



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

RODOLFO TAVARES PEREIRA DOS REIS

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE
Lavandula spp. FRENTE A FUNGOS DO GÊNERO *Trichophyton*.

Recife
2022

RODOLFO TAVARES PEREIRA DOS REIS

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE
Lavandula spp. FRENTE A FUNGOS DO GÊNERO *Trichophyton*.

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Farmácia, do Centro de Ciências da
Saúde, da Universidade Federal de
Pernambuco, como requisito parcial para
obtenção do título de Bacharel em
Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Danielle Patrícia
Cerqueira Macêdo.

Co-orientadora: Ma. Ianca Karine
Prudencio de Albuquerque.

Recife
2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Reis, Rodolfo Tavares Pereira dos.

Avaliação da atividade antifúngica de óleos essenciais de *Lavandula* spp.
frente a fungos do gênero *Trichophyton*. / Rodolfo Tavares Pereira dos Reis. -
Recife, 2022.

38 : il., tab.

Orientador(a): Danielle Patrícia Cerqueira Macêdo

Cooorientador(a): Ianca Karine Prudencio de Albuquerque

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de
Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Farmácia - Bacharelado, 2022.

Inclui referências, anexos.

1. *Lavandula* spp.. 2. *Trichophyton*. 3. Microdiluição. 4. Antifúngico. I.
Macêdo, Danielle Patrícia Cerqueira. (Orientação). II. Albuquerque, Ianca
Karine Prudencio de. (Coorientação). III. Título.

570 CDD (22.ed.)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CURSO DE BACHARELADO EM FARMÁCIA



Aprovada em: 04/11/2022.

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
gov.br DANIELLE PATRICIA CERQUEIRA MACEDO
Data: 10/11/2022 16:40:21-0300
Verifique em <https://verificador.itl.br>

Profa. Dra. Danielle Patrícia Cerqueira Macêdo
(Presidente e Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Documento assinado digitalmente
gov.br DEBORA LOPES DE SANTANA
Data: 10/11/2022 13:46:10-0300
Verifique em <https://verificador.itl.br>

Débora Lopes de Santana
(Examinadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Documento assinado digitalmente
gov.br JOSENILDO PESSOA SENA
Data: 09/11/2022 16:16:47-0300
Verifique em <https://verificador.itl.br>

Josenildo Pessoa Sena
(Examinador)
Universidade Federal de Pernambuco

Mayara Bárbara da Silva
(Suplente)
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico este trabalho aos meus Pais, Israel e Maria José.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu DEUS, que a todo momento me sustentou e me ajudou por toda essa graduação. O SENHOR é a minha força. Enquanto escrevo esse texto me lembro da promessa que eu fiz, “se for da Tua vontade”, e assim foi. Quando eu achei que não seria possível ser aprovado no vestibular, no dia de anúncio dos classificados lá estava eu com a nota mínima aprovável em física (risos).

Agradeço aos meus pais, pessoas simples e comuns, mas que nunca mediram esforços para que eu tivesse uma educação adequada. Sacrificar-se pelo outro é uma ação de mais alto altruísmo e se eu estou concluindo este curso foi pelo esforço de *Lia* e *Rael* que nunca deixaram faltar nada para mim. Serei eternamente grato a eles.

Agradeço também as minhas amigas da graduação. Sozinho você pode até chegar a algum lugar, mas nada é comparado a ter alguém para dividir os seus momentos. Por isso agradeço a: Camilla, Dilli, Elayne, Gisele, Kerol, Raiana, Sasá e Zazá, Valdirene, Girl, Maciel, Bruna, Etna, Renata, Elizabete Camila, Natália Viana, Shay e Mayara. Meninas vocês são demais! Obrigado por todos os momentos naquele departamento!

Agradeço aos meus professores por todos os conhecimentos compartilhados e por todos os funcionários do DCFar.

Agradeço a minha orientadora, Profa. Dra. Danielle Macêdo. Prof, se eu fosse agradecer propriamente a Sra. levaria mais de uma página. Todas as nossas interações mostraram o quanto a Sra. É um ser humano amável! Agradeço a Deus por ter sido orientado pela senhora. Obrigado por tudo professora!

Também agradeço a minha coorientadora lanca por toda ajuda e paciência. Muito obrigado!

Quero agradecer também a BEND STUDIOS nas pessoas de John Garvin e Jeff Ross e a todos envolvidos no jogo Days Gone. A personagem Sara teve influência nesse trabalho e eu agradeço a todos pela criação de uma história tão motivadora. Muito obrigado!

E por fim quero agradecer a WNF Óleos Essenciais por todo apoio.

“Ele é o Criador da Ursa e do Órion, das Plêiades e das constelações do sul.

Livro de Jó 9:9”. (BIBLICA NVI, 2011).

RESUMO

Lavandula spp. é uma espécie nativa do mediterrâneo muito utilizada pelo seu óleo essencial de aroma suave e relaxante. Seu maior destino atualmente se concentra nas indústrias, compondo o aroma de muitos produtos. Estudos buscam correlacionar seu óleo essencial, majoritariamente composto por substâncias químicas voláteis com alguma atividade antimicrobiana. Este trabalho consistiu em avaliar o efeito dos óleos essenciais de espécies de Lavanda frente a fungos do gênero *Trichophyton*. Os óleos comprados comercialmente através da empresa WNF® foram emulsionados e para avaliação antimicrobiana foi utilizada a técnica de microdiluição conforme o protocolo M38-A2 do CLSI. Foram utilizadas 4 cepas sendo: *T. rubrum*, *T. tonsurans*, *T. mentagrophytes* e a cepa *Candida albicans* ATCC 90028 como cepa padrão. Foram testadas 10 concentrações para os óleos (4096 µg/mL a 8 µg/mL) e para os fármacos (16 µg/mL a 0,03125 µg/mL). O óleo de *L. dentata* conseguiu inibir todas as cepas testadas e a cepa mais sensível foi o *T. rubrum* com uma CIM de 1024 µg/mL.

Palavras-chaves: *Lavandula spp.*, *Trichophyton*, microdiluição, antifúngico.

ABSTRACT

Lavandula spp. are native to the Mediterranean, widely used for its essential oil with a soft and relaxing scent. Its biggest destination currently focuses on industries, making up the aroma of many products. Studies seek to correlate its essential oil, mostly composed of volatile chemical compounds with some antimicrobial activity. This work consisted of evaluating the effect of the essential oils from Lavender species against fungi of the genus *Trichophyton*. The oils purchased commercially from the company WNF® Óleos essenciais were emulsified and for the antimicrobial evaluation the broth microdilution technique was used according to the CLSI M38-A2 protocol. Four strains were used: *T. rubrum*, *T. tonsurans*, *T. mentagrophytes* and *Candida albicans* ATCC 90028 strain as standard strain. 10 concentrations were tested for the oils (4096 µg/mL to 8 µg/mL) and for the drugs (16 µg/mL to 0.03125 µg/mL). *L. dentata* oil was able to inhibit all strains tested and the most sensitive strain was *T. rubrum* with a MIC of 1024 µg/mL.

Keywords: *Lavandula spp.*, *Trichophyton*, microdilution, antifungal.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Anverso e Reverso de uma colônia de <i>T. mentagrophytes</i> com crescimento de 14 dias em Ágar Sabouraud Dextrose (SAB) a 30 °C. Nota-se no anverso a mudança de coloração de branco para um tom amarelado, assim como em seu reverso um pigmento castanho-amarronzado.	16
Figura 2 –	Microscopia de uma cultura de <i>T. mentagrophytes</i> . Podemos observar a presença de macroconídeo com estrutura característica charutóide (A), microconídios agrupados em formato de cachos de uvas (B) e a presença de hifas em espiral (C).	17
Figura 3 –	Anverso e Reverso de uma cultura de <i>T. rubrum</i> . O reverso denota o pigmento castanho-avermelhado que se difunde pelo ágar abaixo da colônia. Colônia com crescimento de 10 dias em ágar sabouraud a 30 °C.	18
Figura 4 –	Microscopia de <i>T. rubrum</i> . Podemos observar as hifas com microconídios aderidos à parede celular. Os microconídios estão dispostos em formato característicos de “pássaros em cerca”.	18
Figura 5 –	Exemplo de uma cultura de <i>T. tonsurans</i> . Crescimento de 14 dias em Ágar sabouraud dextrose a 30 °C.	19
Figura 6 –	Microscopia do <i>T. tonsurans</i> . Observam-se microconídios de morfologia variável, assim como a presença de um clamidósporo intercalando uma hifa no centro à esquerda.	20
Figura 7 –	Macroconídio de <i>T. tonsurans</i> exibindo morfologia característica em forma de S. Pode-se notar em seu interior três septos bem definidos.	20
Figura 8 –	Flores de <i>Lavandula angustifolia</i> Mill.	24
Figura 9 –	À esquerda observamos detalhes da morfologia das folhas da <i>L. dentata</i> . A direita podemos observar no topo da espiga terminal, brácteas de cor lilás. Botões florais e delicados tricomas em todas as estruturas também podem ser observados.	24
Figura 10 -	Esquema do teste de microdiluição.	26
Gráfico 1 -	Relação de inibição do óleo essencial de <i>L. angustifolia</i> na sua maior concentração ao poço de controle de crescimento.	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores de CIM e CFM dos óleos essenciais frente aos fungos.	27
---	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	13
2.1	OBJETIVO GERAL	13
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3	REFERENCIAL TEÓRICO	14
3.1	INFECÇÕES FÚNGICAS	14
3.1.1	INFECÇÕES FÚNGICAS SUPERFICIAIS	14
3.1.2	GENERO <i>Trichophyton spp.</i>	15
3.2	FÁRMACOS DA TERAPIA ANTIFÚNGICA	20
3.2.1	NOVAS ALTERNATIVAS	21
3.3	ÓLEOS ESSENCIAIS	22
3.3.1	<i>Lavandula spp.</i>	23
3.3.2	<i>Lavandula angustifolia Mill.</i>	23
3.3.3	<i>Lavandula dentata L.</i>	24
4	METODOLOGIA	24
4.1	MICRORGANISMOS	24
4.2	PREPARAÇÃO DAS EMULSÕES DOS ÓLEOS ESSENCIAIS	24
4.3	FÁRMACOS ANTIFÚNGICOS	25
4.4	PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO	25
4.5	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM)	25
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
6	CONCLUSÃO	30
	REFERÊNCIAS	31
	ANEXO A – Perfil analítico do óleo essencial de <i>Lavandula angustifolia</i>	35
	ANEXO B – Perfil analítico do óleo essencial de <i>Lavandula dentata</i>	37

1 INTRODUÇÃO

O Reino Fungi é composto por organismos heterotróficos, multicelulares e unicelulares, principalmente degradadores de matéria orgânica e com alta diversidade e distribuição por toda a Terra. Sua contribuição para os ecossistemas e a humanidade é indiscutível, como, por exemplo, a sua expressiva relação de simbiose com aproximadamente 90% das plantas, além de atuarem na indústria como fermentadores, produtores de enzimas de alto valor comercial e de metabólitos de interesse médico (CASE; HEITMAN; E COHEN, 2020). Ademais, alguns gêneros de fungos possuem certa atenção do ponto de vista clínico dado a sua patogenicidade aos seres humanos, sendo os gêneros *Candida*, *Aspergillus*, *Pneumocystis*, *Cryptococcus*, *Paracoccidioides*, *Histoplasma* e *Coccidioides* os principais agentes causadores de infecções hospitalares no Brasil (GIACOMAZZI *et al.*, 2015).

Vem sendo observado nos últimos anos um aumento nos casos de doenças fúngicas e dentre esses casos, um aumento significativo de fungos multirresistentes, principalmente em espécies do gênero *Candida* e *Trichophyton* (FISHER *et al.*, 2018). Isto pode ser parcialmente explicado pelo crescente uso indiscriminado de antifúngicos que exercem pressão seletiva sobre os fungos e propiciam a aquisição de mecanismos de resistência. Ainda assim o descobrimento de novos fármacos antifúngicos é modesto e lento (LIMA *et al.*, 2008; MENEZES; MENDES; CUNHA, 2009; QUINTERO, 2010; MARTINS 2018; TANG *et al.*, 2021).

A família *Lamiaceae* abriga plantas do gênero *Lavandula* que são popularmente conhecidas como Lavanda ou Alfazema. Plantas perenes, subarbustivas e nativas do Mediterrâneo, Norte da África e Oriente Médio. São utilizadas principalmente para produção comercial do seu óleo essencial, que pode ser utilizado tanto na indústria cosmética como farmacêutica ou alimentícia. Possui grande apelo na aromaterapia e na medicina natural pelos seus efeitos relaxantes e carminativos. Na clínica é estudado profundamente a aplicação dos seus óleos essenciais devido a sua rica composição em monoterpenos oxigenados. Pesquisas anteriores mostram uma capacidade dos óleos de lavanda demonstrarem certa atividade microbiana o que o torna interessante o seu estudo. (LIS-BALCHIN; HART, 1999; CLARA APROTOSOAIE *et al.*, 2017; MARTINS, 2018).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antifúngica do óleo essencial de espécies do gênero *Lavandula spp.* frente aos fungos do gênero *Trichophyton*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a sensibilidade, *in vitro*, de isolados do gênero *Trichophyton* em relação a fármacos comerciais;
- Verificar quais isolados do gênero *Trichophyton* apresentaram sensibilidade aos óleos essenciais;
- Investigar o potencial antimicrobiano dos óleos essenciais de *Lavandula dentata L.* e *Lavandula angustifolia Mill.* e determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) bem como a Concentração Fungicida Mínima (CFM);
- Comparar a atividade dos dois óleos essenciais frente aos isolados e apontar qual desempenha melhor atividade antimicrobiana;

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 INFECÇÕES FÚNGICAS

Infecções fúngicas são causadas por fungos e espécies de interesse clínico estão classificadas entre leveduras ou filamentosos (LEVINSON, 2016). Existem aproximadamente mais de 100 mil espécies de fungos conhecidos e deste total apenas 200 são reconhecidamente patogênicos, sendo observado um aumento nas últimas décadas na incidência de micoses (TORTORA, Gerard J.; FUNKE, BERDELL R.; CASE, CHRISTINE L., 2017). Estes organismos estão presentes de forma bem distribuída no planeta, podendo ser encontrados tanto em matéria orgânica em decomposição como no solo, água ou ar. O local de surgimento da infecção configura-se como um importante fator na classificação da manifestação clínica, podendo ser diferenciados em micoses superficiais, que podem acometer toda a camada superficial da pele, pelo e unhas; micoses subcutâneas, que envolvem a derme e os tecidos mais profundos até o osso; já as micoses sistêmicas acontecem geralmente pela inalação de estruturas fúngicas infectantes causando uma lesão inicial nos pulmões podendo atingir outros órgãos. Embora indivíduos saudáveis possam ser acometidos por tais doenças, pacientes debilitados ou imunocomprometidos são considerados um grupo de risco, pois oferecem condições favoráveis para a disseminação de micoses de caráter oportunista (WANKE, B; LÁZERA, MS; NUCCI, M., 2000).

3.1.1 INFECÇÕES FÚNGICAS SUPERFICIAIS

Micoses superficiais ou cutâneas possuem grande relevância clínica, pois são as infecções fúngicas mais comumente observadas. Possuem uma alta prevalência de casos e estima-se que de 20 a 25% da população mundial possua algum tipo de micose superficial (HAVLICKOVA; CZAICA; FRIEDRICH, 2008). Segundo uma série de pesquisas analisadas por Bongomin *et al.* (2017) doenças fúngicas mataram cerca de 1.5 milhões de pessoas e afetam cerca 1 bilhão da população mundial. Podem ser causadas por leveduras, fungos dermatófitos ou fungos filamentosos não-dermatófitos (FFND). Porém, os dermatófitos possuem uma maior frequência como agentes causadores dessas doenças, seguidos por leveduras e por fim, fungos filamentosos não-dermatófitos (ALMEIDA *et al.*, 2009).

Dermatófitos são fungos filamentosos queratinofílicos, ou seja, utilizam a

queratina presentes na pele, unha e cabelo como fonte de nutriente. Normalmente, as infecções causadas por esses fungos são comumente chamadas de “tinhas”. Embora que muitas espécies componham esse grupo, faz-se necessário citar que dentre os dermatófitos, três gêneros, a saber: *Epidermophyton*, *Trichophyton* e *Microsporum*, compõem a maioria dos isolados na clínica. Diferem tanto macroscopicamente, como exemplo, no formato e na coloração de suas colônias, tempo de crescimento e seletividade quanto ao meio de crescimento, como microscopicamente, a partir da morfologia de suas estruturas de reprodução assexuada chamadas de conídios (PERES *et al.*, 2010).

Os dermatófitos ainda podem ser classificados quanto ao seu habitat primário, divididos entre espécies geofílicas, antropofílicas e zoofílicas. Espécies geofílicas estão bem adaptadas ao solo e são raramente associadas a infecções humanas. Espécies zoofílicas estão comumente presentes em animais, porém ocasionalmente, podem ser transmitidas para o homem. Essas espécies correspondem a cerca de 30% das infecções humanas relatadas e geralmente acompanham um episódio de inflamação aguda após a infecção. Já as espécies antropofílicas correspondem a 70% das infecções relatadas e são assim denominadas, visto que os fungos presentes nesse grupo se adequaram de forma parasitária tão satisfatória aos seres humanos que esses microrganismos causam doenças com perfil de progressão lenta e crônica (WHITE *et al.*, 2008; PERES *et al.*, 2010).

Um estudo realizado por Weitzman *et al.* (1998) entre os anos de 1993 e 1995 sobre infecções fúngicas nos Estados Unidos revelou que o *Trichophyton tonsurans* foi a espécie mais isolada, correspondendo a 44,9% das amostras, seguido pelo *Trichophyton rubrum* (41,3%), *Trichophyton mentagrophytes* (8,5%), *Microsporum canis* (3,3%) e *Epidermophyton floccosum* (>1%). Já em uma revisão narrativa conduzida no Brasil no ano de 2022 onde foram analisados estudos de várias regiões do país, foi observado a prevalência do *T. rubrum* como agente etiológico, numa variação de 59,60% a 48,70% do total de amostras (PEREIRA, 2022).

3.1.2 GÊNERO *Trichophyton* spp.

O gênero *Trichophyton* compreende um importante grupo de fungos queratinofílicos e segundo um estudo filogenético realizado por De Hoog *et al.* (2017) o grupo compreende 16 espécies reconhecidas. Este grupo de fungos é caracterizado pela produção de alguns a vários microconídios e raros ou nenhum

macroconídio e diferente do *Microsporum spp.*, seus macroconídios, quando apresentam produção, possuem parede celular finas e lisas.

O tamanho e a disposição dos microconídios são importantes para a identificação ao nível de espécie. A produção de pigmento, a atividade de urease, a capacidade de penetrar nos pelos e os padrões de crescimento diferenciados nos meios de cultura com e sem tiamina ou niacina nos ágaros diferenciais para *Trichophyton*, também são utilizados para concluir a identificação de espécies (PROCOP, G. W.; KONEMAN, E. W., 2016).

Trichophyton mentagrophytes é um fungo dermatófito zoofílico, com amplo espectro de animais hospedeiros e de distribuição global. Ocasionalmente infecta o homem, produzindo lesões inflamatórias e ou purulentas na pele e couro cabeludo, especialmente em trabalhadores rurais. Possui um perfil de invasão das células capilares do tipo *ectothrix* e não fluorescem sob a lâmpada de Wood (KIDD, S. *et al.*, 2016).

As colônias geralmente são planas e possuem um perfil de crescimento relativamente rápido, com maturação de 3 a 5 dias sendo observados macrocolônias dos tipos granuladas ou cotonosas. As variantes algodonosas inicialmente possuem coloração esbranquiçadas podendo tornar-se de cor creme a castanho à medida que amadurecem com o reverso de coloração marrom-amarelado a castanho. Já as variantes granuladas produzem colônias dispersivas com aspecto pulverulento. Inicialmente possuem coloração branco a branco-amarelado que com o tempo tornam-se de cor marrom. Podem apresentar pigmentação avermelhada quando cultivadas em ágar fubá ou ágar batata dextrose (Figura 1) (PROCOP, G. W.; KONEMAN, E. W., 2016).

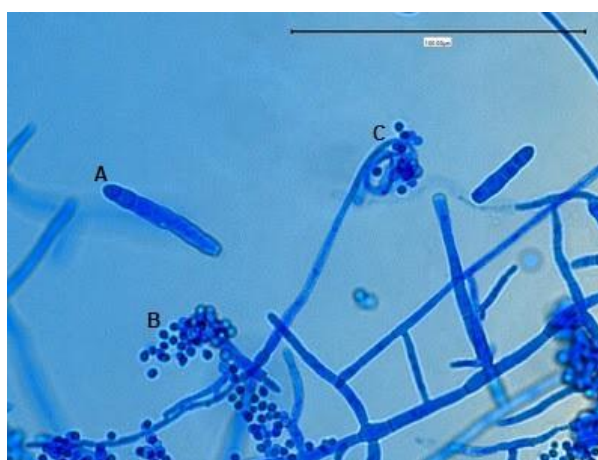
Figura 1 - Anverso e Reverso de uma colônia de *T. mentagrophytes* com crescimento de 14 dias em Ágar Sabouraud Dextrose (SAB) a 30 °C. Nota-se no anverso a mudança de coloração de branco para um tom amarelado, assim como em seu reverso um pigmento castanho-amarronzado.



Fonte: Yuri (2013).

Microscopicamente observam-se numerosos microconídios de parede celular lisa, hialinos e de formato esférico a oval que podem se agrupar em formato de cachos de uva (Figura 2). Quando presentes, os macroconídios são hialinos, pluricelulares e em formato característico de charuto. Clamidósporos e hifas espiraladas também podem ser observadas (KIDD, S. *et al.*, 2016; PROCOP, G. W.; KONEMAN, E. W., 2016).

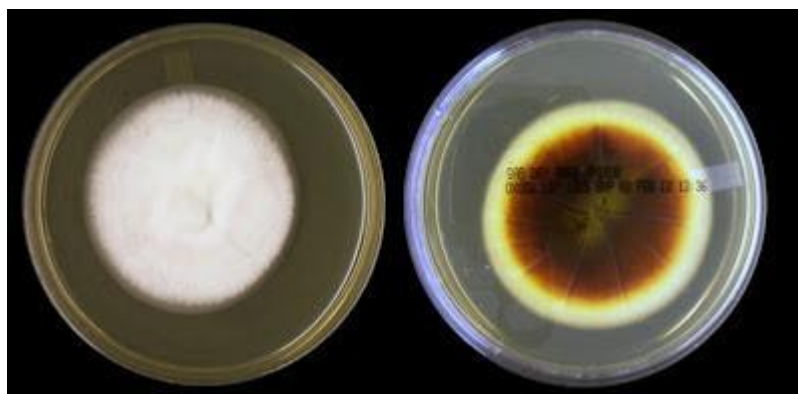
Figura 2 - Microscopia de uma cultura de *T. mentagrophytes*. Podemos observar a presença de macroconídeo com estrutura característica charutóide (A), microconídios agrupados em formato de cachos de uvas (B) e a presença de hifas em espiral (C). (Aumento de 400+10X, corado com azul de lactofenol, tamanho da barra = 100 µm).



Fonte: Yuri (2016)

Trichophyton rubrum é um dermatófito cosmopolita do tipo antropofílico. Comumente coloniza a pele e unhas, com um perfil de infecção crônica. Podem surgir lesões do tipo granulamentosas e raramente infecta o couro cabeludo. Pelos infectados não fluorescem sob a lâmpada de Wood e possui um perfil de invasão dos pelos de caráter misto (*endothrix* ou *ectothrix*). Possui perfil de crescimento lento, com no mínimo de 7 a 14 dias para alcançar maturidade e morfologicamente suas culturas variam de uma textura lisa e compacta para algodonosa e de difícil raspagem. O anverso da cultura pode apresentar coloração esbranquiçada a creme e como o nome indica, um vermelho profundo. O reverso pode variar entre branco a amarelo avermelhado e vermelho-escuro (Figura 3) (PROCOP, G. W.; KONEMAN, E. W., 2016).

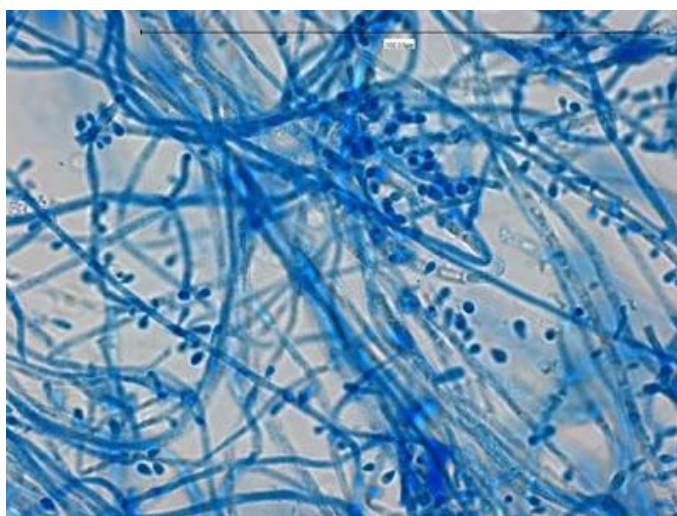
Figura 3 - Anverso e Reverso de uma cultura de *T. rubrum*. O reverso denota o pigmento castanho-avermelhado que se difunde pelo ágar abaixo da colônia. Colônia com crescimento de 10 dias em ágar sabouraud a 30 °C.



Fonte: Yuri (2012a)

Microscopicamente, pode ser observado microconídios em forma de gotas (piriformes) dispersos pelas hifas em um aspecto comumente designados de “pássaros pousados em cerca” e podem ocorrer a presença de macroconídios que são semelhantes aos produzidos pelo *T. mentagrophytes*. São alongados e de forma charutóide e com parede celular afinadas de aspecto liso (KIDD, S. *et al.*, 2016; PROCOP, G. W.; KONEMAN, E. W., 2016). Um estudo molecular conduzido por Graser *et al.* (1999) revelou que a variação entre os isolados de *T. rubrum* era muito pequena, indicando que as espécies são na maioria em grande parte clones (Figura 4) (PROCOP, G. W.; KONEMAN, E. W., 2016).

Figura 4 - Microscopia de *T. rubrum*. Podemos observar as hifas com microconídios aderidos à parede celular. Os microconídios estão dispostos em formato característicos de “pássaros em cerca”. (Aumento de 400X, corado com azul de lactofenol, tamanho da barra = 100 µm).



Fonte: Yuri (2012a)

Trichophyton tonsurans é um fungo antropomórfico com distribuição global. Infecta unhas, pele ou couro cabeludo, podendo causar lesões inflamatórias ou lesões não inflamatórias de caráter crônico. É comumente associado como agente causador de *Tinea capitis* e possui um perfil de infecção do tipo *endothrix*. Assim como os outros Tricófitons citados, o *T. tonsurans* não fluoresce sob a lâmpada de Wood. Macroscopicamente as colônias apresentam uma morfologia plana com textura aveludada a pulverulenta, mas que podem apresentar rugas radiais à medida que amadurecem. De crescimento lento, as colônias atingem maturidade de 7 a 10 dias e o anverso das colônias podem apresentar uma coloração creme a amarelo-castanho. Já o reverso pode variar de amarelo-amarronzado a castanho escuro (Figura 5) (PROCOP, G. W.; KONEMAN, E. W., 2016).

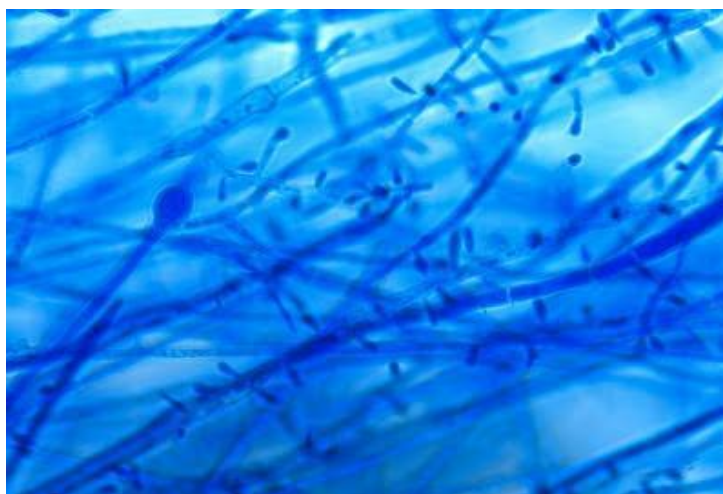
Figura 5 - Exemplo de uma cultura de *T. tonsurans*. Crescimento de 14 dias em Ágar sabouraud dextrose a 30 °C.



Fonte: Yuri (2012b)

Seus microconídios variam de formas claviformes a esféricos, dispostos nas laterais das hifas que são delicadas e septadas. Macroconídeos são raros, mas podem estar presentes em algumas culturas, apresentando morfologia com aspecto de charuto ou clava (Figura 6) (PROCOP, G. W.; KONEMAN, E. W., 2016).

Figura 6 - Microscopia do *T. tonsurans*. Observam-se microconídios de morfologia variável, assim como a presença de um clamidósporo intercalando uma hifa no centro à esquerda. (Aumento de 1000X com coloração de azul de lactofenol).



Fonte: Yuri (2012b)

Ainda podem ser observados, como ilustrado na figura 7, macroconídios com morfologia tortuosa, em forma de “S” característicos do *T. tonsurans*. Numerosos clamidósporos e microconídios tumefatos são observados em colônias envelhecidas. A tiamina é um nutriente essencial para o crescimento do fungo, oferecendo assim um meio diferencial para testes (KIDD, S. *et al.*, 2016; PROCOP, G. W.; KONEMAN, E. W., 2016).

Figura 7 - Macroconídio de *T. tonsurans* exibindo morfologia característica em forma de S. Pode-se notar em seu interior três septos bem definidos. (Aumento de 400X, corado com azul de lactofenol).



Fonte: Autor

3.2 FÁRMACOS DA TERAPIA ANTIFÚNGICA

A terapia antifúngica tem início por volta de 1940 com o uso de sulfonamidas dada a importância da busca de um tratamento contra o avanço de infecções

sistêmicas causadas por fungos (MARTINEZ, 2006). No início da década de 50 foi descoberta a anfotericina B, um antifúngico poliênico isolado como subproduto do processo fermentativo de *Streptomyces nodosus*, um actinomiceto presente no solo. Dado ao seu efeito de amplo espectro antifúngico e eficácia, a anfotericina B continua sendo utilizada até hoje como droga de referência para infecções sistêmicas e disseminadas (GALLIS *et al.* 1990). Assim como a nistatina, atuam ligando-se ao ergosterol alterando a permeabilidade da parede celular. As equinocandinas, lipopeptídeos semissintéticos com alvo na parede celular fúngica possuem menor toxicidade em relação a anfotericina B, mas, em contrapartida possuem algumas limitações como administração exclusiva por via endovenosa e devido ao seu reduzido espectro de ação só é recomendado o uso para infecções graves por *Candida spp.* e *Aspergillus spp.*

Na década de 70 foi introduzido para uso clínico as drogas azólicas causando um grande impacto na terapêutica, uma vez que essas drogas possuem um grande espectro de ação tanto para micoses sistêmicas como para micoses superficiais e nos anos 90 houve a adição de mais um subgrupo ao grupo dos azólicos. Os imidazóis trouxeram uma maior biodisponibilidade e atividade antimicótica. Atuam inibindo enzimas do citocromo P450 dos fungos impedindo a demetilação do lanosterol e consequentemente a síntese do ergosterol, gerando uma alteração na permeabilidade celular. (DERESINSKI; STEVENS, 2003; BERGOLD; GEORGIADIS, 2004; MARTINEZ, 2006). Ainda no tratamento das micoses superficiais podemos citar um derivado da morfolina, a amorolfina; os tiocarbamatos tolnaftato e tolciclato; a naftifina, terbinafina e butenafina que pertencem ao grupo das alilaminas sendo a terbinafina a mais utilizada na clínica principalmente nos casos de tinea capitis. Ainda podemos citar o composto ciclopirox e a griseofulvina, um fármaco extraído da fermentação do fungo *Penicillium griseofulvum*. (GOODMAN; GILMAN, 1996; WILLIAMS; LEMKE, 2002; KOROLKOVAS, 2003).

3.2.1 NOVAS ALTERNATIVAS

O surgimento de novos fármacos antimicóticos possui uma progressão modesta se comparada aos antibacterianos e vale ressaltar a discrepância entre o número de fármacos disponíveis para tratamento de micoses sistêmicas em relação a micoses superficiais, onde pode-se observar um número maior. (BERGOLD; GEORGIADIS, 2004; QUINTERO, 2010). Além disso, surge uma problemática

quando já são observados casos de fungos que demonstram a capacidade de resistência a esses fármacos (LIMA *et al.* 2008; MENEZES; MENDES; CUNHA, 2009; QUINTERO, 2010), causados principalmente pelo uso indiscriminado de antifúngicos com atenção na classe dos fármacos azólicos, um grupo de medicamentos amplamente utilizados para o tratamento da maioria das infecções fúngicas superficiais (FISHER *et al.*, 2018). A pesquisa de moléculas naturais possui uma contribuição fundamental para a descoberta de novos compostos com efeitos biológicos desejáveis. Compostos de origem vegetal são promissores, sendo observado o amplo uso de plantas na pesquisa por antimicrobianos naturais (MARTINS, 2018).

3.3 ÓLEOS ESSENCIAIS

Óleos essenciais são líquidos extraídos de plantas, possuem odor característico, sendo formados por uma mistura de moléculas complexas de baixo peso molecular, lipofílicas e voláteis. São produzidas como metabólitos secundários, isto é, compostos orgânicos não envolvidos nos processos fundamentais para o funcionamento das plantas, mas igualmente importantes, sendo armazenados em tecidos especializados (NAKATSU *et al.*, 2000; ASBAHANI *et al.*, 2015). Possuem uma gama de aplicações e de interesse seja na indústria farmacêutica, alimentícia, agrônoma, cosmética e indústria sanitária (ORLANDA, 2011; BOSCARDIN, 2009).

Esses compostos desempenham um papel importante na interação das plantas com o meio ambiente, como, por exemplo, na defesa contra herbívoros, ataque de patógenos, competição entre plantas de espécies diferentes ou para atrair animais polinizadores facilitando a propagação da espécie. Os metabólitos secundários podem ser divididos em três grandes grupos: Terpenos, Compostos Fenólicos e Alcalóides (MARTINS, 2018). Os terpenos são os principais metabólitos encontrados no óleo essencial de plantas como as Lavandas, sendo os metabólitos de maior interesse o Linalol e Acetato de Linalina. Teores elevados de 1,8-cineol e Cânfora também podem ser encontrados em algumas espécies. (ADAMUCHIO; DESCHAMPS; MACHADO, 2017).

3.3.1 *Lavandula spp.*

A Lavanda é uma planta subarbustiva, perene, pertencente à família *Lamiaceae*. As espécies do gênero *Lavandula* possuem um forte apelo comercial devido à extração do seu óleo essencial, isolado das partes aéreas da planta e extraídas por hidrodestilação. Originária da região do mar Mediterrâneo, são popularmente conhecidas no Brasil como Espilego, Alfazema ou Lavanda. Na antiguidade eram utilizadas para perfumar ambientes, sendo seu uso iniciado pelos Gregos e Romanos (LIS-BALCHIN; HART, 1999)

Dentre as 39 espécies destacam-se: *Lavandula dentata* L., *Lavandula angustifolia* Mill., *Lavandula latifolia* Medik., *Lavandula x intermedia* Emeric ex Loisel., *Lavandula stoechas* L. e *Lavandula dhofarensis* A. G. Mill. (JUSTUS, 2016). Cerca de 50 a 60 compostos já foram identificados no óleo essencial das lavandas, no entanto, devido à grande variabilidade genética cada espécie possui um perfil distinto quanto aos níveis desses compostos (ADAMUCHIO; DESCHAMPS; MACHADO, 2017).

3.3.2 *Lavandula angustifolia* Mill.

Lavandula Angustifolia Mill. (Figura 8) é uma espécie nativa do Mediterrâneo, sendo cultivado por toda Europa principalmente na França, Itália e Espanha. Também conhecida como Alfazema, Lavanda verdadeira ou Lavanda inglesa, pode atingir até 70 cm de altura (ADAMUCHIO; DESCHAMPS; MACHADO, 2017). Seu óleo essencial é rico em terpenos com composições variadas a depender da região de plantio e condições de coleta. Primariamente possui em maior quantidade: Linalol, Acetato de linalina, Lavandulol, Lavandulil e menores quantidades de 1,8-cineol, Borneol e Cânfora (JIANU *et al.*, 2013).

Figura 8 - Flores de *Lavandula angustifolia* Mill.



Fonte: Herbarium.

3.3.3 *Lavandula dentata* L.

A *Lavandula dentata* L. (Figura 9) assim como as outras lavandas também é uma espécie nativa do Mediterrâneo, tendo prevalência em regiões específicas como na península árabe e Ilhas do Atlântico. Também são encontradas nas porções leste e sul da Espanha. Diferente da *Lavandula angustifolia*, essa espécie se adapta bem a locais mais quentes e pode chegar até 1 m de altura (ADAMUCHIO; DESCHAMPS; MACHADO, 2017). Possui altos teores de 1,8-cineol e Cânfora que conferem ao seu óleo essencial algumas propriedades medicinais. (MARTINS, 2018).

Figura 9 - À esquerda observamos detalhes da morfologia das folhas da *L. dentata*. A direita podemos observar no topo da espiga terminal, brácteas de cor lilás. Botões florais e delicados tricomas em todas as estruturas também podem ser observados.



Fonte: Herbarium.

4 METODOLOGIA

4.1 MICRORGANISMOS

Para a realização do teste foram utilizados um total de 3 isolados de espécies do gênero *Trichophyton* a saber: *Trichophyton rubrum* (1), *Trichophyton mentagrophytes* (1) e *Trichophyton tonsurans* (1). A *Candida albicans* ATCC 90028 foi utilizada como cepa de controle e tanto os isolados como a cepa padrão foram cedidos pelo Laboratório de Análises Microbiológicas do Departamento de Farmácia da UFPE.

4.2 PREPARAÇÃO DAS EMULSÕES DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais de *L. angustifolia* e *L. dentata* foram adquiridos pela WNF® Óleos essenciais, que gentilmente cederam seus respectivos laudos

cromatográficos e físico-químicos e encontram-se anexados a este trabalho como anexos A e B.

Para o preparo da solução estoque foi adicionado em um tubo de ensaio estéril o equivalente a 200.000 µg do óleo essencial, 0,06 mL de Tween 80 como agente emulsificador e quantidade suficiente para 10 mL de água destilada e estéril. A mistura foi agitada por 5 minutos utilizando um aparelho do tipo vórtex, obtendo uma emulsão com concentração final de 20.000 µg/mL. (ALLEGRIINI *et al.* 1973). A partir desta solução, uma diluição com o meio do teste foi realizada para se obter uma concentração final de 4096 µg/mL. Concentração essa definida pelo autor. As emulsões foram preparadas no momento do teste.

4.3 FÁRMACOS ANTIFÚNGICOS

Para o teste foram utilizados cetoconazol e anfotericina b nas concentrações de 16 µg/mL. As soluções foram preparadas de acordo com o CLSI utilizando uma solução intermediária na concentração de 100 vezes a utilizada. Uma alíquota dessa solução foi retirada e diluída no meio de cultura para realização dos testes.

4.4 PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO

Os isolados *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans* e a cepa padrão *C. albicans* 90028 foram incubados em placa de ágar sabouraud dextrose a 35°C (±1 °C) por aproximadamente 14 dias para os fungos filamentosos e 24h para *Candida albicans*. Os inóculos foram preparados e ajustados visualmente pela escala 0,5 de McFarland ou 10⁶ unidades formadoras de colônias (UFC/mL). Posteriormente uma diluição de 1:50 com o meio foi realizada para obter a concentração final de trabalho.

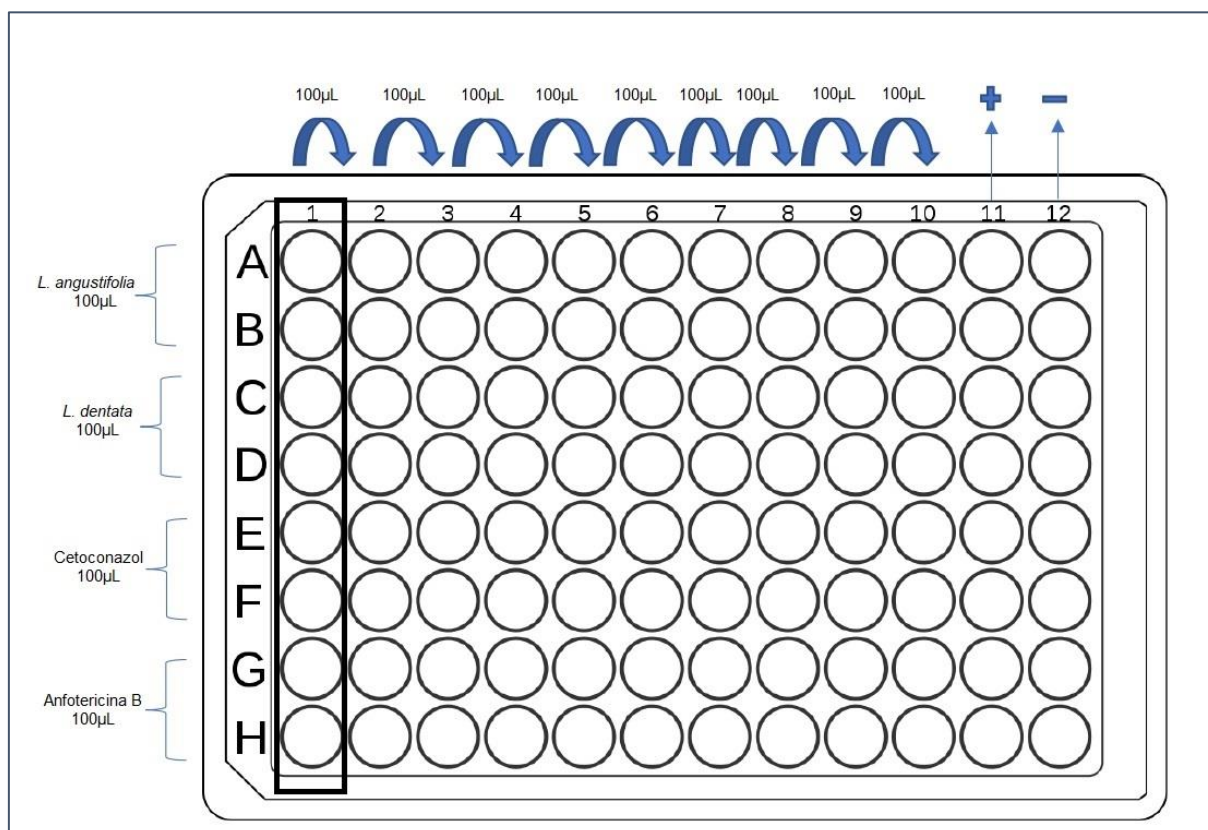
4.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA (CIM) E CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM)

A determinação da CIM foi avaliada através de um teste de microdiluição utilizando placas de microtitulação de 96 poços em formato de “U” conforme o protocolo da CLSI (CLSI 2008). Todo o teste foi executado segundo o protocolo M38-A2 da CLSI com modificações, a saber, no preparo e uso do meio de cultura. A CLSI recomenda o uso de meio RPMI 1640 com glutamina, sem bicarbonato e vermelho de fenol como indicador de pH, mas para este teste foi utilizado caldo Sabouraud (ALIGIANNIS *et al.* 2001; CASTRO, R. D.; LIMA, E. O., 2010).

Foram utilizadas 4 placas de microtitulação, uma para cada fungo a ser testado. Todos os 96 poços foram preenchidos com 100 µL de caldo Sabouraud e a

seguir foram depositados 100 μ L das emulsões dos óleos e 100 μ L dos fármacos nos poços da coluna 1. Diluições seriadas de fator 2 foram realizadas tanto para as emulsões como para os fármacos. As diluições foram realizadas até os poços da coluna 10, sendo definidos como a menor concentração do teste como exemplificado na figura 10.

Imagem 10 – Esquema do teste de microdiluição.



Fonte: Autor.

Posteriormente foram adicionados 100 μ L do inóculo padronizado em todos os poços com exceção aos poços da coluna 12 que foram utilizados como controle de esterilidade. O poço 11 foi utilizado como meio de crescimento. Após isso, a concentração final das emulsões foi de 4096 μ g/mL e 16 μ g/mL para os fármacos.

As placas foram incubadas sem agitação a 35 $^{\circ}$ C ($\pm$ 1 $^{\circ}$ C) em um período de 48 horas para *C. albicans* e 4 dias para os dermatófitos. A CIM foi definida como a menor concentração capaz de inibir visualmente o crescimento fúngico nos poços em comparação ao poço de controle de crescimento. Os testes foram realizados em duplicata. Após passado o tempo determinado, uma alíquota de 1 μ L dos 4 poços de maior concentração dos óleos essenciais e do poço de controle de crescimento foram semeados em Ágar Sabouraud Dextrose e incubados por 48 horas para *C.*

albicans e 4 dias para os dermatófitos. A CFM foi determinada como a menor concentração onde não observado crescimento fúngico.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A determinação dos valores de CIM e CFM foi realizada pelo método de microdiluição em caldo Sabouraud. Os respectivos valores foram sumariados na Tabela 1. Todos os isolados, incluindo a cepa comercial de *Candida* foram sensíveis ao óleo essencial de *L. dentata* (LD) e no geral a performance do óleo foi melhor em relação ao óleo de *L. angustifolia* (LF), sendo o *T. rubrum* e *T. tonsurans* as cepas com menor valor de CIM, 1024 µg/mL e 2048 µg/mL respectivamente. Em contrapartida, tanto a cepa padrão como os dermatófitos *T. tonsurans* e *T. mentagrophytes* foram resistentes aos óleos com valores de CIM para o óleo de LF superiores a 4096 µg/mL que foi a maior concentração testada. O óleo de LD performou uma melhor ação contra o *T. tonsurans* em relação ao óleo LF e o isolado *T. rubrum* foi a cepa que apresentou um perfil de maior sensibilidade, exibindo os menores valores de CIM e CFM, 1024 µg/mL e ≤512 µg/mL respectivamente.

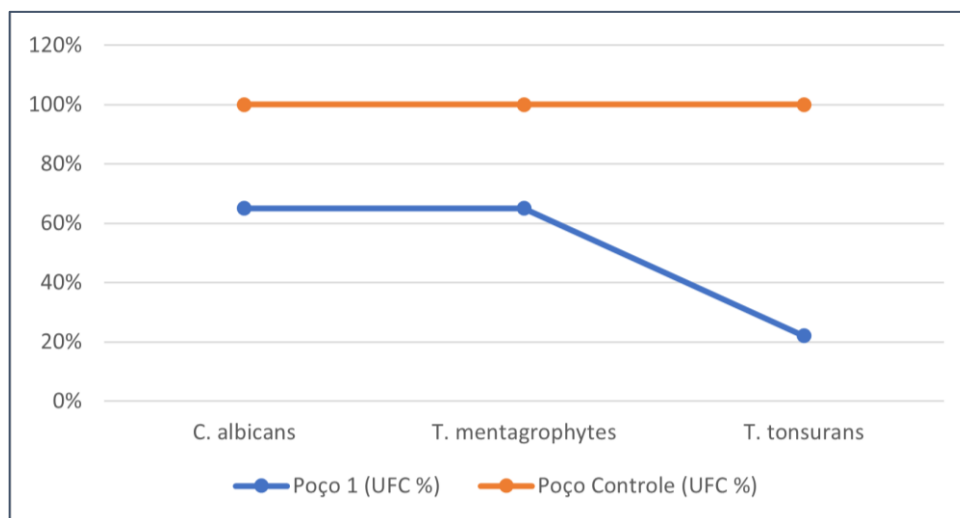
Tabela 1 – Valores de CIM e CFM dos óleos essenciais frente aos fungos.

Microrganismos	<i>L. angustifolia</i> (µg/mL)		<i>L. dentata</i> (µg/mL)		CET (µg/mL)	ANB (µg/mL)
	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	>4096	>4096	4096	4096	8	4
<i>T. mentagrophytes</i>	>4096	>4096	4096	4096	4	>16
<i>T. rubrum</i>	2048	1024	1024	≤512	0,25	8
<i>T. tonsurans</i>	>4096	>4096	2048	2048	8	>16

CET: Cetoconazol, ANB: Anfotericina B. Fonte: O autor.

Embora observado crescimento nos poços de maior concentração do óleo de LF para *C. albicans*, *T. mentagrophytes* e *T. tonsurans*, uma relação entre as contagens de colônias da CFM para o poço de controle de crescimento e o poço de maior concentração do óleo revelou que houve uma inibição de 65% do óleo LF frente a cepa padrão e ao *T. mentagrophytes* e 22% de inibição frente a cepa *T. tonsurans* podendo ser observados no gráfico 1.

Gráfico 1 – Relação de inibição do óleo essencial de *L. angustifolia* na sua maior concentração ao poço de controle de crescimento.



Fonte: Autor.

Segundo os laudos cromatográficos fornecidos pela empresa fabricante dos óleos (Anexo A *L. angustifolia*, Anexo B *L. dentata*), podemos verificar que o maior constituinte dos óleos é Acetato de Linalina (38,49%) e Linalol (38,45%) para *L. angustifolia*, 1,8 Cineol (62,02%) e (17,71%) β -Pineno para *L. dentata*.

Uma investigação realizada por De Oliveira *et al.* (2017) com alguns isolados de *T. rubrum* resistentes a fluconazol revelou que essas cepas eram sensíveis ao Linalol, com valores de CIM em torno de 256 $\mu\text{g/mL}$ a 512 $\mu\text{g/mL}$, enquanto valores de MIC de cetoconazol variaram de 4 $\mu\text{g/mL}$ a 8 $\mu\text{g/mL}$. Também foi observado que uma cepa teve seu crescimento micelial inibido pelo Linanol, principal constituinte do óleo essencial da *L. angustifolia*. Ainda segundo o autor, a interrupção da germinação dos conídios e consequente não formação micelial causados pela ação do óleo é um achado importante no entendimento dos mecanismos de ação antifúngica.

Inouye *et al.* (2006) analisaram a capacidade do vapor de óleos essenciais contra uma cepa de *T. mentagrophytes*. Dentre os óleos testados, a *L. angustifolia* foi capaz de causar a morte do fungo em 3 horas. Também foi reportado que o efeito era dose-dependente, além de que alguns óleos como o óleo do orégano teve um efeito mais sobressalente sobre o efeito de lise celular. Corroborando os estudos de Inouye *et al.*, Tullio *et al.* demonstraram em 2007 que os dermatófitos, em geral possuíam certa sensibilidade tanto ao vapor de óleos essenciais, como em ensaios de microdiluição. Os autores ainda teorizam que por serem ricos em compostos que

conferem um caráter hidrofóbico a sua estrutura, os terpenos vaporizam-se e se ligam por adsorção a parede celular do micélio de caráter lipofílico.

Em estudos de Morcia *et al.* (2012) e Shukla *et al.* (2012) foram observados que fungos patógenos de plantas possuíam forte sensibilidade ao composto 1,8-cineol. Esse composto compõe majoritariamente o óleo essencial da *L. dentata* o que pode explicar um perfil de sensibilidade dos Tricófitons ao óleo evidenciando que o composto possui algum efeito de modo geral aos fungos.

6 CONCLUSÃO

Nas condições apresentadas, foi observado que os óleos de Lavanda possuíram tanto atividade fungistática como fungicida e embora seja observado que os óleos essenciais possuam tal efeito, o mecanismo de ação contra os fungos ainda não é bem elucidado pois o estudo dos óleos essenciais e seus efeitos ainda é escasso.

Protocolos e normas para valores de CIM específicos para óleos essenciais ainda não foram estabelecidos e a busca de uma metodologia que consiga conciliar esses empecilhos metodológicos é desejada além disso se faz necessário a busca por uma metodologia específica para óleos essenciais uma vez que precisamos contornar sua hidrofobicidade, o que pode gerar erros metodológicos. Ainda vale a adição que resultados *in vitro* requerem mais estudos e testes para uma elucidação e uso prático desses efeitos observados.

REFERÊNCIAS

- ADAMUCHIO, G. L.; DESCHAMPS, C.; MACHADO, P. M. **Aspectos gerais sobre a cultura da Lavanda (*Lavandula* spp.)**. Rev. Bras. Pl. Med., Curitiba PR, v. 19, n. 4, p. 483-490, ago. 2017.
- ALLEGRIANI, J.; BOUCHBERG, M. S.; MAILLOLS, H. **Émulsions d'huiles essentielles, fabrication et applications en microbiologie**. Societé de Phamacie de Montpellier, v. 33, n. 1, p. 86, 1973.
- ALIGIANNIS, N. *et al.* **Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of Two *Origanum* Species**. J Agric Food Chem. 2001; v. 49(9) p. 4168-70. 2001.
- ALMEIDA, L. M. M. D. *et al.* **Resposta in vitro de fungos agentes de micoses cutâneas frente aos antifúngicos sistêmicos mais utilizados na dermatologia**. Anais Brasileiros de Dermatologia, Maringá PR, v. 84, n. 3, p. 250, abr. 2009.
- ASBAHANI, A. E. *et al.* **Essential oils: From extraction to encapsulation**. International Journal of Pharmaceutics, v. 483, n. 1-2, p. 220–243, 2015.
- BERGOLD, A. M; GEORGIADIS, S. **NOVIDADES EM FÁRMACOS ANTIFÚNGICOS: UMA REVISÃO**. Visão Acadêmica, Curitiba PR, v. 5, n. 2, p. 160-161, dez. 2004.
- BIBLICA NVI. **JÓ 9:9**, Livro de Jó, 2011.
- BONGOMIN, F. *et al.* **Global and multi-national prevalence of fungal diseases—estimate precision**. Journal of fungi (Basel, Switzerland), v. 3, n. 4, p. 57, 2017.
- BOSCARDIN, P. M. D. **Morfoanatomia, fitoquímica e atividade biológica de folhas de *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cambage – Myrtaceae**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.
- CASE, Nicola; HEITMAN, Joseph; E COHEN, Leah. **The Rise of Fungi: A Report on the CIFAR Program Fungal Kingdom: Threats & Opportunities Inaugural Meeting**. G3 Genes|Genomes|Genetics, [S. l.], v. 10, n. 6, p. 1837-1842, 1 jun. 2020.
- CASTRO, R. D.; LIMA, E. O. **Atividade antifúngica in vitro do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* L. sobre *Candida* spp.** Revista de Odontologia da UNESP, p. 179–184, 2010.
- CLARA APROTOSO AIE, Ana; GILLE, Elvira; TRIFAN, Adriana; SIMON LUCA, Vlad; MIRON, Anca. **Essential oils of *Lavandula* genus: a systematic review of their chemistry**. Phytochemistry Reviews, [S. l.], ano 2017, v. 16, p. 761-799, 3 jun. 2017.
- CLSI. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard - Second Edition**. CLSI document M38-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.

DE HOOG, G. S. *et al.* Toward a novel multilocus phylogenetic taxonomy for the dermatophytes. **Mycopathologia**, v. 182, n. 1–2, p. 5–31, 2017.

DE OLIVEIRA, M. I. L. *et al.* Investigation of the antifungal potential of linalool against clinical isolates of fluconazole resistant *Trichophyton rubrum*. **Journal de mycologie medicale**, v. 27, n. 2, p. 195–202, 2017.

DERESINSKI, Stanley C.; STEVENS, David A. **Caspofungin. REVIEWS OF ANTI-INFECTIVE AGENTS**, Califórnia, v. 36, n. 1, p. 1445, mai. 2003.

KIDD, S. *et al.* **Descriptions of Medical Fungi: Third edition.** [S.n.], p. 195-218, 2016.

FISHER, Matthew; HAWKINS, Nichola; SANGLARD, Dominique; GURR, Sarah. **Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security.** Science, [S. l.], ano 2018, v. 360, n. 6390, p. 739-742, 18 mai. 2018.

GALLIS, Harry A.; DREW, Richard H.; PICKARD, William W. **Amphotericin B: 30 Years of Clinical Experience.** REVIEWS OF INFECTIOUS DISEASES, Chicago, v. 12, n. 2, p. 308, abr. 1990.

GIACOMAZZI *et al.* **The burden of serious human fungal infections in Brazil.** Mycoses, [S. l.], ano 2016, v. 59, n. 3, p. 145-150, 2015.

GOODMAN & GILMAN. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica.** 9. ed. Rio de Janeiro, McGraw-Hill Interamericana editores. p.1436. 1996.

GRASER, Y. *et al.* **Molecular markers reveal exclusively clonal reproduction in *Trichophyton rubrum*.** J. Clin. Microbiol. v. 37, p. 3713-3717, 1999.

HAVLICKOVA, Blanka; CZAICA, Viktor; FRIEDRICH, Markus. **Epidemiological trends in skin mycoses worldwide.** Mycoses, [S. l.], ano 2008, v. 51, n. 4, p. 2-15, 28 ago. 2008.

Herbarium. Plantas y hongos. Disponível em: <https://www.plantasyhongos.es/herbarium/htm>. Acesso em: 30 out. 2022.

INOUE, S. *et al.* The vapor activity of oregano, perilla, tea tree, lavender, clove, and geranium oils against a *Trichophyton mentagrophytes* in a closed box. **Journal of infection and chemotherapy: official journal of the Japan Society of Chemotherapy**, v. 12, n. 6, p. 349–354, 2006.

JIANU, C. *et al.* **Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oils of Lavender (*Lavandula angustifolia*) and Lavandin (*Lavandula x intermedia*) Grown in Western Romania.** INTERNATIONAL JOURNAL OF AGRICULTURE & BIOLOGY, Romênia, v. 15, n. 4, p. 772-776, jan. 2013.

JUSTUS, B. **Morfoanatomia foliar e caulinar, Análise química e atividades biológicas de óleo volátil de *Lavandula dentata* L., LAMIACEAE.** Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2016.

KOROLKOVAS A. **Dicionário Terapêutico Guanabara 2002/2003**. 2002/2003 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. p.300. 2003.

LEVINSON, Warren. **Microbiologia Médica e Imunologia**. 13. ed. Porto Alegre: McGraw Hill Brasil, p. 383, 2016.

LIMA, K. D. M. *et al.* **Candida albicans and Candida tropicalis isolated from an HIV-positive patient suffering fingernail onychomycosis: Resistance to Fluconazole and Itraconazole**. Journal of Tropical Pathology, Recife PE, v. 37, n. 1, p. 57-64, abr. 2008.

LIS-BALCHIN, M; HART., S. **Studies on the mode of action of the essential oil of lavender (Lavandula angustifolia P. Miller)**. Phytother Res., Londres, v. 13, n. 6, p. 540-542, jan. 1999.

MARTINEZ, Roberto. **Atualização no uso de agentes antifúngicos: An update on the use of antifungal agents**. Jornal Brasileiro de Pneumologia, Ribeirão Preto SP, v. 32, n. 5, p. 449-460, fev. 2006.

MARTINS, R. D. P. **Caracterização química e avaliação da atividade antimicrobiana de óleos essenciais de Lavandula dentata L.**, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba MG, v. 1, n. 1, p. 18-28, 2018.

MORCIA, C. *et al.* **In vitro antifungal activity of terpinen-4-ol, eugenol, carvone, 1,8-cineole (eucalyptol) and thymol against mycotoxigenic plant pathogens**. Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment, v. 29, n. 3, p. 415–422, 2012.

MÉNDEZ-TOVAR, L. J. *et al.* Resistencia a compuestos azólicos de aislamientos clínicos de Trichophyton spp. **Revista iberoamericana de micología**, v. 24, n. 4, p. 320–322, 2007.

MENEZES, Everardo Albuquerque; MENDES, Luana Guabiraba; CUNHA, Francisco Afrânio. **Resistência a antifúngicos de Candida tropicalis isoladas no Estado do Ceará**. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Ceará CE, v. 42, n. 3, p. 354-355, mai. 2009.

NAKATSU, T. *et al.* **Biological activity of essential oils and their constituents. Studies in Natural Products Chemistry**, v. 21, p. 571–631, 2000.

ORLANDA, J. F. F. **Estudo da composição química e atividade biológica do óleo essencial de Ruta graveolens Linneau (RUTACEAE)**. Tese (doutorado) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2011.

PERES, N. T. D. A. *et al.* **Dermatófitos: interação patógeno-hospedeiro e resistência a antifúngicos**. Anais Brasileiros de Dermatologia, Ribeirão Preto SP, v. 85, n. 5, p. 658, out. 2010.

PEREIRA, DE LACERDA F. **ESTADO ATUAL DAS MICOSES CUTÂNEAS NO BRASIL - UMA REVISÃO NARRATIVA**. Monografia (TCC) - Curso de Medicina do UniCEUB - Centro Universitário de Brasília – UNICEUB Faculdade de Ciências da Educação e Saúde - FACES Curso de Medicina. Distrito Federal, p. 18. 2022.

PROCOP, G. W.; KONEMAN, E. W. **Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology**. 7. ed. Filadélfia, PA, USA: Lippincott Williams and Wilkins, p. 1911 2016.

QUINTERO, C. H. G. **Resistencia de levaduras del género Candida al fluconazol**. REVISTA INFECTIO. ASOCIACIÓN COLOMBIANA DE INFECTOLOGÍA, Colômbia, v. 14, n. 2, p. 172, ago. 2010.

SHUKLA, R. *et al.* **Antifungal, aflatoxin inhibition and antioxidant activity of Callistemon lanceolatus (Sm.) Sweet essential oil and its major component 1,8-cineole against fungal isolates from chickpea seeds**. Food control, v. 25, n. 1, p. 27–33, 2012.

TANG, C., KONG, X., AHMED, S.A. *et al.* **Taxonomy of the Trichophyton mentagrophytes/T. interdigitale Species Complex Harboring the Highly Virulent, Multiresistant Genotype T. indotineae**. Mycopathologia p.186, 315–326 abr. 2021.

TORTORA, Gerard J.; FUNKE, Berdell R.; CASE, Christine L. **MICROBIOLOGIA**. 12. ed. Porto Alegre, Brasil: Artmed Editora Ltda., 320-331 p. ISBN 978-85-8271-354-9. 2017.

TULLIO, V. *et al.* Antifungal activity of essential oils against filamentous fungi determined by broth microdilution and vapour contact methods. **Journal of applied microbiology**, v. 102, n. 6, p. 1544–1550, 2007.

WANKE, Bodo; LÁZERA, M. D. S; NUCCI, Marcio. **Fungal Infections in the Immunocompromised Host**. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro RJ, v. 95, n. 1, p. 154, nov. 2000.

WEITZMAN, I. *et al.* A survey of dermatophytes isolated from human patients in the United States from 1993 to 1995. Journal of the American Academy of Dermatology, v. 39, n. 2, p. 255–261, 1998.

WHITE, T. C. *et al.* **Generating and Testing Molecular Hypotheses in the Dermatophytes**. EUKARYOTIC CELL, Seattle WA, v. 7, n. 8, p. 1238-1245, ago. 2008.

Williams DA & Lemke TL. **Foye's Principles of Medicinal Chemistry**. 5a ed. Philadelphia, Lippincot Williams & Wilkins. p.1114. 2002.

YURI. **Trichophyton rubrum**. 2012a. 2 Fotografias. Disponível em: <http://thunderhouse4-yuri.blogspot.com/2012/02/trichophyton-rubrum.html>. Acesso em 28 de out. de 2022.

YURI. **Trichophyton tonsurans**. 2012b. 2 Fotografias. Disponível em: <http://thunderhouse4-yuri.blogspot.com/2012/09/microsporum-tonsurans.html>. Acesso em 29 de out. de 2022.

YURI. **Trichophyton mentagrophytes Complex**. 2013. 3 Fotografias. Disponível em: <http://thunderhouse4-yuri.blogspot.com/2013/04/trichophyton-mentagrophytes-complex.html>. Acesso em 28 de out. de 2022.

ANEXO A – Perfil Analítico do óleo essencial de *Lavandula angustifolia*

	Perfil analítico	Nº Revisão: 00
		Emissão: 03/2022
		Revisão: 09/2022
		Página 1 de 2

Identificação do Produto	
Nome	Óleo essencial Lavanda
Inci name	Lavandula Angustifolia Oil
CAS	8000-28-0
Nome Botânico	Lavandula angustifolia x Lavandula latifolia
Certificação botânica	Lavanda, Alfazema, Lavandin
Nome Popular	Lamiaceae
Família Botânica	Saint-Didier, Provence, França
Origem	Flores da Lavanda
Órgão da planta	Destilação por arraste a vapor
Método de extração	Não se aplica
Quimiotipo (QT)	Linalol, acetato de linalila.
Principais componentes	Lavandula angustifolia x Lavandula latifolia
Normas reguladoras	Norma ISO 3515:2002

Análises Físico-químicas				
Análises	Metodologia	Resultado	Especificação	Avaliação
Cor	MACQ003	Levemente amarelado	Incolor, levemente amarelo/esverdeado	Aprovado
Odor	MACQ001	Caraterístico	Característico	Aprovado
Aspecto	MACQ004	Líquido límpido	Líquido límpido	Aprovado
Impurezas	MACQ002	Isento	Isento	Aprovado
Densidade	MACQ005	0,885	0,877 – 0,897 g/cm ³	Aprovado
Índice de Refração	MACQ010	1,459	1,449 – 1,469	Aprovado

Cromatografia (CG/MS)	
Condições analíticas	Temperatura do injetor 250°C, Modo e injeção <i>Split</i> , Fluxo 1 mL min ⁻¹ , Gás de arraste: Hélio, Coluna capilar: DB-5MS (30mx0.25mmx0.25µm), Gradiente de temperatura do forno: temperatura inicial 60°C - 2min. taxa 4°C/min até 200°C e taxa 6°C/min até 260°C - 10min., Temperatura do detector de massas: 260°C, Temperatura da Fonte de ionização: 280°C e Modo de aquisição: <i>scan</i> .
Equipamento	Shimadzu, Modelo GCMS-QP2010 plus

WNF - World's Natural Fragrances
Rua Dr. Mario Pinto Serva, 65 • Casa Verde • São Paulo - SP • +55 11 3857-7790 • CNPJ

03.867.312/0001-95

www.wnf.com.br •    @wnfocial

Aromagia

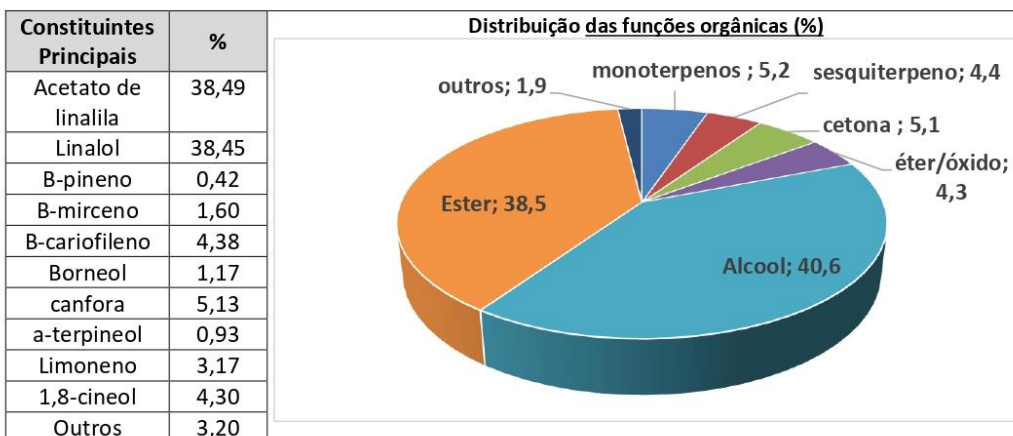
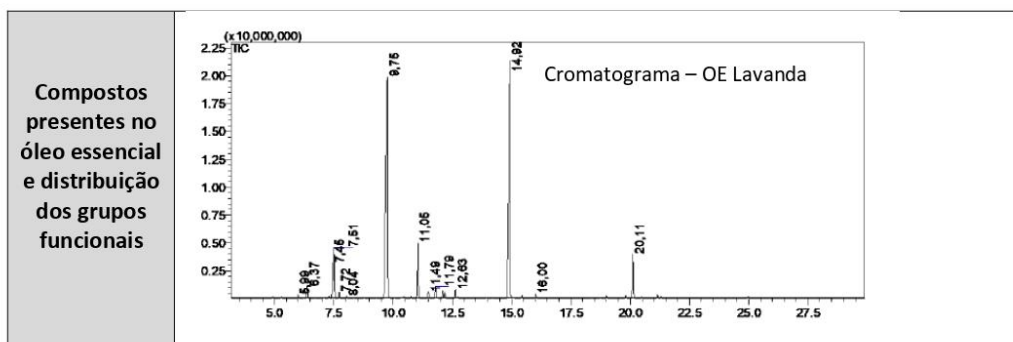
vegana

WNF

IMUNO

Citrojelly

	Perfil analítico	Nº Revisão: 00
		Emissão: 03/2022
		Revisão: 09/2022
		Página 2 de 2



Conclusão
Óleo aprovado de acordo com os padrões analíticos de qualidade.

WNF - World's Natural Fragrances
 Rua Dr. Mario Pinto Serva, 65 • Casa Verde • São Paulo - SP • +55 11 3857-7790 • CNPJ
 03.867.312/0001-95

www.wnf.com.br •    @wnfoficial

Aromagia

vegana



iMUNO

Citrojelly

ANEXO B – Perfil Analítico do óleo essencial de *Lavandula dentata*

	Perfil analítico	Nº Revisão: 00
		Emissão: 03/2022
		Revisão: 09/2022
		Página 1 de 2

Identificação do Produto	
Nome	Óleo essencial Lavanda Brasil
Inci name	Lavandula Dentata Flower/Leaf Oil
CAS	93165-50-5
Nome Botânico	Lavandula dentata
Certificação botânica	Herbário da UMC, voucher 7236
Nome Popular	Lavanda, Alfazema, lavanda brasileira
Família Botânica	Lamiaceae
Origem	Monte Verde, MG, Brasil
Órgão da planta	Partes aéreas da Lavanda
Método de extração	Destilação por arraste a vapor
Quimiotipo (QT)	Não se aplica
Principais componentes	1,8-cineol, B-pineno, Linalol
Normas reguladoras	Não se aplica.

Análises Físico-químicas				
Análises	Metodologia	Resultado	Especificação	Avaliação
Cor	MACQ001	Amarelo palha	Amarelo palha	Aprovado
Odor	MACQ002	Característico	Característico	Aprovado
Aspecto	MACQ003	Líquido límpido	Líquido límpido	Aprovado
Impurezas	MACQ004	Isento	Isento	Aprovado
Densidade	MACQ005	0,915	0,885 – 0,915g/cm ³	Aprovado
Índice de Refração	MACQ010	1,468	1,450– 1,480	Aprovado

Cromatografia (CG/MS)	
Condições analíticas	Temperatura do injetor 250°C, Modo e injeção <i>Split</i> , Fluxo 1 mL min ⁻¹ , Gás de arraste: Hélio, Coluna capilar: DB-5MS (30mx0.25mmx0.25µm), Gradiente de temperatura do forno: temperatura inicial 60°C - 2min. taxa 4°C/min até 200°C e taxa 6°C/min até 260°C - 10min., Temperatura do detector de massas: 260°C, Temperatura da Fonte de ionização: 280°C e Modo de aquisição: <i>scan</i>
Equipamento	Shimadzu, Modelo GCMS-QP2010 plus

WNF - World's Natural Fragrances
Rua Dr. Mario Pinto Serva, 65 • Casa Verde • São Paulo - SP • +55 11 3857-7790 • CNPJ

03.867.312/0001-95

www.wnf.com.br •    @wnfoficial

Aromagia

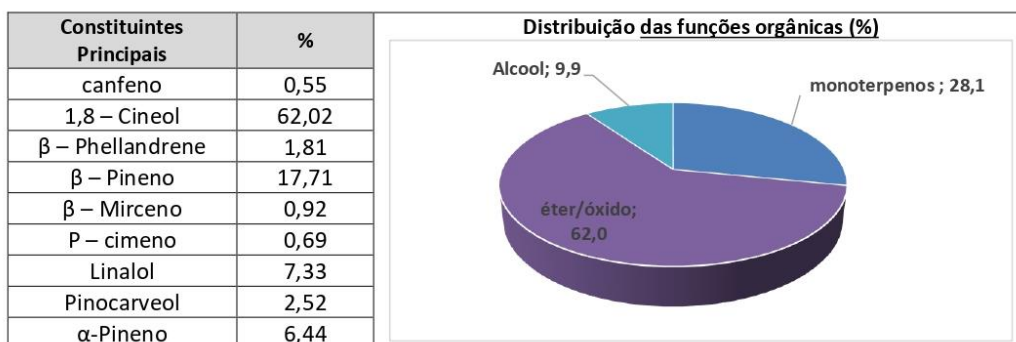
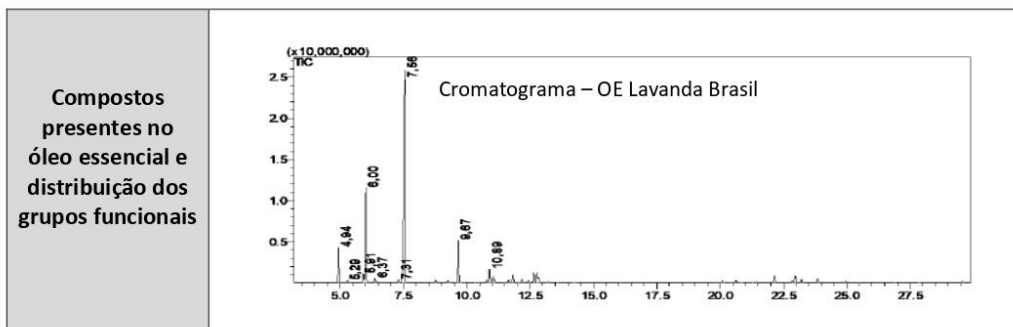
vegana

WNF

IMUNO

Citrojelly

	Perfil analítico	Nº Revisão: 00
		Emissão: 03/2022
		Revisão: 09/2022
		Página 2 de 2



Conclusão
Óleo aprovado de acordo com os padrões analíticos de qualidade.

WNF - World's Natural Fragrances
 Rua Dr. Mario Pinto Serva, 65 • Casa Verde • São Paulo - SP • +55 11 3857-7790 • CNPJ
 03.867.312/0001-95

www.wnf.com.br •    @wnfofficial

Aromagia

vegana



iMUNO

Citrojelly