



**UNIVERSIDADE DE SANTA CRUZ DO SUL  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA  
CURSO DE FARMÁCIA**

Ana Maura Machado de Souza

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA *in vitro* DE UM BIOPRODUTO  
CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE BERGAMOTA (*Citrus reticulata* B.) NO  
TRATAMENTO DE ONICOMICOSSES**

Santa Cruz do Sul  
2020

Ana Maura Machado de Souza

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA *in vitro* DE UM BIOPRODUTO  
CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE BERGAMOTA (*Citrus reticulata* B.) NO  
TRATAMENTO DE ONICOMICOSSES**

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

Orientador (a): Chana de Medeiros  
da Silva

Coorientador (a): Jane Dagmar  
Pollo Renner

Santa Cruz do Sul  
2020

## RESUMO

A espécie vegetal *Citrus reticulata* Blanco mais conhecida como bergamota é uma fruta cítrica que possui ação antifúngica em seu óleo essencial e essa ação está associada aos seus principais componentes como os monoterpenos. A onicomicose é uma infecção fúngica da unha que é responsável por aproximadamente 50% de todos os distúrbios de unhas. O tratamento convencional de antifúngicos tópicos e orais muitas vezes é prolongado e ineficaz para o tratamento dessa infecção. Nesse sentido, esse trabalho tem como objetivo avaliar a atividade antifúngica de um bioproduto desenvolvido a partir do óleo essencial de *Citrus reticulata* e ativos naturais a ser utilizado no tratamento de onicomicoses. Para tanto, foi realizada a avaliação da atividade antifúngica do bioproduto contendo óleo essencial de *C. reticulata* frente aos fungos dermatófitos *Microsporum canis* e *Trichophyton* sp., e às leveduras, *Candida glabrata* e *Candida tropicalis*. O óleo nas concentrações testadas de 5, 10, 20  $\mu\text{L.mL}^{-1}$  provocou inibição de 9,05%, 7,78% e 10,59% de crescimento micelial, respectivamente para *Microsporum canis* e para os 2 isolados clínicos de *Trichophyton* sp. 8,24% e 9,50% (5  $\mu\text{L.mL}^{-1}$ ), 7,88% e 9,63% (10  $\mu\text{L.mL}^{-1}$ ) e 2,25% (20  $\mu\text{L.mL}^{-1}$ ). Nas concentrações testadas não apresentaram efeito antifúngico frente às leveduras do gênero *Candida* na Concentração Inibitória Mínima (CIM) do bioproduto, porém na análise por difusão em disco demonstrou halos de inibição melhores nas concentrações de 20  $\mu\text{L.mL}^{-1}$ , 12,31 (*C. glabrata*) e 8,28 (*C. tropicalis*). Os resultados demonstram que o bioproduto contendo óleo essencial de bergamota apresenta ação antifúngica frente aos fungos causadores de onicomicose *Microsporum canis* e *Trichophyton* sp. e as espécies de *Candida tropicalis* e *Candida glabrata* estudadas.

**Palavras-chave:** *Citrus reticulata*- Onicomicoses - Bioproduto

## ABSTRACT

The vegetable species *Citrus reticulata* Blanco better known as bergamot is a *citrus* fruit that has antifungal action in the essential oil and this action is associated with the main components such as monoterpenes. Onychomycosis is a fungal nail infection that accounts for approximately 50% of all nail disorders. The conventional treatment of topical and oral antifungals is often prolonged and ineffective for treating this infection. In this sense, this work aims to evaluate the antifungal activity of a bioproduct developed from the essential oil of *Citrus reticulata* and natural assets to be used in the treatment of onychomycosis. For this purpose, an evaluation of the antifungal activity of the bioproduct containing essential oil of *C. reticulata* against the dermatophyte fungi *Microsporum canis* and *Trichophyton* sp., and the yeasts, *Candida glabrata* and *Candida tropicalis* was carried out. The oil in the tested concentrations of 5, 10, 20  $\mu\text{L.mL}^{-1}$  caused inhibition of 9.05%, 7.78% and 10.59% of mycelial growth, respectively for *Microsporum canis* and for the 2 clinical isolates of *Trichophyton* sp . 8.24% and 9.50% (5  $\mu\text{L.mL}^{-1}$ ), 7.88% and 9.63% (10  $\mu\text{L.mL}^{-1}$ ) and 2.25% (20  $\mu\text{L.mL}^{-1}$ ). In the tested concentrations they didn't show antifungal effect against *Candida* yeasts in the Minimum Inhibitory Concentration (MIC), however in the disc diffusion analysis it showed better inhibition halos in the concentrations of 20  $\mu\text{L.mL}^{-1}$ , 12.31 (*C. glabrata*) and 8.28 (*C. tropicalis*). The results demonstrate that the bioproduct containing essential oil of bergamot has antifungal action against the fungi that cause onychomycosis *Microsporum canis* and *Trichophyton* sp. and the species of *Candida tropicalis* and *Candida glabrata* studied.

**Keywords:** Citrus reticulata- Onychomycosis – Bioproduct

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	6
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	8
2.1 Objetivo geral .....	8
2.2 Objetivos específicos .....	8
<b>3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	8
3.1 <i>Citrus reticulata</i> Blanco.....	8
3.2 Composições químicas do óleo essencial de <i>Citrus reticulata</i> .....	9
3.3 Propriedades farmacológicas do óleo essencial .....	11
3.4. Onicomicose.....	12
3.5 Fisiopatologia e classificação das oncomicoses .....	13
3.6 Tratamentos das onicomicoses.....	17
3.7 Métodos para melhor a eficácia/ permeação de medicamentos tópicos nas unhas.....	17
3.8 A importância do desenvolvimento de formulações tópicas nas unhas: benéficos e malefícios.....	19
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	20
4.1 Desenho do estudo .....	20
4.2 Procedimentos Metodológicos .....	20
4.2.1 Preparação do bioproduto.....	20
4.2.1.1 Características organolépticas do bioproduto.....	21
4.2.2 Ensaio <i>in vitro</i> da atividade antifúngica do bioproduto.....	22
4.2.2.1 Microrganismos indicadores.....	22
4.2.2.2 Atividade antifúngica do bioproduto contendo óleo essencial de <i>C. reticulata</i> frente a fungos .....	22
4.2.2.3 Atividade antifúngica do bioproduto contendo óleo essencial de <i>C. reticulata</i> frente a leveduras .....	23
4.2.2.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	23
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	25
5.1 Características organolépticas do bioproduto .....	25
5.2 Atividade antifúngica do bioproduto contendo óleo essencial de <i>C. reticulata</i> frente a fungos .....	25

5.3 Atividade antifúngica do bioproduto contendo óleo essencial de <i>C. reticulata</i> frente a levedura.....	28
5.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	30
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>32</b>
<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>33</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A espécie vegetal *Citrus reticulata* Blanco mais conhecida como bergamota é uma fruta cítrica que pertence ao gênero *Citrus* e à família Rutaceae, sendo conhecida popularmente como bergamota, tangerina, mexerica e mandarim. É cultivada em países com verões temperados e invernos suaves, principalmente nos países do Mediterrâneo, Japão, Brasil, Argentina, Estados Unidos e Austrália. O óleo essencial dessa fruta compreende diversos compostos terpenóides dos tipos mono e sesquiterpenos, sendo que esses componentes são extraídos das suas cascas (CHUTIA et al., 2009; KOLLER, 1994; LOTA, 2000).

Os produtos oriundos de plantas medicinais com atividade antimicrobiana vêm ganhando grande perspectiva e tem como meta a descoberta de novos princípios ativos para uma possível aplicação prática no tratamento de diversas infecções. Além disso, sabe-se que alguns antifúngicos sintéticos já são resistentes e/ou vêm tornando-se cada vez mais resistentes a alguns fungos, o que está em crescente preocupação, bem como a provável toxicidade que os antifúngicos sistêmicos causam ao organismo (ABRANTES et al., 2013).

Sabe-se que a ação antifúngica do óleo essencial da *C. reticulata* pode estar associada com os seus principais componentes que possuem mecanismos envolvidos na ação antimicrobiana, em algumas pesquisas é sugerido que essas atividades estejam relacionadas à grande quantidade de flavonas polimetoxiladas, aos monoterpenos, o limoneno e a outros compostos como o  $\alpha$ -pineno decanal, nonanal, citral,  $\gamma$ -terpineno, linalol e  $\alpha$ -terpineol (LIU et al. 2012; SINGH et al. 2010; SOKOVIC et al, 2006; TAO et al. 2014). Devido essa busca busca-se esclarecer se a atividade se dá pela presença de algum constituinte químico especial ou pela a ação em conjunto de todos os componentes do óleo que desencadeia a atividade antifúngica (CHUTIA et al., 2009).

A onicomicose é uma infecção fúngica da unha que é responsável por aproximadamente 50% de todos os distúrbios deste anexo cutâneo, que afetam consideravelmente mais as unhas dos pés do que as unhas das mãos, ela é frequentemente causada por fungos dermatófitos e não dermatófitos ou leveduras, com maior prevalência em pessoas do sexo feminino (MCAULEY et al. 2016; TURNER et al. 2016).

Essa infecção atinge cerca de 5-10% da população mundial, mais precisamente os indivíduos afetados pelos fungos causadores de onicomicoses são

23% em toda a Europa, 20% no leste da Ásia e 14% na América do Norte (MCAULEY et al. 2016; TURNER et al. 2016). O tratamento para tal patologia costuma ser demasiadamente oneroso e prolongado e, além disso, por diversas vezes é ineficaz e bastante dispendioso. Assim, a busca por uma novas alternativas de tratamento para a onicomicose vem sendo muito estudada (ROSSO, 2014).

Diante da limitação do uso desses antifúngicos sintéticos, que já evidenciam resistências por microrganismos, bem como pelo surgimento de reações adversas que podem causar pelo seu uso, novos agentes são propostos na tentativa de diminuir esses casos. Nesse sentido, se considera explorar a potencial atividade antifúngica apresentada pelos óleos essenciais obtidos do gênero *Citrus*, especialmente da espécie *C. reticulata*.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antifúngica de um bioproduto contendo óleo essencial de *Citrus reticulata* para o tratamento de onicomicoses.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar *in vitro* a atividade antifúngica do bioproduto contendo óleo essencial de *Citrus reticulata*, frente às leveduras *Candida tropicalis* e *Candida glabrata* e fungos dermatófitos *Microsporum canis* e *Trichophyton* sp. causadores de onicomicose;
- Analisar a atividade antifúngica *in vitro* do bioproduto em cepas clínicas de fungos dermatófitos *Microsporum canis* e *Trichophyton* sp. isoladas de pacientes com onicomicose.

### 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1 *Citrus reticulata* Blanco

A *Citrus reticulata* é pertencente ao gênero *Citrus*, que pertence à família Rutaceae. Esta espécie é conhecida popularmente como bergamota, tangerina, laranja-mandarim, mexerica ou poncã, sendo que seu nome popular se origina de acordo com cada região em que se encontra. É originária do sul e sudeste asiático, incluindo algumas regiões como África e Austrália, sendo que foram descobertas e adaptadas no Brasil desde o seu descobrimento, por seu clima ser tropical e subtropical, propícios para o seu crescimento e desenvolvimento (KOLLER, 1994).

Dentre as plantas desse gênero também se encontram o Limão (*Citrus limon*), Lima (*Citrus aurantiifolia*), Laranja-doce (*Citrus sinensis*), Laranja-azeda (*Citrus aurantium*), bergamota (*Citrus reticulata*), grapefruit (*Citrus paradisi*) entre outras (Encyclopedia Britannica, INC, 2019). Estas espécies são economicamente interessantes, estão entre as culturas de frutas mais abundantes globalmente e possuem aplicação no aspecto nutricional e medicinal (GROSSER; OLLITRAULT; OLIVARES-FUSTER, 2000). São importantes na extração de óleos essenciais, os quais se destacam, no Brasil, como subprodutos na indústria de sucos. Os óleos essenciais originários dos cítricos, sobretudo da laranja, limão e lima, colocam o Brasil entre os quatro maiores produtores de óleos essenciais do mundo, juntamente com Índia, China e Indonésia (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009).

#### 3.2 Composições químicas do óleo essencial de *Citrus reticulata*

Os óleos essenciais apresentam vários compostos que formam misturas complexas e que podem conter em sua composição cerca de 20 a 60 componentes distintos, dentre as classes de compostos se encontram hidrocarbonetos terpenicos, álcoois simples e terpenicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos furanos, ácidos orgânicos, lactonas e cumarinas (BAKKALI et al. 2008; SIMÕES et al. 2007).

Os óleos essenciais cítricos são formados por mistura de compostos voláteis que apresentam principalmente hidrocarbonetos monoterpenos e são normalmente encontrados nas cascas, folhas e flores (TEIXEIRA; MARQUES; PIO, 2014). Os óleos essenciais extraídos de cítricos possuem diversas atividades biológicas e farmacológicas, por suas várias aplicações estão presentes nas indústrias, tanto a farmacêutica como as de alimentos. (Jing et al., 2014; Viuda-Martos et al., 2007).

Os óleos essenciais possuem ótimo rendimento, aroma, sabores e características farmacológicas sendo vistos com grande interesse, uma das características do óleo é a atividade antifúngica que já é comprovada, sabendo disso se procura reconhecer melhor a sua ação antimicrobiana frente a diversos fungos patogênicos, bem como também conhecer melhor seus componentes (JING et al., 2014; VIUDA-MARTOS et al., 2007).

Segundo Chutia et al. (2009) em uma análise do óleo essencial extraído das cascas de *Citrus reticulata* foi identificado um total de 37 componentes (Tabela 1) dentre eles os principais foram limoneno (46,7%), geranial (19,0%), neral (14,5%), acetato de geranil (3,9%), geraniol (3,5%),  $\beta$ -cariofileno (2,6%), nerol (2,3%), neril acetato (1,1%). Já outro estudo de Sultana et al. (2012) identificou na análise do óleo essencial das cascas de bergamota, compradas em um estabelecimento local, a predominância de monoterpenos como limoneno (92,4%) seguida por  $\gamma$ -terpineno (2,6%) e  $\beta$ -flandandreno (1,8), ambos trabalhos identificaram os componentes do óleo volátil de bergamota pelo método de cromatografia gasosa de massa (GC- MS) e destacaram como componente majoritário o limoneno. O limoneno tem por características contribuir para o odor aromático do óleo, e é um dos componentes majoritários das cascas de frutas cítricas, que possui como umas das suas propriedades a prevenção da desidratação e a inibição de crescimento microbiano nos vegetais (DEMYTTENAERE; VANOVERSCHELDE; DE KIMPE, 2004).

**Tabela 1- Composição química do óleo essencial de *Citrus reticulata***

Nº	Componentes	Porcentagem (%)
1	$\alpha$ -Pinoeno	0,1
2	6-Metil-5 hepten-2 ona	0,7
3	Sabineno	0,1
4	Mirceno	0,3
5	1,8-Cineol	*(<0,1)
6	Limoneno	46,7
7	(Z) -b-ocimeno	*(<0,1)
8	(E) -b-ocimeno	0,4
9	Nonanal	0,4
10	Linalool	0,7
11	Óxido de cis-limoneno	*(<0,1)
12	Óxido trans-limoneno	**(<0,01)
13	Citronelal	1,3
14	Epóxido de furano de rosa	*(<0,1)
15	$\alpha$ -Terpineol	*(<0,1)
16	Decanol	0,6
17	Nerol	2,3
18	Carvone	*(<0,1)
19	Neral	14,5
20	Geraniol	3,5
21	Geranial	19,0
22	Formato de nerilo	**(<0,01)
23	Formato de geranilo	*(<0,1)
24	Undecanal	**(<0,01)
25	$\sigma$ -Elemene	**(<0,01)
26	Acetato de citronelilo	*(<0,1)
27	Acetato de nerilo	1,1
28	Acetato de geranil	3,9
29	Dodecanal	*(<0,1)
30	$\beta$ -cariofileno	2,6
31	Trans-a-bergamoteno	0,1
32	$\alpha$ -Humulene	0,3
33	$\beta$ -bisaboleno	0,2
34	Germacreno B	*(<0,1)
35	(E) -nerolidol	**(<0,01)
36	Óxido de cariofileno	0,2
37	Trans-fitol	*(<0,1)
38	Outro composto	0,6

\* Traços (<0,1)

\*\* Traços (<0,01)

Fonte: Adaptado de CHUTIA et al., 2009.

### 3.3 Propriedades farmacológicas do óleo essencial

Os óleos essenciais são ricos em diversos compostos orgânicos, dentre esses se encontram variados princípios ativos que possuem atividades farmacológicas de interesse para os tratamentos de várias doenças, portanto podem ser utilizadas na indústria farmacêutica, alimentícia e química. Dentre o gênero *Citrus* se encontra várias espécies que possuem diversas atividades farmacológicas, dentre elas se encontra a *Citrus reticulata*. Um estudo relatou que a atividade antibacteriana do

óleo essencial de bergamota se destaca em comparação aos óleos essenciais de laranja e limão, devido a apresentar alto teor de linalol, que foram de 0.02%, 0.02% e 10.23% para a laranja, limão e bergamota, respectivamente (FISHER; PHILLIPS, 2008).

A atividade antifúngica do óleo de *C. reticulata* foi descrita no estudo de Sultana e colaboradores (2012), que analisaram a atividade antifúngica e antibacteriana do óleo em comparação ao tratamento convencional com medicamentos Fluconazol e Tetraciclina, *in vitro*, por método de difusão em ágar. Os ensaios foram associadas a efetividade antibacteriana e antifúngica do óleo frente microrganismos clinicamente patogênicos *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* e *Candida albicans*.

O óleo essencial de *C. reticulata* indicou a presença de atividade contra os microrganismos previamente citados em comparação com os medicamentos utilizados no estudo, por isso notou-se a efetividade da utilização desse óleo e o seu potencial tanto na ação antibacteriana como antifúngica (SULTANA et al. 2012).

### **3.4 Onicomicose**

A onicomicose pode ser definida como uma infecção fúngica da placa ungueal que geralmente é causada por três grupos: de patógenos dermatófitos, não dermatófitos e leveduras. Ela pode afetar as unhas das mãos e dos pés, levando ao espessamento, descoloração e separação do leito ungueal (AKHTAR et al. 2016; GE et al. 2019). Os fungos dermatófitos são responsáveis por mais de 90% dos casos de onicomicoses, sendo que a população comum atingida é de 10% sendo mais prevalente em adultos. Dentre a população que faz parte do grupo de risco, estão pessoas que sofrem de diabetes e portadoras do vírus da imunodeficiência humana (HIV), em que o fator de risco de onicomicoses em pessoas com diabetes chega a ser 1,9 a 2,8 vezes maior do que em indivíduos da população comum, no entanto a prevalência de pessoas com HIV varia de 15 a 40% (AKHTAR et al. 2016; SHIMOYAMA et al. 2018).

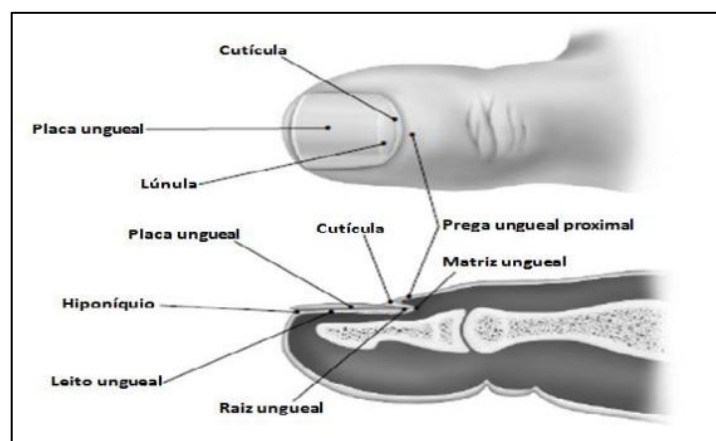
Segundo um estudo retrospectivo de Youssef et al. (2018) que envolveu 3458 casos de onicomicoses, verificou-se que as infecções localizadas nas unhas dos pés foram as mais encontradas chegando a 78% dos casos. Os microrganismos predominantes causadores desses casos de infecção onicomicose em lesões das

unhas das mãos foram causados pelo gênero *Candida*, em que foram identificados deste gênero foram identificadas as espécies de *Candida albicans* em 55,6% dos isolados, *Candida tropicalis* (8,5%) e *Candida parapsilosis* (8,2%) enquanto nas lesões das unhas dos pés, *Trichophyton rubrum* foi de longe o mais frequentemente espécies isoladas (96,8%). Além disso, os pacientes do estudo apresentaram idade de 1 a 85 anos com média de 45 anos, sendo que 50% dos pacientes tinham idade superior a 60 anos.

### 3.5 Fisiopatologia e classificação das oncomicoses

A unha humana é composta por cinco estruturas cutâneas as quais são: matriz, leito ungueal, placa ungueal, pregas da unha e a cutícula (Figura 1). Nas infecções por oncomicoses podem ocorrer diversas deformações como o deslocamento das bordas das unhas, espessamento, aparecimento de manchas brancas, bem como até a distrofia total. (DEGREEF, 2008; FAERGEMANN; BARAN, 2003). Existem quatro principais apresentações clínicas das oncomicoses, elas podem ser subdivididas em: subungueal distal e lateral, subungueal proximal, distrófica subungueal, superficial e total (DEGREEF, 2008; FAERGEMANN; BARAN, 2003).

**Figura 1. Estrutura das unhas**



Fonte: Adaptado de RODGERS; BASSLER, 2001.

A oncomicosose subungueal distal (Figuras 2 e 3) e lateral é o subtipo mais comum de infecção, começa na parte distal da unha e se espalha sob o leito ungueal (hiponíquio), por fim a superfície inferior da unha, que a torna opaca, podendo causar o espessamento da camada córnea, elevando a borda da unha e

levando a uma descoloração da unha que varia do branco ao marrom (FAERGEMANN; BARAN, 2003; ZANARDI, et al., 2008).

**Figura 2. Onicomicose Distal e Lateral**



Fonte: Adaptado de FAERGEMANN; BARAN, 2003.

**Figura 3. Onicomicose Distal e Lateral causada por *Trichophyton rubrum***



Fonte: Adaptado de DEGREEF, 2008.

A onicomicose subungueal proximal (Figura 4) é uma infecção menos comum que a forma anteriormente citada (BALLESTÉ, 2003) Essa infecção começa na prega proximal da unha, podendo atingir a matriz, a placa ungueal e a cutícula, ela é considerada a forma mais comum de onicomicose em pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana, com um rápido desenvolvimento pode envolver todos os dedos dos pés ou das mãos (BALLESTÉ, 2003; DEGREEF, 2008; FAERGEMANN; BARAN, 2003).

**Figura 4. Onicomicose subungueal proximal**



Fonte: Adaptado de FAERGEMANN; BARAN, 2003.

A onicomicose superficial branca (Figura 5) começa com manchas brancas com bordas distintas a placa ungueal dorsal, elas podem se desenvolver e cobrir toda a unha, a superfície se torna áspera e a textura mais macia que o normal. Este tipo de infecção representa de 2 a 5% das onicomicoses dermatofíticas (BALLESTÉ, 2003). Os fungos mais comumente associados a esse tipo de onicomicose é o *Trichophyton mentagrophytes var. interdigitale*, que é responsável por 90% dos casos desse tipo de onicomicose (DEGREEF, 2008; FAERGEMANN; BARAN, 2003). É mais comumente observada nas unhas dos pés (BALLESTÉ, 2003).

**Figura 5. Onicomicose superficial**



Fonte: Adaptado de FAERGEMANN; BARAN, 2003.

A onicomicose distrófica total (Figura 6) representa a forma mais avançada de onicomicose, ela possui duas formas: a primária (Figura 7), geralmente causada pelo agente *Candida* sp. em pacientes imunodeficientes, e a secundária (Figura 8). (ZANARDI, et al., 2008). A unha desmorona e desaparece, deixando um leito de unha espessa e anormal, retendo restos de unha queratóticos (DEGREEF, 2008; FAERGEMANN; BARAN, 2003).

**Figura 6. Onicomicose causada pelo *Trichophyton rubrum***





Fonte: Adaptado de DEGREEF, 2008.

**Figura 7. Onicomicose distrófica total primária**



Fonte: Adaptado de FAERGEMANN; BARAN, 2003.

**Figura 8. Onicomicose distrófica total secundária**



Fonte: Adaptado de FAERGEMANN; BARAN, 2003.

### **3.6 Tratamentos das onicomicoses**

O tratamento de onicomicoses se dá por entrega transungueal dos medicamentos, que é definida como um sistema de transporte do ativo para a unha, esse é o método mais eficaz no tratamento, pois se adere mais facilmente, sua ação

é localizada e fornece poucos efeitos colaterais sistêmicos (AKHTAR et al. 2016). O produto age pelo mecanismo de permeação transungueal que consiste no rompimento de ligações de pontes de dissulfeto que estão presentes na queratina nas unhas, fazem com que ocorra micro porosidade ungueal que permite o deslocamento e a entrada dos princípios ativos (AKHTAR et al. 2016).

O tratamento convencional, utilização de medicamentos é geralmente bem longo e custoso, pode envolver o uso de medicamentos pertencentes a classe das alilaminas, como a terbinafina, e dos azóis como o itraconazol (GUPTA; COOPER, 2008). Em alguns casos o tratamento é combinado com drogas de uso tópico, tem sido adotado para o uso tópico amorolfina e ciclopirox em casos de onicomicose (GUPTA; COOPER, 2008).

Uma terapia eficaz para essa patologia ainda está longe de ser atingida, pois há problemas em relação ao tratamento, em que muitas vezes são prescritos medicamentos sem o conhecimento prévio sobre a infecção e o microrganismo causador da patologia. Além disso, o mecanismo de ação de vários antifúngicos não é bem compreendido ainda, e esses medicamentos frequentemente são utilizados por períodos inadequados, devido à má adesão ao tratamento. Devido a isso o tratamento de onicomicose é uma desafiadora tarefa, pois a infecção pode levar um ano ou mais para se obter uma cura completo, uma vez que o novo crescimento das unhas devem substituir completamente o antigo (ROBERTS; TAYLOR; BOYLE, 2003; WESTERBERG; VOYAKY, 2013).

### **3.7 Métodos para melhorar a eficácia/permeação de medicamentos tópicos nas unhas**

Existem diferentes técnicas e métodos que podem ser uteis no tratamento de onicomicoses dentre estes são conhecidos os métodos mecânicos, químicos e físicos, sendo que o objetivo da terapia tópica para onicomicose é que a droga possa permear os estratos mais profundos da unha em quantidades que estejam acima do concentração inibitória mínima (CIM) (BARAN, 2019). No entanto uma permeação eficaz é desafiadora, pois o medicamento tópico tem que passar por aproximadamente 25 camadas de células queratinizadas, que são 100 vezes mais espessas que o estrato córneo, ou seja, a unha possui baixa permeabilidade e atraso no transporte, métodos químicos e físicos podem auxiliar no problema de permeação e melhor a eficácia tópica do produto que será aplicado (BARAN, 2019).

Os métodos mecânicos são indicados e usados por dermatologistas e podólogos, eles consistem em serem tratamentos invasivos, como: a avulsão da unha, que é a remoção da placa ungueal afetada, que são realizadas através de cirurgia (KUMAR; RAJU, 2013). Outro método é a abrasão das unhas, utilizam-se lixas de unhas, geralmente é realizado antes de tratamento com verniz antifúngico usado para reduzir a quantidade de fungos, envolvendo a diminuição da espessura da placa da unha ou destruí-la, para melhorar permeação da medicação tópica (BARAN, 2019; ROLLMAN, 1982).

Os métodos químicos consistem em produtos químicos que são intensificadores de permeação do fármaco na placa ungueal, alguns deles são os realçadores queratolíticos, por exemplo, a papaína, ureia e ácido salicílico (BARAN, 2019). Os compostos de N-acetil-1-cisteína e mercaptano também são uteis na melhora da permeação dos fármacos tópicos (BARAN, 2019; KUMAR; RAJU, 2013).

Os métodos físicos que permitem a permeação física podem ser considerados superiores aos métodos químicos, devido ao fornecimento de agentes hidrofílicos e macromoleculares (BARAN, 2019). A técnica por laser de dióxido de carbono, que envolve dois métodos: a avulsão da porção da unha afetada seguida de tratamento com laser a 5000w/cm<sup>2</sup>, portanto o tecido subjacente é exposto ao laser de CO<sub>2</sub> (KUMAR; RAJU, 2013). O método que envolve a penetração da placa ungueal com raio laser de CO<sub>2</sub>, que é seguido com o tratamento de antifúngicos tópicos diários, que penetram nos orifícios de punção induzidos pelo laser, sendo este menos utilizado (KUMAR; RAJU, 2013).

Outra técnica é a de hidratação e oclusão, que pode levar ao aumento dos poros da matriz da ungueal, portanto aumenta à penetração transungueal, unhas hidratadas são mais elásticas e permeáveis. Há outros métodos existentes como microagulha, eletroporação, gravura e iontoforese, os quais possibilitam o aumento da permeabilidade de agentes e fármacos através da camada transungueal (BARAN, 2019).

### **3.8 A importância do desenvolvimento de formulações tópicas: benéficos e malefícios**

Os benéficos proporcionados pela terapia ungueal estão principalmente relacionados com a sua forma de administração, modo de preparo e ausência de efeitos adversos sistêmicos e interações medicamentosas (KUMAR; RAJU, 2013).O

seu modo de administração pode fornecer uma adesão facilitada a aqueles que são incapazes de utilizar a terapia sistêmica, como é o caso de muitos idosos e também pacientes que fazem o uso de polifarmácia, sendo preferível nesses casos, pois esta pode ser uma maneira de evitar interações medicamentosas indesejáveis (AKHTAR et al. 2016).

O seu modo de preparo é mais fácil em comparação aos medicamentos por via oral/sistêmica, como os comprimidos e, além disso, seus efeitos colaterais são menos comuns quanto ao surgimento de erupções cutâneas devido a sua aplicação local (KUMAR; RAJU, 2013). No entanto podem surgir, como eritema ungueal da prega proximal da unha, mas desaparecem gradualmente em alguns minutos e ficam menos tempo até o organismo se ajustar ao novo medicamento (AKHTAR et al. 2016).

Todavia, apesar de existirem diversos benefícios relacionados ao seu uso e ação, o uso tópico pode também apresentar problemas relacionados ao mecanismo de ação e limitações quanto à formação do local/tecido onde será aplicado o medicamento tópico, por exemplo, a composição da unha que limita a penetração da droga e permite apenas que uma fração do medicamento tópico penetre para gerar o efeito farmacológico e, portanto, a concentração terapêutica desejada pode não ser alcançada como se espera (KUMAR; RAJU, 2013).

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

O estudo foi realizado nas dependências da Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC), sendo que a preparação da formulação aconteceu no Laboratório de Farmacognosia (bloco 35) do curso de Farmácia e o estudo *in vitro* antimicrobiano foi desenvolvido no Laboratório de Biologia da universidade (bloco 20).

Este trabalho faz parte de um projeto mãe intitulado “Desenvolvimento de métodos de diagnóstico e de terapias alternativas para câncer e doenças oportunistas” realizado no Parque Regional Tecnológico da UNISC – TecnoUnisc. O bioproduto testado já foi desenvolvido anteriormente por outros integrantes do projeto e avaliada sua formulação e estabilidade, a partir dele foi desenvolvido os testes *in vitro* descritos nesse projeto.

O bioproduto foi desenvolvido posteriormente no trabalho de conclusão do curso “Avaliação da estabilidade do óleo essencial de bergamota (*Citrus reticulata* Blanco) em diferentes preparações tópicas com ação antifúngica” da acadêmica Camila Drewanz Brum. Porém a formulação do bioproduto teve adaptações no presente trabalho, como a substituição da Vitamina E da antiga formulação pelo aumento das concentrações dos óleos vegetais descritos na Tabela 2.

### **4.1 DESENHO DO ESTUDO**

A pesquisa que foi realizada neste trabalho possui carácter analítico e caracteriza-se como um estudo quantitativo experimental

### **4.2 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS**

#### **4.2.1 Preparação do bioproduto**

Os óleos vegetais utilizados para a preparação do bioproduto citados neste estudo foram obtidos comercialmente através da aquisição dos mesmos pela Farmácia-escola e o óleo de oliva foi obtido a partir de uma doação de uma empresa produtora de azeite de oliva da região de Caçapava do Sul, RS. O bioproduto foi preparado a partir dos ingredientes citados na Tabela 2.

**Tabela 2. Composição do bioproduto contendo o óleo essencial de bergamota (*Citrus reticulata* Blanco)**

Componentes		Concentração (%)	Função
<b>International Nomenclature of Cosmetic Ingredients (INCI)</b>	<b>Nomenclatura</b>		
<i>Citrus reticulata</i> peel oil	Óleo essencial de bergamota	8%	Principio ativo Atividade antifúngica
<i>Helianthus annuus</i> seed oil	Óleo vegetal de girassol	23%	Veiculo
<i>Persea gratissima</i> fruit oil	Óleo vegetal de abacate	23%	Veiculo
<i>Olea europaea</i> fruit oil	Óleo vegetal de oliva	23%	Veiculo
<i>Prunus amygdalus dulcis</i> oil	Óleo vegetal de amêndoas	23%	Veiculo
Butylated hydroxytoluene	BHT	0,02%	Antioxidante/conservante
	Total	100%	

Através da adição dos componentes da Tabela 2 nas correspondentes quantidades foram medidas em proveta e transferidas para um Becker, desse modo todos os óleos foram acrescentados. O Butylated hydroxytoluene (BHT), por se apresentar em forma sólida foi misturado com um pouco do óleo de oliva até completa solubilização. Após todos os componentes serem adicionados, o Becker foi levado à agitação por aproximadamente 30 min até a completa homogeneização. O bioproduto foi envasado em frasco de vidro âmbar previamente esterilizado e armazenado em congelador à - 7º graus.

#### 4.2.1.1 Características organolépticas do bioproduto

As amostras foram visualmente observadas a fim de verificar possíveis alterações na formulação, como separação de fases, precipitação ou turvação. A classificação utilizada para avaliar a aparência das formulações foi:

- Solubilidade: Precipitado; separado; homogêneo.
- Aparência: turvo ou límpido.
- A textura: viscoso ou liquido
- A cor: característica

## 4.2.2 Ensaios *in vitro* da atividade antifúngica do bioproduto

### 4.2.2.1 Microrganismos indicadores

Para avaliação da atividade antifúngica do bioproduto foram utilizados os fungo dermatófitos *Microsporum canis* e também o fungo *Trichophyton* sp., isolados clinicamente de pacientes com onicomicose. Foram utilizadas ainda as leveduras e também isolado clínico, *Candida glabrata* (ATCC® 90030) e *Candida tropicalis* (ATCC® 13803). Todas as cepas fúngicas foram mantidas em tubos com Ágar Sabouraud. As cepas fúngicas foram obtidas a partir da coleção do Laboratório de Microbiologia da Universidade de Santa Cruz do Sul e as demais espécies de leveduras e dermatófitos foram obtidas a partir da doação de um laboratório de Análises Clínicas de Santa Cruz do Sul.

### 4.2.2.2 Atividade antifúngica do bioproduto contendo óleo essencial de *C. reticulata* frente a fungos

Para avaliação da atividade antifúngica do bioproduto frente aos fungos *Microsporum canis* e *Trichophyton* sp. foram utilizadas a metodologia descrita por Venturoso et al. (2011), com modificações. O bioproduto foi submetido ao meio de cultura Ágar Sabouraud fundente, de modo a obter as concentrações de 5, 10 e 20  $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ , juntamente com cerca de 0,05% de Tween 80 (Polissorbato 80). O meio de cultura foi vertido em placas de Petri e, após a sua solidificação, retirou-se um disco micelial de 0,3 cm do diâmetro do microrganismo-teste de uma cultura fúngica e foi colocado no centro da superfície de cada uma das placas, incubadas a uma temperatura de 25°C.

Após o período de 7 dias realizou-se as medições do diâmetro de crescimento das colônias. A porcentagem de inibição do crescimento (PIC) radial a qual é calculada através da fórmula:

$$\text{PIC} = \frac{d_c - d_t}{d_c} \times 100$$

$d_c$  = diâmetro da colônia controle e  $d_t$  = diâmetro da colônia teste.

Considerou-se o controle negativo o meio de cultura sem adição do bioproduto a ser estudado e como positivo o fármaco antifúngico Itraconazol (64  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). O procedimento foi realizado em triplicata e os dados foram expressos em média e desvio padrão de três medições.

#### **4.2.2.3 Atividade antifúngica do bioproduto contendo óleo essencial de *C. reticulata* frente a leveduras**

Para avaliação da atividade do bioproduto de óleo essencial de bergamota frente às leveduras, *Candida glabrata* e *Candida tropicalis* foram realizadas através da técnica de ágar difusão em disco descrita por Abrantes et al. (2013), com algumas adaptações. Os inóculos foram preparados em solução salina com turbidez correspondente a  $10^6$  UFC/mL e semeados em placas contendo ágar Sabouraud. O bioproduto foi testado nas concentrações de 5, 10 e 20  $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$  e as placas incubadas em estufa a 35°C por 48 horas. Após a sua incubação, realizou-se a medição do diâmetro dos halos de inibição. O procedimento foi desenvolvido em triplicata e os dados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão de três medições. Como controle negativo utilizou-se água estéril em discos de papel de papel filtro com água destilada estéril e, como controle positivo utilizou-se o disco do fármaco antifúngico Itraconazol (64ug).

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

Para determinação da CIM utilizou-se as leveduras *C. tropicalis* e *C. glabrata* com maior proporção de crescimento inibido pelo bioproduto. A avaliação da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada pelo método de microdiluição em caldo, que baseou-se na técnica descrita por Almeida et al. (2009), com adaptações.

Para preparação dos inóculos, as leveduras foram cultivadas em tubos com ágar Sabouraud por 48 horas a 36° C. Após preparou-se uma suspensão das leveduras em caldo Sabouraud até obter a escala de 0,5 McFarland. O bioproduto foi primeiramente diluído em água destilada estéril com 0,05% de Tween 80 e homogeneizado em agitador de tubos, obtendo-se a concentração de 400  $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$  para o bioproduto. Foram utilizadas placas de microdiluição de 96 poços. Em cada poço inseriu-se 100  $\mu\text{L}$  de caldo Sabouraud com a suspensão das leveduras e 100  $\mu\text{L}$  da amostra do bioproduto, para obtenção da concentração inicial de 200  $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ . As concentrações subsequentes foram obtidas após diluições seriadas na placa, partiu-se da concentração inicial de 200  $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$  até 0,390  $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Os poços de uma coluna da placa foram destinados ao controle de crescimento, e a outra coluna para controle positivo (Itraconazol) e uma fileira para controle de esterilidade. Ao



final a placa foi selada com plástico filme, homogeneizada e incubada a 35°C por 48 horas.

Após a incubação foi realizada a observação da reação colorimétrica com corante resazurina 0,01%. Presença de cor azul/roxo nos orifícios foi interpretada como ausência de crescimento fúngico e o desenvolvimento de cor vermelho-rosa como presença crescimento fúngico. Considera-se como CIM a menor concentração do bioproduto capaz de inibir completamente o crescimento.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Características organolépticas do bioproduto

O bioproduto mostrou-se límpido, homogêneo, viscoso e levemente amarelado pela cor características dos óleos.

### 5.2 Atividade antifúngica do bioproduto contendo óleo essencial de *C. reticulata* frente a fungos

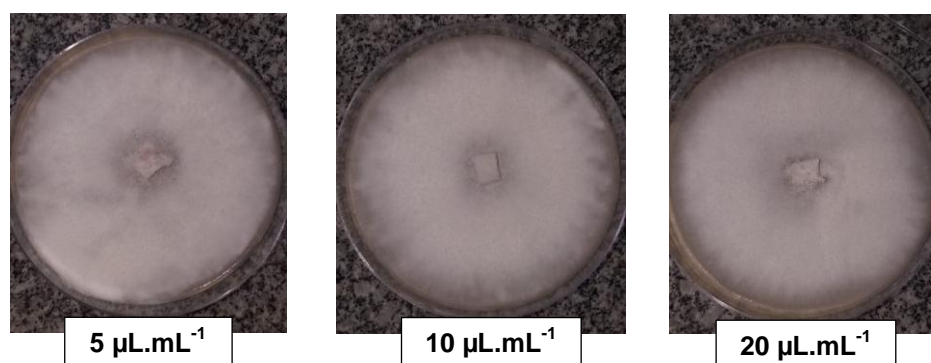
Nos testes realizados para avaliação da atividade antifúngica do óleo essencial de *C. reticulata* frente ao fungo dermatófito *Microsporium canis*, a concentração do bioproduto que apresentou melhor porcentagem de inibição foi a de 20  $\mu\text{L.mL}^{-1}$  (10,59%) seguidas respectivamente 5  $\mu\text{L.mL}^{-1}$  (9,05%) e 10  $\mu\text{L.mL}^{-1}$  (7,78%), (Tabela 3). Em comparação ao controle positivo Itraconazol o bioproduto demonstrou menor porcentagem de inibição sendo o bioproduto (10,59%), e o fármaco Itraconazol 64  $\mu\text{L.mL}^{-1}$  (41,17%).

**Tabela 3. Efeito do bioproduto contendo óleo essencial de *Citrus reticulata* sobre o crescimento micelial de *Microsporium canis***

Microrganismo teste	Bioproduto		
	Concentrações ( $\mu\text{L.mL}^{-1}$ )	Inibição do crescimento (%) <sup>*</sup>	Média do diâmetro dos halos das colônias (mm)
<i>Microsporium Canis</i>	5	9,05 ± 0,46	7,73
	10	7,78 ± 0,29	7,83
	20	10,59 ± 0,10	7,60

\* média ± desvio padrão

**Figura 9. Crescimento micelial 5,10, 20  $\mu\text{L.mL}^{-1}$  do bioproduto frente a *M. canis***



Segundo Kumar et al. (2013) a terapia oral de antifúngicos e o tratamento transungueal possui por si grandes desafios ao tratamento 100% eficaz. Como o bioproduto é um produto que contém somente óleos vegetais constituídos por compostos lipossolúveis, estes conseguem mais facilmente atravessar as camadas da pele, além disso, existe uma escassa quantidade substâncias antifúngicas disponíveis no comércio em comparação com os antibióticos e também são relativamente insatisfatórias para controlar as infecções geradas por organismos fúngicos.

Não foram encontrados artigos que testassem o óleo de *C. reticulata* frente a *M. canis*. No trabalho de Tao et al. (2014) que analisou o efeito antifúngico do óleo essencial de *C. reticulata* pela inibição do crescimento micelial de *Penicillium italicum* (0,32 a 10.0  $\mu\text{L.mL}^{-1}$ ) e *Penicillium digitatum* (1,25 a 40  $\mu\text{L.mL}^{-1}$ ) onde a inibição se apresentou dose-dependente, a porcentagem de crescimento micelial foi de 42.13% (*P. italicuman*) e 4.64% (*P. digitatum*). Entretanto, no presente estudo, foi usado 5, 10 e 20  $\mu\text{L.mL}^{-1}$  do bioproduto, que possui somente 8% do óleo de bergamota, enquanto que no estudo de Tao, foi utilizado o óleo essencial puro de bergamota e em concentrações de 0,32 a 40  $\mu\text{L.mL}^{-1}$ .

Em um estudo de Wang et al. (2012), que testaram diferentes concentrações do óleo essencial de *C. reticulata* de 0,3 a 20  $\mu\text{L.mL}^{-1}$  frente aos mesmos fungos testados por Tao et al. (2014), a análise dos resultados apresentou melhor resultado para o *P.italicum* onde observou-se inibição micelial em baixa concentrações, enquanto no *P. digitatum* não notou-se nenhum efeito de crescimento micelial nessas mesmas concentrações. No entanto pelo aumento das concentrações testadas de 5 a 20  $\mu\text{L.mL}^{-1}$ , o estudo de Wang et al. (2012) verificou que ambos os organismos estudados apresentaram alta porcentagem de inibição. O que demonstra que o óleo de *C. reticulata* possui potencial antifúngico em ambos os estudos.

Já o presente estudo demonstrou melhores resultados nas concentrações de 20  $\mu\text{L.mL}^{-1}$  do bioproduto frente ao *M. canis*, se assemelhando as concentrações utilizadas do óleo puro de bergamota nos estudos citados de Wang et al. (2012) e Tao et al. (2014).

Na avaliação da atividade antifúngica frente aos fungos *Trichophyton* sp. foram utilizados 2 amostras de isolados clínicos. A porcentagem de inibição para a amostra 1 de 5, 10, 20  $\mu\text{L.mL}^{-1}$  foi de 8,24%, 7,88%, sendo que desconsiderou-se o resultado da concentração de 20  $\mu\text{L.mL}^{-1}$ , pois observou-se contaminação. Já para a amostra

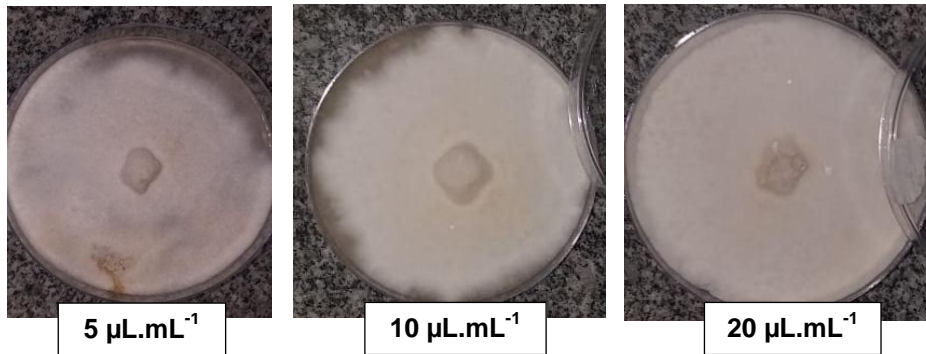
2 para as concentrações de 5, 10, 20  $\mu\text{L.mL}^{-1}$  a porcentagem de inibição foi de 9,5%, 9,63%, 2,25% respectivamente, sendo que a concentração que demonstrou melhor inibição foi a de 10  $\mu\text{L.mL}^{-1}$ , inibiu o crescimento micelial cerca de 9,63% (Tabela 4).

**Tabela 4. Efeito do bioproduto contendo óleo essencial de *Citrus reticulata* sobre o crescimento micelial de *Trichophyton sp.***

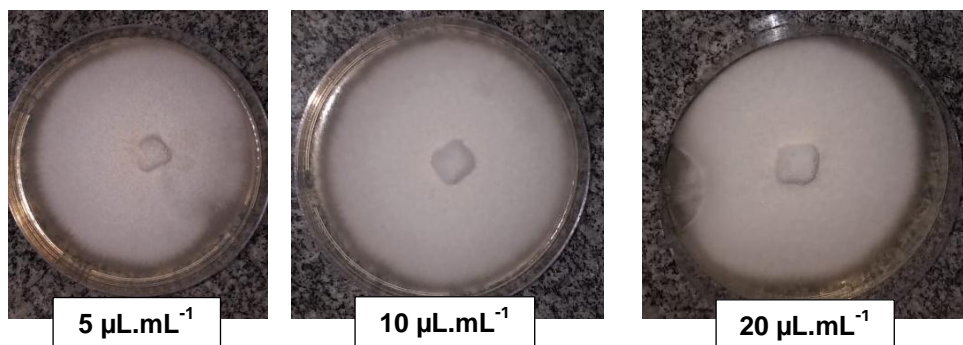
Microrganismo teste	Amostras	Bioproduto		
		Concentrações ( $\mu\text{L.mL}^{-1}$ )	Inibição do crescimento (%)*	Média do diâmetro dos halos das colônias (mm)
<i>Trichophyton sp.</i>	1	5	8,24 $\pm$ 0,65	7,80
		10	7,88 $\pm$ 0,28	7,83
		20	-	-
	2	5	9,50 $\pm$ 0,12	7,26
		10	9,63 $\pm$ 0,25	7,23
		20	2,25 $\pm$ 0,60	7,80

\* média  $\pm$  desvio padrão

**Figura 10. Crescimento micelial 5,10, 20  $\mu\text{L.mL}^{-1}$  do bioproduto frente a *Trichophyton sp.* (Amostra 1)**



**Figura 11. Crescimento micelial 5,10, 20  $\mu\text{L.mL}^{-1}$  do bioproduto frente a *Trichophyton sp.* (Amostra 2)**



Um estudo de Patra et al. (2002) que utilizou óleos essenciais contra fungos que causam infecção de unhas, dentre eles o óleo de *Foeniculum vulgare*, conhecido popularmente como funcho, usando as concentrações de 1 a 0,1  $\mu\text{L.mL}^{-1}$ , através do crescimento micelial de *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes*, comprovou a ação fungicida do óleo puro de 100% a 89% respectivamente da maior a menor concentração testada para *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* (100% a 34%).

Em um estudo de Frias et al. (2009) a avaliação in vitro da atividade antifúngica de extratos de plantas e óleo de eucalipto sobre *Trichophyton mentagrophytes* nas concentrações de 4, 5 e 8% utilizadas notou-se efeito inibitório do desenvolvimento deste dermatófitos nas respectivas concentrações citadas, sendo que apresentou 6,7 cm do diâmetro da colônia médio.

### 5.3 Atividade antifúngica do bioproduto contendo óleo essencial de *C. reticulata* frente a leveduras

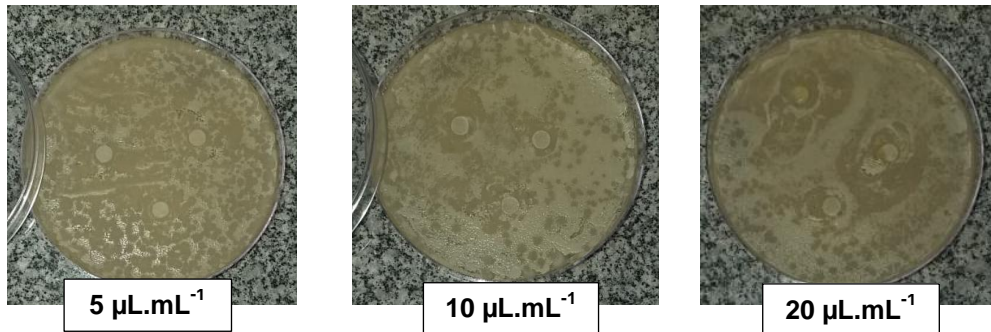
Nas concentrações testadas foi verificada inibição do crescimento das espécies do gênero *C. glabrata* e *C. tropicalis* pelo método de difusão em disco, nas quantidades de 5, 10, 20  $\mu\text{L.mL}^{-1}$ . Os resultados dos halos de inibição para o teste com a *C. glabrata* foram maiores em comparação ao da *C. tropicalis* (Tabela 5).

**Tabela 5. Ação do potencial antifúngico do bioproduto contendo óleo essencial de *Citrus reticulata* frente a cepas de *Candida glabrata* e *Candida tropicalis***

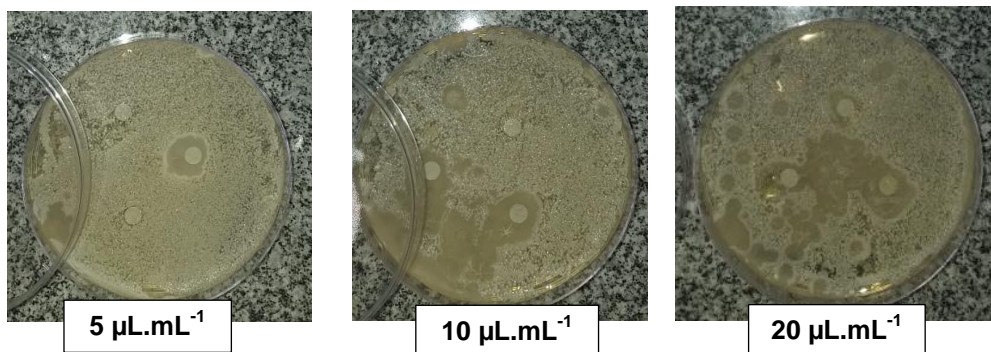
Espécie de <i>Candida sp.</i>	Bioproduto Concentrações ( $\mu\text{L.mL}^{-1}$ )	Halos de inibição (mm)	
		Média*	Desvio padrão*
<i>C. glabrata</i>	5	15,36	-
	10	15,22	0,064
	20	12,31	4,21
<i>C. tropicalis</i>	5	-	-
	10	9,82	0,73
	20	8,28	2,04

\* média  $\pm$  desvio padrão

**Figura 12. Difusão em disco 5,10,20  $\mu\text{L.mL}^{-1}$  do bioproduto (*C. tropicalis*)**



**Figura 13. Difusão em disco 5, 10, 20  $\mu\text{L.mL}^{-1}$  do bioproduto (*C. glabrata*)**



Castro et al. (2011) realizou um ensaio para determinar a atividade antifúngica de óleos essenciais dentre eles o óleo de *Citrus reticulada* frente a cepas de *Candida* também pelo método de difusão em disco, mas utilizando a concentração de 50  $\mu\text{L}$  dos óleos essenciais. Os valores obtidos foram medidos através dos halos de inibição de crescimento, sendo que a espécie de *C. tropicalis* de interesse apresentou melhor inibição de 0 a 10 mm de halo de inibição. Resultado semelhante a esse trabalho, em que a média do diâmetro do halo para *C. tropicalis* ficou entre 9,82 a 8,28 mm, utilizando somente 10  $\mu\text{L.mL}^{-1}$  e 20  $\mu\text{L.mL}^{-1}$  do bioproduto respectivamente, lembrando que no estudo de Castro et al. (2011) foi usado o óleo puro e em maior concentração. No entanto de todas a cepas analisadas no ensaio de Castro et al. (2011), 66,7% mostraram-se resistente aos óleos de *C. reticulata*, *Matricaria chamomilla*, *Eugenia uniflora* e *Zingiber officinale*, dentre todas as cepas as de *C. tropicalis* LM 708 e *C. tropicalis* LM 759 apresentaram-se mais resistentes.

Cavalcanti et al. (2012) realizou uma avaliação antifúngica *in vitro* utilizando os óleos essenciais de *Citrus aurantium* (laranja), *Citrus limmom* (limão siciliano), *Citrus reticulata* (bergamota), *Xylopiã brasiliensis* (pindaíba), e *Campomanesia xanthocarpa* (guabiroba), *Ocimum basilicum* (manjeriçã) e *Cymbopogon martinii* (palmarosa) frente a cepas de *Candida* sp. Através do método de difusão em disco utilizando 20  $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$  dos óleos. As espécies de *Candida* testadas nesse estudo foram as *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei* e o óleo de bergamota apresentou maiores halos de inibiçã frente *C. albicans* (11,5 mm), seguido da *C. tropicalis* (10,5 mm) e *C. krusei* (10 mm), em comparaçã ao presente estudo que apresentou melhor inibiçã frente a *C. glabrata* (15,36 em 5  $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) e *C. tropicalis* (9,82 em 10  $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).

#### 5.4 Determinaçã da Concentraçã Inibitória Míxima (CIM)

Na avaliaçã da determinaçã da CIM foram utilizados os microrganismos *C. glabrata* e *C. tropicalis*. A partir da avaliaçã da placa, nã foi possível a visualizaçã de inibiçã de crescimento das leveduras, sendo que após a revelaçã da placa utilizando o corante resazurina, percebeu-se que houve crescimento microbiano em todos os poços.

No estudo de Castro et al. (2011) foi observada a concentraçã inibitória míxima a partir do método da microdiluiçã, para o desenvolvimento desse teste foram utilizada cepas *C. albicans* ATCC 76846 e *C. tropicalis* ATCC 13803, em que usaram como concentraçã inicial 5000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , que foi diluída seriadamente. Também, no estudo de Castro, realizou-se o teste de sensibilidade das cepas frente o antifúngico nistatina, considerando como a droga de escolha para o tratamento na clínica. O óleo testado foi o que demonstrou melhor resultados na difusão em disco, o óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* (Caneleira-verdadeira), foi observada CIM de 312,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  sobre as cepas de *C. albicans* e *C. tropicalis*, no entanto a nistatina apresentou uma CIM de 32  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Na avaliaçã da determinaçã da concentraçã inibitória míxima do microrganismo *Candida glabrata*, observou-se na revelaçã da placa o crescimento fúngico em todos os poços onde foi adicionado o óleo e somente a inibiçã do crescimento no controle positivo e controle de esterilidade. No estudo de Nunes et al. (2015) avaliaram a atividade antifúngica do óleo essencial de *Ageratum conyzoides* L. *in vitro* frente a frente espécies de *Candida*, utilizando o mesmo método de microdiluiçã em placa, na avaliaçã da atividade utilizou-se o óleo de

*Ageratum conyzoides* L. , demonstrou-se o CIM, a menor concentração a inibir o crescimento fúngico da *C. glabrata* foi 2,22 mg/mL, em comparação ao presente trabalho foi utilizado concentrações maiores.

Segundo o que foi desenvolvido nesse presente estudo o bioproduto contendo óleo essencial de *C. reticulada* foi diluído em água destilada estéril com tween 80, já o estudo de Nunes et al. (2015) fez a diluição em Dimetilsulfóxido (DMSO) para realização do teste pelo método de microdiluição em placas, que é um diluente que também possui afinidade com compostos apolares, podendo essa ser uma das possíveis razões para que a técnica de CIM não tenha demonstrado resultados favoráveis em comparação com a técnica de difusão em disco. Os óleos essenciais são insolúveis em água e complexos e para facilitar a sua solubilidade são necessários solventes compatíveis como o tween e o DMSO (NASCIMENTO et al. 2007).



## 6 CONCLUSÃO

No presente trabalho desenvolvido foi possível concluir:

-O bioproduto contendo óleo essencial de *C. reticulata* apresentou atividade antifúngica *in vitro* frente aos fungos dermatófitos causadores de onicomicose *Trichophyton* sp. e *M. canis*;

- O efeito do bioproduto frente às *C. glabrata* e *C. tropicalis* apresentou inibição na técnica difusão-disco, porém no ensaio de CIM não apresentou inibição.

- Diante desses resultados da atividade antifúngica demonstrada pelo bioproduto em relação aos fungos e leveduras estudadas pode-se observar que o mesmo possui atividade frente a esses microrganismos, porém serão necessários mais testes para confirmar estas atividades, talvez em maiores concentrações do óleo de interesse, além de outras espécies de fungos;

## REFERÊNCIAS

- ABRANTES, Maiza Rocha de et al. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre leveduras *Candida* não *albicans*. *Revista Brasileira de Farmácia*, v. 94, n. 3, p. 227 – 233, 2013.
- ALMEIDA, Livia Maria Martins de et al. Resposta *in vitro* de fungos agentes de micoses cutâneas frente aos antifúngicos sistêmicos mais utilizados na dermatologia. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 84, n. 3, p. 249-55, 2009.
- AKTAR et al. Onychomycosis: Potential of Nail Lacquers in Transungual Delivery of Antifungals. *Scientifica*. p. 12, 2016.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils. *Food and Chemical Toxicology*, France. p. 446–47, 2008.
- BARAN, Robert. *Baran & Dawber's Diseases of the Nails and their Management*. New Jersey: John Wiley & Sons Ltd, 2019. p. 42-44
- CASTRO, Ricardo D.; LIMA, E. O. Screening da Atividade Antifúngica de Óleos Essenciais sobre Cepas de *Candida*. *Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada*, vol. 11, núm. 3, 2011. pp. 341-345
- CAVALCANTI, Yuri W. et al. Atividade Antifúngica de Extratos Vegetais Brasileiros sobre Cepas de *Candida*. *Revista Brasileira de Ciências da Saúde*. v. 16 n.1, pp 43-48, 2012.
- CHUTIA, M. et al. Antifungal activity and chemical composition of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against phytopathogens from North East India. *LWT - Food Science and Technology*. v. 42. p. 777-780, 2009.
- DEGREEF; H. Clinical forms of dermatophytosis (ringworm infection). *Mycopathologia*. p. 257-65, 2008.
- DEMYTTENAERE, J. C. R.; VANOVERSCHELDE, J.; DE KIMPE, N. Biotransformation of (R)-(+)- and (S)-(-)-citronellol by *Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp. and the use of solid phase microextraction for screening. *Journal of Chromatography*. v. 1027, n. 1-2, p. 137-146, 2004.
- Encyclopedia Britannica, Inc. *Citrus*. 2019. Disponível em: <<https://academic-ebritannica.ez127.periodicos.capes.gov.br/levels/collegiate/article/Citrus/82729#>>. Acesso em 12 set. 2019.
- FAERGEMANN, J.; BARAN, R. Epidemiology, clinical presentation and diagnosis of Onychomycosis. *British Journal of Dermatology*. p.1–4, 2003.

FISHER, Katie; PHILLIPS, Carol. Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer? *Trends in Food Science & Technolog.* V. 19 p 156-164, 2008.

FRIAS, D.F.R.; KOZUSNY-ANDREANI, D.I. Avaliação in vitro da atividade antifúngica de extratos de plantas e óleo de eucalipto sobre *Trichophyton mentagrophytes*. *Rev. Bras. Pl. Med.*, Botucatu, v.11, n.2, p.216-220, 2009.

GE, Gai et al. Different toenail onychomycosis due to *Rhodotorula mucilaginosa* and *Candida parapsilosis* in an immunocompetent young adult. *Medical Mycology Case Reports*. V. 24. p. 69–71, 2019.

GUPTA, A. K; COOPER, E. A. Update in antifungal therapy of dermatophytosis. *Mycopathologia*. p. 353-67, 2008.

JING et al. Antifungal Activity of Citrus Essential Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, China/ Eua. v. 62 p. 3011-3022, 2014.

KOLLER, O. C. Citricultura: laranja, limão e tangerina. Porto Alegre: Rigel, p. 446, 1994.

KUMAR, T. Praveen; RAJU, P. Narayana. Transungual Drug Delivery: A Promising Route to Treat Nail Disorders. *International Journal of Pharma Research & Review*. p. 22-33, 2013.

MCAULEY, W.J. et al. An investigation of how fungal infection influences drug penetration through onychomycosis patient's nail plates. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* . p.178–184, 2016.

NASCIMENTO, P. F. C. et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, São Paulo, v. 17, p. 108- 113, 2007.

NUNES et al. Extração, caracterização e atividade antifúngica in vitro do óleo essencial de *Ageratum conyzoides* L. *Anais do Congresso Nacional de Iniciação Científica*, Pernambuco: 2015.

LIU, Li et al. Structure–Activity Relationship of Citrus Polymethoxylated Flavones and Their Inhibitory Effects on *Aspergillus niger*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 60, s. n., p. 4336–4341, 2012.

LOTA, Marie-Laure et al. Chemical variability of peel and leaf essential oils of mandarins from *Citrus reticulata* Blanco. *Biochemical Systematics and Ecology*. p. 61-78, 2000.

PATRA et al. Utilization of essential oil as natural antifungal against nail-infective fungi. *Flavour Fragrance Journal*. v. 17, p. 91–94, 2002.

ROBERTS, D. T.; TAYLOR, W. D.; BOYLE, J. Guidelines for treatment of onychomycosis. *British Journal of Dermatology*. v.148, n. 3, p. 402–410, 2003.

RODGERS, PHILLIP M. D.; BASSLER, Mary M. D. Treating Onychomycosis. *American Family Physician*. v. 63, n.4, p. 664-662, 2001.

ROLLMAN, Ola. Treatment of onychomycosis by partial nail avulsion and topical miconazole. *Dermatologica*.v.165: p. 54–61, 1982.

ROSSO, J.Q. The Role of Topical Antifungal Therapy for Onychomycosis and the Emergence of Newer Agents. *The Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology*, v. 7, n. 7, p. 10-18, 2014.

SEBRAE – Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. *O cultivo e o mercado da tangerina*. 2016. Disponível em: <<http://www.sebrae.com.br/sites/PortalSebrae/artigos/o-cultivo-e-o-mercado-da-tangerina,aefda5d3902e2410VgnVCM100000b272010aRCRD>> . Acesso em: 13 set. 2019.

SINGH, Priyanka et al. Effect of *Citrus reticulata* and *Cymbopogon citratus* Essential Oils on *Aspergillus flavus* Growth and Aflatoxin Production on *Asparagus racemosus*. *Mycopathologia*, v. 170, s. n., p. 195-202, 2010a.

SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira (Org.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 4. ed. Porto Alegre: Ed. da UFSC, 2002.

SOKOVIC, M.; GRIENSVEN, L. J. L. D. Antimicrobial activity of essential oils and their components against the three major pathogens of cultivated button mushroom *Agaricus bisporus*. *European Journal of Plant Pathology*, v. 116, s. n., p. 211–224, 2006.

SULTANA et al. Influence of volatile constituents of fruit peels of *Citrus reticulata* Blanco on clinically isolated pathogenic microorganisms under In-vitro. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. p. S1299-S1302 ,2012.

TAO, Nengguo et al. Anti-fungal activity of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum*. *Food Chemistry*. p. 265–27, 2014.

TEIXEIRA, J. P. F.; MARQUES, M. O. M.; PIO, R. M. Caracterização dos óleos essenciais em frutos de nove genótipos de tangerina. *Citrus Research & Technology*, Cordeirópolis, v. 35, n. 1, p.1-10, 2014.

TURNER, R., et al. A novel vehicle for enhanced drug delivery across the human nail for the treatment of onychomycosis. *International Journal of Pharmaceutical Compounding*. p.71–80, 2016.

VENTUROSOSO, L. R. et al. Inibição do crescimento *in vitro* de fitopatógenos sob diferentes concentrações de extratos de plantas medicinais. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 78, n. 1, p. 89-95, 2011.

- VIUDA-MARTOS, M et al. Antibacterial Activity Of Lemon (*Citrus lemon* L.), Mandarin (*Citrus reticulata* L.), Grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and Orange (*Citrus sinensis* L.) Essential Oils. *Journal of Food Safety*. v.28. p. 567–576, 2008.
- YOUSSEF, A. B. et al. Onychomycosis: Which fungal species are involved? Experience of the Laboratory of Parasitology-Mycology of the Rabta Hospital of Tunis. *Journal de Mycologie Médicale*. v. 28. p. 651–654, 2018.
- WANG, Hua et al. Effect of Shatangju (*Citrus reticulata* Blanco) Essential Oil on Spore Germination and Mycelium Growth of *Penicillium digitatum* and *P. italicum*. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. pp 715 – 723, 2012.
- WESTERBERG, D. P.; VOYACK, M. J. Onychomycosis: current trends in diagnosis and treatment. *American Family Physician*, v. 88, n. 11, p. 762–770, 2013.
- ZANARDI, Daniela et al. Avaliação dos métodos diagnósticos para onicomicose. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 83, n. 2, p.119-24, 2008.