

Universidade Federal do Triângulo Mineiro
Programa de Mestrado Profissional em Inovação Tecnológica

Weder da Silva Mateus

Avaliação dos efeitos fungistáticos e fungicidas de óleos essenciais em
microrganismos causadores de dermatomicoses

Uberaba - MG
2016

Weder da Silva Mateus

Avaliação dos efeitos fungistáticos e fungicidas de óleos essenciais em
microrganismos causadores de dermatomicoses

Dissertação apresentada ao Programa de
Mestrado Profissional em Inovação
Tecnológica da Universidade Federal do
Triângulo Mineiro como requisito para
obtenção do título de Mestre em Inovação
Tecnológica.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Mônica Hitomi
Okura

Coorientador: Prof. Dr. Tony de Paiva
Paulino

Uberaba - MG

2016

**Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do
Triângulo Mineiro**

M377a Mateus, Weder da Silva
Avaliação dos efeitos fungistáticos e fungicidas de óleos essenciais em microrganismos causadores de dermatomicoses / Weder da Silva Mateus. -- 2016.
49 f. : il., fig., tab.

Dissertação (Mestrado Profissional em Inovação Tecnológica) -- Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2016
Orientadora: Profa. Dra. Mônica Hitomi Okura
Coorientador: Prof. Dr. Tony de Paiva Paulino

1. Pele - Doenças. 2. Dermatomicose. 3. Onicomicose. 4. Antimicóticos. 5. Dermatofitos. 5. Canela. 6. Leveduras (Fungo). I. Okura, Mônica Hitomi. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 616.5

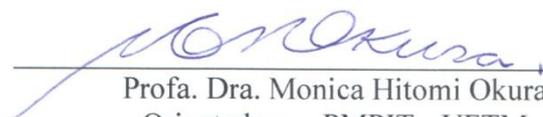
WEDER DA SILVA MATEUS

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS FUNGISTÁTICOS E FUNGICIDAS DE
ÓLEOS ESSENCIAIS EM MICRORGANISMOS CAUSADORES DE
DERMATOMICOSSES

Trabalho de conclusão apresentado ao
Programa de Mestrado Profissional em
Inovação Tecnológica da Universidade
Federal do Triângulo Mineiro, como requisito
para obtenção do título de mestre.

Uberaba, 01 de dezembro de 2016

Banca Examinadora:



Prof. Dra. Monica Hitomi Okura
Orientadora – PMPIT - UFTM



Prof. Dr. Anderson Assunção Andrade
Membro Titular – UFTM



Prof. Dr. Gabriel Antônio Nogueira Nascentes
Membro titular – IFTM

Dedico esse trabalho a minha querida esposa, que foi a minha
inspiração e a principal incentivadora acreditando que eu seria
capaz.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me dar força, me abençoar, proteger e me permitir vencer nessa jornada.

A minha esposa Kamila, por seu amor, incentivo e paciência, por algumas vezes eu ter que trocar sua companhia pelo laboratório.

Aos meus pais, mesmo na simplicidade de não entender a importância de um mestrado, me apoiavam! E pelo simples fato de que se era algo bom para mim, eles estavam comigo.

A minha orientadora, profa. Dra. Mônica, pela prontidão que desde a nossa primeira conversa sempre estava disposta a trabalharmos juntos.

A prof. Tony, co-orientador, pela disposição de ajudar e esclarecer dúvidas.

Aos doutorandos do Laboratório de Microbiologia, Larissa, Diego e Beatriz, por toda a colaboração e transferência de conhecimento, aprendi muito! E sem vocês tudo teria sido bem mais difícil.

Ao Celso, técnico do Laboratório de Microbiologia, pela grande ajuda e disposição em colaborar sempre.

Ao amigo e doutorando Wellington, pela grande colaboração na estatística.

E a todos o meu muito obrigado!

“Combati o bom combate, acabei a carreira, guardei a fé.”

2 Timóteo 4:7.

RESUMO

As dermatomicoses são infecções superficiais da pele, cabelo e unhas ocasionadas por fungos dermatófitos, leveduras e fungos filamentosos não dermatófitos (FFND), que afetam pessoas no mundo inteiro, tornando uma das doenças dermatológicas mais comuns. Entre todas, a onicomicose, que é uma infecção fúngica que atinge as unhas, é a mais prevalente. O tratamento farmacológico da onicomicose é, geralmente, prolongado, pouco efetivo, de custo elevado e pode acarretar reações adversas. Devido a isso, a busca por novas alternativas de tratamento tem sido intensa, principalmente, por compostos naturais. Sendo assim, este trabalho teve por objetivo avaliar a atividade fungistática e fungicida dos óleos essenciais do alecrim (*Rosmarinus officinalis*), alfazema (*Lavandula angustifolia*), canela (*Cinnamomum cassia*) e melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) contra os principais fungos causadores de dermatomicoses. Dessa forma, a atividade antifúngica dos óleos essenciais foi avaliada através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração fungicida mínima (CFM) frente às cepas de fungos das espécies *Trichophyton rubrum* ATCC® MYA 4438, *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale* ATCC® MYA 4439, *Candida albicans* ATCC® 14053 e *Candida parapsilosis* ATCC® 22019, além de amostras clínicas de *Fusarium* spp, *Scytalidium* spp. e *Trichophyton mentagrophytes*. Foram utilizados como medicamentos de referência fluconazol e terbinafina. Os melhores resultados obtidos foram da canela, com CIM e CFM variando de 62,5 a 125 µg/mL contra *T. mentagrophytes* ATCC e amostra clínica, CIM e CFM entre 15,62 e 31,25 µg/mL frente ao *T. rubrum* ATCC. Para as leveduras *C. albicans* ATCC e *C. parapsilosis* ATCC, a CIM e CFM variou entre 31,25 e 62,5 µg/mL. Porém, o resultado mais promissor foi contra *Fusarium* spp, que apresenta resistência à maioria dos antifúngicos, com CIM e CFM variando de 62,5 a 125 µg/mL. A alfazema e melaleuca apresentaram efeito fungicida contra as leveduras, com CIM e CFM variando de 2000 a 4000 µg/mL, frente aos dermatófitos apresentaram apenas efeito fungistático, somente contra o *T. rubrum* ATCC apresentou efeito fungicida. Já o alecrim não apresentou atividade antifúngica. E assim, concluiu-se que a canela demonstrou efeito fungicida contra todos os microrganismos avaliados, sendo mais eficiente do que os demais óleos essenciais. Palavras-chaves: Antifúngicos. Canela. Dermatófitos. Leveduras. Onicomicose.

ABSTRACT

Dermatomycoses are superficial infections of the skin, hair and nails caused by dermatophyte fungi, yeasts and non-dermatophyte filamentous fungi (NDFF), which affect people worldwide, making it one of the most common dermatological diseases. Among all, onychomycosis, which is a fungal infection, is the most prevalent. Pharmacological treatment of onychomycosis is usually prolonged, ineffective, costly and may lead to adverse reactions. Because of this, the search for new treatment alternatives has been intense, mainly, by natural compounds. The objective of this work was to evaluate the fungistatic and fungicidal activity of the essential oils of rosemary (*Rosmarinus officinalis*), lavender (*Lavandula angustifolia*), cinnamon (*Cinnamomum cassia*) and melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) against the main fungi that cause dermatomycosis. Thus, the antifungal activity of the essential oils was evaluated by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) against fungal strains of species *Trichophyton rubrum* ATCC® MYA 4438, *Trichophyton mentagrophytes* var. *Interdigital* ATCC® MYA 4439, *Candida albicans* ATCC® 14053 and *Candida parapsilosis* ATCC® 22019, In addition to clinical samples of *Fusarium* spp, *Scytalidium* spp. and *T. mentagrophytes*. Fluconazole and terbinafine were used as reference medicines. The best results were obtained from cinnamon, with MIC and MFC ranging from 62,5 to 125 µg/mL against *T. mentagrophytes* ATCC and clinical sample, MIC and MFC between 15,62 and 31,25 µg/mL against *T. rubrum* ATCC. For yeast *C. albicans* ATCC and *C. parapsilosis* ATCC, MIC and MFC ranged from 31,25 to 62,5 µg/mL. However, the most promising result was against *Fusarium* spp, which is a genus that shows resistance to most antifungal agents, with MIC and MFC ranging from 62,5 to 125 µg/mL. Lavender and melaleuca presented a fungicidal effect against yeasts, with MIC and MFC ranging from 2000 to 4000 µg/mL, whereas the dermatophytes showed only fungistatic effect, only against *T. rubrum* ATCC with MIC and MFC between 500 and 2000 µg/mL showed fungicidal effect. Rosemary did not present antifungal activity. Thus, it was concluded that cinnamon showed a fungicidal effect against all evaluated microorganisms, being more efficient than the other essential oils.

Key-words: Antifungals. Cinnamon. Dermatophytes. Yeasts. Onychomycosis.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 - Características Clínicas de Dermatofitoses.....	15
Figura 2 - Estrutura anatômica do aparelho ungueal	16
Figura 3 - Aspectos clínicos da onicomicose.....	17
Figura 4 - Alfazema (<i>Lavandula angustifolia</i>)	21
Figura 5 - Alecrim (<i>Rosmarinus officinalis</i>).....	23
Figura 6 - Casca seca do tronco da canela (<i>Cinnamomum cassia</i>)	24
Figura 7 – Melaleuca (<i>Melaleuca alternifolia</i>).....	26
Tabela 1 – Laudo técnico dos óleos essenciais	27
Figura 8 - Esquema de manutenção, cultivo e preparo do inóculo dos fungos filamentosos	29
Figura 9 - Esquema de execução da CIM dos OE com fungos filamentosos.....	30
Figura 10 - Esquema de manutenção, cultivo e preparo do inóculo das leveduras ..	32
Figura 11 - Esquema de execução da CIM dos OE com leveduras	33
Figura 12 - Esquema de execução da CIM dos medicamentos	34
Tabela 2 - CIM e CFM dos OE frente aos dermatófitos.....	36
Tabela 3 - CIM e CFM dos OE frente aos FFND.....	37
Tabela 4 - CIM e CFM dos OE frente às leveduras.....	38
Tabela 5 - CIM e CFM dos medicamentos de referência frente aos fungos.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
µg	Microgramas
µL	Microlitros
ATCC	“American Type Culture Collection” Coleção de cultura tipo americana
BDA	Batata Dextrose Ágar
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	“Clinical and Laboratory Standards Institute” Instituto de Normas Clínicas e Laboratoriais
cm	Centímetro
CMC	Concentração Micelar Crítica
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	“Deoxyribonucleic Acid” ácido desoxirribonucleico
FDA	“Food and Drug Administration” Administração de Alimentos e Drogas
FFND	Fungos filamentosos não dermatófitos
g	Gramas
m	Metro
M	Molar
mL	Mililitros
mM	Milimolar
MOPS	3 (N-morfolino) propanosulfônico
°C	Grau Célsius
OE	Óleos Essenciais
pH	Potencial hidrogeniônico
RPMI	“Roswell Park Memorial Institute” Instituto Memorial Parque Roswell
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
spp.	Espécies
UFC	Unidades formadoras de colônia
UFTM	Universidade Federal do Triângulo Mineiro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1	DERMATOMICOSSES	14
2.1.1	Classificação das onicomicoses	16
2.1.2	Etiologia	18
2.1.3	Tratamento das onicomicoses	19
2.2	ÓLEOS ESSENCIAIS	20
2.2.1	Óleo essencial da <i>Lavandula angustifolia</i> (Alfazema)	21
2.2.2	Óleo essencial da <i>Rosmarinus officinalis</i> (Alecrim)	22
2.2.3	Óleo essencial da <i>Cinnamomum cassia</i> (Canela)	24
2.2.4	Óleo essencial da <i>Melaleuca alternifolia</i> (Melaleuca)	25
3	METODOLOGIA	27
3.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	27
3.2	ÓLEOS ESSENCIAIS	27
3.3	FUNGOS	28
3.3.1	Filamentosos (Dermatófitos e FFND)	28
3.3.1.1	Manutenção, cultivo e preparo do inóculo	28
3.3.1.2	CIM (Concentração Inibitória Mínima)	29
3.3.1.3	CFM (Concentração Fungicida Mínima)	31
3.3.2	Leveduras	31
3.3.2.1	Manutenção, cultivo e preparo do inóculo	31
3.3.2.2	CIM (Concentração Inibitória Mínima)	32
3.3.2.3	CFM (Concentração Fungicida Mínima)	33
3.3.3	CIM do Fluconazol e Terbinafina	34
3.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	35
4	RESULTADOS	36
4.1	CIM E CFM OE FRENTE AOS DERMATÓFITOS	36
4.2	CIM E CFM OE FRENTE AOS FFND	37
4.3	CIM E CFM DOS OE FRENTE ÀS LEVEDURAS	37
4.4	CIM E CFM DOS MEDICAMENTOS DE REFERÊNCIA	38
5	DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	40

6	CONCLUSÃO.....	43
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

1 INTRODUÇÃO

Os fungos são conhecidos da humanidade há séculos, tanto pelos benefícios como por problemas que causam. Muitas doenças são causadas por fungos, e em humanos e animais, eles causam infecções na pele e tecidos subcutâneos. Cada tecido ou órgão do corpo humano pode ser afetado, com exceção dos dentes. Os fungos têm sido utilizados para os mais diferentes propósitos, o mais antigo deles tem sido como alimento, consumindo-os diretamente e mais tarde na produção alimentícia de pães, queijos, cervejas e vinhos. Posteriormente, foi descoberto o poder dos fungos na produção de importantes metabólitos, como a Penicilina, e estudos propiciaram a fabricação em larga escala (MOLINARO; CAPUTO; AMENDOEIRA 2009).

Dermatomicoses são infecções fúngicas superficiais da pele, cabelo e unhas que afetam mais de 20-25% das pessoas no mundo, particularmente nas regiões tropicais e subtropicais, tornando-lhes uma das doenças dermatológicas mais comuns. Estas doenças, ainda que não sejam fatais, são consideradas um problema de saúde pública, uma vez que afetam a qualidade de vida dos indivíduos. Os fungos responsáveis pela dermatomicoses incluem dermatófitos, leveduras e fungos filamentosos não dermatófitos (FFND) (SILVA et al, 2014).

A infecção da unha causada por fungos, conhecida como onicomicose, é um processo comum, numerosos estudos dos países desenvolvidos dão números de prevalência posicionados entre 2-18% da população (GARMENDIA; VIEDMA; ARZA, 2008).

O tratamento da onicomicose depende do tipo clínico, o número de unhas envolvidas e da gravidade da infecção. As desvantagens das terapias são que os tratamentos orais são muitas vezes limitados por interações medicamentosas e elevado nível de hepatotoxicidade, enquanto os antifúngicos tópicos têm uma eficácia limitada se usado sem o desbridamento da placa ungueal. Uma combinação de ambos os tratamentos tópico e sistêmico é frequentemente a melhor escolha (JAYATILAKE; TILAKARATNE; PANAGODA, 2009).

Outros tratamentos alternativos para a onicomicose incluem lasers, tais como o laser de dióxido de carbono, o laser ND: YAG e diodo 870nm, e laser de 930nm. Todos são aprovados pela FDA (Food and Drug Administration), para a melhoria da aparência estética da unha e não para cura micológica, devido à sua

natureza minimamente invasiva e os poucos números de sessões de tratamento solicitados (BRISTOW, 2014).

Atualmente há uma variabilidade maior de opções de antifúngicos, tanto tópicos quanto sistêmicos, mas o arsenal terapêutico ainda é bastante restrito, e é clara a necessidade de novos antifúngicos mais eficazes e menos tóxicos. Muitos têm o mesmo mecanismo de ação, e pertencem ao mesmo grupo de ação farmacológica, contudo, a resposta dos fungos é significativamente diferente quanto à susceptibilidade a estes medicamentos (ALMEIDA et al, 2009).

Considerando a resistência intrínseca e adquirida de algumas espécies de fungos a determinados fármacos, tornou-se evidente a necessidade de métodos de referência, devidamente padronizados e validados, para que os testes de susceptibilidade sejam amplamente utilizados na prática clínica. A terapia prolongada juntamente com a resistência a antifúngicos por alguns fungos são fatores importantes que explicam a crescente utilização destes testes, na tentativa de estabelecer uma terapia mais adequada na cura das infecções fúngicas (ATAIDES, 2010).

O elevado índice de resistência dos microrganismos aos medicamentos atuais e a busca a novas alternativas de tratamento foi um dos principais motivadores desse estudo. Da mesma forma, os diversos efeitos colaterais das drogas sistêmicas, como a hepatotoxicidade, têm sido incentivo para buscar opções de tratamento em produtos naturais de uso tópico.

Portanto, este estudo teve por objetivo avaliar, *in vitro*, a atividade antifúngica dos óleos essenciais (OE) da *Lavandula angustifolia* (Alfazema), *Rosmarinus officinalis* (Alecrim), *Cinnamomum cassia* (Canela) e *Melaleuca alternifolia* (Melaleuca) sobre cepas padrão ATCC (American Type Culture Collection) de fungos das espécies *T. rubrum* ATCC® MYA 4438, *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitales* ATCC® MYA 4439, *Candida albicans* ATCC® 14053 e *Candida parapsilosis* ATCC® 22019, e também sobre amostras clínicas de *Fusarium* sp, *Scytalidium* sp. e *T. mentagrophytes*. Determinou-se a Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Fungicida Mínima (CFM) destes óleos e de dois antifúngicos convencionais Fluconazol e Terbinafina.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 DERMATOMICOSSES

Os fungos são seres vivos eucariontes, possuem organização celular e DNA delimitado por dupla membrana envolvente. Dividem-se por mitose e apresentam células com 1µm ou mais de diâmetro, têm como constituintes celulares, mitocôndrias, aparelho de Golgi e retículo endoplasmático. Plasmídios e clorofila sempre ausente (LACAZ et al, 2002).

Segundo Wille; Arantes; Silva (2009) as dermatomicoses são doenças fúngicas que acometem a pele, unhas e cabelos de homens e animais, sendo altamente prevalentes na América Latina, pois encontram nas condições de temperatura e umidade do clima tropical, o habitat ideal para sua disseminação.

As micoses cutâneas se caracterizam por serem causadas pela invasão por fungos de toda a capa córnea da pele ou a parte queratinizada intrafolicular dos pelos ou a lâmina ungueal. O contágio ocorre através de animais, homens ou de solo infectado (ATAIDES, 2010).

As dermatofitoses ou tinhas consistem em manifestações clínicas variadas causadas por um grupo de fungos chamados dermatófitos, que produzem lesões na pele, pelos ou unhas. Os fungos dermatófitos que degradam queratina pertencem aos gêneros *Epidermophyton*, *Microsporum* e *Trichophyton*. Dentre as espécies patogênicas para o homem, 15 ocorrem no Brasil, as principais são: *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans*, *E. floccosum*, *M. canis* e *M. gypseum* (MOLINARO; CAPUTO; AMENDOEIRA 2009).

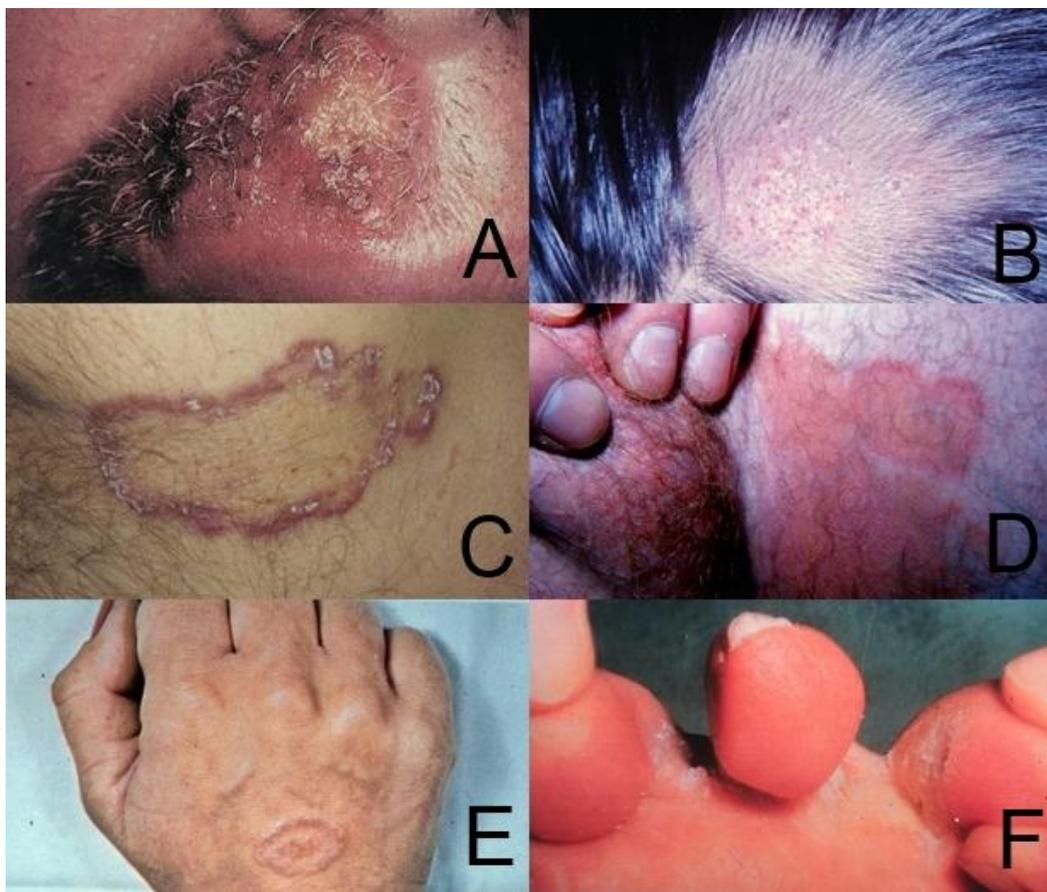
As dermatofitoses podem ser classificadas clinicamente conforme o sítio anatômico acometido, sendo o termo *tinea* ou tinha utilizado para todas as dermatofitoses. Acrescenta-se, a esse termo, a localização da infecção, assim tem-se *tinea capitis* (cabeça), *tinea corporis* (corpo), *tinea cruris* (virilha), *tinea unguium* (unha), *tinea barbae* (barba), *tinea manuum* (mão) e *tinea pedis* (pé) (FIG.1) (KAVANAGH, 2005).

As candidíases são micoses endógenas produzidas por espécies do gênero *Candida*, principalmente *C. albicans*, comprometendo isolada ou conjuntamente, mucosas, pele e unhas. São de distribuição universal e atingem todas as idades com predileção por alguns profissionais como trabalhadores

domésticos, lavadores, cozinheiros, enfermeiros (CAMPANHA; TASCA; SVIDZINSKI 2007).

Outra dermatomicose bastante prevalente é a provocada por uma variedade de fungos filamentosos não dermatófitos (FFND), que produzem lesões na pele, pelo e unhas, clinicamente semelhantes às dermatofitoses. Esta dermatomicose tem como principais agentes causadores os fungos do gênero *Scytalidium*, *Aspergillus* e *Fusarium* (CARVALHO, 2010).

Figura 1. Características Clínicas de Dermatofitoses



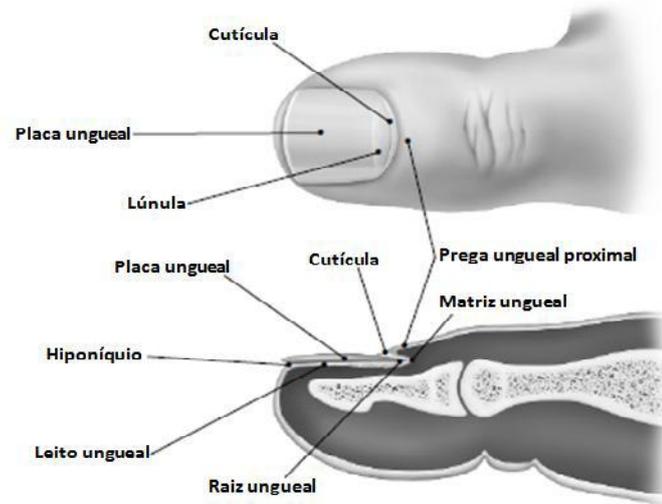
Fonte: MINS et al, 2014.

A- *tinea barbae*; B- *tinea capitis*; C- *tinea corporis*; D- *tinea cruris*; E- *tinea manuum*; F- *tinea pedis*.

A onicomicose é a micose superficial mais frequente e de mais difícil diagnóstico e tratamento, devido a fatores intrínsecos da unha (GHANNOUM; ISHAM, 2014).

A estrutura da unha é composta por placa ungueal, cutícula, lúnula, prega ungueal, matriz ungueal, hiponíquio, leito ungueal e raiz ungueal (FIG.2).

Figura 2. Estrutura anatômica do aparelho ungueal.



Fonte: Rodgers;Bassler, 2001.

As onicomicoses constituem manifestações muito frequentes na dermatologia, sendo de difícil tratamento e que ocasiona desde simples constrangimento aos pacientes a infecções localizadas ou sistêmicas, e são comuns em pacientes portadores de imunossupressão, insuficiência venosa periférica e *diabetes mellitus*. Os principais fatores de risco são idade elevada, distúrbios hormonais, traumas locais, hiperidrose e imunossupressão (REIS et al, 2010).

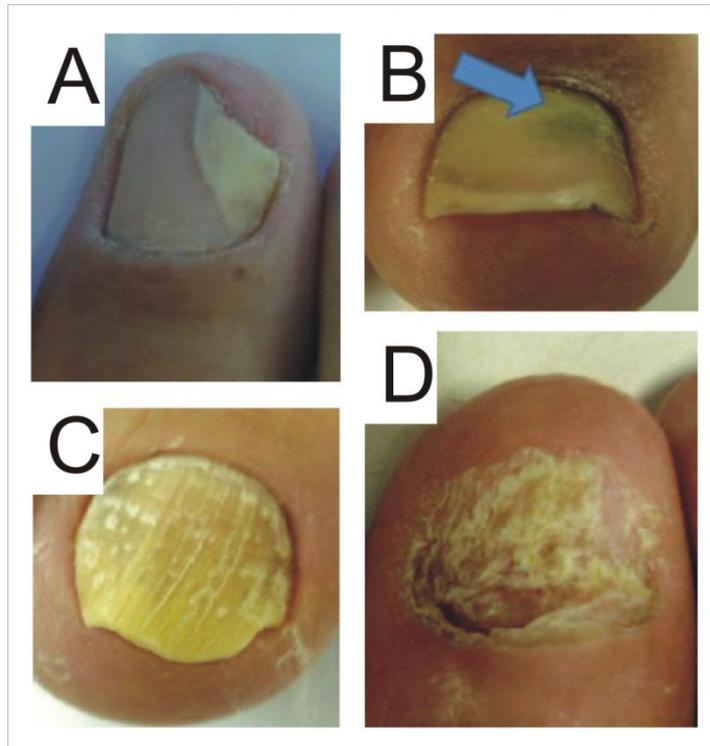
Onicomicose é uma infecção fúngica que atinge as unhas das mãos e/ou dos pés (VEER; PATWARDHAN; DAMLE, 2007), acometendo aproximadamente 5% da população mundial (KAUR; KASHYAP; BHALLA, 2008).

O termo onicomicose abrange outros patógenos além dos dermatófitos, como as leveduras do gênero *Candida* e os fungos filamentosos não dermatófitos (FFND), além de leveduras exógenas (ZAITZ, 2010).

2.1.1 Classificação das onicomicoses

As manifestações das onicomicoses podem variar de acordo com a localização da lesão, extensão do comprometimento e coloração (FIG.3).

Figura 3 – Aspectos clínicos da onicomicose.



Fonte: ATAIDES, 2010.

A- Onicomicose subungueal distal e lateral; B- Onicomicose subungueal proximal; C- Onicomicose superficial branca; D- Onicomicose distrófica total.

A onicomicose subungueal distal e lateral é a forma mais comum da infecção, o agente infectante invade o leito da unha, começando pelo hiponíquio e então migra para região proximal da unha através da matriz subjacente, ocorrendo uma hiperqueratose subungueal, causando o destacamento e coloração amarelada da unha (ATAIDES, 2010).

A onicomicose subungueal proximal é um subtipo relativamente incomum, e ocorre quando o agente infectante invade a unha pela região proximal através da área da cutícula e migra para a região distal, ocasionando uma destruição da lâmina na região proximal e podendo observar uma reação inflamatória leve (ATAIDES, 2010).

Já a onicomicose superficial branca os fungos invadem a camada superficial da lâmina da unha, caracterizada pela localização superficial do fungo no dorso da lâmina ungueal e quando a infecção progride as regiões opacas se juntam e a unha se torna áspera e mole (ATAIDES, 2010).

Essas lesões podem evoluir para a onicomicose distrófica total, que se caracteriza pela fragilização e queda de toda a lâmina ungueal, persistindo apenas alguns restos de queratina aderida ao leito ungueal (ATAIDES, 2010).

2.1.2 Etiologia

A diversidade de patógenos causadores de onicomicose e a grande variabilidade de apresentação clínica, dificulta o diagnóstico e tratamento da doença. Na etiologia da onicomicose, estão envolvidos fungos dermatófitos, leveduras e FFND. Questões climáticas, comportamentais e patológicas influenciam epidemiologicamente, e tais características conferem incidência heterogênea de patógenos (REIS et al, 2010).

A prevalência de onicomicose pode sofrer interferência de alguns fatores como o diabetes mellitus. Segundo Dogra et al (2002) existe prevalência de 17% em pessoas diabéticas, comparado com 6,8% na população normal e pessoas com o tipo 2 dessa endocrinopatia possuem risco 2,5 vezes maior de desenvolver onicomicose em comparação com pessoas normais. Outro fator que pode interferir na prevalência das onicomicoses é a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), que nesses pacientes pode variar de 15 a 40% (RAJU et al. 2005).

Dentre as 632 amostras positivas estudadas por Reis et al (2010), 36% foram fungos dermatófitos, 29% *Candida spp.* e 35% FFND. Os dermatófitos foram responsáveis por acometerem 29% no sexo masculino e 20% nas mulheres. A *Candida spp.* acometeu 12% nos homens e 20% no sexo feminino, já os FFND foram responsáveis por 17% no sexo masculino e 22% no feminino.

De todas as desordens que acometem a unha, 20% são representadas pela onicomicose (REZENDE et al, 2008). No estudo de Veer; Patwardhan; Damle (2007) é relatado que 50% de todas as infecções que acometem a unha são onicomicose. Já Araujo et al (2003) revela em seu estudo que de todas as onicopatias, 18 a 40% são onicomicoses.

Wille; Arantes; Silva (2009) relataram no estudo que fizeram com 40 pacientes com amostras positivas para onicomicose, 55% eram causadas por dermatófitos e 37,5% por leveduras do gênero *Candida spp.* e 7,5% por FFND. Dentre os dermatófitos, os agentes etiológicos mais frequentes causadores de onicomicose foram: *Tricophyton rubrum*, *Tricophyton mentagrophytes* e

Epidermophyton floccosum (ARAUJO et al 2003; MARTINS et al, 2007; REZENDE et al, 2008; WILLE; ARANTES; SILVA, 2009; REIS et al, 2010). As onicomicoses causadas por dermatófitos são responsáveis por cerca de 80 a 90% destas infecções (SEEBACHER et al, 2007). Já as leveduras do gênero *Candida spp.* as espécies mais frequentes foram: *Candida parapsilosis* e *Candida albicans* (LACAZ et al, 2002; MARTINS et al, 2007; ATAIDES, 2010).

Nas unhas das mãos em comparação com as unhas dos pés e em mulheres, a *Candida spp.* frequentemente é o agente causador de onicomicose (JAIN; SEHGAL, 2000). Isso pode ser relacionado ao fator ocupacional das pessoas afetadas, como à grande exposição à umidade, produtos químicos e microtraumas que se submetem indivíduos que desenvolvem serviços domésticos (JAYATILAKE; TILAKARATNE; PANAGODA, 2009).

Sobre os fungos filamentosos não dermatófitos (FFND), os principais agentes etiológicos causadores de onicomicose: *Scytalidium hyalinum*, *Fusarium spp.* e *Aspergillus versicolor* (LACAZ et al, 2002; ARAUJO et al, 2003; ATAIDES, 2010; CURSI et al, 2011). A prevalência de onicomicose por (FFND) pode variar de 1,45 a 22%, e sofre influência de acordo com a região geográfica estudada e os métodos diagnósticos utilizados (PALACIO et al. 2006).

2.1.3 Tratamento das onicomicoses

As onicomicoses são tratadas através de procedimentos terapêuticos tópicos e orais (LACAZ et al. 2002; GARMENDIA; VIEDMA; ARZA, 2008) e segundo Garmendia; Viedma; Arza, (2008). A cura clínica é mais provável combinando tratamento oral e tópico.

Os antifúngicos de uso oral promoveram grandes avanços ao tratamento das onicomicoses. Com o desenvolvimento de compostos do grupo das alilaminas, como a terbinafina, e dos triazóis, como itraconazol e fluconazol, melhores resultados foram observados em um menor período de duração do tratamento, levando um aumento dos índices de cura e da diminuição das recorrências (ATAIDES, 2010).

Fluconazol, itraconazol e terbinafina têm melhorado o êxito do tratamento sistêmico, produzindo uma cura micológica em mais de 90% das infecções de unha. As razões para as falhas do tratamento incluem as características clínicas da

onicomicose, como a onicomicose total, a hiperqueratose subungueal muito espessa e dermatofitoma, o que torna difícil para a droga atingir a área afetada em concentração ativa. Os FFND não respondem aos antifúngicos sistêmicos, pacientes imunodeprimidos têm um prognóstico ruim, e vários medicamentos podem alterar os níveis sanguíneos de antifúngicos (PIRACCINI; ALESSANDRINI, 2015).

Efinaconazol solução a 10% e solução tavaborole 5% são novos antifúngicos tópicos para o tratamento da onicomicose induzida por dermatófitos. Efinaconazol é uma droga promissora, aprovado pela FDA em junho de 2014. É um novo antifúngico triazol desenvolvido para o tratamento tópico de onicomicose subungueal distal e lateral leve a moderada, aplicado uma vez ao dia, sem o desbridamento da unha. As taxas de cura são comparáveis às observadas com itraconazol oral. Um estudo recente avaliou a eficácia desta solução em 1655 pacientes com onicomicose por um período de 52 semanas, encontrando que efinaconazol foi mais eficaz no tratamento da fase inicial da doença. A penetração de um antifúngico tópico através da placa ungueal requer um veículo que é especificamente formulado para entrega transungueal. A penetração ungueal pobre limita o uso de antifúngicos tópicos, e recaídas e re-infecções são comuns, ocorrendo em pelo menos 20% a 25% dos pacientes. A duração do tratamento é de 6-12 meses (JOYATILAKE et al. 2009).

Os principais medicamentos tópicos utilizados são ciclopirox e amorolfina (GUPTA; KOHLI, 2003).

O laser de dióxido de carbono é o laser mais antigo e é usado raramente hoje graças ao advento de lasers menos invasivos. Com a ND: YAG, pequenos ensaios clínicos têm demonstrado taxas de cura micológica tão elevada como 87,5% (BRISTOW, 2014).

2.2 ÓLEOS ESSENCIAIS

Óleos essenciais são produtos voláteis de origem vegetal obtidos por processo de destilação por arraste com vapor de água, destilação por pressão reduzida ou outro método. Eles podem se apresentar isoladamente ou misturados entre si, retificados, desterpenados ou concentrados. Óleos essenciais retificados são aqueles produtos que tenham sido submetidos ao processo de destilação fracionada para concentrar determinados componentes; já os desterpenados, são

aqueles que tenham sido submetidos ao processo que objetiva eliminar os terpenos e sesquiterpenos, com o que se melhoram tanto a solubilidade como a estabilidade do material (desterpenação). Os óleos essenciais concentrados, por sua vez, são os que tenham sido parcialmente desterpenados (BRASIL, 1999).

A parte do vegetal em que o óleo essencial é encontrado depende da espécie e, embora todos os órgãos de uma planta possam acumular óleos essenciais, sua composição pode variar segundo sua localização na estrutura do vegetal (SIMOES et al, 1999).

Além da parte da planta utilizada, outros fatores que podem influenciar diretamente a composição, a quantidade extraída e a qualidade dos extratos vegetais e óleos essenciais é o método de extração, solo e região geográfica de cultivo (BRITO, 2008).

2.2.1 Óleo essencial da *Lavandula angustifolia* (Alfazema)

A alfazema *Lavandula angustifolia* da Família *Lamiaceae*, (FIG.4) conhecida como alfazema, é um arbusto que ocorre em altitude de até 1500m, sendo encontrada em toda a região do Mediterrâneo. É uma importante espécie medicinal e aromática, utilizada principalmente na extração de óleo essencial. Cultivada em várias regiões de clima temperado do mundo todo, seu grande potencial está na produção de óleo essencial (MOON; WILKINSON; CAVANAGH, 2006), que pode ser extraído de suas folhas ou flores, sendo empregado nas indústrias cosmética, alimentícia, farmacêutica e de perfumaria (TSURO; KODA; INOUE, 2000).

Figura 4 – Alfazema (*Lavandula angustifolia*)



Fonte: SILVA, 2008

O OE da *L. angustifolia* é composto por mais de 100 componentes, principalmente terpenóides, e apresenta alto teor a partir da hidrodestilação das inflorescências, apresentando como compostos majoritários o linalol e o acetato de linalila. Das duas colheitas realizadas os constituintes majoritários do óleo foram linalol (46,88% e 37,25%) e acetato de linalila (10,09% e 12,24%) (MACHADO et al, 2013).

Na Índia o OE de *L. angustifolia* apresentou maior teor de acetato de linalila (47,56%) e menor teor de linalol (28,06%) (VERMA et al, 2010).

A atividade antifúngica do OE da *L. angustifolia*, especialmente contra *Candida albicans*, foi relatada por D' Auria (2005), sendo que em 900 µg/mL, inibiu a formação de tubos germinativos da levedura, reduzindo a progressão da infecção.

No estudo de Adam et al (1998), o óleo essencial da *L. angustifolia* foi testado contra *Malassezia furfur*, *Trichophyton rubrum* e *Trichosporon beigeli*, apresentando-se inativo apenas contra *M. furfur*.

Em outro estudo, com as concentrações variando de 100 a 10%, o OE de *L. angustifolia*, em elevadas concentrações demonstraram efeitos fungicidas contra *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* e em concentrações mais baixas apresentaram apenas efeito fungistático, ou seja, não eliminou o agente, apenas impediu seu crescimento (CASSELLA; CASSELA; SMITH, 2002).

Shin, (2003), demonstrou atividade antifúngica do óleo essencial de *L. angustifolia* contra o *Aspergillus flavus* e *A. niger*.

2.2.2 Óleo essencial do *Rosmarinus officinalis* (Alecrim)

O *Rosmarinus officinalis*, conhecido popularmente como alecrim-de-cheiro, alecrim-das-hortas, alecrim-comum, alecrim verdadeiro e rosmarinho é uma planta encontrada na Região Mediterrânea e é cultivado em todo o território brasileiro, sendo muito utilizado para consumo (FREIRE et al, 2012).

A planta (FIG.5) possui porte subarborescente lenhoso, ereto e pouco ramificado de até 1,5 m de altura. Folhas são lineares, coriáceas e muito aromáticas, medindo 1,5 a 4 cm de comprimento por 1 a 3mm de espessura. Flores azulado-claras, pequenas e de aroma forte e muito agradável (PENTEADO; CECY, 2011).

Figura 5 – Alecrim (*Rosmarinus officinalis*)



Fonte: VALERIO; PINHEIRO, 2008.

O OE do *Rosmarinus officinalis* é composto principalmente por 19,4% de 1,8-cineol, 12,7% de cânfora e 9,1% de l-borneol (SHIN, 2003).

Com base nos resultados apresentados no trabalho de DELIC et al, (2013), pode-se concluir que o OE de *R. officinalis* tem o potencial para representar uma boa alternativa para o tratamento de candidíase. Este estudo confirmou que o óleo analisado mostrou tanto atividade fungistática contra cepas de *Candida albicans* testadas.

O mesmo foi demonstrado em outro estudo, que o OE de alecrim, contendo cânfora, 1,8-cineol e verbenona como principais constituintes apresentou atividade fungicida e fungistática *in vitro* em leveduras do gênero *Candida* (CLEFF et al, 2012).

Um trabalho que foi dedicado ao estudo da atividade antifúngica do óleo essencial de alecrim na germinação, crescimento micelial e esporulação de dermatófitos, teve atividade inibitória sobre a germinação de todos os dermatófitos testados em concentrações variando desde 0,001 a 4%. De acordo com a sua sensibilidade, os dermatófitos estudados podem ser classificados de acordo com a seguinte ordem decrescente: *M. gypseum*, *M. nanum*, *M. canis*, *T. mentagrophytes*, *T. concentricum*, *T. rubrum*, *T. schoenleinii*, *E. floccosum* (OURAINI et al, 2005).

2.2.3 Óleo essencial da *Cinnamomum cassia* (Canela)

A *Cinnamomum cassia* é uma planta da família das *Lauraceae*. O gênero *Cinnamomum* compreende aproximadamente mais outras 250 espécies e os óleos aromáticos estão presentes nas folhas e na casca. A especiaria é obtida da parte interna da casca do tronco, sendo a casca seca (FIG.6) (ZANARDO; RAMBO; SCHWANKE, 2014).

A canela cássia é uma árvore que cresce de 10 a 15 m de altura, com casca acinzentada e folhas de 10 a 15 cm de comprimento e tem uma cor avermelhada quando jovens. Sua casca seca é utilizada como especiaria. É usada na medicina chinesa tradicional, onde é considerada uma das 50 ervas fundamentais. Seu nome científico, "cinnamomum", segundo referências, é derivado da palavra indonésia "kayu manis", que significa "madeira doce". Mais tarde, recebeu o nome hebreu "quinnamon", que evoluiu para o grego "kinnamon" (PHILIPPI; MORETTO, 1995).

Figura 6 – Casca seca do tronco da canela (*Cinnamomum cassia*)



Fonte: SALOMON, 2016.

Abdelwahab et al (2014) relataram que o óleo essencial oriundo das plantas desse gênero pode conter cinamaldeído, linalol, cânfora, 4-terpineol, 1,8- 53

cineol, eugenol, safrol, muruleno, α -cadinol, D-germacreno, α -terpineol, α -cadieno, 1,6-octadien-3-ol-3,7-dimetil e dietanoato de 1-fenilpropano-2,2-diol.

O óleo essencial de *C. cassia* nas concentrações que variaram de 64 a 128 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram atividade antifúngica sobre cepas de *C. albicans* isoladas de pacientes HIV positivos e cepa padrão (ATCC 76845) (ALMEIDA, et al, 2012).

Cavalcanti et al (2011) obtiveram atividade fungistática do OE de canela cássia na concentração de 560 $\mu\text{g/mL}$ sobre cepa de *Candida albicans* (ATCC 289065).

Outro estudo demonstrou efeito antifúngico do óleo da canela frente a *A. niger*, *A. flavus* e *A. fumigatus* com CIM de 80 $\mu\text{g/mL}$ (CARMO et al, 2008).

Estudos mostraram que as plantas pertencentes a esse gênero possuem ação antifúngica e que essa ação pode ser atribuída a seu constituinte majoritário, o cinamaldeído (TEJESWINI et al., 2014).

2.2.4 Óleo essencial da *Melaleuca alternifolia* (Melaleuca)

Melaleuca alternifolia, conhecida como “Tea Tree”, pertence à família da *Myrtaceae*. É uma árvore pequena, apresentando no máximo 7 metros de altura. Possui casca fina, semelhante à folha de papel, e folhas afiladas (FIG.7) É nativa da costa sudeste da Austrália, região de New South Wales, e cresce em regiões pantanosas ou próximas a rios (VIEIRA, 2002).

Ela é também chamada de árvore do chá (do inglês Tea Tree), nome que foi estabelecido por conta de suas folhas, uma vez que estas eram utilizadas para preparar um chá aromático. As propriedades de cura das folhas da árvore do chá já eram bem conhecidas dos australianos aborígenes ao norte de Nova Gales do Sul na Austrália. As folhas eram maceradas em água durante longos períodos (horas ou até mesmo dias) e depois empregadas para o tratamento de resfriado comum, dor de garganta, picadas de insetos, feridas ou infecções fúngicas da pele (SALLER et al., 1998)

Figura 7 – Melaleuca (*Melaleuca alternifolia*)



A) Plantação de *Melaleuca alternifolia* B) Partes aéreas picadas
Fonte: OLIVEIRA et al, 2015.

Existem cerca de 100 componentes no óleo essencial da melaleuca. Alguns dos componentes principais terpinen-4-ol, γ -terpineno e α -terpineno correspondem cerca de 70 % da composição total do óleo, enquanto p-cimeno, terpinoleno, α -terpineol e α -pineno representam apenas 15 % do total do óleo, sendo o restante os compostos em menor porcentagem (HAMMER; CARSON; RILEY, 2003).

Segundo o estudo de Cavalcanti; Almeida; Padilha (2011) verificou-se atividade antifúngica do óleo essencial de *M. alternifolia* em concentrações inferiores a 1%, sobre cepas ATCC de *C. albicans*, *C. krusei* e *C. tropicalis* o que indica forte potencial antimicrobiano.

3 METODOLOGIA

3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para a determinação dos efeitos fungistáticos e fungicidas dos óleos essenciais foram utilizadas cepas ATCC de fungos das espécies *T. rubrum*, *T. mentagrophytes var. interdigitale*, *C. albicans*, *C. parapsilosis*, e cepas de amostras clínicas de *Fusarium spp.*, *Scytalidium spp.* e *T. mentagrophytes*. Neste sentido, estas cepas foram desafiadas frente aos óleos de alfazema, alecrim, canela e melaleuca. A determinação da CIM e CFM ocorreu de forma individual para cada microrganismo e óleo vegetal. Como parâmetro referencial foram utilizados grupos de controle e de dois antifúngicos (fluconazol e terbinafina).

3.2 ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais foram adquiridos comercialmente da empresa Ferquima Indústria e Comércio de Óleos Essenciais LTDA, situada na cidade de Vargem Grande Paulista-SP, que forneceu um laudo (TAB.1) com especificações técnicas. Os óleos foram solubilizados em Tween 80. A Concentração Micelar Crítica (CMC) do Tween 80 é de 0,06 mM ($\cong 0,015$ g/mL) e a densidade é 1,07 g/mL. Levando esses dados em consideração, para solubilizar 1mL de óleo essencial foram necessários 14 μ L de Tween.

Tabela 1 – Laudo técnico dos óleos essenciais

	Características dos óleos essenciais			
	Alecrim	Alfazema	Canela	Melaleuca
Aparência	Líquido	Líquido Límpido	Líquido	Líquido Límpido
Cor	Amarelo Palha	Amarelo Claro	Marrom	Amarelo Palha
Impurezas	Isento	Isento	Isento	Isento
Odor	Característico	Característico	Característico	Característico
Densidade (20°C)	0,920	0,885	1,056	0,897
Índice de Refração (20°C)	1,468	1,461	1,612	1,478
Principais Componentes	1,8 cineol 45%; Cânfora 15%; Alfa pineno 13%; Beta pineno 6%; Limoneno 2%	Linalol 33%; Acetato de linalila 38%	Aldeído cinâmico 81%; Cumarina 3%; Benzaldeído 3%; Álcool cinâmico 3%; Estireno 3%	Terpinen-4-ol 42%; Gamma terpinene 22%; Alpha terpinene 10%; Cineol 1,5%
Extração	Destilação a vapor das folhas	Destilação a vapor das flores	Destilação a vapor das folhas	Destilação a vapor das folhas

Fonte: FERQUIMA, 2016.

3.3 FUNGOS

3.3.1 Filamentosos (Dermatófitos e FFND):

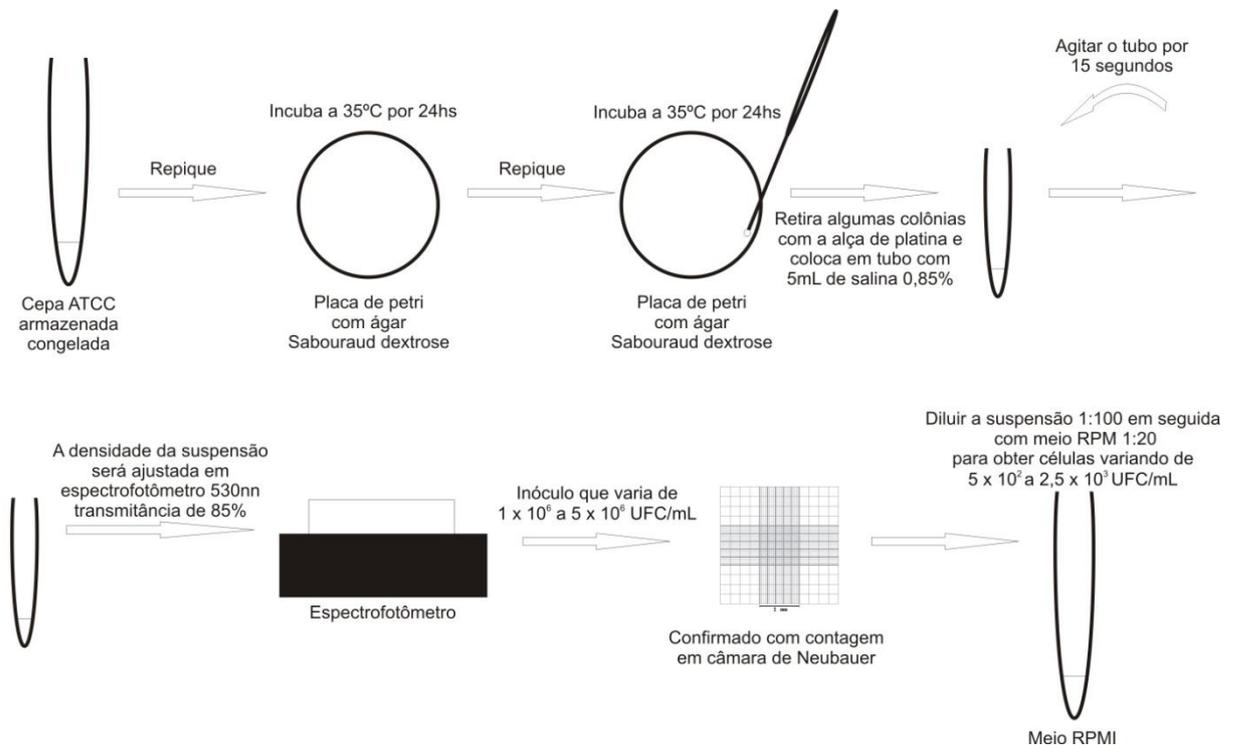
Foram utilizadas cepas ATCC de fungos dermatófitos das espécies *Trichophyton rubrum* ATCC® MYA 4438 e *Trichophyton mentagrophytes var. interdigitales* ATCC® MYA 4439, e amostras clínicas de *Trichophyton mentagrophytes*, E amostras clínicas de fungos filamentosos não dermatófitos das espécies *Scytalidium spp.* e *Fusarium sp.* Os fungos de amostras clínicas foram obtidos em outro trabalho (SILVA et al, 2014), após aprovação pelo comitê de ética da UFTM (protocolo 1361/2010).

3.3.1.1 Manutenção, cultivo e preparo do inóculo

Foram utilizadas cepas que estavam armazenadas em solução fisiológica de 2 a 7°C, após serem subcultivadas em placas com ágar Sabouraud e incubadas por 4 dias a 28°C. Em seguida foram subcultivadas novamente para um tubo tipo Falcon de 50mL com ágar batata dextrose (BDA) e incubadas por 4 dias a 28°C para a produção de conídias. As colônias de fungos foram cobertas com 5 mL de salina estéril (0,9%) e posteriormente raspadas com o auxílio de uma pipeta Pasteur.

A mistura resultante de microconídias e fragmentos de hifas foi filtrada em gaze e a densidade da suspensão foi ajustada em espectrofotômetro ao comprimento de onda de 520nm para uma transmitância de 70 a 72% (FIG.8). Este procedimento gerou um inóculo que varia de 2×10^6 a 4×10^6 UFC/mL, sendo esse valor confirmado pelo plaqueamento de 0,01 mL da suspensão em BDA e posterior contagem das colônias de fungo após incubação das placas por 7 a 10 dias a 28°C. A suspensão do inóculo foi diluída (1:50) em meio RPMI para se obter um número de células variando de 4×10^4 a 8×10^4 UFC/mL.

Figura 8 – Esquema de manutenção, cultivo e preparo do inóculo dos fungos filamentosos



Fonte: Do Autor, 2016.

3.3.1.2 CIM (Concentração Inibitória Mínima)

Foi preparada uma solução estoque 1 de cada óleo essencial, solubilizada em Tween 80, na concentração de 80000 $\mu\text{g/mL}$. Para determinação da CIM, preparou-se uma solução estoque 2 a partir da estoque 1, através de uma diluição de 1/5 em meio padrão RPMI 1640 (pH 7,0) tamponado com 0,165 M de ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS) (34,54g por litro) dos OE da Alfazema, Alecrim e Melaleuca e de 1/20 da Canela, ficando assim as concentrações respectivamente, 16000 $\mu\text{g/mL}$ e 4000 $\mu\text{g/mL}$. Constatamos que essa diferença de concentração inicial se fez necessária, devido aos testes pilotos que foram feitos que mostraram uma melhor eficiência da canela frente aos demais óleos.

Placas de microdiluição de fundo chato (96 poços) foram preparadas de acordo com o método de referência CLSI (M38-A2, 2008), com modificações. Resumidamente, foram adicionados 100 μL de meio padrão RPMI 1640 em cada um dos poços da placa, com exceção da coluna 1 da placa, pois nela foram adicionados 200 μL da solução estoque 2 (óleo essencial + RPMI). Em seguida, 100 μL do

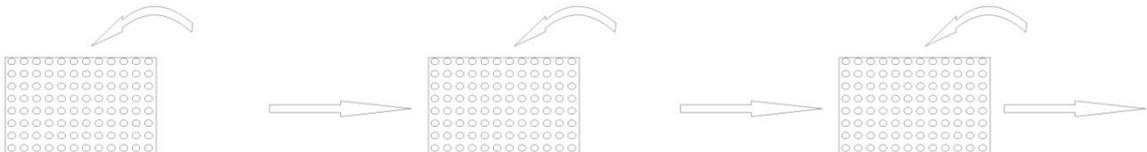
conteúdo dos poços da coluna 1 da placa, nas concentrações de 4000 µg/mL para Canela e 16000 µg/mL para os demais óleos, foram retirados e adicionados nos poços seguintes de cada coluna, a partir dos quais foram realizadas diluições seriadas na razão de dois, por meio da transferência de 100µL da solução para o poço seguinte. Esse procedimento foi feito até os poços da coluna 10 da placa, quando 100µL da solução foram descartados. Por fim, foram adicionados 100µL da suspensão do inóculo diluída (1:50) aos poços contendo os óleos essenciais. Para cada placa teste, foram incluídos ainda três controles: um apenas com 200µL de meio (controle de esterilidade) coluna 12; outro com 100µL de meio e 100µL da suspensão do inóculo (controle de crescimento) coluna 11; e o último com 100µL de meio acrescido de Tween 80 nas mesmas concentrações daquelas presentes nos óleos essenciais, mais 100µL da suspensão do inóculo (controle do solvente) na linha H da placa. Após a adição do inóculo, todas as concentrações foram reduzidas pela metade, obtendo assim, uma concentração variando de 2000 µg/mL a 3,90 µg/mL para Canela e uma variação de 8000 µg/mL a 15,62 µg/mL para os demais OE. As placas de microdiluição foram incubadas a 28°C e lidas visualmente após 4 dias de incubação (FIG.9). Todos os testes foram realizados em triplicata e repetidos em 3 experimentos independentes.

Figura 9 – Esquema de execução da CIM dos OE com fungos filamentosos

Foram adicionados 100µL de RPMI em cada um dos poços da placa, com exceção da coluna 1 da placa, pois nela foram adicionados 200µL da solução estoque 2 (óleo essencial + RPMI).

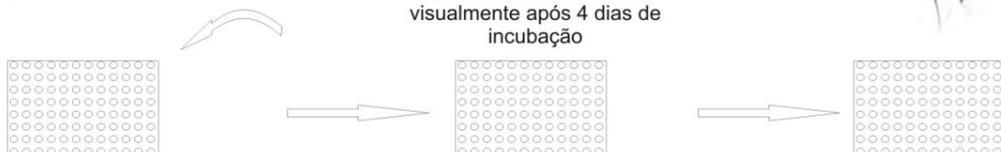
100µL do conteúdo dos poços da coluna 1 da placa, foram retirados e adicionados nos poços seguintes de cada coluna, a partir dos quais foram realizadas diluições seriadas na razão de dois.

Por fim, foram adicionados 100µL da suspensão do inóculo diluída (1:50) aos poços contendo os óleos essenciais



Para cada placa teste, foram incluídos ainda três controles: um apenas com 200µL de meio; outro com 100µL de meio e 100µL da suspensão do inóculo; e o último com 100µL de meio acrescido de Tween 80 nas mesmas concentrações daquelas presentes nos óleos essenciais, mais 100µL da suspensão do inóculo

As placas de microdiluição foram incubadas a 28°C e lidas visualmente após 4 dias de incubação



Fonte: Do Autor, 2016.

3.3.1.3 CFM (Concentração Fungicida Mínima)

A CFM dos óleos essenciais foi determinada por meio do sub-cultivo, em placas de petri 90x15mm lisa com ágar batata dextrose, de 25µL do conteúdo dos poços onde não houve crescimento dos fungos (CIM), dos 2 poços seguintes de maior concentração e dos poços do controle de crescimento. Após semeadura com auxílio de uma alça de Drigalski, as placas foram incubadas por 4 dias a 28°C, quando foi feita a determinação da CFM como a menor concentração de óleo que inibiu qualquer crescimento fúngico nas sub-culturas.

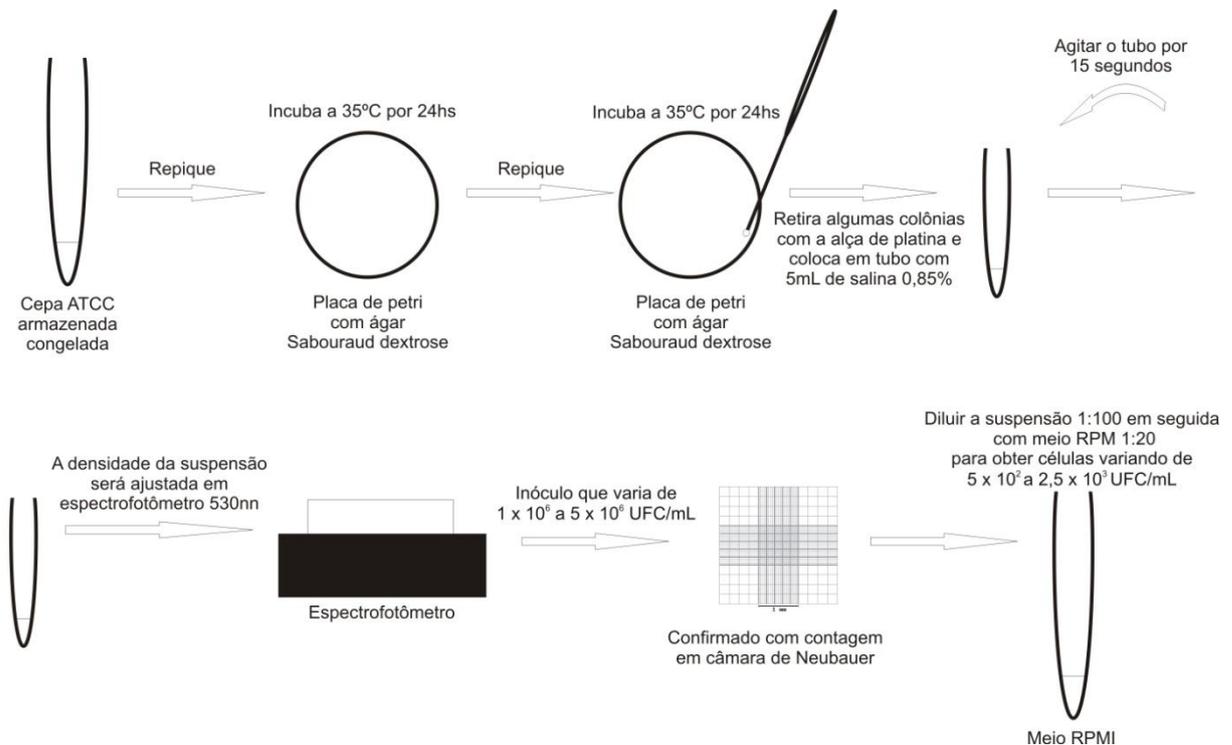
3.3.2 Leveduras:

Foi utilizada cepa ATCC das leveduras da espécie *Candida albicans* ATCC® 14053 e *Candida parapsilosis* ATCC® 22019.

3.3.2.1 Manutenção, cultivo e preparo do inóculo

Foram utilizadas cepas ATCC que estavam armazenadas a -20°C. Foram preparadas de acordo com o método de referência CLSI (M27-A3, 2008) com modificações, e sendo repicadas para uma placa com ágar Sabouraud dextrose e incubadas por 24hs a 35°C. Posteriormente foram repicadas novamente para uma placa com ágar Sabouraud dextrose e incubadas por 24hs a 35°C. Com uma alça de platina, retiram-se algumas colônias que foram colocadas em um tubo de ensaio com 5 mL de salina estéril (0,9%) e agitadas por 15 segundos. A densidade da suspensão resultante foi ajustada em espectrofotômetro ao comprimento de onda de 530 nm para uma transmitância de 85%. Este procedimento gerou um inóculo que varia de 1×10^6 a 5×10^6 UFC/mL que foi confirmada em contagem na câmara de Neubauer (FIG.10). A suspensão do inóculo foi diluída (1:100) em salina estéril (0,9%) seguida de uma diluição (1:20) em meio RPMI para se obter um número de células variando de 5×10^2 a $2,5 \times 10^3$ UFC/mL.

Figura 10 – Esquema de manutenção, cultivo e preparo do inóculo das leveduras



Fonte: Do Autor, 2016.

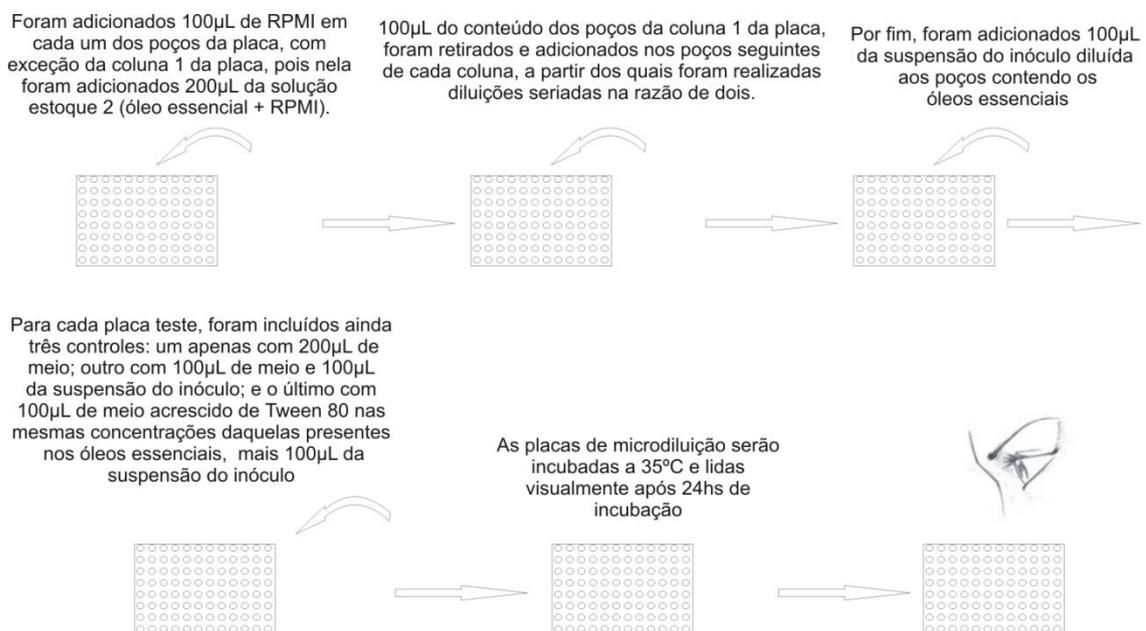
3.3.2.2 CIM (Concentração Inibitória Mínima)

Para determinação da CIM, preparou-se uma solução estoque 2 a partir da estoque 1 (mesma utilizada para os dermatófitos), através de uma diluição de 1/5 em meio padrão RPMI 1640 (pH 7,0) tamponado com 0,165 M de ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS) (34,54g por litro) dos OE da Alfazema, Alecrim e Melaleuca e de 1/20 da Canela, ficando assim as concentrações respectivamente, 16000 µg/mL e 4000 µg/mL.

Placas de microdiluição de fundo chato (96 poços) foram preparadas de acordo com o método de referência CLSI (M27-A3, 2008), com modificações. Resumidamente, foram adicionados 100µL de meio padrão RPMI 1640 em cada um dos poços da placa, com exceção da coluna 1 da placa, pois nela foram adicionados 200µL da solução estoque 2 (óleo essencial + RPMI). Em seguida, 100µL do conteúdo dos poços da coluna 1 da placa, nas concentrações de 4000 µg/mL para Canela e 16000 µg/mL para os demais óleos, foram retirados e adicionados nos poços seguintes de cada coluna, a partir dos quais foram realizadas diluições

seriadas na razão de dois, por meio da transferência de 100µL da solução para o poço seguinte. Esse procedimento foi feito até os poços da coluna 10 da placa, quando 100µL da solução foram descartados. Por fim, foram adicionados 100µL da suspensão do inóculo diluída (1:100 e 1:20) aos poços contendo os óleos essenciais. Para cada placa teste, foram incluídos ainda três controles: um apenas com 200µL de meio (controle de esterilidade) coluna 12; outro com 100µL de meio e 100µL da suspensão do inóculo (controle de crescimento) coluna 11; e o último com 100µL de meio acrescido de Tween 80 nas mesmas concentrações daquelas presentes nos óleos essenciais, mais 100µL da suspensão do inóculo (controle do solvente) na linha H da placa. Após a adição do inóculo, todas as concentrações foram reduzidas pela metade, obtendo assim, uma concentração variando de 2000 µg/mL a 3,90 µg/mL para Canela e uma variação de 8000 µg/mL a 15,62 µg/mL para os demais OE. As placas de microdiluição foram incubadas a 35°C e lidas visualmente após 24hs de incubação (FIG.11).

Figura 11 – Esquema de execução da CIM dos OE com leveduras



Fonte: Do Autor, 2016.

3.3.2.3 CFM (Concentração Fungicida Mínima)

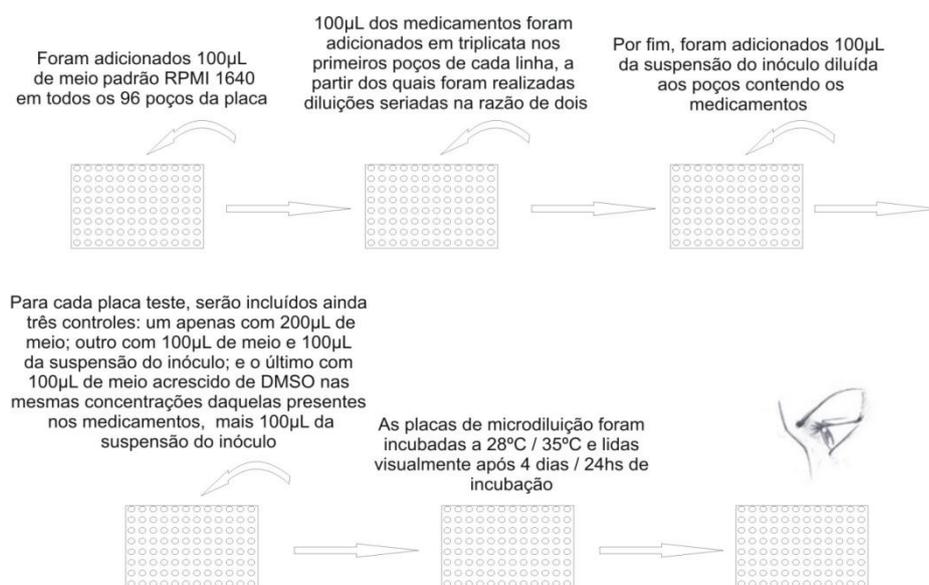
A CFM dos óleos essenciais foi determinada por meio do sub-cultivo, em placas de petri 90x15mm lisa com ágar Sabouraud dextrose, de 25µL do conteúdo dos poços onde não houve crescimento dos fungos (CIM), dos 2 poços seguintes de

maior concentração e dos poços do controle de crescimento. Após semeadura com auxílio de uma alça de Drigalski, as placas foram incubadas por 24hs a 35°C, quando foi feita a determinação da CFM como a menor concentração de óleo que inibiu qualquer crescimento fúngico nas sub-culturas.

3.3.3 CIM do Fluconazol e Terbinafina

O Fluconazol e a Terbinafina foram utilizados como medicamentos de referência nos testes com os fungos. Todo o procedimento foi igual ao utilizado para os OE, diferindo apenas na variação das concentrações finais testadas, que para o Fluconazol variou de 64 a 0,125µg/mL e a Terbinafina de 16 a 0,031µg/mL (FIG.12). E foi executado de acordo com os métodos de referência CLSI (M38-A2, 2008) e CLSI (M27-A3, 2008), com modificações. A CIM para o Fluconazol foi definida como a menor concentração que causou uma proeminente queda no crescimento dos fungos, correspondente a aproximadamente 50% do controle do crescimento, e para a Terbinafina foi definida como a menor concentração que inibiu 100% o crescimento dos fungos, após 4 dias a 28°C para os dermatófitos e filamentosos não dermatófitos e após 24hs a 35°C para leveduras.

Figura 12 – Esquema de execução da CIM dos medicamentos



Fonte: Do Autor, 2016.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada através do programa “Instat e Prisma” da Graphpad (<http://www.graphpad.com>). Em todas as variáveis foram testadas a distribuição normal (Kolmogorov-Smirnov com Dallal-Wilkinson-Liliefors P value) e a variância homogênea (Teste de *Bartlett's* ou Teste F). Foram utilizados testes não paramétricos, Mann-Whitney para avaliação entre 2 grupos, ou Kruskal-Wallis com comparação múltipla de Dunn's para 3 grupos ou mais. As diferenças observadas foram consideradas significantes quando $p < 0,05$ (5%) (ARANGO, 2001).

4 RESULTADOS

4.1 CIM E CFM DOS OE FRENTE AOS DERMATÓFITOS

Os dados (TAB.2) mostraram que a canela nesta avaliação, como no anterior, foi a mais eficiente dos óleos ($p < 0,05$), destacando que com *T. rubrum* ATCC MYA 4438 conseguiu efetividade numa menor concentração que para os demais. Já a alfazema e melaleuca obtiveram resultados, nessa avaliação, piores do que com as leveduras, com exceção também para o *T. rubrum*, que alcançou concentrações um pouco menores. Para o alecrim conseguiu-se resultados iguais ao teste anterior, sendo o menos eficaz dentre todos os óleos.

Para *T. mentagrophytes* ATCC o valor médio da CIM da canela foi de 62,5 µg/mL e CFM de 125 µg/mL. Para a alfazema e melaleuca, o valor médio da CIM foi de 8000 µg/mL e CFM >8000 µg/mL, sendo que para o alecrim a CIM >8000 µg/mL e a CFM não foi possível determinar.

A avaliação com *T. mentagrophytes* amostra clínica a canela teve média para CIM de 62,5 µg/mL e CFM de 125 µg/mL. Os demais óleos obtiveram os mesmos valores da cepa ATCC.

O *T. rubrum* ATCC teve resultados com valor médio da CIM de 15,62 µg/mL e CFM 31,25 µg/mL para a canela, e CIM de 500 µg/mL e CFM de 2000 µg/mL para alfazema e melaleuca, e o alecrim repetindo o valor >8000 µg/mL.

Tabela 2 – CIM e CFM dos OE frente aos dermatófitos

Filamentosos Dermatófitos						
Óleo Essencial	<i>T. mentagrophytes</i> Amostra Clínica		<i>T. mentagrophytes</i> ATCC MYA 4439		<i>T. rubrum</i> ATCC MYA 4438	
	CIM (µg/mL)	CFM (µg/mL)	CIM (µg/mL)	CFM (µg/mL)	CIM (µg/mL)	CFM (µg/mL)
Canela	62,5	125	62,5	125	15,62	31,25
Alfazema	8000	>8000	8000	>8000	500	2000
Melaleuca	8000	>8000	8000	>8000	500	2000
Alecrim	>8000	*	>8000	*	>8000	*

Resultados do valor da CIM e CFM expressos em µg/mL

*A CFM não foi realizada, pois a CIM foi maior que a concentração máxima testada.

Após a análise dos resultados, pode-se verificar que o óleo essencial da canela frente aos fungos dermatófitos foi o que apresentou melhor desempenho *in vitro*. Demonstrou efeito fungicida contra todos os fungos, sendo que a alfazema e a melaleuca apresentaram apenas efeito fungistático possível de determinar dentro do experimento. E dentre todos os dermatófitos avaliados, o *T. rubrum* ATCC foi a espécie mais sensível ao efeito da canela.

4.2 CIM E CFM DOS OE FRENTE AOS FFND

A observação dos dados (TAB.3) mostra-nos que, para essas espécies de fungos a canela também se destacou, obtendo os melhores resultados ($p < 0,05$). Porém nessa análise todos os demais óleos não conseguiram efetividade alguma na concentração máxima testada. Com a canela conseguiu-se valor médio da CIM de 62,5 $\mu\text{g/mL}$ e CFM de 125 $\mu\text{g/mL}$ contra o *Fusarium spp.* a alfazema, melaleuca e alecrim obtiveram CIM $>8000 \mu\text{g/mL}$. Contra o *Scytalidium spp* a canela obteve CIM e CFM de 62,5 $\mu\text{g/mL}$, os demais óleos tiveram CIM $>8000 \mu\text{g/mL}$.

Tabela 3 – CIM e CFM dos OE frente aos FFND

Óleo Essencial	Filamentosos Não Dermatófitos			
	<i>Fusarium sp.</i> Amostra Clínica		<i>Scytalidium sp.</i> Amostra Clínica	
	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CFM ($\mu\text{g/mL}$)	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CFM ($\mu\text{g/mL}$)
Canela	62,5	125	62,5	62,5
Alfazema	>8000	*	>8000	*
Melaleuca	>8000	*	>8000	*
Alecrim	>8000	*	>8000	*

Resultados do valor da CIM e CFM expressos em $\mu\text{g/mL}$

* A CFM não foi realizada, pois a CIM foi maior que a concentração máxima testada.

Na avaliação realizada com os FFND, a canela foi o único OE que obteve efeito fungicida possível de ser determinado com o experimento.

4.3 CIM E CFM DOS OE FRENTE ÀS LEVEDURAS

A análise dos dados (TAB.4) permite verificar que a canela foi mais eficaz dentre os óleos avaliados ($p < 0,05$), sendo efetiva contra as duas espécies testadas,

com melhor resultado sobre a *C. parapsilosis*. A alfazema e a melaleuca obtiveram inibições semelhantes, dentre os demais óleos, alcançaram eficiência mediana. O alecrim foi o que teve pior resultado, não inibiu nenhuma das espécies na concentração máxima testada. O destaque foi da canela que, para *C. albicans* apresentou valor médio da CIM e CFM de 62,5 µg/mL, já a alfazema e melaleuca apresentaram CIM e CFM de 2000 µg/mL, e o alecrim CIM >8000 µg/mL.

A *C. parapsilosis* foi a levedura que apresentou maior sensibilidade ao efeito da canela, com CIM e CFM de 31,5 µg/mL.

Tabela 4 – CIM e CFM dos OE frente às leveduras

Óleo Essencial	Leveduras			
	<i>C. albicans</i> ATCC 14053		<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	
	CIM (µg/mL)	CFM (µg/mL)	CIM (µg/mL)	CFM (µg/mL)
Canela	62,5	62,5	31,5	31,5
Alfazema	2000	2000	2000	4000
Melaleuca	2000	2000	4000	4000
Alecrim	>8000	*	>8000	*

Resultados do valor da CIM e CFM expressos em µg/mL

* A CFM não foi realizada, pois a CIM foi maior que a concentração máxima testada.

A análise dos resultados dos OE contra as leveduras demonstraram que todos, com exceção do alecrim, apresentaram efeito fungicida possível de ser determinado através do experimento.

4.4 CIM E CFM DOS MEDICAMENTOS DE REFERÊNCIA

A análise (TAB.5) revelou a viabilidade das cepas utilizadas no experimento, pois alcançaram a resposta esperada aos fármacos segundo estabelece o CLSI. A sensibilidade ao fluconazol das cepas ATCC das leveduras, que segundo o CLSI (2008), valores de CIM obtidos $\leq 8,0$ µg/mL demonstram que cepas do gênero *Candida spp.* são sensíveis a esse fármaco, pois para *C. albicans* o fluconazol apresentou CIM e CFM de 2,0 µg/mL e para *C. parapsilosis* CIM e CFM de 4,0 µg/mL. Revelou também, que tanto as cepas ATCC como a de amostra clínica dos dermatófitos, foram sensíveis a terbinafina apresentando CIM e CFM $\leq 0,031$ µg/mL. Dentre os FFND o *Fusarium spp.* apresentou resistência ao

fluconazol com CIM ≥ 64 $\mu\text{g/mL}$ e a terbinafina com CIM >16 $\mu\text{g/mL}$. O *Scytalidium spp.* se mostrou resistente ao fluconazol com CIM de ≥ 64 $\mu\text{g/mL}$ e sensível a terbinafina com CIM de 2 $\mu\text{g/mL}$.

Tabela 5 – CIM e CFM dos medicamentos de referência frente aos fungos

Medicamentos de Referência				
Fungos	Fluconazol		Terbinafina	
	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CFM ($\mu\text{g/mL}$)	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CFM ($\mu\text{g/mL}$)
Leveduras				
<i>C. albicans</i> ATCC 14053	2,0	2,0	NR	NR
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	4,0	4,0	NR	NR
Dermatófitos				
<i>T. rubrum</i> ATCC MYA 4438	NR	NR	$\leq 0,031$	0,031
<i>T. mentagrophytes</i> ATCC MYA 4439	NR	NR	$\leq 0,031$	0,031
<i>T. mentagrophytes</i> Amostra Clínica	NR	NR	$\leq 0,031$	0,031
FFND				
<i>Fusarium spp.</i> Amostra Clínica	$\geq 64,0$	*	$>16,0$	*
<i>Scytalidium spp.</i> Amostra Clínica	$\geq 64,0$	*	2	*

Resultados de CIM e CFM expressos em $\mu\text{g/mL}$

NR Não realizado

* A CFM não foi realizada

5 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

As dermatomicoses, dentre as doenças dermatológicas, possuem incidência crescente em todo o mundo nas últimas décadas. É uma importante causa de morbidade, especialmente nos países tropicais (KAYMAN *et al*, 2012) e muitos estudos pelo mundo, inclusive no Brasil, têm comprovado que a onicomicose é a dermatomicose mais prevalente (SILVA *et al*, 2014).

O tratamento dessas doenças nem sempre é efetivo, dada a possibilidade de recorrência da infecção, resistência dos microrganismos e possível toxicidade. Essa questão leva à busca constante por novos fármacos mais ativos e seguros que os disponíveis. Embora a maioria dos antifúngicos existentes no mercado seja de origem sintética, a busca por produtos naturais tem merecido atenção (FENNER *et al*, 2006).

A escolha dos óleos essenciais da alfazema, alecrim, melaleuca e canela para esse estudo se baseou, principalmente, na atividade antifúngica já descrita para os mesmos. As espécies de fungos foram escolhidas por estarem entre os principais agentes causadores das dermatomicoses.

No trabalho de Cassella; Cassella; Smith (2002), foram avaliados os óleos essenciais de alfazema e melaleuca. Em altas concentrações, ambos os óleos parecem demonstrar efeitos antifúngicos contra *T. rubrum*. e contra *T. mentagrophytes*. Os óleos essenciais conseguiram 100% de inibição do crescimento desses fungos nas concentrações de 250000 µg/mL, podendo representar o que foi encontrado neste estudo.

Já em outro trabalho, obteve-se para a canela e melaleuca CIM de 560 µg/mL contra *C. albicans* ATCC 289065 (CAVALCANTI *et al*, 2011), apresentando concentração inibitória maior pela canela e menor pela melaleuca que as encontradas nesta avaliação (62,5 e 2000 µg/mL respectivamente).

No estudo de Ourani *et al* (2005), com o óleo essencial do alecrim, obtiveram resultados discrepantes com os obtidos aqui, foi testado contra *T. rubrum* e teve CIM de 0,4 µg/mL e CFM de 2 µg/mL, porém esse estudo não foi realizado conforme recomenda o CLSI, pois foi utilizado para microdiluição em placa meio líquido Sabouraud, o recomendado é o RPMI. Os dois principais constituintes do OE testado no estudo de Ourani são 1,8 cineol 50,2% e cânfora 9,1%, próximo do

informado no laudo técnico do OE utilizado neste estudo, 45% e 15% respectivamente.

Em outra avaliação, Cleff *et al* (2012) utilizando o OE do alecrim contra *C. albicans* (ATCC 44858 e amostra clínica) e *C. parapsilosis* (ATCC 22019), alcançaram resultados com concentrações mais baixas às obtidas aqui, com CIM e CFM para *C. albicans* ATCC e *C. parapsilosis* de 1,25 e 5,0 µL/mL, respectivamente. Para a *Candida* de amostra clínica CIM e CFM ≥ 10 µL/mL, porém a cromatografia do OE utilizado mostrou a concentração dos dois principais constituintes, 1,8 cineol 16,02% e cânfora 56,04%. Sendo assim, este OE apresentou grande diferença de seus constituintes principais em relação àquele utilizado neste estudo, que tem 45% 1,8 cineol e 15% de cânfora, fato que poderia justificar a diferença de resultados entre os 2 estudos, já que a metodologia utilizada foi referenciada pelo CLSI.

No estudo de Nasir; Tafess; Abate (2015) para o OE da canela da espécie *C. zeylanicum* exibiu CIM de 0,31 µL/mL contra *Trichophyton spp.* isolado de *tinea unguium*. Já no outro trabalho de Martins (2016) utilizando o cinamaldeído que é o principal constituinte da canela, obteve contra o *T. mentagrophytes* ATCC 11481 CIM e CFM de 0,49 µg/mL, para *T. mentagrophytes* isolado clínico CIM de 15,62 µg/mL e CFM de 62,5 µg/mL e para *T. rubrum* URM1666 CIM de 0,12 µg/mL e CFM de 0,49 µg/mL, com isso corroborando, com os resultados apresentados aqui neste trabalho, que demonstraram uma efetiva atividade antifúngica da canela contra fungos dermatófitos, sendo o *T. rubrum* o que apresenta maior sensibilidade, e o *T. mentagrophytes* ATCC apresentando na média menor CIM que a cepa de amostra clínica. Sobre a maior sensibilidade do *T. rubrum* em relação ao *T. mentagrophytes*, foi também relatado por Cassella; Cassella; Smith (2002) que existe uma clara diferença de susceptibilidade dos dois *Trichophyton*, o *T. mentagrophytes* é menos suscetível a drogas antifúngicas que *T. rubrum*.

No trabalho de Almeida *et al* (2012) os resultados obtidos contribuem em evidenciar o efeito antifúngico da canela contra cepas de *C. albicans* isoladas de pacientes HIV positivos e cepa padrão ATCC 76845, com CIM variando de 64 a 128 µg/mL, valores semelhantes aos encontrados em nosso estudo.

No estudo utilizando o cinamaldeído que é o principal constituinte da canela, encontrou-se para *C. albicans* ATCC10231 CIM e CFM de 2,44 µg/mL e para *C. albicans* isolado clínico CIM e CFM de 19,53 µg/mL (MARTINS, 2016), sugerindo que o ativo principal da canela agindo isoladamente, potencializa o efeito

antifúngico, visto que com os dermatófitos, já citados aqui com essa mesma referência, ocorreu a mesma tendência quando comparados com resultados que obtivemos. Fato que pode ser explicado pela razão que em média 81% do OE da canela é constituído de cinamaldeído, mas 19% são outros constituintes, sendo assim, várias hipóteses podem ser levantadas com isso. Porém para maiores afirmações dever-se-ia realizar um estudo comparativo entre canela x cinamaldeído contra as mesmas cepas de fungos, para descartar, como por exemplo, diferenças intrínsecas de suscetibilidade aos antifúngicos dos microrganismos, visto que entre os dois estudos foram utilizadas cepas diferentes e assim conseguir afirmar a melhor efetividade do cinamaldeído sobre canela com todos os seus componentes.

Os resultados obtidos da canela contra o *Scytalidium* e principalmente contra o *Fusarium* são promissores devido à dificuldade de tratamento de dermatomicoses causadas por esses fungos. Os microrganismos do gênero *Fusarium* são, geralmente, resistentes aos tratamentos disponíveis. Apesar de serem sensíveis à anfotericina B e apresentarem perfis variados de susceptibilidade ao voriconazol e ao posaconazol, a terapia clínica requer a associação de fármacos para o tratamento (SPADER et al, 2013). Spader e colaboradores (2013) verificaram o efeito sinérgico, quando voriconazol foi associado à terbinafina, com 84% das espécies do gênero *Fusarium* sendo inibidas por essa associação.

Como já citado na metodologia deste trabalho, os FFND utilizados foram de amostras clínicas oriundos de outro estudo e nele os agentes antifúngicos tiveram pouca atividade contra o FFND e as CIMs para todos os agentes contra *Fusarium spp* foram maiores que aquelas obtidas com outros FFND sugerindo uma maior resistência ao tratamento com os medicamentos, apresentando CIMs para o Cetoconazol, Griseofulvin, Itraconazol, Voriconazol, Terbinafina e Fluconazol variando de $>16 \mu\text{g/mL}$ a $\geq 64 \mu\text{g/mL}$ (SILVA et al, 2014).

Carmo et al (2008) demonstraram o efeito antifúngico da canela sobre FFND do gênero *Aspergillus* em que os valores de CIM foram de $80 \mu\text{L/mL}$. Nas concentrações de 80, 40 e $20 \mu\text{L/mL}$ o óleo demonstrou um potente efeito fungicida, inibindo o crescimento micelial radial de *A. niger*, *A. flavus* e *A. fumigatus* ao longo de 14 dias de exposição. A 80 e $40 \mu\text{L/mL}$ o óleo essencial promoveu inibição de 100% da germinação de esporos, das três espécies de *Aspergillus* citadas anteriormente.

6 CONCLUSÃO

Os ensaios realizados demonstraram o potencial fungicida do óleo essencial da canela (*C. cassia*) contra todos os microrganismos testados, sendo mais eficaz que os óleos essenciais da alfazema e melaleuca. Nas variações de concentrações trabalhadas o óleo essencial do alecrim não apresentou efeito antifúngico.

Em comparação com os medicamentos de referência, fluconazol e terbinafina, a canela foi efetiva contra *Fusarium spp* que apresentou baixa sensibilidade a esses fármacos.

Mais testes serão necessários para elucidar o mecanismo de ação da canela e seus constituintes, avaliar sua ação *in vivo* e posteriormente desenvolver um novo produto para o uso tópico no tratamento de dermatomicoses.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELWAHAB, S. I.; MARIOD, A. A.; TAHA, M. M. E.; ZAMAN, F. Q.; ABDELMAGEED, A. H. A.; KHAMIS, S.; SIVASOTHY, Y.; AWANG, K. 2014. Chemical composition and antioxidant properties of the essential oil of *Cinnamomum altissimum* Kosterm. (Lauraceae). Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S187853521400029X#>> Acesso em 10 agosto 2016.

ADAM, K. et al. Antifungal Activities of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia*, and *Salvia fruticosa* Essential Oils against Human Pathogenic Fungi. J. Agric. Food Chem. 1998, 46, 1739-1745.

ALMEIDA, L. F. D; CAVALCANTI, Y. W; CASTRO R. D; LIMA, E. O. Atividade antifúngica de óleos essenciais frente a amostras clínicas de *Candida albicans* isoladas de pacientes HIV positivos. Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu, v.14, n.4, p.649-655, 2012.

ALMEIDA, L. M. M. et al. Resposta *in vitro* de fungos agentes de micoses cutâneas frente aos antifúngicos sistêmicos mais utilizados na dermatologia. An Bras Dermatol. 2009;84(3):249-55.

ARANGO, HG. Bioestatística Teórica e computacional. Editora Guanabara Koogam S.A. 2001.

ARAUJO, A. J. G. et al. Ocorrência de onicomicose em pacientes atendidos em consultórios dermatológicos da cidade do Rio de Janeiro, Brasil. An bras Dermatol, Rio de Janeiro, 78(3):299-308, maio/jun. 2003.

ATAIDES, F. S. Isolamento, identificação e suscetibilidade *in vitro* de fungos causadores de onicomicose. 2010. 64 f. Tese (Mestrado) – Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2010.

BRASIL. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº. 104 de 14 de maio de 1999. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em 19 de agosto de 2011.

BRITO, D.R.B. Avaliação da atividade anti-helmintica da *Morinda citrifolia (noni)* em aves poedeiras naturalmente infectadas. 2008. 62f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Piauí, Teresina.

BRISTOW, I. R. The effectiveness of lasers in the treatment of onychomycosis: a systematic review. Journal of Foot and Ankle Research 2014, 7:34.

CAMPANHA, A. M; TASCA, R. S; SVIDZINSKI, T. I. E. Dermatomicoses: Freqüência, Diagnóstico Laboratorial e Adesão de Pacientes ao Tratamento

em um Sistema Público de Saúde. Lat. Am. J. Pharm. 26 (3): 442-8. Maringá-PR, Brasil, 2007.

CARMO, E. S. et al. Effect of *Cinnamomum zeylanicum* blume essential oil on the growth and morphogenesis of some potentially pathogenic *Aspergillus* species. Brazilian Journal of Microbiology 2008, 39:91-97.

CARVALHO, C. S. Estudo descritivo das onicomicoses na clínica de dermatologia da Santa Casa de São Paulo no período de janeiro de 2002 até dezembro de 2006. 2010. 95f. Tese (Mestrado) - Curso de Pós Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo. São Paulo, 2010.

CASSELLA, S; CASSELLA, J. P; SMITH, I. Synergistic antifungal activity of tea tree *Melaleuca alternifolia* and lavender *Lavandula angustifolia* essential oils against dermatophyte infection. The Inter Jour Aromat 2002, 12:1.

CAVALCANTI, Y. W; ALMEIDA, L. F. D; PADILHA, W. W. N. Atividade Antifúngica de Três Óleos Essenciais Sobre Cepas de *Candida*. Rev Odontol Bras Central 2011;20(52).

CAVALCANTI, Y. W; PEREZ, A. L. A. L; XAVIER, G. D. R; ALMEIDA, L. F. D. Efeito inibitorio de óleos essenciais sobre microrganismos do canal radicular. Rev Odontol UNESP, Araraquara. set./out., 2011; 40(5): 208-214

CLEFF, M. B. et al. Perfil de suscetibilidade de leveduras do gênero *Candida* isoladas de animais ao óleo essencial de *Rosmarinus officinalis*. L. Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu, v.14, n.1, p.43-49, 2012.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast. CLSI Document M27-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2008.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi. CLSI Document M38-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2008.

CURSI, I. B. et al. Onicomicose por *Scytalidium spp.*: estudo clínico-epidemiológico em um hospital universitário do Rio de Janeiro, Brasil. An Bras Dermatol. 2011; 86(4):689-93.

D'AURIA, F. D. et al. Antifungal activity of *Lavandula angustifolia* essential oil against *Candida albicans* yeast and mycelial form. Medical Mycology, August 2005, 43, 391-396.

DELIC, D. N. et al. Antifungal activity of essential oils of *origanum vulgare* and *rosmarinus officinalis* against three *candida albicans* strains. Jour Nat Sci, Matica Srpska Novi Sad. 124, 203-211, 2013.

DOGRA, S. et al. Epidemiology of onychomycosis in patients with diabetes mellitus in India. *International Journal of Dermatology* 2002, 41, 647–651.

FENNER, R.; BETTI, A. H.; MENTZ, L. A.; RATES, S. M. K. 2006. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 42 (3): 369-394.

FERQUIMA. Ferquima Indústria e Comércio LTDA. Disponível em <<http://www.ferquima.com.br>. Acesso em 19 de agosto de 2016>.

FREIRE, I. C. M. et al. Atividade Antifúngica do Óleo Essencial de *Rosmarinus officinalis* Sobre a Cinética do Crescimento de *Candida albicans* e *Candida tropicalis*. *R bras ci Saúde* 16(3):343-346, 2012.

GARMENDIA, J. L.; VIEDMA, P. I.; ARZA, J. M. Onicomycosis: diagnóstico y tratamiento. *Inf Ter Sist Nac Salud* 2008; 32: 83-92.

GHANNOUM, M.; ISHAM, N. 2014. Fungal nail infections (onychomycosis): a neverending story? *Plos Pathogens*, 10 (6): 1-5.

GUPTA, A. K; KOHLI, Y. In vitro susceptibility testing of ciclopirox, terbinafine, ketoconazole and itraconazole against dermatophytes and nondermatophytes, and in vitro evaluation of combination antifungal activity. *British Journal of Dermatology* 2003; 149: 296–305.

HAMMER, K. A; CARSON, C .F; RILEY, T. V. Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *J Appl Microbiol.* 2003; 95(4):853-60.

JAIN, S; SEHGAL, V. N. Onychomycosis: an epidemio-etiological perspective. *Inter J Dermatol* 2000; 39: 100-103.

JAYATILAKE, J. A. M. S; TILAKARATNE, W. M; PANAGODA, G. J. Candidal onychomycosis: A Mini-Review. *Mycopathologia* 2009; 168:165–173.

LACAZ, C. S. et al. *Tratado de Micologia médica*; Prefácio: Bertrand Dupont. 9. ed. São Paulo, Sarvier, 2002. 1104p. ilus. ISBN 85-7378-123-8.

KAUR, R; KASHYAP, B; BHALLA, P. Onychomycosis – epidemiology, diagnosis and management. *Indian J Med Microbiol* 2008; 26:108-16.

KAVANAGH, K. *Fungi: Biology and Applications*. West Sussex: John Wiley & Sons Ltd. (Ed.). 2005. 293 p.

KAYMAN, T; SARIGUZEL, F. M; KOC, A. N. Etiological agents of superficial mycoses in Kayseri, Turkey. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2012; 1: 1–4.

MACHADO, M. P. et al. Propagação *in vitro* e caracterização química do óleo

essencial de *Lavandula angustifolia* cultivada no Sul do Brasil. *Ciência Rural*, v.43, n.2, fev, 2013.

MARTINS, E. A. et al. Onicomicose: estudo clínico, epidemiológico e micológico no município de São José do Rio Preto. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 40(5):596-598, set-out, 2007.

MINS, C; GOERING, R. V; DOCKRELL, H. M; ZUCKERMAN, M; ROITT, I; CHIODINI, P.L. *Microbiologia médica*. 5. ed. Elsevier, Rio de Janeiro, 2014.

MOLINARO, E. M; CAPUTO, L. F. G; AMENDOEIRA, M R. R. *Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde*. 1. ed. Rio de Janeiro: EPSJV;IOC, 2009.

MOON, T; WILKINSON, J. M; CAVANAGH, H. M. A. Antibacterial activity of essential oils, hydrosols and plant extracts from Australian grown *Lavandula* spp. *The International Journal of Aromatherapy* . 2006; 16, 9–14.

NASIR, M; TAFESS, K; ABATE, D. Antimicrobial potential of the Ethiopian *Thymus schimperi* essential oil in comparison with others against certain fungal and bacterial species. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2015; 15:260.

OLIVEIRA, M. I; SCHNEIDER, M; ROSA, M. B; SILVA, C. M; MORAES, M. S. A; SCHNEIDER, R. C. S; KIST, L. T. Extração e caracterização do óleo essencial de melaleuca e desenvolvimento de uma formulação semi-sólida de uso tópico. *Revista Jovens Pesquisadores, Santa Cruz do Sul*, v. 5, n. 1, p. 50-59, 2015.

OURAINI, D. et al. Étude de l'activité des huiles essentielles de plantes aromatiques à propriétés antifongiques sur les différentes étapes du développement des dermatophytes. *Phytothérapie*. 2005. Numéro 4: 147-157.

PALACIO, A. et al. Onychomycosis: a prospective survey of prevalence and etiology in Madrid. *International Journal of Dermatology* 2006, 45, 874–876.

PENTEADO, J. G; CECY, A. T. alecrim *rosmarinus officinalis* L. labiatae (lamiaceae): uma revisão bibliográfica. *Cilouredo*, Mar 04, 2011.

PHILIPPI, J. M. S; MORETTO, E. Ocorrência de Salmonella e Coliformes de Origem Fecal na Canela em Pó (*Cinnamomum cassia* Blume a *Cinnamomum zeylanicum* Nees) Comercializada em Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. *Cad. Saúde Públ.*, Rio de Janeiro, 11 (4): 624-628, out/dez, 1995.

PIRACCINI, B. M; ALESSANDRINI, A. Onychomycosis: A Review. *J. Fungi* 2015, 1, 30-43.

RAJU, P. V. K. et al. Skin disease: clinical indicator of immune status in human immunodeficiency virus (HIV) infection. *International Journal of Dermatology* 2005, 44:646–649.

- REIS, C. M. S. et al. Avaliação micológica das amostras ungueais de pacientes com diagnóstico clínico de onicomicose atendidos no hospital universitário de Brasília. *Brasília Med* 2010;47(3):320-325.
- REZENDE, C. et al. Estudo epidemiológico das dermatofitoses em instituições públicas da cidade de Barretos, São Paulo, Brasil. *RBAC*, vol. 40(1): 13-16, 2008.
- RODGERS, P; BASSLER, M. Treating onychomycosis. *Am Fam Physician* 63: 663-672. 2001.
- SALLER, R.; BERGER, T.; REICHLING, J.; HARKENTHAL, M., 1998: Pharmaceutical and medicinal aspects of Australian tea tree oil. *Phytomedicine* 5(6): 489-495.
- SALOMON MANUFACTURAS S L. 2016. Disponível em: <http://www.http://www.salomonsl.com/en/index.aspx/>>. Acesso em: 20 out. 2016.
- SEEBACHER, C. et al. Onychomycosis. *Mycoses* (2007), 50, 321–327.
- SHIN, S. Anti-Aspergillus Activities of Plant Essential Oils and Their Combination Effects with Ketoconazole or Amphotericin B. *Arch Pharm Res* Vol 26, No 5, 389-393, 2003.
- SILVA, L. B. et al. Identification and antifungal susceptibility of fungi isolated from dermatomycoses. *JEADV* 2014, 28, 633–640.
- SILVA, M. R. Perfil ansiolítico do óleo essencial de *lavandula angustifolia* miller pela via inalatória em modelos animais. 2008. 97 f. Tese (Mestrado) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2008.
- SIMÕES, C. M. O. et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre: Ed. da UFSC, 1999.
- SPADER, T. B.; VENTURINI, T. P.; ROSSATO, L.; DENARDI, L. B.; CAVALHEIRO, P. B.; BOTTON, S. A.; SANTURIO, J. M.; ALVES, S. H. 2013. Synergism of voriconazole or itraconazole with other antifungal agents against species of *Fusarium*. *Revista Iberoamericana de Micología*, 30 (3): 200-204.
- TEJESWINI, M. G.; SOWNYA, H. V.; SWARNALATHA, S. P.; NEGI, P. S. 2014. Antifungal activity of essential oils and their combinations in vitro and in vivo conditions. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 47 (5): 564-570.
- TSURO, M; KODA, M; INOUE, M. Efficient plant regeneration from multiple shoots formed in the leaf-derived callus of *Lavandula vera*, using the “open culture system”. *Scientia Horticulturae*, v.86, n. 01, p. 81-88, 2000.

- VALERIO, E. A; PINHEIRO, V. C. S. Plantas medicinais e aromáticas. Material Didático Caderno Temático, Programa de Desenvolvimento Educacional, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2008.
- VEER, P; PATWARDHAN, N. S; DAMLE, A. S. Study of onychomycosis: prevailing fungi and pattern of infection. *Indian Journal of Medical Microbiology* 2007, 25 (1):53-6.
- VERMA, R. S. et al. Essential oil composition of *Lavandula angustifolia* Mill. cultivated in the mid hills of Uttarakhand, India. *J. Serb. Chem. Soc.* 75 (3) 343–348, 2010.
- VIEIRA, T. R. Anatomia foliar de espécies do gênero *Melaleuca* L. e caracterização da composição química de *Melaleuca alternifolia* Cheel (Myrtaceae) [dissertação] Viçosa: Universidade Federal de Viçosa (MG);2002.
- ZAITS C. et al. Compêndio de micologia médica. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.
- ZANARDO, V. P. S; RAMBO, D. F; SCHWANKE, C. H. A. Canela (*cinnamomum* sp) e seu efeito nos componentes da síndrome metabólica. PERSPECTIVA, Erechim. v. 38, Edição Especial, p. 39-48, março/2014.
- WILLE, M. P; ARANTES, T. D; SILVA, J. L. M. Epidemiologia das dermatomicoses em população da periferia de Araraquara – SP. *Rev Bras Clin Med*, 2009;7:295-298.