

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS**

DAVI VARELA MAGALHÃES

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE DERIVADOS SINTÉTICOS DO
EUGENOL E TIMOL FRENTE A CEPAS DE *Candida* spp. E
Microsporum canis.**

FORTALEZA - CE

2009

DAVI VARELA MAGALHÃES

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE DERIVADOS SINTÉTICOS DO
EUGENOL E TIMOL FRENTE A CEPAS DE *Candida* spp. E
Microsporum canis.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Reprodução e Sanidade.

Linha de Pesquisa: Reprodução e Sanidade de carnívoros, onívoros e aves.

Orientadora: Profa. Dra. Selene Maia de Moraes

FORTALEZA

2009

DAVI VARELA MAGALHÃES

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE DERIVADOS SINTÉTICOS DO
EUGENOL E TIMOL FRENTE A CEPAS DE *Candida* spp. E
Microsporum canis.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Selene Maia de Moraes
Universidade Estadual do Ceará
Orientadora

Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha da Rocha
Universidade Estadual do Ceará
Co-orientador

Profa. Dra. Eveline S. B. Cavalcanti
Universidade Estadual do Ceará
Examinadora

Profa. Dra. Raquel O. dos S. Fontenelle
Instituto Tecnológico de Teologia Aplicada
Examinadora

Ao Senhor Deus, porque somente nEle encontro força e refúgio.

**Aos meus pais Tomaz e Vírginia, a meus irmãos
Daniel e Débora e a minha mãe científica Profa. Selene,
que me ajudaram nesta caminhada.**

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus toda a honra e toda glória por esse trabalho, porque sem Ele nada vale a pena.

Ao meu pai, Tomaz Edme, pelo exemplo de toda uma vida para me fazer chegar até aqui. A minha mãe, Virginia Candida, pela dedicação de mãe incondicional, a minha irmã Débora e, meu irmão Daniel, pois além de irmãos são amigos e companheiros.

À minha orientadora, Dra. Selene Maia de Moraes, por tudo que ela é, enfim, pela mãe que ela é para mim.

Ao Professor Dr. Marcos Fábio Gadelha da Rocha, pela ajuda e paciência de colaborar nessa caminhada.

A banca examinadora Dra. Eveline Solon Barreira Cavalcanti e a Dra. Raquel Oliveira dos Santos Fontenelle.

Aos alunos do Laboratório de Produtos Naturais (LPN) da UECE, Priscila, Nadja, Micheline, Michelline Maciel, Cristiane, Igor, Edson pela grande ajuda.

Aos meus amigos Raquel Oliveira dos Santos Fontenelle, Patrícia Raquel e João Jaime por me ajudarem na área microbiológica.

Ao Professor Emanuel e meu companheiro de trabalho Carlos Elielton, por ajudarem no decorrer desse período compreendendo a dificuldade de uma pós-graduação e um emprego.

A Adriana da coordenação por sempre me ajudar na parte institucional, lembrando de documentos, aulas e muitas outras.

A Livia, Deise, Alisandro, Cris, Bruna, Lais, Tia Aurineide e Tio Sinézio, por estarem sempre presentes na minha vida.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, pela oportunidade de realização deste curso.

À todos que contribuíram para a concretização dessa dissertação.

“O que também aprendestes, e recebestes, e ouvistes, e vistes em mim, isso praticai; e o Deus de paz será convosco. Ora, muito me regozijo no Senhor por terdes finalmente renovado o vosso cuidado para comigo; do qual na verdade andáveis lembrados, mas vos faltava oportunidade. Não digo isto por causa de necessidade, porque já aprendi a contentar-me com as circunstâncias em que me encontre. Sei passar falta, e sei também ter abundância; em toda maneira e em todas as coisas estou experimentado, tanto em ter fartura, como em passar fome; tanto em ter abundância, como em padecer necessidade. Posso todas as coisas naquele que me fortalece”.
(Filipense 4:9-13)

RESUMO

A síntese de compostos com expectativas em relação a sua ação farmacológica é importante para o desenvolvimento da química orgânica e da indústria farmacêutica. Neste trabalho foram sintetizados derivados dos compostos eugenol e timol para avaliação da sua potencialidade como agentes antifúngicos. Os derivados do eugenol e do timol foram obtidos por meio de reações de acetilação e benzoilação, e foram avaliados quanto a sua atividade antifúngica contra as cepas de *Candida* spp. e *Microsporum canis*. As cepas fúngicas foram recuperadas da micoteca do Centro Especializado em Micologia Médica da Universidade Federal do Ceará e a viabilidade das mesmas foi avaliada através de testes laboratoriais. A atividade antifúngica foi realizada pelos métodos de difusão em ágar e microdiluição em caldo. Os derivados sintéticos que obtiveram atividade antifúngica contra cepas de *Microsporum canis* foram o *O*-Acetil-eugenol, *O*-Benzoil-eugenol e *O*-Benzoil-timol (CIM variando de 4mg ml⁻¹ a 39mg ml⁻¹), e para *Candida* spp. o Benzoil eugenol (CIM variando de 156mg ml⁻¹ a 625mg ml⁻¹). Desta forma, devido à eficácia observada, os derivados sintetizados constituem importantes compostos antifúngicos para serem avaliados em testes *in vivo* e usados no tratamento de micoses em animais.

Palavras chaves: Eugenol, Timol, Atividade Antifúngica, *Candida* spp, *Microsporum canis*.

ABSTRACT

The synthesis of a compound in relation to their pharmacological action is important for organic chemistry and pharmaceutical industry. Derivatives of eugenol and thymol were obtained by acetylation and benzylation reactions in order to evaluate the antifungal activity against *Candida* spp. and *Microsporum canis* strains. These fungal strains were recovered from mycology Specialized Medical Mycology Center – CEMM (Federal University of Ceará). Antifungal activity was evaluated by using diffusion agar and microdilution broth. Acetyl eugenol, Benzoyl eugenol and Benzoyl thymol (MIC ranging from 4mg ml⁻¹ to 39mg ml⁻¹) showed antifungal properties against strains of *Microsporum canis* and Benzoyl eugenol (MIC ranging from 156mg ml⁻¹ to 625mg ml⁻¹) against *Candida* spp. In such a way, due to their effectiveness, the synthesized derivatives constitute important antifungal compounds to be evaluated in vivo tests in and used in the treatment of mycoses in animals.

Keywords: Eugenol. Thymol. Antifungal. *Candida*. *Microsporum*.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Estrutura química do eugenol	16
FIGURA 2 – Reação de Acetilação do eugenol	17
FIGURA 3 – Reação de benzoilação do eugenol	17
FIGURA 4 – Estrutura química do timol	18
FIGURA 5 – Reação de acetilação do timol	19
FIGURA 6 – Reação de benzoilação do timol	19
FIGURA 7 - Colônias de <i>M. canis</i>	22
FIGURA 8 - Achado macromorfológico (A) mostrando coloração branca, superfície lisa, textura glabrosa úmida, característica das espécies de <i>Candida</i> e micromorfologia (B) mostrando blastoconídios de <i>Candida albicans</i>	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Antifungal activity of compounds against *M. canis* and *Candida* spp.....42

Tabela 2. MIC of compounds against *M. canis* and *Candida* spp. in the broth microdilution method.....42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% - Percentagem

μ - Micro

CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*

DMSO - Dimetilsufóxido

g - Grama (s)

ISO - *International Standard Organization*

mg - Miligrama (s)

mL - Mililitro (s)

mm - Milímetro (s)

NCCLS - *National Committee for Clinical Laboratory Standards*

°C - Grau (s) celsius

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1 A importância das plantas medicinais como fonte de compostos antifúngicos – Óleos essenciais.....	14
2.1.1 Óleos essenciais.....	15
2.2 Eugenol.....	16
2.3 Timol.....	18
2.4 Relação entre estrutura química e atividade farmacológica de compostos orgânicas.....	19
2.5 Fungos	21
2.5.1 Dermatófitos	22
2.5.2 Leveduras	23
2.6 Métodos de análise da atividade antifúngica <i>in vitro</i>	24
3. JUSTIFICATIVA	26
4. HIPÓTESE CIENTÍFICA	27
5. OBJETIVOS	28
5.1 Objetivo geral.....	28
5.2 Objetivos específicos.....	28
6. CAPÍTULO 1	29
7. CONCLUSÃO	43
8. PERSPECTIVAS	44
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, o comércio de ervas medicinais começou com os índios e, atualmente, em qualquer cidade, é possível comprar plantas e unguentos em mercados e também nas ruas. Essa alternativa é utilizada tanto dentro de um contexto cultural, na medicina popular, quanto na forma de fitoterápicos, pelo fato de essas plantas serem fontes importantes de compostos biologicamente ativos, muitos dos quais constituem modelos para a síntese de um grande número de fármacos, revelando nestes produtos alta diversidade em termos de estrutura e de propriedades (LIMA et al., 2007).

Muitos compostos podem ser isolados de plantas, fungos e bactérias, para avaliação de suas propriedades físicas, químicas e farmacológicas. No entanto, muitos compostos biologicamente ativos ocorrem em baixa concentração nas plantas, e devem ser produzidos sinteticamente em maior quantidade permitindo assim que suas propriedades sejam avaliadas em testes mais aprofundados (ARAÚJO, 2005).

A quantidade de substâncias químicas com ação antifúngica é bastante extensa, mas ainda muito restrita ao ser comparada com o número de drogas antibacterianas disponíveis. As infecções por fungos representam o parasitismo de eucariótico sobre um outro eucariótico, com diferenças fisiológicas muito pequenas, quando comparado a infecções bacterianas. É importante que as drogas antifúngicas tenham aplicação clínica adequada, com o mínimo de efeitos colaterais importantes (ALVES, et al., 1999).

Neste trabalho foi realizada análise da atividade antifúngica de derivados sintéticos do eugenol e timol, contra os dermatófitos *Microsporum canis* e as leveduras *Candida* spp. oriundas de animais.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A importância das plantas medicinais como fonte de compostos antifúngicos – Óleos essenciais

As plantas medicinais constituem importantes elementos da medicina indígena. Na Amazônia, por exemplo, os índios usam, pelo menos, 1.300 espécies de plantas. No Sudeste da Ásia, os curadores tradicionais utilizam 6.500 plantas diferentes para tratar malária, úlceras de estômago, sífilis e outras doenças (MORAIS & BRAZ-FILHO, 2007).

Cerca de 25% das drogas prescritas mundialmente provém de plantas, 121 dos compostos ativos são de uso corriqueiro. Das 252 drogas consideradas como básicas e essenciais pela Organização Mundial de Saúde, 11% são exclusivamente originárias de plantas (MORAIS & BRAZ-FILHO, 2007).

A grande biodiversidade de espécies vegetais presentes no Brasil constitui uma de suas maiores riquezas e se destaca como fonte para obtenção de novas substâncias com finalidade terapêutica (KORDALI et al., 2008). A utilização de plantas no tratamento de diversas enfermidades, infecciosas ou não, é, na prática, bastante utilizada (MACIEL & VIANA, 2005), visto que o Brasil possui sérios problemas de saúde, principalmente na região Nordeste, em razão do baixo poder aquisitivo de grande parte da população local. O alto custo dos remédios torna-os inacessíveis até mesmo nos mais simples casos, como dores agudas e/ou crônicas, febres e gripes. Portanto, o uso popular das plantas medicinais foi o primeiro passo para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos de baixo custo para uma região tão carente de recursos financeiros e, por outro lado, tão rica em flora, conquanto reúne milhares de espécies vegetais distintas (RABELO et al., 2003).

2.1.1 Óleos essenciais

Os óleos essenciais são misturas de substâncias voláteis lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas. Também podem ser chamados de óleos voláteis, óleos etéreos ou essências. Essas denominações derivam de algumas de suas características físico-químicas, como, por exemplo, a de serem geralmente líquidos de aparência oleosa a temperatura ambiente, advindo daí a designação de óleo. Sua principal característica,

entretanto, é a volatilidade, diferindo dos óleos fixos, misturas de substâncias lipídicas, obtidos geralmente de sementes. Outra característica importante é o aroma agradável e intenso, sendo, por isso, chamados de essências (SIMÕES & SPITZER, 1999).

Vários estudos têm comprovado o efeito de compostos isolados, extraídos de óleos essenciais de plantas, que atuam como fungicidas naturais, inibindo a atividade fúngica, dentre os quais, um número significativo destes constituintes se mostrou eficaz (ABDELGALEIL et al., 2008). Os constituintes químicos desses óleos aromáticos variam desde hidrocarbonetos terpênicos, alcoóis simples, fenóis, aldeídos, éteres, ácidos orgânicos, ésteres, cetonas, lactonas, cumarinas, até compostos contendo nitrogênio e enxofre (SIMÕES et al., 2004).

O óleo do cravo da Índia (*Syzygium aromaticum*) e óleos de tomilho (*Thymus vulgaris*) têm sido descritos como apresentando atividade antifúngica particularmente a anticandida (PINA-VAZ et al., 2004 e GAYOSO et al., 2005). Suas atividades têm sido atribuídas a uma série de moléculas aromáticas como o eugenol e o timol (CHAMI et al., 2005).

A avaliação da atividade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas do Nordeste do Brasil revelou os óleos essenciais de *Lippia sidoides* e espécies de *Croton* como fontes importantes de constituintes antifúngicos, pois apresentam entre os seus constituintes o timol, estragol, anetol e o metileugenol (FONTENELLE et al., 2007).

A *Lippia sidoides*, conhecida popularmente como alecrim-pimenta, se destaca pelos elevados rendimentos de seu óleo essencial, de até 6% (MENDONÇA, 1997), sendo este rico em timol (43,5%), que é o responsável pelo alto poder anti-séptico de suas folhas.

Trabalhos já registrados na literatura mostram atividade bactericida e fungicida contra diferentes espécies microbianas, bem como larvicida (FONTENELLE et al., 2007). Apresentou ação contra *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Bacillus subtilis* e os fungos *Saccharomyces cerevisiae*, *Cryptococcus neoformans* e *Aspergillus flavus* (COSTA, 2001).

O gênero *Croton* é muito importante pela sua utilidade ao indivíduo que vive afastado dos grandes centros populacionais para o tratamento de diversas doenças, incluindo micoses (SOUZA et al., 2007). Estudo da composição química do óleo essencial de espécies de *Croton* revelou como constituintes majoritários o estragol e anetol para o *C. zehntneri*, Metil-eugenol e biciclogermacreno para o *C. nepetaefolius* e

espatulenol e biciclogermacreno para o *C. argyrophyloides*. Estes óleos essenciais revelaram ação relevante contra *Microsporium canis* (FONTENELLE et al., 2008)

A atividade antimicrobiana de óleos essenciais foi relatada para várias espécies de *Ocimum*, podendo-se destacar as espécies *O. basilicum* do Mediterrâneo, *O. gratissimum* de África e *O. sanctum* da Índia, que mostraram forte atividade antibacteriana e antifúngica (SUPPAKUL et al., 2003).

2.2 Eugenol

O eugenol (Figura 1) é uma substância aromática natural, farmacologicamente muito ativa, presente em óleos essenciais de plantas. Dentre estas plantas destacam-se: *Eugenia caryophyllus*, o “cravo-da-índia”; *Dicipelium cariophyllatum*, “o craveiro do Maranhão ou cravinho”; *Ocimum gratissimum*, a “alfavaca-cravo”; e o *Croton zenhtneri*, a “canela-de-cunha” (WU et al., 1994 e CRAVEIRO et al., 1981). Também conhecido como ácido eugênico ou cariofílico, o eugenol é um fenol arilpropanóide, popularmente denominado de essência de cravo (ESCOBAR, 2002).

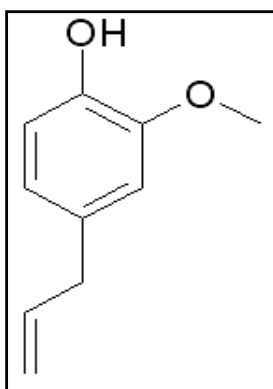


Figura 1. Estrutura química do Eugenol

O eugenol possui diversas ações farmacológicas comprovadas, sendo utilizado em práticas adontológicas como anti-séptico tópico, analgésico e anestésico local, além de conferir propriedades farmacológicas aos cimentos obturadores de canais, visto ter ação bactericida, portanto, eficaz no tratamento de algumas enfermidades infecciosas na cavidade bucal (ESCOBAR, 2002 e MARKOWITZ et al., 1992). Também é utilizado como cimento provisório em cavidades dentárias, quando associado ao óxido de zinco (NAGABABU & LAKSHMAIT, 1994).

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

Derivados do eugenol como acetileugenol (Figura 2), isoeugenol, e metileugenol possuem atividade antifúngica contra os fungos de podridão branca da madeira (*Betulina L.*) e fungos da podridão marrom da madeira (*Sulphureus L.*) (SEN-SUNG et al., 2008).

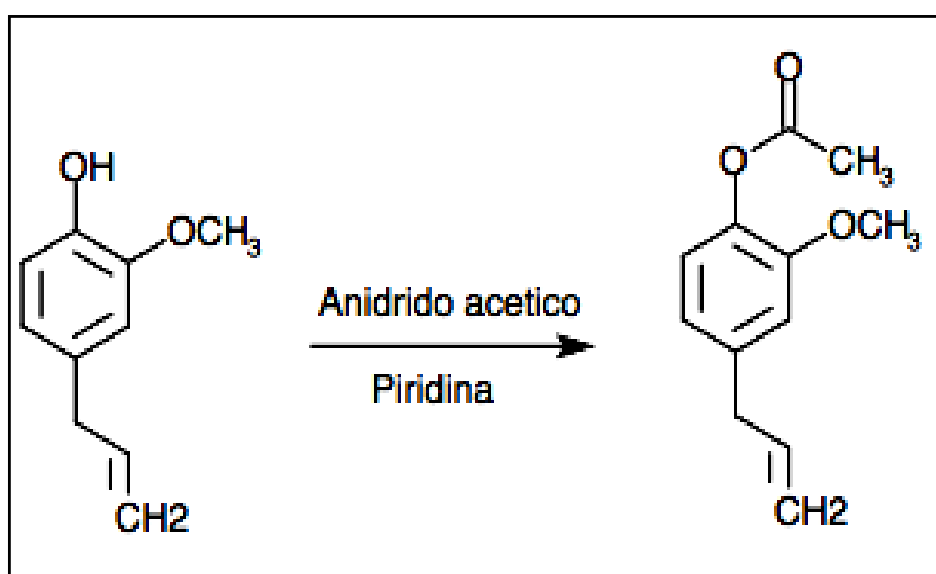


Figura 2: Reação de Acetilação do Eugenol

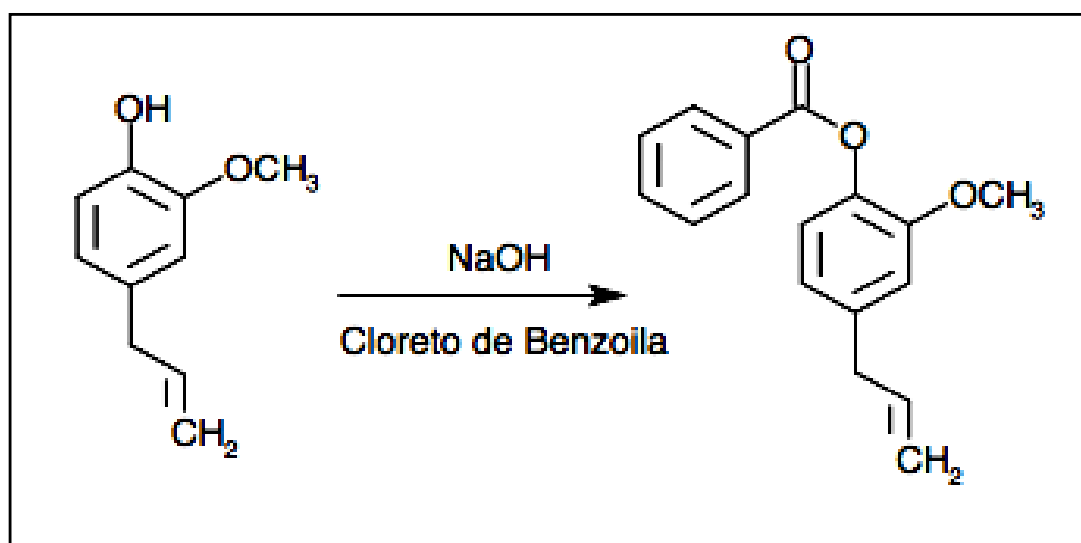


Figura 3: Reação de Benzoilação do Eugenol

2.3 Timol

O Timol (Figura 3) apresenta-se sob a forma de cristais incolores grandes ou pó cristalino branco com aroma irritante, lembrando tomilho. Pouco solúvel em álcool. É irritante da mucosa gástrica, gordura e álcool aumentam sua absorção. Possui atividade antimicrobiana, que é diminuída na presença de proteínas (BOTELHO et al., 2007). Este composto é absorvido no trato gastrointestinal e excretado na urina em sua forma pura e como glicuronídeo.

Este composto é um antisséptico com atividade antibacteriana, antifúngica é o mais potente dos fenóis, porém seu uso é limitado por causa da sua pouca solubilidade em água e sua ação irritante (BOTELHO et al., 2007), sendo usado principalmente como anti-séptico bucal, e constitui o princípio ativo do listerine. O timol tem sido usado no tratamento de enfermidades da pele e por inalação, associado a outras substâncias voláteis, para tratar enfermidades respiratórias (KORDALI et al., 2008).

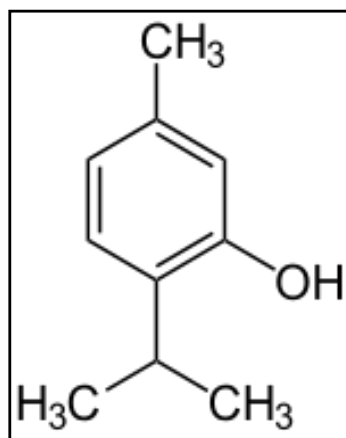


Figura 4. Estrutura química do Timol

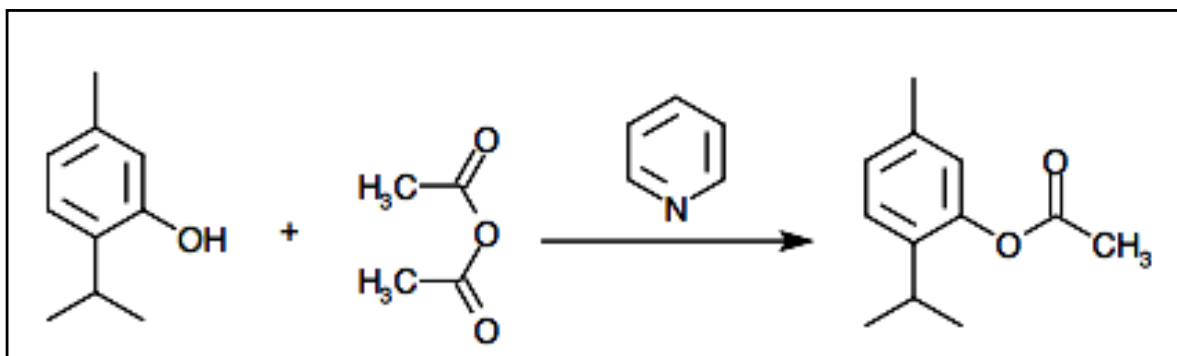


Figura 5: Reação de Acetilação do Timol

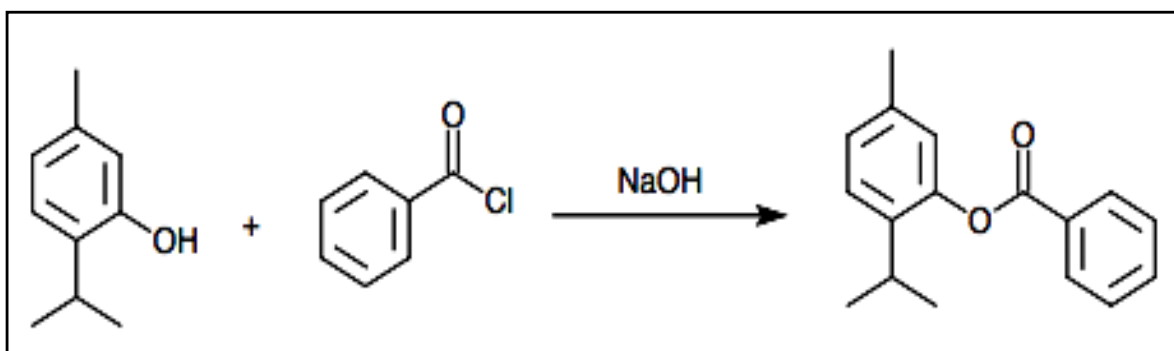


Figura 6: Reação de Benzoilação do Timol

2.4 Relação entre a estrutura química e atividade farmacológica de compostos orgânicos

É notório o trabalho de farmacologia de Pedanius Dioscórides, médico grego militar nascido em Anazarba da Cílicia (40-90 d.C.) e geralmente desconhecido, mas que já descrevia em sua obra *De Materia Medica* mais de mil remédios entre óleos, beveragens e unguentos. Entre outros relatos muito interessantes observa-se que Dioscórides já descrevia a utilização de ópio na forma de medicamento e como veneno, comumente usado por Nero para eliminar seus inimigos. Somente no século XX é que se descobririam os componentes farmacologicamente ativos no ópio, compostos da classe dos alcaloides, como a morfina (de origem natural do ópio), que por sua vez pode gerar a heroína (derivado sintético obtido por acetilação da morfina). A heroína apresenta atividade psicotrópica mais elevada pelo maior transporte e maior absorção cerebral devido à menor solubilidade em água e à ocorrência dos grupos hidroxílicos acetilados (PATWARDHAN et al., 2004).

Atualmente, pode-se denominar que a Química Medicinal engloba o planejamento racional de novas substâncias bioativas, envolvendo a síntese ou a modificação molecular de substâncias; o isolamento de princípios ativos naturais (plantas, animais, minerais); a identificação ou elucidação da estrutura; a descrição das moléculas desde a sua constituição atômica (passando por relações entre a estrutura e propriedades) até suas características estruturais quando da(s) interação(ões) com os diferentes sistemas biofases/biológicos; a compreensão em nível molecular de processos bioquímicos/farmacológicos, toxicológicos e farmacocinéticos. E, finalmente, a proposição e validação de modelos matemáticos através dos estudos de relações entre a

estrutura química e a atividade farmacológica e/ou toxicológica, permitindo então a proposição de novas moléculas de interesse para o planejamento de fármacos, bem como planejamento e mecanismo de ação de agrotóxicos, previsão da toxicidade de compostos, visando sua aplicação tanto terapêutica quanto ambiental (PLISKA et al., 1997).

Segundo Korolkovas & Burckhalter, 1982 A presença de um grupo específico não pressupõe necessariamente que a molécula terá determinada atividade biológica, visto que esta é função da molécula como um todo. Os grupos químicos presentes ou introduzidos num fármaco exercem dois tipos de efeitos – efeitos estéricos e efeitos eletrônicos – e são importantes por dois motivos:

1. Eles podem ser essenciais para a manifestação de determinada ação biológica, em razão de sua reatividade química ou da disposição espacial (efeitos estéricos);
2. Eles podem modificar a intensidade de determinada ação biológica, em consequência do efeito característico que exerce.

Grupos demasiadamente reativos – que reagem facilmente com vários constituintes celulares – talvez impeçam que o fármaco atinja o local em que deve agir. No entanto, grupos pouco reativos podem tornar desprezível a atividade biológica do fármaco matriz. Portanto, a atividade biológica requer reatividade química elevada e propriedades físico-químicas consideráveis. Segundo os critérios químicos e biológicos, na estrutura química dos fármacos, distinguem-se as partes ou grupos quimiofuncionais (aqueles que contribuem para a fixação do fármaco ao receptor através das várias forças em jogo), e as partes ou grupo biofuncionais (os responsáveis pela atividade biológica). (KOROLKOVAS & BURCKHALTER, 1982):

Os grupos ácidos e básicos determinam as características físico-químicas dos fármacos em que estão presentes, devido a sua polaridade e, portanto influem decisivamente nas suas atividades biológicas. (KOROLKOVAS & BURCKHALTER, 1982)

As hidroxilas exercem dois efeitos farmacológicos principais: alterações das propriedades físicas e modificação da reatividade química. Em certos compostos polihidroxilados em que, através de pontes de hidrogênio, as hidroxilas concorrem para a fixação do fármaco ou seu receptor; é por isso que a eterificação e a esterificação modificam a atividade dos fármacos hidroxilados.

Determinados compostos hidroxilados devem a sua ação à possibilidade de ser convertido à sua forma quinônica: e as quinonas participam na fosforilação oxidativa por serem transportadoras de elétrons.

2.5 Fungos

Os fungos são microrganismos que constituem um grupo diversificado e abundante na natureza. São caracterizados por estruturas unicelulares ou multicelulares e classificados de acordo com sua morfologia em filamentosos, leveduras e dimórficos (PRADO, 2007). São seres eucarióticos, isto é, apresentam uma membrana nuclear que envolve os cromossomos e o nucléolo. São classificados como seres heterotróficos por não possuírem pigmentos fotossintéticos. (SIDRIM & ROCHA, 2004).

O reino *Fungi* (*Eumycota*) está atualmente subdividido em sete filos: *Microsporidia*, *Chytridiomycota*, *Blastocladiomycota*, *Neocallimastigomycota*, *Glomeromycota*, *Basidiomycota* e *Ascomycota*, sendo estes dois últimos incluídos no sub-reino *Dikarya* (HIBBET, et al., 2007).

Os fungos causam doenças em animais e vegetais, destroem a madeira e materiais sintéticos e compartilham com as bactérias um importante papel na decomposição de restos orgânicos do solo (MENDES-GIANINNI & MELHEM, 1996).

As doenças antifúngicas ocorrem com relativa frequência em clínicas de pequenos animais, sendo que, nos casos crônicos, o tratamento se torna mais difícil. O problema do tratamento pode ser justificado pelo limitado arsenal de drogas antifúngicas comparadas com as drogas antibacterianas, pelo aparecimento de vários efeitos colaterais à terapia com medicamentos convencionais e pela seleção de cepas resistentes aos fármacos utilizados (SIDRIM & ROCHA, 2004).

As infecções causadas por fungos, denominadas micoses, parecem ser acidentais, ou seja, sua grande maioria não é contagiosa, mas adquirida por exposição do indivíduo a uma fonte natural de ocorrência do fungo. Existem na natureza mais de 250 mil espécies fúngicas conhecidas atualmente. Dentre elas, apenas trezentas aproximadamente foram identificadas, em processos patológicos em seres humanos ou animais (SIDRIM & ROCHA, 2004).

As micoses podem ser classificadas, segundo os tecidos e órgãos atingidos em: micoses superficiais, de localização nas camadas mais superficiais da pele ou dos pêlos; micoses cutâneas ou dermatomicoses, localizadas na pele, no pêlo ou nas unhas;

micoses subcutâneas; micoses sistêmicas ou profundas atingindo, principalmente, órgãos internos e vísceras, e as micoses oportunistas que atingem os pacientes imunocomprometidos por doença de base, como câncer, diabetes, ou aqueles que são submetidos a tratamentos com uso de corticoidoterapia, imunossupressores e antibioticoterapia (TRABULSI, 2004).

Dentre as micoses superficiais, estão as dermatofitoses, que se localizam nas zonas planas e intertriginosas da pele (LACAZ et al., 2002), e são produzidas por fungos especializados, denominados dermatófitos, os quais têm a habilidade de degradar a queratina e transformá-la em material nutritivo para seu crescimento (SIDRIM E ROCHA, 2004). Essas micoses são consideradas importantes para a clínica veterinária, pois por acometerem os animais domésticos, possuem potencial zoonótico (GARCIA, 2000; CRESPO et al., 2000).

Além dos dermatófitos, fungos leveduriformes também possuem importância veterinária, como espécies do gênero *Candida* e *Malassezia* (BRITO et al., 2007). A história natural das doenças causadas por leveduras é mais bem compreendida à luz da susceptibilidade do hospedeiro (MILAN e ZAROR, 2004).

2.5.1 Dermatófitos

Em 1839, Robert Remak elucidou a etiologia do *favus*. Quase um século depois, os dermatófitos foram classificados por um dermatologista francês de nome Raymond Jacques Andrien Sabouraud. Hoje, existem muitos fungos pertencentes aos gêneros



<http://mushroomobserver.org/images/640/43453.jpg>

Figura 7: Colônia de *Microsporum canis*

Trichophyton, *Epidermophyton* e *Microsporum*. Entretanto, a denominação dermatófito é utilizada somente para os fungos pertencentes a esses gêneros (SIDRIM & ROCHA, 2004). Os dermatófitos são ainda caracterizados por serem filamentosos, hialinos, septados, algumas vezes artroconidiados. Em cães e gatos as principais espécies isoladas pertencem aos gêneros *Microsporum* e *Trichophyton*, sendo o *Microsporum*

canis a espécie mais freqüente, possuindo um importante papel como um constante agente de zoonose (PRADO et al., 2007).

O *Microsporum canis* é o dermatófito com potencial zoonótico mais frequentemente encontrado em áreas urbanas (CAFARCHIA et al., 2006). Porém, os gatos assintomáticos apresentam maior potencial zoonótico do que cães, uma vez que a incidência de dermatófitos é maior em gatos em relação aos cães sem sintomologia clínica (CAFARCHIA et al., 2006).

As dermatofitoses em felinos são clinicamente caracterizadas por áreas de alopecia e quebra de pêlos e em raros casos o *M. canis* tem sido associado com o desenvolvimento de grânulos e nódulos teciduais (RICHARD, et al., 1994). O *M. canis* é cosmopolita, endêmico em criações de felinos, onde todos os animais jovens podem estar clinicamente afetados e em contraste, os adultos portadores podem não apresentar lesões (LACAZ et al., 2002).

2.5.2 Leveduras

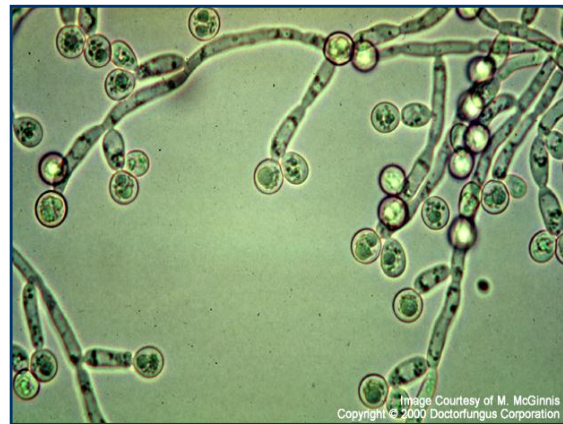
O gênero *Candida* é composto por fungos leveduriformes hialinos, que apresentam duas formas de reprodução: assexuada ou anamorfa, através da formação de blastoconídios, pseudo-hifas e, ocasionalmente, hifas verdadeiras, e sexuada ou telemorfa. Taxonomicamente são enquadradas dentro do grupo dos ascomicetos, visto que, a reprodução sexuada é caracterizada pela produção de ascos (SIDRIM & ROCHA, 2004).

Para a identificação das espécies do gênero *Candida* muitos aspectos são levados em consideração, como morfologia, capacidade de formar tubo germinativo, assimilação de carboidratos, assimilação de nitrogênio e fermentação de carboidratos (SIDRIM & ROCHA, 2004).

Em animais as leveduras do gênero *Candida* são isoladas em diferentes sítios,



Fonte: Vieira, 2009



Fonte: www.doctorfungus.org

Figura 8. Achado macromorfológico (A) mostrando coloração branca, superfície lisa, textura glabrosa úmida, característica das espécies de *Candida* e micromorfologia (B) mostrando blastoconídios de *Candida albicans*.

como o tubo digestivo, mucosas e pele, embora seja um microorganismo sapróbio em homens e animais, um desequilíbrio no binômio parasito-hospedeiro, pode torná-lo agente de infecções (BRITO, 2005). Na medicina veterinária a multiplicação celular das leveduras é facilitada por fatores como a produção de cerume no caso de otite, alterações do pH, uso de antibióticos, glicocorticóides ou fármacos indutores de neutropenia, deficiência nutricional, principalmente de vitaminas e ferro, doenças metabólicas e endocrinopatias (CLEFF et al., 2007).

Infecções em animais causadas por *Candida* spp. já tendo sido relacionadas com infecções urinárias (OZAWA et al., 2005), otite (BRITO et al., 2007), endoftalmite (LINEK, 2004), lesões cutâneas (MORETTI et al., 2004) e infecções sistêmicas (BROWN et al., 2005). No Brasil a presença de *C. albicans* foi detectada em bovinos com otite (DUARTE et al., 2001) e em casos de dermatomicoses em cães (MORETTI et al., 2004).

2.6 Métodos de análise da atividade antifúngica *in vitro*

A atividade antifúngica é medida *in vitro*, a fim de determinar a potência de um antibiótico em solução, sua concentração em líquidos e tecidos corporais e a

sensibilidade de um determinado microorganismo a concentrações conhecidas deste antibiótico (JAWETZ et al., 2005).

A entidade responsável pela normatização de técnicas de laboratório clínico nos Estados Unidos é o *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI), que padronizou os testes de sensibilidade de fungos à droga antimicótica, definindo variáveis como método e preparação de inóculo, composição e pH do meio a ser utilizado, temperatura e tempo de incubação e determinação dos critérios de leitura do teste (COLOMBO & ALVES, 2004).

A macrodiluição em caldo foi o primeiro método padronizado pelo CLSI (1992), porém por tratar-se de método laborioso e de difícil execução em laboratórios de rotina, houve a busca de métodos alternativos que possibilitassem a determinação de concentração inibitória mínima de drogas antifúngicas. A microdiluição em caldo, realizada segundo parâmetros do CLSI, além da facilidade na execução, permite a análise de grande número de amostras, com economia de material (COLOMBO E ALVES, 2004).

O método de difusão em disco, padronizado por Fontenelle, 2007, para leveduras, possibilita análises quantitativas, com resultados favoráveis e alta reprodutibilidade.

Os testes de susceptibilidade às drogas antifúngicas podem ser usados não só nas pesquisas de sensibilidade aos antimicrobianos, como também na busca de novos fármacos pela atividade antifúngica de amostras complexas, como extratos vegetais, e de amostras puras. As metodologias para a tais avaliações são variáveis, sendo realizadas, a difusão em ágar, e a diluição em ágar e caldo (STOPPA et al., 2009).

3. JUSTIFICATIVA

Eugenol e o Timol apresentam atividade antifúngica relevante contra fungos que acometem animais. Na tentativa de potencializar a ação destes compostos, a síntese de derivados através de reações simples como acetilação e benzolição poderia gerar compostos com maior atividade. Deste modo, um estudo sobre a atividade antifúngica dos derivados sintéticos do Eugenol e do Timol é importante para a descoberta de novas substâncias visando incrementar o limitado arsenal de drogas antifúngicas.

4. HIPÓTESE CIENTÍFICA

Os derivados sintéticos do Eugenol e do Timol possuem atividade antifúngica frente às cepas dos fungos *Candida SPP.* e *Microsporum canis*.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

Sintetizar derivados sintéticos do eugenol e do timol e avaliar sua atividade antifúngica frente às cepas de *Candida* spp. e *Microsporum canis*.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Sintetizar através de reações orgânicas os derivados acetilados e benzoilados do eugenol e timol.
2. Confirmar as estruturas dos compostos sintetizados por análise espectroscópica de infra-vermelho e Cromatografia em camada delgada.
3. Avaliar a atividade antifúngica dos derivados sintetizados pelos métodos de difusão em ágar e microdiluição em caldo.

6. CAPÍTULO 1

Antifungal properties of Eugenol and Thymol derivatives against *Candida* spp. and *Microsporum canis* strains.

Trabalho enviado para a revista Microbiological Research

Antifungal properties of Eugenol and Thymol derivatives against *Candida* spp. and *Microsporium canis* strains.

D.V. Magalhães^{1,2}, S.M. Morais^{1,2}, M.F.G. Rocha^{1,3}, R. O. S. Fontenelle³

¹ Veterinary Faculty, Post-Graduation Program in Veterinary Sciences, State University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

² Chemistry Department, State University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

³ Pathology and Legal Medicine Department, Medical University, Medical Mycology Specialized Center, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

Corresponding author: Selene Maia de Morais, Rua Ana Bilhar. No 601. Apto 400: Meireles. CEP: 60.160-110. Fortaleza, Ceará, Brazil, Phone: 55 (85) 3232-3834. Fax: 55 (85) 3495-8692. E. mail: selene@uece.br

ABSTRACT

The synthesis of a compound in relation to its pharmacological action is essential for organic chemistry and pharmaceutical industries in order to improve the control of quality for large-scale production and allow the prospection of potential antifungal agents. Derivatives of Eugenol and Thymol were obtained by acetylation and benzylation reactions to evaluate the antifungal activity against *Candida* spp. and *Microsporum canis*, strains. These fungal strains were recovered from mycology Specialized Medical Mycology Center – CEMM (Federal University of Ceará). Antifungal activity was evaluated by using diffusion agar and microdilution broth. Acetyl eugenol, Benzoyl eugenol and Benzoyl thymol (MIC ranging from 4mg ml⁻¹ to 19mg ml⁻¹), shown antifungal properties against strains of *Microsporum canis* and Benzoyl eugenol (MIC ranging from 156mg ml⁻¹ to 625mg ml⁻¹) against *Candida* spp. The results shows that the derivatives synthesized are important sources of antifungal compounds.

Keywords: Eugenol. Thymol. Antifungal. *Candida* spp. *Microsporum canis*.

INTRODUCTION

In Brazil, it is possible to buy plants, powder and ointments at the public markets. This alternative can be used as cultural context, such as popular medicine or by phytotherapies, since the plants are rich in important natural and biologically active products. Some of them serve as a model for the synthesis of a great number of medications, revealing on these products the high potential when it comes to structure and property (Machado, 2005).

The antifungal effect of constituents from many aromatic plants have been described in several studies (Pyun, 2006). Over 30,000 different components have been isolated from these plants and have been suggested to have potent antifungal activity (Vázquez et al., 2001). In this sense, eugenol (the main component of clove oil) and thymol (the major component of *Lippia sidoides* or *Thymus vulgaris*) are two of the most important representatives, with considerable antibacterial properties (Vázquez et al., 2001 and Botelho et al., 2007). Carvacrol and eugenol were evaluated for their therapeutic efficacy in the treatment of experimental oral candidiasis induced by *Candida albicans* in immunosuppressed rats and were considered to be strong antifungal agents (Pyun, 2006). The ethers anethole and estragole are also found frequently in several essential oils and many authors have demonstrated their antimicrobial activity, for example, antifungal activity of anethole against *Aspergillus parasiticus* strains (Karapinar, 1990).

Previous studies of our research group, about the essential oils of species of *Crotons* and *Lippia sidoides*, plants native to the Caatinga (scrublands) biome, have shown their antifungal activity against strains of *Candida* spp. and *Microsporum canis* (Fontenelle et al., 2008). These same studies identified and quantified the main constituents of these essential oils, by gas chromatography and mass spectrometry. The

main constituent found in the essential oil of *Lippia sidoides* is thymol (59,65%), while in the essential oil of *Croton nepetaefolius* it is methyl-eugenol (15.73%). The essential oil of *Croton zehntneri* contains two main constituents, estragole (72.9%) and anethole (14.3%).

Based on these studies, we carried out the present work to evaluate the antifungal activity of the main compounds found in these oils and derivatives against *Candida* spp. and *M. canis* strains isolated from symptomatic dogs.

MATERIALS AND METHODS

Antifungal agents

Eugenol and thymol were purchased from VETEC, Fortaleza, Brazil.

Acetylation reaction

A mixture of acetic anhydride (12g) and pyridine (4g) was added to eugenol (6g) or thymol (3g). The mixture was left stirring for 24hrs at room temperature. After that time, was transferred to a Becker and added distilled water (20mL) ice. The solution was neutralized by the addition of HCl 5% for the reaction with eugenol or 0.1 M NaOH for the thymol. The reaction mixture was transferred to a separating funnel and extracted three times with chloroform (20mL). The chloroform layer containing the acetylated material was washed with water (five times with 20 ml each) and then dried with anhydrous sodium sulfate. The solvent was evaporated under reduced pressure (Cavalcanti, 1997).

Benzoylation reaction

Initially, it was dissolved eugenol (7.2g) or thymol (7.5g) in the cold solution of NaOH 5% (40mL). Then, the solution was placed in a flat-bottomed flask and added benzoyl chloride (7g) (5.8 ml). The reaction mixture was transferred to a separation funnel and extracted three times with ethyl ether. The ether layer containing the

benzoylated material was washed with solution of NaOH 10% disappear (10 to 15 minutes). The solid product was then filtered in büchner funnel, washed with distilled water and left to dry in filter paper at room temperature, resulting in the benzoyl-looking crystals shaped white needles reaction as a liquid and eugenol transparent to the thymol. (Cavalcanti, 1997)

Fungal strains

The strains were obtained from the fungus collection of the Specialized Medical Mycology Center – CEMM (Federal University of Ceará, Brazil), where they were maintained in saline solution (0,9% NaCl), at 28°C. At the time of the analysis, an aliquot of each suspension was taken and inoculated into potato dextrose agar (difco, Detroit, USA), and then incubated at 28°C for 2-10 days. A total of five strains of *M. canis*, six strains *Candida* spp. were included in this study. Both *M. canis* and *Candida* spp. strains were isolated from symptomatic.

Inoculum preparation for antifungal susceptibility tests

For the agar-well diffusion method, based on Fontenelle et al., 2007, stock inocula were prepared on the day two and day ten for *Candida* spp. and *M. canis*, respectively, grown on potato dextrose agar (Difco, Detroit, USA), at 28°C. Potato dextrose agar was added to the agar slant and the cultures were gently swabbed to dislodge the conidia. The suspensions with blastoconidia of *Candida* spp. or suspension of hyphal fragments of *M. canis* were transferred to a sterile tube and adjusted by turbidimetry to obtain an inoculum of approximately 10^6 and 10^5 cfu/ml for *Candida* spp. and *M. canis*, respectively. The optical densities of the suspensions were spectrophotometrically determined at 530 nm and then adjusted to 95% transmittance.

For the broth microdilution method, the standardized inocula for *Candida* spp. ($2.5 - 5 \times 10^3$ cfu/mL) and *M. canis* (5×10^4 cfu/mL) were also prepared by turbidimetry.

Stock inocula were prepared on the day two and day ten for *Candida* spp. and *M. canis* cultures, respectively, grown on potato dextrose agar at 28°C. Sterile normal saline solution (0,9%; 3ml) was added to the agar slant and the cultures were gently swabbed to dislodge the conidia from the hyphal mat for *M. canis* (Gurgel et al., 2005), and blastoconidia from *Candida* spp. (Brito et al., 2005). The suspensions of conidia with hyphal fragments of *M. canis* and the blastoconidia suspension of *Candida* spp. were transferred to sterile tubes, and the volume of both suspensions were adjusted to 4 ml with sterile saline solution. The resulting suspension was allowed to settle for 5 min at 28°C, and its density was read at 530 nm and then adjusted to 95% transmittance. The suspensions were diluted to 1:2000 for *Candida* spp. and 1:500 for *M. canis*, both with RPMI 1640 medium (Roswell Park Memorial Institute – 1640) with L-glutamine, without sodium bicarbonate (Sigma Chemical Co., USA), and buffered at pH 7.0 with 0.165M morpholinepropanesulfonic acid (MOPS) (Sigma Chemical Co., USA) to obtain inoculum sizes of approximately $2.5 - 5 \times 10^3$ for *Candida* spp. and 5×10^4 cfu/ml for *M. canis*.

Agar-well diffusion susceptibility test

The screening of the antifungal activity of the derivatives was evaluated against *Candida* spp. and *M. canis* strains, by the agar-well diffusion method according to Gurgel et al., 2005 and Fontenelle et al., 2007. Petri dishes 15cm in diameter were prepared with potato dextrose agar (Difco, Detroit, USA). Wells (6mm in diameter) were then CUT from the agar and 0.100ml of the compounds was placed in them. The constituents were weighed and dissolved in DMSO to obtain a test concentration of 10mg/ml. Stock solutions of griseofulvin ($1000 \mu\text{g ml}^{-1}$; Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) and amphotericin B ($5 \mu\text{g ml}^{-1}$; Sigma Chemical Co., USA) were prepared in distilled water and tested as positive controls for *M. canis* and *Candida* spp.,

respectively. Each fungal suspension was inoculated on the surface of the agar. After incubation at 28°C, for 3-5 days for *Candida* spp. and 5-8 days for *M. canis*, all the dishes were examined for growth-inhibition zones and the diameters of these zones were measured in millimeters. Each experiment was repeated at least twice.

Broth microdilution method

The minimum inhibitory concentration (MIC) for *Candida* spp. was determined by the broth microdilution method, in accordance with the Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI (NCCLS, 2002). The broth microdilution assay for *M. canis* was performed as described by Jessup et al., 2002 and Brilhante et al., 2005, based on the M38-A document (NCCLS 2002).

Derivatives, amphotericin B (AMB) (Sigma, Chemical Co., USA) and griseofulvin (Sigma Chemical Co., USA), were mixed with DMSO to improve solubility in distilled water. For the susceptibility analysis, the compounds were tested in concentrations ranging from 4 to 5000 µg ml⁻¹.

The microdilution assay was performed in 96-well microdilution plates. Growth and sterile control wells were included for each isolate tested. The microplates were incubated at 37°C and read visually after two days for *Candida* spp. and five days for *M. canis*. All isolates were run in duplicate and repeated at least twice. The MIC was defined as the lowest oil concentration that caused 100% inhibition of visible fungal growth. The results were read visually as recommended by CLSI.

RESULTS AND DISCUSSION

The antifungal activity of the chemical compounds was initially evaluated by the agar diffusion method using strains of *M. canis* and *Candida* spp. The inhibition zones for *M. canis* were 14-25 mm for acetyl eugenol, 25-32 mm for benzoyl eugenol,

demonstrating higher action than Eugenol. There are the acylation reaction increases the activity of Eugenol. For Thymol the derivative benzoyl (20-28mm) showed similar action. The inhibition zones for *Candida* spp was 12-32 mm for benzoyl eugenol. The positive control, amphotericin B, had a significant effect (10 mm) against *Candida* spp. and griseofulvin induced a significant growth inhibition zone (51 mm) against *M. canis* (Table 1).

Through the broth microdilution method, the eugenol effect against *M. canis* (n=6) showed a MIC of 39 mg ml⁻¹. The O-benzoyl-eugenol effect against *Candida* spp. showed a MIC ranged from 156 to 625 mg ml⁻¹(Table 2).

Concerning the strains *M. canis* (n=5), for thymol the MIC ranged from 4 to 9 mg ml⁻¹ and for eugenol th MIC from 39 mg ml⁻¹. For O-acetyl-eugenol the MIC of 4 mg ml⁻¹. For O-benzoyl-eugenol the MIC varied from 4 to 9 µg ml⁻¹. For O-benzoyl-thymol the MIC varied from 4 to 19 mg ml⁻¹(Table 2).

The agar well-diffusion method has been used for screening of antifungal susceptibility testing. This method is simple, convenient and has been used for antifungal susceptibility of derivatives of eugenol and thymol. However, the zone diameter from this method is affected by the fungal concentration and the degree of drug diffusion into the agar, that's why this method has been used only for screening of compounds which present antifungal activity. We adopted agar well-diffusion and broth dilution method for yeast and filamentous fungi. Broth dilution method appears to be the one most commonly used for antifungal susceptibility testing of derivatives synthetics. In the present study, we have demonstrated that O-acetyl-eugenol, O-benzoyl-eugenol and O-benzoyl-thymol have *in vitro* antifungal activity against both *M. canis* and O-benzoyl-eugenol has antifungal activity also against *Candida* spp.

Our results suggest that O-acetyl-eugenol, O-benzoyl-eugenol and O-benzoyl-thymol have antifungal activity against the *Candida* spp. and *M. canis* obtained from dog. However, further *in vivo* studies will be required to evaluate the usefulness of these substances as veterinary antimicrobials.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are thankful the financial support of FUNCAP (Ceará State Research Foundation).

REFERENCES

ALVES, S.H.; LOPES, J.O.; CURY, A.E. **Teste de suscetibilidade aos antifúngicos: por que, quando e como realizar**, 1999.

BOTELHO, M. A.; BASTOS, G. M.; FONSECA, S. G. C.; MATOS, F. J. A.; MONTENEGRO, D.; RAO, V. S. and BRITO, G. A. C.; Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, cavacrol and thymol against oral pathogens. **Braz J. Med. Biol. Res.** V. 40, p. 349-356, 2007.

BRITO, E. H. S. *Caracterização fenotípica e perfil de sensibilidade antifúngica de cepas de candida spp e malassezia pachydermatis, oriundas de cães*. Dissertação (mestrado em ciências veterinárias) Universidade Estadual do Ceará, 2005.

BRITO, E. H. S.; FONTENELLE, R. O. S.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; SOARES JÚNIOR, F. A.; MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Phenotypic characterization and in vitro antifungal sensitivity of *Candida* spp. and *Malassezia pachydermatis* strains from dogs. *The Veterinary Journal*, v.174, p.147–153, 2007.

BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; MEDRANO, D. J. A.; MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Antifungal susceptibility and genotypical pattern of *Microsporum canis* strains. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 51, p. 1480-3275, 2005.

CAVALCANTI, E. S. B. **Contribuição ao conhecimento químico de plantas nativas do Nordeste: *Metha villosa* Backer e *Bursera leptophloeos* e síntese de derivados do Eugenol**. 1997. Tese (Doutorado em Química Orgânica) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1997.

FONTENELLE, R.; MORAIS, S.; BRITO, E.; KERNTOPF, M.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; TOMÉ, A.; QUEIROZ, M. G.; NASCIMENTO, N. R.;

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, p. 934-940, 2007.

FONTENELLE, R.O.S.; MORAIS, S. M.; BRITO, E.H.S. BRILHANTE, R.S.N.; CORDEIRO, R.A. NASCIMENTO, N.R.F.; KERNTOPF, M.R.; SIDRIM, J.J.C. E ROCHA, M.F.G. Antifungal activity of essential oils of Croton species from the Brazilian Caatinga biome. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, p. 1383-1390, 2008.

GURGEL L. A.; SIDRIM J. J. C.; MARTINS D. T., *In vitro* antifungal activity of dragon's blood from *Croton urucurama* against dermatophytes. *J. Ethnopharmacol* , 2005; 97: 409-12.

JESSUP C. J.; WARNER J.; ISHAM I., Antifungal susceptibility testing of dermatophytes: establishing a medium for inducing conidial growth and evaluation of susceptibility of clinical isolates. *J Clin Microbiol*, 2000; 38: 341-44.

KARAPINAR M. Inhibitory effects of anethole and eugenol on the growth and toxin production of *Aspergillus parasiticus*. **Food Microbiol**, 10: 193-9, 1990.

LACAZ, C.S.; NEGRO, G. Drogas antifúngicas. Terapêutica das micoses. In: LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C. **Micologia médica fungos, actinomicetos e algas de interesse médico**. São Paulo : Savier, 1991. Cap.38. p.616-651.

MACHADO, K. E. **Atividade antimicrobiana dos extratos, frações e substâncias isoladas da *Eugenia umbelliflora* Berg.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade do Vale do Itajaí, 2005

MATASYOH JC, KIPLIMO JJ, KARUBIU NM, HAILSTORKS TP, Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Tarchonanthus camphoratur*. **Food Chem**, 101; 1183-07, 2007.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. 2002
Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts:
Approved standard, 2nd Ed. NCCLS document M27-A2. Clinical and Laboratory
Standards Institute, Villanova, PA, 2002.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS.
Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing filamentous fungi:
Approved standard, NCCLS document M38-A. Clinical and Laboratory Standards
Institute, Villanova, PA, 2002.

PYUN M.S.; SHIN S. Antifungal effects of the oils volatile oils from *Allium* plants
against *Trichophyton* species and synergism of the oils with ketoconazole.
Phytomedicine 2006; 13: 394-400.

SIDRIM, J. J. C.; BRILHANTE, R. S. N.; ROCHA, M. F. G. Aspectos clínicos
laboratoriais das dermatofitoses. In: SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. *Micologia
médica à luz de autores contemporâneos*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan,
2004. cap. 14, p. 135-161.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. *Micologia médica à luz de autores
contemporâneos*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2004. cap. 5, p. 41-49.

VÁZQUEZ B. I.; FENTE C.; FRANCO C. M.; VÁZQUEZ M. J.; CEPEDA A.,
Inhibitory effects of eugenol and thymol on *Penicillium citrium* strains in culture media
and cheese. *Food Microbiol* 2001; 67: 157-63.

Table 1. Antifungal activity of compounds against *M. canis* and *Candida* spp.

Strains	Growth inhibition zones (mm)					
	Constituents (10mg/mL)					
	Eugenol	Thymol	Acethyl Eugenol	Benzoyl Eugenol	Benzoyl Thymol	Acetyl Thymol
<i>M. canis</i>						
CEMM 1-3-023	N.A	N.A	14	32	28	N.I
CEMM 1-3-165	N.A	N.A	25	29	28	N.I
CEMM 1-3-168	N.A	N.A	24	27	28	N.I
CEMM 1-3-188	26	35	22	25	26	N.I
CEMM 1-5-190	30	40	24	29	20	N.I
<i>Candida</i> spp.						
CEMM 1-3-068	N.A	N.A	N.I	30	N.I	N.I
CEMM 1-3-069	8	17	N.I	10	N.I	N.I
CEMM 1-3-074	N.A	N.A	N.I	31	N.I	N.I
CEMM 1-3-075	12	18	N.I	32	N.I	N.I
ATCC <i>C. krusei</i>	N.A	N.A	N.I	31	N.I	N.I
ATCC <i>C. parapsilosis</i>	N.A	N.A	N.I	12	N.I	N.I

N.A: No account

N.I: No inhibition

Table 2. MIC of compounds against *M. canis* and *Candida* spp. in the broth microdilution method

Strains	Least inhibiting concentration					
	Constituents (5000mg/mL)					
	Eugenol	Thymol	O-Acethyl -Eugenol	O-Benzoyl -Eugenol	O-Benzoyl -Thymol	O-Acetyl -Thymol
<i>M. canis</i>						
CEMM 1-3-023	N.A	N.A	4	4	4	N.A
CEMM 1-3-165	N.A	N.A	4	9	19	N.A
CEMM 1-3-168	N.A	N.A	4	9	4	N.A
CEMM 1-3-188	39	9	4	9	9	N.A
CEMM 1-5-190	39	4	4	4	9	N.A
<i>Candida</i> spp.						
CEMM 1-3-068	N.A	N.A	N.A	625	N.A	N.A
CEMM 1-3-069	N.A	N.A	N.A	156	N.A	N.A
CEMM 1-3-074	N.A	N.A	N.A	625	N.A	N.A
CEMM 1-3-075	N.A	N.A	N.A	156	N.A	N.A
ATCC <i>C. krusei</i>	625	156	N.A	625	N.A	N.A
ATCC <i>C. parapsilosis</i>	625	156	N.A	156	N.A	N.A

N.A: No account

Anphotericin B = 312 mg/mL

Griseofulvin = 19 mg/mL

7. CONCLUSÕES GERAIS

- Os derivados sintéticos do eugenol e do Timol produzidos neste trabalho foram capazes de inibir, *in vitro*, as cepas de *M. canis*.
- O O-Acetil-timol que não apresentou atividade frente às cepas.
- O O-benzoil-eugenol produzido neste trabalho foi capazes de inibir, *in vitro*, as cepas de *Candida* spp.
- Posteriormente estudos acerca da toxicidade *in vivo*, são necessários para o emprego desses derivados em animais infectados na clínica veterinária.

8. PERSPECTIVAS

A partir dos resultados obtidos em relação a atividade antifúngica dos derivados sintetizados do Eugenol e do Timol contra as cepas de *Candida* spp. e *M. canis*, observa-se que esses derivados apresentam potencial de exploração na procura de novos fármacos antifúngicos, sendo necessários testes *in vivo* para os derivados com atividade maior antifúngica, possibilitando assim testes com grupos alvos, visando à otimização de novas drogas antifúngicas.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELGALEIL, S. A. M.; ABBASSY, M. A.; BELAL, A. S.; RASOUL, M. A.A.A. Bioactivity of two major constituents isolated from the essential oil of *Artemia judaica* L. *Biosource Technology*, v. 99, p. 5947-5950, 2008.

ALVES, S.H.; LOPES, J.O.; CURY, A.E. **Teste de suscetibilidade aos antifúngicos: por que, quando e como realizar**. Disponível on line na Internet em 05 de abril de 1999.

ARAÚJO, M. E. M. *Química analítica aplicada aos produtos naturais*. Texto de apoio: Mestrado em química analítica aplicada, 2005.

BOTELHO, M. A.; BASTOS, G. M.; FONSECA, S. G. C.; MATOS, F. J. A.; MONTENEGRO, D.; RAO, V. S. and BRITO, G. A. C.; Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, cavacrol and thymol against oral pathogens. *Braz J. Med. Biol. Res.* V. 40, p. 349-356, 2007.

BOURNE, K. Z.; BOURNE, N.; REISING, S.F.; STANBERRY, L.R.; Plant products as topical microbicide candidates: assessment of *in vitro* and *in vivo* activity against herpes simplex virus type 2. *Antiviral Research*, v. 42, p.219-236, 1999.

BRITO, E. H. S. *Caracterização fenotípica e perfil de sensibilidade antifúngica de cepas de candida spp e malassezia pachydermatis, oriundas de cães*. Dissertação (mestrado em ciências veterinárias) Universidade Estadual do Ceará, 2005.

BRITO, E. H. S.; FONTENELLE, R. O. S.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; SOARES JÚNIOR, F. A.; MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Phenotypic characterization and in vitro antifungal sensitivity of *Candida* spp. and *Malassezia pachydermatis* strains from dogs. *The Veterinary Journal*, v.174, p.147–153, 2007.

BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; MEDRANO, D. J. A.; MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Antifungal susceptibility and genotypical pattern of *Microsporum canis* strains. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 51, p. 1480-3275, 2005.

BROWN, M.R., THOMPSON, C.A., MOHAMED, F.M. Systemic candidiasis in an apparently immunocompetent dog. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 17, p. 272–276, 2005.

CAFARCHIA, C.; ROMITO, D.; CAPELLI, G.; GUILLOT, J.; OTRANTO, D. Isolation of *Microsporum canis* from the hair coat of pet dogs and cats belonging to owners diagnosed with *M. canis* tinea corporis. *Europea Society of Veterinary Dermatology*, v. 17, p. 327-331, 2006.

CHAMI N, BENNIS S, CHAMI F, ABOUSSEKHRA A, REMMAL A. Study of anticandidal activity of carvacrol and eugenol *in vitro* and *in vivo*. *Oral Microbiology and Immunology*, v. 20, n. 2, p. 106-111, 2004.

CLEFF, M. B.; LIMA, A. P.; FARIA, R.O.; MEINERZ, A. R. M.; ANTUNES, T. Á.; ARAÚJO, F. B.; NASCENTE, P. S.; NOBRE, M. O.; MEIRELES, M. C. A. Isolation of *candida* spp from vaginal microbiota of healthy canine females during estrous cycle. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 36, p.201-204, 2005.

COLOMBO, A. L.; ALVES, S. H. Teste de susceptibilidade a antifúngicos. In: SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. *Micologia médica à luz de autores contemporâneos*. Rio de Janeiro: **Editora Guanabara Koogan**, cap. 10, p. 102-110, 2004.

COSTA, S. M. Contribuição ao conhecimento químico de plantas do Nordeste do Brasil *Lippia sidoides* Cham. Tese (Doutorado em Química Orgânica). **Universidade Federal do Ceará**, 2001.

CRAVEIRO, A. A.; MATOS F. J. A.; ALENCAR, J. W. A simple and inexpensive steam generator for essential oils extraction. *J Chem Edu*, v. 53, p. 652, 1976.

CRAVEIRO, A. C.; FERNANDES, A. G.; ANDRADE, C. H. S.; MATOS, F. J. A.; ALENCAR, J. W.; MACHADO, M. I. L. *Óleos essenciais de plantas do Nordeste, Edições UFC*, 1981.

CRESPO, M. J.; ABARCA, M. L.; CABAÑES, F. J. Evaluation of different Preservation and Store Methods for *Malassezia* spp. *Journal Clinic Microbiology*, v. 38, p. 3872-5, 2000.

CRUZ, G.M.P. Efeito do eugenol e do metil-eugenol sobre o potencial composto do nervo ciático do rato, *Dissertação de mestrado. Universidade Estadual do Ceará*, 2001.

DUARTE, E. R.; RESENDE, J. C.; ROSA, C. A.; HAMDAN, J. S. Prevalence of yeasts and mycelial fungi in bovine parasitic otitis in the State of Minas Gerais, Brazil. *Journal of Veterinary Medicine Series B - Infectious Diseases and Veterinary Public Health*, v. 48, p. 631–635, 2001.

ESCOBAR, R. G. Eugenol: propriedades farmacológicas y toxicológicas, Ventajas y desventajas de su uso. *Review Cubana Estomatology*, v. 39, 2002.

FERNANDES, A. G.; ALENCAR, J. W.; MATOS, F. J. A. Canelas silvestres nordestinas: aspectos botânicos, químicos e farmacológicos. *Ciência Cultural*, v. 32, p. 26-33, 1971.

FONTENELLE, R. O. S.; MORAIS, S. M.; BRITO, E. H. S.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; NASCIMENTO, N. R. F.; KERNTOPF, M. R.; SIDRIM, J. J.C.; ROCHA, M. F.G. Antifungal activity of essential oils of *Croton* species from the Brazilian Caatinga biome. *Journal of Applied Microbiology*, v. 104, n. 5, p.1383-1390, 2008.

FONTENELLE, R.; MORAIS, S.; BRITO, E.; KERNTOPF, M.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; TOMÉ, A.; QUEIROZ, M. G.; NASCIMENTO, N. R.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 59, p. 934-940, 2007.

GAYOSO CW, Lima EO, OLIVEIRA VT, PEREIRA FO, SOUZA EL, LIMA IO. *Fitoterapia*;76:247, 2005.

GARCIA, M. E.; BLANCO, J. L. Principales enfermedades fúngicas que afetam a los animales domésticos. *Revista Iberoamericana de Micologia*, v. 17, p. S2-S7, 2000.

HIBBET, J.; SMADJA, H. K. Chemical Composition and *in Vitro* Antimicrobial Activities of the JAWETZ, E.; MELNICK, L. J.; ADELBERG, E. A. *Microbiologia Médica*, Ed. Artmed, 7 ed., p. 568, 2007.

JAWETZ, E.; MELNICK, L. J.; ADELBERG, E. A. *Microbiologia Médica*, Ed. Artmed, 7 ed., p. 568, 2005.

KORDALI, S.; CAKIR, A.; OZER, H.; CAKMAKCI, R.; KESDEK, M.; METE, E. Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from *Turkish Origanum acutidens* and its three components, cavacrol, thymol and ρ -cymene. *Bioresource Technology*, doi: 10.1016/j.biortech.2008.04.048, 2008.

KOROLKOVAS, A., BURCKHALTER, J. H. *Química farmacêutica*. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1982. 783p.

LACAZ, C. DA S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E. M.; DE MELO, N. T. *Tratado de microbiologia médica*. São Paulo: Sarvier, 2002.

LACAZ, C.S.; NEGRO, G. Drogas antifúngicas. Terapêutica das micoses. In: LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C. *Micologia médica fungos, actinomicetos e algas de interesse médico*. São Paulo : Savier, Cap.38. p.616-651, 1991.

LIMA, C. B. N.; BELLETTINI, M. T.; SILVA, A. S.; CHEIRUBIM, A. P.; JANANI, J. K.; VIEIRA, M. A. V.; AMADOR, T. S. Uso de Plantas Medicinais pela População da Zona Urbana de Bandeirantes-PR. *Revista Brasileira de Biociências*, v. 5, n. 1, p. 600-602, 2007.

LINEK, J. Mycotic endophthalmitis in a dog caused by *Candida albicans*. *Veterinary Ophthalmology*, v. 7, p. 159–162, 2004.

LOEFFLER, J.; HAGMEYER, L.; HEBART, H.; HENKE, N.; SCHUMACHER, U.; EINSELE, H.; Rapid detection of point mutations by fluorescence resonance energy transfer and probe melting curves in *Candida* species. *Clinical Chemistry*, v.46, p.631–635, 2000.

MACIEL, A. S.; VIANA, J. A. Dermatofitose em cães e gatos: uma revisão. *Clínica Veterinária*, v. 57, p. 74-82, 2005.

MARKOWITZ, K.; MOYNIHAN, M.; LIU, M.; KIM, S. Biologic proprieties of eugenol and zinc oxido-eugenol. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, v. 73, p. 729-737, 1992.

MARQUES, C. A.; LEITÃO, G. G.; BIZZO, H. R.; KRANZ, W. M.; PEIXOTO, A. L.; VIEIRA, R. C. Considerações anatômicas e análise de óleo essencial do hipanto e do fruto de *Hennecartia omphalandra* J. Poisson (Monimiaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 18, n. 3, p. 415-429, 2008.

MATASYOH, L. G.; MATASYOH, J. C.; WACHIRA, F. N.; KINYUA, M.G.; MUIGAI, A. W. T.; MUKIAMA, T. K. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. growing in Eastern Kenya. *African Journal of Biotechnology*, v. 6, n. 6, p. 760-765, 2007.

MENDES-GIANNINI, M.J.S.; MELHEM, M.S.C. *Infecções fúngicas*. In: FERREIRA, A.W.; ÁVILA, S.L.M. – *Diagnóstico laboratorial*. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 216-275, 1996.

MENDONÇA, M. C. S. Efeito do ácido indolbutírico no enraizamento de estacas de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.). *Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade Federal do Ceará*. 1997.

MICHEL, J.; DUARTE, R. E.; BOLTON, J. L.; HUANGA, Y. A. C.; VELIZ, M.; SOEJARTO, D. D.; MAHADY, G. B. Medical potential of plants used by the Q'eqchi Maya of Livingston, Guatemala for the treatment of women's health complaints. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 114, p. 92–101, 2007.

MILAN, E. P.; ZAROR, L. Leveduras: identificação laboratorial. In: SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. *Micologia médica à luz de autores contemporâneos. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan*, Cap. 9, p. 89-101, 2004.

MORAIS, S. M.; BRAZ-FILHO, R. *Produtos naturais: estudos químicos e biológicos. Fortaleza: EdUECE*, 2007.

MORAIS, S. M.; CATUNDA JÚNIOR, F. E. A.; SILVA, A. R. A.; MARTINS NETO, J. S.; RONDINA, D.; CARDOSO, J. H. L. Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de *Croton* do Nordeste do Brasil. *Química nova*, v. 29, n. 5, p. 907-910, 2006.

MORETTI, A., POSTERARO, B., BONCIO, L., MECHELLI, L., GASPERIS, E., AGNETTI, F., RASPA, M. Diffuse cutaneous candidiasis in a dog. Diagnosis by PCR-REA. *Revista Iberoamericana de Micologia*, v. 21, p. 139–142, 2004.

OZAWA, H., OKABAYASHI, K., KANO, R., WATARI, T., WATANABE, S., HASEGAWA, A. Rapid identification of *Candida tropicalis* from canine cystitis. *Mycopathologia*, v. 160, p. 159–162, 2005.

PATWARDHAN, B.; VAIDYA, A. D. B.; CHORGHAD, M. *Curr. Sci. on line*, 86, 789, 2004.

PINA-VAZ C, RODRIGUES AC, PINTO E, COSTA-DE-OLIVEIRA S, TAVARES C, SALGUEIRO L. *J. Eur. Acad. Derm. Vener*, 18:73, 2004.

PLISKA, V.; TESTA, B.; VAN DE WATERBEEMD, H. Em *Drug Action and Toxicology - Methods and Principles in Medicinal Chemistry*; **Mannhold, R.; Kubinyi, H.; van de Waterbeemd, H., eds, VCH**: Alemanha, Vol. 4, 1997.

POTZERNHEIM, M., BIZZO, H. R., COSTA, A. T. S., VIEIRA, R. F., CARVALHO, C. M., GRACINDO, L. A. M. B. Chemical characterization of seven *Piper* species (Piperaceae) from Federal District, Brazil, based on volatile oil constituents. ***Revista Brasileira de Plantas Medicinais***, v. 8, p. 10-12, 2006.

PRADO, M. R. *Isolamento de microsporium canis, malassezia spp. e candida tropicalis em cães: um destaque para teste de sensibilidade de malassezia pachydermatis in vitro. Tese (doutorado em ciências veterinárias) Universidade Estadual do Ceará*, 2007.

RABELO, M.; SOUZA, E. P.; SOARES, P. M. G.; MIRANDA, A. V.; MATOS, F. J. A.; CRIDDLE D. N. Antinociceptive properties of the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. (Labiatae) in mice. ***Brazilian Journal of Medical and Biological Research***, v. 36, p. 521-524, 2003.

RAKOTONIRAINY, M. S. & LAVEDRINE, B. Screening for antifungal activity of essential oils and related compounds to control the biocontamination in libraries and archives storage areas. ***International Biodeterioration & Biodegradation***, v. 55, p. 141-147, 2005.

RICHARD, J. L.; DEBEY, M. C.; CHERMETTE, R. Advances in veterinary mycology. ***Journal of Medical and Veterinary Mycology***, v. 32, p. 169-187, 1994.

SEN-SUNG CHENG, JU-YUN LIU, ED-HAUN CHANG, SHANG-TZEN CHANG. Antifungal activity of cinnamaldehyde and eugenol congeners against wood-rot fungi. ***Bioresource Technology*** 99, 5145–5149, 2008

SIDRIM, J. J. C.; BRILHANTE, R. S. N.; ROCHA, M. F. G. Aspectos clínicos laboratoriais das dermatofitoses. In: SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. *Micologia*

médica à luz de autores contemporâneos. Rio de Janeiro: **Editora Guanabara Koogan**, Cap. 14, p. 135-161, 2004.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Candidíase. In: SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. *Micologia médica à luz de autores contemporâneos*. Rio de Janeiro: **Editora Guanabara Koogan**,. Cap. 25, p. 265-273, 2004.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G.; CORDEIRO, R. A. Biologia dos fungos. In: SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. *Micologia médica à luz de autores contemporâneos*. Rio de Janeiro: **Editora Guanabara Koogan**, Cap. 5, p. 41-49, 2004.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P.R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS / **Editora da UFSC**, 2004.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Ed. Universidade/UFRGS. 3^a ed., 1999.

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR., G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*, v. 30, n. 2, p.351-355, 2003.

STOPPA, M. A.; CASEMIRO, L. A.; VINHOLIS, A. H. C.; CUNHA, W. R.; ANDRADE, M. L. S.; MARTINS, C. H. G. Estudo comparativo entre as metodologias preconizadas pelo CLSI e pelo EUCAST para avaliação da atividade antifúngica. *Química Nova*, v. 32, n. 2, p.498-502, 2009.

SUPPAKUL P, MILTZ J, SONNEVELD K AND BIGGER SW. Antimicrobial properties of basil and its possible application in food packaging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, n. 11, p. 3197-3207, 2003.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. *Microbiologia*, 4 ed. São Paulo: Atheneu, 2004.

VIEIRA R. F.; SIMON J. E. Chemical characterization of basil(*Ocimum* spp.) Found in the markets and used in traditional medicine in Brazil. *Economic Botany*, v. 54, n. 2, p. 207-216, 2000.

VANI, S. R.; CHENG, S.F.; CHUAH, C.H. Comparative Study of Volatile Compounds from Genus *Ocimum*. *American Journal of Applied Sciences*, v. 6, n. 3, p. 523-528, 2009.

WRIGHT, D.E.; WHITE, F.A.; GERFEN, R.W.; SILOS-SANTIAGO, I.; SNIDER, W.D. The guidance molecule semaphoring III is expressed in regions of spinal cord and periphery avoided by growing sensory axons. *Journal of Comportamental Neurology*, v. 361, p. 321-333, 1995.

WU, B. N.; HWANG, T. L.; LIAO, C. F.; CHEN, M. I. J. Vanimolol: a new selective beta B-adrenergic antagonist derived from vanillin. *Biochemical Pharmacology*, v. 48, p. 101-109, 1994.