

Resumo

Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica dos óleos essenciais de *Eugenia caryophyllus*, *Thymus vulgaris* e seus compostos químicos majoritários sobre *Cryptococcus neoformans*

Patricia de Souza Santos; Maria de Fátima Costa Pires (orientadora)

Programa de Pós-Graduação em Ciências. Coordenadoria de Controle de Doenças. Secretaria de Estado da Saúde. São Paulo. Brasil, 2016

RESUMO

Cryptococcus neoformans é uma levedura patogênica, agente etiológico da meningoencefalite criptocócica, manifestação clínica mais frequente da criptococose, que tem uma alta taxa de mortalidade nos países em desenvolvimento e apresentam fatores de virulência que diretamente influenciam a infecção no hospedeiro. Uma doença infecciosa cosmopolita que ocorre por inalação das leveduras e se manifesta com mais frequência em indivíduos com baixa imunidade celular. *C. neoformans* tem tropismo pelas células do sistema nervoso central. Para o tratamento da criptococose, a droga de escolha é a anfotericina B associada ou não a 5-flucitosina, apesar da alta toxicidade e nefrotoxicidade. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antifúngica dos óleos essenciais de *Eugenia caryophyllus* e *Thymus vulgaris* e seus compostos químicos majoritários sobre *Cryptococcus neoformans*. Em doses subinibitórias, avaliar a produção de cápsula e de exoenzimas proteinase e fosfolipase, antes e após exposição aos óleos essenciais e seus compostos químicos majoritários e avaliar a mistura dos compostos químicos sobre isolados de *C. neoformans* sensíveis aos óleos essenciais. Foram utilizados 18 isolados biológicos de origem humana, sendo 07 de pacientes com sorologia positiva para o HIV e 11 com sorologia desconhecida para o HIV, 20 isolados de origem ambiental e 02 cepas padrão de *C. neoformans*: ICB 163 D (NIH 163D) e ATCC 90112. Para a avaliação da atividade antifúngica e obtenção da concentração inibitória mínima (CIM) utilizou-se a técnica de microdiluição em caldo, em meio RPMI 1640, com polissorbatato Tween 20 a 0,02% como tensoativo. E a confirmação da inibição em Agar Sabouraud dextrose, a 37°C por 48 horas, com obtenção da concentração fungicida mínima (CFM). Para cada óleo essencial e seus compostos químicos majoritários foram encontrados os seguintes resultados de CFM50 e CFM90: *E. caryophyllus* CFM50 0,19% e CFM90 1,56%; para seus compostos majoritários: Eugenol 99% CFM50 24,75% e CFM90 99%; β -cariofileno 80% CFM50 40% e CFM90 80%. Para o óleo de *T. vulgaris* CFM50 0,09% e CFM90 1,56%; para seus compostos majoritários: Linalol 97% CFM50 e CFM90 97%; P-Cimeno 99% CFM50 e CFM90 de 99%; Carvacrol 98% CFM50 24,50% e CFM90 49%; Timol 95,5% CFM50 24,8% e CFM90 49,7%. Quanto à produção de proteinase e fosfolipase, todos os isolados eram fortemente positivos, produtores das exoenzimas e após exposição aos óleos essenciais e seus compostos majoritários todos se tornaram não produtores. Quanto à presença de cápsulas, todos os isolados apresentavam cápsula e após contato com os óleos e seus compostos majoritários, ocorreu redução ou ausência da mesma, bem como as células de leveduras tenderam a se agrupar em número de 2, 4 ou mais células com aumento de tamanho. Para a pesquisa da mistura entre os compostos químicos majoritários, obtiveram-se os seguintes resultados quanto às CFMs 50 e 90: Eugenol 84,10% e β -cariofileno 12,67% - CFM 50 e CFM90 96,77%; P-Cimeno 14,43% e Linalol 8,49% - CFM 50 e CFM90 de 22,92%; de P-Cimeno 14,43% e Carvacrol 5,08% - CFM50 e CFM90 de 19,51%; P-Cimeno 14,43% e Timol 62,13% - CFM50 e CFM90 de 76,56%; Linalol 8,49% e Timol 62,13% - CFM50 35,31% e CFM90 de 70,62%; Linalol 8,49% e Carvacrol 62,13% - CFM50 e CFM90 de 13,57%; Timol 62,13% e Carvacrol 5,08% - CFM50 8,4% e CFM90 33,6%. A mistura de Timol 62,13%, Carvacrol 5,08%, P-Cimeno 14,43% e Linalol 8,49% foram CFM50 de 2,81% e CFM90 90,13%. Pelo exposto e nas condições desse estudo, conclui-se que as CFMs de cada composto químico majoritário sobre os isolados biológicos, apresentaram atividade antifúngica com concentrações superiores às do óleo essencial total.

PALAVRAS-CHAVE: *Cryptococcus neoformans*. Óleos essenciais. Antifúngicos naturais. Microdiluição em caldo. *Eugenia caryophyllus*. *Thymus vulgaris*. Eugenol. β -cariofileno. Linalol. P-Cimeno. Carvacrol. Timol.

Abstract

In vitro evaluation of the antifungal activity of the essential oils of *Eugenia caryophyllus*, *Thymus vulgaris* and their chemical compounds on *Cryptococcus neoformans*

Patricia de Souza Santos; Maria de Fátima Costa Pires (orientadora)

Programa de Pós-Graduação em Ciências. Coordenadoria de Controle de Doenças. Secretaria de Estado da Saúde. São Paulo. Brasil, 2016

ABSTRACT

Cryptococcus neoformans is a pathogenic yeast, etiologic agent of cryptococcal meningoencephalitis, most common clinical manifestation of cryptococcosis, which has a high mortality rate in developing countries and have virulence factors that directly influence the infection in the host. A cosmopolitan infectious disease that occurs by inhalation of yeasts and manifests more frequently in individuals with low cellular immunity. *C. neoformans* has tropism for cells of the central nervous system. For the treatment of cryptococcosis the drug of choice is amphotericin B associated or not to 5-flucitosina despite the high toxicity and nephrotoxicity. The objective of this study was to evaluate the antifungal activity of essential oils of *Eugenia caryophyllus* and *Thymus vulgaris* and its major chemical compounds on *Cryptococcus neoformans*. In subinibitory evaluate the dose capsule production and proteinase exoenzyme and phospholipase, before and after exposure to essential oils and chemicals its controlling and evaluating the mixture of chemical compounds on *C. neoformans* isolates sensitive to essential oils. human were used 18 isolated biological origin and, 07 patients with positive serology for HIV and 11 with unknown HIV status, 20 environmental isolates and 02 standard strains of *C. neoformans*: ICB 163 D (NIH 163D) and ATCC 90112. for the evaluation of the antifungal activity and obtaining the minimum inhibitory concentration (MIC) used the broth microdilution technique in RPMI 1640 medium with Tween 0.02% polysorbate 20 as surfactant. And confirmation of inhibition Sabouraud dextrose agar at 37 ° C for 48 hours to obtain the minimum fungicidal concentration (MFC). For each essential oil and its major chemical compounds the following results MFC50 and MFC90 were found: *E. caryophyllus* CFM50 CFM90 0.19% and 1.56%; for its major compounds: Eugenol 99% 24.75% MFC50 and MFC90 99%; β -caryophyllene 80% MFC50 CFM90 40% and 80%. For *T. vulgaris* oil MFC50 MFC90 0.09% and 1.56%; for its major compounds: Linalool 97% MFC50 and MFC90 97%; P-cymene and 99% MFC50 MFC90 99%; Carvacrol 98% and 24.50% MFC50 MFC90 49%; Thymol MFC50 95.5% 24.8% and 49.7% MFC90. For the production of proteinase and phospholipase all isolates were strongly positivprodutores of exoenzymes and after exposure to essential oils and their major compounds all became not producers. Regarding the presence of capsules all isolates had capsule and after contact with oils and their major compounds caused a reduction or lack thereof, as well as yeast cells tended to cluster numbers of 2, 4 or more cells with increased size . For the research of the mixture between the main chemical compounds, the following results as the CFMs were obtained 50 and 90: Eugenol 84.10% and β -caryophyllene 12.67% - MFC50 and MFC90 96.77%; P-Cymene Linalool 14.43% and 8.49% - MFC50 and MFC90 22.92%; P-cymene 14.43% and 5.08% Carvacrol - MFC50 and MFC90 of 19.51%; P-cymene and thymol 14.43% 62.13% - MFC50 and MFC90 of 76.56%; Linalool and thymol 8.49% 62.13% - 35.31% MFC50 and MFC90 of 70.62%; Linalool 8.49% and 62.13% Carvacrol - MFC50 and MFC90 of 13.57%; 62.13% Thymol and Carvacrol 5.08% - 8.4% and MFC50 MFC90 33.6%. A mixture of 62.13% thymol, 5.08% Carvacrol, P-Cymene Linalool 14.43% and 8.49% were MFC50 MFC90 2.81% and 90.13%. For these reasons and under the conditions of this study, it is concluded that the CFMs of each major chemical on biological strains showed antifungal activity at concentrations higher than the overall essential oil.

KEYWORDS: *Cryptococcus neoformans*. Essential oils. Natural antifungals. Microdilution broth. *Eugenia caryophyllus*. *Thymus vulgaris*. Eugenol. β -caryophyllene. Linalool. P-cymene. Carvacrol. Thymol.