibição do crescimento micelial de *A. ochraceus* e produção de Ocratocina A por tal fungo (avaliando durante 7, 14 e 21 dias).

Sharma e Tripatti (2006) observaram que na concentração de 3,5 µg/mL (CIM e CFM) o óleo de *Citrus sinensis* foi capaz de inibir 100% do crescimento radial micelial de *A. niger* após 7 dias de incubação.



Figura 15 – Cinética de morte microbiana de *A. fumigatus* exposto ao óleo essencial, respectivamente, de *C. zeylanicum* (40 µL/mL), ao cetoconazol (50µg/mL) e controle de crescimento fúngico, após 4 dias de interação.



Figura 16 - Cinética de morte microbiana de *A. fumigatus* exposto ao óleo essencial, respectivamente, de *C. zeylanicum* (40 µL/mL), ao cetoconazol (50µg/mL) e controle de crescimento fúngico, após 10 dias de interação.

O desenvolvimento micelial de *A. niger* avaliado nos experimentos de De Billerberck et al. (2001) foi reduzido de modo concentração-dependente pelo óleo de *Cymbopogon nardus*. Por exemplo, nas concentrações de 200 mg/L e 400 mg/L houve redução, respectivamente de 30% e 40% deste crescimento, enquanto que na concentração 800 mg/L o desenvolvimento micelial foi completamente inibido.

Outros estudos têm sido realizados no mundo com intuito de se observar à cinética de crescimento radial frente a produtos naturais, podendo-se citar Freire, Morra e Knudsen (2004), os quais observaram que substâncias voláteis liberadas do farelo de *Brassica napus* foram responsáveis pela inibição de 100% do crescimento micelial de cepas de *Fusarium oxysporum*.

Inibição da germinação dos conídios

a) Efeito do óleo essencial de *C. zeylanicum* sobre a germinação de conídios de *Aspergillus*.

Os resultados obtidos da interferência do óleo essencial de *C. zeylanicum* (20, 40 e 80 $\mu\text{L}/\text{mL}$) sobre a germinação dos conídios de *A. flavus* LM-247, *A. fumigatus* ATCC-40640 e *A. niger* P-03 estão plotados na Tabela 8. Como pode ser notado ocorreu uma significativa inibição da germinação destes nas diferentes concentrações do óleo. Nas concentrações de 80 e 40 $\mu\text{L}/\text{mL}$, ocorreu 100 % de inibição de todas as linhagens, enquanto a 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$ esta inibição esteve acima de 90 e 80%, respectivamente, para *A. flavus* e *A. fumigatus*. A germinação dos conídios de *A. niger* foi inibida na ordem de 25 %, numa concentração de 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$ do óleo essencial. Adicionalmente, foi verificada nesta concentração uma aparente diminuição da hifa germinativa nascente do conídio de *A. niger*, quando comparado ao controle. A figura 17 ilustra a inibição da germinação dos conídios de *A. niger* em diferentes concentrações.

Tabela 8 - Inibição da germinação dos conídios de *Aspergillus* pelo óleo essencial de *C. zeylanicum* (resultados expressos em porcentagem de inibição da germinação dos conídios em relação ao controle).

Fungo	Concentrações do óleo essencial de <i>C. zeylanicum</i>		
	20 $\mu\text{L}/\text{mL}$	40 $\mu\text{L}/\text{mL}$	80 $\mu\text{L}/\text{mL}$
<i>A. flavus</i> LM-247	92%	100 %	100 %
<i>A. fumigatus</i> ATCC-40640	86 %	100 %	100 %
<i>A. niger</i> P-03	25 %	100 %	100 %

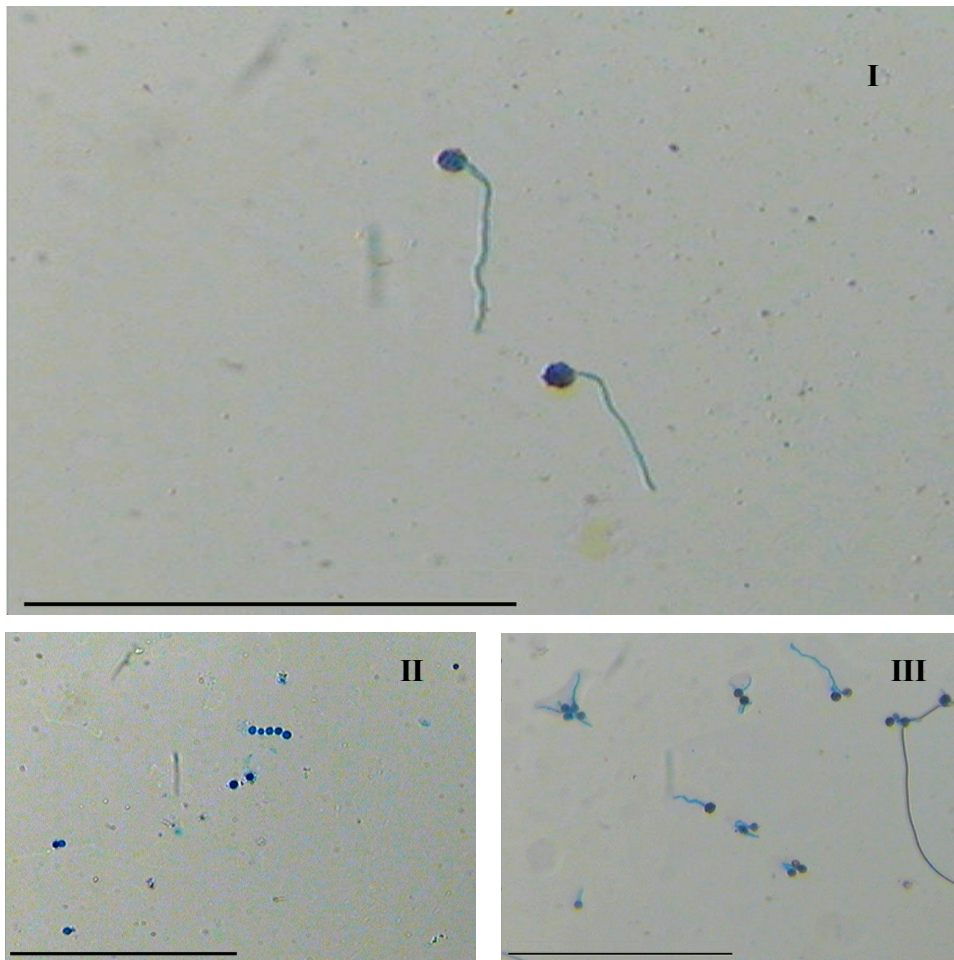


Figura 17 - Efeito do óleo essencial de *C. zeylanicum* sobre a germinação de conídios de *A. niger*. a) controle positivo: *A. niger* na ausência do óleo. b) *A. niger* exposto a 40 μ L/mL do óleo. c) *A. niger* exposto a 20 μ L/mL do óleo.

b) Efeito do óleo essencial de *O. vulgare* sobre a germinação de conídios de *Aspergillus*.

A tabela 9 demonstra os resultados obtidos pela interferência do óleo essencial de *O. vulgare* nas concentrações de 40 e 80 μ L/mL sobre a germinação dos conídios de *A. flavus* LM-247, *A. fumigatus* ATCC-40640 e *A. niger* P-03. Como pode ser notado o óleo exibiu uma forte inibição da germinação dos conídios de todos os fungos testados, em ambas as concentrações. Na concentração de 80 μ L/mL ocorreu 100 % de inibição de todos os fungos, enquanto que a 40 μ L/mL foi observado sempre uma inibição superior a 90%.

Tabela 9 - Inibição da germinação dos conídios de *Aspergillus* pelo óleo essencial de *O. vulgare* (resultados expressos em porcentagem de inibição da germinação dos conídios em relação ao controle).

Fungos	Concentrações do óleo essencial de <i>O. vulgare</i>	
	40 µL/mL	80 µL/mL
<i>A. flavus</i> LM-247	91 %	100 %
<i>A. fumigatus</i> ATCC-40640	93 %	100 %
<i>A. niger</i> P-03	100 %	100 %

Outros óleos essenciais atualmente vêm sendo testados no intuito de inibir a germinação de esporos fúngicos, em especial do gênero *Aspergillus*. Por exemplo, o óleo de *Citrus sinensis* na concentração de 3,5 µg/mL foi capaz de inibir 100% da germinação dos conídios de *A. niger* (SHARMA & TRIPATHI, 2006). Em outro estudo, realizado por Aderiye et al. (1989), a germinação de conídios de *Aspergillus* foi prevenida, em cerca de 40% numa pelo β-sitosterol numa concentração de 50 µg/mL. Os extratos metanólicos de *Solanum xanthocarpum* e *Datura metel* inibiram o crescimento e germinação dos conídios de *A. fumigatus*, *A. niger* e *A. flavus* numa concentração de 1,25-2,50 µg/mL (DABUR et al., 2004).

Assim como a inibição da germinação de conídios de *Aspergillus*, também outros fungos tiveram o desenvolvimento da hifa impedido, após exposição a outros óleos essenciais. Rana, Singh e Taneja (1997), testando o óleo essencial de *Aegle marmelos* em diferentes concentrações sobre a germinação dos esporos de fungos como *Alternaria*, *Curvularia* e *Fusarium*, observaram redução gradual da germinação, concentração-dependente e que a 500ppm ocorreu total inibição de germinação destes.

A ação inibitória dos óleos essenciais de *C. zeylanicum* e *O. vulgare* sobre a germinação dos conídios de *A. niger*, *A. fumigatus* e *A. flavus* pode ser resultado de um bloqueio de canal de cálcio (RODRIGUES; ARAUJO; PINA-VAZ, 2006), uma vez que a formação da hifa fúngica de *Aspergillus* a partir do seu conídio é análoga à formação do tubo germinativo de *C. albicans* e esta, por sua vez, foi

inibida por Rodrigues et al. (1999), em seus experimentos utilizando lidocaína e bupivacaina (anestésicos locais), ambas bloqueadores dos canais de cálcio.

Sabe-se que tanto cálcio quanto calmodulina são essenciais para o ciclo de divisão celular e crescimento do *Aspergillus nidulans*. E que o prejuízo da expressão do gene para cálcio-calmodulina – dependente de proteína cinase previne a entrada de conídios no ciclo de divisão nuclear e germinação, bloqueando o desenvolvimento da hifa (DAYTON et al. 1997).

A germinação de conídios de *Aspergillus* é um passo decisivo na patogênese de infecções pulmonares causadas por estes organismos (BERENQUER et al., 1995). Portanto a inibição da germinação dos conídios, bloqueando a formação das hifas, as quais são as formas invasivas do *Aspergillus*, pode representar um novo alvo estratégico com significativo impacto terapêutico (DE LUCCA et al., 1996).

Morfogênese

As cepas de *A. flavus* LM-247, *A. fumigatus* ATCC-40640 e *A. niger* P-03, expostas as concentrações de 40 e 80 µL/mL do óleo essencial de *C. zeylanicum*, quando analisadas sob microscopia óptica, num aumento de 400 vezes, revelaram algumas alterações morfológicas quando comparadas aos seus respectivos micélios controle.

Primeiramente, o micélio controle demonstrou estrutura celular regular, apresentando citoplasma homogêneo, conidióforo completo com visível estirigmata, suportando os conídios e uma conidiação sobre uma larga e radiada cabeça conidial.

Aspergillus niger no meio de cultura adicionado de óleo essencial, apresentou distintas alterações morfológicas da estrutura micelial. Tais alterações incluíram mudanças na estrutura dos conidióforos, como diminuição da conidiação (perda da esporulação), conidióforos pouco desenvolvidos, além de perda de pigmentação das hifas, visível perda do conteúdo citoplasmático e fragmentação de hifas foram visualizadas (ver figura 18 e 19).

A. flavus e *A. fumigatus* quando expostos ao óleo essencial, demonstraram algumas alterações morfológicas, principalmente, na formação dos conidióforos, onde uma visível diminuição da conidiação foi observada (ver figura 20 e 21).



Figura 18 - Micromorfologia do conidióforo de *A. niger* P-03 crescendo em ASD sem ou com óleo essencial de *C. zeylanicum*, durante 7 dias de incubação a 28-30 °C. (I) Controle positivo: cabeça conidial de *A. niger*, larga e radiada, desenvolvendo vesícula sobre conidióforo, conídios claramente visíveis, barra 100 μ m. (II-III) Modificações da cabeça conidial induzida, respectivamente, por 80 e 40 μ L/mL do óleo essencial de *C. zeylanicum*, demonstrando clara redução na conidiação, barra 100 μ m.

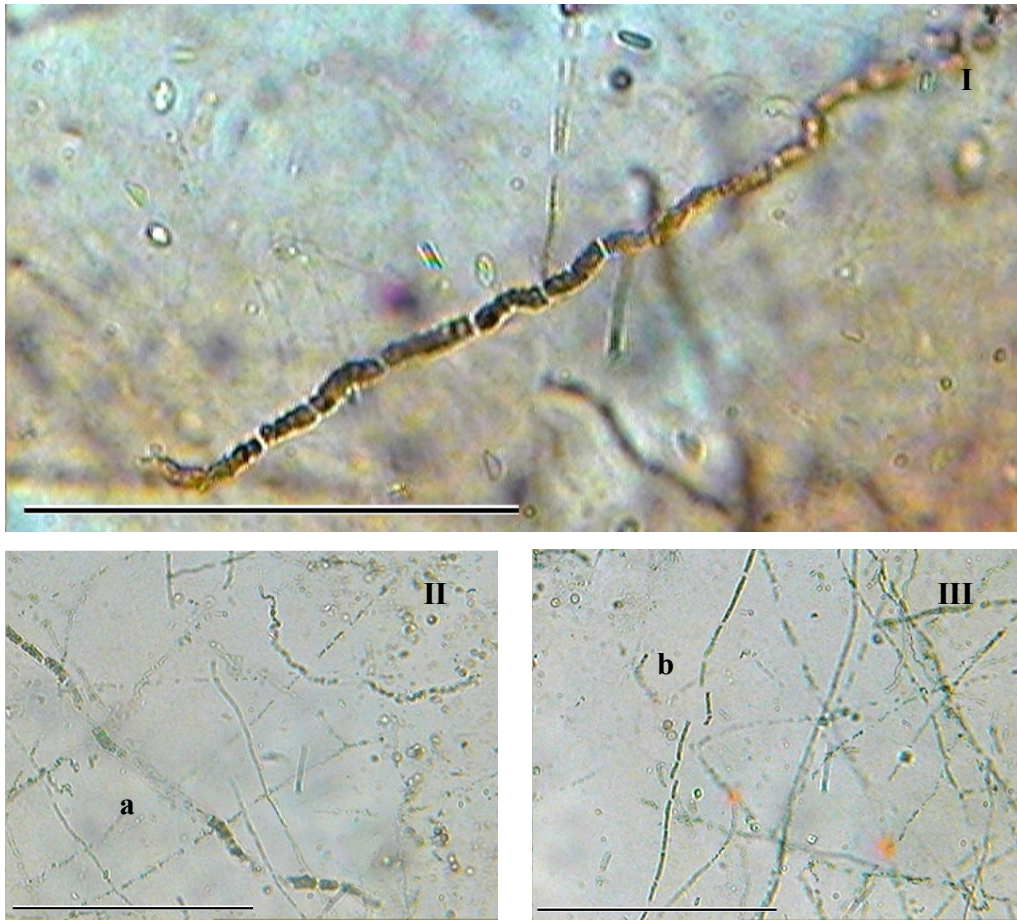


Figura 19 – Micromorfologia da hifa vegetativa de *A. niger* P – 03 crescendo em ASD sem ou com óleo essencial de *C. zeylanicum* durante 7 dias de incubação a 28-30°C. (I) controle positivo: hifa vegetativa demonstrando estrutura homogênea e regular, barra 100µm. (II-III) modificações da hifa fúngica, induzidas por 80µL/mL do óleo essencial de *C. zeylanicum* demonstrando perda de pigmentação citoplasmática (a) perda de conteúdo citoplasmático (b) clara ruptura da célula fúngica, com conseqüente destruição da mesma, barra 100 µm.

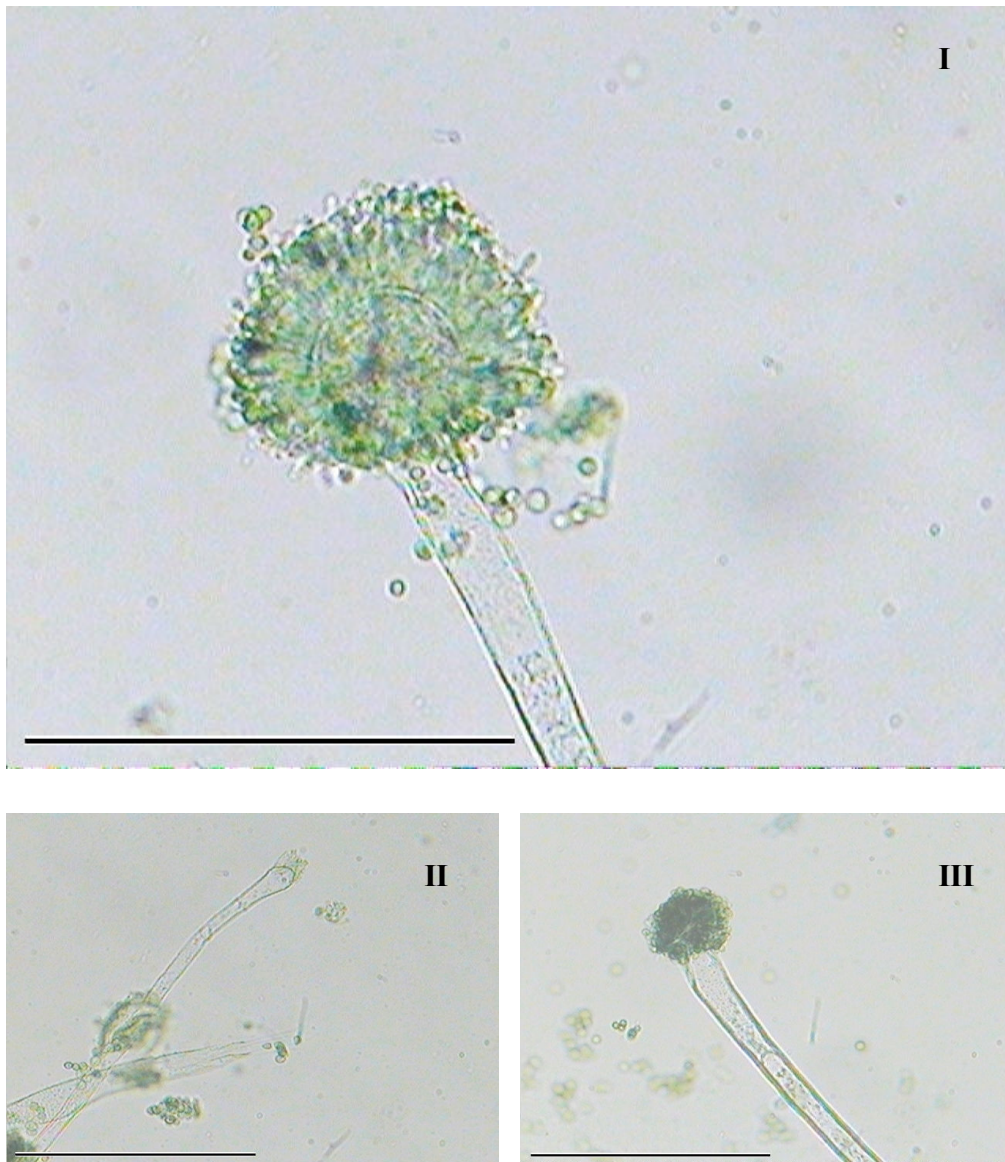


Figura 20 – Micromorfologia do conidióforo de *A. flavus* LM-247 crescendo em ASD sem ou com óleo essencial de *C. zeylanicum*, durante 7 dias de incubação a 28-30 °C. (I) Controle positivo: cabeça conidial de *A. flavus*, larga e radiada, desenvolvendo vesícula sobre conidióforo, conídios claramente visíveis, barra 100 μm . (II-III) Modificações da cabeça conidial induzida, respectivamente, por 80 e 40 $\mu\text{L/mL}$ do óleo essencial de *C. zeylanicum*, demonstrando clara redução na conidiação, barra 100 μm .



Figura 21 – Micromorfologia do conidióforo de *A. fumigatus* ATCC-40640 crescendo em ASD sem ou com óleo essencial de *C. zeylanicum*, durante 7 dias de incubação a 28-30 °C. (I) Controle positivo: cabeça conidial de *A. flavus*, larga e radiada, desenvolvendo vesícula sobre conidióforo, conídios claramente visíveis, barra 100 µm. (II-III) Modificações da cabeça conidial induzida, respectivamente, por 80 e 40 µL/mL do óleo essencial de *C. zeylanicum*, demonstrando clara redução na conidiação, barra 100 µm.

As alterações morfológicas encontradas nesse estudo com o óleo essencial de *C. zeylanicum* estão compatíveis com o estudo realizado por Sharma e Tripathi (2006). Eles examinaram a microscopia óptica, num aumento de 400 vezes, significativas alterações morfológicas em *A. niger* tratado com diferentes concentrações (0.5; 1.0 e 2.0 µg/mL) do óleo essencial de *Citrus sinensis* em relação ao grupo controle, tais como: perda do citoplasma da hifa fúngica; falta de esporulação; visível perda de pigmentação; aberrante desenvolvimento de conidióforos; redução da cabeça conidial; esterigmata pobremente desenvolvida, com menor ou ausência de conidiação e conidióforos totalmente distorcidos além de bifurcações de algumas hifas. E analisando em microscopia eletrônica, observou-se ruptura da parede celular da hifa na concentração de 2.0 µg/mL.

Em microscopia eletrônica, *A. niger* exposto a 250ppm do óleo essencial de *Thymus x-polorck*, apresentou severos danos à parede celular, como perda da integridade e rigidez desta; rompimento da membrana plasmática e organelas celulares, evidenciando destruição de mitocôndrias e hifas tornaram-se colapsadas pela perda de conteúdo citoplasmático. Acredita-se que a ação do óleo essencial de *Thymus x-polorck* deve-se aos seus componentes possuírem propriedades lipofílicas, e, portanto, habilidade de penetrar na membrana plasmática, provocando alterações deletérias no fungo (KNOBLOCH et al., 1989).

Alterações como redução do diâmetro da hifa de *A. niger* e aparecimento de estruturas granulares e vesiculares, quando comparado ao controle, foram observadas a microscopia óptica, após a exposição a 200mg/L do óleo essencial de *Cymbopogon nardus* por De Billerbeck et al. (2001). Já na concentração de 400 mg/L esta granulação tornou-se mais evidente e a 800mg/L as hifas apresentaram-se completamente degeneradas. Em microscopia eletrônica de varredura, evidenciaram ruptura da parede celular, quando a hifa exposta a 800mg/L do óleo. já na microscopia de transmissão eletrônica, observou-se a formação de numerosos lomassomas, estruturas geralmente encontradas em fungos tratados com derivados imidazólicos (PREUSER, 1976, SCOTT et al., 1986).

Ghfir, Fonvieille e Dargent (1997), em um estudo bioquímico feito com óleo de *Hyssopus officinales*, sobre a síntese da parede de *A. fumigatus*, observaram que a presença do óleo no meio induzia mudança no conteúdo de galactose e galactosamine, os quais são componentes polissacarídeos essenciais à constituição da parede celular fúngica. Outros pesquisadores como Giordani et al. (1996), relataram degradação da parede celular devido à perda de constituintes polissacarídicos de *C. albicans* tratadas com o látex de *Carica papaya* (GIORDANI et al., 1996).

Diante das alterações morfológicas deletérias apresentadas pelas cepas de *A. flavus* LM-247, *A. niger* P-03 e *A. fumigatus* 40640, como perda do conteúdo citoplasmático e conseqüentemente morte celular é que se pode atribuir a esse efeito, uma interferência direta dos componentes do óleo essencial de *C. zeylanicum* nas reações enzimáticas de síntese da parede celular, as quais afetam a morfogênese e crescimento fúngico (ZAMBONELLI et al., 1996; DE BILLERBECK et al., 2001; RASOOLI; REZAEI; ALLAMEH, 2006; SHARMA e TRIPATTI, 2006).

De acordo com Shama e Tripatti (2006) estas observações indicam que o mecanismo de atividade antifúngica do óleo essencial é um resultado de ataque a parede da célula fúngica com conseqüente redução do conteúdo citoplasmático e por fim morte micelial.

CONSIDERACOES FINAIS

- ❖ No *screening* microbiológico para avaliação preliminar da atividade antifúngica, os óleos essenciais de *C. aromaticus*, *C. zeylanicum* e *O. vulgare*, apresentaram intenso efeito inibitório sobre *Aspergillus*, quando comparados aos demais óleos;
- ❖ Com relação a CIM para os três óleos com melhor atividade, todos apresentaram os mesmos valores de CIM₅₀ e CIM₉₀, respectivamente, 40 e 80 µL/mL;
- ❖ De todas as espécies ensaiadas, as duas de *A. terreus* foram as mais resistentes, não apresentando nenhum grau de sensibilidade a anfotericina B (100 µg/mL), no entanto tais cepas foram sensíveis até a concentração de 40 µL/mL para os óleos essenciais de *C. zeylanicum* e *O. vulgare* e até 80 µL/mL para o óleo de *C. aromaticus*;
- ❖ Na avaliação do potencial de inibição do crescimento micelial, pela cinética de morte microbiana, ambos os óleos essenciais de *C. zeylanicum* e *O. vulgare*, em todas as concentrações, mostraram nos 14 dias de incubação, um potente efeito fungicida, quando comparados a baixa eficácia do cetoconazol (50 µg/mL), ao longo do mesmo período;
- ❖ Os óleos essenciais de *C. zeylanicum* e *O. vulgare* conseguiram prevenir a germinação dos conídios de *A. flavus*, *A. fumigatus* e *A. niger*, ou seja, promovendo assim a não formação da hifa, a qual é a forma invasiva do fungo;
- ❖ O óleo essencial de *C. zeylanicum* foi capaz de diminuir a esporulação das cepas *A. flavus* LM-247, *A. fumigatus* ATCC-40640 e *A. niger* P-03, além de

provocar alterações deletérias na hifa fúngica, como perda de material citoplasmático e ruptura da célula fúngica;

- ❖ Devido à promissora atividade antifúngica desempenhada pelos óleos essenciais de *C. aromaticus*, *C. zeylanicum* e *O. vulgare* sobre o gênero *Aspergillus*, justifica-se que estes possam ser usados de forma racional tanto pela indústria alimentícia (na conservação da comida), quanto pela indústria farmacêutica na formulação de novos agentes antifúngicos para tratamento de eventuais aspergiloses.

REFERÊNCIAS

ABBASI, S.; SHENEP, J. L.; HUGHES, W. T.; FLYNN, P. M. Aspergillosis in children with cancer: A 34-year experience. **Clinical Infectious Diseases**, v. 29, p. 1210-1219, 1999.

ADAM, K.; SIVROPOULOU, A.; KOKKNI, S.; LNARAS, T. ARSENAKIS, M. Antifungal activities of *Origanum vulgare* subsp. Hirtum, *Mentha spicata*, *lavandula augustifolia* and *Salvia fruticosa* essential oils against humam pathogenic fungi. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 5, p. 1739-1745, 1998.

ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. Carol Stream : Allured Publishing Corporation, 1995.

ADERIYE, B. I.; OGUNDANA, S. K.; ADESANYA, S. A.; ROBERTS, M. F. The effect of beta-sitosterol on spore germination and germ-tube elongation of *Aspergillus niger* and *Botryodiplodia theobromae*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 73-8, 1989.

AKGUL, A.; KIVANÇ, M. Inhibitory effects of selected Turkish spices and oregano components on some foodborne fungi. **International Journal of Food Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 263-268, 1988.

ALIGIANS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINO, I. B. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two *Origanum* species. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 49, p. 4168-4170, 2001.

ALLEGRIANI, J.; BOUCHBERG, M. S.; MAILLOLS, H. Émulsions d'huiles essentielles fabrication et applications en microbiologie. **Société de Pharmacie de Montpellier**, v. 33, n. 1, p. 86, 1973.

ALONSO, R. J. Tratado de fitomedicina: bases clínicas y farmacológicas. Buenos Aires: ISIS, 1998.

ALVES, T. M. A.; SILVA, A. F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T. S. M.; SMÂNIA, E. F. A.; SMÂNIA JÚNIOR, A.; ZÁNI, C. L. Biological Screening of Brazilian Medicinal Plants. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, RJ., v. 93, n. 3, p. 367-373, 2000.

AMARAL, M. F. Z. J.; BARA, M. T. F. Avaliação da atividade antifúngica de extratos de plantas sobre o crescimento de fitopatógenos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 2, n. 2, p. 5-8, 2005.

AMITANI, R.; TAYLOR, G.; ELEZIS, E. N.; LLEWELLYN, C. J.; MITCHELL, J.; KUZE, F.; COLE, P. J.; WILSON, R. Purification and characterization of factors produced by *Aspergillus fumigatus* which affect human ciliated respiratory epithelium. **Infection Immunity**, v. 63, n. 9, p. 3266-3271, 1995.

ANDREAZZA, R. C. S. Análise botânica, química e microbiológica de *Salvia aliciae*, *S. lachnostachys* Benth, *S. microphylla* Kunth, *S. officinalis* L. (Lamiaceae). Curitiba, 2000, 125f. Dissertação (Mestrado em Botânica). Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná.

ATANDA, O. O.; AKPAN, I.; OLUWAFEMI, F. The potential of some essential oils in the control of *A. parasiticus* CFR 223 and aflatoxin production, **Food Control**, v.18, n.5, p. 601-607, 2007.

BARATTA, T. M., DORMAN, D. J. H., DEANS, G. S., FIGUEIREDO, C. A., BARROSO, G. J., & RUBERTO, G. Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial oils. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 13, n. 4, p. 235–244, 1998.

BASÍLICO, M. Z.; BASÍLICO, J. C. Inhibitory effects of some spice essential oils on *Aspergillus ochraceus* NRRL 3174 growth and ochratoxin A production. **Letters in Applied Microbiology**, v. 29, n. 4, p. 238-241, 1999.

BAUER, A. W. M. M.; KIRBY, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v.45, n.3, p. 493-496, 1966.

BAUER, J.; ABBOTT, M.; GEDEK, B. Isolation of a Mycotoxin (gliotoxin) from a bovine udder infected with *Aspergillus fumigatus*. **Journal of medical and veterinary mycology**, v. 27, n. 1, p. 45-50, 1989.

BEDELE, A. M.; CARLTON, W. W.; KROGH, P.; LILLEHOJ, E. B. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 75, p. 773–774.1985.

BELÉM, L. F. Efeito de fungicidas químicos e de produtos naturais no desenvolvimento “*in vitro*” de fungos que afetam sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) durante o armazenamento. 1997, 66f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal). Universidade Federal da Paraíba, Areia – PB.

BELÉM, L. F.; LIMA, E. S.; LIMA, E. O.; AGRA, M. F.; PAULO, M.Q. Study of the chemistry and antimicrobial activity of *Chaetocarpus blanchetii* (Euphorbiaceae). **In. Simpósio Brasil-China de química e farmacologia de produtos naturais**, Rio de Janeiro. 1989.

BELÉM, L. F. Estudo epidemiológico da Pitiríase versicolor no Estado da Paraíba e avaliação química e antifúngica de produtos naturais e sintéticos contra seu agente etiológico. 167p. 2002. (Tese de Doutorado). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB.

BELKACEMI, L.; BARTON, R. C.; HOPWOOD, V.; EVANS, E. G. V. Determination of optimum growth conditions for gliotoxin production by *Aspergillus fumigatus* and development of a novel method for gliotoxin detection. **Medical Mycology**, v. 37, n.4, p. 227-234, 1999.

BERENQUER, J.; ALLENDE, M. C.; LEE, J. W.; GARRETT, K.; LYMAN, C. A.; ALI, N. M.; BACHER, J.; PIZZO, P. A.; WALSH, T. J.. Pathogenesis of invasive pulmonary aspergillosis during persistent granulocytopenia versus cyclosporine and methylprednisolone-induced immunosuppression. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 152, p. 1079–1086, 1995.

BRODY, T. M.; LARNER, J.; MINNEMAN, K. P.; NEU, H. C. Farmacologia humana: de molecular a clínica. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 457 e 637, 1994.

BRUININK, A.; SIDLER, C. The Neurotoxic Effects of Ochratoxin-A Are Reduced by Protein Binding but Are Not Affected by l-Phenylalanine. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 146, n. 2, p. 173–179, 1997.

BULLERMAN, L. B.; LIEW, F. Y.; SEIER, S. A. Inhibition of growth and aflatoxin production by Cinnamomum and clove oils, cinnamic aldehyde and eugenol. *Journal of Food Science*, Chicago, v. 42, n. 6, p. 1107-1109, 1977. In SOUZA, S. M. C; PEREIRA, M. C.; ANGELICO, C. L.; PIMENTA, C. J. Avaliação de óleos essenciais de condimentos sobre o desenvolvimento micelial de fungos associados a produtos de panificação. **Ciências, Agrotecnologia, Lavras**, v. 28, n. 3, p. 685-690, 2004.

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

BUSHBY, L. A.; WOGAN, G. N. Aflatoxins. In R. C. Shank (Ed.), *Mycotoxins and N-nitroso compounds: Environmental risks* Boca Raton: CRC Press. p. 3–29, 1981.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade Como Fonte de Medicamentos. **Revista Ciência e Cultura**, São Paulo: Imprensa Oficial, n. 3, ano 55, Jul/Ago/Set p. 37, 2003.

CALIXTO, J. B.; SANTOS, A. R. S.; CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A.; A review of the plants of the genus *Phyllanthus*: their chemistry pharmacology and therapeutic potencial. **John Wiley & Sons**, v. 18, n. 4, p. 225-258, 1998.

CALIXTO, J. B.; YUNES, R. A. Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna. Chapecó: Argos. p. 481-496, 2001.

CANUTO, M. M.; RODERO, F. G. Antifungal drug resistance to azoles and polyenes. **The Lancet Infectious Diseases**, v.2, n.9, p.550-563, 2002.

CARRICONDE, C.; MORAES, D.; FRITSCEHN, M. V.; CARDOSO JUNIOR, E. L. Plantas medicinais & plantas alimentícias. UFRPE, Olinda, v. 1, 1996.

CARSON, C. F.; MEE, B. J.; RILEY, T. V. Mechanism of action of *Melaleuca artemifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 6, p. 1914–1920, 2002.

CASALS, J. B. Tablet sensitivity testing of pathogenic fungi. **Journal of Clinical Pathology**, v. 32, n. 7, p. 719-722, 1979.

CHAKRABARTI, A.; MARAK, R. S. K.; SING, S.; GUPTA, S. O.; HURST, S. F.; PADHYE, A. A. Brain abcess due to *Aspergillus nidulans*. **Journal Medical Mycology**, v. 16, n. 2, p. 100-104, 2006.

CHAMILOS, G.; KONTOYIANIS, D. P. Update on antifungal drug resistance mechanisms of *Aspergillus fumigatus*. **Drug Resistance Update**, v. 8, n. 6, p. 344-358, 2005.

CHAO, S.; YOUNG, D. G.; OBERG, C. J. *Screening* for inhibitory of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. **Journal of Essential Oil Research**, v. 12, p. 639-649, 2000.

CHILLER, T. M.; STEVENS, D. A. Treatment strategies for *Aspergillus* infections. **Drug Resistance Update**, v. 3, p. 89-97. 2000.

CHUN, S. S., VATTERN, A. V., LIN, Y. T., SHETTY, K. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. **Process in Biochemistry**, 40, n.2, p. 809-816, 2005.

CIMANGA, K.; KAMBU, K.; TONA, L.; APERS, S.; BRUYNE, T.; HERMANS, N.; TOTTÉ, J.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A. J. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic republic of Congo. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, n.2, p. 213-220, 2002.

CLEELAND, R.; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials "*in vitro*" and in experimental animal infections. In: LORIAN, V. M. D. **Antibiotics in Laboratory Medicine**. Willians & Wilkins, p. 739-788, 1991.

CLIFT, D. C.; DODD, H. J.; KIRBY, J. D. T.; MIDGLEY, G.; NOBLE, W. C. Seborrheic dermatitis and malignancy. **Acta Dermato Venereologica**, v. 68, p. 48-52, 1988.

COLOMBO, A. L. (2002). Ação de fungos é letal em até 60% das contaminações. Disponível em: <http://www.unifesp.br/comunicacao/jpta/ed167/pesquisa2.htm>
Acessado em: 09/07/2004.

CORREA, M. P. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Imprensa Nacional (ed.), Rio de Janeiro, v. 1, p. 458-459, 1984.

COSTA, A. F. Farmacognosia. Fundação Calouste-Gulbenkian (3ª ed.), Lisboa. v. 1, p. 295, 1975.

CRAVEIRO, A. A.; DE QUEIROZ, D. C. Óleos essenciais e Química fina. **Química Nova**, v. 16, n. 3, p. 224-228, 1993.

CUCÉ, L. C.; ANDRADE, F. A.; SALEBIAN, A.; HEINSVACCARI, E. M. Flora anemófila em ambiente hospitalar (P.S. E UTI). **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 68, n.4, p. 201-204, 1993.

CURTIS, L.; CONROY, L.; COLI, S.; BAKER, K.; OUR, C. H.; Hershov, R.; NORLOCK-CRUZ, F.; SCHEFF, P. *Aspergillus* surveillance project at a large tertiary-care hospital. **Journal of Hospital Infection**, v.59, n.3, p.188-196, 2005.

DABUR, R.; SINGH, H., CHHILLAR, A. K.; ALI, M.; SHARMA, G. L. Antifungal potential of Indian medicinal plants. **Fitoterapia**, v. 75, p. 389–391, 2004.

DAFERERA, D. J.; ZIOGAS, B. N.; POLISSIOU, M. G. GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 48, n. 6, p. 2576-2581, 2000.

_____. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium sp.* and *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michaganensis*. **Crop Protection**, v. 22, n.1, p. 39-44, 2003.

DAYTON, J. S.; SUMI, M.; NANTHEKUMAR, N. N.; MEANS, A. R. Expression of a constitutively active Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase in *Aspergillus nidulans* spores prevents germination and entry into the cell cycle. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 6, p. 3223–3230, 1997.

DE BILLERBECK, V. G.; ROQUES, C. G.; BESSIERE, J-M.; FONVIEILLE, J-L.; DARGENT, R. Effects of *Cymbopogon nardus* (L.) W. Watson essential oil on the growth and morphogenesis of *Aspergillus niger*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 9-17, 2001.

DESSELBERGER, V. Emerging and re-emerging infectious disease. **Journal of Infectious Diseases**. v.40, n.1, p.3-15, 2000.

DE LUCCA, A. J.; WALSH, T. J.; DAIGLE, D. J. *N*-Acetylcysteine inhibits germination of conidia and growth of *Aspergillus* spp. and *Fusarium* spp. **Antimicrob Agents Chemother**, v.40, n. 5, p. 1274–1276, 1996.

DUARTE, M. C. T.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V. L. G.; DELARMELENA, C. Anti-candida activity of brasilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 2, p. 305-311, 2005.

DUBEY, A.; PATWARDHAN, R. V.; SAMPTH, S.; SANTOSHI, V.; KOLLURI, S.; NANDA, A. Intracranial fungal granuloma: analysis of 40 patients and review of the literature. **Surgical Neurology**, v. 63, p. 254-260, 2006.

FALEIRO, L.; MIGUEL, G.; GOMES, S.; COSTA, L.; VENÂNCIO F.; TEXEIRA, A.; FIGUEIREDO, A. C.; BARROSO, J. G.; PEDRO, L. G. Antibacterial and antioxidant activities of essential oil isolated from *Thymbra capitata* L. and *Origanum vulgare* L. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 53, n. 21, p. 8162-8168, 2005.

FARIAS-ALVES, V.; SICCHIROL-LAVRADOS, M.A.; PEREIRA-DE-MARTINIS, E.C. Bacteriocins exposure and food ingredients influence on growth and virulence of *Listeria monocytogenes* in a model mat gravy system. **Journal of Food Safety**, v.23, n.3, p.201-217, 2003.

FRANCO, J. Determinação *in vitro* da atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Eucalyptus cinérea* F. Myrtaceae. Curitiba, 2003, 13f. Monografia (Especialização em Microbiologia). Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

FREIRE, M. F. I.; MORRA, M. J.; KNUDSEN, G. R. Atividade antifúngica de substancias voláteis presentes em *Brassica napus* sobre o crescimento micelial de *Fusarium oxysporum*. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 85, n. 3, p. 73-75, 2004.

FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L.; FERREIRA, M. B. C. Farmacologia clínica. Fundamentos da terapêutica racional. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 439-440, 2004.

GARBER, G. An overview of fungal infections. **Drugs**, v.1 (Suppl. 1), p. 1-12, 2001.

GAUR, A.; FLYNN, P. M. Emerging Fungal Infections in the Immunocompromised Host. **Seminars in Pediatric Infectious Diseases**, v. 12, n. 4, p. 279-287, 2001.

GAYOSO, C. W.; LIMA, E. O.; OLIVEIRA, V. T.; PEREIRA, F. O.; SOUZA, E. L. Ação inibitória do óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* Blume, α -pineno, β -pineno sobre fungos isolados de onicomioses. **Journal Brasileiro de Fitomedicina**, v. 1, p. 25-29, 2004.

GAYOSO, C. W.; LIMA, E. O.; OLIVEIRA, V. T.; PEREIRA, F. O.; SOUZA, E. L.; LIMA, I. O.; NAVARRO, D. F. Sensitivity of fungi isolated from onychomycosis to

Eugenia cariophyllata essential oil and eugenol. **Fitoterapia**, v. 76, p. 247-249, 2005.

GHFIR, B.; FONVIEILLE, J. L.; DARGENT, R. Effect of essential oil of *Hyssopus officinalis* on the chemical composition of the walls of *Aspergillus fumigatus*. *Mycopathologia*, v.138, p. 7-12, 1997. In BILLERBECK, V. G.; ROQUES, C. G.; BESSIERE, J-M.; FONVIEILLE, J-L.; DARGENT, R. Effects of *Cymbopogon nardus* (L.) W. Watson essential oil on the growth and morphogenesis of *Aspergillus niger*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 9-17, 2001.

GIORDANI, R.; CARDENAS, M. L.; MOULIN-TRAFFORT, J.; REGLI, P. Fungicidal activity of latex sub from *Carica papaya* and antifungal effect of D(+) gencosamine on *Candida albicans* growth. *Mycoses*, v. 39, p. 103-110, 1996. In BILLERBECK, V. G.; ROQUES, C. G.; BESSIERE, J-M.; FONVIEILLE, J-L.; DARGENT, R. Effects of *Cymbopogon nardus* (L.) W. Watson essential oil on the growth and morphogenesis of *Aspergillus niger*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 9-17, 2001.

GRUMACH, A. S. Alergia e imunologia na infância e na adolescência. São Paulo: Atheneu, p. 16-21, 2001.

HAN, M.; KIM, S.; AHN, Y. Insecticidal and antifeedant activities of medicinal plant extracts against *Attagenes uicolor japonicus* (Coleoptera: Dermestidae). **Journal of Stored Products Research**, v.42, Issue 1, p. 15-22, 2006.

HERBRECHT, R., MARR, K., CATANZARO, A., GREENBERG, R., TISSOT-DUPONT, H., GALLAIS, H., MOORE, T., CORCORAN, G., PEDICONE, L. Posaconazole as salvage therapy for invasive fungal infections unresponsive to voriconazole: a case series. In: 44th Interscience Conference on Antimicrobial

Agents and Chemotherapy (ICAAC), Washington, DC, USA, Abstract # M-1044, 2005.

HERSH-MARTINEZ, P.; LEANOS-MIRANDA, B. E.; SOLORZANO-SANTOS, F. Antibacterial effects of commercial essential oils over locally prevalent pathogenic strains in México. **Fitoterapia**, v. 76, n. 5, p. 453-457, 2005.

HOLT, R. I. Laboratory tests of antifungal drugs. **Journal of Clinical Phatology**, v. 28, p. 767-774, 1975.

International Agency for Research on Cancer (IARC). Overall evaluations of carcinogenicity: An updating of IARC monographs, IARC Scientific Publication, V. 1-42. (Suppl. 7), IARC, Lyon, 1987.

JHAN, G. N.; DHINGRA, O. D.; JARDIM, C. M.; VALENTE, V. M. Identification of the major fungitoxic component of *Cinnamomum* bark oil. **Fitoterapia Brasileira**, v. 30, n. 4, p. 404-408, 2005.

JIROVETZ, L.; BUCHBAUER, G.; STOILOVA, I.; STOYANOVA, A.; KRASTANOV, A.; SCHMIDT, E. Chemical Composition and Antioxidant Properties of Clove Leaf Essential Oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 17, p. 6303-6307, 2006.

JUGLAL, S; GOVINDEN, R.; ODHAN, B. Spices oils for the control co-occurring micotoxin-producing fungi. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 4, p. 638-687, 2002.

KATTA, S. K., ESKRIDGE, K. M., & BULLERMAN, L. B. Mold content of commercial popcorn. **Journal of Food Protection**, v. 58, 1014-1017, 1995.

KERN, M. E.; BLEVINS, K. S. *Micologia Médica: texto e Atlas*. 2^a. ed. São Paulo: Premier, 1999.

KIM, H. O.; PARK, S. W.; PARK, H. D. Inactivation of *Escherichia coli* 0157:H7 by cinnamic aldehyde purified from *Cinnamomum cassia* Shoot. **Food Microbiology**, v. 21, Issue 1, p. 105-110, 2004.

KNOBLOCH, K.; PAULI, P.; IBERL, B.; WEIGAND, H.; WEISS, N. Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. **Journal of Essential Oil Research**, v. 1, p. 119-128, 1989.

KONTOYIANNIS, D. P., BODEY, G. P. Invasive aspergillosis in 2002: an update. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 21, p. 161–172, 2002.

KONTOYIANNIS, D. P.; LEWIS, R. E. Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. **Lancet**, v.359, n.9312, p.1135-1144, 2002.

KOTSONIS, F. N.; BURDOCK, G. A.; FLAMM, W. G. Food toxicology. In C. D. Klassen (Ed.), *Casarett and Doull's Toxicology: The Basic science of poisons* New York: McGraw-Hill, p. 1049–1088, 2001.

LACAZ, C. S. *Micologia Médica: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico*. 7. ed. São Paulo: Sarvier, p. 69-174, 1984.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C. *Micologia Médica*. 8 ed. São Paulo: Sarvier, 695p. 1991.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N. T. *Guia para identificação: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico*. São Paulo: Sarvier, 1998.

LARONE, D. H. *Medically Important Fungi – a guide to identification*. 3^a ed. New York: ASM Press, p. 78-80, 1994.

LAVABRE, M. *Aromaterapia – A cura pelos óleos essenciais*. Rio de Janeiro: Record. P. 65. 1992.

LEUNG, A.Y.; FOSTER, S. *Encyclopedia of common natural ingredients used in foods, drugs and cosmetics*. 2^a ed. New York: Wiley, 1996, p. 465-466. In SOUZA, E. L.; STAMFORD, T. L. M.; TRAJANO, V. N.; LIMA, E. O.; BARBOSA FILHO, J. M. Orégano (*Origanum vulgare* L., Lamiaceae): Uma especiaria como potencial fonte de compostos antimicrobianos. **Revista Higiene Alimentar**, v. 19, n. 132, p. 40-45, 2005.

LI, Y.; XU, C.; ZHANG, Q.; LIU, J. Y.; TAN, R. X. *In vitro* anti-*Helicobacter pylori* of 30 chinese herbal medicines used to treat ulcer diseases. **Journal of ethnopharmacology**, v. 98, Issue 3, p. 329-333, 2005.

LIMA, E. O., Plantas e suas propriedades antimicrobianas: uma breve análise histórica. In. CALIXTO, J. B.; YUNES, R. A. *Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna*. Chapecó: Argos. p. 481-496, 2001.

LIMA, E. O.; GUERRA, M. F.; BELEM, L. F.; FARIAS, N. M. P.; CASIMIRO, G. S. Atividade antimicrobiana de produtos naturais oriundos de plantas medicinais regionais. In XV Simpósio de plantas medicinais do Brasil. Resumos: Águas de Lindóia, p. 175, 1998.

LIMA, M. P.; ZOGHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A.; SILVA, T. M. D.; FERNANDES, C. S. Constituintes voláteis das folhas e dos galhos de *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae). **Acta Amazônica**, V. 35, n. 3, p. 363 – 366, 2005.

LIONAKIS, M. S.; LEWIS, R. E.; TORRES, H. A.; ALBERT, N. D.; RAAD, I. I.; KONTOYIANNIS, D. P. Increased frequency of non-*fumigatus* *Aspergillus* species in amphotericin B- or triazole-pre-exposed cancer patients with positive cultures for *Aspergilli*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 52, n. 1, p. 15–20, 2005.

MANCINI, D. A. P.; DIAS, A. L. F.; PINTO, J. R.; MANCINI FILHO, J. Antioxidants in aqueous extract from *Cinnamomum zeylanicum* Blume as inhibitors of influenza virus. **Brazilian Journal Of Pharmaceutical Science**, v. 35, n. 1, p. 155-160, 1999.

MARIATH, I. R. Atividade antifúngica do óleo essencial de Eugenia aromática B. contra fungos dermatíceos. 24 p. 2004 (Especialização em Microbiologia), UFPB, PB.

MARINO, M.; BERSANI, C.; COMI, G. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. **International Journal of Food Microbiology**, v. 67, n.3, p. 187–195, 2001.

MAZZAFERA, P. Efeito alelopático do extrato alcoólico de cravo da Índia e eugenol. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 26, n.2, p. 231-238, 2003.

MENCACCI, A.; CENCI, E.; BACCI, A.; MONTAGNOLI, C.; BISTONI, F.; ROMANI, L. Cytokines in candidiasis and aspergillosis. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 1, n. 3, p. 235–251, 2000.

McLAFFERTY, F. W.; STAUFFER, D. The Wiley/NBS Registry of Mass Spectral Data. New York : John Wiley Sons, 1989.

MIMS, C. A.; PLAYFAIR, J. H. L.; ROITT, I. M. WAKELIN, D.; WILLIAMS, R. Microbiologia Médica. São Paulo: editora Manole Ltda., Resumos. p. 162, 1995.

MISHRA, A. K., & DUBEY, N. K. Evaluation of some essential oils for their toxicity against fungi causing deterioration of stored food commodities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n.4, p. 1001–1005, 1994.

MISRA, N.; UPMA, K.; SHUKLA, D. Antifungal activity of essential oil of *Cinnamomum zeylanicum*. **Journal Essential Oil Research**, v. 3, n. 1, p. 97-110, 2000.

MOREIRA, A. C. P. Avaliação da atividade antifúngica de óleos essenciais e fitoconstituintes sobre fungos dermatíceos. 94 p. 2006. (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB.

MOREIRA, A. C. P.; LIMA, E. O.; SOUZA, E. L.; DIGENEM, M. A. V.; TRAJANO, V. N. Inhibitory effect of *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae) essential oil and β -pineno on the growth of dermatiaceus moulds. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 33-38, 2007.

MOORE, C. B.; SAYERS, N.; MOSQUERA, J.; SLAVEN, J.; DENNING, D. W. Antifungal drug resistance in *Aspergillus*. **Journal of Infection**, v.41, n.3, p.203-220, 2000.

NAKATANI, N. Biologically functional constituents of spices and herbs. **Journal of Japanese Society of Nutrition and Food Science**. v.56, n.6, p.389-395, 2003.

NASCIMENTO, G. C. F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P. C.; SILVA, G. L. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 247-256, 2000.

NATTINAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS-NCCLS.
Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. 7 ed. Villanova. PA:
NCCLS, 2000.

NOGUEIRA, M. C. M.; COSTA, R. O. SUDO, L.; PORTO, J. A. *Malassezia furfur*
(na pitiríase versicolor e em sádios). **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 63, p.
229-234, 1988.

NOSTRO, A.; BLANCO, A. R.; CANTELLI, M. A.; VICENZO, E.; FLAMINI, G.;
MORELLI, Z.; ROCCARO, A. S; ALONZO, V. Susceptibility of methicillin-resistant
staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. **FEMS Microbiology
Letters**, v. 230, n. 2, p. 191-195, 2004.

NOVAK, F. R.; ALMEIDA, J. A. G.; SANTOS, M. J. S. Contaminação do leite
humano ordenhado por fungos miceliais. **Jornal de Pediatria**, v. 78, n.3. Rio de
Janeiro, p.197-201, 2002.

NOVAK, J.; CHRISTINA, B.; LANGBEHN, B.; PARK, F.; SKOULA, M.; GORSIOU,
Y.; FRANZ, C.M. Ratios of cis- and trans- sabinene hydrate in *Origanum marjorana*
L. and *Origanum midrophyllum* (Bentham). **Biochemical Systematics and
Ecology**, v.28, n.7, p.697-704, 2000.

NÚÑEZ, L.; D' AQUINO, M.; CHIRIFE, J. Antifungal properties of clove oil
(*Eugenia caryophyllata*) in sugar solution. **Brasilian Journal of Microbiology**, v.
32, p. 123-126, 2001.

ODDS, F .C. Antifungal activity of saperconazole (R 66905) *in vitro*. **Journal
Antimicrobial Chemother**, v. 24, p. 533-537, 1989.

OLIVEIRA, L. C. L.; ARANTES, A.; CAIUBY, M. J.M. Utilidade da investigação
rotineira de infecção fúngica pela broncoscopia em pacientes infectados ou não

pelo HIV em um hospital geral, referência para SIDA. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. 3, p. 255-261, 1999.

OLIVEIRA, M. T. B.; BRAZ, R. F. S.; RIBEIRO, M. A. G. Airbone fungi isolated from Natal, State of Rio Grande do Norte – Brazil. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, p. 25-30, 1993.

PASQUIER, F.; CROXO, C.; MELLIEZ, H.; PORTE, H.; BOURGEOIS-PETIT, E.; CAMBIER, N.; ROSE, S. L. Aspergillome pulmonaire: une complication possible de lá drepanocytose. **La Revue de Medicine Interne**, v. 27, p. 260-263, 2006.

PASTER, N.; JUVEN, B. J.; SHAAYA, E.; MENASHEROV, M.; NITZAN, R.; WEISSLOWICZ, H.; RAVID, V. Inhibitory effect of oregano and thyme essential oils on moulds and food borne bacteria. **Letters in Applied Microbiology**, v. 11, p. 33-37, 1990.

PAVIE, J.; LACROIX, C.; HERMOSO, D. G.; ROBIN, M.; FERRY, C.; BERGERON, A.; FEUILHADE, M.; DROMER, F.; GLUCKMAN, E.; MOLINA, J. M.; RIBAUD, P. Breakthrough disseminated *Aspergillus ustus* infection in allogeneic haematopoietic stem cell transplant recipients receiving voriconazole or caspofungin prophylaxis. **Journal Clinical Microbiology**, v. 43, n. 9, p. 4902–4904, 2005.

PERAICA, M.; RADIC, B.; LUCIC, A.; PAVLOVIC, M. Toxic effects of mycotoxins in humans. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 77, n. 9, p. 754–766, 1999.

PERFECT, J. R.; COX, G. M.; LEE, J. Y.; KAUFFMAN, C. A.; REPENTIGNY, L.; CHAPMAN, S. W.; MORRISON, V. A.; PAPPAS, P.; HIEMENZ, J. W.; STEVENS, D. A. The impact of culture isolation of *Aspergillus* species: a hospital-based survey of aspergillosis. **Clinical Infectious diseases**, v. 33, n. 1, p. 1824–1833, 2001.

PLAUSE, E. A.; FLORES, G. S. ; ATAUCUSI, S. G. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Origanum vulgare* (orégano). **Revista de Medicina**, v.12, n.1, p.16-19, 2001.

PONTES, Z. B. V. Atividade antifúngica de produtos naturais e sintéticos sobre espécies de *Trichosporon* Behrend. 183p. 2002, (Tese de Doutorado). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB.

PRABUSEENIVASAN, S.; JAYAKUMAR, M.; IGNACIMUTHU, S. *In vitro* antibacterial activity of some plant essential oils. **BMC Complementary and alternative medicine**, v. 6, p. 39, 2006.

PREUSER, H.J. Effects of in vitro treatment with econazole on the ultrastructure of *Candida albicans*. **Mykosen**, v. 19, p. 304-316, 1976.

RANA, B. K.; SINGH, U. P.; TANEJA, V. Antifungal activity and kinetics of inhibition by essential oil isolated from leaves of *Aegles marmelos*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 57, n. 1, p. 29-34, 1997.

RAINA, V. K.; SRIVASTAVA, S. K.; AGGARWAL, K. K.; SYAMASUNDAR, K. V.; KUMAR, S. Essential oil composition of *Syzygium aromaticum* leaf from Little Andaman, India. **Flavour and fragrance Journal**, v. 16, n. 5, p. 334-336, 2001.

RASOOLI, I.; REZAEI, M. B.; ALLAMEH, A. Growth inhibition and morphological alterations of *Aspergillus niger* by essential oils from *Thymus eriocalyx* and *thymus x-porlorck*. **Food Control**, v. 17, p. 359-364, 2006.

RATES, S. T. I. K. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de farmacognosia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 11, n. 2, p. 57-69, 2001.

REX, J. H.; WALSH, T. J.; ANAISSIE, E. J. Fungal infections in iatrogenically compromised hosts. **Advances in Internal Medicine**, v. 43, p. 321–71, 1998.

RICHARDSON, M. D.; WARNOCK, D. W. Fungal infection: diagnosis and management. Blackwell Scientific Publications, p. 1-2; 92-102, 1993.

_____. Fungal infection diagnosis and management. Oxford: Blackwell Science; p. 1–8, 1997.

RODRIGUES, E. A. C.; MENDONÇA, J. S.; AMARANTE, J. M. B. ALVES FILHO, M. B. GRINBAUM, R. S. RICHTMANN, R. Infecções Hospitalares: Prevenção e Controle. São Paulo: Sarvier, 1997.

RODRIGUES, A. G.; ARAUJO, R.; PINA-VAZ, C. Interaction of local anaesthetics with other antifungal agents against pathogenic *Aspergillus*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 27, p. 339–343, 2006.

RODRIGUES, A. G.; PINA-VAZ, C.; MARDH, P. A.; MARTINEZ-DE-OLIVEIRA, J.; FREITAS-DA-FONSECA, A. Inhibition of germ tube formation by *Candida albicans* by local anesthetics: an effect related to ionic channel blockade. **Current Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 145–148, 1999.

SÁ, L. D.; PAULO, M. Q.; LIMA, E. O.; XAVIER FILHO, L. Activité antimicrobienne D’Muelles essentielles sur les bacteries qui causent la conjunctivite. **Separata do Boletim da Sociedade Broteriana**, v. 67, 2ª série, p. 99-103, 1995.

SAHIN, F., GULLUCE, M., DAFERERA, D., SOKMEN, A., POLISSIOU, M., SOKMEN, M.; ÁGAR, G., OZER, H. Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. **Food Control**, v. 15, n. 7, p. 549–557, 2004.

SAKAR, M. K.; TAMER, A. U.; TOKUR, S. Antimicrobial activities of some *Hesperium* species growing in Turkey. **Fitoterapia**, v. 59, p. 49-51, 1988.

SALGUEIRO, L. R.; CAVALEIRO, C.; PINTO, E.; PINA-VAZ, C.; RODRIGUES, A.G. Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of *Origanum virens* on *Candida* species. **Planta Medica**, v.69, n.9, p.871-874, 2003.

SANTOS, F. A.; BASTOS, E. M. A.; UZEDA, M.; CARVALHO, M. A. R.; FARIAS, L. M.; MOREIRA, E. S. A. Antibacterial activity of própolis produced in Brazil against *Actinobacillus acinomycetemcomitans*, *Fusobacterium* spp. and bacteria from the *Bacterioides fragilis* group isolated from human and marmoset hosts. **Anaerobe**, v. 5, p. 479-481, 1999.

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

SELLAN, W. Óleos que curam: o poder da aromoterapia. Rio de Janeiro: Nova Era, 270 p. 2002.

SHARMA, N.; TRIPATHI, A. (2006). Effects of Citrus (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem. *Microbiol Res* In press, 2007

SCOTT, E. M.; GORMAN, S. P.; MILLERSHIP, J. S.; WRIGTH, L. R. Effect of miconazole and clotrimazole on K⁺ release and inhibition of ergosterol biosynthesis in Trichophyton mentagrophytes and related ultrastructural observations. *Journal Antimicrobial Chemother*, v. 17, p. 423-432, 1986. *In* BILLERBECK, V. G.; ROQUES, C. G.; BESSIERE, J-M.; FONVIEILLE, J-L.; DARGENT, R. Effects of Cymbopogon nardus (L.) W. Watson essential oil on the growth and morphogenesis of *Aspergillus niger*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 9-17, 2001.

SIDRIM, J. J. C.; MOREIRA, J. L. B. Fundamentos clínico-laboratoriais da micologia médica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 171-190, 1999.

SILVER, L. L. e BOSTIAN, K. A. Discovery and Development of new antibiotics: The problem of antibiotic resistance. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 37, p. 377-383, 1993.

SOUZA, S. M. C; PEREIRA, M. C.; ANGELICO, C. L.; PIMENTA, C. J. Avaliação de óleos essenciais de condimentos sobre o desenvolvimento micelial de fungos associados a produtos de panificação. **Ciências, Agrotecnologia., Lavras**, v. 28, n.3, p. 685-690, 2004.

SOUZA, E. L. Potencial antimicrobiano do óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L.): Uma abordagem para uso em sistemas de conservação de alimentos. Recife (tese de doutorado). 149 p., 2006.

SOUZA, E. L.; STAMFORD, T. M.; LIMA, E. O. Sensitivity of spoiling and pathogen food-related bacteria to *Origanum vulgare* (Lamiaceae) essential oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 527-532, 2006.

SOUZA, E. L.; STAMFORD, T. L. M.; LIMA E. O.; TRAJANO, V. N. Efectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. **Food Control**, v. 18, p. 409–413, 2007.

SUTTON, D. A.; SANCHE, S. E.; REVANKAR, S. G.; FORTHERGILL, A. W.; RINALDI, M. G.; *In vitro* amphotericin B resistance in clinical isolates of *Aspergillus terreus*, with a head-to-head comparison to voriconazole. **Journal Clinical Microbiology**, v. 37, n.7, p. 2343–2345, 1999.

THUVANDER, A., FUNSETH, E., BREITHOLTZ-EMANUELSSON, A., HALLE´N PALMIGER, I.; OSKARSSON, A. Natural Toxins, p. 141–147, 1996.

THYÁGARA, N.; HOSONO, A. Effect of spice extract on fungal inhibition. **Lebensmittel wissenschaft ind.-technology**, v. 29, n.3, p. 286-288, 1996.

TOMAINO, A.; CIMINO, F.; ZIMBALATTI, V.; VENUTI, V.; SULFARO, V.; DE PASQUALE, A.; SAIJA, A. Influence of heating on antioxidant activity and the chemical composition of some spice essential oils. **Food Chemistry**, v. 89, p. 549–554, 2005.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. *Microbiologia*. 3ª. ed. São Paulo: Atheneu, 2000.

TULLIO, V.; NOSTRO, A.; MANDRAS, N.; DUGO, P.; BANCHE, G.; CANNATELLI, M. A.; CUFFINI, A. M.; ALONZO, V.; CARLONE, N. A. Antifungal activity of essential oils against filamentous fungi determined by broth microdilution and vapour contact methods. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, p. 1544–1550, 2007.

VAN WELL, G. T.; VAN GROENINGEN, I.; DEBETS-OSSENKOPP, Y. J.; VAN FURTH, A. M.; ZWAAN, C. M. Zygomycete infection following voriconazole prophylaxis. **Lancet Infectious diseases**, v. 5, p. 594, 2005.

VELLUTI, A.; SANCHIS, V.; RAMOS, A. J.; EGIDO, J. Inhibitory effect of Cinnamomum, clove, lemongrass, orégano and palmarose essential oils on growth and fumonisin B1 production by *Fusarium* proliferation in maize grain. **International Journal of Ethopharmacology**, v. 88, n. 2-3, p.137-143, 2003.

VILJOEN, A., VAN VUUREN, S.; ERNST, E.; LEPSER, M.; DEMIRCI, B.; BASER, H.; VAN WYK, B. E. *Osmitopsis astericoides* (Asteraceae) - the antimicrobial activity and essential oil composition of a Cape-Dutch remedy. **Journal of Ethopharmacology**, v.88, n.2-3, p.137-143, 2003.

VISCONTI, A.; PASCALE, M.; CENTONZE, G. *Journal of Chromatography A*, 888, p. 321–326, 2000.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da industria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 147-152, 2001.

WAIMSLEY, S.; DEVI, S.; KING, S.; SCHNEIDER, R.; RICHARDSON, S.; FORD-JONES, L. Invasive *Aspergillus* infections in a pediatric hospital: A ten-year review. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 12, n.8, p. 673-682, 1993.

WALSH, T. J.; PETRAITIS, V.; PETRAITIENE, R.; FIELD-RIDLEY, A.; SUTTON, D.; GHANNOUM, M. Experimental pulmonary aspergillosis due to *Aspergillus terreus*: pathogenesis and treatment of an emerging fungal pathogen resistant to amphotericin B. **Journal Infectious Diseases**, v. 188, p. 305–319, 2003.

WILLIAMS, J. H.; PHILLIPS, T. D.; JOLLY, P. E.; STILES, J. K.; JOLLY, C. M.; AGGARWAL, D. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 80, n.5, p. 1106–1122, 2004.

WONG-LEUNG, Y. L. Antibacterial activities of some Hong Kong plants used in Chinese medicine. **Fitoterapia**, v. 59, n. 1, p. 11-17, 1988.

ZAMBONELLI, A.; D_AURELIO, A. Z.; BIANCHI, A.; ALBASINI, A. Effects of essential oils on phytopathogenic fungi. **Journal of Phytopathology**, v. 144, p. 491–494, 1996.

ZANON, U.; NEVES, J. Infecções Hospitalares – Prevenção, Diagnóstico e Tratamento. Rio de Janeiro: MEDSI, 1987.

ZARGARI, A. Medicinal Plants. 4^a ed. Tehran: Tehran University Publications. p. 42-45, 1990. *In* SOUZA, E. L.; STAMFORD, T. L. M.; TRAJANO, V. N.; LIMA, E. O.; BARBOSA FILHO, J. M. Orégano (*Origanum vulgare* L., Lamiaceae): Uma especiaria como potencial fonte de compostos antimicrobianos. **Revista Higiene Alimentar**, v. 19, n. 132, p. 40-45, 2005.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)