

**CURSO DE FARMÁCIA**

Kátia Daniele Gomes Scherer

**ATIVIDADE ANTIFUNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL *Syzygium aromaticum*  
(CRAVO-DA-ÍNDIA) EM AGENTES CAUSADORES DE ONICOMICOSSES**

Santa Cruz do Sul  
2017

Kátia Daniele Gomes Scherer

**ATIVIDADE ANTIFUNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL *Syzygium aromaticum*  
(CRAVO-DA-ÍNDIA) EM AGENTES CAUSADORES DE ONICOMICOSSES**

Projeto de pesquisa apresentado à disciplina de Trabalho de Curso II, do Curso de Farmácia da Universidade de Santa Cruz do Sul.

Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Jane Dagmar Pollo Renner

Santa Cruz do Sul  
2017

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me fortalecer nessa jornada e que mesmo com tantos percalços me trouxe até aqui.

Ao meu marido, Márcio Scherer, não há palavras para descrever teu amor, companheirismo, compreensão e apoio incondicional. Nada teria sido possível se não fosse por ti.

À minha filha, Samantha Scherer, minha luz e a razão de toda a minha existência, obrigado pelo amor, carinho e paciência, por entender minhas ausências, vibrando comigo a cada vitória conquistada. Te amo infinitamente.

Aos meus pais, Inge e Adriano, que desde o início estiveram ao meu lado me apoiando e me dando forças para prosseguir.

À minha afilhada, Julia Frozza, minha providência divina, que em um momento de grandes questionamentos e uma vontade enorme de desistir, veio para me alegrar e renovar minhas forças.

À minha irmã, Adriane Gomes, por estar sempre ao meu lado, alegrando meus dias e me incentivando. Essa conquista também é tua maninha.

À minha colega e amiga, Julia Muller Trevisan, pela grandeza, generosidade e amizade. Obrigado pela mão estendida sempre que precisei, tua ajuda e teu apoio foram essenciais.

À minha orientadora, Jane Dagmar Pollo Renner, por todo apoio e ajuda, dividindo conhecimentos e alegrando os meus dias.

**“Combati o bom combate, terminei a corrida, guardei a fé.”**

**2 TIMÓTEO 4:7.**

## RESUMO

As onicomicoses são infecções fúngicas cada vez mais recorrentes e têm se tornado um problema de saúde pública mundial. Essas infecções que acometem as unhas das mãos e dos pés, podem comprometer o bem estar do paciente, causando desde desconfortos estéticos e ao caminhar, como também causar complicações graves, sobretudo em pacientes imunocomprometidos. Os tratamentos farmacológicos das onicomicoses são geralmente de alto custo financeiro, de longa duração, com alto risco de acarretar reações adversas e não raro, baixa eficácia. Cerca de 25% dos casos, a terapêutica não apresenta resultado satisfatório, levando a necessidade da busca por novos compostos, uma vez que o uso irracional desses medicamentos têm criado microrganismos resistentes aos principais antifúngicos. Desta forma, este trabalho avaliou a atividade antifúngica do eugenol, componente majoritário do óleo essencial do cravo-da-Índia frente aos principais causadores de onicomicoses, *T. rubrum*, *Candida albicans* e *Candida glabrata*. A determinação da CIM e a avaliação da atividade antifúngica ocorreu de forma individual para cada microrganismo e grupos de controle foram utilizados como parâmetro referencial. Para a avaliação da atividade antifúngica o óleo essencial foi adicionado ao meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar) a aproximadamente 45°C a fim de se obter concentrações de 1,25; 2,5; 3,75 e 5%, em que cada concentração representou um tratamento. Placas de Petry somente com meio BDA, sem adição de óleo essencial foram utilizadas como testemunha. Discos de 5mm com crescimento fúngico *T. rubrum* cultivados durante 8 dias foram repicados para o centro das placas contendo as respectivas concentrações do óleo essencial. Para a avaliação da CIM, o óleo essencial foi diluído de forma seriada, mediante emprego da técnica de microdiluição. A determinação da CIM foi realizada em placas de microdiluição de 96 poços, dispostos em 12 colunas (1 a 12) e 8 linhas (A a H). O óleo essencial apresentou atividade antifúngica frente a todos os microrganismos testados.

**Palavras-chave:** Onicomicose. Antifúngicos. Eugenol. Óleo Essencial. Cravo-da-Índia

## ABSTRACT

Onychomycoses are increasingly recurrent fungal infections and have become a worldwide public health problem. These infections that affect the nails of the hands and feet can compromise the patient's well-being, causing aesthetic discomfort when walking, as well as causing serious complications, especially in immunocompromised patients. The pharmacological treatments of onychomycosis are generally of high financial cost, long duration, with high risk of causing adverse reactions and not infrequently, low efficacy. About 25% of the cases, the therapy does not present a satisfactory result, necessitating the search for new compounds, since the irrational use of these drugs has created microorganisms resistant to the main antifungal agents. Thus, this work evaluated the antifungal activity of eugenol, a major component of the essential oil of the Indian clove against the main causative agents of onychomycosis, *T. rubrum*, *Candida albicans* and *Candida glabrata*. The determination of MIC and evaluation of antifungal activity occurred individually for each microorganism and control groups were used as a reference parameter. For the evaluation of the antifungal activity, the essential oil was added to the BDA (Potato-Dextrose-Agar) medium at approximately 45 ° C in order to obtain concentrations of 1.25; 2.5; 3.75 and 5%, where each concentration represented a treatment. Petri dishes with BDA medium, without addition of essential oil were used as controls. 5mm disks with fungal growth *T. rubrum* grown for 8 days were peeled to the center of the plates containing the respective concentrations of the essential oil. For the evaluation of the MIC, the essential oil was serially diluted using the microdilution technique. MIC determination was performed in 96 well microdilution plates, arranged in 12 columns (1 to 12) and 8 lines (A to H). The essential oil presented antifungal activity against all tested microorganisms.

**KEYWORDS:** Onychomycoses. Antifungal agents. Eugenol. Essential oil. *Syzygium aromaticum*

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>7</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>9</b>
2.1 Objetivo geral .....	9
2.2 Objetivos específicos .....	9
<b>3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	<b>10</b>
3.1 Anatomia da unha .....	10
3.2 Onicomicoses .....	11
3.3 Os fungos .....	12
3.4 Fungos dermatófitos.....	13
3.4.1 <i>Trichophyton rubrum</i> .....	14
3.5 Fungos não dermatófitos.....	15
3.5.1 <i>Candida albicans</i> .....	15
3.5.2 <i>Candida glabrata</i> .....	15
3.6 Terapias antifúngicas .....	16
3.6.1 Terapia farmacológica sistêmica .....	17
3.6.2 Terapia farmacológica tópica .....	18
3.7 Resistência antifúngica.....	19
3.8 Óleo essencial de <i>Syzygium aromaticum</i> (L.) Merr. & Perry .....	19
<b>4 ARTIGO</b> .....	<b>21</b>
<b>5 CONCLUSÃO</b> .....	<b>32</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>33</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>38</b>
ANEXO 1 – NORMAS PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA “JOURNAL OF FUNGI”	39

## 1 INTRODUÇÃO

As onicomicoses são infecções fúngicas que acometem as unhas das mãos e dos pés. Os fungos dermatófitos são os principais causadores dessa patologia, correspondendo cerca de 90% das infecções. Também podem ser provocadas por fungos não dermatófitos e leveduras (MARTINEZ et al., 2014). Estima-se que sua incidência e prevalência sejam de 2% e 13%, respectivamente (COLEMAN et al., 2014). Essas infecções têm se tornado um problema de saúde pública mundial, não apenas pela preocupação estética e cosmética, mas também por causar dor e desconforto e comprometer o bem estar dos pacientes, sobretudo naqueles que apresentam condição de imunossusceptibilidade como diabéticos e idosos (LASENNA; TOSTI, 2015).

O tratamento das onicomicoses é geralmente direcionado ao microrganismo agressor, levando em consideração o grau de comprometimento da unha, possíveis efeitos colaterais e comorbidades do paciente (COLEMAN et al., 2014). Esses tratamentos geralmente são longos, de custo elevado e com altos riscos de recidiva. Os tratamentos de uso oral apresentam alto potencial de dano à órgãos e interação com outros medicamentos, no entanto são considerados mais eficazes. Os medicamentos de uso tópico, por sua vez, são mais seguros, porém apresentam a desvantagem do tempo de tratamento prolongado e da baixa eficácia terapêutica (5% a 12%), tendo em vista a dificuldade de penetração dos fármacos na estrutura da unha (GHANNOUM; ISHAN, 2014; FLINT et al., 2014).

O uso indiscriminado de antifúngicos propiciou o surgimento de espécies multirresistentes aos fármacos convencionais. Os antifúngicos considerados de primeira escolha, sobretudo para os fungos dermatófitos e não dermatófitos (BACKES et al., 2015; AGBULU et al., 2015, GHELARDI et al., 2014) e novos fungos patógenos oportunistas isolados de pacientes imunocomprometidos se tornaram intrinsecamente resistentes, com a resistência desenvolvida em resposta à exposição à droga durante o tratamento (TILLOTSON et al., 2015). Este aumento do número de pacientes imunocomprometidos, associado a uma maior resistência por partes destas espécies de fungos, impõe um desafio à indústria farmacêutica na busca por novos agentes terapêuticos que apresentam maior segurança, eficácia e baixa toxicidade (MARIN et al., 2015).

A descoberta da penicilina, em 1928, impulsionou a busca por novos agentes terapêuticos a partir das plantas, que representam uma fonte importante de compostos com atividade biológica (FLAMBÓ, 2013). Muitos desses compostos são originários do metabolismo secundário dos vegetais, como por exemplo, os fenilpropanoides que apresentam importantes



propriedades antifúngicas (FREIESLEBEN et al., 2014). Entre os compostos, o eugenol torna-se um importante alvo para pesquisas, pois apresenta ação contra fungos filamentosos (KHAN et al., 2012) e leveduras (DE PAULA et al., 2014).

As unhas desempenham um papel importante na proteção das extremidades dos dedos e nas mãos têm função importante na discriminação tátil para manipulação de pequenos objetos (GOMES et al., 2012).

Os tratamentos convencionais das onicomicoses podem ser de uso tópico ou oral. Esses tratamentos são longos, de custo elevado e podem ocorrer falhas terapêuticas, recidiva e reinfeção. Outro fator relevante é a falta de adesão do paciente, que na maioria das vezes deve-se aos inúmeros efeitos adversos, atribuídos à terapia medicamentosa oral. A terapia tópica, mesmo apresentando baixa toxicidade, não é a melhor escolha terapêutica por demandar um tempo de tratamento maior que a terapia medicamentosa oral. Os fármacos tópicos dispõem de baixa eficácia devido a estrutura da unha e conseqüentemente a dificuldade do fármaco para chegar até o sítio de ação, e também a baixa adesão ao tratamento, visto que esses fármacos apresentam um custo elevado (GHANNOUM; ISHAN, 2014; FLINT et al., 2014).

As falhas na identificação do microrganismo causador da onicomicose e o uso indiscriminado de antifúngicos propiciaram o surgimento de espécies resistentes aos principais antifúngicos utilizados, demonstrando a necessidade de se descobrir novos agentes terapêuticos eficazes e de baixa toxicidade (FLAMBÓ, 2013; COLEMAN et al., 2014).

Dentro desse contexto, o presente estudo tem como objetivo avaliar a atividade antifúngica do eugenol, constituinte majoritário do óleo essencial de cravo-da-índia, frente a *Trichophyton rubrum*, *Candida albicans* e *Candida glabrata*, alguns dos principais agentes causadores das onicomicoses.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar a atividade antifúngica *in vitro* do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* frente a *T. rubrum*, *Candida glabrata* e *Candida albicans*.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* frente a *T. rubrum*, *Candida glabrata* e *Candida albicans*, alguns dos principais causadores de onicomicoses.

### 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1 Anatomia da unha

As unhas, também chamadas de aparelho ungueal são placas córneas, semirrígidas, que se dispõem sobre a superfície dorsal das falanges terminais dos dedos das mãos e dos pés. São formadas por quatro epitélios próprios: matriz ungueal, leito ungueal, prega ungueal proximal e hiponíquio. A partir da proliferação celular da matriz, que é um epitélio germinativo, origina-se uma estrutura de múltiplas camadas de células córneas que cobrem o leito, chamada prato ungueal (GOMES et al., 2012).

A estrutura ungueal é compreendida pela matriz que se estende 6 mm abaixo da dobra proximal, também chamado de prato ungueal. Essa estrutura retangular e translúcida, apresenta cor rósea devido aos capilares presentes no leito ungueal, localizado logo abaixo dela. Em sua porção proximal encontra-se a lúnula, com formato de semicírculo e possui aparência esbranquiçada, sendo responsável pela produção de células que formarão a placa ungueal. O leito ungueal corresponde a porção que vai desde a lúnula até o hiponíquio, consiste basicamente na pele presente abaixo da placa ungueal (BARAN et al., 2011).

O eponíquio, também chamado de dobra ungueal corresponde a extremidade da prega proximal que se dobra para trás, com o objetivo de fornecer uma camada epidérmica para a placa ungueal que está sendo formada. Essa camada muito fina é a cutícula que junto com o eponíquio formam uma vedação protetora. O hiponíquio, por sua vez, é um epitélio presente abaixo da placa ungueal, na união entre a borda livre e a pele na ponta do dedo, ela marca o local em que a placa se separa do tecido. Essa porção também promove uma vedação, protegendo o leito ungueal (KUMAR et al., 2013).

De acordo com Gomes, Lencastre e Lopes (2012), a formação da unha se inicia a partir da nona semana de vida embrionária, apresentando o prato ungueal já visível a partir da décima terceira semana gestacional, que a partir desse momento passa a adquirir gradualmente consistência e rigidez. Em condições fisiológicas normais, as unhas crescem em média 3mm por mês, sendo 0,1 mm/dia nas mãos e 1 mm/mês nos pés. No entanto, condições como a desnutrição e doenças graves podem interferir nesse crescimento, diminuindo sua velocidade ou até a paragem temporária do mesmo. As unhas têm a função de proteger a extremidade dos dedos e atuação na manipulação de pequenos objetos. Tendo importante papel também na discriminação tátil (GOMES et al., 2012).

Estruturalmente, as unhas são uma estrutura rígida e impermeável, isso se deve as suas ligações de hidrogênio e dissulfeto entre suas moléculas de queratina, sendo assim uma das

estruturas mais rígidas do corpo humano. É composta basicamente por  $\alpha$ -queratina, enxofre e pequena porção de lipídios (CHOUGHAN et al., 2012).

### 3.2 Onicomicoses

As onicomicoses são infecções fúngicas crônicas de unha. Mesmo não sendo uma patologia com riscos fatais, as onicomicoses podem interferir na qualidade de vida do paciente. Caracteriza-se pela descoloração, espessamento e deformação das unhas e pode ser causada por dermatófitos, não-dermatófitos e leveduras. A prevalência das espécies varia de acordo com características específicas como localização geográfica e o clima (JO SIU et al., 2003).

Essas infecções fúngicas acometem a lâmina ungueal e os tecidos circundantes, sendo responsável por 50% das lesões ungueais. Sua prevalência é de 18,2% em idosos e 3% em adultos com idade inferior a 55 anos. Quanto ao sexo, tanto homens quanto mulheres podem ser acometidos, com uma proporção de 3 homens para cada mulher infectada (DELL ROSSO, 2014; GHANNOUM; ISHAM, 2014; BARAN; NAKAMURA, 2011).

Peres e colaboradores (2010) sugerem que a prevalência é menor em mulheres devido a progesterona, hormônio sexual esteroide, que é essencial para o equilíbrio ovariano e para a gravidez. Esse esteroide poderia inibir o crescimento de fungos antropofílicos com dose-dependente, isso porque as proteínas do citosol do microrganismo se ligariam especificamente ao hormônio, causando o efeito antidermatofítico.

As micoses cutâneas são classificadas segundo a extensão do comprometimento e a porção acometida. Sendo 5 tipos: a) Onicomicose subungueal distal e lateral; b) Onicomicose superficial; c) Onicomicose subungueal proximal; d) Onicomicose do tipo endonyx; e) Onicomicose com distrofia total (SCHECHTMAN, 2011).

Essas infecções fúngicas necessitam tratamento farmacológico, sendo este muitas vezes de longa duração e não raro, sem resposta terapêutica. Dentre as micoses superficiais, essa é a mais comum e com maior dificuldade de diagnóstico e tratamento devido aos fatores intrínsecos da unha. Além da idade, comprometimento imunológico e trauma nas unhas serem fatores predisponentes ao aparecimento de onicomicoses, o fator genético também pode ser considerado um fator de risco (GHANNOUM; ISHAM, 2014).

Mesmo não apresentando risco fatal para os pacientes imunocomprometidos, ela pode acarretar desconforto, como dor ao caminhar e dificuldade de cortar as unhas (MARTINEZ et al., 2013). Pacientes portadores de diabetes, que desenvolvem onicomicoses, tem um aumento de até três vezes as chances de apresentarem morbidades como úlceras e gangrenas nos pés,

quando comparados a pacientes diabéticos que não apresentam essa condição (LASENNA; TOSTI, 2015).

A onicomicose é causada com maior frequência por fungos dermatófitos e, em uma porcentagem menor, por não dermatófitos como *Candida* spp., *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp., *Scopulariopsis* spp., *Scytalidium* spp. entre outros (DELL-ROSSO, 2014). Nas unhas dos pés, a prevalência é maior das espécies *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Epidermophyton floccosum*, enquanto que nas mãos, as leveduras do gênero *Candida* são as mais prevalentes (MARTINEZ et al., 2013). Segundo Ghannoum e Ishan (2014) são critérios de cura para a onicomicose o reestabelecimento da aparência normal da unha (cura clínica) e a cura micológica, através de exames micológicos diretos e cultura apresentando ausência dos microrganismos.

### 3.3 Os fungos

Os fungos são microrganismos eucariontes pertencentes ao reino Fungi. Possuem parede celular, importante na manutenção da forma e integridade da célula, protegendo contra injúrias do ambiente (ENE et al., 2015). Essa parede é composta de 90% de polissacarídeos, com um núcleo central  $\beta$ -1,3 glucano-quitina ramificado (LATGÉ, 2007). A composição da parede celular constitui um fator importante na patogenicidade, apresentando uma correlação direta entre a virulência, alterações químicas e dimorfismo celular (MARTINEZ-ROSSI et al., 2008). A coloração das colônias se deve a presença de pigmentos polifenólicos na parede celular juntamente com os pigmentos presentes nos fluidos (LOGUERCIO-LEITE et al., 2007).

A membrana plasmática fúngica é uma bicamada lipídica que se difere da membrana plasmática animal pela presença da substância ergosterol em substituição ao colesterol. O ergosterol tem função importante na fluidez da membrana desses microrganismos, bem como na sua estrutura e permeabilidade. Outro fator importante no que se refere ao ergosterol é o fato de que baseado em sua presença se constitui a estratégia para a maioria dos compostos antifúngicos (ALCAZAR-FUOLI; MELADO, 2013; KAVANAGH, 2005). Os principais mecanismos antifúngicos são baseados na inibição da síntese do ergosterol através de dois efeitos principais: O primeiro, através de alterações na fluidez, função e permeabilidade da membrana celular e o segundo efeito é o acúmulo de intermediários da biossíntese, que se tornam tóxicos as células fúngicas (MÜLLER et al., 2013).

### 3.4 Fungos dermatófitos

Os fungos dermatófitos são compreendidos por três gêneros: *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton* (GHANNOUM; ISHAM, 2014). Tais gêneros, apresentam semelhanças acerca de sua taxonomia (COSTA et al., 2002), limites de infectividade e antigenicidade. Contudo, apresentam diferenças quanto as suas exigências nutricionais para o seu crescimento e também sobre o perfil enzimático (PEREIRA, 2009).

Esses microrganismos são considerados queratinolíticos (URIBE; CARDONA-CASTRO, 2013), isto é, apresentam a habilidade de invadir o extrato córneo da pele e de outros tecidos queratinizados de homens e animais, resultando no aparecimento das chamadas tineas (COSTA et al., 2002). Essa habilidade se deve ao fato desses microrganismos utilizarem substratos de queratina como fonte de carbono, nitrogênio e enxofre (MARTINEZ-ROSSI et al., 2008).

Os fungos dermatófitos também podem ser classificados em antropofílicos, zoofílicos e geofílicos, segundo sua origem. Os antropofílicos são aqueles que permanecem viáveis parasitando o homem, são responsáveis por cerca de 70% dos casos de dermatofitoses, provocam infecções crônicas e de progressão lenta. Os zoofílicos, por sua vez, parasitam animais e respondem por cerca de 30% das dermatofitoses humanas, causando infecções agudas. Os geofílicos são encontrados em solos ricos em resíduos de queratina humana ou animal (PERES et al., 2010; URIBE; CARDONA-CASTRO, 2013).

Todos os dermatófitos originaram-se do solo, onde viviam na forma de sapróbios. A partir da evolução, adquiriram a capacidade de degradar a queratina presente nesses ambientes, como cabelos, pelos e descamação de pele de animais que habitavam aquele espaço, tornando-se assim, capazes de parasitar animais, o que lhes conferiu o gênero zoofílico. Em consequência da adaptação do parasitismo a essas espécies foi possível o desenvolvimento da parasitologia em humanos, surgindo assim, os fungos antropofílicos (PEREIRA, 2009).

O aumento da prevalência e incidência das infecções causadas por dermatofitoses constituem um modelo preocupante, sobretudo pelo aumento do uso dos antifúngicos que favorece cada vez mais o aparecimento de espécies resistentes aos tratamentos convencionais (NASERI et al., 2013; SOARES et al., 2013).

O grau de severidade das infecções causadas por esses fungos depende diretamente do agente etiológico e do estado imunológico do hospedeiro. Em hospedeiros, cujo sistema imunológico não esteja comprometido, essas infecções dificilmente conseguem penetrar as camadas mais profundas da pele, ficando restritas apenas à camada córnea. No entanto, ao apresentar um estado de imunidade comprometido, os indivíduos acometidos com essas

infecções podem apresentar nódulos de caráter inflamatório, os chamados granulomas, esses nódulos formados basicamente de macrófagos, têm a função de isolar o fungo que o organismo foi incapaz de excretar (PERES et al., 2010; SOARES et al., 2013).

Clinicamente, as dermatofitoses são classificadas segundo seu sítio anatômico de acometimento, utilizando-se o termo *tinea* para todas as dermatofitoses. Acrescentando-se ao termo, a localização da infecção, tendo assim: *Tinea capitis* (cabeça); *Tinea corporis* (corpo); *Tinea cruris* (virilha); *Tinea unguium* (unha); *Tinea barbae* (barba); *Tinea manuum* (mãos); *Tinea pedis* (pés) (KAVANAGH, 2005):

As infecções causadas por esses microrganismos acometem entre 20 a 25% da população (NASERI et al., 2013). A prevalência de onicomicoses é maior em idosos, isso pode ser atribuído a vários fatores, dentre os quais estão a redução da circulação sanguínea, baixa imunidade, presença de comorbidades como o diabetes, injúrias e irregularidades na superfície da unha (ADAMS et al., 2015).

O aumento dessas infecções tem se tornado um fator preocupante. Isso pode ser atribuído a epidemia de Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (SIA), uso irracional de corticoides e antibióticos, uso de imunossupressores em transplantados, atividades físicas comunitárias e em academias de ginástica. Essas infecções podem causar uma redução na qualidade de vida do paciente, bem como sua autoestima (ARAÚJO et al., 2003; MARTELOZO et al., 2005). Em pacientes portadores de diabetes *mellitus* podem ocorrer complicações ainda maiores, como amputações.

A infecção inicia-se após a deposição de artroconídios no sítio. Essa deposição é favorecida quando o sítio já apresenta lesões pré-existentes e através da ação queratinolítica do fungo. A germinação do conídio é rápida e as hifas dos fungos penetram nas estruturas queratinizadas. Após o processo de adesão, inicia-se a síntese de proteases, lipases, elastases, colagenases, fosfatases e protagenases, que metabolizam moléculas presentes no tecido do hospedeiro e suprem necessidades nutricionais para o desenvolvimento do microrganismo. Essas enzimas também são consideradas fatores de virulência, estabelecendo-se assim uma relação direta entre a atividade queratinolítica e a patogenicidade do fungo (MARTINEZ-ROSSI et al., 2008; PERES et al., 2010).

### **3.4.1 *Trichophyton rubrum***

Entre os dermatófitos, o *T. rubrum* é o mais frequente, provocando lesões na pele e nas unhas (GHELARDI et al., 2014). As infecções causadas por esse fungo tendem a ser persistentes e recorrentes em cerca de 70% dos casos (PEREIRA, 2009). Isso ocorre, devido a

adaptação ao hospedeiro humano, que adquire habilidade para escapar das defesas do organismo, se mantendo como uma infecção residual. Sua transmissão ocorre de forma inter-humana ou através de objetos de uso pessoal contaminados (SIDRIM; ROCHA, 2014).

Suas colônias são de coloração branca, com aspecto cotonoso (algodão) a aveludado. O reverso da colônia apresenta pigmentação avermelhada púrpura (RODRIGUES, 2007), mas também podem ser observadas diferentes tonalidades de castanho (SIDRIM; ROCHA, 2014). O crescimento das colônias ocorre entre 7 a 14 dias, apresentando pregas radiais formando uma saliência no centro. Microscopicamente, apresenta hifas septadas hialinas, microconídios em forma de gota que se dispõem ao longo das hifas ou em cachos e raros macroconídios (RODRIGUES, 2007; PEREIRA, 2009).

Em ensaios de identificação, é possível diferencia-lo do *T. mentagrophytes* através do teste *in vitro* de perfuração de pelo e teste de urease no meio *Christensen*. O *T. rubrum*, ao contrário do *T. mentagrophytes* não apresenta capacidade de perfurar o pelo e não hidrolisa a ureia (PEREIRA, 2009).

### **3.5 Fungos não dermatófitos**

#### **3.5.1 *Candida albicans***

A *Candida albicans* é o principal agente etiológico do gênero *Candida*. São comensais e oportunistas, fazendo parte da microbiota normal das regiões mucocutânea, genitourinária e gastrintestinal humana (MURRAY, et al., 2004; LIMA et al., 2006).

Suas colônias apresentam textura cremosa, de coloração e odor característicos. Microscopicamente, formam blastoconídios esféricos ou levemente ovalados, podendo apresentar pseudo-hifas. A transição entre as formas de hifa e leveduriforme é considerada seu maior fator de virulência (MURRAY, et al., 2004; PETERS, et al., 2014).

Conforme relatado na literatura, existem casos de resistência dessas leveduras aos azólicos (terapia convencional das onicomicoses), quando em pacientes de uso prolongado dessas substâncias (LIMA et al., 2006; LIMA et al., 2009; KHAN et al., 2015).

#### **3.5.2 *Candida glabrata***

A *C. glabrata* foi inicialmente classificada como sendo pertencente ao gênero *Torulopsis glabrata*, uma vez que se observava a ausência de produção de hifas. No entanto, em 1980, descobriu-se que essa característica não poderia ser utilizada para diferenciação dos gêneros,



passando então a ser classificada como *Candida*. Além da não produção de hifas, a *C. glabrata* apresenta outras diferenças significativas quando comparadas as outras espécies desse gênero, não é dimórfica e cresce como blastoconídeos, expressivamente menores quando comparados aos da *C. albicans* (SILVA et al., 2012). Dependendo da região do planeta em que se refere, a *C. glabrata* ocupa o 2º ou 3º lugar dos gêneros envolvidos nas candidoses, logo depois da *C. albicans* (JANDRIC; SCHÜLLER, 2011).

Suas colônias são pequenas, convexas e brilhantes e apresentam superfície lisa quando inoculadas em meio SDA (*Sabouraud Dextrose Ágar*) (MINAMI, 2003). Algumas características da *C. glabrata* permitem com que se efetue facilmente a diferenciação da *C. albicans*, seu genoma haploide, com células mais esféricas do que alongadas, a ausência de tubos germinativos e sua capacidade de fermentar unicamente glucose e trealose (SILVA et al., 2012). Outra característica desse gênero refere-se ao seu crescimento, que torna-se relativamente lento, quando comparado a *C. albicans* em meio de cultura necessitando de pelo menos 48 horas de incubação até seu crescimento completo (KIRAZ et al., 2010).

### **3.6 Terapias antifúngicas**

Para uma terapia antifúngica ser considerada adequada, deve ser levado em consideração o microrganismo envolvido, a condição imunológica do paciente e o sítio acometido. A maior limitação no desenvolvimento de antifúngicos refere-se a característica dos fungos, que por serem microrganismos eucariotos apresentam alvos celulares bastante limitados, causando a dificuldade em desenvolver antifúngicos específicos e com baixa toxicidade às células do hospedeiro (SOARES et al., 2013; MURRAY et al., 2014; DELARZE; SANGLARD, 2015).

Outro fator importante a ser considerado é a mudança na etiologia das onicomicoses. Para uma terapia correta e eficaz, é imprescindível que se determine corretamente o agente etiológico através de exames laboratoriais, uma vez que diferentes microrganismos respondem de forma diferenciada aos antifúngicos (MARTELOZO et al., 2005). A estrutura densa da unha e sua pouca vascularização dificultam a penetração de fármacos de terapias sistêmicas, resultando em um tratamento complexo e prolongado (DEL-ROSSO et al., 2014).

Para melhores resultados a curto e longo prazo no tratamento das onicomicoses, Gupta e Paquet (2013) sugerem cinco estratégias a serem adotadas: tratamento segundo o ciclo biológico dos fungos, modificações de dosagem, terapias conciliadas, manejos para otimização da liberação do fármaco e cuidados profiláticos.

### 3.6.1 Terapia farmacológica sistêmica

Os fármacos disponíveis para infecções fúngicas sistêmicas é bastante limitado. Muitos desses fármacos já tiveram seus alvos de ação elucidados, como a respiração mitocondrial, a integridade da parede e/ou membrana das células, a divisão celular, a síntese de proteínas e a transdução de sinais. Contudo, esses fármacos podem apresentar citotoxicidade para as células do hospedeiro, que se deve em parte a produção intracelular de radicais livres (KIM et al., 2002). O número de interações medicamentosas acaba restringindo seu uso, sobretudo em pacientes que apresentam doenças crônicas ou estado de imunocomprometimento, que necessitam de outros medicamentos de maneira contínua. É imprescindível que pacientes que estejam utilizando essa terapêutica realizem um monitoramento de sua função hepática, devido ao grande risco de desenvolverem hepatotoxicidade (LASENNA; TOSTI, 2015).

Um dos principais fármacos antifúngicos de uso oral é a griseofulvina, ela apresenta atividade fungistática *in vitro* e sua ação se deve pela interação com os microtúbulos polimerizados, ocasionando a ruptura do fuso mitótico. Dessa maneira, a mitose fúngica é inibida, resultando na produção de células multinucleadas, de paredes espessas e hifas encurvadas. A griseofulvina apresenta baixa afinidade pela queratina ungueal, por isso, o tratamento pode perdurar de 6 a 9 meses, em doses de 1g/diária, com índices de cura de até 25,5%. Assim como o fluconazol, pode ocasionar efeitos adversos locais, gastrintestinais, hepatotoxicidade e leucopenia. Sua ação fungistática limita-se a gêneros *Microsporium*, *Trichophyton* e *Epidermophyton* (HARDMAN et al., 2005; SOARES et al., 2013).

Os fármacos azólicos, por sua vez, são os considerados de primeira escolha e aqueles que mais apresentam incidência de espécies resistentes. Os azólicos são subdivididos em dois grupos imidazólicos e triazólicos. Ao primeiro grupo pertence o cetoconazol e ao segundo o fluconazol e o itraconazol. Ambos os grupos apresentam o mesmo mecanismo de ação, através da inibição da enzima esterol 14- $\alpha$ -demetilase. Ao inibi-la, ocorre um comprometimento na síntese do ergosterol na membrana citoplasmática do fungo, acarretando um acúmulo de 14- $\alpha$ -metilesteróis. Esse acúmulo causa uma desagregação das cadeias fosfolípides e compromete as funções de sistemas enzimáticos ligados à membrana, como a Trifosfato de Adenosina (ATP)ase e as enzimas do sistema de transporte de elétrons, ocasionando a inibição do crescimento fúngico. Os triazólicos, quando comparados com os imidazólicos, apresentam metabolização mais lenta e exercem efeitos menores sobre a síntese de esteróis em humanos (HARDMAN et al., 2005; PEREIRA, 2009).

O cetoconazol foi o primeiro azólico utilizado na prática clínica. Apresenta alta afinidade pela queratina, no entanto, seus efeitos colaterais são um fator bastante limitante na sua terapia.

A dose diária recomendada é de 200mg/dia por cerca de 4 meses. O itraconazol, por sua vez, apresenta uma taxa de cura de 93,5%. Sua terapia é de 200mg/dia por 12 semanas. Também é possível realizar um modelo chamado esquema de pulsoterapia, que corresponde a 400mg/dia durante uma semana, a cada mês. Nesse último caso, a duração do tratamento varia de acordo com a área atingida, de 3 a 4 meses para as unhas dos pés e 2 meses quando as unhas acometidas forem as das mãos. Del Rosso (2014) salientou o risco de hepatotoxicidade e interações medicamentosas, sobretudo em idoso em uso desses fármacos. Outro fármaco dessa classe é o fluconazol, ele apresenta alta biodisponibilidade oral e tolerabilidade, com doses recomendadas de 150 a 450mg/dia. Contudo, a *Food and Drug Administration* (FDA) não aprova sua utilização para alguns casos de onicomicose. Dentre todos da classe, o fluconazol, juntamente com itraconazol são os fármacos que apresentam maior custo financeiro (DEL ROSSO, 2014; SIDRIM; ROCHA, 2014; DELARZE; SANGLARD, 2015).

Outro antifúngico de terapia farmacológica sistêmica disponível no mercado é a terbinafina. Esse fármaco apresenta um mecanismo de ação baseado na inibição da síntese de ergosterol através da inibição reversível não competitiva da enzima fúngica esqualeno epoxidase, que participa da primeira fase da síntese dos esteróis (HARDMAN et al., 2005; PEREIRA, 2009). A depleção do ergosterol em associação ao acúmulo de esqualeno, resulta em alterações na estrutura e funções da membrana plasmática levando à morte espécies suscetíveis (MARTINEZ-ROSSI et al., 2008). Sua dose diária recomendada é de 250mg, com duração de tratamento de 3 meses que pode alcançar uma taxa de cura de até 82%. Sua apresentação de uso tópico, apresenta taxas de 1%. (SIDRIM; ROCHA, 2004; HARDMAN et al., 2005; DEL ROSSO, 2014). A terbinafina apresenta efeitos adversos inferiores aqueles apresentados pela griseofulvina e o itraconazol. Mesmo desempenhando ação fungistática, apresenta capacidade de inibição para quase todos os gêneros de dermatófitos, porém, apresenta baixa eficácia em casos de infecção por *C. albicans* (DEL ROSSO, 2014).

### **3.6.2 Terapia farmacológica tópica**

As terapias tópicas são indicadas quando a infecção ainda não atingiu a matriz ungueal da unha; em casos em que a terapia sistêmica é contra indicada; em terapia combinada e na profilaxia pós-tratamento (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DERMATOLOGIA). Essas terapias apresentam baixa eficácia clínica (comparadas a terapia sistêmica) em consequência da dificuldade de penetração até as camadas mais profundas da unha. Em alguns casos, o

debridamento químico ou físico ou a remoção da unha infectada em associação com a terapia tópica podem favorecer o tratamento (DEL ROSSO, 2014; GHANNOUM; ISHAM, 2014).

Em tratamentos de uso tópico para onicomicoses, são comuns fármacos na forma de esmalte. É o caso do ciclopirox alanina 8%, que apresenta um amplo espectro fúngico e atividade bacteriana com capacidade de quelação do íon ferro e inibição de enzimas responsáveis pela síntese de proteínas e ácidos nucleicos. O esmalte deve ser aplicado na unha uma vez ao dia durante 48 semanas. Apresenta eficácia menor que 50% em infecções nas unhas das mãos e 25% nas unhas dos pés. Esses índices referem-se a infecções que correspondem ao limite de 30% no comprometimento da superfície ungueal (MARTINEZ-ROSSI et al., 2008; NEGRONI, 2008; GHANNOUM; ISHAN, 2014; GHELARD et al., 2014).

Outro fármaco disponível em forma de esmalte é a amorolfina a 5%, seu mecanismo de ação é baseado na interferência sobre as enzimas 14- $\alpha$ -redutase e 7,8- $\alpha$ -isomerase, que resultam na inibição da síntese do ergosterol (NEGRONI, 2008; GHANNOUM; ISHAN, 2014). A amorolfina propicia uma taxa de cura de 40% para as unhas dos pés e 60% para as unhas das mãos (SIDRIM; ROCHA, 2004).

### 3.7 Resistência antifúngica

A resistência antifúngica pode ser intrínseca ou adquirida. Quando a mesma for de natureza intrínseca, indica que o fármaco não apresenta atividade eficaz em espécies nunca expostas ao mesmo, característica que se estende geralmente a todos os membros da espécie. A resistência adquirida é atribuída aquele grupo que anteriormente demonstrava sensibilidade mas que em consequência do uso constante do antifúngico houve uma seleção de população resistente, que gradualmente predominaram (; MARTINEZ-ROSSI et al., 2008; DELARZE; SANGLARD, 2015).

Martinez-Rossi e colaboradores (2008) consideraram um antifúngico eficiente, quando o mesmo for uma associação de amplo espectro e baixa ou nenhuma toxicidade. Nas onicomicoses, especificamente, o fármaco deve ter capacidade de penetrar na unha e permanecer no local pelo tempo e concentrações adequadas para a ação.

### 3.8 Óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry

O *Syzygium aromaticum* (sinonímia *Eugenia caryophyllata*, *Eugenia caryophyllus*, *Eugenia aromática*, *Caryophyllus aromaticus*, *Jambosa caryophyllus*) é uma planta utilizada tanto como especiaria, quanto na medicina popular (BRASIL, 2013), conhecida popularmente

como cravo-da-índia (ASCENÇÃO; FILHO, 2013). Pertence à família Myrtaceae, de origem asiática, aclimatada na África e no Brasil. Comercialmente estão disponíveis dois produtos da árvore do cravo: o cravo propriamente dito, que consiste no botão floral dessecado e o óleo essencial, extraído das folhas, caule e botões (RAZAFIMAMONJISON et al., 2014).

O óleo essencial de cravo-da-índia é um composto de misturas de terpenos voláteis cíclicos e alifáticos e fenilpropanoides (SANTIN et al., 2010). O eugenol é o constituinte mais abundante e importante nesse óleo (mínimo de 75%) (BRASIL, 2003).

Joseph e Sujatha (2011) conferiram a esse óleo propriedades antioxidantes, antimutagênicas, antiulcerogênicas e antiparasitárias. Possui também propriedades anestésicas e analgésicas, amplamente utilizada na odontologia (PINTO et al., 2009). Além do eugenol, o cravo apresenta constituintes como o  $\beta$ -cariofileno e o acetato de eugenol. Santin e colaboradores (2010) evidenciaram a composição de 89,6% de eugenol, 8,6% de cariofileno e 1,7% de acetato de eugenol. Os principais constituintes dos botões florais são os fenilpropanoides como eugenol, carvacrol, timol e cinamaldeído. A composição química, no entanto, pode variar qualitativa e quantitativamente por influência da origem do vegetal. Outros fatores também podem influenciar na composição, como o teor do eugenol, que tende a ser menor em botões florais jovens, sendo crescente e atingindo percentuais máximos na fase de frutificação completa, ocorrendo o contrário com o acetato de eugenol (RAZAFIMAMONJISON et al., 2014).

#### 4 ARTIGO

A metodologia, os resultados, a discussão e as conclusões serão apresentadas em forma de artigo, intitulado “Atividade antifúngica do óleo essencial *Syzygium aromaticum* (cravo-da-índia) em agentes causadores de onicomicoses”, que será encaminhado para publicação no *Journal of Fungi*.

**ARTIGO ORIGINAL****Atividade antifúngica do óleo essencial *Syzygium aromaticum* (Cravo-da-Índia) em agentes causadores de onicomicoses.****Kátia Daniele Gomes Scherer<sup>1</sup>  
Jane Dagmar Pollo Renner<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Departamento de Biologia e Farmácia. Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC, Santa Cruz do Sul/RS. Brasil. [kscherer@mx2.unisc.br](mailto:kscherer@mx2.unisc.br).

<sup>2</sup>Departamento de Biologia e Farmácia e mestrado em promoção da Saúde. Universidade de Santa Cruz do Sul/RS. Brasil. [janerenner@unisc.br](mailto:janerenner@unisc.br)

**Autor correspondente:** Jane Dagmar Pollo Renner. Av. Independência, nº 2293, Bairro Universitário. Santa Cruz do Sul/RS – Brasil. CEP: 96824120. Email: [janerenner@unisc.br](mailto:janerenner@unisc.br). Fone: (51) 998063124

---

**Abstract:**

Onychomycoses are increasingly recurrent fungal infections and have become a worldwide public health problem. These infections that affect the nails of the hands and feet can compromise the patient's well-being, causing aesthetic discomfort and walking, as well as causing serious complications, especially in immunocompromised patients. The pharmacological treatments of onychomycosis are generally of high financial cost, long duration, with high risk of causing adverse reactions and not infrequently, low efficacy. About 25% of the cases, the therapy does not present a satisfactory result, necessitating the search for new compounds, since the irrational use of these drugs has created microorganisms resistant to the main antifungal agents. Thus, this work evaluated the antifungal activity of eugenol, a major component of the essential oil of the Indian clove against the main causative agents of onychomycosis, *Trichophyton rubrum*, *Candida albicans* and *Candida glabrata*. The determination of Minimal Inhibitory Concentration (MIC) and evaluation of antifungal activity occurred individually for each microorganism and control groups were used as a reference parameter. For the evaluation of the antifungal activity, the essential oil was added to the BDA (Potato-Dextrose-Agar) medium at approximately 45 ° C in order to obtain concentrations of 1.25; 2.5; 3.75 and 5%, where each concentration represented a treatment. Petri dishes with BDA medium, without addition of essential oil were used as controls. 5mm disks with fungal growth *T. rubrum* grown for 8 days were peeled to the center of the plates containing the respective concentrations of the essential oil. For the evaluation of the MIC, the essential oil was serially diluted using the microdilution technique. MIC determination was performed in 96 well microdilution plates, arranged in 12 columns (1 to 12) and 8 lines (A to H). The essential oil presented antifungal activity against all tested microorganisms.

**KEYWORDS:** Onychomycoses. Antifungal agents. Eugenol. Essential oil. *Syzygium aromaticum*

## Resumo

As onicomicoses são infecções fúngicas cada vez mais recorrentes e têm se tornado um problema de saúde pública mundial. Essas infecções que acometem as unhas das mãos e dos pés, podem comprometer o bem estar do paciente, causando desde desconfortos estéticos e ao caminhar, como também causar complicações graves, sobretudo em pacientes imunocomprometidos. Os tratamentos farmacológicos das onicomicoses são geralmente de alto custo financeiro, de longa duração, com alto risco de acarretar reações adversas e não raro, baixa eficácia. Cerca de 25% dos casos, a terapêutica não apresenta resultado satisfatório, levando a necessidade da busca por novos compostos, uma vez que o uso irracional desses medicamentos tem criado microrganismos resistentes aos principais antifúngicos. Desta forma, este trabalho avaliou a atividade antifúngica do eugenol, componente majoritário do óleo essencial de cravo-da-índia frente aos principais causadores de onicomicoses, *Trichophyton rubrum*, *Candida albicans* e *Candida glabrata*. A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a avaliação da atividade antifúngica ocorreu de forma individual para cada microrganismo e grupos de controle foram utilizados como parâmetro referencial. Para a avaliação da atividade antifúngica o óleo essencial foi adicionado ao meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar) a aproximadamente 45°C a fim de obter concentrações de 1,25; 2,5; 3,75 e 5%, em que cada concentração representou um tratamento. Placas de Petry somente com meio BDA, sem adição de óleo essencial foram utilizadas como testemunha. Discos de 5mm com crescimento fúngico de *Trichophyton rubrum* cultivadas durante 8 dias foram repicados para o centro das placas contendo as respectivas concentrações do óleo essencial. Para a avaliação da CIM, o óleo essencial foi diluído de forma seriada, mediante emprego da técnica de microdiluição. A determinação da CIM foi realizada em placas de microdiluição de 96 poços, dispostos em 12 colunas (1 a 12) e 8 linhas (A a H). O óleo apresentou atividade antifúngica frente a todos os microrganismos testados.

**PALAVRAS-CHAVES:** Onicomicoses. Agentes antifúngicos. Eugenol. Óleo essencial. Cravo-da-Índia

---

## INTRODUÇÃO

As onicomicoses são infecções fúngicas que acometem as unhas das mãos e dos pés. São manifestações muito comuns na dermatologia, sendo uma das principais causas de buscas por atendimento, tanto na área privada quanto em serviços públicos (VEASEY et al., 2017). Com uma prevalência de 13%, essas infecções não são apenas uma preocupação do ponto de vista estético, mas também pelo comprometimento do bem estar do paciente, uma vez que causam grande desconforto e dor, sobretudo em pacientes imunossuprimidos (LASENNA; TOSTI, 2015; COLEMAN et., 2014). Em pacientes portadores de imunossupressão, insuficiência venosa periférica e diabetes mellitus, as onicomicoses podem evoluir para infecções localizadas ou sistêmicas, levando em alguns casos a amputação. Os principais fatores de risco são: pacientes acima de 50 anos, distúrbios hormonais, traumas locais, hiperidrose (suor excessivo) e imunossupressão (REIS et al., 2010).



As onicomicoses são classificadas de acordo com a área e extensão do acometimento da unha e a coloração:

A onicomicose subungueal distal e lateral caracteriza-se pela invasão do agente infectante no leito da unha pelo hiponíquio e em seguida a migração para a região proximal da unha através da matriz subjacente, causando uma hiperqueratose subungueal. A esse processo se atribui o destacamento e a cor amarelada da unha. Esse é o tipo mais comum de infecção (ATAIDES, 2010).

Na onicomicose subungueal proximal, a infecção ocorre com a invasão do agente infectante pela região proximal da unha (área da cutícula), migrando em seguida para a região distal. Nesse subtipo ocorre a destruição da lâmina na região proximal em alguns casos é possível observar uma pequena inflamação. Essa infecção é pouco comum.

A onicomicose superficial branca ocorre pela invasão do agente infectante pela lâmina superficial da unha. O fungo fica localizado no dorso da lâmina ungueal e vai progredindo, formando regiões opacas e atribuindo a unha aspecto áspero e consistência frágil. A evolução desse subtipo de onicomicose, ocasiona a onicomicose distrófica total, nesse estágio em função da fragilidade da unha ocorre a perda de toda a lâmina ungueal, restando apenas traços de queratina aderido ao leito ungueal (ATAIDES, 2010).

Devido à grande variedade de patógenos causadores de onicomicoses e suas diferentes apresentações clínicas, o diagnóstico e o tratamento são bastante complexos. Sua etiologia envolve fungos dermatófitos, fungos filamentosos não-dermatófitos (FFND) e leveduras e têm sua epidemiologia influenciada diretamente por fatores climáticos, comportamentais e patológicos (REIS et al., 2010). Em estudo realizado por Reis et al. (2010) foram analisadas 632 amostras positivas, destas, 36% correspondiam a infecções causadas por fungos dermatófitos, 29% por *Candida spp* e 35% por FFND.

O tratamento das onicomicoses são geralmente longos, apresentam custos elevados, além de ocorrer falhas terapêuticas, recidiva e reinfecções. Nas terapias orais, ocorrem falhas no tratamento devido aos inúmeros efeitos colaterais e pelos erros de identificação do patógeno. Nas terapias tópicas, também ocorrem falhas devido a baixa eficácia terapêutica, tendo em vista a dificuldade do fármaco em penetrar a estrutura da unha e chegar até o seu sítio de ação (GHANNOUM; ISHAN, 2014; FLINT et al., 2014).

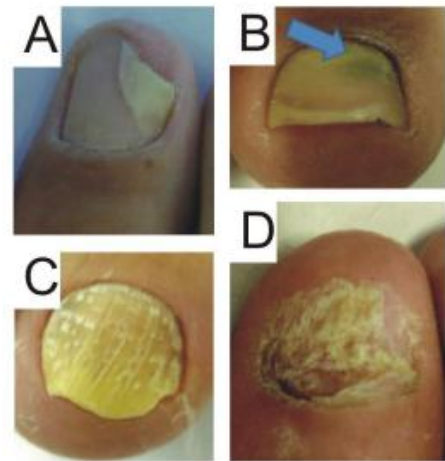


Figura 1 - A) Onicomicose subungueal distal e lateral; B) Onicomicose subungueal proximal; C) Onicomicose superficial branca; D) onicomicose distrófica total (FONTE: ATAÍDES, 2010)

A grande incidência de microrganismos resistentes aos antifúngicos já existentes, justificam a necessidade da descoberta de novos compostos terapêuticos que apresentem alta eficácia e baixa toxicidade. Dentro desse contexto, os óleos essenciais se mostram um alvo bastante promissor. A presença de monoterpenos, sesquiterpenos, fenilpropanoides e outros compostos voláteis em sua composição, confere aos óleos essenciais várias atividades biológicas, entre elas atividades antiparasitárias, antimicrobianas e antifúngicas (SARTO; JUNIOR, 2014).

Assim, este estudo teve como objetivo avaliar a atividade antifúngica do óleo essencial de cravo-da-Índia (*Syzygium aromaticum*) frente a alguns dos mais frequentes causadores de onicomicoses: *Trichophyton rubrum*, *Candida albicans* e *Candida glabrata*.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Delineamento experimental**

Trata-se de uma pesquisa laboratorial, de natureza básica e de caráter transversal e prospectivo. Este estudo teve enfoque experimental, quantitativo e qualitativo. Esta pesquisa foi desenvolvida no período de abril a junho de 2017, no laboratório de Biologia, na Universidade de Santa Cruz, na cidade de Santa Cruz do Sul – RS.

### **Óleo essencial *Syzygium aromaticum***

O óleo essencial foi adquirido comercialmente da empresa Aura Cacia, com a concentração de 100% e densidade de 0,973g/mL (dado fornecido pelo fabricante).

### **Cepas fúngicas**

Para a determinação dos efeitos fungistáticos e fungicidas do óleo essencial de cravo-da-Índia foram utilizadas cepas clínicas de *Candida albicans* (2 amostras isoladas de unhas das mãos e 1 isolada das unhas dos pés), cepas de *T. rubrum* (isolada de unhas das mãos) e cepas padrão de *Candida albicans* (ATCC 11006) e *Candida glabrata* (ATCC 90030). As cepas clínicas foram doadas pelo Laboratório Enzylab, situado no município de Santa Cruz do Sul – RS.

### **Avaliação da atividade antifúngica**

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a avaliação da atividade antifúngica ocorreu de forma individual para cada microrganismo e grupos de controle foram utilizados como parâmetro referencial.

Para a avaliação da atividade antifúngica o óleo essencial foi adicionado ao meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA) a aproximadamente 45°C a fim de se obter concentrações de 1,25; 2,5; 3,75 e 5%, em que cada concentração representou um tratamento. Placas de Petry somente com meio BDA, sem adição de óleo essencial foram utilizadas como controle negativo.

Discos de 5mm com crescimento fúngico *T. rubrum* cultivados durante 8 dias foram repicados para o centro das placas contendo as respectivas concentrações do óleo essencial. Em seguida, foram incubadas em estufa de fotoperíodo (BOD) a temperatura de 28° ± 2° C sob o regime de fotoperíodo de 12h por um período de 7 dias. A avaliação foi realizada quando a testemunha cobriu totalmente a placa de Petry.

### **Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)**

A partir de culturas recentes e mantidas em Ágar Sabourand Dextrose – ASD (Difco® - France), durante 24 – 48 horas a 35°C, o inóculo foi preparado e padronizado em solução fisiológica a 0,9% estéril. Inicialmente, preparou-se uma suspensão comparativa com o tubo 0,5 da Escala de McFarland. A mesma foi ajustada no espectrofotômetro para conter aproximadamente 10<sup>6</sup> UFC/mL. Em seguida, essa suspensão foi diluída com água destilada em uma proporção de 1:9 resultando em um inóculo contendo aproximadamente 10<sup>5</sup> UFC/mL, que foi utilizado nos ensaios (OSTROSKY et al., 2008).

Para a avaliação da CIM, o óleo essencial foi diluído de forma seriada, mediante emprego da técnica de microdiluição. A determinação da CIM foi realizada em placas de microdiluição de 96 poços, dispostos em 12 colunas (1 a 12) e 8 linhas (A a H). Em cada um dos poços das placas de microdiluição foi adicionado 100µL de inóculo (suspensão da levedura), 100µL de caldo Sabourand-Dextrose duplamente concentrado. O óleo essencial foi inicialmente diluído em água destilada estéril (0,4mL do óleo essencial, 0,04mL de Tween 80 e q.s.p 5mL de água) obtendo assim a concentração de 0,8% de óleo essencial. As concentrações subsequentes dos óleos essenciais foram obtidas após diluições seriadas dos produtos naturais na placa de microdiluição, partindo-se da concentração inicial de 0,8% (Linha B) até 0,0125% (Linha H), pela transferência de 100µL do conteúdo do poço subsequente. Para os poços da linha H, foram dispensados 100µL do conteúdo, de modo a igualar o volume total dos poços. As CIMs foram determinadas através da leitura da absorbância em espectrofotômetro (Marca Bio-Tec

Instuments Inc, Modelo EL800), acoplado em computador com programa Kcjunior, com comprimento de onda pré-selecionado de 490nm, determinando assim, a inibição do crescimento pela diferença entre as leituras realizadas em 48 horas de incubação a 37°C e pela leitura realizada no tempo inicial.

### Análise de dados

Os dados foram registrados na forma de um banco de dados no *Microsoft Office Excel – Windows*, e analisados por meio de estatística descritiva, através de percentuais.

## RESULTADOS

### Avaliação da atividade antifúngica

O ensaio foi realizado com o fungo filamentososo *T. rubrum* isolado a partir de uma amostra clínica de onicomicose de unhas das mãos, a fim de possibilitar o conhecimento prévio do comportamento desse microrganismo frente ao óleo *Syzygium aromaticum* em diferentes concentrações (1,25; 2,5; 3,75 e 5%). O experimento foi realizado em duplicata e em nenhuma das concentrações apresentou qualquer tipo de crescimento visível na placa.

### Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A tabela 1 demonstra os resultados obtidos:

TABELA 1: CIM do óleo essencial *S. aromaticum* sobre espécies de *Candida albicans* (ATCC e origem clínica e *Candida glabrata* ATCC.

	Óleo essencial <i>Syzygium aromaticum</i>	<i>C. albicans</i> ATCC	<i>C. albicans</i> (mãos)	<i>C. albicans</i> (mãos)	<i>C. albicans</i> (pés)	<i>C. glabrata</i> ATCC
A	0%	-	-	-	-	-
B	0,8%	-	-	-	-	-
C	0,4%	-	-	-	-	-
D	0,2%	-	-	-	+	-
E	0,1%	+	-	-	+	+
F	0,05%	+	+	+	+	+
G	0,025%	+	+	+	+	+
H	0,0125%	+	+	+	+	+

**Legenda:** *C. albicans*: *Candida albicans*; *C. glabrata*: *Candida glabrata*; (-): não houve crescimento; (+): houve crescimento

## DISCUSSÃO

As onicomicoses apresentam um tratamento nem sempre efetivo, dada a possibilidade de recorrência de infecção, possível toxicidade e a resistência dos microrganismos. Esses parâmetros levam a uma busca constante por novos compostos que apresentem segurança e uma maior atividade farmacológica que os fármacos já existentes. De uma maneira geral, a maioria dos fármacos antifúngicos existentes no mercado são de origem sintética, desse modo, a busca por produtos naturais que desempenhem essa atividade tem merecido atenção (FENNER et al., 2006; HAFEEZ et al., 2013; KHAN, AHMAD e CAMEOTRA, 2013).

A escolha do composto Eugenol, componente majoritário do óleo essencial do Cravo-da-Índia, se baseou principalmente na atividade antifúngica já descrita (LEE et al., 2007; TEJESWINI et al., 2014), o que atribui a ele potencial antifúngico para fungos causadores de onicomicoses. O cinemaldeído e o eugenol são provenientes da mesma rota biossintética nas plantas (NATH, BARUAH e KANJILAL, 2006).

Shreaz e colaboradores (2010) verificaram resultados satisfatórios ao analisarem o cinemaldeído, que reduziu em 58% a síntese do ergosterol de *C. albicans*. Também promoveu a inibição em 41% de extrusão de prótons, através da membrana plasmática, por meio da enzima ATPase de membrana plasmática, a qual gera um gradiente de membrana importante ao transporte de nutrientes. Esses autores também constataram que esse composto podia funcionar como reagente para a síntese de ligantes e/ou complexos com metais, com a melhoria da atividade fúngica.

Em estudo, Ascensão e Filho (2013), testaram a atividade antifúngica do óleo *S. aromaticum* frente a fungos da espécie *Fusarium*, e neste, encontraram uma média de variação na inibição de crescimento entre 85,65% a 100%, compatível com o resultado encontrado pelo presente estudo (100%). Essa inibição do crescimento foi significativa, comprovando a atividade antifúngica do óleo essencial. Efeito esse, atribuído ao eugenol, composto majoritário do óleo essencial, que apresenta atividade antifúngica comprovada.

Costa e colaboradores (2011) e Santos e colaboradores (2007) também encontraram resultados satisfatórios em ensaios frente a espécies de *Fusarium*, inibição total de crescimento em ambos estudos em altas concentrações do óleo.

Pinto e colaboradores (2009) verificaram ao testar o eugenol frente a *Candida albicans* ATCC, CIM de 545,92µg/mL, valor inferior aos dados desse estudo que demonstrou um CIM de 973,0µg/mL para o mesmo microrganismo. Ao testar a CIM de *C. albicans* de cepas clínicas, Khan, Ahmad e Cameotra (2013) obtiveram CIM de 400µg/mL, que corrobora os achados desse estudo que determinou a CIM de achados clínicos das unhas das mãos em 486µg/mL. O mesmo

no entanto, não aconteceu para as cepas clínicas desse microrganismo isolado a partir das unhas dos pés, que demonstrou um CIM de 1094µg/mL.

Ahmad e colaboradores (2010) estudaram a associação *in vitro* do eugenol e metileugenol contra isolados clínicos de *Candida albicans* (cepas padrão e cepas clínicas) e *Candida glabrata* (cepas padrão e cepas clínicas). Neste, foi determinado o valor de CIM para a *C. glabrata* ATCC de 490µg/mL, valor esse muito inferior ao encontrado pelo presente estudo, que determinou o CIM em 973µg/mL. Para a *C. albicans* ATCC e cepas clínicas, determinou CIM de 480µg/mL e 500µg/mL, respectivamente, também inferiores aos achados por esse estudo. Em associação com o fluconazol, Ahmad et al. (2010) obtiveram CIM ainda menores para ambos os fungos, com CIM de 120µg/ml para *C. albicans* ATCC e CIM de 125µg/mL para cepas clínicas. No caso da *C. glabrata*, quando testadas em associação, obtiveram CIM 125µg/mL (ATCC) e CIM 145µg/mL (cepas clínicas).

A natureza lipossolúvel dos óleos essenciais e de seus constituintes permite com que ocorra a interação do mesmo com estruturas celulares que apresentam composição lipídica, isso resulta no aumento da permeabilidade da membrana, causando desequilíbrio eletrolítico e morte celular (CAVALCANTI; ALMEIDA; PADILHA, 2011). Muitos estudos mostram a eficácia da associação de frações de óleo essencial de diferentes plantas com drogas sintéticas como agentes antifúngicos (AHMAD et al., 2010).

O papel dos componentes do óleo nessa atividade fungicida ainda não estão completamente esclarecidos (ROSSATO et al, 2009). Sabe-se que o eugenol, devido ao seu caráter lipofílico apresenta a capacidade de entrar em cadeias que compõem as bicamadas lipídicas da membrana, alterando sua fluidez e a permeabilidade das membranas celulares, afetando assim, a atividade e a regulação de importantes enzimas da membrana que catalisam a síntese de uma série de componentes principais de polissacarídeos da parede celular, interferindo no crescimento celular e na morfogênese (PINA-VAZ et al., 2004; BRAGA et al., 2007).

## CONCLUSÕES

Os ensaios realizados demonstraram o potencial antifúngico do *S. aromaticum* contra *T. rubrum*, *Candida albicans* e *Candida glabrata*. Essas constatações são bastante positivas, tendo em vista as crescentes falhas de tratamento e a resistência antifúngica aos fármacos já existentes. Sugerindo uma maneira de tratar infecções resistentes através de uma abordagem conjunta. No entanto, uma avaliação do mecanismo de ação do eugenol e a avaliação da capacidade de permeação em formulações de uso tópico são necessários.

## REFERÊNCIAS

- AHMAD, A. et al. *In vitro* synergy of eugenol and methyleugenol with fluconazole against clinical *Candida* isolates. **Journal of Medical Microbiology**. v. 59, p. 1178-1184, 2010.
- ASCENÇÃO, V. L.; FILHO, V. E. M. Extração, caracterização química e atividade antifúngica de óleo essencial *Syzygium aromaticum* (cravo da Índia). **Caderno de pesquisa**, São Luís. v. 20, n. especial, p. 137-144, 2013.
- ATAÍDES, F.S. Isolamento, identificação e suscetibilidade *in vitro* de fungos causadores de onicomicoses. Tese (mestrado). 64 f – Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiânia, Goiás. 2010
- BRAGA, P.C. et al. Eugenol and thymol, alone or in combination, induce morphological alterations in the envelope of *Candida albicans*. **Fitoterapia**. v. 78, p. 396-400, 2007
- 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).
- COLEMANN, N. W. Fungal nail infections. **The journal of hand surgery**, St. Louis, MO. v. 39, 2014.
- COSTA, A. R. T. et al. Ação do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M. Perry sobre as hifas de alguns fungos fitopatogênicos. **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**. V. 13, n. 2, p. 240-245, 2011
- FENNER, R; BETTI, A. H; MENTZ, L.A; RATES, S.M.K. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Revista de Ciências Farmacêuticas**. v. 42, n. 3, p. 369-394, 2006.
- GHANNOUM, M.; ISHAM, N. Fungal nail infections (Onychomycosis): A never-ending story? **Plos Pathogens**, Ohio. v. 10, n. 6, p. 1-5, 2014.
- HAFEEZ, F. et al. Transungual delivery of ketoconazole using novel lacquer formulation. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 456, p. 357-361, 2013.
- KHAN, M.S.A; AHMAD, I.; CAMEOTRA, S.S. Phenyl aldehyde and propanoids exert multiple sites of action towards cell membrane and cell wall targeting ergosterol in *Candida albicans*. **AMB Express**. v. 3, n. 54, p. 1-16, 2013.
- LASENNA, C. E.; TOSTI, E. Patient considerations in the management of toe onychomycosis – role of efinaconazole. **Patient preference and Adherence**, Flórida. v. 9, p. 887-891, 2015.
- LEE, S. J. et al. Antifungal effect of eugenol and nerolidol against *Microsporum gypseum* in a guinea pig model. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**. v. 30, n. 1, p. 184-188, 2007

NATH, S.C.; BARUAH, A.; KANJILAL, P. B. Chemical composition of the leaf essential oil of *Cinnamomum pauciflorum* Nees. **Flavour and Fragrance Journal**. v. 21, p. 531-533, 2006.

PINA-VAZ, C. et al. Antifungal activity of *Thymus pulegioides* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. **Journal med microbial**. v. 55, p. 1367-1373, 2004.

PINTO. E.; VALE-SILVA, L.; CAVALEIRO, C.; SALGUEIRO, L. Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. **Journal of Medical Microbiology**. v. 58, p. 1454-1462, 2009.

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**, Brasília. v. 47, n. 3, p. 320-325, 2010.

ROSSATO, A. et al. *In vitro* synergic efficacy of the combination of nystatin with the essential oils of *Origanum vulgare* and *Pelargonium graveolens* against some *Candida* species. **Phytomedicine**. v. 16, p. 972-975, 2009

SHREAZ et al. Anticandidal activity of cinnamaldehyde, its ligand and Ni(II) complex: effect of increase in ring and side chain. **Microbial Pathogenesis**. v. 49, p. 75-82, 2010.

TEJESWINI et al. Antifungal activity of essential oils and their combinations in vitro and in vivo conditions. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**. v. 47, n. 5, p. 564-570, 2014.

v., n., p.

VEASEY, J.V; ZAITZ, C.; NAPPI, F.; MURAMATU, L.H: Descriptive analysis of mycological examination of patients with onichomycosis treated in private practice. **Anais Brasileiros de dermatologia**, São Paulo. V. 92, n. 1, p. 134-136, 2017



## 5 CONCLUSÃO

Os ensaios realizados demonstraram o potencial antifúngico do *S. aromaticum* contra *T. rubrum*, *Candida albicans* e *Candida glabrata*. Essas constatações são bastante positivas, tendo em vista as crescentes falhas de tratamento e a resistência antifúngica aos fármacos já existentes. Sugerindo uma maneira de tratar infecções resistentes através de uma abordagem conjunta. No entanto, uma avaliação do mecanismo de ação do eugenol e a avaliação da capacidade de permeação em formulações de uso tópico são necessários.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, C. et al. Environmental and genetic factors on the development of onychomycosis. **Journal of Fungi**, Philadelphia. p. 211-216, 2015
- AGBULU, C.O; IWODI, C.; ONEKUTU, A. In vitro Susceptibility Test of Some Antifungal Drugs on Selected Dermatophytes and Yeasts Isolated from Patients Attending Hospitals in Makurdi Environ. **Microbiology journal**, Nigéria. v. 5, n. 1, p. 9-16, 2015 (C)
- ALCAZAR-FUOLI, L. et al. Ergosterol biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*: its relevance as an antifungal target and role in antifungal drug resistance. **Steroids**. v. 73, n. 3, p. 1-6, 2008. (B1)
- ARAÚJO, A. J. G. et al. Onicomicoses por fungos emergentes: análise clínica, diagnóstico laboratorial e revisão. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro. v. 78, n. 4, p. 445-455, 2003. (B3)
- ARENDRUP M. C., GUINEA J, CUENCA-ESTRELLA M., MELETIADIS J., MOUTON J. W., LAGROU K., HOWARD S. J and the Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)\*, EUCAST E.DEF 7.3 December 2015.
- ASCENÇÃO, V. L.; FILHO, V. E. M. Extração, caracterização química e atividade antifúngica de óleo essencial *Syzygium aromaticum* (cravo da Índia). **Caderno de pesquisa**, São Luís. v. 20, n. especial, p. 137-144, 2013. (B5)
- BACKES, G.L. et al. Potent antimicrobial agents against azole-resistant fungi based on pyridinohydrazide and hydrazomethylpyridine structural motifs. **Bioorganic & medicinal chemistry**, United States. v. 23, p. 3397-3407, 2015 (A2)
- BARAN, R.; NAKAMURA, R. **Doenças da unha: do diagnóstico ao tratamento**. 1 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011
- BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2003. **Resolução da diretoria Colegiada (RDC) nº150**, de 17 de junho de 2003. Disponível em [http://www.anvisa.gov.br/anvisa/legis/resol/2003/rdc/150\\_3rdc.pdf](http://www.anvisa.gov.br/anvisa/legis/resol/2003/rdc/150_3rdc.pdf).
- CHOUHAN, P.; SAINI, T. R. Hydration of nail plate: A novel screening model for transungual drug permeation enhancers. **International Journal of Pharmaceutics**, Índia. v. 436, p. 179-182, 2012. (A2)
- COLEMANN, N. W. Fungal nail infections. **The journal of hand surgery**, St. Louis, MO. v. 39, 2014. (B2)
- COSTA, M. et al. Epidemiologia e etiologia das dermatofitoses em Goiânia, GO, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Goiânia. v. 35, n. 1, p. 19-22, 2002 (B3)
- DELARZE, E.; SANGLARD, D. Defining the frontiers between antifungal resistance, tolerance and the concept of persistence. **Drug Resistance Updates**, Lausanne. v. 23, p. 12-19, 2015. (A1)

- DELL-ROSSO, James Q. The role of tropical antifungal therapy for Onychomycosis and the Emergence of newer agents. **The Journal of clinical and Aesthetic Dermatology**, Nevada. v. 7, n. 7, p. 10-18, 2014. (B1)
- ENE, I. V. et al. Cell wall remodeling enzymes modulate fungal cell wall elasticity and osmotic stress resistance. **Mbio**, França. v. 6, n. 4, p. 1-15, 2015. (A1)
- FLINT, W. W; CAIN, J. D. Nail and skin disorders of the foot. **The medical clinics of north America**, USA. v. 65, n. 6, p. 1219-1227, 2011 (B1)
- FLAMBÓ, D. F. A. L. P. Atividades biológicas dos flavanóides: Atividade antimicrobiana. **Dissertação**. Faculdade de Ciências da saúde, Universidade Fernando Pessoa. Porto, Portugal. 43 p, 2013
- FREIESLEBEN, S. H.; JÄGER, A. K. Correlation between Plant Secondary Metabolites and Their Antifungal Mechanisms—A Review. **Medicinal e aromatic plants**, Denmark. v. 3, n. 2, p. 1-6 (C)
- GHANNOUM, M.; ISHAM, N. Fungal nail infections (Onychomycosis): A never-ending story? **Plos Pathogens**, Ohio. v. 10, n. 6, p. 1-5, 2014. (A1)
- GHELARDI, E. et al. Potential of ergosterol synthesis inhibitors to cause resistance or cross-resistance in *Trichophyton rubrum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Pisa. v. 58, n. 5, p. 2825- 2829, 2014. (A1)
- GOMES, S.; LENCASTRE, A.; LOPES, M. J. P. Alterações ungueais em pediatria. **Nascer e Crescer**, V. 21, n.1, p. 19-24, 2012
- GUPTA, A. K.; PAQUET, M. Improved efficacy in onychomycosis therapy. **Clinics in dermatology**, Canadá. v. 31, p. 555-563, 2013 (B2)
- HARDMANN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; GILMAN, A. G. (ed) 2005. Goodmann & Gilman. **As Bases farmacológicas da terapêutica**. 10. Ed, Rio de Janeiro: McGraw Hill, 1625 p.
- JANDRIC, Z.; SCHÜLLER, C. Stress response in *Candida glabrata*: pieces of a fragmented picture. **Future Microbiology**, Austria. v. 6, n. 12, p.1475-1484, 2011
- JO SIU, W. J. et al. Comparison of *In Vitro* Antifungal Activities of Efinaconazole and Currently Available Antifungal Agents against a Variety of Pathogenic Fungi Associated with Onychomycosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 4, p. 1610-1616, 2013 (A1)
- JOSEPH, B.; SUJATHA, F. Bioactive compounds and its autochthonous microbial activities of extract and clove oil (*Syzygium aromaticum L.*) on some food borne pathogens. **Asian Journal of Biological Sciences**, Índia. v. 4, n. 1, p. 35-43, 2011. (B5)
- KAVANAGH, K. (Ed). **Fungi: Biology and applications**. West Sussex: John Wiley & Sons Ltd. 293p, 2005.

KHAN, M. S. A. et al. Liposomal thymoquinone effectively combats fluconazole-resistant *Candida albicans* in a murine model. **International Journal of Biological Macromolecules**, Buraidah. v. 76, p. 203-208, 2015 (A2)

KHAN, N. et al. Anticandidal activity of curcumin and methyl cinnamaldehyde. **Fitoterapia**, Índia. v. 83, p. 434-440, 2012 (B5)

KIRAZ, N. et al. Correlation between broth microdilution and disk diffusion methods for antifungal susceptibility testing of caspofungin, voriconazole, amphotericin B, intraconazole and fluconazole against *Candida glabrata*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 82, n. 2, p. 136-140, 2010.

KIM, J. H. et al. Antifungal activity of redox-active benzaldehydes that target cellular antioxidation, **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, USA. v. 10, n. 23, 2011 (B2)

KUMAR, T. P.; RAJU, P. N. Transungual Drug delivery: A promising route to treat nail disorders. **International Journal of Pharma Research & Review**, Índia. v. 2, n. 4, p. 22-33, 2013. (C)

LACAZ, C. S. et al. **Tratado de micologia médica**, São Paulo: Sarvier, 2002.

LASENNA, C. E.; TOSTI, E. Patient considerations in the management of toe onychomycosis – role of efinaconazole. **Patient preference and Adherence**, Flórida. v. 9, p. 887-891, 2015. (B2)

LATGÉ, Jean-Paul. The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. **Molecular Microbiology**, Paris. v. 66, n. 2, p. 279-290, 2007. (A1)

LIMA, I. O. et al. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy**, João Pessoa. v. 16, n. 2, p. 197-201, 2006. (B2)

LIMA, K. M. et al. Espécies e suscetibilidade antifúngica in vitro de leveduras isoladas em unhas de pacientes com vírus da imunodeficiência humana. **Revista de Ciências Médicas, Campinas**. v. 18, n. 2, p. 89-97, 2009. (B4)

LOGUERCIO-LEITE, C. et al. A particularidade de ser um fungo – I. Constituintes celulares. **BioTemas**, Florianópolis. v. 19, n. 2, 2006. (C)

MAKIMURA, K. et al. Phylogenetic classification of *Trichophyton mentagrophytes* complex strains based on DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 regions. **Journal of Clinical Microbiology**, Ishikawa. v. 36, n. 9, p. 2629-2633, 1998. (A1)

MARIN, R.; FUENTEFRIA, A. M.; OLIVEIRA, L. F.; APEL, M. A.; JOAQUIM, A. R.; PETROVICK, P. R.; HENRIQUES, A. T. Solidago chilensis essential oil as a potential new

drug against resistant *Candida* isolates, without human blood cell damage and genotoxicity. **Journal of Pharmaceutical Biology**, v. 5, n. 4, p. 307-313, 2015. (B2)

MARTELOZO, I. C.; GUILHERMETTI, E.; SVIDZINSKI, T. I. E. Ocorrência de onicomicoses em Maringá, estado do Paraná, Brasil. **Acta Scientiarum Health Science**, Maringá. v. 27, n. 2, p. 177-182, 2005 (B4)

MARTÍNEZ, E. et al. *Microsporium* spp. onychomycosis: disease presentation, risk factors and treatment responses in an urban population. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Guatemala. v. 18, n. 2, p. 181-186, 2014. (B2)

MARTINEZ-ROSSI, N. M.; ROSSI, A. Antifungal resistance mechanisms in dermatophytes. **Mycopathologia**, Ribeirão Preto. v. 166, p. 369-383, 2008. (B2)

MINAMI, P. S. **Métodos Laboratoriais de diagnóstico das micoses**. 1 ed. São Paulo. Editora Manole, 2003.

MÜLLER, C. et al. A convenient cellular assay for the identification of the molecular target of ergosterol biosynthesis inhibitors and quantification of their effects on total. **Steroids**, Munique. v.78, p. 483-493, 2013. (B1)

MURRAY, P. R. et al. **Microbiologia médica**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan S.A, 2004.

NEGRONI, R. Tratamento de las onicomicoses. *Revista de Patologia tropical*, Argentina. v. 37, n. 2, p. 89-109, 2008 (B5)

NASERI, A. et al. Surveillance of Dermatophytosis in Northeast of Iran (Mashhad) and Review of Published Studies. **Mycopathologia**, Mashhad. v. 176, p. 247-253, 2013 (B2)

PEREIRA, F. O. et al. Investigation on mechanism antifungal activity of eugenol against *Trichophyton rubrum*. **Medical Micology**, Campina Grande. v. 51, p. 507-513, 2013

PERES, N. T. A. et al. Dermatofitos: interação patógeno-hospedeiro e resistência a antifúngicos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Ribeirão Preto. v. 85, n. 5, p. 657-667, 2010. (B3)

PETERS, B. M.; NOVERR, M. C.; FIDEL Jr, P. R. *Candida* Vaginitis: When Opportunism Knocks, the Host Responds. **Plos Pathogens**, Louisiana. v. 10, n. 4, p. 1-4, 2014. (A1)

PINTO, E. et al Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. **Journal of Medical Microbiology**, Porto. v. 58, p. 1454-1462, 2009. (B1)

RAZAFIMAMONJISON, G. et al. Bud, leaf and stem essential oil composition of *Syzygium aromaticum* from Madagascar, Indonesia and Zanzibar. **International Journal of basic and applied Sciences**, Madagascar. v. 3, n.3, p. 224-233, 2014.

RODRIGUES, E. R. Estudo da ação de extratos vegetais de *Pothomorphe umbellata* E drogas antifúngicas sobre linhagens de *Trichophyton rubrum* e análise da expressão proteica. **Dissertação**. Universidade de Ribeirão Preto, 104p. 2007

SANTIN, J. R. et al. Gastroprotective activity of essential oil of the *Syzygium aromaticum* and its major component eugenol in different animal models, **Naunyn-Schmied Arch Pharmacol**, Itajaí. v. 383, p. 149-158, 2010. (B1)

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, J. F. G.; **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan S.A, 2004

SILVA, S. et al. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance, **FEMS microbiology Reviews**, Portugal. v. 36, n. 2, p. 288-305, 2012.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DERMATOLOGIA. **Manual de conduta de onicomicoses: diagnóstico e tratamento**. Disponível em: <http://cuce.com.br/arq/onicomicoses.pdf>. Acesso em 05 out 2016.

SOARES, L. A. et al. Anti dermatophytic therapy - Prospects for the discovery of new drugs from natural products. **Brazilian Journal of Microbiology**, Araraquara. v. 44, n. 4, p. 1035-1041, 2013. (B3)

SCHECHTMAN, R. C. **Onicomicoses**. 1 ed. Rio de Janeiro, Elsevier, 2011

TILLOTSON, J.; TILLOTSON, G.S. The Regulatory Pathway for Antifungal Drugs: A US Perspective. **Clinical Infectious Diseases**, Downingtown, PA. v. 61, n. 6, p. 678-683, 2015 (A1)

URIBE, M. P.; CARDONA-CASTRO, N. Mecanismos de adherencia e adésion de dermatófitos a la piel. **Revista CES Medicina**, Colômbia. v. 27, n. 1, p. 67-75, 2013 (B5)

## **ANEXOS**

## ANEXO 1 – NORMAS PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA “JOURNAL OF FUNGI”

Os manuscritos de pesquisa devem incluir:

- Matéria frontal: título, lista de autor, resumo e palavras chaves.
- Seções de manuscrito de pesquisa: Introdução, materiais de métodos, resultados, discussão e conclusões (opcional);
- Referências;

**Título:** O título do seu manuscrito deve ser conciso, específico e relevante. Ele deve identificar se o estudo relata (humano ou animal) dados de teste, ou é uma revisão sistemática, meta-análise ou estudo de replicação. Quando os nomes de genes ou proteínas estão incluídos, o nome abreviado em vez do nome completo deve ser usado.

**Lista de autor e afiliações:** os nomes e sobrenomes completos dos autores devem ser fornecidos. As iniciais de qualquer nome do meio podem ser adicionadas. O formato padrão do PubMed / MEDLINE é usado para afiliações: informações completas de endereço incluindo cidade, código postal, estado / província, país e todos os endereços de e-mail. Pelo menos um autor deve ser designado como autor correspondente, e seu endereço de e-mail e outros detalhes devem ser incluídos no final da seção de filiação.

**Resumo:** O resumo deve ser um total de cerca de 200 palavras no máximo. O resumo deve ser um único parágrafo e deve seguir o estilo dos resumos estruturados, mas sem títulos: 1) Antecedentes: Coloque a questão abordada em um amplo contexto e destaque a finalidade do estudo; 2) Métodos: Descreva brevemente os principais métodos ou tratamentos aplicados. Inclua qualquer número de pré-registro relevante, e espécies e cepas de qualquer animal usado. 3) Resultados: resuma as principais descobertas do artigo; E 4) Conclusão: Indicar as principais conclusões ou interpretações. O resumo deve ser uma representação objetiva do artigo: não deve conter resultados que não sejam apresentados e fundamentados no texto principal e não devem exagerar as principais conclusões.

**Palavras-chave:** três a dez palavras-chave pertinentes devem ser adicionadas após o resumo. Recomendamos que as palavras-chave sejam específicas do artigo, mas razoavelmente comuns na disciplina disciplinar.



## SEÇÕES DE MANUSCRITO DE PESQUISA

**Introdução:** A introdução deve colocar o estudo em um amplo contexto e destacar por que é importante. Deve definir o propósito do trabalho e sua importância, incluindo hipóteses específicas a serem testadas. O estado atual do campo de pesquisa deve ser revisado cuidadosamente e as principais publicações citadas. Destaque hipóteses controversas e divergentes quando necessário. Finalmente, mencione o objetivo principal do trabalho e destaque as principais conclusões. Na medida do possível, mantenha a introdução compreensível para os cientistas que trabalham fora do tópico do artigo.

**Materiais e Métodos:** devem ser descritos com detalhes suficientes para permitir que outros se reúnam e obtenham resultados publicados. Novos métodos e protocolos devem ser descritos em detalhes, enquanto métodos bem estabelecidos podem ser descritos sucintamente e apropriadamente citados. Dê o nome e a versão de qualquer software usado e deixe claro se o código do computador usado está disponível. Inclua quaisquer códigos de pré-registro.

**Resultados:** Fornecer uma descrição concisa e precisa dos resultados experimentais, sua interpretação, bem como as conclusões experimentais que podem ser desenhadas.

**Discussão:** Os autores devem discutir os resultados e como eles podem ser interpretados em perspectiva de estudos anteriores e das hipóteses de trabalho. As descobertas e suas implicações devem ser discutidas no contexto mais amplo possível e as limitações do trabalho destacado. Também podem ser mencionadas orientações de pesquisa futuras. Esta seção pode ser combinada com resultados.

**Conclusões:** Esta seção não é obrigatória, mas pode ser adicionada ao manuscrito se a discussão for excepcionalmente longa ou complexa.