

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE
NÚCLEO DE PESQUISA E INOVAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

EDILENE BOLUTARI BAPTISTA

**ESTUDO DE ESTABILIDADE E EFICÁCIA DE FORMULAÇÃO TÓPICA
FITOTERÁPICA PARA TRATAMENTO DE DERMATOFITOSE ANIMAL**

JUIZ DE FORA

2015

EDILENE BOLUTARI BAPTISTA

**ESTUDO DE ESTABILIDADE E EFICÁCIA DE FORMULAÇÃO TÓPICA
FITOTERÁPICA PARA TRATAMENTO DE DERMATOFITOSE ANIMAL**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde, área de concentração Saúde Brasileira, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de doutora.

Orientadora: Prof^a Dr^a Nádia Rezende Barbosa Raposo

JUIZ DE FORA

2015

EDILENE BOLUTARI BAPTISTA

**ESTUDO DE ESTABILIDADE E EFICÁCIA DE FORMULAÇÃO TÓPICA
FITOTERÁPICA PARA TRATAMENTO DE DERMATOFITOSE ANIMAL**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde, área de concentração Saúde Brasileira, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de doutora.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Nádia Rezende Barbosa Raposo – Orientadora
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Frederico Pittella Silva
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Marcone Augusto Leal de Oliveira
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof^a. Dr^a. Emília Maricato Pedro dos Santos
Universidade Presidente Antônio Carlos

Prof. Dr. Fernando Teixeira Gomes
Universidade Presidente Antônio Carlos

*Aos meus amados pais,
Edite Bolutari Baptista e João Baptista,
que me ensinaram as coisas mais importantes da vida.
Ao meu marido Lippy Faria Marques,
meu companheiro de todos os momentos.*

*Aos meus amigos mais fiéis,
Bruce, Hanna, Ozzy, Linus e Pauling,
que alegam todos os meus dias.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai que nunca mediu esforços para que eu tivesse uma formação acadêmica completa e, que mesmo sem presenciar fisicamente minhas conquistas profissionais, sempre esteve no meu coração e mente.

À minha mãe, Edite Bolutari Baptista, a melhor mãe do mundo.

À minha irmã, Edmara, ao Jonas e aos meus sobrinhos, Matheus e Julia, por compreenderem minhas ausências e me amarem mesmo assim.

Aos meus segundos pais, Leni e Lafontaine, que estão sempre dispostos a me ajudarem em tudo.

Aos meus amigos de laboratório Annelisa, Érika, Dani, Pedro e Fatinha, levarei o carinho de vocês e todos os bons momentos para toda minha vida.

À profa. Dra. Nadia Rezende Barbosa Raposo por abrir as portas do seu laboratório e permitir que esse trabalho fosse realizado e que novas experiências profissionais e pessoais fossem vividas.

À Larissa Silveira, Kauana e Alexandre, por toda ajuda no laboratório.

Ao amigo Hernane Barud, pela presteza com os testes termoanalíticos, sem sua ajuda, parte desse trabalho não poderia ser realizado.

Ao químico, Dr. Humberto Garcia, pelo auxílio com os testes de infravermelho.

À Profa. Dra. Flávia Cavalieri Machado por todo carinho e ajuda com alguns reagentes.

À farmacêutica da Farmácia Escola da UNIPAC, Pâmela Hilário, pela contribuição no desenvolvimento da formulação.

Ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) pela doação das linhagens fúngicas.

Ao laboratório NIQUA, a UFJF e demais Universidades parceiras nesse trabalho: UNESP/Araraquara, UFRJ, UFMG, UERJ e UNIPAC.

Ao meu amor, Lippy Faria Marques, um exemplo de profissional a ser seguido, por estar ao meu lado nos momentos difíceis e compartilhar minhas conquistas.

Finalmente, à Deus, pela bondade e oportunidade de vivenciar tudo isso.

“Determinação, coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso. Se estamos possuídos por uma inabalável determinação conseguiremos superá-los. Independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho.”

Dalai Lama

RESUMO

As dermatofitoses são doenças fúngicas que nos animais são causadas principalmente por microrganismos dos gêneros *Microsporum* spp e *Trichophyton* spp. Afetam os tecidos queratinizados resultando no aparecimento de lesões em anel e alopecia e podem ser transmissíveis ao homem. Na busca por tratamentos naturais alternativos aos fármacos sintéticos de toxicidade conhecida, os óleos essenciais destacam-se por possuírem uma composição química complexa e diversas ações farmacológicas conhecidas. O objetivo do presente trabalho foi desenvolver uma formulação veterinária de uso tópico com óleo essencial para tratamento da dermatofitose e avaliar a sua estabilidade. Foram realizadas a caracterização morfológica dos fungos *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 11480, *Microsporum canis* ATCC 32903 e *Microsporum gypseum* ATCC 14683; a identificação e quantificação dos componentes químicos dos óleos essenciais da *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L.R. Landrum e do *Eucalyptus smithii* e, posteriormente, a análise de seus potenciais antifúngicos. Uma formulação tópica (creme aniônico tipo O/A) com o óleo da *P. pseudocaryophyllus* foi desenvolvida e submetida a 50 °C e 90% de Umidade Relativa - UR por 3 meses para o estudo de estabilidade acelerada. Durante esse período, foram avaliados os parâmetros organolépticos e físico-químicos da formulação, além do estudo termoanalítico, espectroscópico na região do infravermelho e de cromatografia gasosa (CG). Os resultados para a *P. pseudocaryophyllus* foram mais promissores indicando uma concentração inibitória mínima (CIM) de 250 µg/mL para os três fungos e uma concentração fungicida mínima (CFM) de 250 µg/mL para o *M. canis* e de 1000 µg/mL para *T. mentagrophytes* e *M. gypseum*. A formulação contendo o óleo da *P. pseudocaryophyllus* na concentração de 1% (m/m) mostrou-se eficaz no combate fúngico e, por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV), foram observadas as principais alterações morfológicas nas hifas e macroconídeos dos fungos causadas pelos óleos e pela formulação. Durante o estudo de estabilidade a formulação manteve-se estável em relação aos parâmetros organolépticos e físico-químicos, apresentando apenas uma perda na concentração de eugenol (composto majoritário do óleo essencial) comprovada por CG. Por meio de técnicas termoanalíticas foi possível verificar a estabilidade térmica e avaliar a

compatibilidade entre os excipientes e o óleo essencial. De forma geral, os resultados encontrados para a formulação foram satisfatórios, porém vale ressaltar que os estudos termoanalíticos ainda não substituem os estudos convencionais de estabilidade e que para avaliar a real toxicidade dessa formulação, testes de segurança precisam ser realizados antes da comercialização do produto.

Palavras-chave: Dermatofitos. Óleo essencial. Atividade antifúngica. Estabilidade de medicamentos. Calorimetria Diferencial de Varredura. Termogravimetria.

ABSTRACT

Dermatophytosis are fungal diseases and they are caused in animals by microorganisms of the genus *Microsporum* spp and *Trichophyton* spp. Tissues containing keratin are affected resulting in ring lesions and alopecia and it can be transmitted to humans. Trying to find alternative natural treatments, the essential oils are notable for having a complex chemical composition and many known pharmacological actions. The objective of this study was to develop a veterinary formulation for topical use with essential oil to treat the dermatophytosis and evaluate its stability. A morphological characterization of the fungi *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 11480, *Microsporum canis* ATCC 32903 and *Microsporum gypseum* ATCC 14683 was performed and also the identification and quantification of chemical components of the essential oils of *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L.R. Landrum and the *Eucalyptus smithii* and, subsequently, the analysis of their potential antifungal. A topical formulation (anionic cream type O/A) with the oil of *P. pseudocaryophyllus* was developed and submitted to 50 °C and 90% relative humidity for 3 months to study of accelerated stability. During this period, physical, chemical and organoleptic parameters of the formulation were evaluated, in addition to thermoanalytical, infrared spectroscopic and gas chromatography (GC) study. The results for *P. pseudocaryophyllus* were more promising indicating a minimum inhibitory concentration (MIC) of 250 µg mL⁻¹ for all three fungi and minimum fungicidal concentration (MFC) of 250 µg mL⁻¹ for *M. canis* and 1000 µg mL⁻¹ for *T. mentagrophytes* and *M. gypseum*. The formulation containing the oil of *P. pseudocaryophyllus* with a concentration of 1% (w/w) was effective in combating fungal and, by scanning electron microscopy (SEM), the main morphological changes in hyphae and fungal macroconidia caused by oils and the formulation were observed. During stability study, the formulation was stable in relation to physical, chemical and organoleptic parameters, with only a loss in eugenol concentration (major compound of the essential oil) confirmed by GC. It was possible to verify, by thermoanalytical techniques, the thermal stability and to evaluate the compatibility of the excipients and the essential oil. In general, the results of formulation were satisfactory, but it's important to emphasize that the thermoanalytical studies does

not replace conventional stability studies. To evaluate the real toxicity of this formulation, safety tests need to be performed before to marketing the product.

Keywords: Dermatophytes. Essential oil. Antifungal activity. Drug Stability.
Calorimetry, Differential Scanning. Thermogravimetry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura da pele e epiderme.	35
Figura 2	Estrutura e ciclo do pelo.	35
Figura 3	Aspectos morfológicos de colônias de <i>Microsporium canis</i> .	40
Figura 4	Aspectos morfológicos de colônias de <i>Microsporium gypseum</i> .	40
Figura 5	Aspectos morfológicos de colônias de <i>Trichophyton mentagrophytes</i> .	41
Figura 6	Manifestações clínicas das dermatofitoses.	44
Figura 7	Estrutura química da terbinafina e cetoconazol.	47
Figura 8	Aspecto geral da <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> (Gomes) L.R. Landrum.	55
Figura 9	Desenho esquemático do ramo, ovário e semente de <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> (Gomes) L.R. Landrum.	55
Figura 10	Estrutura química do eugenol (4-hidroxi-3-metoxifenilprop-2-eno), metil-eugenol (3,4 – dimetoxifenilpro-2-eno) e chavibetol (3-hidroxi-4-metoxifenilprop-2-eno).	57
Figura 11	Estrutura química do 1,8-cineol.	59
Figura 12	Figura esquemática representando a técnica de microcultivo para fungos filamentosos.	73
Figura 13	Cromatograma do óleo essencial da <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> obtido por CG-AR.	90
Figura 14	Cromatograma do óleo essencial do <i>Eucalyptus smithii</i> obtido por CG-AR.	92
Figura 15	Comparação entre os espectros na região do infravermelho do	95

óleo do craveiro e Eugenol.

- Figura 16** Aspectos morfológicos do *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 11480. 97
- Figura 17** Aspectos morfológicos do *Microsporum canis* ATCC 32903. 97
- Figura 18** Aspectos morfológicos do *Microsporum gypseum* ATCC 14683. 98
- Figura 19** Eletromicrografias da espécie *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 11480. Células fúngicas não expostas aos tratamentos experimentais. 105
- Figura 20** Eletromicrografias da espécie *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 11480. Células fúngicas expostas ao óleo essencial da *Pimenta pseudocaryophyllus*. 106
- Figura 21** Eletromicrografias da espécie *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 11480. Células fúngicas expostas ao óleo essencial da *Pimenta pseudocaryophyllus* (250 µg/mL). 107
- Figura 22** Eletromicrografias da espécie *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 11480. Células fúngicas expostas ao óleo essencial da *Pimenta pseudocaryophyllus* (1000 µg/mL). 107
- Figura 23** Eletromicrografias da espécie *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 11480. Células fúngicas expostas ao eugenol (1000 µg/mL). 108
- Figura 24** Eletromicrografias da espécie *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 11480. Células fúngicas expostas aos fármacos cetoconazol 2 µg/mL. 109
- Figura 25** Eletromicrografias da espécie *M. canis* ATCC 32903. Células fúngicas não expostas aos tratamentos experimentais. 109

- Figura 26** Eletromicrografias da espécie *M. canis* ATTC 32903. Sequências 110 de ampliações. Células fúngicas não expostas aos tratamentos experimentais.
- Figura 27** Eletromicrografias da espécie *M. canis* ATTC 32903. Células 110 fúngicas expostas ao óleo essencial da *Pimenta pseudocaryophyllus* (250 µg/mL).
- Figura 28** Eletromicrografias da espécie *M. canis* ATTC 32903. Células 111 fúngicas expostas ao óleo essencial da *Pimenta pseudocaryophyllus* na concentração de 1000 µg/mL.
- Figura 29** Eletromicrografias da espécie *M. canis* ATTC 32903. Comparativo 111 entre Células fúngicas não expostas aos tratamentos experimentais (A1) e Células fúngicas expostas ao óleo essencial da *Pimenta pseudocaryophyllus* (1000 µg/mL) (A2).
- Figura 30** Eletromicrografias da espécie *M. canis* ATTC 32903. Células 112 fúngicas expostas ao eugenol (125 µg/mL).
- Figura 31** Eletromicrografias da espécie *M. canis* ATTC 32903. Células 113 fúngicas expostas ao eugenol (125 µg/mL).
- Figura 32** Eletromicrografias da espécie *M. canis* ATTC 32903. Células 114 fúngicas expostas ao eugenol (1000 µg/mL).
- Figura 33** Eletromicrografias da espécie *M. canis* ATTC 32903. Células 114 fúngicas expostas ao óleo essencial de *Eucalyptus smithii* (1000 µg/mL).
- Figura 34** Eletromicrografias da espécie *M. canis* ATTC 32903. Células 115 fúngicas expostas aos fármacos cetoconazol (A) e terbinafina (B).
- Figura 35** Eletromicrografias da espécie *M. gypseum* ATCC 14683. Células 115

fúngicas não expostas às substâncias testadas. Setas indicando hifas tubulares sem regiões compactadas.

- Figura 36** Eletromicrografias da espécie *M. gypseum* ATCC 14683. Células 116
fúngicas expostas ao óleo essencial da *Pimenta pseudocaryophyllus* na concentração de 250 µg/mL (A) e na concentração de 1000 µg/mL (B).
- Figura 37** Eletromicrografias da espécie *M. gypseum* ATCC 14683. Células 116
fúngicas expostas ao eugenol (1000 µg/mL) com zoom.
- Figura 38** Eletromicrografias da espécie *M. gypseum* ATCC 14683. Células 117
fúngicas expostas ao eugenol (1000 µg/mL).
- Figura 39** Eletromicrografias da espécie *M. gypseum* ATCC 14683. Células 117
fúngicas expostas ao óleo essencial de *Eucalyptus smithii* (1000 µg/mL).
- Figura 40** Eletromicrografias da espécie *M. gypseum* ATCC 14683. Células 118
fúngicas expostas aos fármacos cetoconazol e terbinafina.
- Figura 41** Comprovação da atividade antifúngica da formulação contendo 124
óleo do craveiro sobre o *T. mentagrophytes* ATCC 11480.
- Figura 42** Comprovação da atividade antifúngica da formulação contendo 125
óleo do craveiro sobre o *M. canis* ATCC 32903.
- Figura 43** Comprovação da atividade antifúngica da formulação contendo 126
óleo do craveiro sobre o *M. gypseum* ATCC 14683.
- Figura 44** Eletromicrografias da espécie *T. mentagrophytes* ATCC 11480 –. 128
(A) Células não expostas às substâncias pesquisadas. (B) Fungo exposto ao placebo. (C) Fungo exposto ao creme com 0,1% (v/m) do óleo essencial. (D) Fungo exposto ao creme com 1% (v/m) do

óleo essencial. (E) Fungo exposto diretamente ao óleo na concentração de 1% (v/v).

- Figura 45** Eletromicrografias da espécie *M. canis* ATCC 32903. (A) Células não expostas às substâncias pesquisadas. (B) Fungo exposto ao placebo. (C) Fungo exposto ao creme com 0,1% (v/m) do óleo essencial. (D) Fungo exposto ao creme com 1% (v/m) do óleo essencial. (E) Fungo exposto diretamente ao óleo na concentração de 1% (v/v). 129
- Figura 46** Eletromicrografias da espécie *M. gypseum* ATCC 14683. (A) Células não expostas às substâncias pesquisadas. (B) Fungo exposto ao placebo. (C) Fungo exposto ao creme com 0,1% (v/m) do óleo essencial. (D) Fungo exposto ao creme com 1% (v/m) do óleo essencial. (E) Fungo exposto diretamente ao óleo na concentração de 1% (v/v). 130
- Figura 47** Amostras submetidas ao teste de centrifugação. 133
- Figura 48** Avaliação organoléptica quanto ao parâmetro cor. 133
- Figura 49** Avaliação organoléptica quanto ao parâmetro cor para o óleo essencial do craveiro – representado pela letra C no frasco e eugenol, representado pela letra E no frasco. 134
- Figura 50** Cromatograma do eugenol padrão obtido por CG-AR 135
- Figura 51** Cromatograma do eugenol pós-estudo de estabilidade obtido por CG-AR. 135
- Figura 52** Cromatograma do óleo essencial da *Pimenta pseudocaryophyllus* (controle) obtido por CG-AR. 136
- Figura 53** Cromatograma do óleo essencial da *Pimenta pseudocaryophyllus* 136

obtido por CG-AR pós-estabilidade.

- Figura 54** Cromatograma do creme 1% (m/m) controle por CG-AR. 137
- Figura 55** Cromatograma do creme 1% (m/m) por CG-AR pós-estabilidade. 137
- Figura 56** Cromatograma do placebo (Controle) por CG-AR. 138
- Figura 57** Espectros de absorção na região do infravermelho do creme 1% (m/m) e placebo antes e depois do estudo da estabilidade. 140
- Figura 58** Comparação das curvas de DSC do creme 1% (m/m), eugenol, placebo e óleo do craveiro. 142
- Figura 59** Comparação das curvas de DSC do creme 1% (m/m), eugenol e placebo pós-estabilidade. 142
- Figura 60** Comparação das curvas de DSC dos excipientes utilizados na formulação antes e depois de serem submetidos ao estudo de estabilidade. 145
- Figura 61** Análise comparativa da curva DSC do placebo com cada excipiente empregada na formulação do mesmo. 146
- Figura 62** Análise comparativa das curvas DSC do creme 1% (m/m) e placebo antes e após o estudo de estabilidade. 148
- Figura 63** Curvas DSC normalizadas do placebo antes e após o estudo de estabilidade. 148
- Figura 64** Curvas termogravimétricas comparativas entre o óleo craveiro, placebo, creme 1% (m/m), Creme 1% (m/m) pós-estabilidade. 149

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1** Comparação morfológica entre os principais fungos causadores das dermatofitoses veterinárias. 39
- Quadro 2** Descrição das matérias-primas utilizadas na elaboração do creme aniônico. 83
- Quadro 3** Principais bandas de absorção e modos vibracionais do óleo essencial e do eugenol na região do infravermelho. 95
- Quadro 4** Base da formulação de creme aniônico incorporado com óleo essencial do craveiro a 1% (m/m). 121

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Espécies dermatófitas isoladas de cães e gatos e sua 31
classificação de acordo com o *habitat* natural e preferência
pelo hospedeiro.
- Tabela 2** Porcentagem dos constituintes químicos do óleo essencial do 91
craveiro obtida por CG-AR.
- Tabela 3** Porcentagem dos constituintes químicos do óleo essencial do 93
eucalipto obtida por CG-AR
- Tabela 4** Valores de CIM e CFM das substâncias testadas sobre os 100
microrganismos *Microsporium canis* ATCC 32903 e
Trichophyton mentagrophytes ATCC 11480.
- Tabela 5** Porcentagem de eugenol das amostras obtida por CG-AR. 138

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μg	micrograma
μL	microlitro
μm	micrômetro
β	razão de aquecimento
ν	estiramento
ABINPET	Associação Brasileira da Indústria de produtos para animais de estimação
alif	Alifático
ANFALPET	Associação Nacional dos Fabricantes de Produtos de Animais de Estimação
arom	Aromático
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosina tri-fosfato
ATR	<i>Average True Range</i>
BHT	<i>Butylated hydroxytoluene</i>
CFM	Concentração fungicida mínima
CG	Cromatografia gasosa
CG-AR	Cromatografia gasosa de Alta Resolução
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CIM	Concentração inibitória mínima
COMAC	Comissão de Animais de Companhia
CTC	Cetoconazol
DF	Distrito Federal

DMSO	Dimetilsulfóxido
DSC	<i>Differential Scanning Calorimetry</i>
DTM	<i>Dermatophyte Test Medium</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
F	Forte
f	Fraco
FID	<i>Fire Ionization Detector</i>
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
KOH	Hidróxido de potássio
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MFC	<i>Minimum Fungicidal Concentration</i>
MG	Minas Gerais
MIC	<i>Minimum Inhibitory Concentration</i>
mL	mililitro
MOPS	Ácido 3-[N-morfolino] propanosulfônico
NaOH	Hidróxido de sódio
nm	Nanometro
O/A	Óleo em Água
P.A	Porcentagem Analítica
PR	Paraná
pH	Potencial Hidrogeniônico

q.s.p.	Quantidade suficiente para
RDC	Resolução de Diretoria Colegiada
SDA	<i>Sabouraud Dextrose Ágar</i>
SEM	<i>Scanning Electron Microscopy</i>
SINDAN	Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para a Saúde Animal
sp	Espécie
spp	Espécies (plural)
TG	<i>Thermogravimetry Analyse</i>
TRB	Terbinafina
TSA	Teste de Susceptibilidade Antifúngica
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UNESP	Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
UNIPAC	Universidade Presidente Antônio Carlos
UR	Umidade relativa

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	28
2	REVISÃO DA LITERATURA	30
2.1	Dermatofitoses veterinárias e potencial zoonótico	30
2.2	Anatomia e fisiologia da pele e do pelo animal	33
2.3	Agentes etiológicos das dermatofitoses e sua classificação	36
2.3.1	Patogenia e manifestações clínicas	42
2.3.2	Diagnóstico da dermatofitose	44
2.4	Antifúngicos sintéticos	46
2.5	Fitoterapia	50
2.5.1	Família Myrtacea	53
2.6	Formulação veterinária	60
2.6.1	Mercado farmacêutico veterinário	61
2.7	Estudo de estabilidade de formulações farmacêuticas	62
2.8	Análise térmica aplicada à farmácia	64
3	OBJETIVOS	68
3.1	Geral	68
3.2	Específicos	68
4	MATERIAL E MÉTODOS	70
4.1	Óleos essenciais	70
4.2	Caracterização química dos óleos essenciais	70
4.2.1	Cromatografia Gasosa	70
4.2.2	Espectroscopia vibracional na região do infravermelho	71

4.3	Fungos	71
4.3.1	Caracterização dos fungos	72
4.4	Métodos para determinação da atividade antifúngica <i>in vitro</i> do óleo essencial do craveiro e do eugenol	73
4.4.1	Método do fragmento	74
4.4.2	Determinação quantitativa da atividade antifúngica	75
4.4.2.1	Preparo e padronização da suspensão fúngica	75
4.4.2.2	Preparo do meio de cultura	76
4.4.2.3	Preparo das amostras	77
4.4.2.4	Preparo das microplacas	79
4.4.2.5	Determinação da concentração fungicida mínima (CFM)	80
4.5	Microscopia Eletrônica de Varredura	80
4.6	Desenvolvimento e avaliação da formulação	82
4.6.1	Determinação do pH	83
4.6.2	Teste de centrifugação	83
4.6.3	Características organolépticas	83
4.6.4	Estudo de eficácia da formulação	84
4.6.4.1	Método do fragmento	84
4.6.4.2	Microscopia Eletrônica de Varredura	85
4.6.5	Estudo de estabilidade	86
4.6.5.1	Cromatografia Gasosa da formulação, do óleo essencial do craveiro e eugenol pós-estudo de estabilidade	86
4.6.5.2	Espectroscopia vibracional na região do infravermelho	87
4.6.6	Estudo por análise térmica	88
4.6.6.1	Estudo da formulação por calorimetria exploratória diferencial (<i>Differential scanning calorimeter</i> - DSC- sigla do inglês)	88

4.6.6.2	Estudo da formulação por análise termogravimétrica (<i>Thermogravimetry Analyse</i> – TG – sigla do inglês)	88
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	90
5.1	Óleos essenciais	90
5.2	Caracterização química dos óleos essenciais	90
5.2.1	Perfil cromatográfico do óleo do craveiro	90
5.2.2	Perfil cromatográfico do eucalipto	92
5.2.3	Espectroscopia vibracional na região do infravermelho do óleo do craveiro	94
5.3	Fungos	96
5.3.1	Caracterização dos fungos	96
5.4	Métodos para determinação da atividade antifúngica <i>in vitro</i> do óleo essencial do craveiro e do eugenol	98
5.4.1	Método do fragmento	98
5.4.2	Determinação da concentração mínima inibitória dos óleos essenciais	100
5.5	Microscopia Eletrônica de Varredura	104
5.6	Desenvolvimento e avaliação da formulação	120
5.6.1.	Determinação do pH	121
5.6.2	Teste de centrifugação	122
5.6.3	Características organolépticas	122
5.6.4	Estudo de eficácia da formulação	123
5.6.4.1	Método do fragmento	123
5.6.4.2	Microscopia Eletrônica de Varredura	127
5.6.5	Estudo de estabilidade	131
5.6.5.1	Perfil cromatográfico da formulação, do óleo essencial do	135

	craveiro e eugenol pós-estudo de estabilidade	
5.6.5.2	Espectroscopia vibracional na região do infravermelho	141
5.6.6	Estudo por análise térmica	140
5.6.6.1	Estudo da formulação por calorimetria exploratória diferencial (<i>Differential scanning calorimeter</i> - DSC- sigla do inglês)	140
5.6.6.2	Estudo da formulação por análise termogravimétrica (<i>Thermogravimetry Analyse</i> – TGA – sigla do inglês)	149
6	CONCLUSÕES	153
	REFERÊNCIAS	154
	ANEXO A	169

1 INTRODUÇÃO

A dermatofitose é uma das doenças de maior ocorrência na clínica médico veterinária e pela frequência com que são diagnosticadas, estima-se que milhões de dólares sejam gastos anualmente em tratamentos (MACHADO *et al.*, 2004; SOUZA *et al.*, 2009a). Essa dermatopatia é causada por fungos conhecidos como dermatófitos que, taxonomicamente, são classificados como *Microsporum*, *Epidermophyton* e *Trichophyton* (CARFACHIA *et al.*, 2013).

Dentre os dermatófitos, as espécies mais frequentemente associadas à contaminação de cães e gatos são o *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum* e *Trichophyton mentagrophytes*. Mais raramente, são identificadas algumas espécies transferidas dos humanos para os animais como o *Epidermophyton floccosum* e o *Trichophyton rubrum* (COELHO *et al.*, 2008; GALIZA *et al.*, 2014).

A compreensão dessa doença torna-se necessária, pois a preocupação com a saúde dos animais domésticos pode ser evidenciada pela ascensão da dermatologia veterinária e no crescente aumento do mercado de produtos de usos exclusivos, como *pet shops*, indústrias e farmácias de manipulação voltadas para este segmento. Dados da Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação (ABINPET) mostraram que, em 2014, o mercado *pet* obteve um faturamento de R\$ 20,3 bilhões, sendo 6,1% com produtos farmacêuticos e 17,1% de antimicrobianos. Quanto à população, o Brasil ocupa o quarto lugar no mundo em animais de estimação com 132 milhões (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA ANIMAIS DE ESTIMAÇÃO - ABINPET, s.d.).

Com o crescimento desse setor, o mercado torna-se cada vez mais competitivo e a inovação é um fator essencial para o crescimento e sustentabilidade

do negócio. Logo, na tentativa de inovar, as formulações fitoterápicas contendo óleos essenciais, destacam-se como excelentes alternativas ao tratamento convencional, pois o perfil químico complexo dos óleos essenciais que lhes conferem uma diversidade de usos farmacológicos pode garantir o sucesso dos tratamentos e satisfazer aos anseios da sociedade como consumidora (ALI *et al.*, 2015; BAKKALI *et al.*, 2008; MARTINS; CORTEZ; FELIPE, 2008; PIRES; GONÇALVES, 2011). Além do mais, os tratamentos convencionais para as dermatofitoses, como os azóis, alilaminas e a griseofulvina, apesar de possuírem eficácia comprovada já demonstraram efeitos adversos como hepatotoxicidade e baixa biodisponibilidade (FOY; TREPANIER, 2010).

Porém, para alcançar a expectativa farmacológica e mercadológica do óleo, é necessário o desenvolvimento de uma formulação estável que possa garantir a eficácia e segurança durante todo o período de tratamento. Para avaliar tal estabilidade, estudos sob condições climáticas controladas e estudos termoanalíticos são indicados.

Nesse contexto, os óleos essenciais de espécies da família Myrtacea, *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L.R. Landrum, encontrada na Mata Atlântica e no Cerrado (LANDRUM; KAWASAKI, 1997; PAULA *et al.*, 2010) e *Eucalyptus smithii* RT Baker, nativo da Austrália (PRYOR; JOHNSON, 1971), tornam-se um alvo a pesquisa, pois o estudo justifica-se por razões medicinais e sócio-econômicas.

Além do mais, até o momento, não existem pesquisas na literatura da atividade antifúngica da *P. pseudocaryophyllus* e do *E. smithii* sobre dermatófitos, portanto, o presente trabalho é uma alternativa inovadora ao tratamento de animais com dermatofitoses, doença que faz parte de uma área da medicina veterinária em ascensão.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Dermatofitoses veterinárias e potencial zoonótico

A dermatofitose é uma doença fúngica causada por microrganismos dos gêneros *Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidermophyton*. A infecção acomete os tecidos queratinizados, pele (estrato córneo), pelo e unhas. Quando a origem da infecção são fungos pertencentes a outros gêneros, denomina-se dermatomicose (CAMPANHA; TASCA; SVIDZINSKI, 2007; QUINN *et al.*, 2005; MATTEI, BEBER, MADRID, 2014).

Os dermatófitos podem ser classificados como zoofílicos, antropofílicos e geofílicos que compreendem, basicamente, os saprófitas. Tal classificação é baseada na origem desses fungos, sendo os zoofílicos isolados de animais; os antropofílicos, encontrados nos humanos e os geofílicos têm o solo como o *habitat* natural. Os fungos zoofílicos podem ser transmitidos dos animais ao homem, caracterizando uma antropozoonose. Mais raramente, são identificados fungos antropofílicos em animais. Os geofílicos, ocasionalmente, são encontrados nos seres humanos e animais (HIRSH; ZEE, 2003).

Nos animais de pequeno porte, como cães e gatos, há uma predominância das dermatofitoses causadas pelas espécies *Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Microsporum gypseum* (BOND, 2010). Em vários estudos em países europeus como Itália, Portugal e Espanha, assim como em cidades brasileiras das regiões nordeste e sul, foram relatadas a presença do *M. canis* como a causa mais comum de dermatofitose em cães e gatos (BIER *et al.*, 2013;

BRILHANTE *et al.*, 2003; CARFACHIA *et al.*, 2006; COELHO *et al.*, 2008; FERREIRO *et al.*, 2014; MENDOZA *et al.*, 2010; SOUZA *et al.*, 2009a).

Embora o *T. mentagrophytes* apareça em algumas pesquisas como a segunda espécie mais diagnosticada, no trabalho de Balda e colaboradores (2004) tal microrganismo não foi isolado, aparecendo o *M. gypseum* em segundo lugar com 11,9 % dos casos analisados e de forma não corriqueira foi isolado em um paciente a espécie *Trichophyton rubrum*, um fungo antropofílico. Portanto, não é possível estabelecer outro dermatófito como o segundo em diagnósticos.

Além das espécies predominantes, citadas anteriormente, vários dermatófitos já foram isolados de cães e gatos, como demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1: Espécies dermatófitas isoladas de cães e gatos e sua classificação de acordo com o *habitat* natural e preferência pelo hospedeiro.

Dermatófito	Hospedeiro*	Fonte†
<i>Epidermophyton floccosum</i>	B	A
<i>Microsporum audouinii</i> (<i>M. langeronii</i> , <i>M. rivalierii</i>)	B	A
<i>M. canis</i> (<i>M. equinum</i> , <i>M. felineum</i> , <i>M. lanosum</i> , <i>M. obseum</i>)	B	Z
<i>M. gypseum</i> (<i>M. fulvum</i> , <i>M. duboisii</i> , <i>Achorion gypseum</i>)	B	G
<i>M. nanum</i>	B	Z
<i>M. persicolor</i>	B	Z
<i>M. vanbreuseghemii</i>	B	G
<i>Trichopyton ajelloi</i> (<i>Keratinomyces ajelloi</i>)	B	G
<i>T. equinum</i>	B	Z
<i>T. erinacei</i> (<i>T. mentagrophytes</i> var. <i>erinacei</i>)	B	Z
<i>T. gallinae</i> (<i>M. gallinae</i> , <i>A. gallinae</i>)	B	Z
<i>T. mentagrophytes</i> (<i>T. asteróides</i> , <i>T. caninum</i> , <i>T. felineum</i> , <i>T. granulorum</i> , <i>T. gypseum</i> , <i>T. quinckeanum</i>)	B	Z
<i>T. rubrum</i> (<i>T. multicolor</i> , <i>T. purpureum</i>)	B	A
<i>T. schoenleinii</i> (<i>A. schoenleinii</i>)	B	A
<i>T. simii</i>	D	Z, G
<i>T. terrestre</i>	B	G
<i>T. tonsurans</i> (<i>T. accuminatum</i> , <i>T. cerebriforme</i> , <i>T. crateriforme</i> , <i>T. epilans</i> , <i>T. fumatum</i> , <i>T. plicate</i> , <i>T. sabouraudi</i> , <i>T. sulfureum</i>)	B	A
<i>T. verrucosum</i> (<i>T. album</i> , <i>T. discoides</i> , <i>T. faviforme</i> , <i>T. ochraceum</i>)	B	Z
<i>T. violaceum</i> (<i>T. glabrum</i> , <i>T. kagewaense</i> , <i>T. vinosum</i>)	B	A

*B= cão e gato, D= cão.

†A= antropofílico, G= geofílico, Z= zoofílico.

Fonte: Adaptado de SCOTT *et al.*, 2001a.

Nem sempre o isolamento de um microrganismo representa um quadro de infecção, pois muitos bolores e leveduras fazem parte da microbiota fúngica desses animais. Um exemplo é a levedura *Candida albicans*, que coloniza diversas partes do corpo e que pode tornar-se um agente oportunista principalmente em casos de imunodepressão (MACHADO *et al.*, 2004). No estudo de Galiza e colaboradores (2014) após analisar a ocorrência de micoses e pitioses em 230 casos de animais domésticos, constataram-se que a candidíase foi a mais diagnosticada, principalmente, por se tratar de uma doença secundária.

Estudos de prevalência e incidência das dermatofitoses apontam a raça canina *Yorki shire* e a raça felina *Persa* como predominantes em casos confirmados da doença. Nessas pesquisas, não foi estabelecida uma relação entre casos diagnosticados e o sexo dos animais infectados por dermatofitoses nas clínicas médico veterinárias (COELHO *et al.*, 2008; MACHADO *et al.*, 2004).

Aparentemente o clima também contribui para a prevalência das infecções. As regiões mais úmidas e quentes são apontadas como as mais favoráveis, embora não haja consenso entre todas as pesquisas (BALDA *et al.*, 2004; BRILHANTE *et al.*, 2003).

A infecção simultânea de um animal por duas espécies fúngicas ocorre de forma esporádica. Geralmente, tal fato é resultante de uma doença oportunista mais comum em pacientes com a imunidade comprometida ou inadequada. Uma observação frequente, porém ainda não comprovada, é que não apenas as doenças oportunistas, mas as dermatomicoses em geral acometem mais cães e gatos jovens, e uma possível explicação é pelo fato desses animais serem ainda imunodeficientes (BASSO *et al.*, 2008; MACHADO *et al.*, 2004).

Assim como as tendências de idade, raça e clima, conhecer as formas de transmissão são essenciais no combate às doenças fúngicas. A simples adoção de algumas medidas de prevenção e higiene por parte dos proprietários dos animais contaminados serve de auxílio ao controle das zoonoses (HIRSH; ZEE, 2003).

Os fungos podem ser transmitidos pelo contato com pelo, caspa, ambiente e acessórios comuns como escovas, tesouras e cortador de pelos empregados na tosa e banho. Nos homens, as áreas mais acometidas são aquelas que entram em contato direto com o animal, como braços, troncos e couro cabeludo. Para os fungos geofílicos, a transmissão é pelo solo contaminado (BOND, 2010; SCOTT *et al.*, 2001a).

Conhecer as formas de diagnóstico e controle é fundamental, pois estudos tem demonstrado que mais animais de companhia estão sendo incorporados nas famílias e, muitas vezes, esses animais são portadores assintomáticos dos fungos (FERREIRO *et al.*, 2014; MATTEI; BEBER; MADRID, 2014). Bier e colaboradores (2013) avaliaram o potencial de cães e gatos em disseminar fungos dermatófitos e 67% dos animais avaliados foram positivos para fungos dermatófitos, sendo 95% dos gatos e 49% dos cães. No estudo de Galiza e colaboradores (2014) de 26 casos de dermatofitose encontrados, 22 eram em animais de companhia.

2.2 Anatomia e fisiologia da pele e do pelo animal

Os dermatófitos são fungos que invadem e colonizam os tecidos queratinizados. Rompem o estrato córneo e penetram os folículos pilosos estabelecendo uma inflamação e comprometendo as funções dessas estruturas

como isolamento térmico, percepção sensorial e proteção física, química e microbiológica (HIRSH; ZEE, 2003; SIDRIM; ROCHA, 2004).

Para uma melhor compreensão das etapas de colonização e de infecção desse grupo de fungos, torna-se relevante o estudo das principais estruturas afetadas nesses processos, a pele e o pelo.

A pele pode ser dividida em três camadas, a epiderme, derme e hipoderme. A parte mais externa da pele é a epiderme, composta por múltiplas camadas de células que variam de forma colunar à achatada. Os queratinócitos correspondem a 85% das células, os melanócitos a 5% e as células de *Langerhans* e células de *Merkel* constituem os 10% restantes (SOUZA *et al.*, 2009b).

A epiderme é subdividida em camadas ou estratos. Da parte mais interna para a mais externa encontra-se: camada basal, camada espinhosa, camada granular, camada clara e a camada córnea, completamente queratinizada e que sofre descamação constantemente, processo controlado pela proliferação das células basais (SOUZA *et al.*, 2009b).

Dentre as proteínas encontradas na camada córnea, destaca-se a queratina, uma proteína fibrosa, que contém pontes dissulfeto entre os resíduos do aminoácido cisteína da cadeia polipeptídica o que lhe confere resistência às fibras. É o principal substrato para os dermatófitos (MARZZOCO; TORRES, 2005).

A pele e a pelagem normal dos animais podem sofrer muitas variações dependendo da raça, espécie, região do corpo, idade e sexo. A pele é mais espessa na fronte, no pescoço dorsal, no tórax dorsal, na região glútea e na base da cauda. Geralmente, na pele sadia dos gatos e cães, a superfície cutânea é ácida com o pH variando entre 5,5 e 7,5 (SCOTT *et al.*, 2001b).

Na Figura 1, pode-se observar a estrutura da pele e suas divisões e, em destaque, a epiderme e suas camadas.

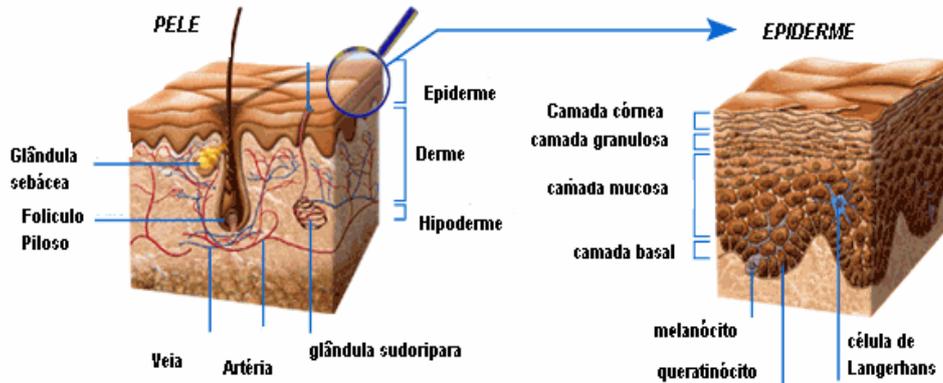


Figura 1: Estrutura da pele e epiderme.
Fonte: www.bioderma.fr/conceils/informations.asp

Os cães e gatos possuem pelos primários que são maiores e rodeados por pelos secundários, glândulas sebáceas e sudoríparas e um músculo eretor, como demonstrado na Figura 2.

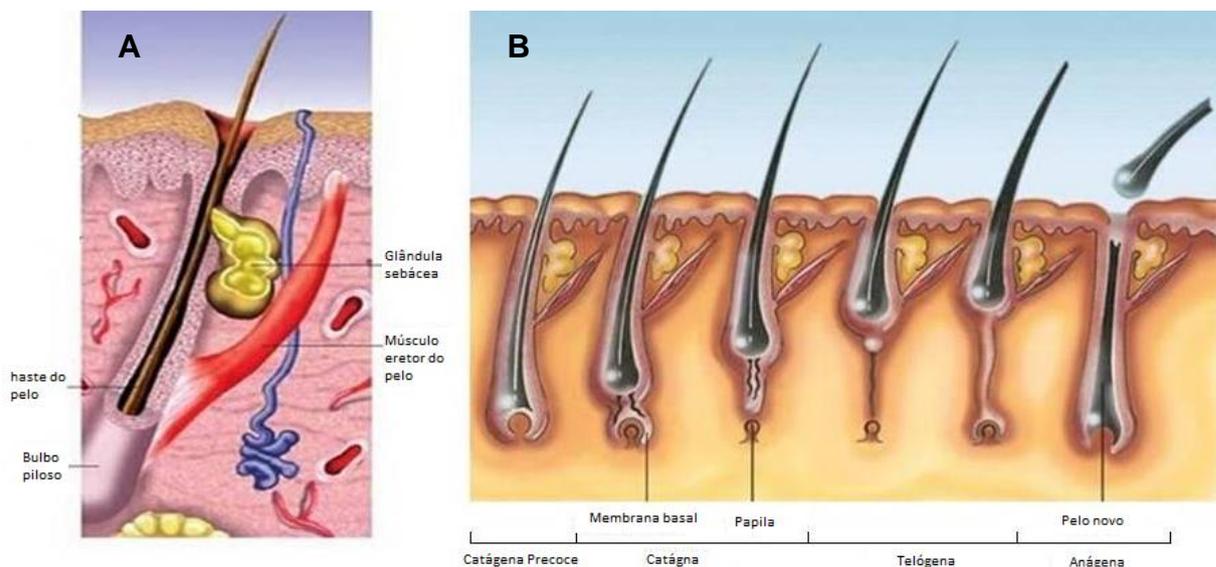


Figura 2: Estrutura e ciclo do pelo. (A) Estrutura do pelo: haste do pelo, bulbo piloso, glândula sebácea e músculo eretor do pelo. (B) Ciclo do pelo e as fases catágena, telógena e anágena.

Fonte: <http://pelepet.blogspot.com/2011/05/ciclo-do-pelo.html>

O pelo é a primeira barreira de defesa do animal, porém pode albergar muitos microrganismos. A haste do pelo pode ser dividida em três partes, a camada mais interna conhecida como medula, a camada mediana responsável pela cor do pelo denominada córtex e a camada mais externa chamada cutícula (SOUZA *et al.*, 2009b).

O crescimento do pelo não é contínuo, apresenta diferentes estágios que se fecham em um ciclo. O estágio anagênico é o período propriamente dito de crescimento, através de um processo mitótico nas células da papila dérmica, o pelo é produzido ativamente pelo folículo (SCOTT *et al.*, 2001b).

O estágio catagênico precoce é uma fase transicional com constrição no bulbo do pelo que será empurrado para fora no próximo estágio, o catagênico. O período de descanso é denominado telogênico, nesse momento o pelo é considerado “morto” e será perdido, formando-se um novo germe secundário o qual crescerá para baixo envolvendo a papila e formando um novo bulbo no estágio anagênico precoce. Dessa forma, reiniciando o ciclo com o período de alongamento do pelo (SCOTT *et al.*, 2001b).

2.3 Agentes etiológicos das dermatofitoses e sua classificação

Os fungos são os agentes etiológicos das dermatofitoses e são organismos eucariontes como os seus hospedeiros. Apresentam mitocôndrias, retículo endoplasmático, ribossomos e vacúolos. Suas membranas plasmáticas são constituídas de bicamadas de fosfolípidos, com esteróides, ergosterol e microtúbulos de tubulina. Diferentemente das plantas, são heterotróficos não

fotossintetizantes e sua parede celular é formada de quitina, conferindo-lhes elevada rigidez e resistência (QUINN *et al.*, 2005).

São microrganismos que liberam enzimas no meio e absorvem os nutrientes já digeridos. Também já foram isoladas a partir de dermatófitos as enzimas queratinase, elastase e lipase que atuam no metabolismo das macromoléculas (HIRSH; ZEE, 2003).

A proteína é a principal fonte utilizada para o desenvolvimento dos dermatófitos. Com esse substrato, a necessidade simultânea de carbono e nitrogênio é alcançada. Sabe-se que durante o metabolismo proteico o íon amônio é liberado alcalinizando o meio e favorecendo a desnaturação da queratina. Quando o substrato cessa, esse íon é recuperado e associado à glicose para constituir uma nova fonte de energia, restabelecendo o pH inicial (LEMSADDEK, 2008).

Até 1969 os fungos faziam parte do reino Vegetal, porém algumas evidências como a glicose armazenada na forma de glicogênio e não de amido mostraram que esses seres não apresentavam determinadas características básicas para pertencer a tal reino. Dessa forma, surgiu o reino *Fungi* (SIDRIM; ROCHA, 2004).

A primeira tentativa de normalizar os dermatófitos foi com Jacques Sabouraud que publicou em 1910 o livro intitulado *Les teignes*. A classificação era de acordo com o parasitismo, definindo quatro gêneros: *Achorion*, *Trichophyton*, *Epidermophyton* e *Microsporum*. Porém, em 1934 Chester W. Emmons reclassificou-os com base em características micromorfológicas em meios contendo grãos de cereais. Assim, os gêneros *Achorion* e *Trichophyton* foram englobados em um único gênero: *Trichophyton* (CARFACHIA *et al.*, 2013; WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995).

Os agentes etiológicos das dermatofitoses também são classificados de acordo com a forma de reprodução. Alguns se enquadram no estado anamórfico

(imperfeito ou assexual) da classe Hyphomycetes da divisão Deuteromycota. Outros dermatófitos, principalmente os zoofílicos e geofílicos, são capazes de reproduzir sexualmente e sintetizar ascosporos, sendo classificados no estado teleomórfico. Para esses fungos surgiu o gênero *Arthroderma*, pertencente à família Arthrodermataceae da ordem Onygenales da divisão Ascomycota (CARFACHIA *et al.*, 2013; LEMSADDEK, 2008; GRUMBT; MONOD; STAIB, 2011).

São conhecidas mais de 250 mil espécies de fungos e aproximadamente 150 são reconhecidas como patógenos. Nos ambientes onde são encontrados, esses microrganismos podem viver como saprófitas decompondo matéria orgânica morta; em simbiose com outro organismo; ou como parasitas, causando prejuízo a outro ser (QUINN *et al.*, 2005).

A maioria dos fungos é encontrada na forma filamentosa e apesar do avanço tecnológico na identificação das espécies, as características macroscópicas das colônias fúngicas e as estruturas microscópicas como as de frutificação e ornamentação, ainda são muito úteis no diagnóstico final (CHAVES, 2007; SAENZ, 2001; MATTEI; BEBER; MADRID, 2014).

Os principais aspectos das colônias e estruturas morfológicas das espécies mais frequentemente associadas às dermatofitoses em cães e gatos podem ser observados no Quadro 1.

Alguns aspectos macroscópicos e microscópicos mencionados na Quadro 1 podem ser observados nas Figuras 3, 4 e 5.

Quadro 1: Comparação morfológica entre os principais fungos causadores das dermatofitoses veterinárias.

Aspectos macroscópicos e microscópicos	<i>Microsporum canis</i>	<i>Microsporum gypseum</i>	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>
Tempo de maturação da colônia em ágar <i>Sabouraud</i>	6 – 10 dias	3 – 5 dias	6 – 11 dias
Aspecto superficial da colônia	Textura algodonosa, discreto relevo umbilicado e radiado, tonalidade branca	Plana com bordas irregulares e pulverulenta, areia de praia. Tendência ao pleomorfismo	Textura furfurácea ou pulverulenta, círculos concêntricos de branco-amarelado ao castanho-avermelhado
Tonalidade do reverso	Reverso amarelo-limão e tendência de difusão do pigmento tornando-se castanho	Reverso amarelo-acastanhado	Reverso castanho tendendo para o vinho
Estruturas de frutificação – macroconídios	Grande quantidade, fusiformes, paredes grossas com 5 a 7 septos	Grande quantidade, paredes finas com 3-7 septos. Extremidade mais arredondada	Poucos, semelhantes a charutos. 1 a 6 septos transversais
Estruturas de frutificação – microconídios	Poucos	Poucos	Muitos. Arredondados e agrupados com aspecto de cachos
Estruturas de ornamentação	Não mencionada	Não mencionada	Hifas em espiral

Fonte: SAENZ, 2001; SIDRIM; ROCHA, 2004.

Uma característica relevante na diferenciação entre as espécies do gênero *Microsporum* é a parede espessa do macroconídio do *M. canis*, em contraste as paredes finas encontradas no *M. gypseum* (MATTEI; BEBER; MADRID, 2014, SIDRIM; ROCHA, 2004) como pode ser observado nas figuras 3 e 4.

Na espécie *T. mentagrophytes*, destaca-se a hifa na forma de espiral enrolada, estrutura de ornamentação muito comum (MATTEI; BEBER; MADRID, 2014; SAENZ, 2001) esquematicamente demonstrada na figura 5.

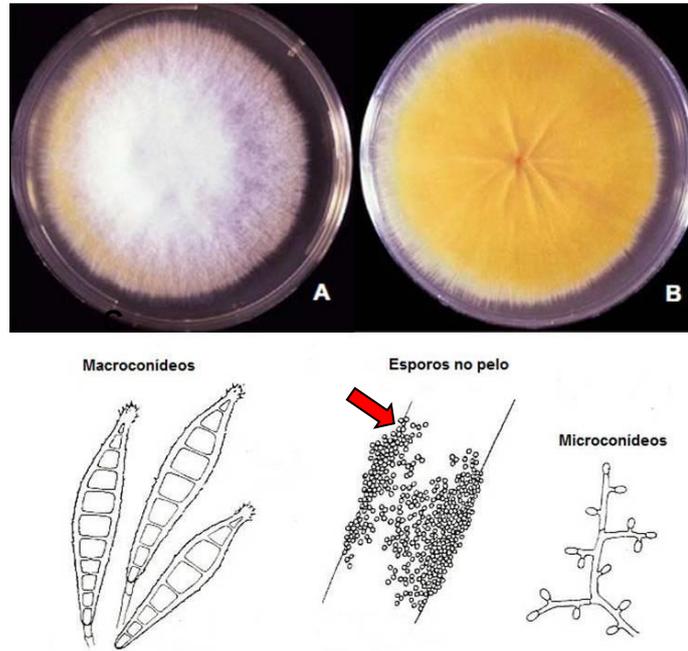


Figura 3: Aspectos morfológicos de colônias de *Microsporium canis*. (A) Anverso algodinoso branco. (B) Reverso amarelo. (C) Estruturas de frutificação e aspecto desorganizado dos esporos no pelo.
Fonte: SCOTT *et al.*, 2001c, THE UNIVERSITY OF ADELAIDE, 2011.

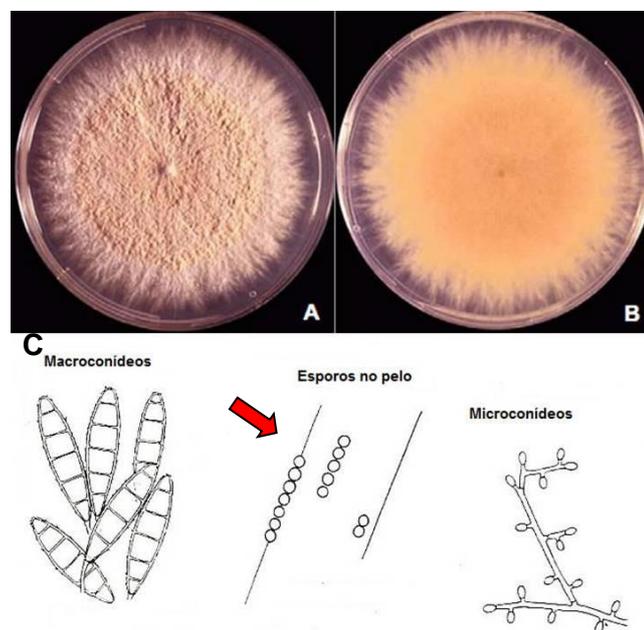


Figura 4: Aspectos morfológicos de colônias de *Microsporium gypseum*. (A) Anverso pulverulento. (B) Reverso amarelo. (C) Estruturas de frutificação e aspecto organizado em cadeia dos esporos esparsos no pelo.
Fonte: SCOTT, *et al.*, 2001c; THE UNIVERSITY OF ADELAIDE, 2011.

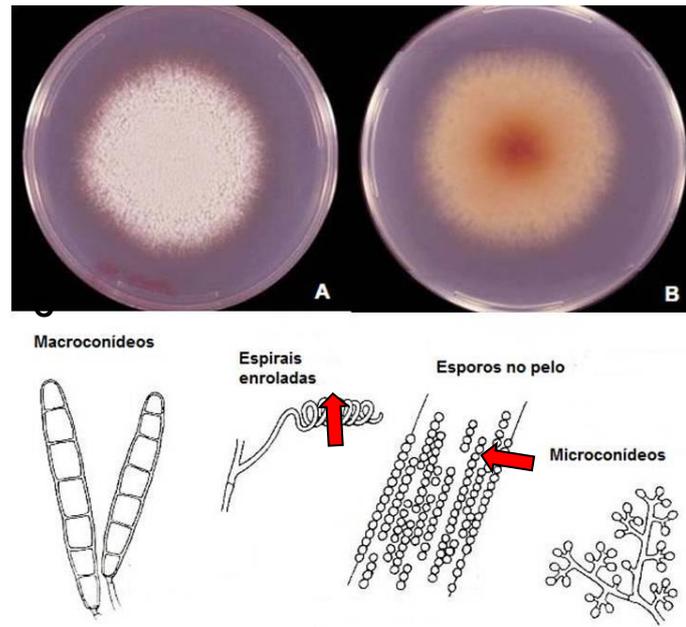


Figura 5: Aspectos morfológicos de colônias de *Trichophyton mentagrophytes*. (A) Anverso branco e pulverulento. (B) Reverso amarelo. (C) Estruturas de frutificação e aspecto organizado em cadeias dos esporos no pelo.

Fonte: SCOTT, *et al.*, 2001c; THE UNIVERSITY OF ADELAIDE, 2011.

A espécie *T. mentagrophytes* pode apresentar variações morfológicas. As principais são *T. mentagrophytes* var. *interdigitales* e *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes*, sendo a última conhecida como uma espécie particularmente zoofílica. Outra propriedade importante da espécie é produzir ativamente a enzima urease (CHAVES, 2007).

Embora sejam sutis, as diferenças micromorfológicas dos dermatófitos são essenciais na identificação dos microrganismos. A forma diferenciada como a colonização que aparece na haste do pelo também pode auxiliar no diagnóstico (CHAVES, 2007; MATTEI; BEBER; MADRID, 2014; SANTOS; COELHO; NAPPI, 2002).

2.3.1 Patogenia e manifestações clínicas

Baseando-se na investigação da variabilidade genética dos dermatófitos, pesquisadores procuram detectar genes que codificam as enzimas na tentativa de estabelecer uma relação com o grau de patogenicidade da espécie e natureza da doença (ABDEL-RAHMAN, 2008; BURMESTER *et al.*, 2011; GRUMBT, 2011).

Para colonizar o tecido e instalar uma infecção os microrganismos precisam “escapar” dos diversos mecanismos de defesa do hospedeiro.

A regeneração constante da pele pela frequente descamação e o meio ligeiramente ácido combinado a competição com a microbiota normal são apenas alguns fatores de resistência do hospedeiro, muitas vezes, superados pelas diversas substâncias produzidas pelos dermatófitos (LEMSADDEK, 2008).

Para contornar o pH ligeiramente baixo do hospedeiro, no início da colonização são liberadas enzimas proteolíticas cujo pH ótimo do meio é baixo (meio ácido). Aos poucos, tais enzimas são substituídas por proteases com atividade em pH próximo a neutralidade. Observa-se uma atividade mais moderada das lipases, talvez pelo fato dos ácidos graxos inibirem o crescimento desses microrganismos (LEMSADDEK, 2008; MARTINEZ-ROSS; PERES, 2008).

No combate a microbiota local, alguns fungos produzem antibióticos β -lactâmicos e fusidanos. A aderência à superfície do hospedeiro, etapa fundamental para colonização, é facilitada pelas glicoproteínas presentes na parede celular (FUKUDA *et al.*, 2009; MARTINEZ-ROSS; PERES, 2008).

Os dermatófitos não fazem parte da microbiota normal da pele, portanto quando ocorre o contato, ainda que seja superficial, há um estímulo da resposta imunológica humoral e celular do hospedeiro. Os antígenos mais importantes estão

na parede celular e são as glicoproteínas, a quitina e glicanos. Em resposta, ocorre um aumento da regeneração celular da epiderme com remoção do fungo da pele (BLANCO; GARCIA, 2008; FUKUDA *et al.*, 2009). A persistência da infecção pode estar relacionada a uma baixa imunidade, fato usado para esclarecer a maior incidência em animais jovens (BASSO *et al.*, 2008).

A infecção começa pela perfuração e penetração da camada córnea até atingir o folículo piloso. As hifas proliferam pela haste do pelo e com a enzima queratinase promovendo a ruptura da cutícula o crescimento continua dentro da haste. Denomina-se endothrix a invasão miceliana no interior do pelo e ectothrix quando o filamento miceliano está localizado fora do pelo. O *M. canis*, o *M. gypseum* e o *T. mentagrophytes* são espécies que produzem o parasitismo tipo ectothrix (HIRSH; ZEE, 2003; SAENZ, 2001).

Dependendo da fase do ciclo do pelo, o crescimento fúngico pode ser retardado e até interrompido. Tal fato poderá ocorrer se o pelo estiver na fase telogênica, pois por se tratar de um período de repouso, a produção de queratina, principal nutriente para os dermatófitos, é escassa. Porém, a reinfecção do folículo piloso pode acontecer quando esse entrar na fase anagênica (SCOTT *et al.*, 2001b).

Instalada a infecção, os sinais clínicos mais comuns são manchas circulares de alopecia com formação de caspas. Podem surgir lesões em anel com halo central sadio e pápulas foliculares finas com crostas na periferia (Figura 6) (BOND, 2010). O termo *tinha* ou *tinea* (verme em latim) é comumente utilizado para designar o aspecto circular rugoso das lesões com margens inflamadas (HIRSH; ZEE, 2003).

As regiões mais acometidas em cães e gatos são a cefálica e os troncos. Em alguns trabalhos a alopecia foi encontrada em 100 % dos casos, seguida das

crostas, eritema e edema (BALDA *et al.*, 2004; GALIZA *et al.*, 2014; WALLER *et al.*, 2014). Podem ocorrer infecções bacterianas secundárias (HIRSH; ZEE, 2003).

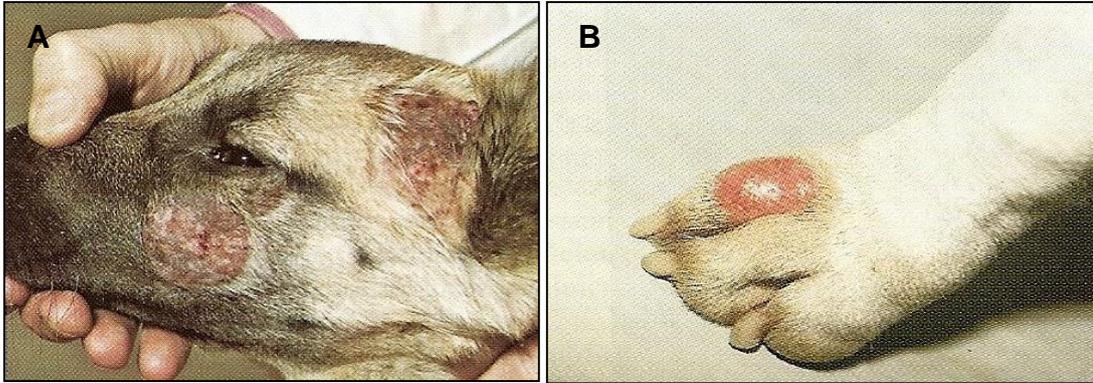


Figura 6: Manifestações clínicas das dermatofitoses. (A) Lesões inflamatórias anulares por *M. canis*. (B) Lesão causada por *M. gypseum*.
Fonte: SCOTT *et al.*, 2001a.

Como os sinais clínicos podem ser confundidos com outras infecções, estudos demonstram uma grande ocorrência de diagnóstico clínico falho. Em Souza e colaboradores (2009a), de 61 casos com suspeita de infecção fúngica, apenas 6 foram confirmados no diagnóstico laboratorial, havendo uma prevalência de dermatites alérgicas e bacterianas. A mesma incoerência nas observações clínicas e confirmação laboratorial foram relatadas por Coelho e colaboradores (2008) e Brilhante e colaboradores (2003). Esses dados corroboram para a importância da análise de material clínico nos pacientes com suspeita de dermatofitose.

2.3.2 Diagnóstico da dermatofitose

Os métodos convencionais de identificação ainda são considerados os mais relevantes como forma de diagnóstico. A cultura fúngica é considerada o “padrão ouro” para diagnóstico (MATTEI; BEBER; MADRID, 2014). As técnicas de análises moleculares, embora estejam em ascensão desde a década de 80, não se firmaram

como rotina. Porém, os avanços na tipagem molecular têm se mostrado muito úteis para uma melhor compreensão da taxonomia, ecologia e epidemiologia dos dermatófitos (BOUCHARA; MIGNON, 2008; CARFACHIA, *et al.*, 2013; CHAVES, 2007).

Há duas décadas, estudos demonstravam uma preocupação em reduzir o tempo de análise para a diferenciação dos microrganismos (SUMMERBELL *et al.*, 1988) e uma dificuldade ainda encontrada na identificação é a grande variação dos aspectos morfológicos macroscópicos da colônia dentro da mesma espécie.

Para uma correta caracterização, devem ser consideradas as observações macroscópicas e microscópicas. Em muitos casos, é necessário utilizar critérios fisiológicos e nutricionais como o cultivo em grão de arroz para o gênero *Microsporum spp* e o teste da urease e perfuração do pelo para a diferenciação de *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* (SAENZ, 2001).

O cultivo desses fungos pode ser em ágar *Sabouraud-dextrose* (SDA, sigla em inglês) e como meio alternativo o *Dermatophyte Test Medium* (DTM) que contém o vermelho de fenol, o qual promove a mudança da cor para vermelho em meio alcalino (SANTOS; COELHO; NAPPI, 2002).

O exame direto do material clínico em lâmina com hidróxido de potássio (KOH) 40%, também é recomendado (COELHO *et al.*, 2008). Embora, no relato de caso zoonótico realizado por Waller e colaboradores (2014), no exame direto dos pelos do cão com sinais clínicos de dermatofitose, não foi evidenciada a presença de estruturas fúngicas, sendo a confirmação dada pela cultura fúngica do material clínico.

A fluorescência observada na pelagem dos animais contaminados quando submetidos à lâmpada de *Wood* é outro parâmetro utilizado como forma de

diagnóstico da dermatofitose. Porém, apesar de fornecer um resultado rápido, esse aponta uma inespecificidade. Nem todos os casos positivos de fluorescência são confirmados na cultura (CHAVES, 2007). Nos estudos revisados por Bond (2010), apenas 50% das dermatofitoses diagnosticadas por *M. canis* pela lâmpada de Wood foram confirmadas. Um diagnóstico exato é decisivo na escolha da terapia mais eficiente e cura do animal (BASSO *et al.*, 2008).

2.4 Antifúngicos sintéticos

Por serem organismos eucariontes, os agentes antifúngicos podem acarretar diversos efeitos colaterais, pois hospedeiro e parasita apresentam células muito semelhantes. Os principais antifúngicos utilizados na terapêutica são: polienos (nistatina e anfotericina B), flucitosina, derivados morfolínicos, equinocandinas, derivados azólicos, alilaminas e griseofulvina, sendo os três últimos os mais importantes no tratamento das dermatofitoses (FOY; TREPANIER, 2010).

Os derivados azólicos são compostos sintéticos de estrutura química bem semelhante e de amplo espectro, cujo estudo da atividade antifúngica iniciou-se com o benzimidazol. Dentre os principais fármacos estão o cetoconazol, miconazol, fluconazol e itraconazol (SIDRIM; ROCHA, 2004). Os azóis atuam na enzima 14 α -demetilase inibindo a demetilação do lanosterol, precursor do ergosterol, resultando no aumento da permeabilidade da membrana celular (GHANNOUM; RICE, 1999).

O cetoconazol (Figura 7b), dependendo da sua concentração, pode ser considerado fungistático ou fungicida. Está disponível na forma de cremes, xampus e comprimidos. Quando administrado via oral, o paciente pode apresentar distúrbios gastrintestinais como náuseas, vômitos e diarreias. Por meio da via tópica, sua ação

é localizada e pode surgir irritação, eritema e prurido (ZHANG *et al.*, 2007). Seu uso é limitado pela hepatotoxicidade associada ao grande número de interações medicamentosas listadas (FOY; TREPANIER, 2010).

As alilaminas, terbinafina (Figura 7a) e naftina, apresentam algumas semelhanças aos azóis. São substâncias sintéticas e também agem na biossíntese do ergosterol com a vantagem de não interferir na biotransformação de outros fármacos, pois atuam na enzima esqualeno-epoxidase que não pertence ao complexo citocromo P-450. Além de alterarem a permeabilidade da membrana, o acúmulo intracelular de esqualeno, substrato da enzima inibida, também é responsável pela morte celular (FOY; TREPANIER, 2010; GHANNOUM; RICE, 1999).

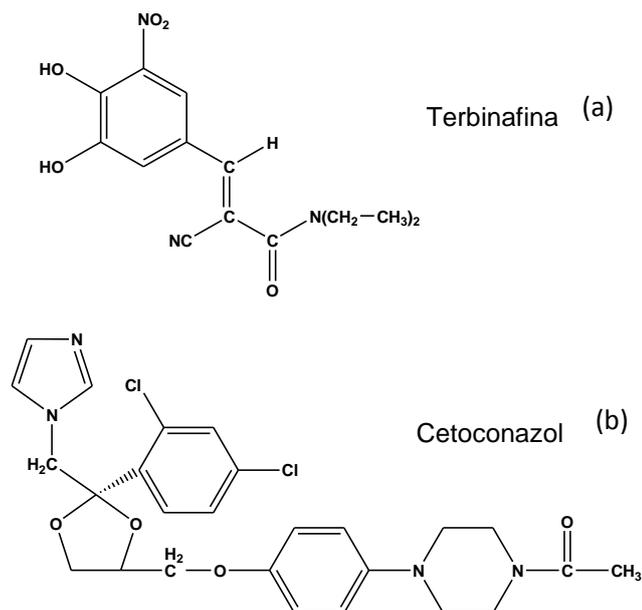


Figura 7: Estrutura química da terbinafina e cetoconazol.
Fonte: Autora, 2011.

Diferente das classes anteriores, a griseofulvina é um antibiótico, isolado do *Penicillium griseofulvum*. Sua ampla distribuição pelos tecidos queratinizados, tornou-a um dos principais fármacos de escolha no tratamento das dermatofitoses. Seu mecanismo de ação começa com a penetração da molécula na célula fúngica

seguida da interação com os microtúbulos do núcleo desfazendo o fuso mitótico (HECTOR, 2005).

A griseofulvina, que já foi um dos fármacos mais usados no tratamento sistêmico, é considerada menos potente que a terbinafina. No entanto, essa alilamina não tem se mostrado eficiente nas infecções ectothrix por *M. canis* (FOY; TREPANIER, 2010; ZHANG *et al.*, 2007).

O tratamento sistêmico convencional para os animais de pequeno porte baseia-se nos medicamentos de uso oral antifúngico, tais como: griseofulvina, itraconazol e terbinafina. A medida terapêutica consiste na combinação entre o tratamento sistêmico e tópico, o qual deve ser mantido durante pelo menos 10 semanas. Em alguns países, a griseofulvina não é mais licenciada para uso animal. Mas, quando indicada, a dosagem usual para cães e gatos varia entre 15-20 mg/Kg uma vez ao dia, e 25 mg/Kg duas vezes por dia (MATTEI; BEBER; MADRID, 2014).

Estudos em humanos demonstram que a eficácia de um antifúngico pode ser aumentada quando administrados em associação a outros fármacos. Esse efeito sinérgico é relatado por Shi e colaboradores (2011). Nesse estudo, uma formulação de cetoconazol creme teve sua potencialidade aumentada no tratamento de dermatofitoses humanas quando combinada ao alcalóide tetrandrina.

Alguns insucessos nos tratamentos estão sendo relacionados a possíveis mecanismos de resistência desenvolvidos por algumas linhagens aos antifúngicos sintéticos. O uso indevido desses medicamentos tem sido apontado como um dos fatores que podem desencadear tal processo (MARTINEZ-ROSSI; PERES, 2008). Muitos casos diagnosticados com base apenas em sinais clínicos podem ser tratados equivocadamente como dermatofitose, ou ainda, a terapia pode não ser conduzida adequadamente e interrompida de forma errônea (SOUZA *et al.*, 2009a).

Dentre os mecanismos bioquímicos de resistência são considerados os mais relevantes a diminuição da absorção do fármaco, a alteração estrutural no sítio de ação e o aumento no efluxo do fármaco (GHANNOUM; RICE, 1999; MARTINEZ-ROSSI; PERES, 2008).

Para contornar possíveis problemas com linhagens resistentes, além da orientação no uso correto dos antifúngicos existentes, a descoberta de novas substâncias é uma alternativa aos laboratórios farmacêuticos. Nesse contexto, torna-se relevante a padronização do teste de susceptibilidade antifúngica (TSA) para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) da molécula de interesse (BIANCALANA *et al.*, 2011; GALUPPI *et al.*, 2010).

As técnicas utilizadas para os antifúngicos são bem semelhantes às aquelas empregadas nos antibacterianos. Os métodos mais conhecidos são a macrodiluição, microdiluição e a difusão em ágar (OSTROSKY *et al.*, 2008).

Devido às variabilidades encontradas no TSA, vários estudos interlaboratoriais são feitos com o objetivo de avaliar a reprodutibilidade do método de microdiluição para fungos (ESPINEL-INGROFF *et al.*, 2005; FERNÁNDEZ-TORRES *et al.*, 2002; GHANNOUM *et al.*, 2004, 2006). A comparação entre as técnicas de microdiluição e difusão em ágar também aparecem descritas na literatura, como Galuppi e colaboradores (2010), que avaliaram a atividade *in vitro* de sete agentes antifúngicos frente aos principais microrganismos causadores de dermatofitose em cães e gatos.

O *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) é uma organização internacional sem fins lucrativos, educacional e de desenvolvimento de normas que no propósito de elaborar um documento que padronizasse o TSA, designou um subcomitê que, no uso das suas atribuições, desenvolveu o M38-A2, um “Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade

a Terapia Antifúngica dos Fungos Filamentosos”. O documento padroniza os ensaios para fungos filamentosos, porém não cita todos os dermatófitos (*CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2008*).

2.5 Fitoterapia

De acordo com a Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 26 de 13 de maio de 2014, são considerados medicamentos fitoterápicos ou produtos tradicionais fitoterápicos aqueles que são obtidos empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais. Portanto, não são considerados os produtos constituídos de associações de extratos vegetais com substâncias ativas de qualquer origem (BRASIL, 2014a).

Ainda de acordo com a RDC nº 26/2014, os medicamentos fitoterápicos têm sua comprovação baseada em evidências clínicas, enquanto os produtos tradicionais estão baseados em dados de uso seguro e efetivo publicados na literatura técnico-científica e, por isso, os últimos podem ser usados sem a indicação médica não podendo, portanto, ser utilizados em doenças ou outras situações consideradas graves (BRASIL, 2014a).

Todos os requisitos necessários para o registro de um medicamento fitoterápico e registro de notificação de produto tradicional fitoterápico estão descritos na Instrução Normativa nº 4, de 18 de junho de 2014 da ANVISA (BRASIL, 2014b).

A fitoterapia é um mercado em expansão. Em estudo realizado em 2008, antes da diferenciação entre medicamentos fitoterápicos e produto tradicional fitoterápico, 512 medicamentos possuíam registro fitoterápico no país, sendo

principalmente formas farmacêuticas sólidas e a espécie com maior número de registros foi o *Ginkgo biloba*, seguido pela castanha da Índia (CARVALHO *et al.*, 2008).

Muitas plantas são escolhidas para estudos através de observações no uso popular dessas em determinadas regiões do país (SRINIVASAN *et al.*, 2001). O resultado da triagem fitoquímica dos extratos também pode sugerir algumas aplicações industriais (PAULA *et al.*, 2008).

À partir das plantas, pode-se extrair os óleos essenciais que são substâncias voláteis de forte odor formados pelo metabolismo secundário das plantas. Por apresentarem um perfil químico complexo cuja mistura pode conter, aproximadamente, 20 a 60 componentes em concentrações diferentes, são largamente investigados quanto às suas propriedades farmacológicas (BAKKALI *et al.*, 2008; BOUZABATA *et al.*, 2015; RAUT; KARUPPAYIL, 2014; SANTOS *et al.*, 2010; SUBUDHI *et al.*, 2010).

Devido a essa complexidade, os óleos não possuem um alvo celular específico. Nas células eucariontes, assim como nas bactérias, os óleos parecem levar a perda de íons, afetar o potencial de membrana, reduzir o gradiente de pH e alterar a produção de adenosina tri-fosfato (ATP). Alguns danos na membrana plasmática das células fúngicas também podem ser observados quando essas são expostas aos óleos, tal ação tem sido atribuída à sua natureza lipofílica (BAKKALI *et al.*, 2008; HARRIS, 2002; ZYL *et al.*, 2010).

Os óleos essenciais apresentam atividades anti-inflamatória, inibidor de acetilcolinesterase, anticarcinogênicos, inseticida, antiviral, antioxidante, agente hipocolesterolêmico, antibacteriano, antiparasitário, antifúngico e potenciadores de penetração na pele de compostos lipofílicos (ACIOLE, 2009; BAKKALI *et al.*, 2008;

BOUZABATA *et al.*, 2015; CUSTÓDIO *et al.*, 2010; GARCIA *et al.*, 2004; PARREIRA *et al.*, 2010).

O método empregado na extração do óleo essencial, a parte da planta utilizada, as condições de plantio e colheita podem interferir na composição química da matéria-prima obtida e, conseqüentemente, nos efeitos esperados (ELAISSI *et al.*, 2012a; PAULA *et al.*, 2010).

Geralmente, os constituintes em maior concentração, conhecidos como marcadores químicos, são também os responsáveis pelas atividades atribuídas à planta (LEE *et al.*, 2007; PARK *et al.*, 2009). Mas, tal afirmativa diverge de alguns estudos que sugeriram que o composto majoritário não estava relacionado à atividade encontrada (CIMANGA *et al.*, 2002; ELAISSI *et al.*, 2012a).

Porém, o que torna os óleos essenciais substâncias mais interessantes são os efeitos sinérgicos entre esses marcadores, potencializando e diversificando a sua utilização (ZYL *et al.*, 2010). Mas, efeitos antagônicos também são observados, um exemplo é a associação entre eugenol e linalol (NAKATSU *et al.*, 2000).

Para a ação antifúngica, os óleos essenciais ricos em citral, citronela, cinamaldeído, timol, carvacrol e eugenol são apontados como os mais promissores (HARRIS, 2002). Nos experimentos conduzidos por Park e colaboradores (2009), os efeitos do citral, eugenol, nerolidol e α -terpineol foram investigados sobre a espécie *Trichophyton mentagrophytes* e os resultados foram satisfatórios mostrando que essas substâncias promovem um rompimento celular irreversível nas células do microrganismo.

Extratos de natureza distinta também são investigados quanto à atividade antifúngica. A planta *Wrightia tinctoria* R. Br. foi avaliada por Ponnusamy e colaboradores (2010) e mostrou-se eficaz no tratamento das dermatofitoses.

Isolados clínicos de *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Microsporum nanum* foram tratados com extratos de *Azadirachta indica* (neem), concluindo-se que a inibição do crescimento foi estatisticamente significativa (NATARAJAN; VENUGOPA; MENON, 2003).

Apesar das inúmeras descrições literárias, a fitoterapia e a aplicação dos óleos essenciais ainda têm muito a ser pesquisado. Somente o cerrado brasileiro possui mais de 11.627 espécies de plantas nativas catalogadas, representando 5% da biodiversidade de todo o planeta (BRASIL, s.d.b).

2.5.1 Família Myrtaceae

A família Myrtaceae é composta por, aproximadamente, 130 gêneros e 4000 espécies. Sua subfamília Myrtoideae, com predomínio na América do Sul e Central, é representada pelos gêneros *Eugenia* L., *Myrtus* L., *Pimenta* Lindl., *Pseudocaryophyllus* O. Berg., *Psidium* L. e *Syzygium* P. Browne ex Gaertn (FARIAS *et al.*, 2009). Em estudo realizado de remanescentes disjuntos de Cerrado nos Campos Gerais (PR), a família Myrtaceae aparece como a quarta em maior riqueza da região (RITTER; RIBEIRO; MORO, 2009).

A *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L.R. Landrum (Figura 8) é uma espécie do gênero *Pimenta* pertencente à família Myrtaceae (LANDRUM; KAWASAKI, 1997). Conhecida popularmente como “pau-cravo” ou “craveiro”, é nativa do Brasil e encontrada na Mata Atlântica e, esporadicamente, no cerrado brasileiro (PAULA *et al.*, 2010).

O gênero *Pimenta* possui 15 espécies distribuídas pela América. No Brasil, ocorre apenas a espécie *Pimenta pseudocaryophyllus* que pode ser classificada de

acordo com o indumento, formato, dimensões e ápice das folhas em três variedades a *var. pseudocaryophyllus*, *var. fulvescens* (DC.) Landrum e a *var. hoehnei* (Burret) Landrum (LANDRUM; KAWASAKI, 1997).

As Myrtaceae são identificadas pela ocorrência de cavidades secretoras esquizógenas e floema interno, não apresentam estômato característico. Estudos realizados sobre a organização estrutural e farmacognóstico das folhas da *Pimenta pseudocaryophyllus*, descreveram folhas hipoestomáticas e complexos estomáticos anomocíticos, com grande quantidade de tricomas unicelulares na superfície abaxial das folhas adultas e em ambas as superfícies nas folhas jovens, cavidades secretoras contendo compostos lipídicos e epiderme uniestratificada revestida por cutícula espessa (FARIAS *et al.*, 2009; PAULA *et al.*, 2008).

Um desenho das principais partes da *Pimenta pseudocaryophyllus* pode ser observado na Figura 9.

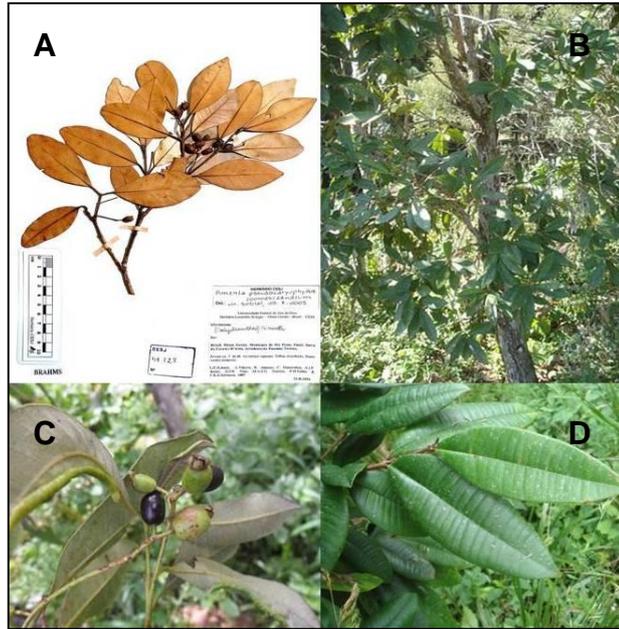


Figura 8: Aspecto geral da *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L.R. Landrum. (A) herbário da UFJF. (B) Aspecto do arbusto. (C) Fruto. (D) Aspecto da folha.
 Fontes: (A): <http://www.floraserranegra.com.br/plants/830>
 (B) e (C): <http://sites.google.com/site/florasbs/myrtaceae/craveiro>
 (D): http://www6.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=5797

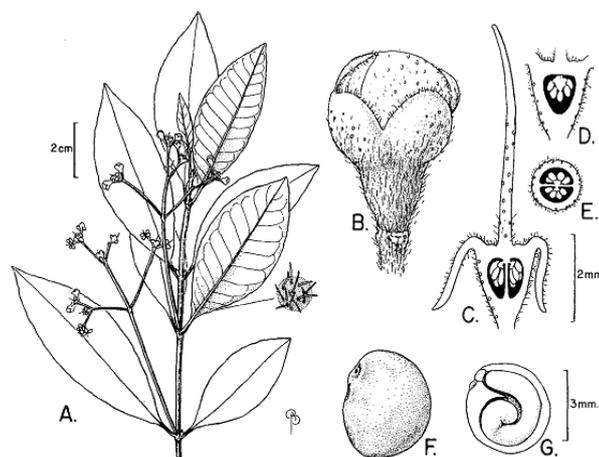


Figura 9: Desenho esquemático do ramo, ovário e semente da *Pimenta pseudocaryophyllus*.
 A. Ramo jovem com inflorescência do tipo panícula e um *close-up* de pelos na superfície inferior das folhas;
 B. Botão de flor;
 C. Ovário, seção longitudinal mostrando ambos os lóculos;
 D. Ovário, seção longitudinal mostrando um lóculo;
 E. Seção transversal do ovário;
 F. Semente;
 G. Semente, seção mostrando o tegumento duro, opérculo e embrião em espiral.
 Fonte: LANDRUM; KAWASAKI, 1997.

Na triagem fitoquímica, foram encontrados compostos fenólicos (contribuem para sabor, coloração e podem apresentar atividade antioxidante, antibacteriana e antiviral), além de taninos e flavonoides (FARIAS *et al.*, 2009; PAULA *et al.*, 2008).

Vários estudos farmacológicos têm sido realizados para o gênero *Pimenta*. Atividade antimicrobiana, inseticida, antioxidante e anti-inflamatória são apenas algumas das aplicações pesquisadas; popularmente, os chás da *Pimenta pseudocaryophyllus* são utilizados como calmantes, reguladores da digestão e menstruação (ACIOLE, 2009; CAMPANINI *et al.*, 2013; CUSTÓDIO *et al.*, 2010; GARCIA *et al.*, 2004; LIMA *et al.*, 2006, PAULA *et al.*, 2008; YOKOMIZO; NAKAOKA-SAKITA, 2014).

O primeiro relato sobre o potencial antifúngico do óleo essencial do craveiro foi realizado por Custódio e colaboradores (2010). O estudo foi conduzido com microrganismos do gênero *Candida sp.* e alguns fungos filamentosos, não havendo, até o momento, pesquisas da *P. pseudocaryophyllus* com espécies dermatófitas.

Algumas diferenças químicas na constituição dos óleos essenciais do craveiro estão descritas na literatura. Uma das justificativas apresentadas seriam as diferenças regionais entre as plantas analisadas. De acordo com as pesquisas, as mudanças sazonais refletiriam na composição química observada nas amostras. Porém, o metil-eugenol e o eugenol (Figura 10) aparecem como os principais marcadores químicos na maioria dos relatos (CUSTÓDIO *et al.*, 2010, LIMA *et al.*, 2006, PAULA *et al.*, 2010, 2011).

Embora os efeitos dos óleos sejam atribuídos ao conjunto de seus componentes químicos, determinadas atividades podem estar relacionadas à presença de constituintes específicos. No caso do eugenol, estudos isolados apontam para atividades antimicrobianas, antifúngicas e antioxidantes (ATSUMI;

FUJISAWA; TONOSAKI, 2005; CHEN *et al.*, 2008; FUJISAWA *et al.*, 2002; ITO; MURAKAMI; YOSHIMO, 2005).

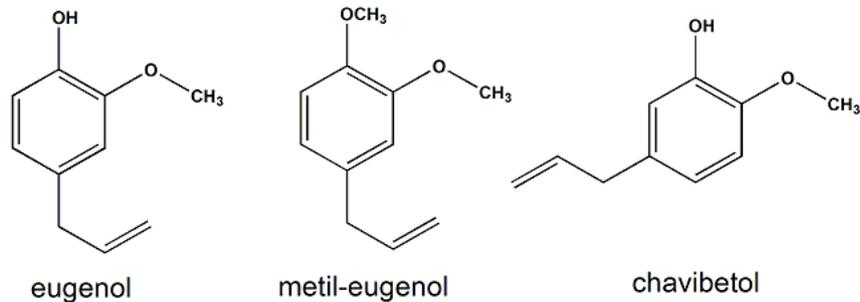


Figura 10: Estrutura química do eugenol (4-hidroxi-3-metoxifenilprop-2-eno), metil-eugenol (3,4-dimetoxifenilpro-2-eno) e chavibetol (3-hidroxi-4-metoxifenilprop-2-eno).
Fonte: Autora, 2015.

Nos experimentos conduzidos por Ahmad e colaboradores (2010) e Braga e colaboradores (2007) foram avaliados os efeitos do eugenol e timol. O primeiro estudo sugere que a atividade antifúngica encontrada nos óleos testados é resultado de alterações na cadeia respiratória do microrganismo por interferência no bombeamento de prótons. No segundo estudo, os autores observaram por meio da MEV alterações morfológicas no envelope da *Candida albicans*, um importante fator de virulência para esse microrganismo.

O resultado das pesquisas com os óleos essenciais contendo eugenol resultou em patente internacional. O registro refere-se à aplicação dessa substância sintética ou natural na prevenção e tratamento das doenças animais causadas por bactérias, fungos e parasitas (VOJIN, 2005).

O gênero *Eucalyptus* também pertence à família Myrtaceae. Mais de 300 espécies de *Eucalyptus* contêm óleos voláteis em suas folhas (LANDRUM; KAWASAKI, 1997). *Eucalyptus smithii* RT Baker é nativo da Austrália, pertence ao

subgênero *Symphyomyrtus*, seção *Maidenaria* e subséries *Viminalinae* (PRYOR; JOHNSON, 1971). É popularmente conhecido como "goma gully" ou "hortelã gully".

Os óleos essenciais de plantas de eucalipto possuem propriedades biológicas, tais como agentes antibacterianos, antifúngicos, antitumoral, e propriedades inseticidas e são amplamente utilizados em especiarias, formulações cosméticas, e na indústria farmacêutica em nível mundial (CHAGAS *et al.*, 2002; CIMANGA *et al.*, 2002; ELAISSI *et al.*, 2011; GILLES *et al.*, 2010; KUMAR *et al.*, 2012; MEDEIROS *et al.*, 2012; PINTO JUNIOR *et al.*, 2010).

Vários estudos têm demonstrado propriedades antimicrobianas de óleos essenciais de várias espécies de eucalipto contra uma gama de microrganismos. Os óleos essenciais de *E. camaldulensis*, *E. globulus*, *E. tereticornis*, *E. citriodora* e *E. odorata* têm demonstrado atividade forte, moderada ou fraca contra bactérias e dermatófitos (ASHOUR, 2008; ELAISSI *et al.*, 2012a; KIM; PARK, 2012; MUSYIMI; OGUR, 2008; VOSS-RECH *et al.*, 2011).

Estudos sobre a composição química dos óleos essenciais a partir de várias espécies de eucalipto têm encontrado 1,8-cineol como o composto predominante (Figura 11). No entanto, estes estudos demonstraram grandes variações na composição química dos óleos essenciais seja de espécies diferentes ou de mesma espécie, mas de regiões diferentes. Tal fato é justificável, pois o metabolismo da planta pode ser afetado por fatores não genéticos, tais como a idade da folha e variações sazonais (CIMANGA *et al.*, 2002; OGUNWANDE *et al.*, 2003; ELAISSI *et al.*, 2012a; ELAISSI *et al.*, 2012b; SIMMONS; PARSON, 1997).

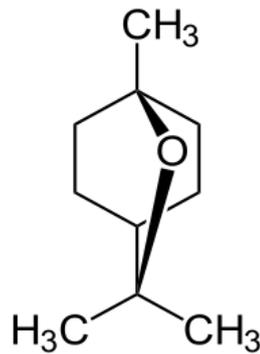


Figura 11: Estrutura química do 1,8-cineol.
Fonte: Autora, 2015.

2.6 Formulação veterinária

A comercialização dos medicamentos veterinários no Brasil deve ser feita mediante a obtenção de uma licença expedida pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). De acordo com o relatório de produtos com licença vigente atualizado em 15/04/2014, estão licenciados no país 6573 produtos. Não há uma norma específica para produtos fitoterápicos, se comprovada ação profilática ou terapêutica, esse deverá seguir as normas para registro de um produto alopático de uso veterinário (BRASIL, s.d. a).

Entre as normas brasileiras pertinentes ao registro de produtos de uso veterinário, destacam-se:

- Decreto-Lei nº 467, de 13.02.69 – Dispõe sobre a Fiscalização de Produtos de Uso Veterinário e dos Estabelecimentos que os Fabricam.
- Instrução Normativa (IN) MAPA nº 11, de 8.06.05 – Aprova o Regulamento Técnico para Registro e Fiscalização de Estabelecimentos que Manipulam Produtos de Uso Veterinário e o Regulamento de Boas Práticas de Manipulação de Produtos Veterinários (Farmácia de Manipulação).

- Instrução Normativa MAPA nº 13, de 03.10.03 – Aprova o Regulamento de Boas Práticas de Fabricação de Produtos de Uso Veterinário e o Glossário.
- Instrução Normativa DAS nº 37, de 8.07.99 – Produtos dispensados de Registro.

De acordo com a IN MAPA nº 11/2005 (Brasil, 2005b), o médico veterinário é o responsável pela prescrição e o profissional farmacêutico é o responsável por manipular e assegurar a qualidade do produto até o cliente. A fiscalização de todo o processo é feita por fiscais federais agropecuários e o não cumprimento das normas é passível de sanções que deverão ser aplicadas pelo MAPA.

As exigências para a manipulação de fórmulas farmacêuticas de uso veterinário são semelhantes às de uso humano, porém vale ressaltar que existem diferenças fisiológicas entre os organismos e as mesmas devem ser consideradas no desenvolvimento da formulação. Para o tratamento de doenças tópicas, seja de homens ou animais, uma opção são as emulsões.

Emulsão é a mistura de uma fase aquosa e uma fase oleosa. Denomina-se do tipo O/A (óleo/água) quando gotículas de óleo estão dispersas na fase aquosa e são chamadas de creme quando são semi-sólidas, sendo utilizadas para uso externo. Os cremes apresentam a vantagem de se espalharem facilmente e de desaparecerem durante a fricção. Situações onde a pele estiver inflamada, com perda de estrato córneo e com queratinização alterada, o creme será mais permeável à pele (AULTON, 2005).

No desenvolvimento de uma emulsão, todos os componentes, assim como, o processo de produção deve ser planejado para se evitar o “efeito *creaming*”, que consiste na separação das fases e instabilidade da formulação (AULTON, 2005). A ocorrência de separação de fases sem restabelecimento da uniformidade pode

acarretar em erros de administração com comprometimento da dose, além do mais, para o consumidor final do produto, tal alteração é indesejável o que pode resultar em prejuízo para a empresa fabricante.

2.6.1 Mercado farmacêutico veterinário

A análise de dados nacionais e internacionais baseados em faturamento e crescimento industrial no setor veterinário sugere um mercado com grande potencial para investimento. Na década de 90 houve um crescimento de 20% nos produtos para animais de estimação. Atualmente, de forma mais moderada e estabilizada, esse crescimento encontra-se na ordem de 10%. Porém, de acordo com a Comissão de Animais de Companhia (COMAC), cerca de 80% dos médicos veterinários brasileiros ainda receitam medicamentos de uso humano para seus pacientes. Portanto, o mercado *pet* no Brasil ainda tem muito a expandir (COMISSÃO DE ANIMAIS DE COMPANHIA, s.d.).

Na percepção das tendências comerciais do segmento, algumas indústrias desenvolveram estratégias para atender às necessidades do público alvo. Um exemplo é a indústria Virbac, considerada líder mundial em produtos veterinários para dermatologia e líder na Europa em vacinas de felinos. A empresa, que antes produzia para o mercado suíno, inovou os seus produtos direcionando-os aos animais de companhia, devido às pesquisas que apontaram insatisfação dos proprietários, em relação às dificuldades de administração dos medicamentos em seus animais. E o resultado foi que, em 2006, 62% do faturamento do grupo foi proveniente desse público com 8% destinados às novas pesquisas (OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2007).

O faturamento do mercado *pet* em 2014 foi de R\$ 20,3 bilhões sendo 6,1% com medicamentos veterinários, e desses, 14,8% são destinados aos cães e gatos. Entre as classes terapêuticas, os antimicrobianos respondem por 17%. No *ranking* mundial do mercado *pet*, o Brasil está em terceiro lugar com 5,4%, apenas atrás dos Estados Unidos da América com 41,7% e Japão com 22,6% (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA ANIMAIS DE ESTIMAÇÃO, 2015).

As perspectivas de crescimento do setor *pet* farmacêutico para o Brasil são otimistas (5-7%) (ANFALPET, 2011) e o número de medicamentos licenciados só tende a aumentar, pois o desenvolvimento de medicamentos de uso exclusivo veterinário é de suma importância para a saúde do animal, pois garantem eficiência e segurança, além de atender às necessidades específicas dos proprietários desses animais.

O otimismo com o crescimento do mercado é um reflexo da população de animais de estimação em que o Brasil ocupa o quarto lugar no mundo, porém na população de cães e gatos, 52,2 e 22,1 milhões respectivamente, o Brasil ocupa o 2º lugar mundial (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA ANIMAIS DE ESTIMAÇÃO, 2015).

2.7 Estudo de estabilidade de formulações farmacêuticas

A responsabilidade de qualquer indústria farmacêutica de medicamentos, para fins de uso humano ou animal, é garantir que o produto chegue com qualidade ao consumidor final. Para que o mesmo mantenha a sua eficácia e segurança

constantes durante todo o período de transporte, armazenamento e administração é necessário que a formulação seja submetida ao teste de estabilidade.

O estudo de estabilidade é um conjunto de testes que são realizados com o objetivo de se definir o prazo de validade do produto em que o mesmo poderá ser consumido qualquer dano ao usuário (BRASIL, 2005b).

Tal estabilidade pode ser determinada através de estudos cujas condições climáticas são controladas. É comum que o medicamento ou insumo farmacêutico seja submetido a situações de estresse, pois tais condições podem aumentar a deterioração do produto, reduzindo o tempo necessário de observação (AULTON, 2005).

Diversos fatores afetam a estabilidade dos produtos farmacêuticos. Dentre os fatores extrínsecos estão a temperatura, umidade, tempo, luz e oxigênio, o material utilizado no acondicionamento, contaminações microbiológicas e vibração, que no caso das emulsões, poderia acarretar em separação de fases. Além desses, ainda existem os fatores intrínsecos que estão relacionados às propriedades físico-químicas da formulação, esses podem abranger desde a natureza química do ativo e excipientes até o processo de produção (BRASIL, 2005a; GIL, 2010).

De acordo com o Anexo 1 da Resolução RE Nº 1, de 29 de julho de 2005, publicada pela ANVISA, existem três tipos de estudos de estabilidade: estudo de estabilidade acelerado, estudo de estabilidade de acompanhamento e estudo de estabilidade de longa duração (BRASIL, 2005a).

No estudo de estabilidade acelerado, as condições de temperatura e umidade empregadas durante o teste têm como objetivo acelerar a degradação química e/ou mudanças físicas no produto, por exemplo, um aumento na temperatura de 10 °C

resulta em um aumento de duas a cinco vezes no processo de degradação (AULTON, 2005; BRASIL, 2005a).

Por se tratarem de sistemas complexos, os medicamentos sofrem reações simultâneas, consecutivas ou em cadeia. A degradação acontece por quatro processos principais: hidrólise, oxidação, fotólise e catálise com traços de metais. A causa mais provável de instabilidade é a hidrólise que pode ser acelerada pela alta umidade, já a oxidação pode ser controlada pelo ambiente e pelo uso de antioxidantes (AULTON, 2005; GIL, 2010). Dependendo do impacto sofrido pela formulação, resultados obtidos no estudo de estabilidade acelerada podem ser utilizados para se prever o prazo de validade do medicamento, enquanto o estudo de longa duração está em andamento (BRASIL, 2005b).

Para os medicamentos de uso veterinário, os quais são regulados pelo MAPA, os estudos de estabilidade devem ser seguidos em consonância com a Instrução Normativa nº 15 de 09 de maio de 2005, a qual aprova o regulamento técnico para testes de estabilidade de produtos farmacêuticos de uso veterinário. De acordo com a IN nº15/2005, o teste pode ser feito em câmara climatizada com temperatura de $50\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $90\% \pm 5\%$ por 3 meses (BRASIL, 2005b).

2.8 Análise térmica aplicada à farmácia

Análise térmica é o nome dado a um conjunto de técnicas que tem como objetivo avaliar determinadas propriedades físicas e químicas de uma substância em função do tempo ou da temperatura, sob uma atmosfera controlada, sendo a

termogravimetria (TG) e a calorimetria exploratória diferencial (DSC) as mais utilizadas (MATOS; MERCURI; BARROS, 2009).

As aplicações são distintas, uma vez que, as alterações e propriedades físicas que podem ser observadas nas amostras também são variadas tais como: pontos de ebulição e fusão, mudança de fase cristalina, estudo de polimorfismo, transição vítrea, reações de decomposição e oxidação, entre outros.

Diante de tantas aplicações, os métodos de análise térmica são utilizados na área de farmácia desde a década de 70 (BAUERECKER; SARGE; CAMMENGA, 1989; DAVIS; PORTER, 1969). Dentre as aplicações mais utilizadas pela indústria farmacêutica, estão os estudos de estabilidade térmica, compatibilidade entre excipientes e ativo, caracterização de polimorfos, pureza de fármacos (BARNES; HARDY; LEVER, 1993; GIRON, 2002; LIMA *et al.*, 2015; MENDONÇA *et al.*, 2014).

Diferentemente das técnicas espectroscópicas, em que substâncias distintas são mais facilmente distinguidas pelos espectros, eventos térmicos que ocorrem em mesma faixa de temperatura, não serão identificados, sendo necessário, associar técnicas termoanalíticas que avaliam propriedades diferentes, como TG e DSC. Outras vezes, torna-se necessário associar às análises termoanalíticas outras técnicas para conclusões mais precisas, como a difração de raios X, espectroscopia vibracional na região do infravermelho, cromatografia, entre outras.

No estudo conduzido por Vieira e colaboradores (2014), as técnicas termoanalíticas foram associadas com difração de raios X, MEV, ressonância magnética nuclear, espectroscopia na região do infravermelho e espectrometria de massa para caracterização físico-química de um novo anti-inflamatório e avaliação da compatibilidade desse com excipientes farmacêuticos.

Apesar da eficiência, as técnicas termoanalíticas podem ser influenciadas por fatores instrumentais e relativos à amostra (CAVALHEIRO, 1995; MATOS; MERCURI; BARROS, 2009). Dentre os fatores instrumentais estão a razão de aquecimento (β), a atmosfera do forno, a forma, o tamanho e a composição do cadinho (CAVALHEIRO, 1995). Giordano e colaboradores (2003) comprovaram a relevância da atmosfera ao analisarem a degradação térmica do diclofenaco de sódio. Nesse estudo, foram empregadas uma atmosfera inerte de nitrogênio e uma atmosfera oxidante de oxigênio. Os resultados mostraram discrepância e o fato foi atribuído às reações de degradação nas amostras submetidas à atmosfera oxidante.

Quanto às características da amostra, a massa empregada no teste pode influenciar nos resultados. Por exemplo, nas reações exotérmicas, quanto maior a massa empregada no teste, maior o calor desprendido, resultando em um aumento da taxa de aquecimento do forno. Nas reações endotérmicas, o efeito esperado é inverso (MATOS; MERCURI; BARROS, 2009). Além disso, o tamanho da partícula também pode interferir, pois a velocidade de decomposição aumenta com o aumento da superfície de contato (MATOS; MERCURI; BARROS, 2009).

Diversos autores têm empregado a TG e a DSC na área farmacêutica (BAUERECKER; SARGE; CAMMENGA, 1989; COLLETT; BROWN, 1998; DAVIS; PORTER, 1969; GIORDANO *et al.*, 2003; KÓNYA *et al.*, 2003; LASZCZ *et al.*, 2007; MOREIRA *et al.*, 2010; SALAMA, MOHAMMAD, FATTAH, 2015; YOSHIDA *et al.*, 2011). Silva, Paola e Matos (2007) relataram diversos trabalhos da literatura em que as técnicas termoanalíticas foram utilizadas na caracterização de matérias-primas e cosméticos. Oliveira, Yoshida e Gomes (2011) em seu trabalho de revisão, também descreveram diversos trabalhos em que a análise térmica foi empregada no estudo de fármacos e formulações na indústria farmacêutica.

A TG pode ser utilizada para se analisar a variação da massa da amostra em função do tempo, determinando a temperatura em que os materiais começam a se decompor. Wiss e Schmunck (2011), mostraram que a termogravimetria pode ser empregada para a determinação de impurezas residuais durante estudo de validação de limpeza de equipamentos da indústria farmacêutica, condição requisitada pelas autoridades e que evita a contaminação cruzada entre os produtos manipulados.

A DSC é uma técnica que se mede a diferença de energia fornecida à amostra e um material de referência, enquanto são submetidos a uma programação controlada de temperatura (MATOS; MERCURI; BARROS, 2009). A determinação quantitativa da pureza por DSC baseia-se no fato de que a presença de impurezas diminui o ponto de fusão e alarga a faixa de temperatura de fusão. Logo, com base no ponto de fusão e na equação de Van't Hoff é possível determinar a fração molar das impurezas (DAVIS; PORTER, 1969; MOREIRA *et al.*, 2010). Laszcz e colaboradores (2011), ao estudar a estabilidade do fármaco capecitabina, demonstraram que a DSC é uma técnica confiável na determinação da pureza da matéria-prima ao comparar os resultados termoanalíticos com o método de cromatografia líquida de alta eficiência.

No desenvolvimento de novas formulações, o emprego da análise térmica tem se mostrado de grande relevância, pois as interações resultantes da incompatibilidade entre fármaco e excipientes podem afetar a natureza química, a estabilidade, a biodisponibilidade dos fármacos e comprometer a eficácia e segurança do medicamento (LIMA *et al.*, 2015; MENDONÇA *et al.*, 2014).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Desenvolver uma formulação para uso veterinário contendo óleo essencial para tratamento de dermatofitose e avaliar sua estabilidade.

3.2 ESPECÍFICOS

- Identificar e quantificar os componentes químicos dos óleos essenciais da *Pimenta pseudocaryophyllus* e *Eucalyptus smithii* por cromatografia gasosa (CG);
- Determinar a atividade antifúngica *in vitro* dos óleos essenciais da *P. pseudocaryophyllus* e *E. smithii* frente aos fungos dermatófitos: *Microsporum canis* ATCC 32903, *Microsporum gypseum* ATCC 14683 e *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 11480;
- Estabelecer a CIM e a CFM dos óleos essenciais da *P. pseudocaryophyllus* e *E. smithii* frente aos fungos que apresentarem atividade antifúngica *in vitro*;
- Analisar possíveis alterações morfológicas produzidas nos fungos de interesse pelos óleos essenciais da *P. pseudocaryophyllus* e *E. smithii* por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV).
- Propor uma formulação em que o único ativo antifúngico seja o óleo essencial que apresentar os melhores resultados antimicrobianos *in vitro* para o combate aos dermatófitos.

- Avaliar a atividade antifúngica e as alterações nas estruturas morfológicas causadas pela formulação frente aos dermatófitos de interesse utilizando a microscopia eletrônica de varredura.
- Realizar o estudo de estabilidade acelerado da formulação teste.
- Avaliar o comportamento térmico do óleo essencial escolhido para a formulação, isoladamente e quando incorporado em uma emulsão, por meio da espectroscopia vibracional na região do infravermelho e pelas técnicas de análise térmica: DSC e Termogravimetria.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Óleos essenciais

No estudo foram empregados o óleo essencial da *Pimenta pseudocaryophyllus* (óleo craveiro) (Lote: CRAVOCaO2) e o óleo essencial do *Eucalyptus smithii* (óleo do eucalipto) (Lote: EUCCSM105) obtido comercialmente da empresa Laszlo® Aromatologia Ltda, e o eugenol, considerado marcador químico do craveiro. O eugenol (Lote: MKBC6619) com 99,0% de pureza foi adquirido da empresa Aldrich Chemistry®.

4.2 Caracterização química

4.2.1 Cromatografia Gasosa dos óleos essenciais

A determinação da composição química do óleo essencial da *Pimenta pseudocaryophyllus* e do *Eucalyptus smithii* foi realizada por Cromatografia Gasosa de Alta Resolução (CG-AR) em cromatógrafo a gás do tipo HP-5890 equipado com detector de ionização de chama (*Flame Ionization Detector* - FID) e módulo de injeção com razão de divisão (*split*) de 1:50. O volume de injeção foi de 1 µL de amostra [concentração de 0,5% (v/v) em clorofórmio]. O hidrogênio foi utilizado como gás de arraste a uma vazão de 2 mL/min. A programação da temperatura do forno foi de uma isoterma inicial de um minuto a 60°C seguida da taxa de 3 °C/min até 220°C. A temperatura utilizada no injetor e no detector foi de 220°C. A coluna

utilizada foi HP-BP1 (30 m de comprimento por 0,25 mm de diâmetro interno). A análise química foi executada no Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

4.2.2 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

Complementando a caracterização química do óleo essencial do craveiro foi realizado um estudo de espectroscopia vibracional na região do infravermelho. Utilizou-se o eugenol como um padrão para a análise, uma vez que, o mesmo é componente majoritário do óleo essencial em estudo.

Os espectros vibracionais na região do infravermelho foram obtidos usando um espectrômetro Bruker alfa (FT-IR), com a amostra analisada por ATR, na região de 4000 - 600 cm^{-1} , com 4 cm^{-1} de resolução espectral. As boas relações sinal-ruído foram obtidas a partir de acumulação 128 varreduras espectrais. A análise foi realizada no Departamento de Química da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF).

4.3 Fungos

Foram empregados nos testes os fungos *Microsporum canis* ATCC 32903, *Microsporum gypseum* ATCC 14683 e *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 11480, os principais fungos causadores de dermatofitoses em cães e gatos.

As três linhagens foram obtidas da coleção de culturas do Laboratório de Microrganismos de Referência do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em

Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), localizada no Rio de Janeiro – Brasil (ANEXO A).

Os fungos foram conservados em diferentes recipientes, devidamente identificados, contendo água estéril e sob congelamento (-20°C).

4.3.1 Caracterização dos fungos

Foi realizada a caracterização morfológica dos dermatófitos de interesse. Uma amostra de cada fungo refrigerado foi enriquecida em caldo *Sabouraud-dextrose* e incubada à temperatura de 25 °C por 7 dias. Posteriormente, procedeu-se ao repique (triplicata) em tubos de ensaio contendo meio inclinado ágar *Sabouraud-dextrose* (SDA) acrescido de cloranfenicol 0,5% (m/v). Os tubos foram incubados nas mesmas condições descritas para o enriquecimento.

Decorrido o prazo de crescimento dos fungos foi realizada a inoculação dos mesmos em placa de Petri contendo meio SDA adicionado de cloranfenicol 0,5% (m/v), para a observação dos aspectos morfológicos macroscópicos. Para a caracterização microscópica foi realizado o microcultivo em lâminas, que possibilita a visualização de estruturas reprodutivas de fungos filamentosos.

No microcultivo foram utilizadas três lâminas, duas dessas foram empregadas como suporte para a terceira lâmina na qual foi colocado um pequeno bloco de ágar batata inoculado nas quatro extremidades com o fungo de interesse e coberto por uma lamínula. O conjunto foi montado em uma placa de Petri contendo um pequeno chumaço de algodão embebido com água estéril para manter o ambiente com umidade adequada ao crescimento fúngico. O sistema encontra-se esquematizado na Figura 12.

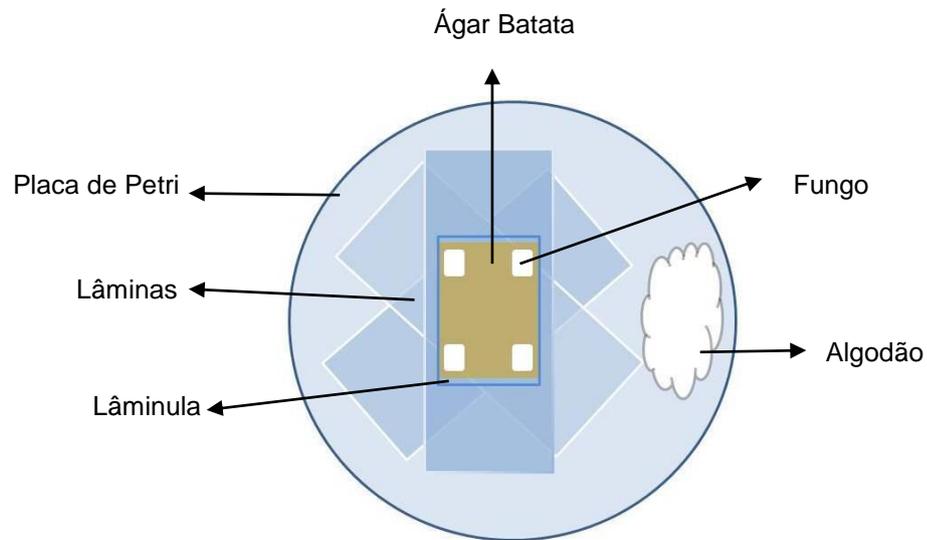


Figura 12: Figura esquemática representando a técnica de microcultivo para fungos filamentosos.
Fonte: Autora, 2011.

A placa foi incubada à temperatura de 25 °C por 7 dias. Transcorrido o período de incubação, com auxílio de uma pinça estéril, a lamínula foi retirada e, após a fixação do microrganismo em álcool, essa foi montada em uma lâmina limpa com 1 gota do corante lactofenol azul algodão. As estruturas morfológicas foram observadas em microscópio óptico em aumento de 40x e as imagens foram fotografadas para análise.

4.4 Métodos para determinação da atividade antifúngica *in vitro* dos óleos essenciais e do eugenol

Os ensaios iniciaram-se com um teste qualitativo. O objetivo foi verificar se o óleo essencial do craveiro e o do eucalipto apresentavam atividade antifúngica para os dermatófitos *M. canis*, *M. gypseum* e *T. mentagrophytes*. O teste foi denominado de método do fragmento.

4.4.1 Método do fragmento

Uma adaptação da metodologia descrita em Souza e colaboradores (2002) foi utilizada como um ensaio preliminar para os óleos essenciais.

No experimento, preparou-se uma solução estoque com os óleos essenciais em solução salina 0,9% (m/v) estéril, adicionada de uma mistura *Tween*:DMSO (1:1, v/v) na concentração máxima de 2,5% (v/v), para melhor solubilização, e agitou-se em vórtex por 30 segundos.

Uma alíquota de cada solução foi transferida para a placa de Petri acrescentando-se o SDA contendo cloranfenicol 0,5% (m/v) fundido e resfriado à temperatura de 45 °C. As placas foram homogeneizadas girando-se no sentido horário e anti-horário.

Após o meio solidificar-se em temperatura ambiente, um fragmento de 2 mm do fungo a ser testado foi inoculado à superfície do meio, permanecendo por 7 dias à temperatura de 25 ± 2 °C. Controles positivo [meio de cultura, *Tween*:DMSO (1:1, v/v) e fungo] e negativo [meio de cultura e *Tween*:DMSO (1:1, v/v)] foram preparados simultaneamente.

Os volumes de óleo utilizados no preparo da solução estoque foi calculado com base no percentual do seu componente químico majoritário, ajustando-se a concentração desse para 100%. Dessa forma, a concentração final do óleo na placa foi de 1000 µg/mL.

A atividade antifúngica foi evidenciada visualmente pela inibição do crescimento fúngico após o período de incubação.

4.4.2 Determinação da concentração mínima inibitória dos óleos essenciais

A determinação da concentração mínima inibitória (CIM) dos óleos essenciais e do eugenol frente aos fungos de interesse foi realizada pelo método turbidimétrico em microdiluição adaptado do documento M38-A2 do CLSI (2008).

4.4.2.1 Preparo e padronização da suspensão fúngica

A suspensão fúngica foi preparada à partir de um tubo contendo colônias de 7 dias do fungo desejado. Com auxílio de uma pipeta automática e ponteira estéril foram adicionados ao tubo 2 mL de solução salina 0,9% (m/v) (estéril) e 0,02 mL de *Tween*:DMSO (1:1, v/v) e, a seguir, a suspensão foi homogeneizada passando-se levemente uma alça sobre o fungo para a obtenção de uma suspensão mais concentrada. O procedimento de lavagem foi realizado mais três vezes utilizando 2 mL de solução salina estéril [sem *Tween*:DMSO (1:1, v/v)]. A coleta dos 8 mL de suspensão fúngica foi feita em frasco plástico cônico estéril e homogeneizada em vórtex por 1 minuto. Após 5 minutos, período de sedimentação, o sobrenadante foi transferido para tubo estéril.

A padronização da suspensão fúngica foi feita em espectrofotômetro modelo UVmini-1240 Shimadzu ajustando o comprimento de onda em 530 nm, de acordo com Almeida e colaboradores (2009).

A suspensão fúngica foi diluída com solução salina estéril até a obter uma leitura compreendida entre 68-70% de transmitância e, posteriormente, armazenada

sob refrigeração (4 °C) até o momento do uso como recomendado por Deus, Alves e Arruda (2011).

Como medida de controle, o inóculo foi quantificado através do método de semeadura em profundidade. O número viável de UFC/ mL foi obtido diluindo-se novamente a suspensão fúngica padronizada em salina estéril (1:100) e transferindo-se uma alíquota de 0,01mL para uma placa de Petri. Posteriormente, foi adicionado o meio SDA fundido e resfriado à 45 °C.

A placa foi incubada à temperatura de 28 °C e observada diariamente para verificar a presença de colônias de fungos. As colônias foram contadas após 7 dias.

4.4.2.2 Preparo do meio de cultura

O meio de cultura empregado na determinação da CIM foi o caldo RPMI-1640 tamponado com MOPS (ácido 3-[N-morfolino]propanosulfônico), como sugerido no documento M38-A2 do CLSI (2008).

De acordo com o documento para cada 1 L de meio a ser preparado, deve-se pesar 10,4 g de RPMI-1640 em pó e 34,53 g de tampão MOPS, dissolver em água destilada e ajustar o pH para 7,0 a 25 °C com hidróxido de sódio (NaOH) 1,0 M. Posteriormente, o meio foi esterilizado através de filtração com membrana de 0,22 µm. O preparo e a esterilização do meio de cultivo foram feitos no momento do uso.

Parte do volume de meio preparado foi utilizado para diluição das amostras, o volume restante foi inoculado com a suspensão fúngica na proporção de 1:50 (v/v) ou seja, para cada 1 mL do inóculo foram necessários 49 mL do meio de cultivo padrão. Tal diluição corresponde a 2x a densidade necessária para obter $0,4 \times 10^4$ a

5×10^4 UFC/mL na microplaca. O cálculo considera que serão pipetados 100 μ L do meio inoculado para um volume final no poço de 200 μ L.

4.4.2.3 Preparo das amostras

Para a determinação da CIM foram testadas oito concentrações de cada óleo essencial com limite superior de 1000 μ g/mL e inferior de 7,8 μ g/mL com base em seu componente químico majoritário.

Uma solução estoque foi preparada de modo a obter uma concentração de 2000 μ g/mL. No preparo foram pipetados 9,04 μ L de óleo essencial, 7,5 μ L de *Tween*: DMSO (1:1, v/v) e meio RPMI-1640 suficiente para completar o volume de 4mL. À partir dessa solução estoque de óleo essencial do craveiro foi retirada uma alíquota de 500 μ L para frasco estéril contendo 500 μ L de meio RPMI-1640, obtendo-se dessa forma a segunda concentração (1000 μ g/mL) e através de uma diluição seriada foram obtidas mais seis concentrações.

Alíquotas de 100 μ L foram transferidas para os poços da microplaca, posteriormente completados com mais 100 μ L de meio RPMI-1640 inoculado. Assim como no preparo do meio inoculado, as diferentes concentrações foram preparadas duas vezes mais concentradas do que a concentração desejada na microplaca. Dessa forma, foram testadas as seguintes concentrações de cada óleo essencial: 1000 μ g/mL – 500 μ g/mL – 250 μ g/mL – 125 μ g/mL – 62,5 μ g/mL – 31,25 μ g/mL – 15,63 μ g/mL e 7,8 μ g/mL.

O eugenol foi testado nas mesmas concentrações, porém no preparo da solução estoque foram pipetados 6,06 μ L do eugenol, corrigido de acordo com a sua pureza (99,0%) rotulada, 5,05 μ L *Tween*: DMSO (1:1, v/v) e meio RPMI-1640

suficiente para completar o volume de 3 mL. O preparo das demais concentrações, assim como a transferência para a microplaca seguiu-se conforme já descrito para o óleo essencial do craveiro e do eucalipto.

Como controle positivo foram empregados os fármacos cetoconazol (CTC) da Janssen-Cilag e a terbinafina (TRB) da Galena e Química Farmacêutica.

Ambos os fármacos foram testados em uma faixa abrangendo 10 concentrações. Para o CTC, primeiramente, foi preparada uma série de soluções de 1.600 a 3,13 $\mu\text{g/mL}$ em DMSO. Posteriormente, cada concentração foi diluída em meio RPMI-1640. Como ocorre a diluição (1:2, v/v) dos fármacos quando combinados com o meio inoculado, as soluções de trabalho dos agentes antifúngicos são preparadas em concentração dobrada. Sendo assim, as concentrações finais testadas para o CTC foram: 0,0313 $\mu\text{g/mL}$ – 0,0626 $\mu\text{g/mL}$ – 0,1252 $\mu\text{g/mL}$ – 0,2504 $\mu\text{g/mL}$ – 0,5008 $\mu\text{g/mL}$ – 1,0016 $\mu\text{g/mL}$ – 2,0032 $\mu\text{g/mL}$ – 4,0064 $\mu\text{g/mL}$ – 8,0128 $\mu\text{g/mL}$ e 16 $\mu\text{g/mL}$ como recomendado por Araújo e colaboradores (2009).

A TRB foi preparada de modo semelhante, variando-se apenas a faixa de concentração analisada, tal como sugerida por Barros, Santos e Handan (2007): 0,005 $\mu\text{g/mL}$ – 0,001 $\mu\text{g/mL}$ – 0,002 $\mu\text{g/mL}$ – 0,004 $\mu\text{g/mL}$ – 0,008 $\mu\text{g/mL}$ – 0,015 $\mu\text{g/mL}$ – 0,03 $\mu\text{g/mL}$ – 0,06 $\mu\text{g/mL}$ – 0,12 $\mu\text{g/mL}$ e 0,24 $\mu\text{g/mL}$.

A concentração mínima inibitória para o CTC e para a TRB foi estabelecida como a menor concentração testada do fármaco capaz de promover 100% de inibição do crescimento do microrganismo.

4.4.2.4 Preparo das microplacas

As diluições das amostras e fármacos foram pipetadas em triplicata e distribuídas em microplaca de 96 poços.

Iniciou-se pelo controle negativo, que corresponde a 100 μ L do meio de cultura RPMI-1640 antes de sua inoculação e 100 μ L da maior concentração da solução de óleo essencial (1000 μ g/mL).

Nos demais poços utilizados para o teste foram adicionados 100 μ L do meio inoculado, com exceção do poço de controle do crescimento do microrganismo, para o qual foram pipetados 200 μ L de meio inoculado.

Após a adição dos meios (inoculado e não inoculado), acrescentou-se 100 μ L das diluições do óleo essencial, do eugenol e dos fármacos em cada poço referente a estes, partindo-se sempre da maior concentração para a menor concentração.

A microplaca foi homogeneizada em agitador de microplaca por 2 minutos na velocidade 3 e incubada à temperatura de 28 °C durante 7 dias seguindo as recomendações de Barros, Santos e Handan (2007).

Decorrido o prazo de incubação, a microplaca foi visualizada com auxílio de microscópio óptico (aumento de 40x) para melhor identificação dos poços que havia crescimento fúngico. Para todas as substâncias, a CIM foi considerada como a menor concentração capaz de inibir 100% do crescimento do microrganismo.

4.4.2.5 Determinação da concentração fungicida mínima (CFM)

A CFM foi estabelecida à partir da microplaca utilizada na determinação da CIM. Foram transferidas alíquotas de 20 µL de meio dos poços que não apresentaram crescimento fúngico para uma nova microplaca com 100 µL de caldo *Sabouraud-dextrose*. As microplacas foram incubadas à temperatura de 28 °C durante 7 dias. A metodologia foi adaptada de Pereira (2009).

Foi identificada como concentração fungicida mínima, das amostras e fármacos testados, a menor concentração em que não foi observada turvação do meio, caracterizando o não crescimento fúngico.

Para controle do procedimento, uma alíquota de 20 µL de meio com crescimento fúngico e com ausência de substância inibidora foi transferida para a microplaca, seguindo conforme descrito anteriormente. Foi realizado um controle negativo com o plaqueamento apenas do caldo *Sabouraud-dextrose*.

4.5 Microscopia Eletrônica de Varredura

A análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada para os dermatófitos *T. mentagrophytes*, *M. canis* e *M. gypseum* utilizando-se microrganismos oriundos do método do fragmento. Tais fungos foram expostos aos óleos essenciais do craveiro e eucalipto e ao eugenol. As concentrações utilizadas ficaram compreendidas entre 1000-125 µg/mL, variando de acordo com o resultado obtido pela CIM ou CFM.

Como controles, foram feitas imagens dos fungos sem receberem nenhum tipo de exposição às essas substâncias e expostos ao cetoconazol e terbinafina, fármacos de atividade antifúngica reconhecida.

O preparo das amostras foi realizado de acordo com Silva e colaboradores (2011). Blocos de ágar foram cortados e transferidos para um pequeno frasco onde foram imersos em solução fixadora de *Karnovsky* modificado pH 7,2 (glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,05 M) permanecendo por um período de 24 horas.

Após o prazo estabelecido para a fixação, as amostras foram lavadas por imersão em tampão cacodilato 0,05 M por três vezes, 10 minutos cada lavagem. A pós-fixação foi em solução aquosa de tetróxido de ósmio 1% (m/v), durante 1 hora e, em seguida, as amostras foram lavadas com água destilada três vezes. O tratamento final foi a desidratação em série com soluções de acetona nas concentrações de 25%, 50%, 75% e 90% (v/v), deixando em contato por 10 minutos em cada concentração. Para finalizar a etapa de desidratação, as amostras passaram por três ciclos de 10 minutos cada em acetona P.A. e mantidas em dessecador por tempo suficiente para completar a secagem.

Em um suporte de alumínio (*stub*) as amostras foram montadas com auxílio de uma fita de carbono dupla face e, no momento da análise, cobertas com uma fina camada de ouro-paládio (ciclo de metalização) e observadas em microscópio eletrônico de varredura (JSM 6390LV). As imagens foram captadas e registradas em aumentos variados na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

4.6 Desenvolvimento e avaliação da formulação

De acordo com os resultados obtidos pela CIM, o óleo essencial do craveiro foi o escolhido para o desenvolvimento da formulação.

Para veicular o óleo essencial a forma farmacêutica escolhida foi um creme aniônico, emulsão do tipo O/A. A formulação foi uma adaptação do Formulário Nacional (Brasil, 2012). A descrição das matérias-primas utilizadas, assim como a proporção, encontra-se no Quadro 2.

Para o preparo, as fases oleosa e aquosa foram aquecidas separadamente à temperatura aproximada de 70-75 °C. Lentamente, sob agitação, a fase aquosa foi adicionada à fase oleosa. Ainda, sob agitação moderada, a base foi resfriada até a temperatura de 30 °C. Posteriormente, o óleo foi adicionado na concentração final de 1% (m/m), homogeneizando-se até a incorporação total do mesmo.

Quadro 2: Descrição das matérias-primas utilizadas na elaboração do creme aniônico.

FASE	MATÉRIA-PRIMA	FUNÇÃO	PROPORÇÃO (m/m)	LOTE
O	*Lanette N®	Base auto-emulsionante aniônica	15%	CN144-1113
O	*Óleo Mineral	Veículo da fase oleosa	6,0%	130114E05551
O	*Propilparabeno	Conservante	0,1%	JJ2511
O	*Hidroxitolueno Butilado (BHT – <i>sigla do inglês</i>)	Conservante, antioxidante	0,05%	3AP29WAKUA
A	**Propilenoglicol	Umectante	5,0%	A955EBIL11
A	***Metilparabeno	Conservante	0,2%	MP-60/11-12
A	*EDTA dissódico	Potencializa a ação do conservante prevenindo a formação do ranço	0,1%	20130520
A	Água purificada	Veículo	q.s.p. 100%	N/A

Fornecedor®: * Henrifarma Produtos Químicos e Farmacêuticos, ** Pharmaceutical, *** Synth

4.6.1 Determinação do pH

O pH do creme 1% (m/m) do óleo da *Pimenta pseudocaryophyllus* foi determinado a partir de uma solução aquosa a 10% (m/v) por meio do método potenciométrico.

4.6.2 Teste de centrifugação

Antes do produto ser submetido ao estudo de estabilidade acelerada, o mesmo passou pelo teste de centrifugação. Uma amostra foi centrifugada (Eppendorf, 5417R, Alemanha) 3000 rpm por 30 minutos (BRASIL, 2005a).

O objetivo foi detectar qualquer alteração como precipitação, separação de fases, formação de *caking* e coalescência, observações que poderiam demonstrar instabilidade e necessidade de reformulação.

4.6.3 Características organolépticas

No presente estudo, a formulação foi avaliada quanto à cor, odor e homogeneidade. Pois, para o consumidor é importante que além da eficácia e segurança o produto atenda às expectativas organolépticas. Alterações físico-químicas podem ser evidenciadas na simples visualização da amostra, acarretando em não-conformidade da mesma.

4.6.4 Estudo de eficácia da formulação

Após a elaboração da formulação é importante a comprovação da eficácia da mesma. O teste foi realizado com a formulação [creme com 1% (m/m) do óleo essencial], com a formulação diluída de tal forma a obter um creme 0,1% (m/m), tal concentração corresponde a CFM do óleo essencial encontrada para dois dos três fungos.

Como controles do teste foram utilizados a base para a incorporação do óleo do craveiro, denominada neste estudo de placebo (creme sem o óleo), o óleo essencial na concentração de 1% (v/v), além dos controles positivo [meio de cultura, *Tween*:DMSO (1:1, v/v) e fungo] e negativo [meio de cultura e *Tween*:DMSO (1:1, v/v)].

4.6.4.1 Método do fragmento

O método de escolha foi o do fragmento descrito no item 4.4.1.

Para se obter uma concentração do creme a 1% (m/m) na microplaca, uma solução estoque foi preparada utilizando uma formulação com concentração de 20% (m/m) do óleo essencial em solução salina 0,9% (m/v) estéril, adicionada de uma mistura *Tween*:DMSO (1:1, v/v).

Também foram feitas soluções estoque com solução salina 0,9% (m/v) estéril adicionada de uma mistura *Tween*:DMSO (1:1, v/v) para as seguintes amostras: placebo, creme em uma concentração de forma a alcançar 0,1% (m/m) na

microplaca e óleo do craveiro de forma a obter a concentração de 1% (v/m) na microplaca.

A partir de cada solução estoque, uma alíquota foi transferida para uma microplaca contendo SDA e cloranfenicol 0,5% (m/v) fundido e resfriado à temperatura de 45 °C. As microplacas foram homogeneizadas girando-se no sentido horário e anti-horário.

Após o meio solidificar-se em temperatura ambiente, um fragmento de 2 mm do fungo a ser testado foi inoculado à superfície do meio, permanecendo por 7 dias à temperatura de 25 ± 2 °C.

A atividade antifúngica da formulação e do óleo essencial (controle) foi evidenciada visualmente pela inibição do crescimento fúngico após o período de incubação.

4.6.4.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

Todas as amostras testadas no item 4.6.4.1 foram visualizadas pela microscopia eletrônica de varredura. O protocolo de preparo das amostras foi o mesmo descrito no item 4.5.

As análises foram realizadas no Instituto de Química da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ). O equipamento utilizado foi o JSM-6510LV e as amostras foram capturadas nos aumentos de x 1.500, x 3.500 e x 5.000.

4.6.5 Estudo de estabilidade

O estudo de estabilidade foi conduzido de acordo com o Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos da ANVISA (2004) e Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade (Resolução - RE n^o 1, de 29 de julho de 2005). O teste de escolha foi o Teste de estabilidade acelerada com duração de 90 dias.

Amostras de óleo essencial, eugenol, creme a 1% (m/m), placebo, além de amostras de cada componente da formulação (Lanette N, óleo mineral, propilparabeno, BHT, propilenoglicol, metilparabeno, EDTA dissódico) foram colocadas em câmara climática à 50 ± 2 °C com $90\% \pm 5\%$ umidade relativa (UR) (GIL, 2010). Como padrão para o teste, amostras idênticas às citadas anteriormente foram mantidas em outras duas condições: temperatura ambiente e refrigeradas à 4 °C. Todas as amostras foram mantidas ao abrigo da luz.

As amostras foram avaliadas quanto aos parâmetros organolépticos (aspecto, cor e odor) e físico-químicos (pH e teste de centrifugação) antes do estudo de estabilidade, em torno de 45 dias e no final do estudo de estabilidade.

4.6.5.1 Cromatografia gasosa da formulação, do óleo essencial do craveiro e eugenol pós-estudo de estabilidade

Decorrido o estudo de estabilidade, amostras do creme 1% (m/m), do óleo essencial do craveiro e do eugenol foram analisadas utilizando-se Cromatografia Gasosa de Alta Resolução (CG-AR).

O cromatógrafo utilizado foi a gás do tipo HP 7820A (Agilent) equipado com detector de ionização de chama (*Flame Ionization Detector* - FID) e módulo de

injeção com razão de divisão (*split*) de 1:30. O volume de injeção foi de 1 μL de amostra (concentração de 0,5% (v/v) em clorofórmio). O hidrogênio foi utilizado como gás de arraste a uma vazão de 3 mL/min. A programação da temperatura do forno foi de uma isoterma inicial de um minuto a 70 °C seguida da taxa de 3 °C/min até 200 °C. A temperatura utilizada no injetor e no detector foi de 220 °C. A coluna utilizada foi HP5 (30 m x 0,32 mm x 0,25 μm Agilent). Software de aquisição de dados: EZChrom Elite Compact (Agilent).

A análise química foi executada no Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

4.6.5.2 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

O objetivo do estudo de espectroscopia vibracional na região do infravermelho foi auxiliar na avaliação das amostras [creme 1% (m/m) e placebo] submetidas ao estudo de estabilidade comparando-as com as amostras controle (armazenadas na temperatura ambiente).

As medidas foram feitas utilizando-se o equipamento espectrômetro Bruker alfa (FT-IR), pertencente ao Departamento de Química da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), sendo a amostra analisada por ATR, na região de 4000 - 600 cm^{-1} , com 4 cm^{-1} de resolução espectral.

4.6.6 Estudo por análise térmica

4.6.6.1 Estudo da formulação por calorimetria exploratória diferencial (*Differential scanning calorimeter* - DSC- sigla do inglês)

Com o objetivo de avaliar o perfil de decomposição térmica, as amostras foram submetidas à análise de Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC – sigla do inglês, de *Differential Scanning Calorimetry*).

As curvas de DSC foram obtidas em Analisador Térmico, TA INSTRUMENTS, MDSC2920 do Instituto de Química de Araraquara da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP). Foi empregado o método não isotérmico de análise, na razão de aquecimento de 10 °C/min em atmosfera de nitrogênio e massa de 3 a 5 mg. O intervalo de temperatura escolhido foi de 25 °C a 350 °C.

Amostras de óleo essencial, eugenol, creme a 1% (m/m), placebo, além de amostras de cada componente da formulação (Lanette N, óleo mineral, propilparabeno, BHT, propilenoglicol, metilparabeno, EDTA dissódico) foram submetidas à análise de DSC. Sendo que a técnica termoanalítica foi realizada antes e depois do estudo de estabilidade.

4.6.6.2 Estudo da formulação por análise termogravimétrica (*Thermogravimetry Analyse* – TGA – sigla do inglês)

As curvas termogravimétricas foram obtidas em um equipamento TGA Q50 V6.7 BUILD 203 com termo balança. A massa utilizada no ensaio foi de 3 a 5 mg, a razão constante de aquecimento foi de 20 °C/min e o intervalo de temperatura

escolhido foi de 50 °C a 250 °C, utilizando-se atmosférica dinâmica de nitrogênio com fluxo de 100 mL/min. As análises foram realizadas no Instituto de Química da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Óleos essenciais

5.2 Caracterização química dos óleos essenciais

5.2.1 Perfil cromatográfico do óleo do craveiro

A caracterização química do óleo essencial da *Pimenta pseudocaryophyllus* foi feita por CG-AR. O cromatograma obtido na análise está apresentado na Figura 13 e os componentes identificados e quantificados estão descritos na Tabela 2.

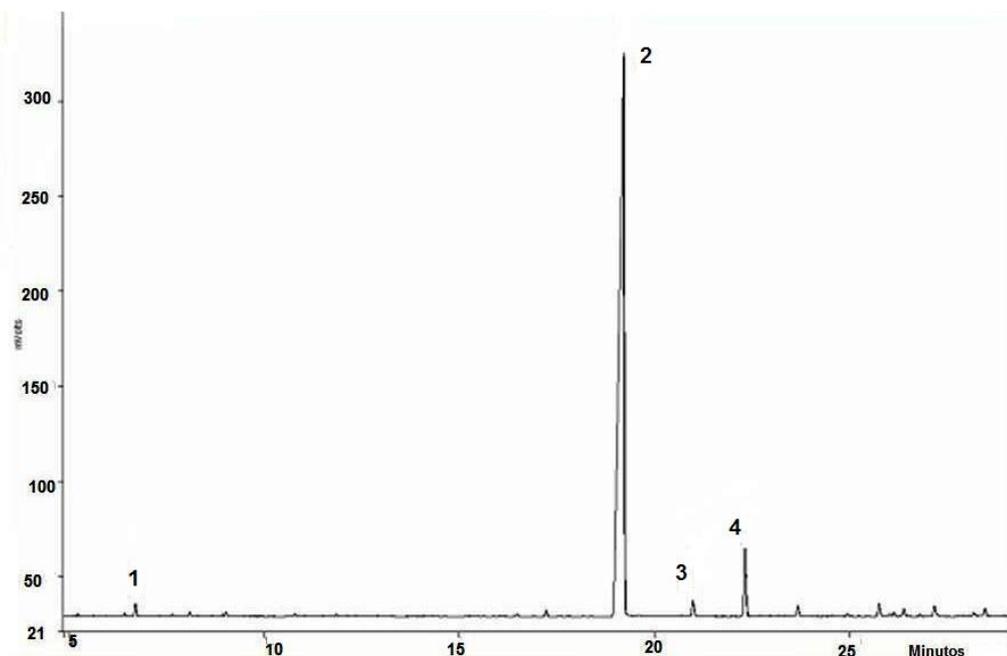


Figura 13: Cromatograma do óleo essencial da *Pimenta pseudocaryophyllus* obtido por CG-AR. (1) 1,8-cineol, (2) eugenol, (3) acetato de eugenol, (4) β -cariofileno. Picos menores que 0,1% não foram demonstrados.

Tabela 2: Porcentagem dos constituintes químicos do óleo essencial do craveiro obtida por CG-AR.

Pico	Composto	Conteúdo(%)	Índice de Kovats (Calculado)	Índice de Kovats (Adams, 2009)
1	1,8-cineol	0,7	1019	1033
2	eugenol	88,6	1266	1356
3	Acetato de eugenol	1,0	1284	1401
4	β -cariofileno	4,8	1297	1418
Total	-	95,1	-	

O eugenol foi identificado como constituinte majoritário do óleo com um percentual de 88,6%. Em estudo conduzido por Custódio e colaboradores (2010) para a determinação da atividade antimicrobiana dos óleos da *Pimenta pseudocaryophyllus* e *Tynanthus micranthus*, o componente majoritário também foi o eugenol nas porcentagens de 92,6% e 99,9%, respectivamente. Outros componentes químicos foram identificados no óleo do craveiro como o metil-eugenol, (E)-cariofileno, terpinen-4-ol e o-cimeno, sendo os dois primeiros também encontrados no presente estudo.

Porém, pesquisas apontam para uma maior diversidade entre tais componentes. Em estudo comparativo entre os óleos essenciais do craveiro extraídos das plantas oriundas das cidades São Gonçalo do Abaeté (MG) e Brasília (DF), as substâncias neral e geranial foram encontradas como os principais constituintes químicos do óleo da cidade mineira, enquanto o metil-eugenol e o (E)-metil-isoegenol foram os constituintes majoritários da planta de Brasília (LIMA *et al.*, 2006; PAULA *et al.*, 2010).

Sendo assim, a complexidade química dos óleos essenciais tem sido a explicação para as inúmeras atividades farmacológicas encontradas, contribuindo para retardar o aparecimento de resistência celular quando empregados como

antibacterianos ou antifúngicos. Logo, pode-se encontrar na literatura trabalhos com a *Pimenta pseudocaryophyllus* frente a diversos microrganismos como a *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, e os fungos filamentosos *Botryosphaeria rhodina*, *Botryosphaeria ribis*, *Claudosporium herbarum*, *Fusarium verticillioides* e *Lasiodiplodia theobromaeae*. Porém, não foi encontrada, até o momento, a atividade dessa planta para os dermatófitos (CUSTÓDIO *et al.*, 2010, LIMA *et al.*, 2006).

5.2.2 Perfil cromatográfico do eucalipto

A caracterização química do óleo essencial do *Eucalyptus smithii* foi feita por CG-AR. O cromatograma obtido na análise está apresentado na Figura 14 e os componentes identificados e quantificados estão descritos na Tabela 3.

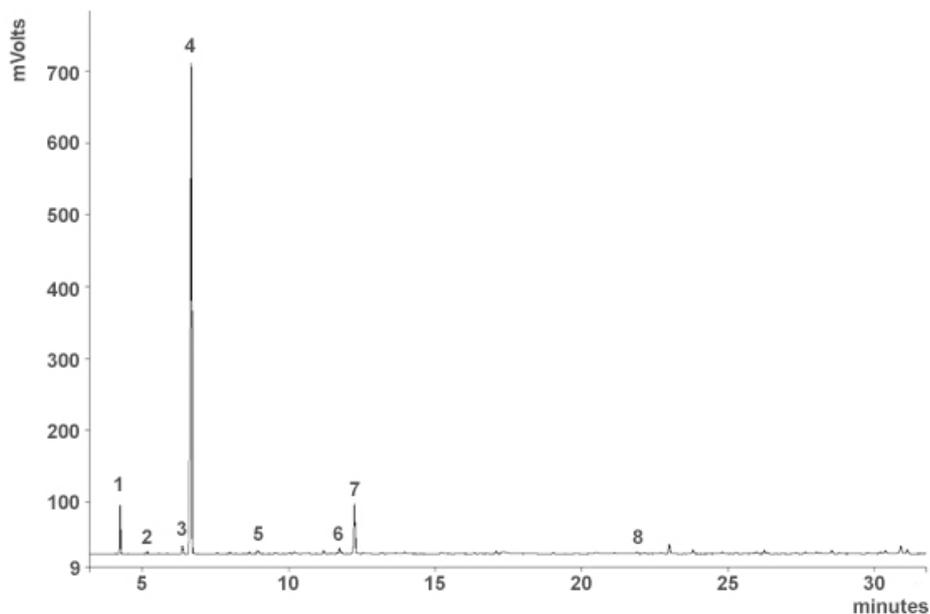


Figura 14: Cromatograma do óleo essencial do *Eucalyptus smithii* obtido por CG-AR. (1) α -pineno, (2) β -pineno, (3) p -cimeno, (4) 1,8-cineol, (5) linalol, (6) terpinen-4-ol, (7) α -terpineol, (8) β -cariofileno. Picos menores que 0,1% não foram demonstrados.

Tabela 3: Porcentagem dos constituintes químicos do óleo essencial do eucalipto obtida por CG-AR.

Pico	Composto	Conteúdo(%)	Índice de Kovats (Calculado)	Índice de Kovats (Adams, 2009)
1	α -pineno	3,5	948	939
2	ρ -cimeno	1,1	1016	1026
3	1,8-cineol	72,2	1013	1033
4	linalol	0,7	1078	1098
5	terpinen-4-ol	0,8	1143	1177
6	α -terpineol	7,5	1156	1189
7	β -cariofileno	0,4	1399	1418
Total	-	86,2	-	-

Alguns trabalhos apontam os monoterpenos, responsáveis por várias atividades, como os compostos mais dominantes em óleos essenciais (BAKALI *et al.*, 2008). No presente estudo, monoterpenos, representados essencialmente por α -pineno (hidrocarboneto monocíclico), ρ -cimeno (monocíclico aromático), 1,8-cineol (éter), linalol, terpinen-4-ol e α -terpineol (álcoois), foram encontrados como sendo os principais compostos para o óleo essencial do eucalipto. O 1,8-cineol foi identificado como constituinte majoritário do óleo com um percentual de 72,2%. Além desses, também foi encontrado o β -cariofileno um sesquiterpeno bicíclico.

Elassi e colaboradores (2011) mostraram que os principais compostos presentes em óleos essenciais de 10 espécies de eucalipto foram semelhantes aos observados nesse estudo. No entanto, Ogunwande e colaboradores (2003) mostraram que o β -pineno (39,4%) e α -pineno (30,4%) foram os constituintes predominantes em amostras de óleo obtidas a partir de *E. tereticornis* Smith e *E. grandis* W. Hill, respectivamente, sem detectar o 1,8-cineol.

Estudos sobre caracterização de óleos essenciais indicam variações entre as amostras. Tais diferenças na composição química dos óleos podem ser atribuídas a

fatores ambientais e ao envelhecimento das folhas a partir do qual são extraídos os óleos (CIMANGA *et al.*, 2002; ELAISSI *et al.*, 2012a; ELAISSI *et al.*, 2012b; SIMMONS; PARSON,1997; OGUNWANDE *et al.*, 2003). A variação sazonal e as alterações genéticas também são fatores utilizados para explicar essas diferenças relatadas, assim como as enzimas especializadas no metabolismo secundário das plantas, pois tais substâncias teriam uma propensão em agir em diversos substratos e, dessa forma, os produtos ficariam susceptíveis aos tipos e concentrações desses metabólitos (PAULA *et al.*, 2011).

5.2.3 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho do óleo do craveiro

A Figura 15 mostra os espectros do óleo essencial do craveiro e do eugenol. Por meio de uma análise comparativa entre o óleo essencial do craveiro utilizado no presente estudo com o eugenol padrão é possível perceber a semelhança entre os espectros vibracionais, fato esperado, pois 88,6% do conteúdo do óleo é eugenol.

A região do espectro compreendida entre 1800 cm^{-1} e 600 cm^{-1} foi a região que mais apresentou bandas de absorção tanto para o eugenol quanto para o óleo do craveiro. Porém, o óleo do craveiro apresenta uma banda na região de 1087 cm^{-1} e a mesma não é observada para o eugenol.

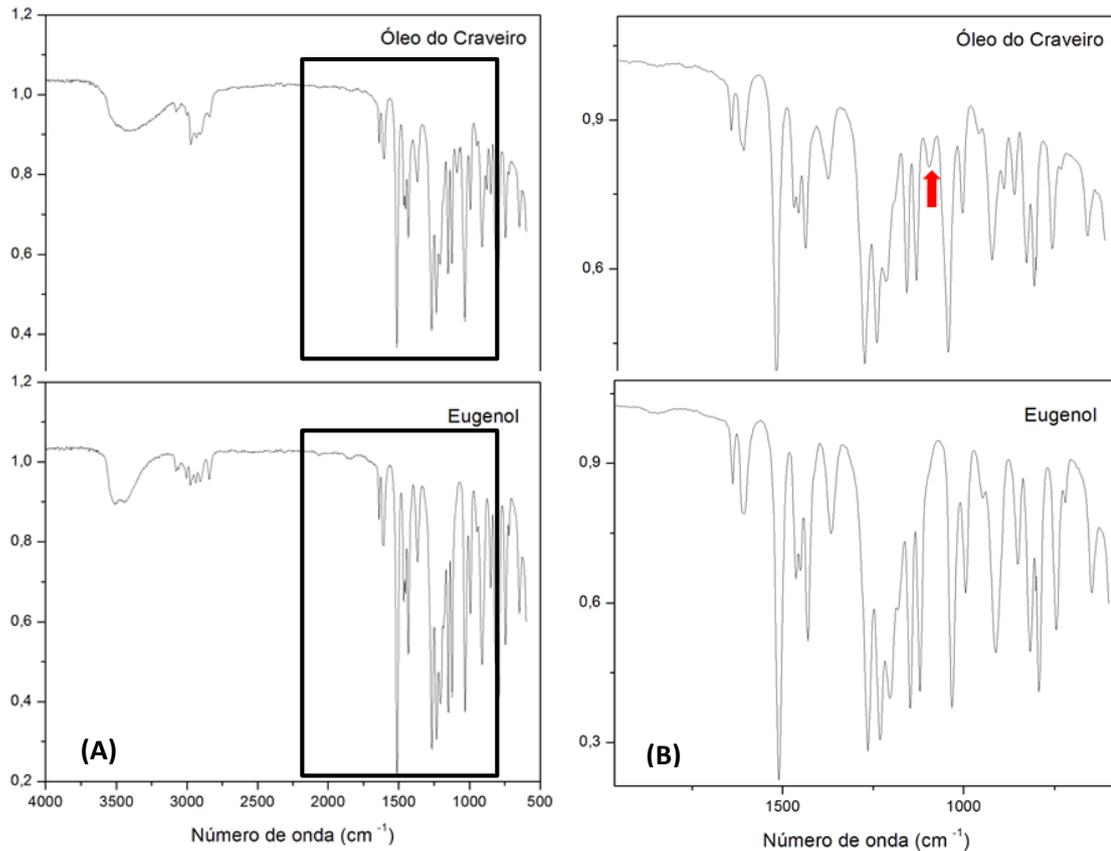


Figura 15: Comparação entre os espectros na região do infravermelho do óleo do craveiro e do eugenol. (A) Comparação dos espectros na região do infravermelho na faixa de 4000-600 cm^{-1} . (B) Zoom da região destacada em (A) e seta indicando uma banda diferente no óleo do craveiro.

As principais bandas de absorção estão atribuídas no Quadro 3.

Quadro 3: Principais bandas de absorção e modos vibracionais do óleo essencial e do eugenol na região do infravermelho.

MODO VIBRACIONAL	ABSORÇÃO EUGENOL (cm^{-1})	ABSORÇÃO ÓLEO DO CRAVEIRO (cm^{-1})
$\nu(\text{OH})$	3469 (f)	3440 (f)
$\nu(\text{CH})_{\text{arom}}$	3071, 3003 (f)	3079, 3003 (f)
$\nu(\text{CH})_{\text{alif}}$	2935, 2896 (f)	2933, 2873 (f)
$\nu(\text{C-OH})$	1266 (F)	1265 (F)
$\nu(\text{C=C})_{\text{anel}}$	1607 (f)	1607 (f)
$\nu(\text{C=C})_{\text{alif}}$	1640 (f)	1638 (f)
$\nu(\text{C-O-C})$	1233 (F)	1229 (F)

Abreviações: ν = estiramento; arom= aromático; alif= alifático; F= forte; f= fraca.

5.3 Fungos

5.3.1 Caracterização dos fungos

A identificação morfológica dos fungos filamentosos empregados na avaliação da atividade antifúngica demonstrou que as espécies *Microsporum canis* ATCC 32903, *Microsporum gypseum* ATCC 14683 e *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 11480 apresentaram as características macroscópicas e microscópicas semelhantes às descritas na literatura. Aspectos como coloração da colônia, textura e forma do macroconídeo são condizentes às esperadas para cada espécie estudada.

Os resultados macroscópicos obtidos com o plaqueamento em SDA e as imagens oriundas da microscopia óptica foram agrupados por espécie e estão apresentados nas Figuras 16, 17 e 18.

Na Figura 16, pode-se observar o aspecto morfológico do *T. mentagrophytes*. A colônia apresenta textura pulverulenta sem relevo acentuado de coloração branca no anverso e amarela no reverso. Na análise microscópica é possível observar uma abundância de microconídeos arredondados e agrupados em cacho, característica da espécie.

Analisando-se os aspectos macroscópicos da Figura 17, observa-se colônias com textura algodonosa, relevo rugoso e pigmentação branca no anverso e amarela no reverso. Na microscopia óptica é possível visualizar macroconídeos com aspecto fusiforme, de parede grossa e dividido por vários septos.

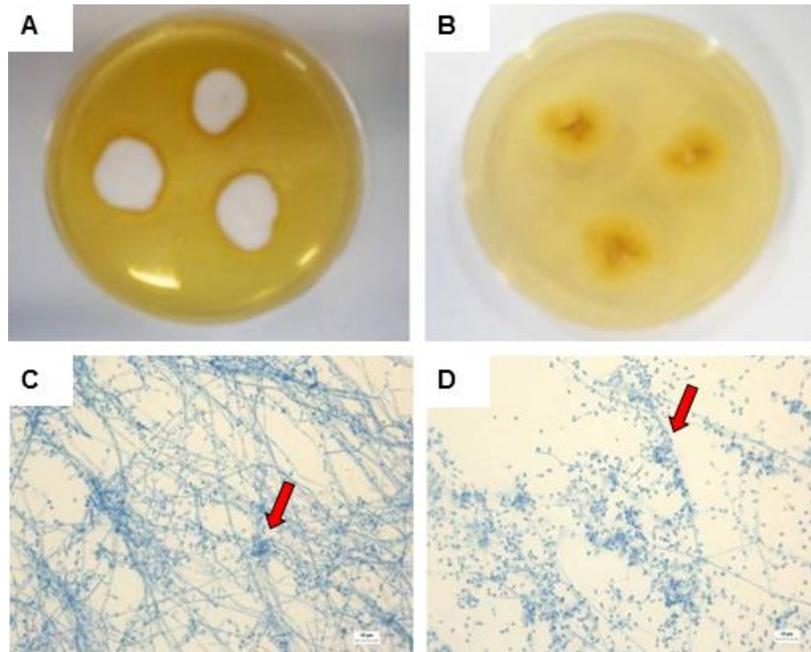


Figura 16: Aspectos morfológicos do *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 11480. Macroscópicos: (A) Anverso da colônia, (B) Reverso da colônia. Microscopia óptica (aumento de 40x): (C) e (D) Microconídeos arredondados e agrupados em cacho.

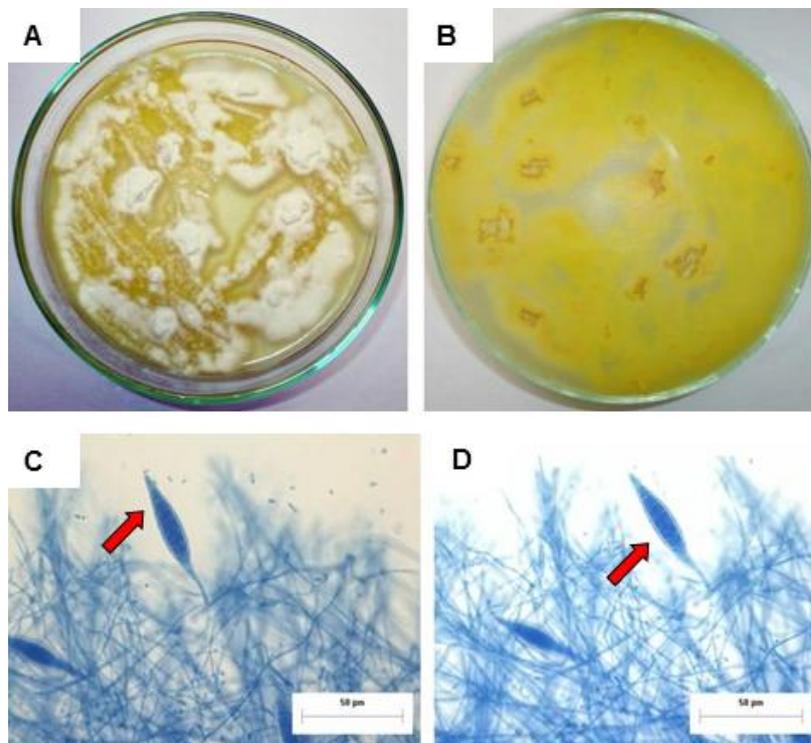


Figura 17: Aspectos morfológicos do *Microsporium canis* ATCC 32903. Macroscópicos: (A) Anverso da colônia, (B) Reverso da colônia. Microscopia óptica (aumento de 40x): (C) e (D) Macroconídeos de parede espessa e fusiforme.

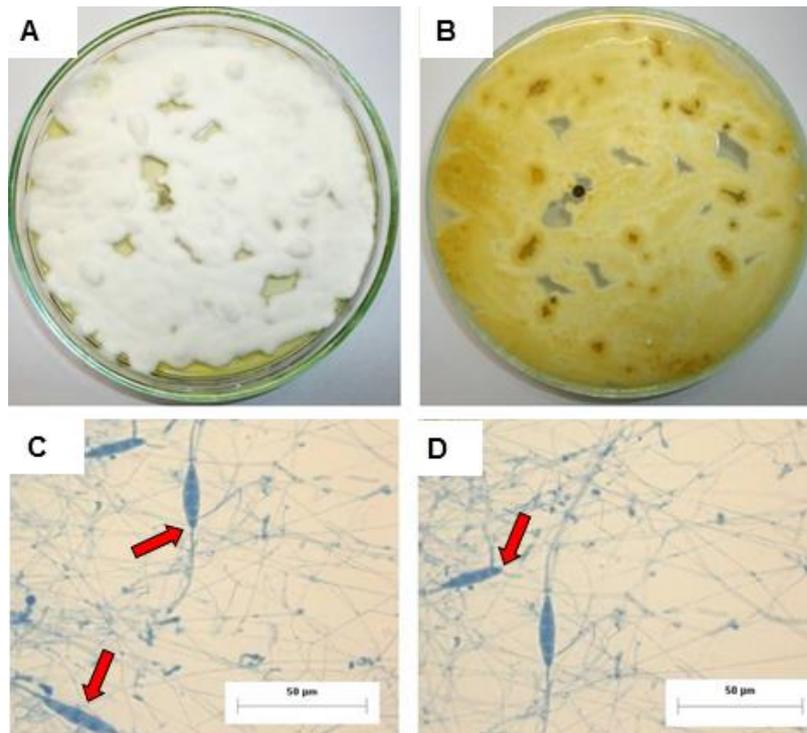


Figura 18: Aspectos morfológicos do *Microsporium gypseum* ATCC 14683. Macroscópicos: (A) Anverso da colônia, (B) Reverso da colônia. Microscopia óptica (aumento de 40x): (C) e (D) Macroconídeos com paredes finas e arredondas.

Semelhante ao *M. canis*, as colônias do *M. gypseum* apresentam-se com textura algodoadosa e anverso de coloração branca e reverso amarelo. Microscopicamente, é possível observar na Figura 18 um grande número de macroconídeos que diferem do *M. canis* por apresentarem as extremidades mais arredondadas e paredes finas.

5.4 Métodos para determinação da atividade antifúngica *in vitro* do óleo essencial do craveiro e do eugenol

5.4.1 Método do fragmento

Os resultados demonstraram que os óleos essenciais do craveiro e do eucalipto apresentaram atividade antifúngica contra *Microsporum canis* ATCC 32903 e *Microsporum gypseum* ATCC 14683, pois não foi observado crescimento fúngico após a incubação, mas apenas o óleo do craveiro apresentou atividade para o *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 11480. Entretanto, o efeito fungicida é dependente da dose e da linhagem investigada, fato que foi comprovado na pesquisa de Jamalian e colaboradores (2012).

O método do fragmento foi realizado apenas para os óleos essenciais, pois uma vez que a concentração de óleo testada foi ajustada em função de seus marcadores químicos, após um resultado positivo para o craveiro e para o eucalipto, partiu-se do princípio que a probabilidade do eugenol e do 1,8-cineol apresentarem atividade antifúngica era muito alta, além do mais, alguns estudos já demonstraram atividade antifúngica desses para os gêneros *Microsporum* spp e *Trichophyton* spp (LEE *et al.*, 2007).

Geralmente, os compostos majoritários determinam a atividade biológica dos óleos essenciais (BAKALI *et al.*, 2008). Um estudo mostrou que 1,8-cineol, composto predominante observado no óleo essencial do eucalipto, tem relativamente fortes propriedades antimicrobianas contra diversos agentes patogênicos importantes (GILLES *et al.*, 2010; KUMAR *et al.*, 2012) além de apresentar uma menor toxicidade observada em ensaios *in vitro* (ELAISSI *et al.*, 2012a).

No entanto, estudos evidenciam que os óleos essenciais, principalmente aqueles com ação antimicrobiana, o efeito pode ser explicado devido a um sinergismo entre todos os componentes e que mesmo aqueles em menores proporções parecem desempenhar um papel significativo (CIMANGA *et al.*, 2002; GILLES *et al.*, 2010).

5.4.2 Determinação da concentração mínima inibitória dos óleos essenciais

Na Tabela 4, encontram-se os valores da CIM e CFM para o óleo essencial da *Pimenta pseudocaryophyllus*, o seu marcador químico (eugenol) e o óleo essencial do *Eucalyptus smithii* para o dermatófitos em estudo.

Tabela 4: Valores de CIM e CFM das substâncias testadas sobre os dermatófitos.

Substâncias Testadas (µg/mL)	Dermatófitos					
	<i>Trichophyton mentagrophytes</i> ATCC 11480		<i>Microsporum canis</i> ATCC 32903		<i>Microsporum gypseum</i> ATCC 14683	
	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
Óleo essencial da <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i>	250	1000	250	250	250	1000
Eugenol	31,25	62,5	125	125	62,5	125
Óleo essencial do <i>Eucalyptus smithii</i>	-	-	500	500	1000	-
Cetoconazol	2,00	2,00	0,06	0,12	8,00	16
Terbinafina	0,03	0,03	0,06	0,06	0,12	0,12

* Valores de CIM e CFM expressos em µg/mL.

(-) não detectado na concentração testada (7,8 to 1.000 µg mL⁻¹ de óleo).

De acordo com os resultados obtidos para o óleo essencial da *Pimenta pseudocaryophyllus* e óleo essencial do *Eucalyptus smithii* os melhores resultados foram para o óleo essencial da *Pimenta pseudocaryophyllus*, sendo assim, o mesmo foi o escolhido para o desenvolvimento da formulação.

Diante dos resultados apresentados na Tabela 4, calculou-se a porcentagem (v/v) de óleo essencial da *Pimenta pseudocaryophyllus* capaz de inibir o crescimento fúngico através da conversão dos valores de CFM. O maior valor encontrado (1000

µg/mL) foi equivalente a 0,1% (v/v). Tal valor foi essencial para se definir a concentração que seria utilizada futuramente na formulação.

Nos estudos como antibacteriano, o craveiro mostrou-se promissor. Em experimentos desenvolvidos com o *Staphylococcus aureus* a CIM encontrada foi de 17 µL/mL e para a levedura *Candida albicans* a CIM foi de 4 µL/mL (CUSTÓDIO *et al.*, 2010).

Os valores de CIM encontrados para as linhagens de dermatófitos estudadas nesse trabalho foram mais elevados. Analisando os resultados, pode-se observar que embora o eugenol seja o composto majoritário do óleo essencial do craveiro, quando testado isoladamente, os valores de CIM e CFM foram inferiores. Vale ressaltar que essa comparação é válida, pois a concentração do óleo do craveiro foi ajustada pelo teor de eugenol revelado na análise por CG-AR. Sendo assim, o resultado sugere que houve um antagonismo entre os componentes químicos do óleo, resultando na diminuição de sua eficácia frente aos fungos quando comparado ao eugenol isolado. Porém, é possível encontrar na literatura outras atividades atribuídas ao óleo do craveiro que poderiam agregar à formulação vantagens ao tratamento, como a atividade bactericida (no caso de infecções secundárias por bactérias) e anti-inflamatória auxiliando nas lesões características da dermatofitose (CUSTÓDIO *et al.*, 2010; GARCIA *et al.*, 2004; LIMA *et al.*, 2006).

Os trabalhos publicados de atividade antifúngica de diferentes óleos essenciais também divergem muito na concentração de óleo necessária para a ação fungicida. No trabalho desenvolvido por Mugnaini e colaboradores (2012) com diversos óleos essenciais e *M. canis* isolado de gatos, foi necessário 7,5% do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* para se comprovar eficiência e 7,0% do óleo de *Citrus limon*, e o menor percentual foi atribuído ao óleo de *Thymus serpyllum*, cerca

de 0,1%, ainda assim, quatro vezes mais que o percentual encontrado para o óleo craveiro frente ao *M. canis* nesse trabalho.

A atividade antifúngica do eugenol foi relatada por Lee e colaboradores (2007) que testaram sua ação *in vitro* e *in vivo* para o *M. gypseum* e encontraram uma CFM de 300 µg/mL e uma redução significativa nas lesões de pele durante a primeira semana de tratamento com a substância nos ensaios *in vivo* (porquinho-da-índia). Estudos comparativos entre a ação do eugenol e timol em *Candida albicans* determinou uma CIM de 500 µg/mL para o eugenol (BRAGA *et al.*, 2007). Esse resultado é muito superior a CIM de 31,25 µg/mL encontrada para o *M. canis* e *T. mentagrophytes* descritas nesse estudo.

Quanto ao óleo do eucalipto, Elassi e colaboradores (2012) avaliaram sete espécies de eucalipto contra três dermatófitos (*T. rubrum*, *T. soudanense* e *M. canis*). As atividades destes óleos variaram significativamente com a espécie e com a linhagem. O óleo essencial de *E. odorata* apresentou melhor atividade antifúngica contra todas as cepas fúngicas testadas. Este óleo essencial continha a maior porcentagem média de criptona (20,9% ± 1,3%) e a menor porcentagem média de 1,8-cineol (4,5% ± 1,6%). Sendo assim, os autores deste estudo sugeriram que não havia qualquer relação entre a quantidade de 1,8-cineol e a elevada atividade antifúngica. No entanto, óleos essenciais a partir de *E. sideroxylon* e *E. bicostata*, contendo a maior porcentagem média de 1,8-cineol e quantidade moderada de α-pineno, apresentaram a capacidade de inibir o crescimento de *M. canis* e ainda apresentou a vantagem de ser menos tóxicos.

Portanto, fica evidente que a atividade biológica dos óleos essenciais varia de acordo com a presença de determinados compostos no óleo e a dose administrada. Além disso, certas relações fitoquímicas de estrutura-atividade são consideradas

importantes para ação biológica desse óleo. Um estudo realizado por Kim e Park (2012) mostrou que os aldeídos (neral e geranial) e álcoois (citronelol e geraniol) eram agentes antifúngicos mais eficazes contra espécies de *Aspergillus* do que hidrocarbonetos. Este estudo também associou a posição do grupo hidroxila com a atividade antifúngica.

Ratificando o estudo anterior, Vieira e colaboradores (2014) atribuíram a ação antimicrobiana às características lipofílicas do esqueleto de hidrocarboneto associada aos grupos funcionais hidrofílicos presente em alguns compostos e, ainda citaram, de acordo com a possibilidade de apresentarem atividade, um *rank* de componentes de óleos essenciais, o qual seria da seguinte forma: fenóis > aldeídos > cetonas > álcoois > éteres > hidrocarbonetos. Sendo que as atividades dos fenóis são reportadas, principalmente, à presença de timol, carvacrol e eugenol.

A mesma diversidade de respostas dos fungos filamentosos também ocorre em relação à susceptibilidade aos fármacos antifúngicos. Tal fato pode ser a justificativa para as pequenas variações encontradas na CIM para os fármacos nesse trabalho. Porém, os resultados mostraram-se coerentes com a literatura, pois pesquisas com os microrganismos *M. canis* e *T. mentagrophytes* têm apresentado valores para a CIM que variam entre 0,03 e 0,06 µg/mL para a TRB e próximo a 2 µg/mL para o CTC (ARAÚJO *et al.*, 2009; SEHATA; MUKHERJEE; GHANNOUM, 2008), sendo que um estudo com o *M. gypseum* obteve uma CIM para o CTC de 8,0 µg/mL (ALMEIDA, *et al.*, 2009), semelhante ao valor de 8,01 µg/mL apresentado no presente estudo para o microrganismo *M. canis*.

5.5 Microscopia Eletrônica de Varredura

Através do emprego das técnicas de MEV e MET é possível observar alterações na morfologia externa e interna do fungo, respectivamente. Tais observações são importantes na elucidação dos possíveis mecanismos de ação dos óleos essenciais sobre os fungos, pois estudos justificam a ação fungicida pela lise celular que ocorre devido ao caráter lipofílico de alta penetração do óleo quando em contato com o microrganismo (BRAGA *et al.*, 2007; ZYL *et al.*, 2010). Sendo assim, no presente estudo, os resultados de CIM e CFM foram complementados com os resultados obtidos no MEV. As eletromicrografias revelaram que os óleos essenciais e os fármacos controle tiveram um efeito prejudicial sobre a morfologia dos fungos quando expostos a essas substâncias.

A microscopia eletrônica de varredura foi realizada para os fungos *T. mentagrophytes*, *M. canis* e *M. gypseum* após serem expostos aos óleos essenciais do craveiro e do eucalipto e ao eugenol. Como controle, também foram obtidas imagens dos fungos sem receberem nenhum tipo de exposição às essas substâncias e depois de expostos aos fármacos cetoconazol e terbinafina, de atividade antifúngica bem estabelecida na literatura.

Nas análises de microscopia para o *T. mentagrophytes*, Park e colaboradores (2009) descreveram a ação do eugenol sobre a morfologia desse fungo. A CFM encontrada foi de 150 µg/mL e nessa concentração o eugenol inibiu completamente o crescimento do *T. mentagrophytes* que, por meio do MEV, antes da exposição à substância apresentava hifas na forma tubular e com aspecto normal e após a exposição ao eugenol a morfologia observada foi aberrante, com encolhimento e distorção parcial das hifas em algumas regiões.

Pode-se observar um efeito similar nas células dos dermatófitos testados nesse trabalho, eletromicrografias de todos os fungos expostos aos óleos mostraram diferenças nas estruturas quando comparadas com as dos fungos que não foram expostos.

As imagens obtidas para o *T. mentagrophytes* estão apresentadas nas Figuras de 19 a 24. Nesse caso, a captura das imagens por MEV não foi realizada para o óleo essencial de eucalipto, pois o mesmo não apresentou atividade antifúngica para o fungo *T. mentagrophytes*.

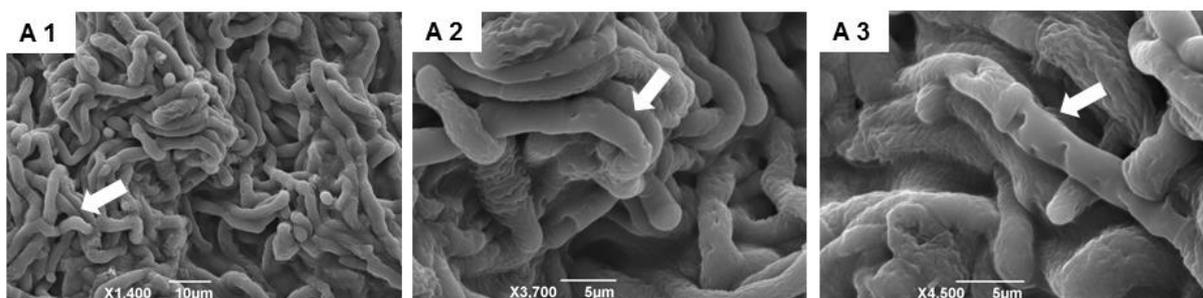


Figura 19: Eletromicrografias da espécie *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 11480. Células fúngicas não expostas aos tratamentos experimentais. Setas indicam hifas tubulares sem aparência compacta. Magnitude: (A1) x1.400, (A2) x3.700 e (A3) x4.500. Escala da barra: (A1) 10 µm; (A2, A3) 5 µm.

Na Figura 19, pode-se observar a presença de hifas mais íntegras e, principalmente, mais espaçadas uma em relação às outras quando comparadas às imagens das células expostas ao óleo essencial demonstradas na Figura 20. Ainda na Figura 20, em (A1) e (A2), pode-se observar umas das principais características do *T. mentagrophytes* que são os microconídeos arredondados e agrupados em cacho.

Para verificar os danos causados pela exposição ao óleo do craveiro, as concentrações de escolha foram 250 µg/mL (A) e 1000 µg/mL (B), correspondentes aos resultados de CIM e CFM, respectivamente. Através das imagens capturadas por MEV na Figura 20, pode-se observar alguns dos danos celulares ocorridos em

função da exposição ao óleo do craveiro como superfícies enrugadas, hifas aglomeradas e compactadas.

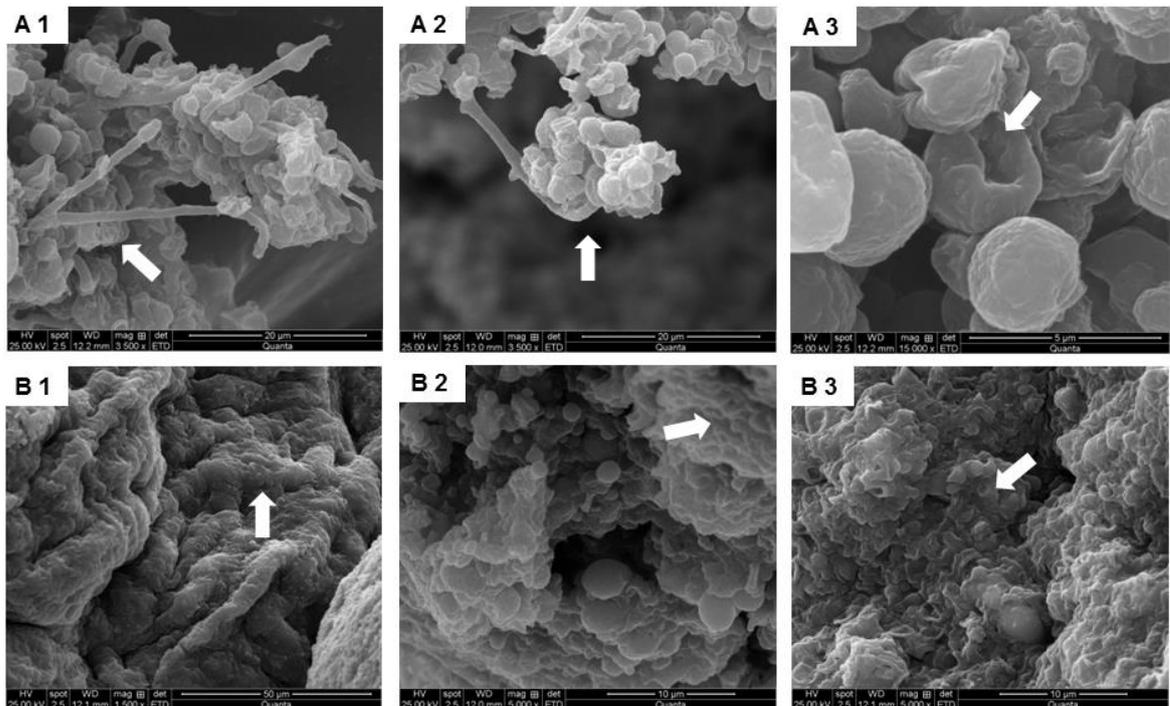


Figura 20: Eletromicrografias da espécie *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 11480. Células fúngicas expostas ao óleo essencial da *Pimenta pseudocaryophyllus*. (A) concentração de 250 µg/mL e (B) concentração de 1000 µg/mL. Setas indicam microconídios “enrugados” (A) e hifas formando superfícies compactas (B). Magnitude: (A1, A2) x3.500, (B1) x1.500 e (A3, B2, B3) x5.000. Escala da barra: (B1) 50 µm; (A1, A2) 20 µm; (B2, B3) 10 µm e (A3) 5 µm.

Na Figura 20, comparando-se as imagens (A) com as imagens (B), pode-se evidenciar o maior impacto do óleo sobre o fungo quando em concentração mais elevada. A observação mais aparente é a formação de aglomerados de hifas com formação de uma superfície densa.

Na Figura 21, é possível observar “cachos” de microconídios nas hifas, característico da espécie e em (A2), um zoom de (A1), microconídios deformados.

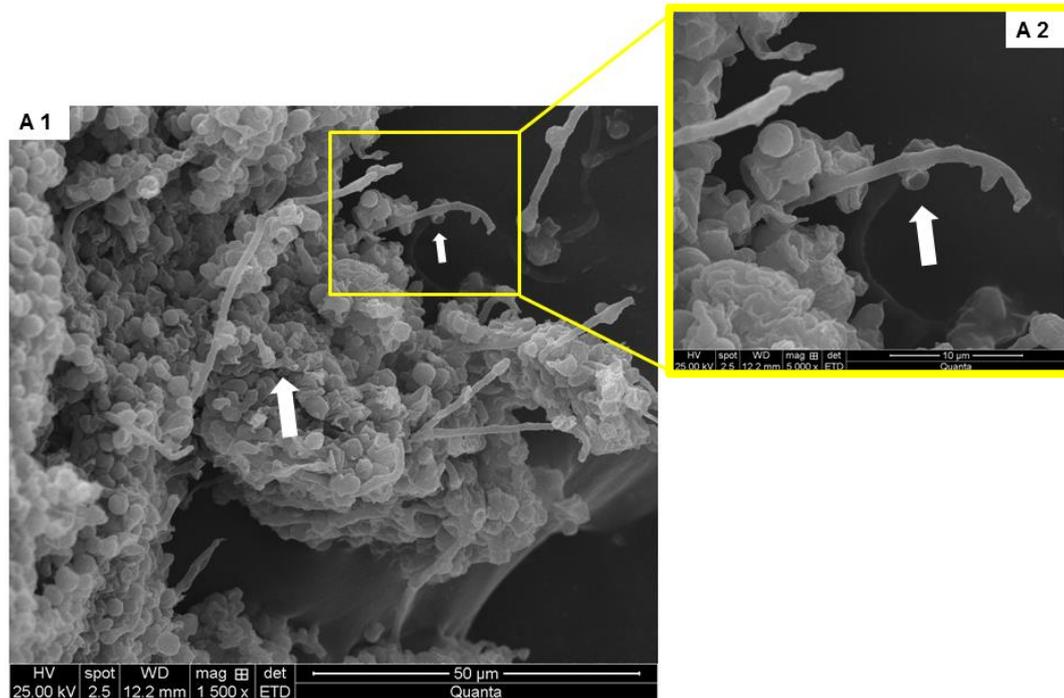


Figura 21: Eletromicrografias da espécie *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 11480. Células fúngicas expostas ao óleo essencial da *Pimenta pseudocaryophyllus* (250 µg/mL). Setas indicam microconídios deformados. Magnitude: (A1) x1.500 e (A2) x5.000. Escala da barra: (A1) 50µm e (A2) 10µm.

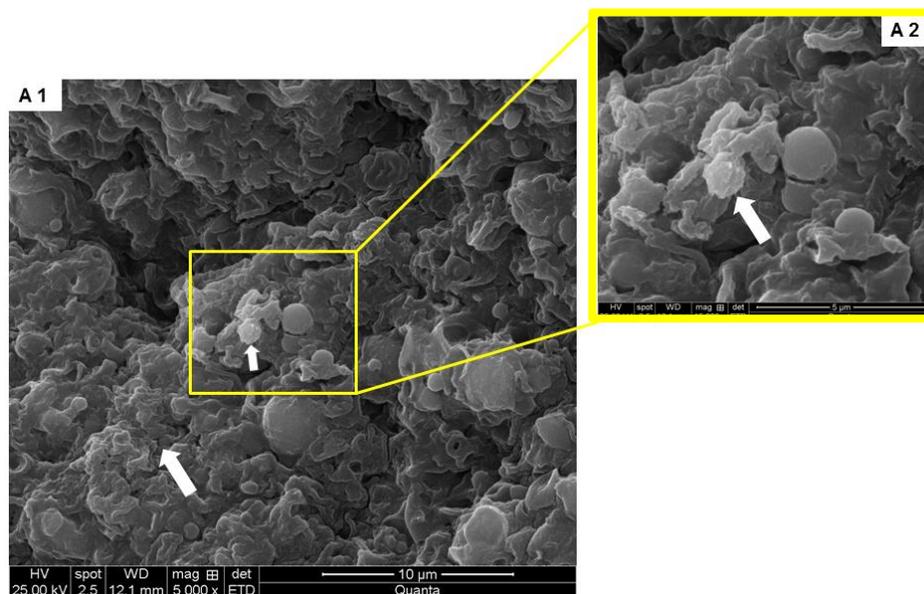


Figura 22: Eletromicrografias da espécie *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 11480. Células fúngicas expostas ao óleo essencial da *Pimenta pseudocaryophyllus* (1000 µg/mL). Setas indicam microconídios deformados. Magnitude: (A1) x5.000, (A2) x15.000. Escala da barra: (A1) 10µm e (A2) 5µm.

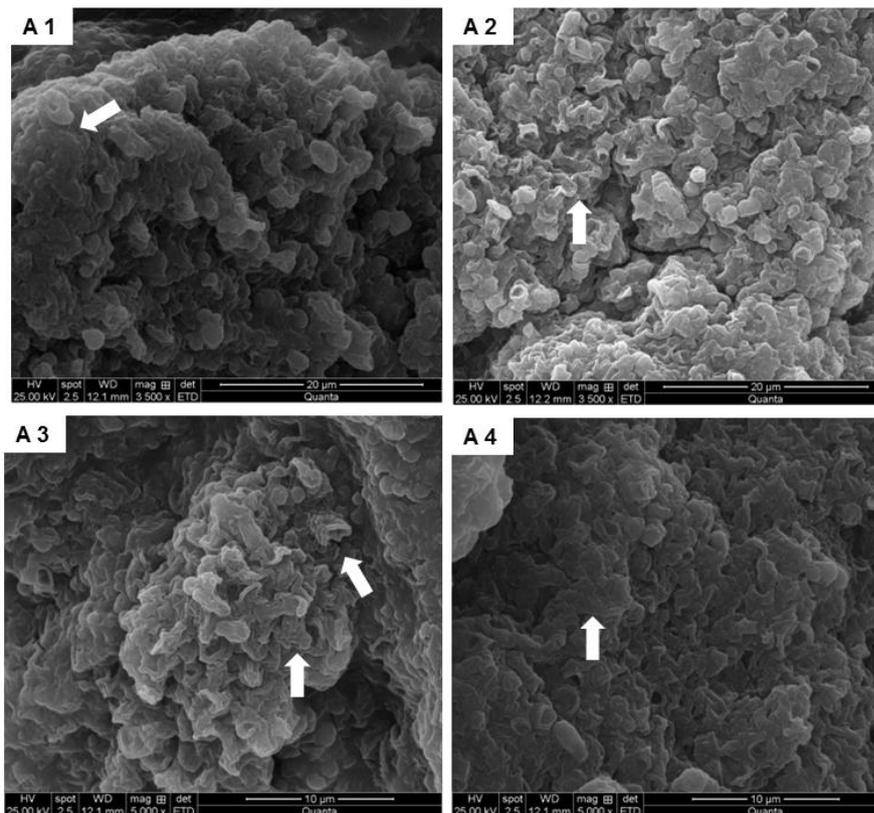


Figura 23: Eletromicrografias da espécie *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 11480. Células fúngicas expostas ao eugenol (1000 µg/mL). Setas indicam superfícies compactas com hifas e microconídeos enrugados. Magnitude: (A1, A2) x3.500 e (A3, A4) x5.000. Escala da barra: (A1) 10µm e (A2) 5µm.

Nas Figuras 22 e 23, as observações são semelhantes àquelas relatadas anteriormente, sendo que na Figura 23 a exposição das células foi ao eugenol, composto químico majoritário do óleo do craveiro.

Na Figura 24 foram testados os fármacos cetoconazol e terbinafina nas concentrações obtidas nos teste de susceptibilidade antimicrobiana. O aspecto aglomerado das hifas e superfície enrugada também pode ser notado.

As imagens obtidas para o *M. canis* ATCC 32903 estão apresentadas nas Figuras de 25 a 34.

Pode-se observar na Figura 25 a abundância de macroconídeos com parede espessa, extremidade mais pontiaguda e hifas íntegras e espaçadas, características do *M. canis*.

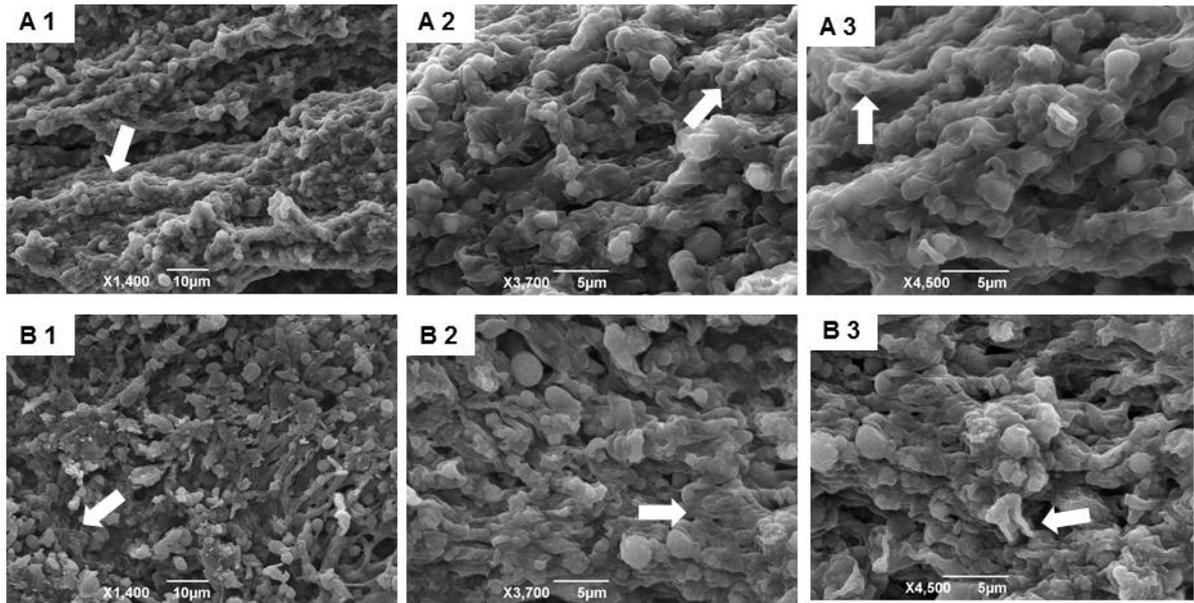


Figura 24: Eletromicrografias da espécie *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 11480. Células fúngicas expostas aos fármacos cetozonazol 2 µg/mL (A) e terbinafina 0,03 µg/mL (B). Setas indicando regiões compactadas e “enrugadas”. Magnitude: (A1, B1) x1.400, (A2, B2) x3.700 e (A3, B3) x4.500. Escala da barra: (A1, B1) 10µm e (A2, A3, B2, B3) 5µm.

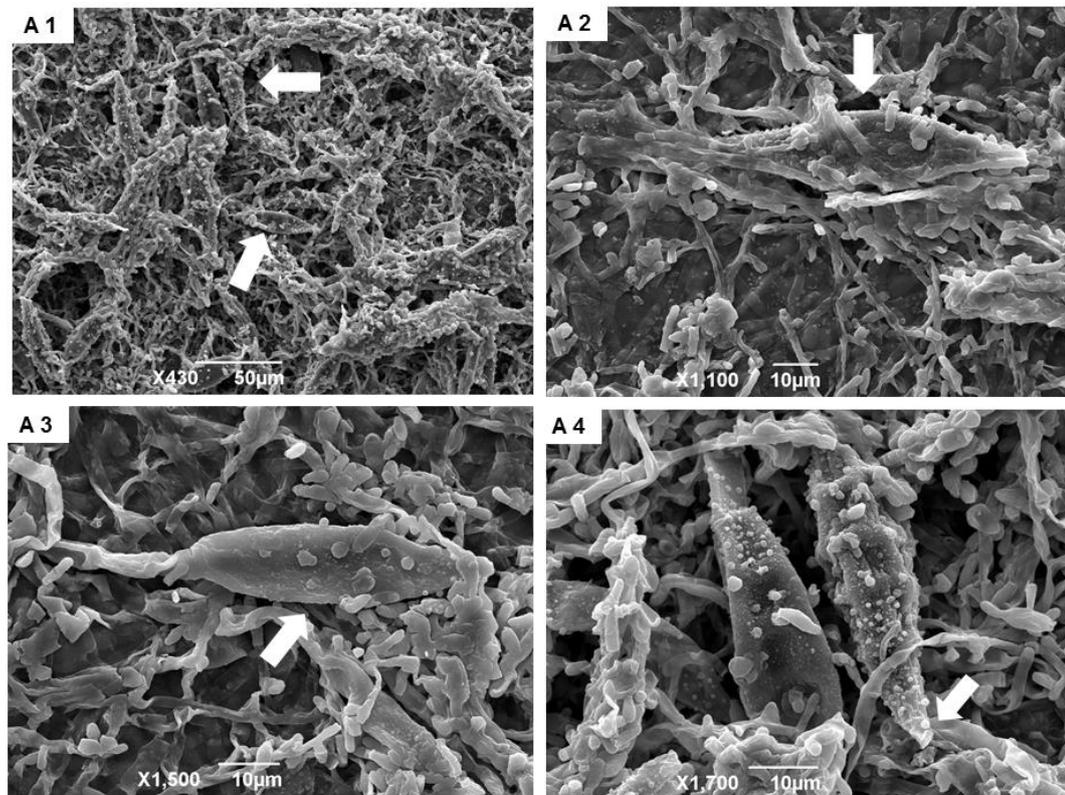


Figura 25: Eletromicrografias da espécie *M. canis* ATCC 32903. Células fúngicas não expostas aos tratamentos experimentais. Setas indicando grandes quantidades de macroconídeos. Magnitude: (A1) x430, (A2) x1.100, (A3) x1.500 e (A4) x1.70. Escala da barra: (A2, A3, A4) 10µm e (A1) 50µm.

Nas Figuras 25 e 26 o fungo pode ser observado na sua forma íntegra, sem deformações provocadas pelas substâncias em teste. As hifas mais espaçadas é uma das grandes diferenças observadas quando essas imagens são comparadas àquelas cujas células foram expostas ao óleo essencial.

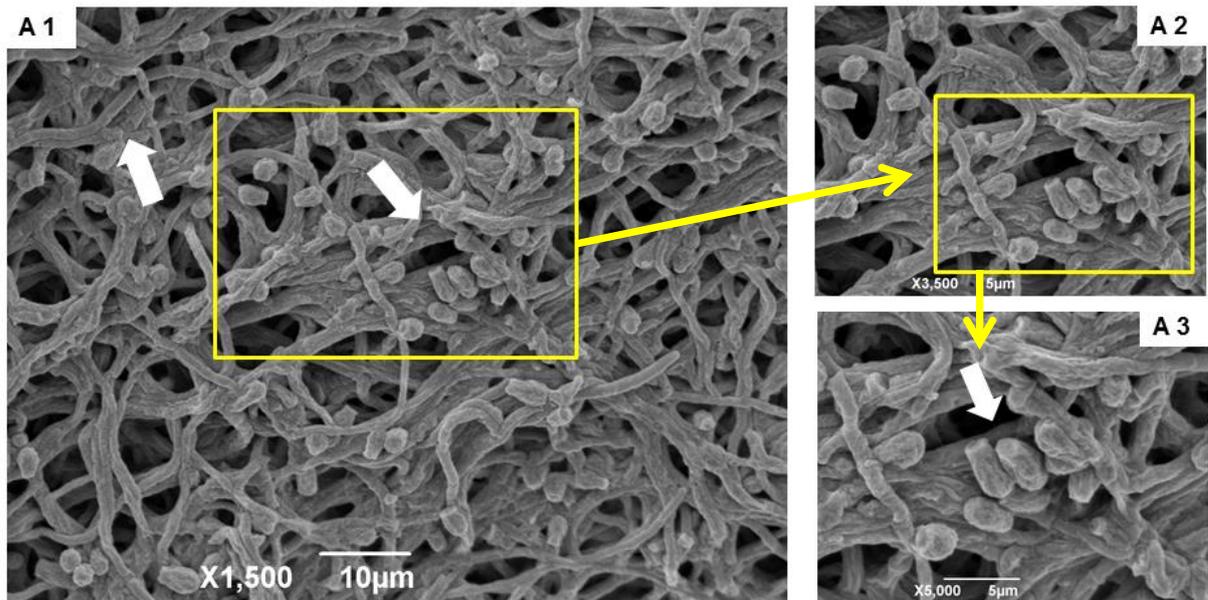


Figura 26: Eletromicrografias da espécie *M. canis* ATTC 32903. Sequências de ampliações. Células fúngicas não expostas aos tratamentos experimentais. Setas indicando hifas tubulares e mais espaçadas. Magnitude: (A1) x1.500, (A2) x3.500 e (A3) x5.000. Escala da barra: (A1) 10µm e (A2, A3) 5µm.



Figura 27: Eletromicrografias da espécie *M. canis* ATTC 32903. Células fúngicas expostas ao óleo essencial da *Pimenta pseudocaryophyllus* (250 µg/mL). Setas indicando hifas tubulares e mais espaçadas. Magnitude: (A1, A2) x3.500 e (A3) x5.000. Escala da barra: 5µm.

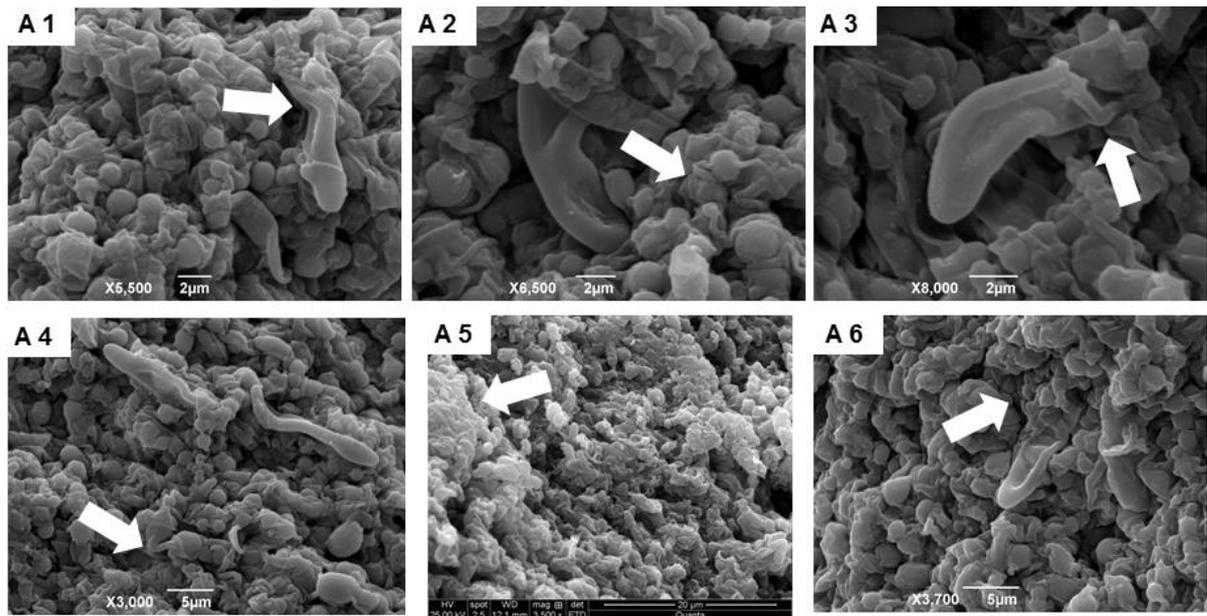


Figura 28: Eletromicrografias da espécie *M. canis* ATTC 32903. Células fúngicas expostas ao óleo essencial da *Pimenta pseudocaryophyllus* na concentração de 1000 µg/mL. Setas indicando hifas e macroconídeos retorcidos e formação de superfície compactada. Magnitude: (A1) x5.500, (A2) x6.500, (A3) x8.000, (A4) x3.000, (A5) x3.500 e (A6) x3.700. Escala da barra: (A1, A2, A3) 2µm, (A4, A6) 5µm e (A5) 20µm.

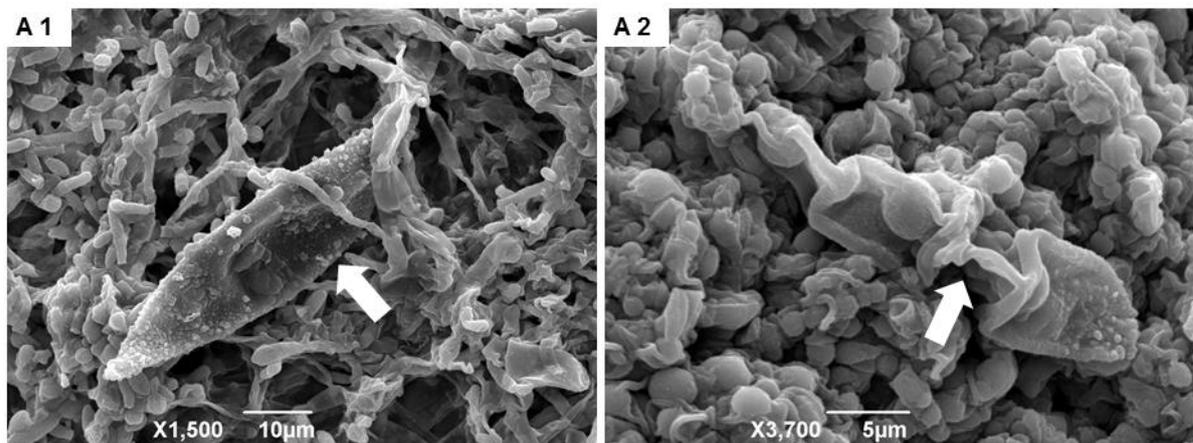


Figura 29: Eletromicrografias da espécie *M. canis* ATTC 32903. Comparativo entre Células fúngicas não expostas aos tratamentos experimentais (A1) e Células fúngicas expostas ao óleo essencial da *Pimenta pseudocaryophyllus* (1000 µg/mL) (A2). Setas mostrando um comparativo entre o macroconídeo normal (A1) e com aspecto “estrangulado” (A2). Magnitude: (A) x1.500 e (A2) x3.700. Escala da barra: (A1) 10µm e (A2) 5µm.

As Figuras 27 e 28 demonstram as alterações que podem ser encontradas quando o *M. canis* é exposto ao óleo do craveiro. Porém, também fica evidente o quanto a concentração do óleo pode interferir nessas alterações. Na Figura 27, a

concentração testada foi a da CIM e na Figura 28 foi a da CFM. Na concentração fungicida, as alterações são muito mais evidentes, com hifas compactadas e macroconídeos retorcidos, ao contrário, na concentração fungistática, a aparência do fungo é mais próxima àquela encontrada no fungo sem nenhum tipo de exposição.

Na Figura 29 é possível observar uma significativa mudança no macroconídeo após exposição ao óleo do craveiro. Em (A2) observa-se as hifas compactadas, com aspecto intumescido em alguns pontos e enrugado ou “estrangulado” em outras regiões. Em (A2) está evidenciada a deformação do macroconídeo, estrutura de reprodução do fungo, bem diferente da mesma destacada em (A1).

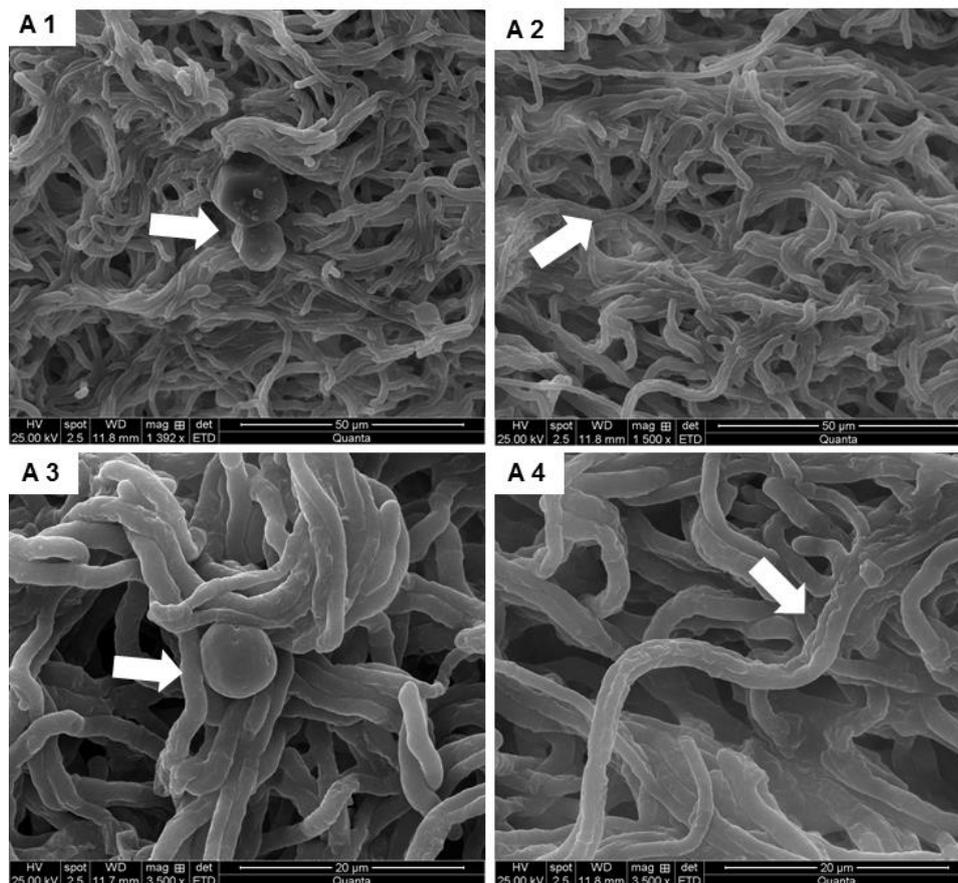


Figura 30: Eletromicrografias da espécie *M. canis* ATTC 32903. Células fúngicas expostas ao eugenol (125 µg/mL). Setas indicando pequenas deformações nas hifas. Magnitude: (A1) x1.392, (A2) x1.500 e (A3, A4) x3.500. Escala da barra: (A1, A2) 50µm e (A3, A4) 20µm.

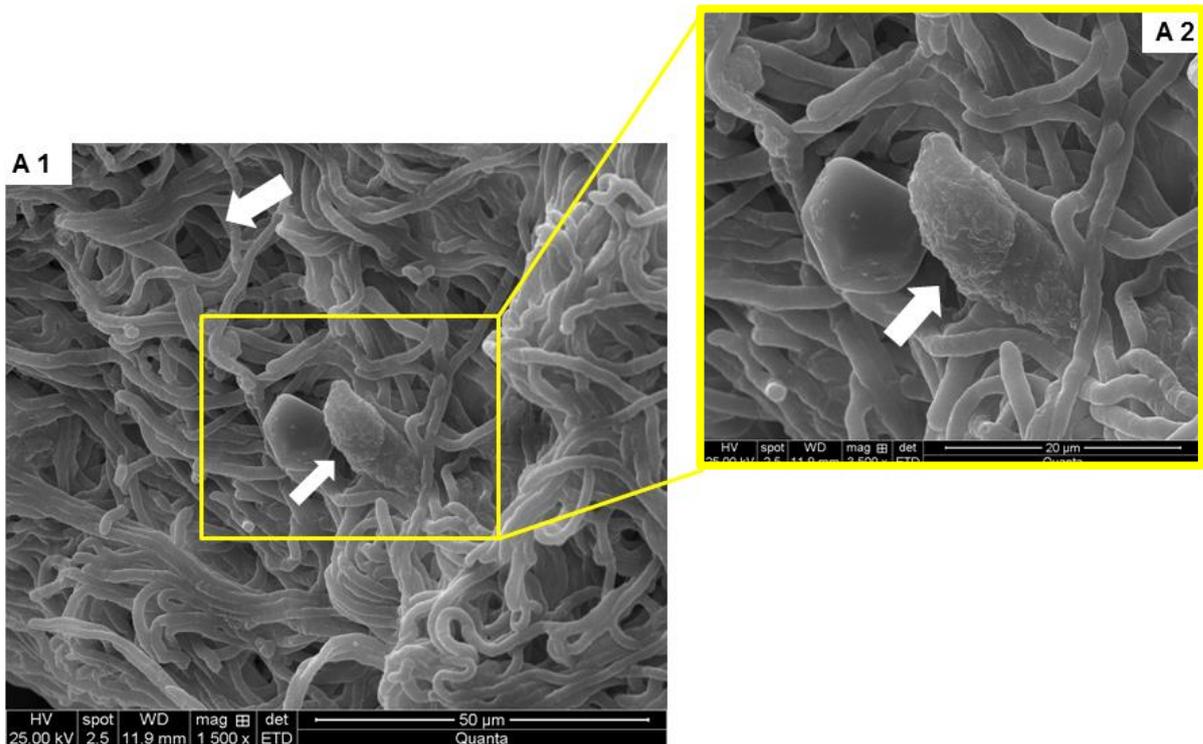


Figura 31: Eletromicrografias da espécie *M. canis* ATTC 32903. Células fúngicas expostas ao eugenol (125 µg/mL). Setas indicando a extremidade característica do macroconídeo dessa espécie. Magnitude: (A1) x1.500, (A2) x3.500. Escala da barra: (A1) 50µm e (A2) 20µm.

Assim como observado para o óleo essencial do craveiro, a concentração de eugenol a qual o fungo foi exposto está totalmente relacionada às observações encontradas por MEV. Nas Figuras 30 e 31 (concentração de 125 µg/mL de eugenol), as alterações são mais sutis quando comparadas àquelas encontradas na Figura 32 (concentração de 1000 µg/mL de eugenol) ou na Figura 34 quando as células foram expostas aos fármacos.

Na Figura 31, encontra-se em evidência a extremidade de um macroconídeo do *M. canis*, aspecto típico para tal estrutura nesse dermatófito.

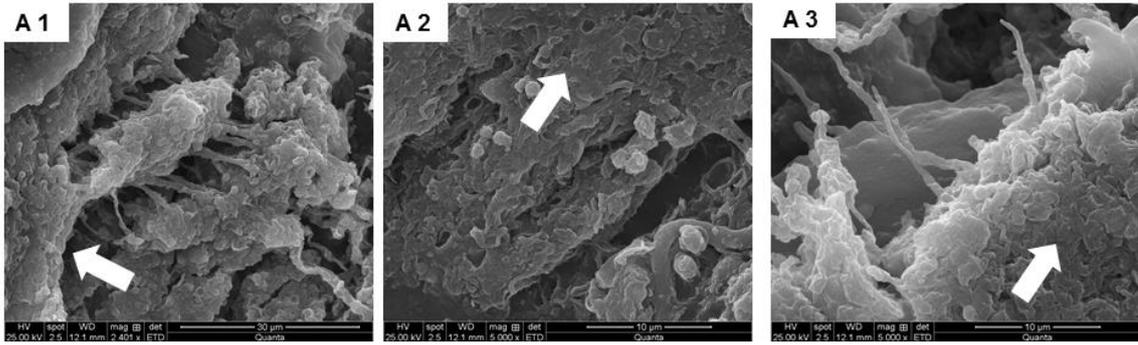


Figura 32: Eletromicrografias da espécie *M. canis* ATTC 32903. Células fúngicas expostas ao eugenol (1000 $\mu\text{g/mL}$). Setas indicando superfície compacta. Magnitude: (A1) x2.401, (A2, A3) x5.000. Escala da barra: (A1) 30 μm e (A2, A3) 50 μm .

O óleo essencial do eucalipto também provoca alterações semelhantes ao óleo do craveiro nas hifas do *M. canis*, como observado na Figura 33.

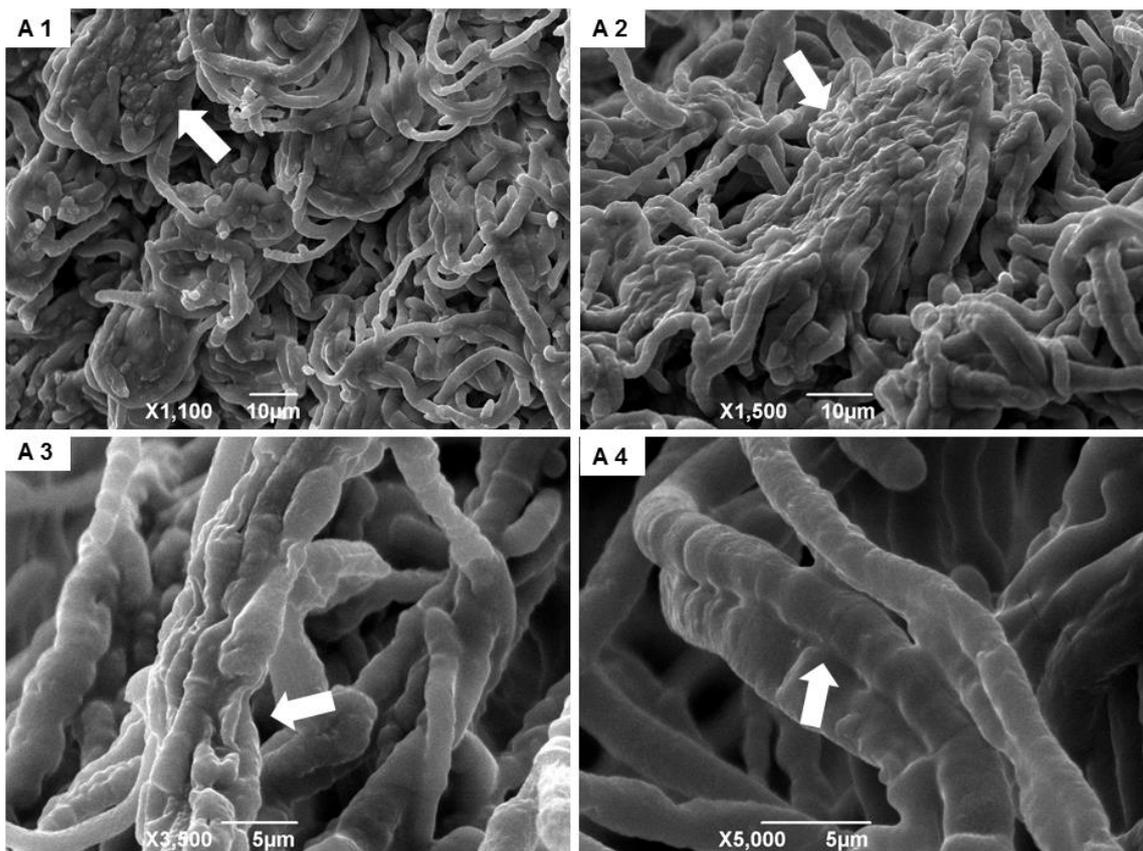


Figura 33: Eletromicrografias da espécie *M. canis* ATTC 32903. Células fúngicas expostas ao óleo essencial de *Eucalyptus smithii* (1000 $\mu\text{g/mL}$). Setas indicando deformações nas hifas. Magnitude: (A1) x1.100, (A2) x1.500, (A3) x3.500, (A4) x5.000. Escala da barra: (A1, A2) 10 μm e (A3, A4) 5 μm .

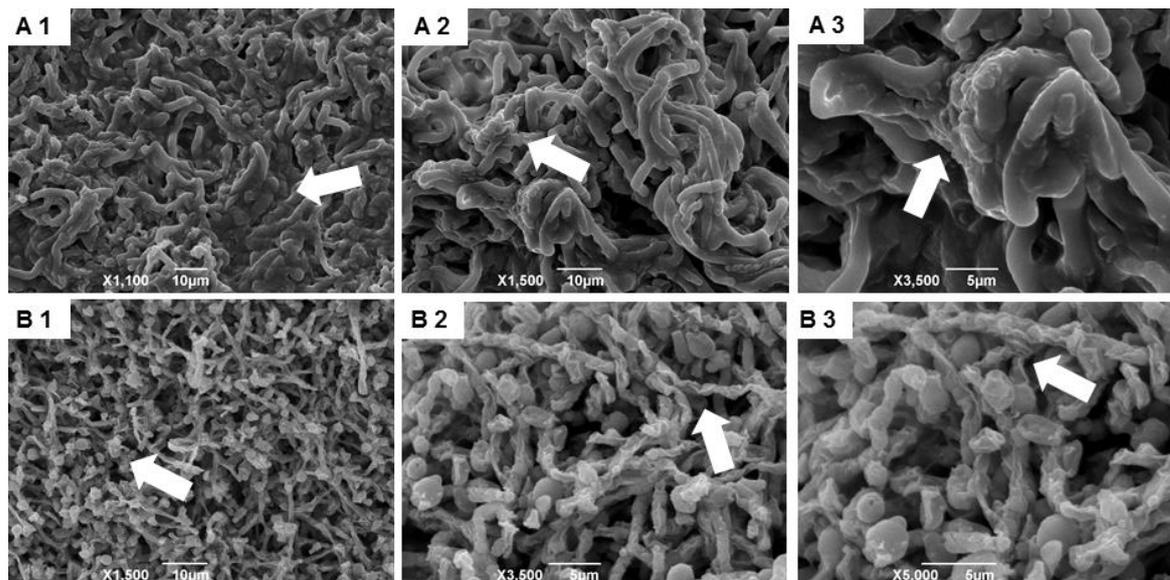


Figura 34: Eletromicrografias da espécie *M. canis* ATCC 32903. Células fúngicas expostas aos fármacos cetoconazol (A) e terbinafina (B). Setas indicando deformações nas hifas e superfícies compactas. Magnitude: (A1) x1.100, (A2, B1) x1.500, (A3, B2) x3.500 e (B3) x5.000. Escala da barra: (A1, A2, B1) 10 μ m e (A3, B2, B3) 5 μ m.

As imagens obtidas para o *M. gypseum* ATCC 14683 estão apresentadas nas

Figuras de 35 a 40.

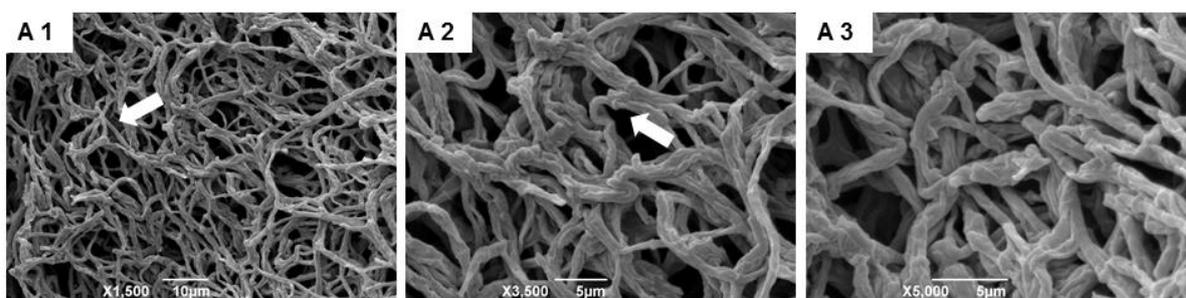


Figura 35: Eletromicrografias da espécie *M. gypseum* ATCC 14683. Células fúngicas não expostas às substâncias testadas. Setas indicando hifas tubulares sem regiões compactadas. Magnitude: (A1) x1.500, (A2) x3.500 e (A3) x5.000. Escala da barra: (A1) 10 μ m e (A2, A3) 5 μ m.

Semelhante ao ocorrido com o *M. canis*, quanto maior a concentração de óleo essencial empregada no teste, mais evidente fica as alterações nas hifas do *M. gypseum*. A comparação pode ser feita entre as Figuras 35 (fungo sem nenhuma exposição) e 36 (exposto ao óleo essencial do craveiro nas concentrações de 250 μ g/mL e 1000 μ g/mL).

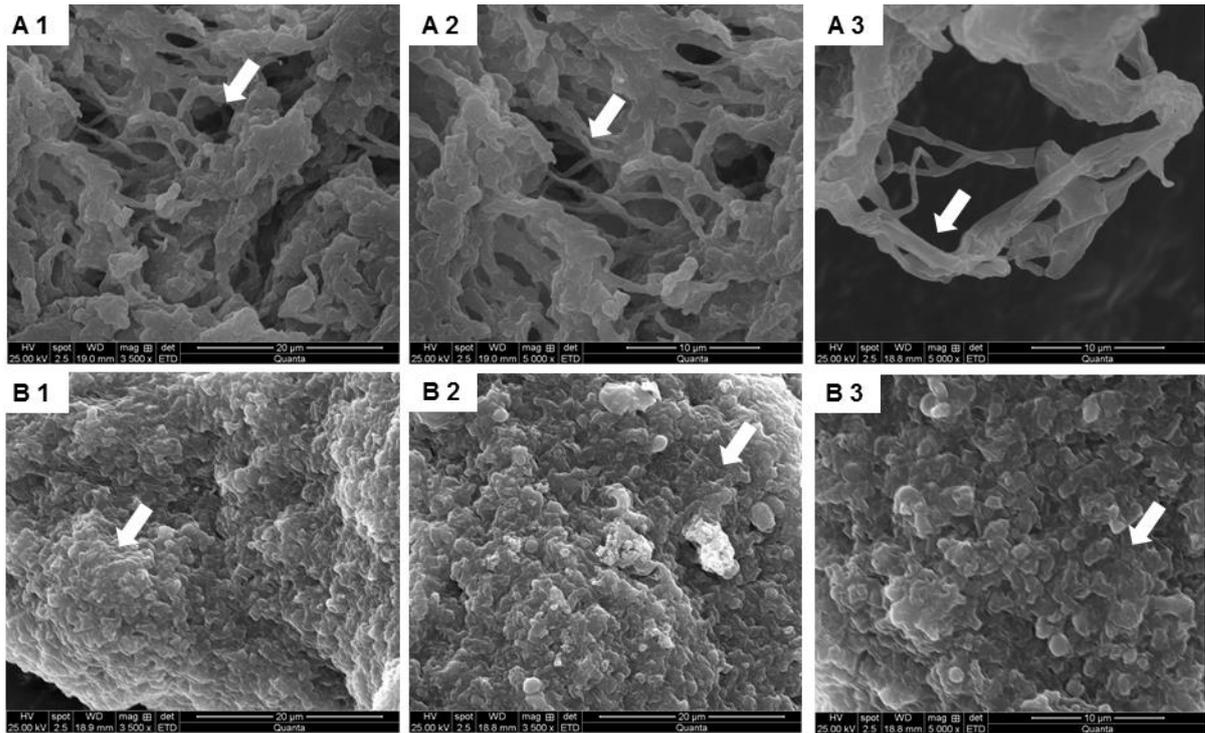


Figura 36: Eletromicrografias da espécie *M. gypseum* ATCC 14683. Células fúngicas expostas ao óleo essencial da *Pimenta pseudocaryophyllus* na concentração de 250 µg/mL (A) e na concentração de 1000 µg/mL (B). Setas indicando em (A) superfícies menos compactadas e hifas com regiões lisas e em (B) áreas totalmente compactadas. Magnitude: (A) x1.500, (B) x3.500 e (C) x5.000. Escala da barra: (A2, A3, B3) 10µm e (A1, B1, B2) 20µm.

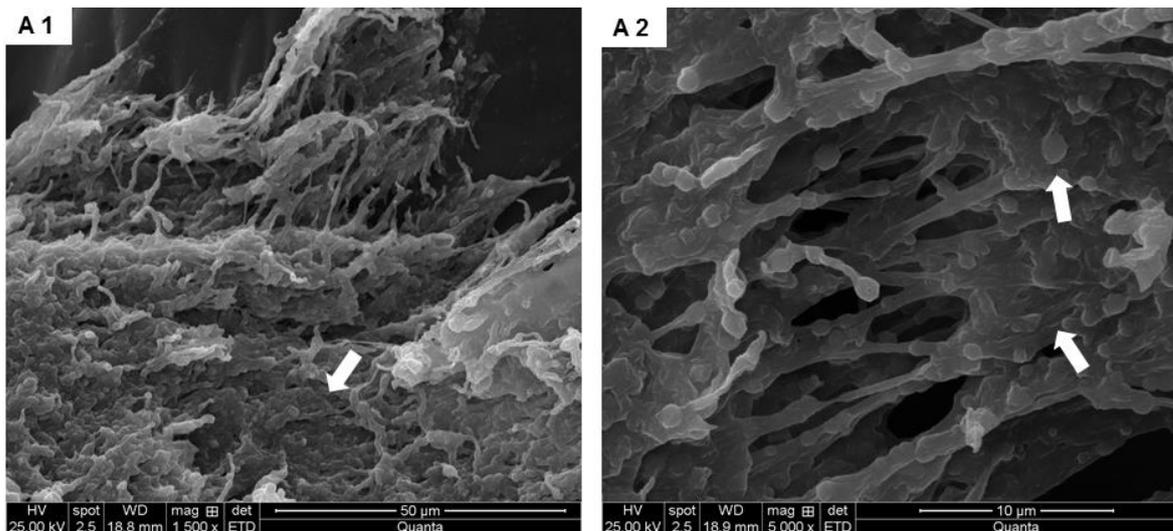


Figura 37: Eletromicrografias da espécie *M. gypseum* ATCC 14683. Células fúngicas expostas ao eugenol (1000 µg/mL). Setas indicando superfícies compactadas. Magnitude: (A1) x1.500 e (A2) x5.000. Escala da barra: (A1) 50µm e (A2) 10µm.

Quando exposto ao eugenol, o *M. gypseum* também sofre danos celulares visíveis, sendo o mais frequentemente observado, a superfície compacta em que as hifas se aglomeram, como demonstrado na Figura 37.

Nas regiões onde as hifas ainda aparecem mais espaçadas, como na Figura 38, é possível observar as mesmas retorcidas e enrugadas.

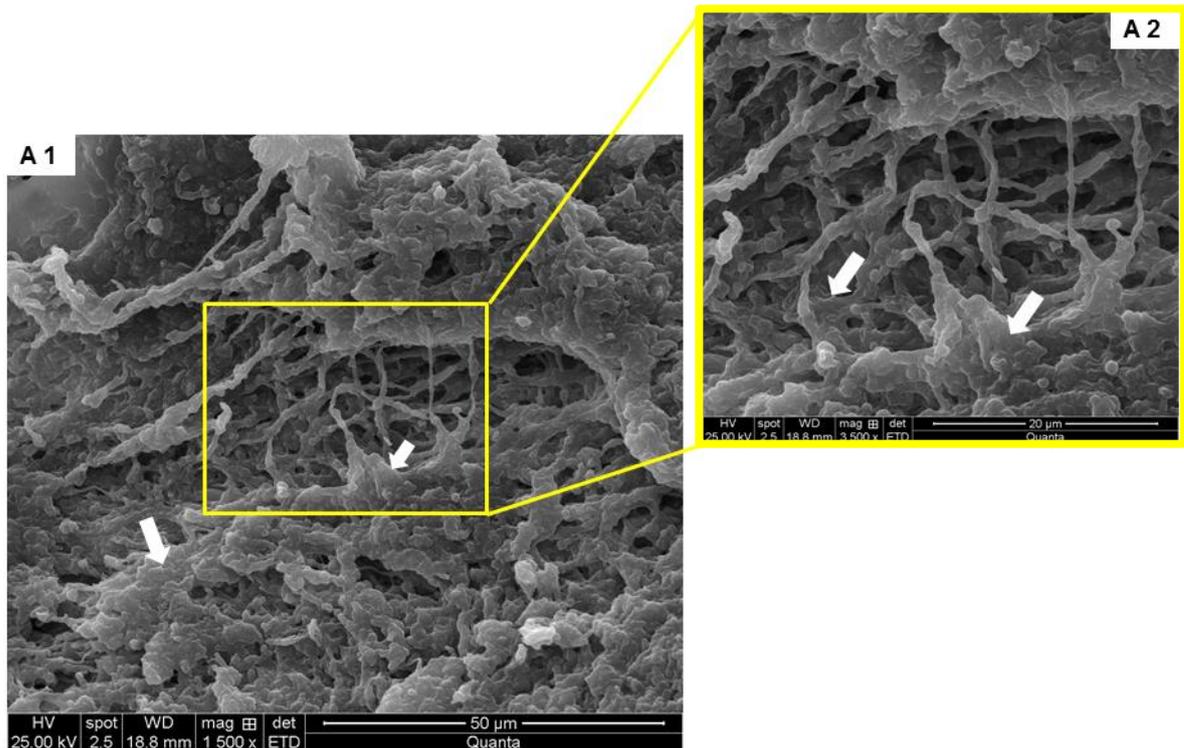


Figura 38: Eletromicrografias da espécie *M. gypseum* ATCC 14683. Células fúngicas expostas ao eugenol (1000 µg/mL) com zoom. Setas indicando superfícies compactadas. (A2): zoom de (A1). Magnitude: (A1) x1.500, (A2) x3.500. Escala da barra: (A1) 50µm e (A2) 20 µm.

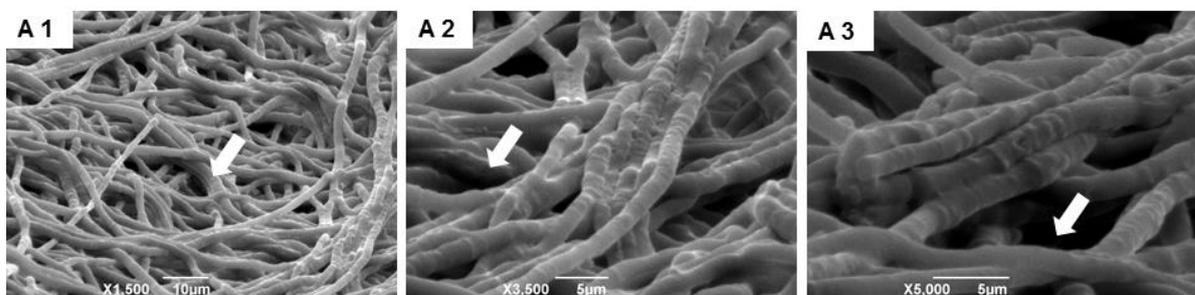


Figura 39: Eletromicrografias da espécie *M. gypseum* ATCC 14683. Células fúngicas expostas ao óleo essencial de *Eucalyptus smithii* (1000 µg/mL). Setas indicando superfícies íntegras das hifas com pequenas deformações. Magnitude: (A1) x1.500, (A2) x3.500 e (A3) x5.000. Escala da barra: (A1) 10µm e (A2, A3) 5 µm.

Na Figura 39 é possível observar o impacto do óleo do eucalipto na CIM sobre o *M. gypseum*. As alterações são mais sutis com aspecto semelhante à Figura 35.

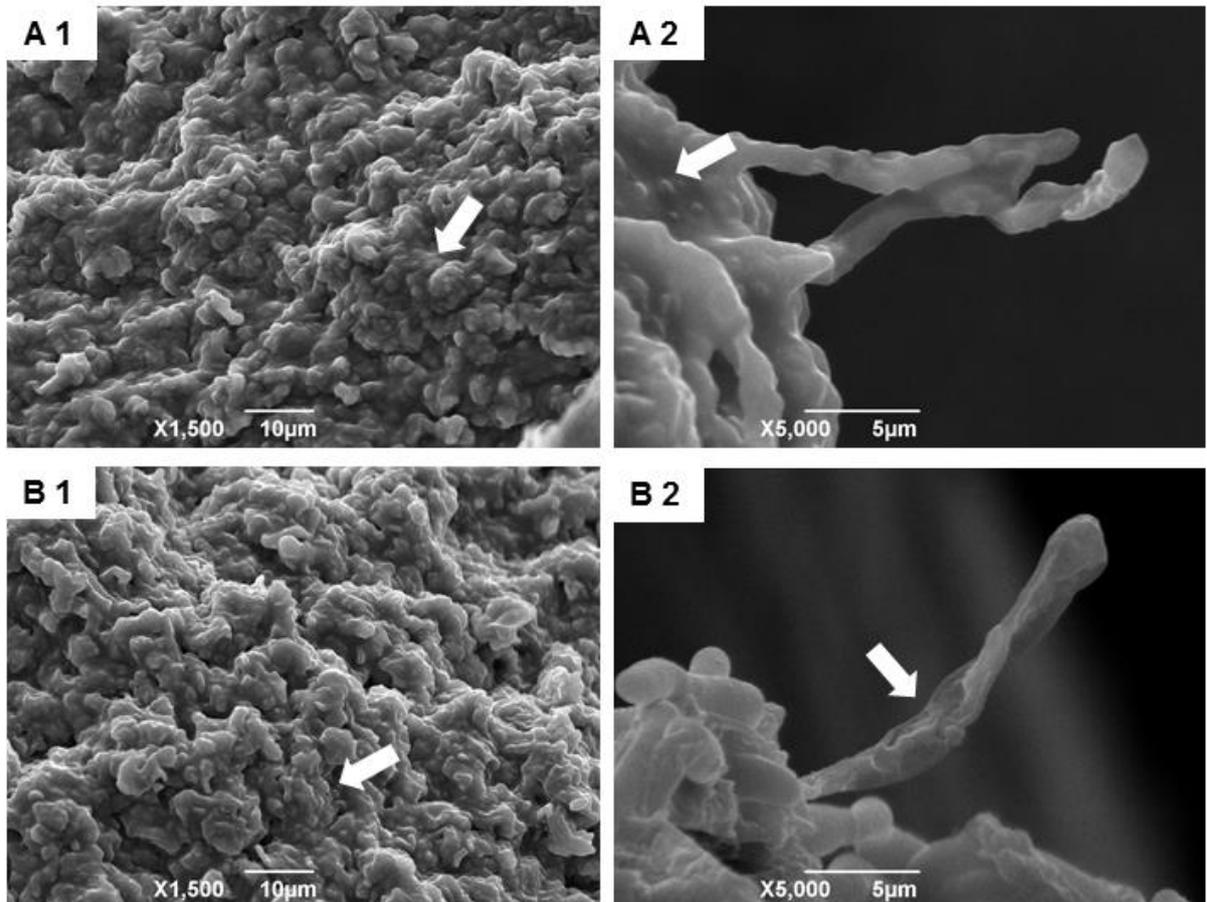


Figura 40: Eletromicrografias da espécie *M. gypseum* ATCC 14683. Células fúngicas expostas aos fármacos cetoconazol e terbinafina. Setas indicando deformações nas superfícies das hifas. Magnitude: (A1, B1) x1.500 e (A2, B2) x5.000. Escala da barra: (A1, B1) 10µm e (A2, B2) 5 µm.

Aspecto enrugado e danos aparentes nas hifas são alterações que podem ser identificadas na Figura 40 que demonstra a ação dos fármacos cetoconazol e terbinafina sobre o dermatófito em estudo.

As alterações foram similares em todos os fungos, apenas com diferentes intensidades. As células expostas aos fármacos e àquelas expostas às concentrações mais elevadas dos óleos apareceram mais desidratadas e mais

compactadas. As deformações mais comuns foram o agrupamento de hifas, sem a forma tubular original e a aparência de hifas secas e enrugadas.

Revisão da literatura sugere que tais observações são causadas pelo extravasamento do citoplasma da célula (GILLES *et al.*, 2010; INOUYE *et al.*, 2007). Assim, pode ser sugerido que os óleos essenciais estudados nesse trabalho podem modificar a permeabilidade das células fúngicas, conduzindo às várias alterações estruturais e bioquímicas e, eventualmente, até mesmo a morte celular.

Para tentar estabelecer o mecanismo de ação do citral, geraniol e nerol, Miron e colaboradores (2014) estabeleceram uma relação com o ergosterol. Nesse experimento, uma determinada quantidade de ergosterol foi adicionada no meio extracelular, pois caso houvesse afinidade do composto teste com o ergosterol, um complexo seria formado impedindo os componentes do óleo de interagir com a parede celular. Os resultados revelaram que existia uma interação entre os compostos testados e o ergosterol, pois ocorreu um aumento de 5x no valor do MIC, sendo assim, os pesquisadores concluíram que esse era, possivelmente, um dos mecanismos de ação.

Por meio da microscopia eletrônica de transmissão (MET) as estruturas intracelulares podem ser analisadas e, de acordo com as observações de Park e colaboradores (2009), após o contato com o óleo a parede celular do *T. mentagrophytes* apresentou-se com uma textura esfoliada e o citoplasma estava quase completamente desaparecido nas células cujas organelas estavam rompidas. Segundo os autores, as alterações constatadas por MEV e MET poderiam tornar a célula inviável.

Mas outros estudos são necessários, pois na literatura o eugenol é citado como um dos componentes de óleo essencial com capacidade de interferir no

bombeamento de prótons da cadeia respiratória, alterando a produção de ATP, o que poderia levar a inviabilidade celular (AHMAD *et al.*, 2010).

Diante das observações, pode-se concluir que tanto os óleos essenciais do craveiro e eucalipto como o eugenol causaram alterações da membrana celular. Porém, uma melhor compreensão da ação dessas substâncias é necessária para elucidar seus mecanismos antifúngicos.

5.6 Desenvolvimento e avaliação da formulação

Mesmo havendo comprovado eficácia frente aos dermatófitos testados, o óleo do craveiro precisa ser incorporado a uma formulação para que possa ser empregado no tratamento da dermatofitose animal.

Para se determinar a concentração de óleo a ser utilizada na formulação, foram considerados os resultados de CFM, assim como, dados de outros estudos semelhantes (CAMPANINI *et al.*, 2013; MARTINS; CORTEZ; FELIPE, 2008; PIRES; GONÇALVES, 2011).

Na formulação cosmética com óleo essencial de *Thymus vulgaris* os autores optaram por uma concentração de 4,5% (m/m) (PIRES; GONÇALVES, 2011). Martins, Cortez e Felipe (2008), empregando óleo essencial extraído do cravo-da-índia desenvolveram formulações com 2% (m/m) e Pereira e colaboradores (2009) incorporaram o óleo de *Melaleuca alternifolia* em formulações do tipo gel e loção nas concentrações de 10%, 15%, 20% e 25% (m/m). No presente estudo, a concentração escolhida foi 1% (m/m) o que corresponde 10 vezes a concentração estabelecida na CFM, embora os resultados *in vitro* para a formulação de 0,1% (m/m) também demonstraram eficácia.

A formulação desenvolvida foi um creme aniônico. Os componentes encontram-se descritos no Quadro 4, assim como a respectiva proporção para cada matéria-prima.

Quadro 4: Base da formulação de creme aniônico incorporado com óleo essencial do craveiro a 1% (m/m).

MATÉRIA-PRIMA	PROPORÇÃO (m/m)
Lanette N®	15%
Óleo Mineral	6,0%
Propilparabeno	0,1%
Hidroxitolueno Butilado (BHT – <i>sigla do inglês</i>)	0,05%
Propilenoglicol	5,0%
Metilparabeno	0,2%
EDTA dissódico	0,1%
Água purificada	q.s.p. 100%

Estudos testam diversos tipos de emulsionantes para se avaliar aquele que terá a maior compatibilidade e estabilidade com o ativo (CAMPANINI *et al.*, 2013; PIRES; GONÇALVES, 2011). Foram testadas formulações com o óleo do cravo-da-índia, de composição muito semelhante ao óleo do craveiro, e concluíram que os melhores resultados de compatibilidade e estabilidade foram com a base aniônica, a mesma base empregada no presente estudo (MARTINS; CORTEZ; FELIPE, 2008).

5.6.1. Determinação do pH

O pH do creme 1% (m/m) do óleo da *Pimenta pseudocaryophyllus* obtido a partir de uma solução aquosa a 10% (m/v) foi igual a 7,0.

No desenvolvimento de uma formulação, cada etapa deve ser muito bem projetada. A escolha do pH 7,0 para a formulação foi pensando no pH da pele normal do animal que varia entre 5,5 e 7,5 nos gatos e cães (SCOTT *et al.*, 2001b). O objetivo de uma boa formulação é que o seu pH mantenha-se constante durante todo o período de administração, pois dessa forma, evita-se reações indesejáveis da pele ao produto, como irritação e manifestação de prurido e vermelhidão (LEONARDI; GASPAR; CAMPOS, 2002).

5.6.2 Teste de centrifugação

A amostra de creme 1% (m/m) submetida à centrifugação por 3000 rpm durante 30 minutos apresentou-se estável, com aparência homogênea, sem formação aparente de fases.

Tal resultado é de suma importância, pois a aparência do produto é essencial e faz parte da qualidade final que se deseja alcançar. Sendo assim, a cor, o odor e a viscosidade devem ser agradáveis ao consumidor, nesse caso específico, não só ao animal, mas também deve atender a expectativa do proprietário que irá adquirir o produto no mercado.

5.6.3 Características organolépticas

Na avaliação organoléptica quanto aos parâmetros cor, odor e homogeneidade, o creme 1% (m/m) foi considerado de cor branca, com odor

predominante característico do óleo essencial da *Pimenta pseudocaryophyllus* e homogêneo.

5.6.4 Estudo de eficácia da formulação

Para demonstrar a eficácia da formulação frente aos dermatófitos testados foi realizado o método do fragmento e a microscopia eletrônica de varredura.

Todo esse cuidado é justificável, pois a formulação deve veicular o ativo, ou seja, tem a finalidade de conduzi-lo ao seu alvo específico. Para isso, não pode comprometer a eficácia do mesmo e, por se tratar apenas de uma base na qual será incorporado o fármaco, nesse caso o óleo, a mesma não deve ter atividade farmacológica, apenas farmacotécnica.

5.6.4.1 Método do fragmento

As Figuras 41, 42 e 43 são imagens capturadas das microplacas nas quais foram realizados repiques dos fungos *T. mentagrophytes* ATCC 11480, *M. canis* ATCC 32903 e *M. gypseum* ATCC 14683, respectivamente.

A atividade antifúngica da formulação pode ser comprovada para os três dermatófitos, pois não houve crescimento fúngico nos poços contendo o creme adicionado de óleo essencial a 1% (m/m) – concentração escolhida para o desenvolvimento da formulação.

No teste com o creme a 0,1% (m/m) – valor encontrado na CFM, a eficácia também foi comprovada a partir do não crescimento fúngico. Do contrário, quando utilizado somente a base do creme (placebo), o fragmento do fungo colocado no

centro da placa cresceu da mesma forma do controle positivo, mostrando que o placebo não possui atividade antifúngica. Também foi realizado um controle com o óleo a 1% (v/v), além dos controles positivo e negativo do experimento, sendo todos os resultados satisfatórios.

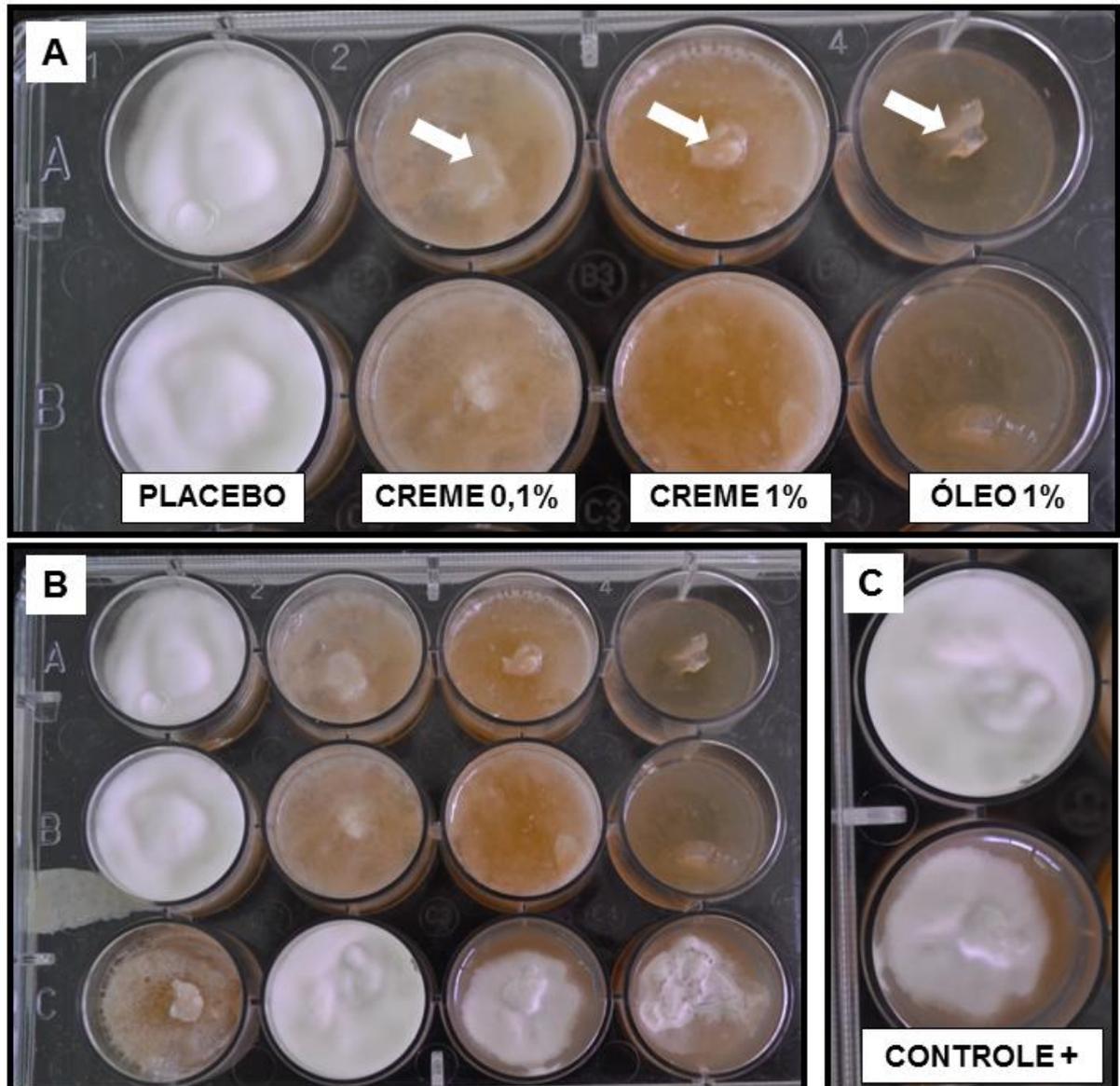


Figura 41: Comprovação da atividade antifúngica da formulação contendo óleo do craveiro sobre o *T. mentagrophytes* ATCC 11480. (A) Placebo – formulação sem a adição do óleo essencial. Formulação contendo 0,1% (m/m) do óleo essencial - concentração inibitória mínima. Formulação contendo 1% (m/m) do óleo essencial. Óleo essencial na concentração de 1% (v/v), a mesma utilizada na formulação. Setas indicando o fragmento do fungo. (B) imagem geral da placa, última fileira de controles. (C) zoom dos poços de controle positivo.

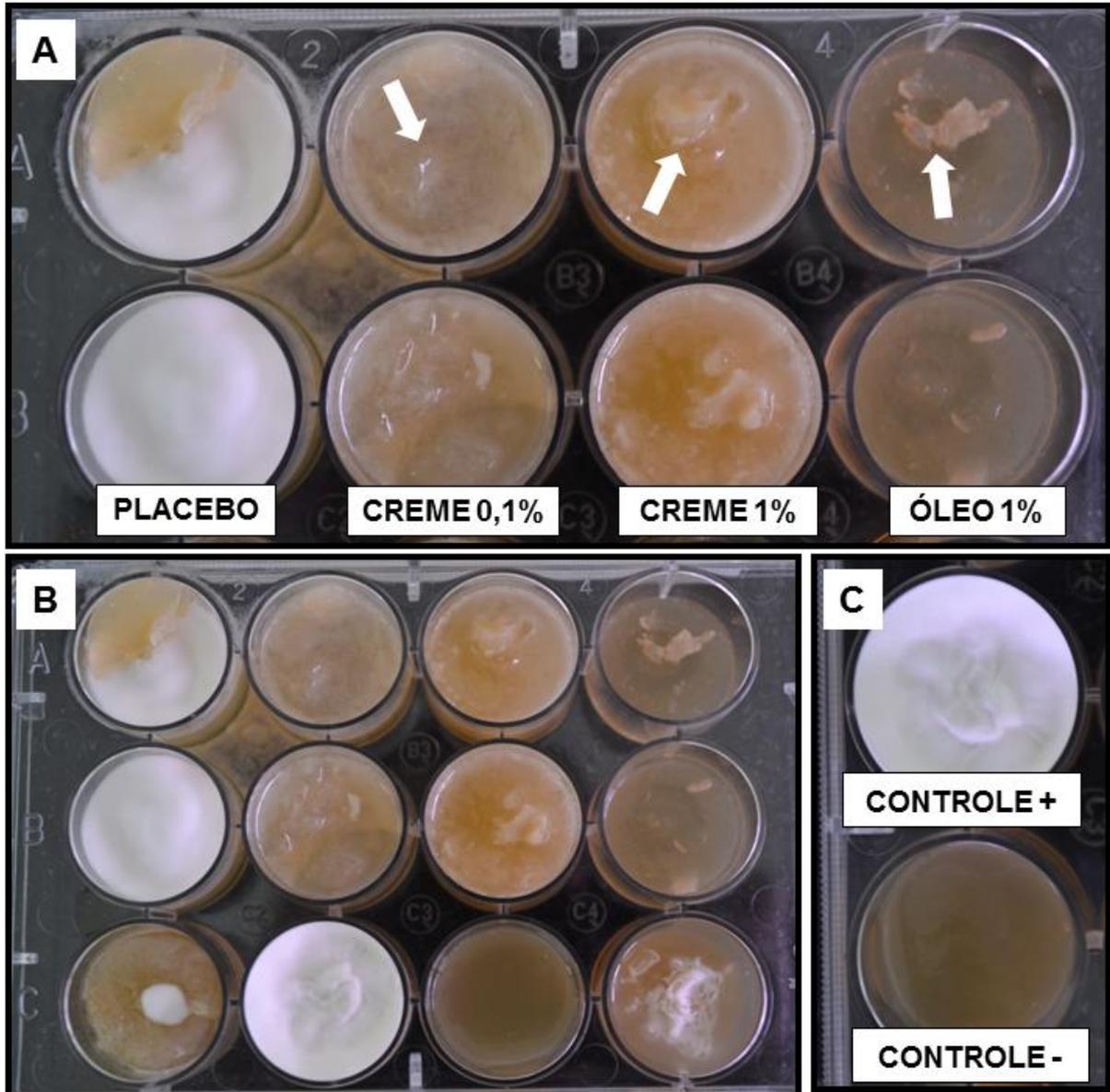


Figura 42: Comprovação da atividade antifúngica da formulação contendo óleo do craveiro sobre o *M. canis* ATCC 32903. (A) Placebo – formulação sem a adição do óleo essencial. Formulação contendo 0,1% (m/m) do óleo essencial. Formulação contendo 1% do óleo essencial (m/m). Óleo essencial na concentração de 1% (v/v), a mesma utilizada na formulação. Setas indicando o fragmento do fungo. (B) imagem geral da placa, última fileira de controles. (C) zoom dos poços de controle positivo e controle negativo.

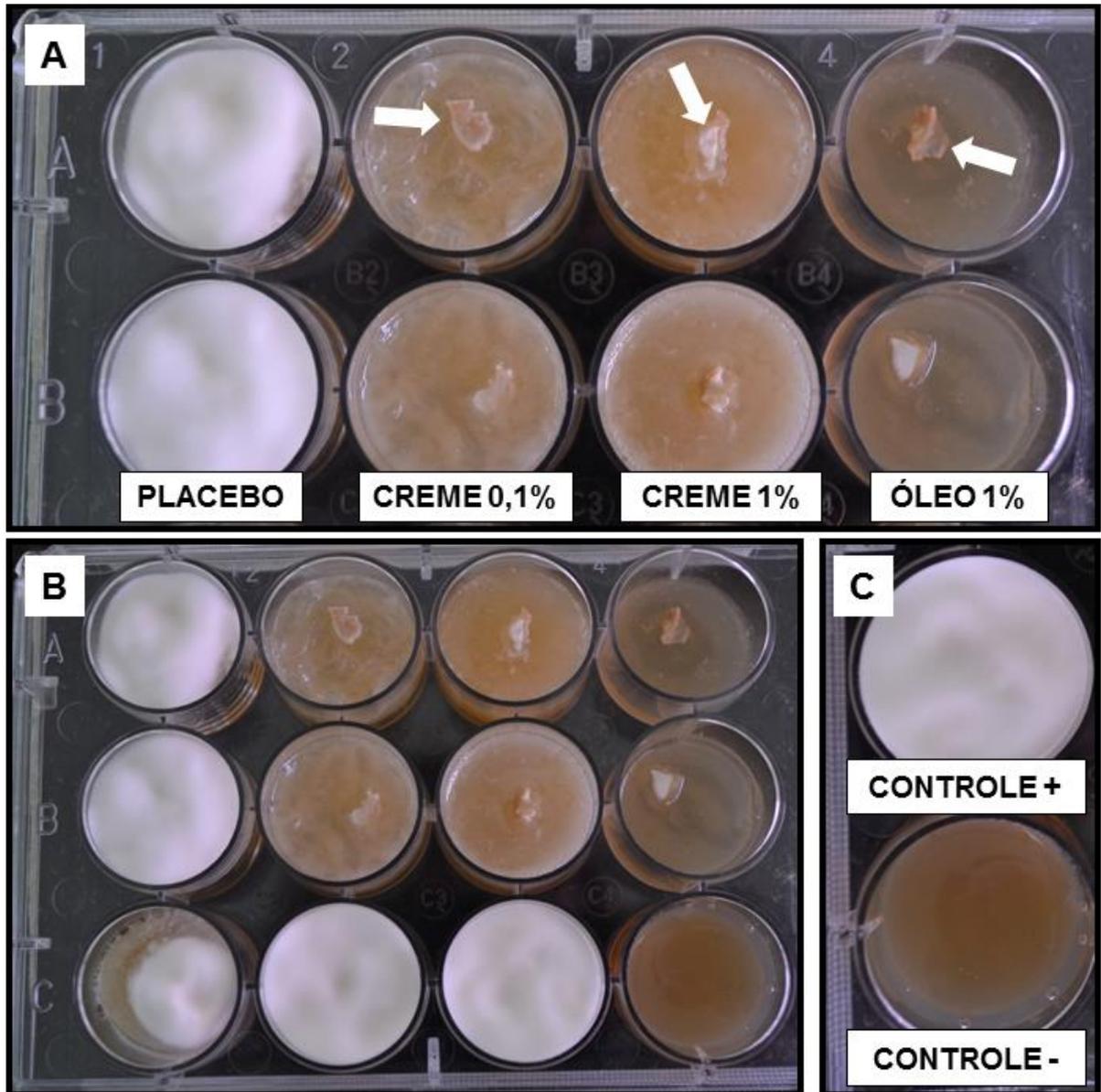


Figura 43: Comprovação da atividade antifúngica da formulação contendo óleo do craveiro sobre o *M. gypseum* ATCC 14683. (A) Placebo – formulação sem a adição do óleo essencial. Formulação contendo 0,1% (m/m) do óleo essencial - concentração inibitória mínima. Formulação contendo 1% (m/m) do óleo essencial. Óleo essencial na concentração de 1% (v/v), a mesma utilizada na formulação. Setas indicando o fragmento do fungo. (B) imagem geral da placa, última fileira de controles. (C) zoom dos poços de controle positivo e controle negativo.

5.6.4.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

As eletromicrografias realizadas para os dermatófitos com as formulações, o placebo e os controles demonstraram tanto a eficácia da formulação como o fato dela provocar nas células fúngicas os mesmos efeitos observados no óleo sozinho, sugerindo que o mecanismo de ação do óleo sobre os dermatófitos continuou o mesmo.

Nas imagens, descritas nas Figuras 44 (*T. mentagrophytes* ATCC 11480), 45 (*M. canis* ATCC 32903) e 46 (*M. gypseum* ATCC 14683), fica evidente que apenas as células que entraram em contato com o óleo do craveiro foram afetadas pela ação do mesmo.

As observações mais evidentes para os fungos expostos são as hifas rompidas e agregadas, deixando um aspecto de “massa compacta”.

Apesar da alta densidade fúngica apresentada nas imagens, é possível observar para os três dermatófitos que apenas as letras (A) e (B), correspondentes aos fungos não expostos a nenhuma substância com característica antifúngica, apresentam maior espaçamento entre as hifas, diferindo das demais imagens correspondentes às células que foram expostas ao óleo diretamente ou indiretamente através da formulação. Em (B), na Figura 45, é possível detectar macroconídeos íntegros, estrutura reprodutiva em abundância nas espécies de *M. canis*.

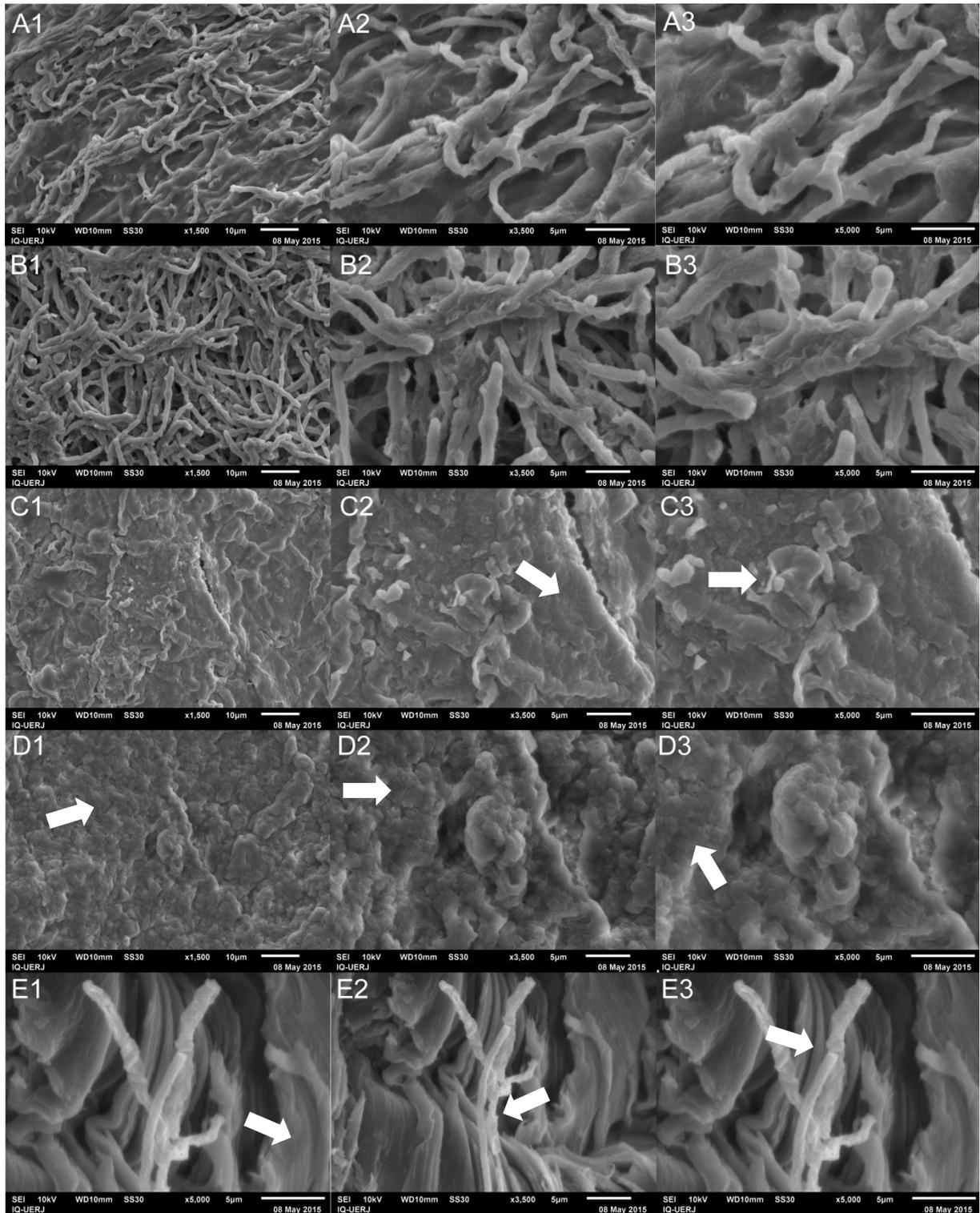


Figura 44: Eletromicrografias da espécie *T. mentagrophytes* ATCC 11480 –. (A) Células não expostas às substâncias pesquisadas. (B) Fungo exposto ao placebo. (C) Fungo exposto ao creme com 0,1% (v/m) do óleo essencial. (D) Fungo exposto ao creme com 1% (v/m) do óleo essencial. (E) Fungo exposto diretamente ao óleo na concentração de 1% (v/v). (A): aspecto íntegro das hifas. (B): Hifas preservadas e semelhantes às imagens sem tratamento. (C), (D) e (E): Setas indicando hifas compactadas e enrugadas. Magnitude: (1) x1.500, (2) x3.500 e (3) x5.000. Escala da barra: (1) 10 μ m e (2 e 3) 5 μ m.

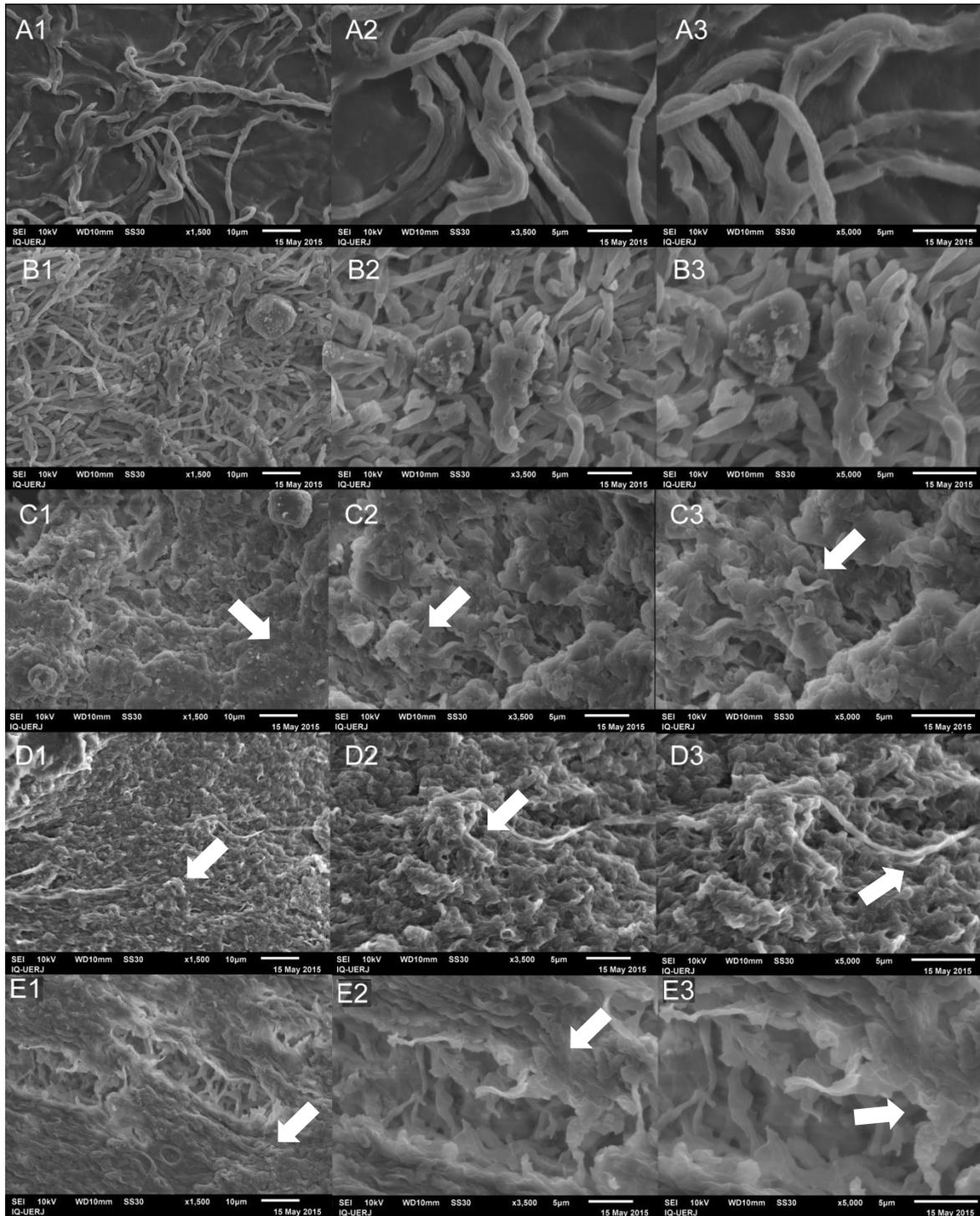


Figura 45: Eletromicrografias da espécie *M. canis* ATCC 32903. (A) Células não expostas às substâncias pesquisadas. (B) Fungo exposto ao placebo. (C) Fungo exposto ao creme com 0,1% (v/m) do óleo essencial. (D) Fungo exposto ao creme com 1% (v/m) do óleo essencial. (E) Fungo exposto diretamente ao óleo na concentração de 1% (v/v). (A): aspecto íntegro das hifas. (B): Hifas e macroconídeos preservados e semelhantes às imagens sem tratamento. (C), (D) e (E): Setas indicando hifas compactadas e enrugadas e macroconídeos distorcidos. Magnitude: (1) x1.500, (2) x3.500 e (3) x5.000. Escala da barra: (1) 10µm e (2 e 3) 5µm.

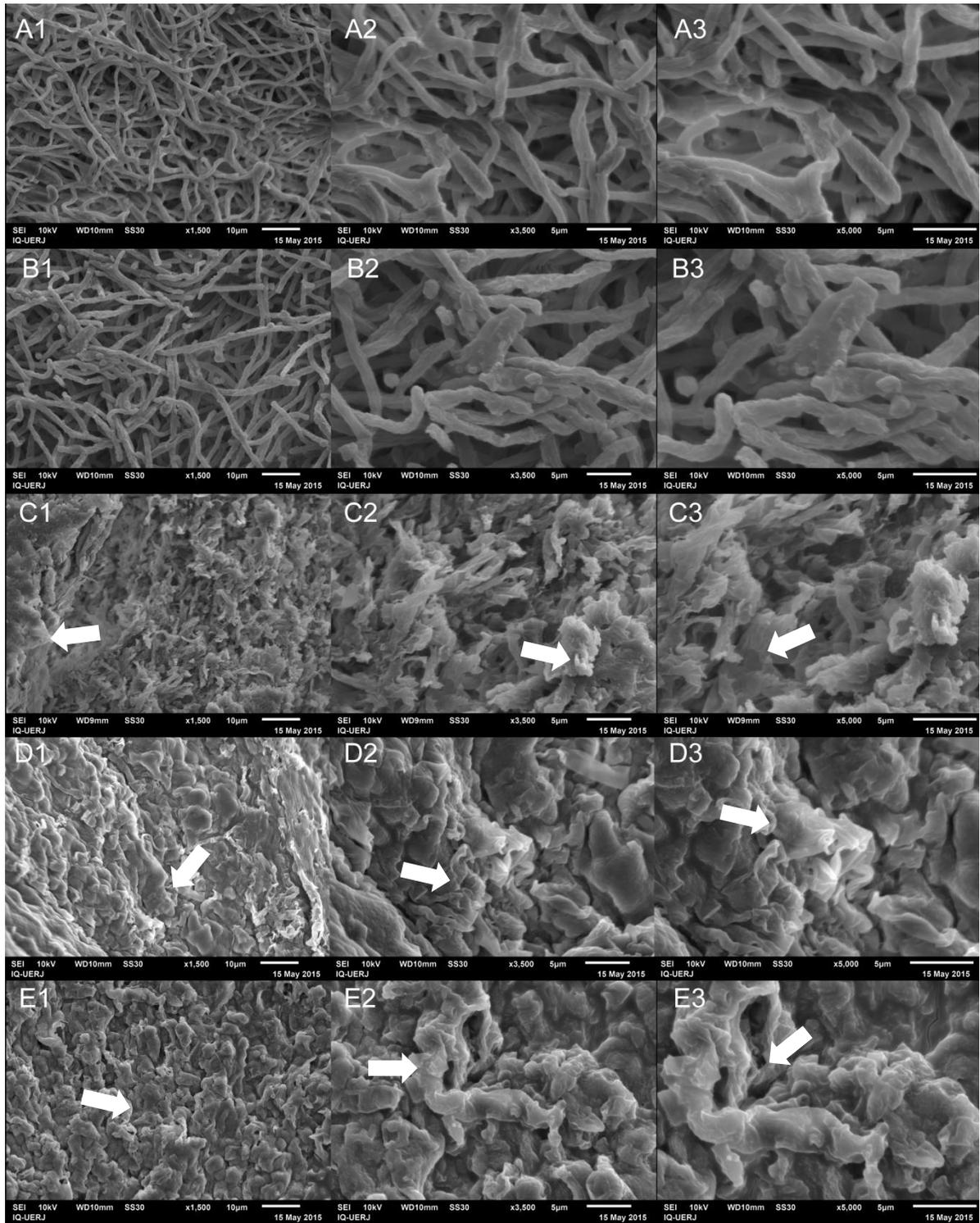


Figura 46: Eletromicrografias da espécie *M. gypseum* ATCC 14683. (A) Células não expostas às substâncias pesquisadas. (B) Fungo exposto ao placebo. (C) Fungo exposto ao creme com 0,1% (v/m) do óleo essencial. (D) Fungo exposto ao creme com 1% (v/m) do óleo essencial. (E) Fungo exposto diretamente ao óleo na concentração de 1% (v/v). Magnitude: (1) x1.500, (2) x3.500 e (3) x5.000. (A): Aspecto íntegro das hifas. (B): Hifas e macroconídeos preservados e semelhantes às imagens sem tratamento. (C), (D) e (E): Setas indicando hifas compactadas e enrugadas e macroconídeos distorcidos. Escala da barra: (1) 10 μ m e (2 e 3) 5 μ m.

Porém, além da eficácia, para que se tenha uma formulação apta ao uso, a segurança também deve ser comprovada. Embora, o presente estudo não tenha realizado testes de toxicidade, Esteves-Pedro e colaboradores (2013) avaliaram a segurança dos óleos essenciais da *Pimenta pseudocaryophyllus* quanto à citotoxicidade, fototoxicidade e micronúcleo *in vitro*. Para as análises de citotoxicidade e fototoxicidade foi utilizada a linhagem celular BALB/c 3T3 derivada de fibroblastos de camundongos (ATCC CCL 163) e para o ensaio de micronúcleo *in vitro* foi empregada a linhagem celular CHO-K1 (ATCC CCL-61) de células do ovário de hamster chinês (ATCC, 2013b). Os autores concluíram que na concentração de 0,04 mg/mL do óleo essencial houve viabilidade de 90% para as células Balb/c 3T3, não sendo considerado citotóxico. Da mesma forma, o óleo também não foi considerado fototóxico ou genotóxico na concentração de 0,1 mg/mL.

5.6.5 Estudo de estabilidade

Uma vez comprovada a eficácia e a segurança, deve-se considerar que o tratamento de uma dermatofitose prosseguirá até o desaparecimento e cura da doença. Além do mais, a formulação deverá ser produzida dentro das boas práticas de fabricação por farmácias ou indústrias farmacêuticas seguida de registro devido. Logo, tal produto deve assegurar todas as suas características organolépticas e farmacológicas durante o seu uso. Sendo assim, foi necessária a realização do estudo de estabilidade, que no caso, por se tratar de um produto de uso veterinário seguiu a Instrução Normativa nº 15 de 09 de maio de 2005.

Garantir a qualidade durante o uso é provar através do estudo de estabilidade que mesmo em condições aceleradas, as características organolépticas serão

mantidas podendo o prazo de validade ser de 24 meses aos produtos cuja degradação for igual ou menor que 5% (BRASIL, 2005b).

Dessa forma, a estabilidade da formulação foi avaliada pelo acompanhamento das características físico-químicas das amostras deixadas em câmara climática com condições controladas por 90 dias e por análise térmica sob condições que poderiam acelerar os processos de degradação, principalmente, reações de decomposição por hidrólise e oxidação.

Um dos parâmetros avaliados foi o pH do creme 1% (m/m) do óleo da *Pimenta pseudocaryophyllus* obtido a partir de uma solução aquosa a 10% (m/v), assim como encontrado para o tempo 0 (antes de ser colocado na câmara) o resultado foi igual a 7,0 durante os 3 meses de estudo.

A amostra de creme 1% (m/m) submetida à centrifugação por 3000 rpm durante 30 minutos apresentou-se estável, com aparência homogênea, sem formação aparente de fases, como pode ser observado na Figura 47.

Na avaliação organoléptica quanto aos parâmetros cor e odor, o creme 1% (m/m) permaneceu com cor branca, como demonstrado na Figura 48, porém o odor predominante característico do óleo essencial da *Pimenta pseudocaryophyllus*, apesar de inalterado, tornou-se menos intenso do que no tempo 0, tal observação aplica-se também às amostras que permaneceram em temperatura ambiente e nas refrigeradas.

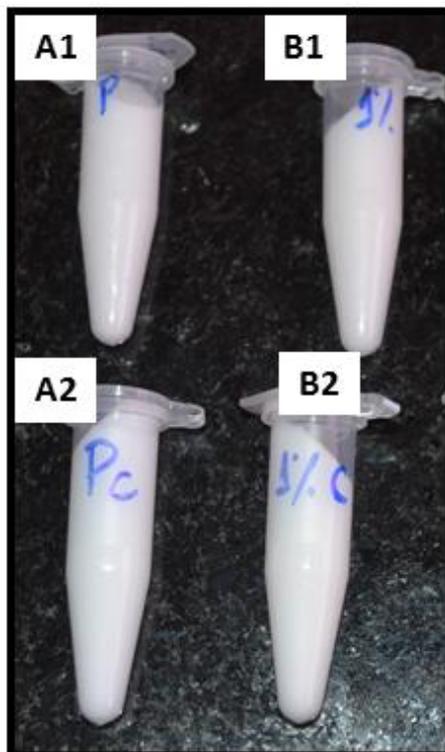


Figura 47: Amostras submetidas ao teste de centrifugação. (A) Placebo e (B) Creme com 1% (m/m) do óleo essencial. (2) Amostras mantidas em temperatura ambiente utilizadas como controles para o teste.

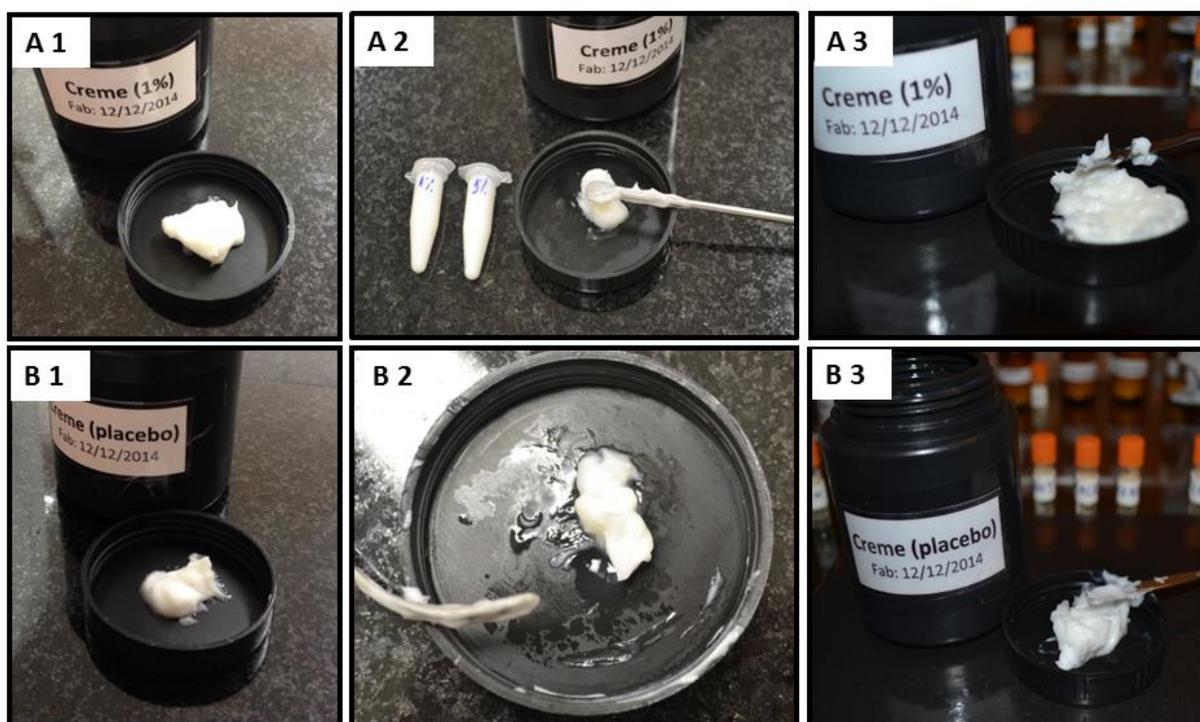


Figura 48: Avaliação organoléptica quanto ao parâmetro cor. (A) Creme com 1% (v/m) do óleo essencial e (B) Placebo. (1) Tempo 0, (2) Durante o estudo de estabilidade e (3) Final do o estudo de estabilidade.

Na Figura 49, pode-se observar uma mudança na coloração dos óleos, ambos escureceram ao longo do teste. Uma pequena redução no volume dos mesmos também pode ser notada. A perda de volume, possivelmente, é devido à volatilização e o escurecimento, pode ser consequência de reações de oxidação. Um dos fatores que pode justificar o não escurecimento na amostra do creme 1% (m/m) é o fato de que na formulação foi adicionada a substância BHT que possui ação antioxidante.

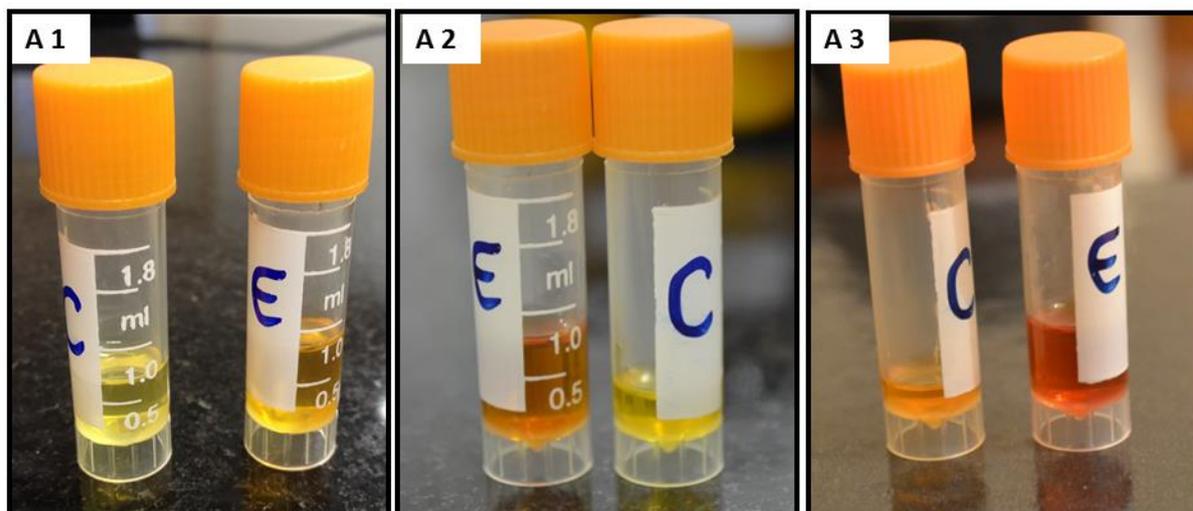


Figura 49: Avaliação organoléptica quanto ao parâmetro cor para o óleo essencial do craveiro – representado pela letra C no frasco e Eugenol, representado pela letra E no frasco. (1) Tempo 0 (2) durante o estudo de estabilidade e (3) no final do estudo de estabilidade.

Na pesquisa conduzida por Pires e Gonçalves (2011) testando diferentes formulações cosméticas com óleo essencial de *Thymus vulgaris*, a amostra mantida à temperatura de 4 °C por 50 dias comportou-se de forma semelhante a amostra do presente estudo, mantendo as características iniciais com odor característico reduzido. Mas, a amostra mantida a 40 °C apresentou escurecimento e odor intensificado.

5.6.5.1 Perfil cromatográfico da formulação, do óleo essencial do craveiro e eugenol pós-estudo de estabilidade

Nas Figuras de 50 a 56, encontram-se os cromatogramas obtidos por CG-AR para o óleo essencial do craveiro e a formulação pós-estabilidade, assim como os controles.

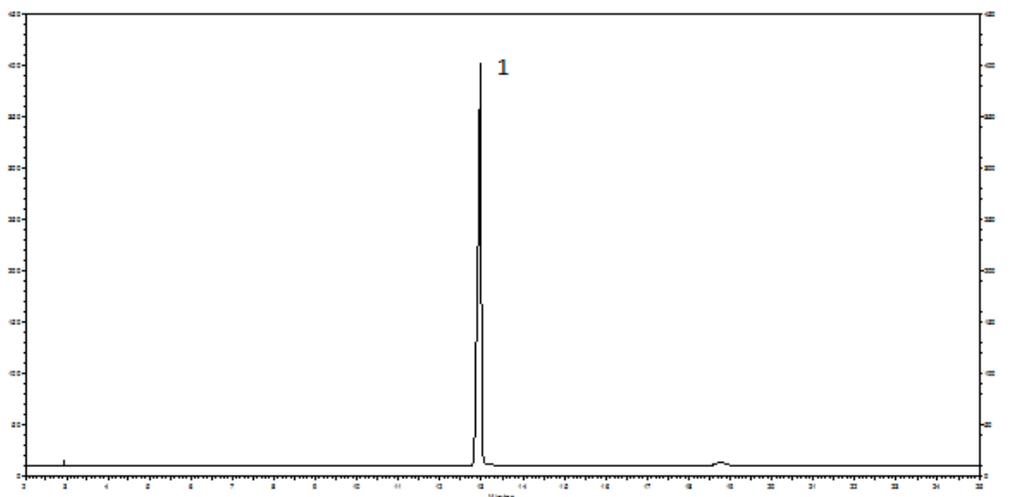


Figura 50: Cromatograma do Eugenol Padrão obtido por CG-AR. (1) Eugenol. Picos menores que 0,1% não foram demonstrados.

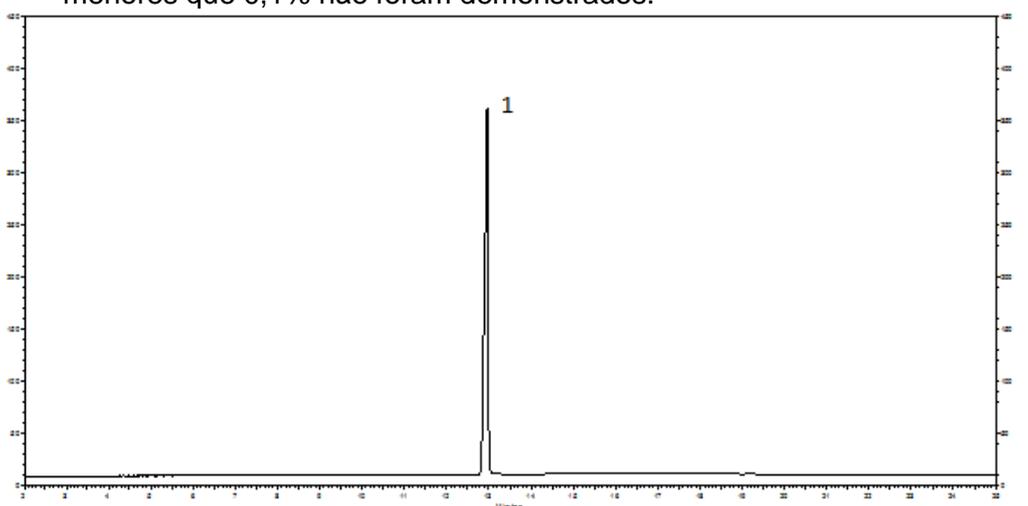


Figura 51: Cromatograma Eugenol pós-estudo de estabilidade obtido por CG-AR. (1) Eugenol. Picos menores que 0,1% não foram demonstrados.

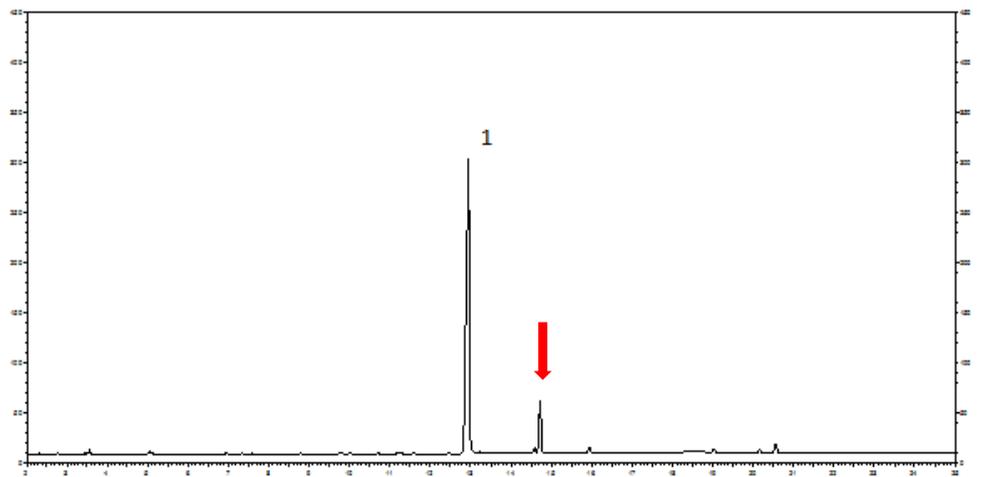


Figura 52: Cromatograma do óleo essencial da *Pimenta pseudocaryophyllus* (controle) obtido por CG-AR. (1) Eugenol.

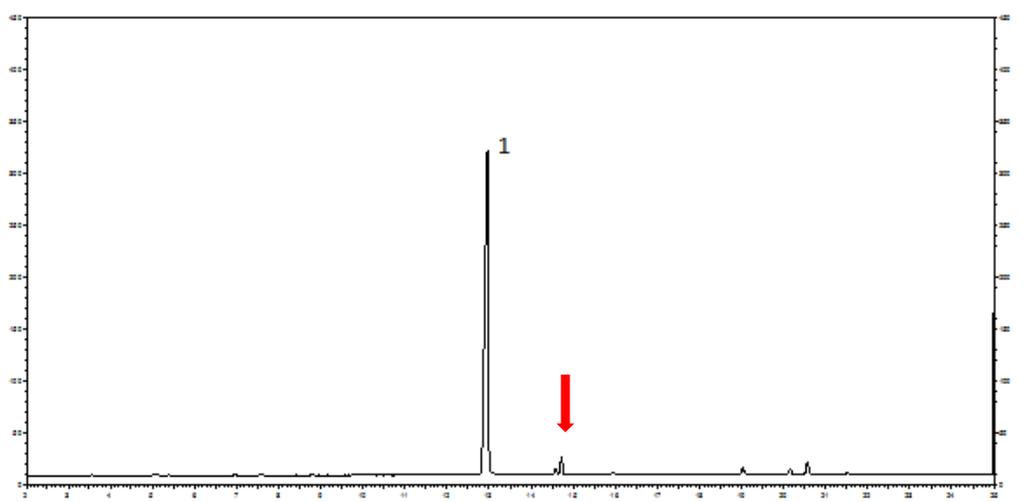


Figura 53: Cromatograma do óleo essencial da *Pimenta pseudocaryophyllus* obtido por CG-AR pós-estabilidade. (1) Eugenol.

Nas Figuras 52 e 53 é possível observar que a intensidade dos picos atribuídos ao eugenol são semelhantes, ou seja, não houve perda de eugenol quando comparado ao seu controle, porém é possível verificar que, de acordo com o cromatograma, o pico ao lado daquele identificado como eugenol teve sua área diminuída. Dessa forma, pode-se concluir que as observações aparentes do óleo do craveiro após o estudo de estabilidade podem ser em função da degradação desse componente.

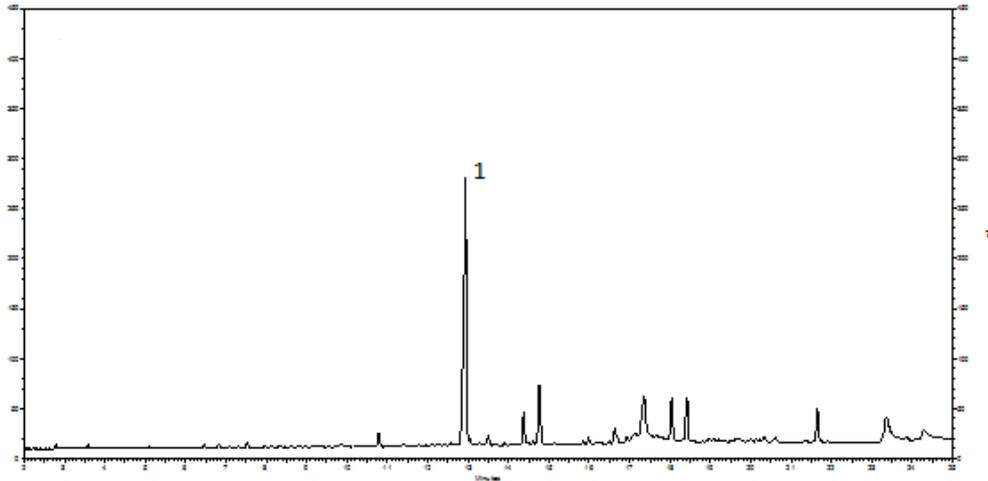


Figura 54: Cromatograma do Creme 1% (m/m) controle por CG-AR. (1) Eugenol.

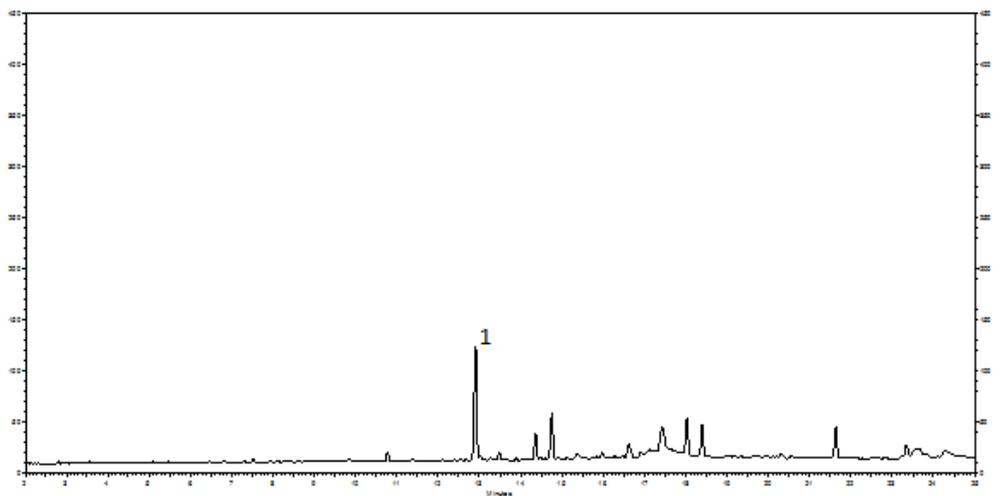


Figura 55: Cromatograma do Creme 1% (m/m) por CG-AR pós-estabilidade. (1) Eugenol.

Comparando as Figuras 54 e 55, é possível observar que houve uma diminuição considerável no pico atribuído ao eugenol na amostra de creme 1% (m/m) pós-estabilidade.

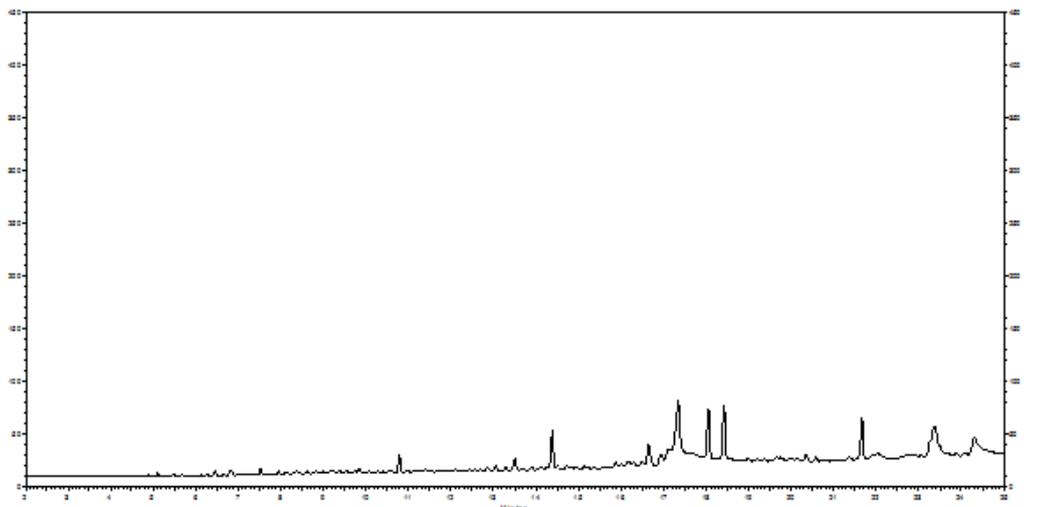


Figura 56: Cromatograma do Placebo (Controle) por CG-AR.

Na Figura 56 é possível observar que não foi identificado eugenol na amostra, uma vez que, no placebo não foi incorporado o óleo essencial.

Na Tabela 5 é possível comparar todas as amostras estudadas por CG-Ar em termos de concentração de eugenol.

Tabela 5: Porcentagem de Eugenol das amostras obtida por CG-AR.

Amostra	Teor de Eugenol (%)
Eugenol Controle	99,9
Eugenol Pós-estabilidade	86,8
Óleo essencial do Craveiro	66,9
Óleo essencial do Craveiro Pós-estabilidade	73,2
Creme 1% (m/m) Controle	0,6
Creme 1% (m/m) Pós-estabilidade	0,2
Placebo (Controle)	0,0

De acordo com os resultados de CG, o padrão eugenol sofreu uma perda de 13,1% após o estudo de estabilidade, porém não foi evidenciada nenhuma perda de eugenol no óleo essencial do craveiro pós-estabilidade. Para o creme 1% (m/m) pós-estabilidade a concentração determinada na CG de eugenol representou 1/3 da concentração do creme controle. Tal perda pode justificar a diminuição do odor característico do óleo do craveiro no creme 1% (m/m) pós-estabilidade.

A perda de eugenol que ocorreu no padrão após o estudo de estabilidade, pode estar relacionada às observações relativas ao escurecimento e diminuição do volume, descritas anteriormente.

Olmedo, Asensio e Grosso (2015) avaliando a atividade antioxidante e a estabilidade térmica de óleos essenciais de plantas cultivadas na Argentina observaram que o percentual de eugenol do óleo essencial do louro após 28 dias aumentou de 0,9% para 2,3% e o 1,8-cineol passou de 32,3% para 52,0% enquanto o linalol e o acetato de terpineol diminuíram de 11,7 % para 5,6% e de 13,2% para 12,6%, respectivamente. No óleo essencial do alecrim, o β -cariofileno diminuiu de 2,3% para 1,1% e o 1,8-cineol e a cânfora aumentaram os seus percentuais de 16,6% para 21,8% e de 12,7% para 18,7% após 28 dias, respectivamente. Logo, pode-se verificar que o aumento de um dos componentes em termos percentuais deve-se à diminuição de outro componente, assim como observado no presente estudo.

Portanto, os resultados encontrados no estudo cromatográfico são condizentes com o estudo organoléptico da formulação.

5.6.5.2 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

Com objetivo de avaliar a estabilidade da formulação através de possíveis mudanças químicas, foi realizado um estudo por espectroscopia vibracional na região do infravermelho de amostras do creme 1% (m/m) e do placebo antes e depois do estudo de estabilidade. O resultado encontra-se na Figura 57.

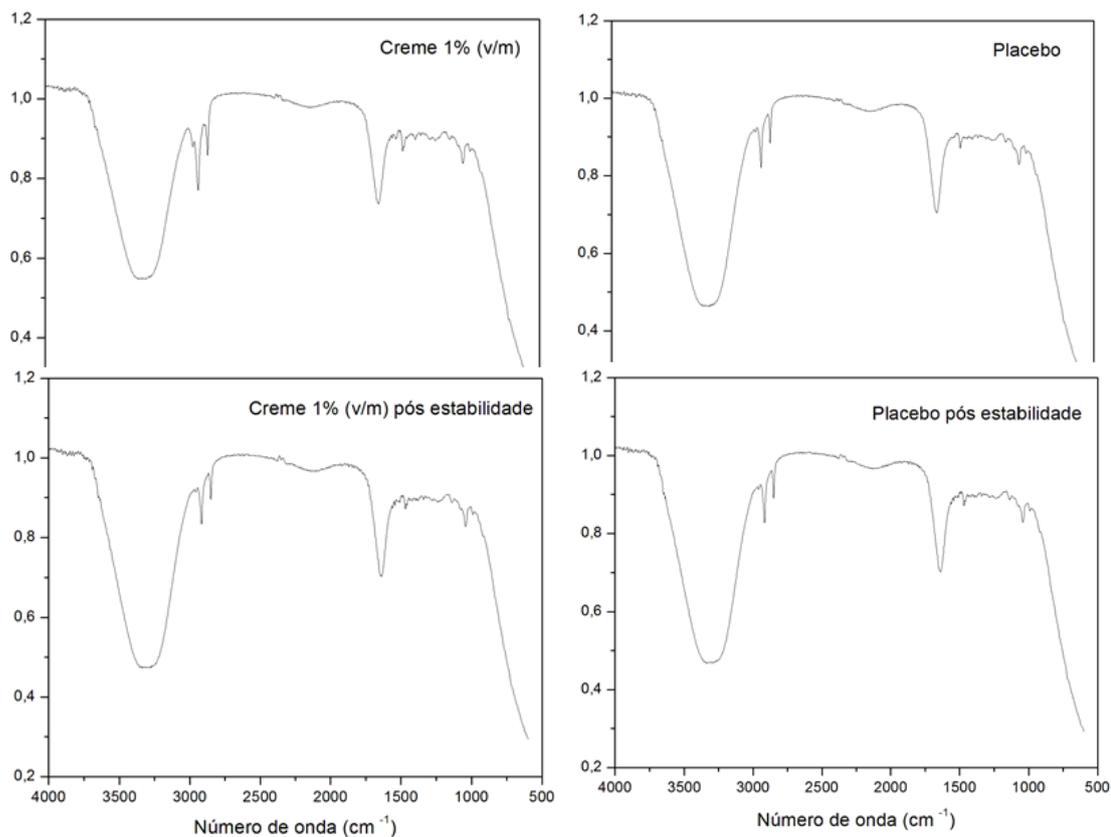


Figura 57: Espectros de absorção na região do infravermelho do creme 1% (m/m) e placebo antes e depois do estudo da estabilidade.

Todos os quatro espectros são muito semelhantes, apresentando bandas de absorção em regiões de mesma frequência.

5.6.6 Estudo por análise térmica

5.6.6.1 Estudo da formulação por calorimetria exploratória diferencial (*Differential scanning calorimeter* - DSC- sigla do inglês)

Buscando avaliar a qualidade da formulação em menor tempo, as técnicas termoanalíticas têm sido amplamente empregadas no desenvolvimento farmacotécnico (LIMA *et al.*, 2015; VIEIRA *et al.*, 2014; YOSHIDA, *et al.*, 2011).

Sendo assim, com o objetivo de avaliar a estabilidade térmica e possíveis incompatibilidades entre o ativo e excipientes, o presente trabalho submeteu a formulação e todos os excipientes ao estudo de análise térmica por DSC e, para completar as informações, foi realizado um estudo de análise termogravimétrica para o creme 1% (m/m) pós-estabilidade, do seu controle, das amostras de placebo e do óleo essencial do craveiro.

Uma observação comum a todas as curvas de DSC foi que todos os eventos visualizados foram endotérmicos. De acordo com a literatura, eventos endotérmicos podem significar processos de decomposição que foram iniciados com absorção de energia para o rompimento de ligações químicas ou volatilização do componente químico. No caso de picos endotérmicos estreitos, os mesmos são, normalmente, atribuídos a ponto de fusão e ebulição (MATOS; MERCURI; BARROS, 2009).

Na Figura 58, é possível comparar as curvas de DSC entre o creme 1% (m/m), placebo, eugenol e óleo do craveiro. A curva DSC do creme 1% (m/m) apresentou dois eventos endotérmicos com picos centrados em 94,6 °C e 110,7 °C. Na curva DSC do placebo, pode-se identificar 4 eventos endotérmicos principais com picos centrados em 61,2 °C, 106,1 °C, 132,1°C e 137,48°C.

No caso do eugenol, o evento endotérmico em 281,2 °C pode ser atribuído ao seu ponto de ebulição. Em estudo realizado com o óleo essencial da pimenta da Jamaica, o qual apresentou 77% de eugenol, um evento endotérmico em 256 °C para o óleo na curva de DSC foi atribuído à ebulição do eugenol. De acordo com os autores, o ponto de ebulição quando detectado pela DSC através do uso de cadinho furado pode diferir daquele encontrado na literatura (MONTEIRO *et al.*, 2011). Tal fato pode justificar o ponto de ebulição encontrado para o eugenol no presente estudo, já que o valor determinado pelo fabricante do produto é de 254 °C.

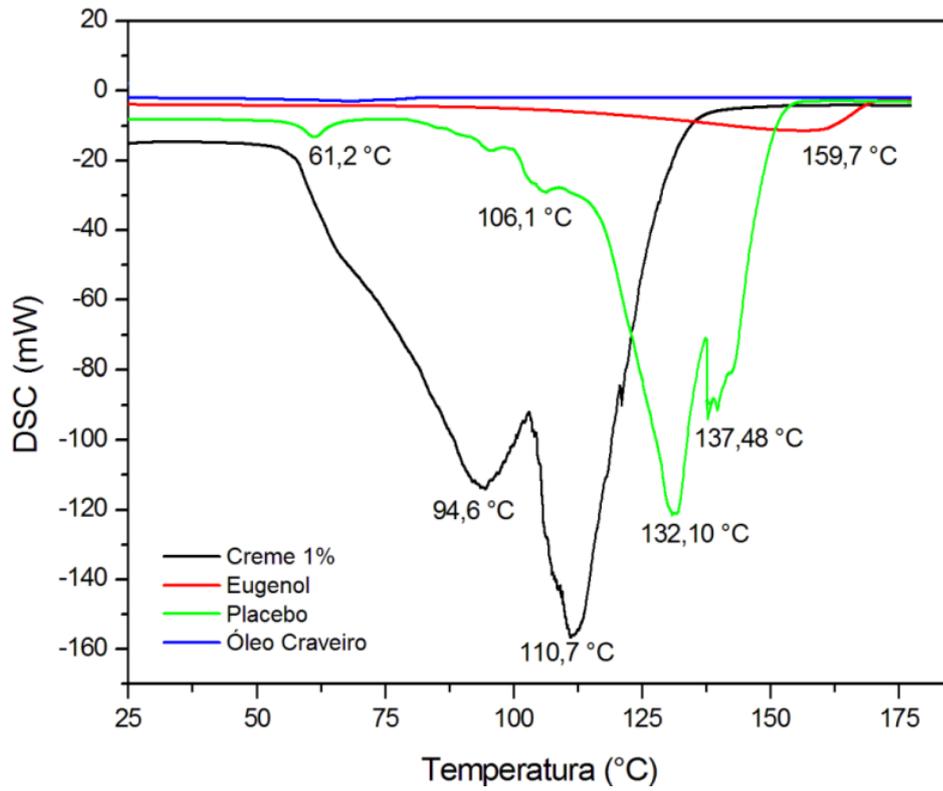


Figura 58: Comparação das curvas de DSC do creme 1% (m/m), eugenol, placebo e óleo do craveiro.

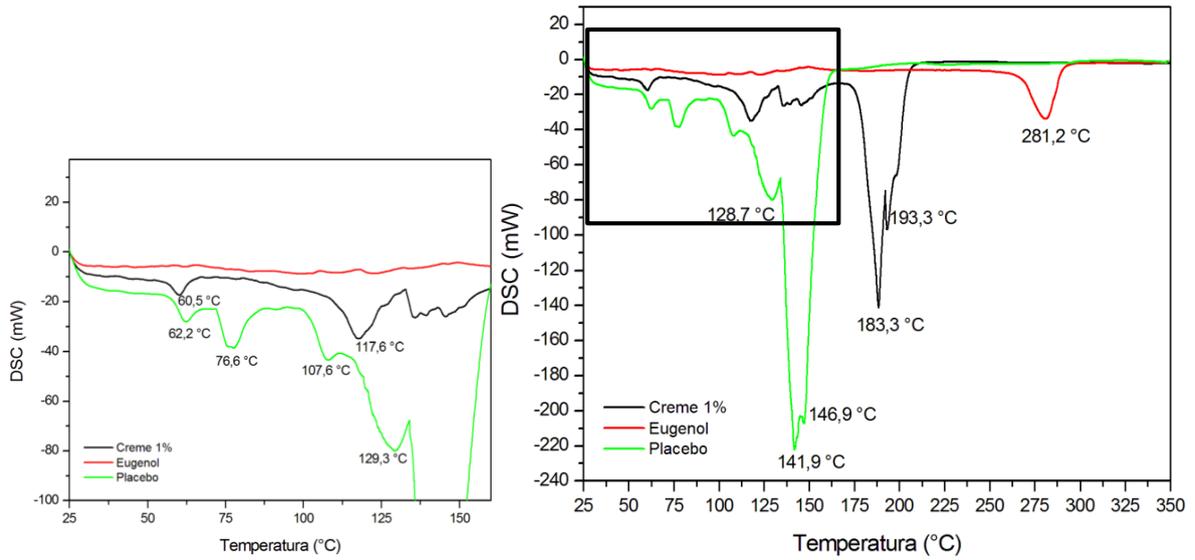


Figura 59: Comparação das curvas de DSC do creme 1% (m/m), eugenol e placebo pós-estabilidade.

A análise foi feita até 180 °C não sendo possível visualizar a temperatura de ebulição do óleo essencial ou do eugenol. Pode-se notar que apesar de apresentarem um perfil semelhante, as curvas do creme 1% (m/m) e do placebo encontram-se deslocadas uma em relação a outra.

A Figura 59 apresenta as curvas de DSC do creme 1% (m/m), eugenol e placebo após o estudo de estabilidade. A temperatura de análise foi estendida para 350 °C possibilitando a visualização de um evento endotérmico do eugenol, centrado em 281, 2 °C, que pode ser atribuído ao ponto de ebulição desse composto. Quando comparada com a Figura 58, pode-se observar que houve um estreitamento e deslocamento da curva de DSC do creme 1% (m/m).

Não foi possível, por motivos técnicos, a obtenção das curvas DSC para o óleo essencial do craveiro, propileno e óleo mineral (excipientes utilizados na formulação) após o estudo de estabilidade.

Na formulação incorporada com o óleo essencial, apesar desse mesmo óleo isoladamente não ter apresentado nenhum evento até 180 °C, é possível perceber uma diferença em relação à curva DSC do placebo. O pico apresenta-se mais alargado com menos eventos definidos (Figura 58). Segundo estudos publicados de compatibilidade entre fármaco e excipientes, casos de deslocamentos, modificação do formato, redução significativa ou desaparecimento de picos na DSC, quando comparados às curvas individuais, podem significar incompatibilidade ou interação de origem física. Se nenhuma interação é esperada, o mesmo comportamento na DSC para os compostos puros e sua mistura será esperado (FREITAS *et al.*, 2007; LIMA *et al.*, 2015; MATOS; MERCURI; BARROS, 2009; MENDONÇA *et al.*, 2014; YOSHIDA, *et al.*, 2011). Sendo assim, a curva obtida com o creme 1% (m/m) antes do estudo de estabilidade sugere a ocorrência de alguma incompatibilidade.

Na Figura 60, encontram-se as curvas DSC obtidas para os excipientes. Para as amostras analisadas antes do estudo de estabilidade, a temperatura máxima empregada foi de 180 °C, após o estudo de estabilidade optou-se por utilizar a temperatura máxima de 350 °C.

Para os excipientes BHT, EDTA, metilparabeno, propilparabeno, lanette N® e propileno analisados isoladamente, todos os eventos endotérmicos visualizados podem ser atribuídos aos seus pontos de ebulição ou fusão.

Na Figura 60, em (A), pode-se observar dois eventos endotérmicos na curva DSC para o BHT pós-estabilidade, tais picos aparecem centrados em 70,6 °C e 275,3 °C. Um pico semelhante em 70,6 °C pode ser observado para uma amostra de BHT analisada antes do estudo de estabilidade. Em (B), encontram-se as curvas DSC para o EDTA, dois eventos endotérmicos podem ser visualizados nas temperaturas de 211, 5 °C e 251, 3 °C. Em (C), pode-se observar dois eventos endotérmicos para o metilparabeno com picos centrados em 128,7 °C e 301,0 °C. Dois picos endotérmicos também podem ser observados para o propilparabeno (D) nas temperaturas de 96, 8 °C e 316, 7 °C. Para o Lanette-N (E) o evento endotérmico mais evidente pode ser observado na temperatura de 59, 9 °C para a amostra analisada antes do teste de estabilidade e 61,5 °C para a amostra pós-estabilidade. Em (F), pode-se observar o óleo mineral e o propileno antes do estudo de estabilidade. Para o óleo mineral, não é possível observar nenhum evento dentro da temperatura analisada. Já para o propileno, um evento endotérmico pode ser visualizado com pico em 142, 8 °C.

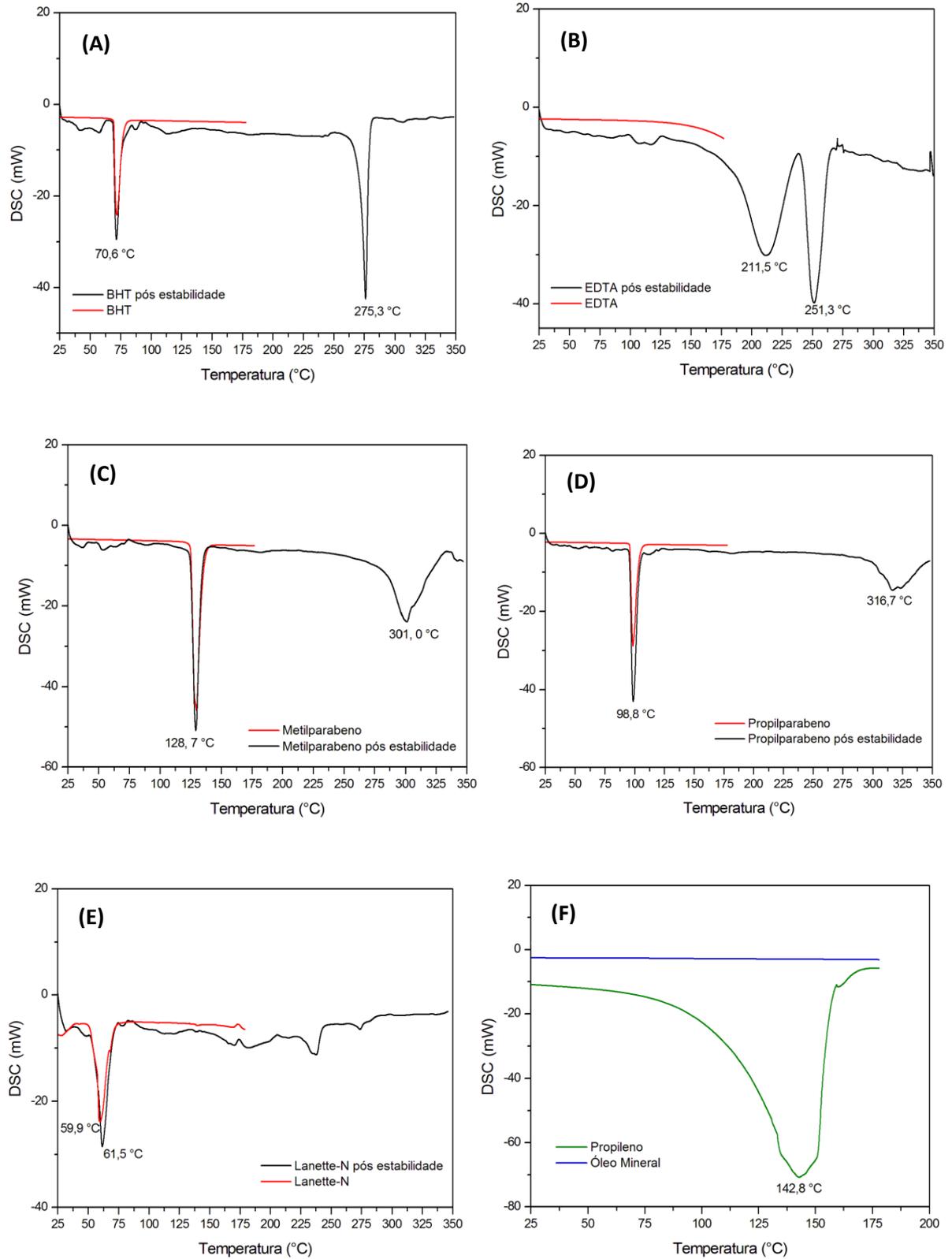


Figura 60: Comparação das curvas de DSC dos excipientes utilizados na formulação antes e depois de serem submetidos ao estudo de estabilidade.

Quando analisados individualmente, os excipientes não apresentaram diferenças antes e após o estudo de estabilidade, os principais eventos endotérmicos mantiveram-se na mesma faixa de temperatura. Para aqueles em que foi possível fazer tal comparação, pode-se dizer que não houve fenômenos de decomposição.

Na Figura 61 é possível observar todos os eventos mencionados anteriormente e condensados na mesma imagem para facilitar a comparação entre todos os excipientes e a formulação.

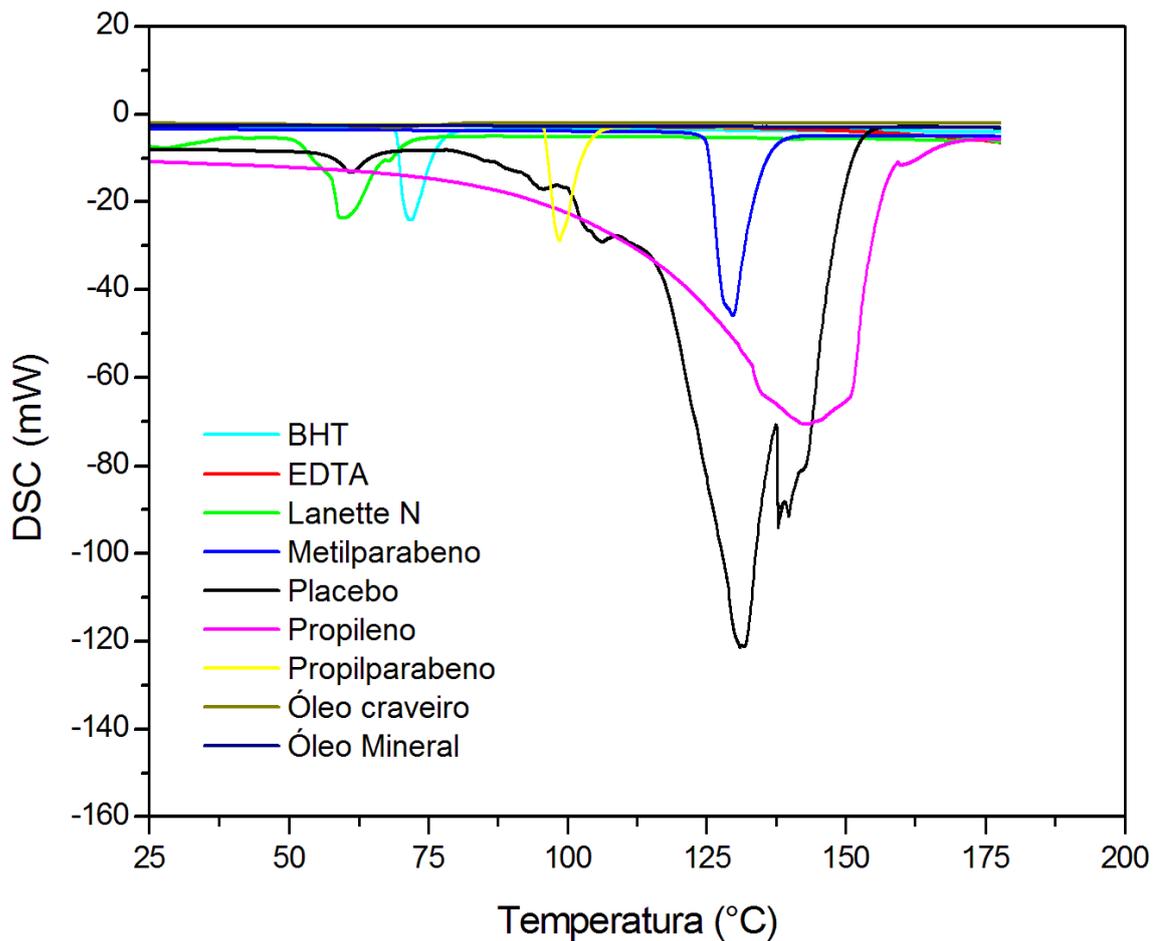


Figura 61: Análise comparativa da curva DSC do placebo com cada excipiente empregada na formulação do mesmo.

Quanto à formulação, espera-se que a curva de uma mistura seja o somatório das curvas relativas aos componentes puros (MATOS; MERCURI; BARROS, 2009). Sendo assim, na formulação base (placebo) que apresenta vários eventos endotérmicos ocorrendo na mesma faixa de temperatura, não foi possível visualizar a contribuição de cada excipiente. Ainda assim, foi possível observar que a menor temperatura (62,2 °C) em que foi registrado um evento endotérmico no placebo pode ser atribuída ao Lanette N®. Tal observação pode ser relacionada ao estudo de estabilidade realizado no presente trabalho, pois as amostras armazenadas à 50 °C, apesar da diminuição do teor de eugenol, não apresentaram perda aparente de viscosidade, ou mesmo, alteração no teste de centrifugação, continuando com a mesma aparência do início do estudo. Logo, fica evidente que os excipientes só começam a se decompor termicamente em temperaturas mais elevadas do que aquela utilizada no estudo de estabilidade.

Apesar dos picos de cada excipiente na curva DSC do placebo não serem evidentes, pode-se sugerir algumas contribuições individuais mais relevantes ao perfil da curva obtida, destacando-se na mistura, por exemplo, o propileno e o metilparabeno.

Na comparação feita entre as curvas do creme 1% (m/m) e placebo antes e após o estudo de estabilidade, observa-se que a maior diferença está entre as curvas de creme 1% (m/m) (Figura 62). Entre amostras de placebo não existe grande diferença, principalmente quando as mesmas são analisadas normalizadas (Figura 63). Porém, para as curvas do creme 1% (m/m), o deslocamento e estreitamento dos picos ficam evidentes.

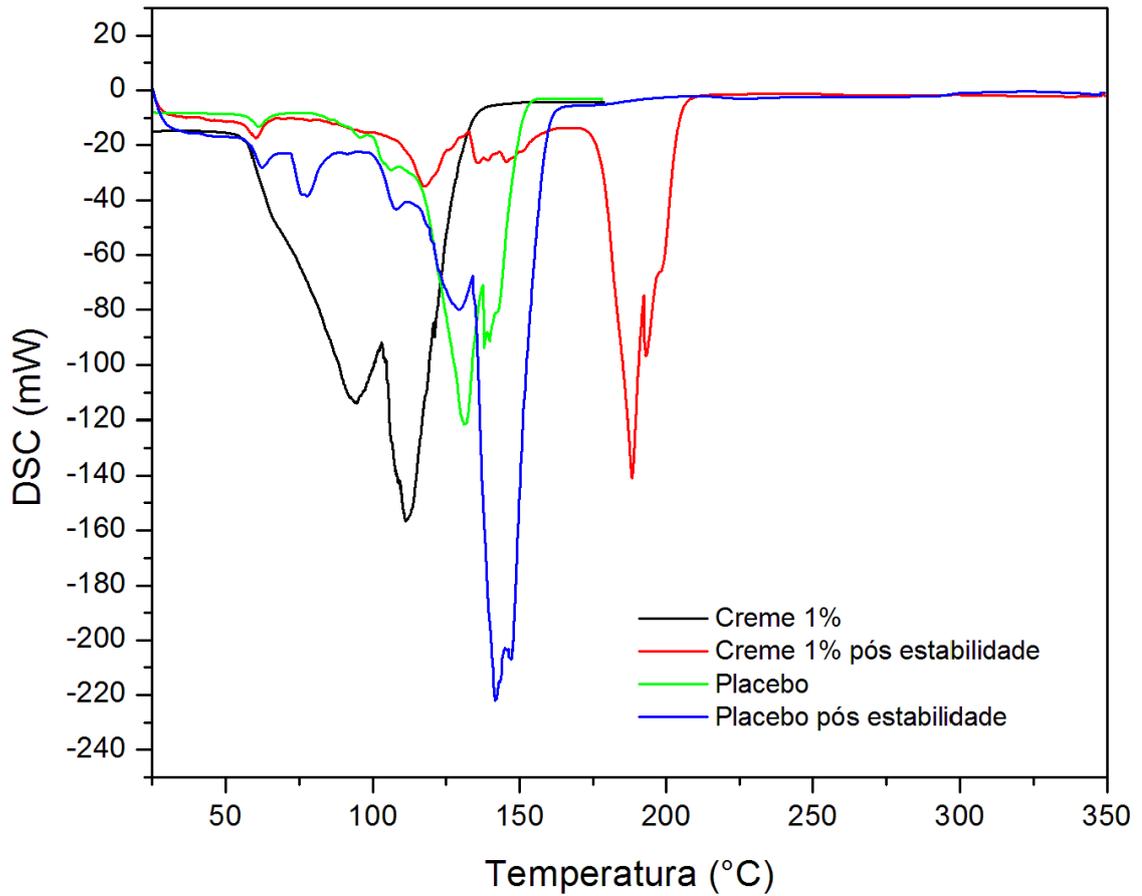


Figura 62: Análise comparativa das curvas DSC do creme 1% (m/m) e placebo antes e após o estudo de estabilidade.

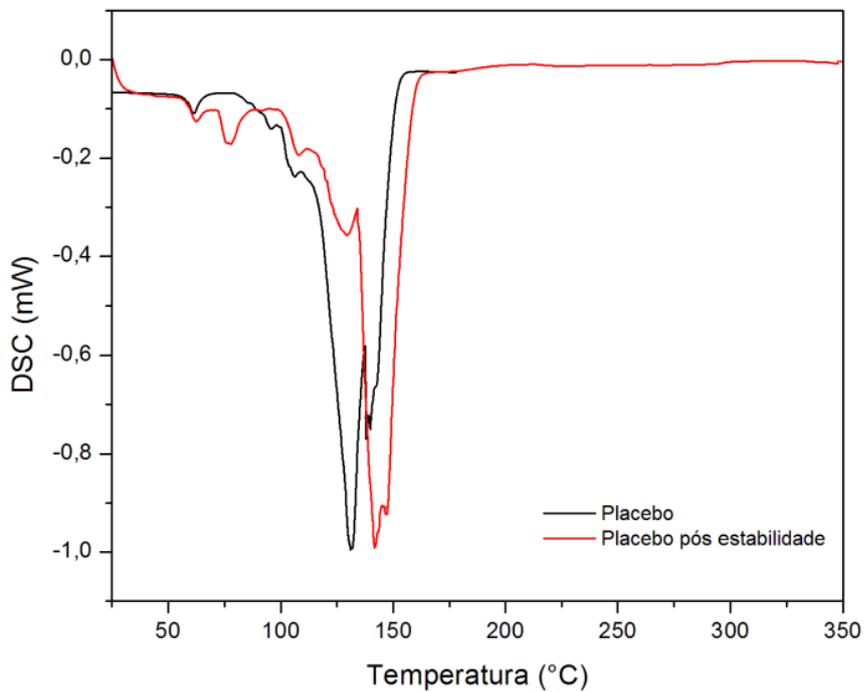


Figura 63: Curvas DSC normalizadas do placebo antes e após o estudo de estabilidade.

5.6.6.2 Estudo da formulação por análise termogravimétrica (*Thermogravimetry Analyse* – TGA – sigla do inglês)

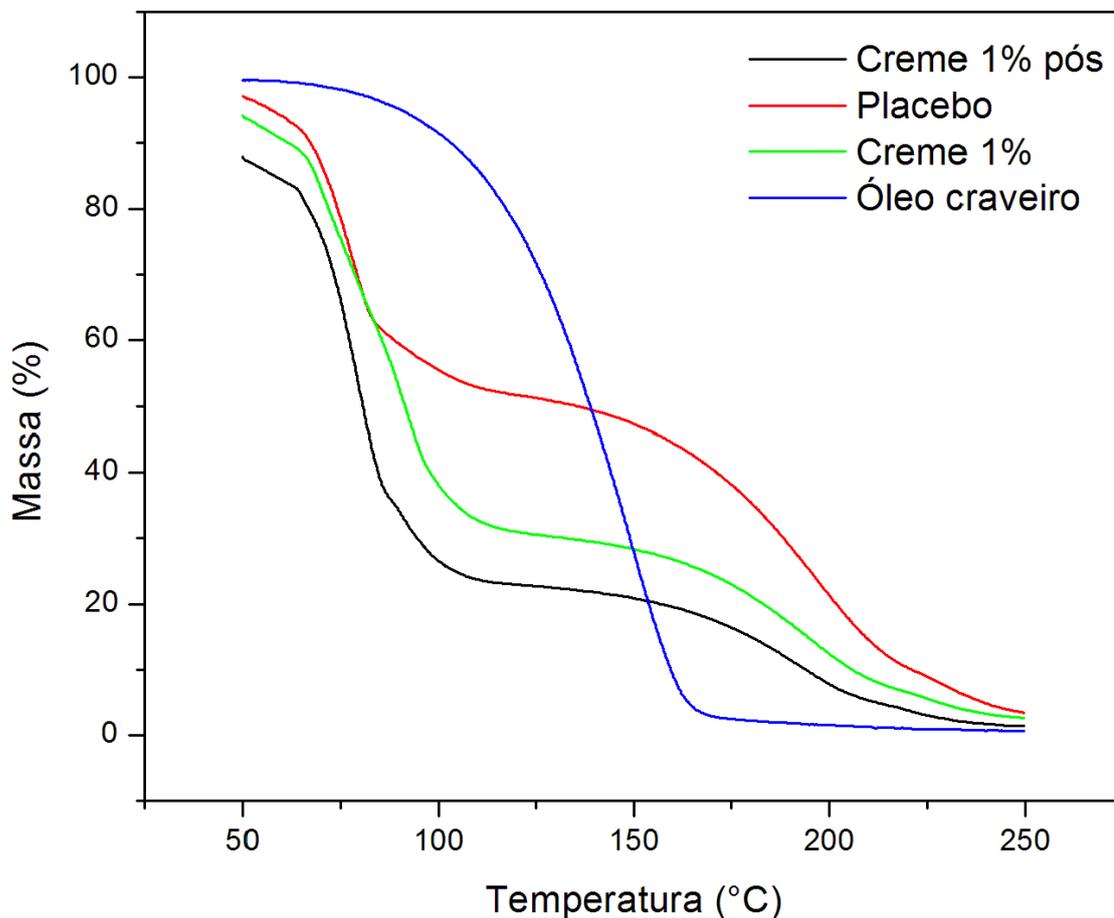


Figura 64: Curvas termogravimétricas comparativas entre o óleo craveiro, placebo, creme 1% (m/m), Creme 1% (m/m) pós-estabilidade.

Na Figura 64 é possível observar que as curvas termogravimétricas do placebo, creme 1% (m/m) e creme 1% (m/m) pós-estabilidade apresentam um perfil semelhante de perda de massa, porém em torno de 80,0 °C o placebo apresenta uma perda de massa menos acentuada enquanto o creme 1% (m/m) apresenta uma perda de massa contínua chegando a uma diferença de aproximadamente 30% em relação ao placebo. Também, pode-se observar que o óleo craveiro começa a perder massa em torno de 110,0 °C e que a formulação do creme que foi submetida

ao estudo de estabilidade, apesar de apresentar um perfil muito semelhante àquela que não foi submetida ao estudo, apresenta maiores perdas de massa durante todo o processo de aquecimento.

Tais diferenças podem ser atribuídas à perda do óleo na amostra que foi submetida ao estudo de estabilidade e também a absorção de umidade, pois as curvas termogravimétricas sugerem que o creme 1% (m/m) pós-estabilidade apresentava um maior teor de água bruta ou superficial. Um fato que pode comprovar que o creme 1% pós-estabilidade apresentava maior teor de água, possivelmente absorvida durante o armazenamento a 90% UR, é que no momento em que o estudo se iniciou em 50 °C tal amostra já começou com uma perda de 12% a qual pode ser devido a um processo de desidratação, uma vez que, na curva TG uma perda gradual de massa entre a temperatura ambiente e 100 °C pode ser atribuída a liberação de moléculas de água adsorvidas (MATOS; MERCURI; BARROS, 2009).

No estudo de Kónya e colaboradores (2003) em que a técnica TG foi utilizada para avaliar vários tipos de emulsionantes e a estrutura do creme O/A obtidas com os mesmos, os autores mostraram, através das curvas termogravimétricas, que 60% da massa analisada foi perdida até 120 °C o que corresponderia a água incorporada, ou seja, água bruta ou superficial.

No presente estudo, através das curvas termogravimétricas (Figura 64), é possível verificar que em 100 °C o creme 1% (m/m) pós-estabilidade já havia perdido 73,6% da sua massa, o creme 1 % (m/m) controle 62,1%, o placebo 44,7% e o óleo do craveiro apenas 7,9%. Era esperada uma maior perda para o creme 1% (m/m) em relação ao placebo já que nele soma-se a massa perdida pelo óleo presente no creme. Quanto ao creme 1% (m/m) pós-estabilidade, a maior perda

constatada para o mesmo, pode ser atribuída a uma maior quantidade de água absorvida durante o armazenamento, mas também pode estar relacionada ao fato do mesmo ter sofrido decomposição durante o estudo de estabilidade, pois mesmo entre 100 °C e 250 °C, temperatura que as massas tornaram-se constantes, o creme pós-estabilidade sofreu perdas mais significativas de massa.

Assim como o presente estudo, Laszaz e colaboradores (2011) usando as técnicas DSC e a TG para estudo de estabilidade de capecitabina observaram alteração na amostra após o armazenamento a 40 °C/ 75% UR por 6 meses. De acordo com os resultados, houve diminuição do ponto de fusão, diminuição da pureza e aumento no conteúdo de água, assim como aumento na perda da massa. Os resultados levaram os autores a concluir que houve decomposição da matéria, pois o teor de água para a amostra armazenada, o qual foi medido através do método volumétrico de Karl Fischer, foi menor do que a perda de massa. Os autores também realizaram um estudo por espectroscopia vibracional na região do infravermelho e concluíram que a técnica apresentava baixa sensibilidade para detecção de produtos de decomposição, uma vez que, não foi observada alteração nos espectros.

Lima e colaboradores (2015) ao estudarem a compatibilidade entre a hidroquinona e os excipientes de formas farmacêuticas semi-sólidas também não observaram interação entre fármaco e excipientes ao analisarem os espectros de absorção no infravermelho, embora os estudos termoanalíticos tenham demonstrado o inverso.

De forma similar, no presente estudo também não foram observadas alterações significativas nos espectros de absorção no infravermelho das amostras que passaram pelo estudo de estabilidade com os controles (Figura 57). Portanto,

conclui-se que tal técnica também não se mostrou eficiente nesse caso, uma vez que os estudos citados anteriormente detectaram diferenças entre as amostras.

Apesar dos resultados satisfatórios e os métodos de análise térmica apresentarem qualidade e velocidade de análise, os mesmos não devem substituir estudos convencionais de estabilidade.

6 CONCLUSÕES

O óleo essencial da *Pimenta pseudocaryophyllus*, testado no presente estudo, mostrou-se promissor frente às espécies *Microsporum canis* ATCC 32903, *Microsporum gypseum* ATCC 14683 e *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 11480, assim como, a formulação creme desenvolvida, cuja eficácia foi comprovada e cujas características organolépticas foram mantidas durante todo o estudo de estabilidade. Além do mais, a análise térmica mostrou-se uma excelente ferramenta para se avaliar a estabilidade e compatibilidade entre os componentes da formulação. Porém, algumas recomendações quanto às condições de armazenagem são essenciais para assegurar a qualidade final do produto, visto que houve uma perda considerável no teor de eugenol da formulação no estudo de estabilidade acelerado. Finalmente, cabe ressaltar que para a comercialização do produto, testes de segurança para avaliar a toxicidade dessa formulação são fundamentais.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-RAHMAN, S. M. Strain differentiation of dermatophytes. *Mycopathologia*, v. 166, p. 319-333, 2008.
- ACIOLE, S. D. G. **Avaliação da Atividade Inseticida dos Óleos Essenciais das Plantas Amazônicas Annonaceae, Boraginaceae e de Mata Atlântica Myrtaceae como Alternativa de Controle às Larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae)**. 2009. 86 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Ambiente) Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Lisboa / Portugal, 2009.
- ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry**. 4. ed. Allured Bussiness Media, Illinois, United States, 2009. p. 804.
- AHMAD, A.; KHAN, A.; YOUSUF, S.; KHAN, L. A.; MANZOOR, N. Proton translocating ATPase mediated fungicidal activity of eugenol and thymol. *Fitoterapia*, v. 81, p. 1157-1162, 2010.
- ALI, B., AL-WABEL, N. A., SHAMS, S., AHAMAD A., KHAN, S. A., ANWAR, F. Essential oils used in aromatherapy: A systemic review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, v. 5, n. 8, p. 601-611, 2015.
- ALMEIDA, L. M. M.; BIANCHIN, D. B.; SOUZA, E. A. F.; SVIDZINSKI, T. I. E. 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. 249-255, 2009.
- ARAÚJO, C. R.; MIRANDA, K. C.; FERNANDES, O. F. L.; SOARES, A. J.; SILVA, M. R. R. In vitro susceptibility testing of dermatophytes isolated in Goiania, Brazil, against Five antifungal agents by broth microdilution method. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 51, n. 1, p. 9-12, 2009.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA ANIMAIS DE ESTIMAÇÃO. Dados do Mercado. [s.d.]. Disponível em: <<http://abinpet.org.br/site/mercado/>> Acesso em: 25 ago. 2015.
- ASHOUR, H. M. Antibacterial, antifungal, and anticancer activities of volatile oils and extracts from stems, leaves, and flowers of *Eucalyptus sideroxylon* and *Eucalyptus torquata*. *Cancer Biology & Therapy*, v. 7, n. 3, p. 399-403, 2008.
- ASSOCIAÇÃO NACIONAL DOS FABRICANTES DE PRODUTOS DE ANIMAIS DE ESTIMAÇÃO (ANFALPET). [s.d.]. Disponível em: <<http://anfalpet.org.br/portal/>> Acesso em: 25 ago. 2011.
- ATSUMI, T.; FUJISAWA, S.; TONOSAKI, K. A comparative study of the antioxidant/prooxidant activities of eugenol and isoeugenol with various concentrations and oxidation conditions. *Toxicology in Vitro*, v. 19, p. 1025-1033, 2005.

AULTON, M. E. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. Tradução de George González Ortega *et al.* 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

BALDA, A.C.; LARSSON, C.E.; OTSUKA, M.; GAMBALE, W. Estudo retrospectivo de casuística das dermatofitoses em cães e gatos atendidos no Serviço de Dermatologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32, n. 2, p. 133-140, 2004.

BARNES, A. F.; HARDY, M. J.; LEVER, T. J. A review of the applications of thermal methods within the pharmaceutical industry. **Journal of Thermal Analysis**, v. 40, p. 499-509, 1993.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.

BARROS, M. E. S.; SANTOS, D. A.; HAMDAN, J. S. Evaluation of susceptibility of *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum* clinical isolates to antifungal drugs using a modified CLSI microdilution method (M38-A). **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, p. 514-518, 2007.

BASSO, P. C.; RAISER, A. G.; SCHMIDT, C.; BRUN, M. V.; SOUZA, T. M.; TRINDADE, A. B.; MÜLLER, D. C. M. Dermatomicose e ceratite micótica causada por *Exophiala sp* em um cão. **Ciência Rural**, v. 38, n. 7, p. 2063-2067, 2008.

BAUERECKER, S.; SARGE, S.M.; CAMMENGA H.K. Calorimetric determination of purity by simulation of DSC curves 2. **Journal of Thermal Analysis**, v. 35, p. 527-539, 1989.

BIANCALANA, F. S. C.; LYRA, L.; MORETTI, M. L.; KAMEI, K.; SCHREIBER, A. Z. Standardization of Hyphal Growth Inhibition Rate as a Means of Evaluating *Microsporum spp. in vitro* Susceptibility to Terbinafine, Griseofulvin, and Ciclopiroxolamine. **Mycopathologia**, v. 172, n. 4, p.279-85, 2011.

BIER, D.; FARIAS, M. R. de; MURO, M. D.; SONI, L. M. F.; CARVALHO, V. O.; PIMPÃO, C. T. Isolamento de dermatófitos do pelo de cães e gatos pertencentes a proprietários com diagnóstico de dermatofitose. **Archives of Veterinary Science**, v.18, n.1, p.1-8, 2013.

BLANCO, J. L.; GARCIA, M. L. Immune response to fungal infections. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 125, p. 47-70, 2008.

BOND, R. Superficial veterinary mycoses. **Clinics in Dermatology**, v. 28, p. 226-236, 2010.

BOUCHARA, J. P.; MIGNON, B.; CHATURVEDI, V. Editorial: Dermatophytes and Dermatophytoses: A Reappraisal for the Twenty-First Century. **Mycopathologia**, v. 166, p. 235–237, 2008.

BOUZABATA, A.; CABRAL, C.; GONÇALVES, M. J.; CRUZ, M. T.; BIGHELLI, A.; CAVALEIRO, C.; CASANOVA, J.; TOMI, F.; SALGUEIRO, L. *Myrtus communis* L. as source of a bioactive and safe essential oil. **Food and Chemical Toxicology**, v. 75, p.166–172, 2015.

BRAGA, P. C.; SASSO, M.; CULICI, M.; ALFIERI, M. Eugenol and thymol, alone or in combination, induce morphological alterations in the envelope of *Candida albicans*. **Fitoterapia**, v. 78, p.396-400, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. [s.d.]. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/>> Acesso em: 25 ago. 2015a.

BRASIL. Ministério do Meio ambiente. **O Bioma Cerrado**. [s.d.]. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado>> Acesso em: 02 jul. 2015b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução de Diretoria Colegiada nº 26 de 13 de maio de 2014**. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 14 mai. 2014a. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a9e43d0044140f579b5affb9cd167b7c/rd_c0026_13_05_2014.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 13 jan. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Instrução Normativa nº 4, de 18 de junho de 2014**. Determina a publicação do Guia de orientação para registro de Medicamento Fitoterápico e registro e notificação de Produto Tradicional Fitoterápico. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 20 jun. 2014b. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/10f7288044703a8bbbf8fffe3a642e80/Guia+final+dicol+180614.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 13 jan. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário nacional da farmacopeia brasileira/Brasil**. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2. ed. Brasília: Anvisa, 2012. p. 224. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeiabrasileira/arquivos/2012/FNFB%20_Reviseao_2_COFAR_setembro_2012_atual.pdf>. Acesso em: 05 out. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RE Nº 1, de 29 de julho de 2005**. Guia para a realização de estudos de estabilidade. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 01 ago. 2005a. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/legis/01_05_re_comentada.pdf>. Acesso em: 08 set. 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa Nº 11, de 8 de Junho de 2005**. Aprova o Regulamento Técnico para Registro e Fiscalização de Estabelecimentos que Manipulam Produtos de Uso Veterinário e o Regulamento de Boas Práticas de Manipulação de Produtos Veterinários (Farmácia de Manipulação). Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 10 jun. 2005b. Disponível em: <

<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAtoPortalMapa&chave=989875967>>. Acesso em: 08 set. 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 15 de 09 de maio de 2005**. Regulamento técnico para testes de estabilidade de produto farmacêutico de uso veterinário. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 12 mai. 2005c. Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAtoPortalMapa&chave=1775629259> >. Acesso em: 08 set. 2014.

BRILHANTE, R. S. N.; CAVALCANTE, C. S. P.; SOARES-JUNIOR, F. A.; CORDEIRO, R. A.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. High rate of *Microsporum canis* feline and canine dermatophytoses in Northeast Brazil: Epidemiological and diagnostic features. **Mycopathologia**, v.156, n.4, p.303-8, 2003.

BURMESTER, A.; SHEL, E.; GLÖCKNER, G.; HEDDERGOTT, C.; SCHINDLER, S.; STAIB, P.; HEIDEL, A.; FELDER, M.; PETZOLD, A.; SZAFRANSKI, K.; FEUERMA, M.; PEDRUZZI, I.; PRIEBE, S.; GROTH, M.; WINKLER, R.; LI, W.; KNIEM EYER, O.; SCHROECKH, V. HERTWECK, C.; HUBE, B.; WHITE, T. C.; PLATZER, M.; GUTHKE, R.; HEITM, J.; WÖSTEMEYE, J.; ZIPFEL, P.; MONOD, M.; BRAKHAGE, A. Comparative and functional genomics provide insights into the pathogenicity of dermatophytic fungi. **Genome Biology**, v. 12, p. 01-16, 2011.

CAFARCHIA, C.; IATTA, R.; LATROFA, M. S.; GRÄSER, Y.; OTRANTO, D. Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of dermatophytes. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 20, p.336–35, 2013.

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

CAMPANHA, A. M.; TASCA, R. S.; SVIDZINSKI, T. I. E. Dermatômicoses: Freqüência, Diagnóstico Laboratorial e Adesão de Pacientes ao Tratamento em um Sistema Público de Saúde, Maringá-PR, Brasil. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 3, p. 442-448, 2007.

CAMPANINI, M. Z.; PINHO-RIBEIRO, F. A.; IVAN, A. L.M.; FERREIRA, V. S.; VILELA, F. M.P.; VICENTINI, F. T.M.C.; MARTINEZ, R. M.; ZARPELON, A. C.; FONSECA, M. J.V.; FARIA, T. J.; BARACATA, M. M.; VERRI JÚNIOR, W. A.; GEORGETTI, S. R.; CASAGRANDE, R. Efficacy of topical formulations containing *Pimenta pseudocaryophyllus* extract against UVB-induced oxidative stress and inflammation in hairless mice. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 127, p. 153-160, 2013.

CARVALHO, A. C. B.; BALBINO, E. E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J. P. S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 314-319, 2008.

CHAGAS, A. C. de S.; PASSOS, W. M.; PRATES, H. T.; LEITE, R. C.; FURLONG, J.; FORTES, I. C. P. Efeito acaricida de óleos essenciais e concentrados emulsionáveis de *Eucalyptus* spp em *Boophilusmicroplus*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 39, n. 5, p. 247-253, 2002.

CAVALHEIRO, E. T. G. A influência de fatores experimentais nos resultados de análises termogravimétricas. **Química Nova**, v. 18, n. 3, p. 305-308, 1995.

CHAVES, L. J. Q. **Dermatomicoses em cães e gatos: avaliação do diagnóstico clínico-laboratorial e dos aspectos epidemiológicos em uma população de portadores de lesões alopecias circulares**. 2007. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Ceará/Brasil, 2007.

CHEN, D.; LEE, Y.; YEB, P.; LIN, J.; CHEN, Y.; HUNG, S. Eugenol inhibited the antimicrobial functions of neutrophils. **Basic Research-Biology**, v. 34, n. 2, p.176-187, 2008.

CIMANGA, K.; KAMBU, K.; TONA, L.; APERS, S.; DE BRUYNE, T.; HERMANS, N.; TOTTÉ, J.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A. J. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, p. 213-220, 2002.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi: Approved Standard – Second edition**. CLSI document M38-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008. 52 p.

COELHO, A. C.; ALEGRIA, N.; RODRIGUES, J. Isolamento de dermatófitos em animais domésticos em Vila Real, Portugal. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 4, p. 1017-1020, 2008.

COLLETT, L. A.; BROWN, M. E. Biochemical and biological applications of thermal analysis. **Journal of Thermal Analysis**, v. 51, p. 693-726, 1998.

COMISSÃO DE ANIMAIS DE COMPANHIA (COMAC). Disponível em: <<http://www.comac.com.br/>> Acesso em: 25 ago. 2011.

CUSTÓDIO, D. L.; BURGO, R. P.; MORIEL, B.; BARBOSA, A. M.; REZENDE, M. I.; DANIEL, J.F.S.; PINTO, J. P.; BIANCHINI, E.; FARIA, T. J de. Antimicrobial Activity of Essential Oils from *Pimenta pseudocaryophyllus* and *Tynanthus micranthus*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.53, n. 6, p.1363-1369, 2010.

DAVIS, G. J.; PORTER, R. S. Application of the differential scanning calorimeter to purity measurements. **Journal of Thermal Analysis**, v. 1, p. 449-458, 1969.

DEUS, R. J. A.; ALVES, C. N.; ARRUDA, M. S. P. Avaliação do efeito antifúngico do óleo resina e do óleo essencial de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 1, p. 1-7, 2011.

ELAISSI, A.; ROUIS, Z.; MABROUK, S.; SALAH, K. B. H.; AOUNI, M.; KHOUJA, M. L.; FARHAT, F.; CHEMLI, R.; HARZALLAH-SKHIRI, F. Correlation Between Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oils from Fifteen Eucalyptus Species Growing in the Korbous and Jbel Abderrahman Arboreta (North East Tunisia). **Molecules**, v.17, p. 3044-3057, 2012a.

ELAISSI A.; ROUIS, Z.; SALEM, N. A. B.; MABROUK, S.; SALEM, Y. B.; SALAH, K. H.; AOUNI, M.; FARHAT, F.; CHEMLI, R.; HARZALLAH-SKHIRI, F.; KHOUJA, M. L. Chemical composition of 8 eucalyptus species' essential oils and the evaluation of their antibacterial, antifungal and antiviral activities. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.12, p.81. 2012b.

ELAISSI, A.; SALAH, K. B. H.; MABROUK, S.; LARBI, K. M.; CHEMLI, R.; HARZALLAH-SKHIRI, F. Antibacterial activity and chemical composition of 20 *Eucalyptus* species' essential oils. **Food Chemistry**, v.129, p.1427-1434, 2011.

ESPINEL-INGROFF, A.; BARCHIESI, F.; CUENCA-ESTRELLA, M.; FOTHERGILL, A.; PFALLER, M. A.; RINALDI, M.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L.; VERWEIJ, P. E. Comparison of Visual 24-Hour and Spectrophotometric 48-Hour MICs to CLSI Reference Microdilution MICs of Fluconazole, Itraconazole, Posaconazole, and Voriconazole for *Candida* spp.: a Collaborative Study. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 9, p. 4535–4540, 2005.

ESTEVEZ-PEDRO, N. M.; LOPES, P. S.; SUFI, B. da S.; RODAS, A. C. D.; MATHOR, M. B.; HIGA, O. Z.; VIEIRA, D. P.; OKAZAKI, K.; MORENO, P. R. H.; BABY, A. R.; LACERDA, A. C. L.; KANEKO, T. M. Uso de métodos alternativos na toxicidade *in vitro* de óleos essenciais da mata atlântica. 2013. Disponível em: <<https://www.ipen.br/biblioteca/2013/eventos/19716.pdf>>. Acesso em: 25 ago. 2015.

FARIAS, V.; ROCHA, L. D.; PREUSSLER, K. H.; MARANHO, L. T. Organização estrutural da folha de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L.R. Landrum, Myrtaceae. **Acta Botanica Brasilica**, v. 23, n.2, p. 398-406, 2009.

FERREIRO, L.; ROEHE, C.; DORNELES, A. S.; MACHADO, G.; FRAGA, C. F.; LUPION, C. G.; BARROSO, G. J.; SANCHES, E. M. C. Isolamento de dermatófitos e fungos saprotróficos do pelame de gatos sem dermatoses na região metropolitana de Porto Alegre - RS, Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 42, p.1191, 2014.

FERNÁNDEZ-TORRES, B.; CABAÑES, F. J.; CARRILLO-MUÑOZ, A. J.; ESTEBAN A.; INZA, I.; ABARCA, L.; GUARRO, J. Collaborative Evaluation of Optimal Antifungal Susceptibility Testing Conditions for Dermatophytes. **Journal Clinical Microbiology**, v. 40, n. 11, p. 3999-4003, 2002.

FOY, D. S.; TREPANIER, L. A. Antifungal Treatment of Small Animal Veterinary Patients. **Veterinary Clinical Small Animals**, v. 40, n. 6, p. 1171–1188, 2010.

FREITAS, M. N.; ALVES, R.; MATO, J. R.; MARCHETTI, J. M. Thermal analysis applied in the osmotic tablets pre-formulation studies. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 87, n. 3, p. 905-911, 2007.

FUJISAWA, S.; ATSUMI, T.; KADOMA, Y.; SAKAGAMI, H. Antioxidant and 324 prooxidant action of eugenol-related compounds and their cytotoxicity. **Toxicology**, v. 177, n. 325, p. 39-54, 2002.

FUKUDA, E. K.; VASCONCELOS, A. F. D.; MATIAS, A. C.; BARBOSA, A. M.; DEKKER, A. C.; SILVA, M. L. C. Polissacarídeos de parede celular fúngica: purificação e caracterização. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 30, n. 1, p. 117-134, 2009.

GALIZA, G. J.N.; SILVA, T. M. da; CAPRIOLI, R. A.; BARROS, C. S.L. Ocorrência de micoses e pitiose em animais domésticos: 230 casos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 3, p. 224-232, 2014.

GALUPPI, R.; GAMBARARA, A.; BONOLI, C.; OSTANELLO, F.; TAMPIERI, M. P. Antimycotic effectiveness against dermatophytes: comparison of two *in vitro* tests. **Veterinary Research Communications**, v. 34, p. 57-61, 2010.

GARCIA, M. D.; FERNÁNDEZ, M. A.; ALVAREZ, A.; SAENZ, M. T. Antinociceptive and anti-inflammatory effect of the aqueous extract from leaves of *Pimenta racemosa* var. ozua (Mirtaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 91, p. 69-73, 2004.

GHANNOUM, M. A.; RICE, L. B. Antifungal Agents: Model of Action, Mechanisms of Resistance, and Correlation of These Mechanisms with Bacterial Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, p. 501-517, 1999.

GHANNOUM, M. A.; CHATURVEDI, V.; ESPINEL-INGROFF, A.; PFALLER, M. A.; RINALDI, M. G.; LEE-YANG, W.; WARNOCK, D. W. Intra- and Interlaboratory Study of a Method for Testing the Antifungal Susceptibilities of Dermatophytes. **Journal of clinical microbiology**, v. 42, n. 7, p. 2977-2979, 2004.

GHANNOUM, M. A.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.; CHATURVEDI, V.; ESPINEL-INGROFF, A.; PFALLER, M. A.; RENNIE, R.; RINALDI, M. G.; WALSH, T. J. Interlaboratory Study of Quality Control Isolates for a Broth Microdilution Method (Modified CLSI M38-A) for Testing Susceptibilities of Dermatophytes to Antifungals. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 12, p. 4353-4356, 2006.

GIL, E. S (Org.). **Controle Físico-químico de Qualidade de Medicamentos**. São Paulo: Pharmabooks, 3. ed., 2010.

GILLES, M.; ZHAO, J.; AN, M.; AGBOOLA, S. Chemical composition and antimicrobial properties of essential oils of three Australian *Eucalyptus* species. **Food Chemistry**, v. 119, p. 731-737, 2010.

GIORDANO, F.; ROSSI, A.; PASQUALI, I.; BETTINI, R.; FRIGO, E.; GAZZANIGA, A.; SANGALLI, M. E.; MILEO, V.; CATINELLA, S. Thermal degradation and melting point determination of diclofenac. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 73, p. 509-518, 2003.

GIRON, D. Applications of thermal analysis and coupled techniques in pharmaceutical industry. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 68, p. 335-357, 2002.

GRUMBT, M.; MONOD, M.; STAIB, P. Genetic advances in dermatophytes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 320, p. 79–86, 2011.

HARRIS, R. Progress with superficial mycoses using essential oils. **The International Journal of Aromatherapy**, v. 12, n. 2, p. 83-91, 2002.

HECTOR, R.F. An Overview of Antifungal Drugs and their use for treatment of deep and Superficial Mycoses in Animals. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v. 20, p. 240-249, 2005.

HIRSH, D.C.; ZEE, Y.C. **Microbiologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 2003. p. 201-206.

INOUE, S.; UCHIDA, K.; NISHIYAMA, Y.; HASUMI, Y.; YAMAGUCHI, H.; ABE, S. Combined effect of heat, essential oils and salt on the fungicidal activity against *Trichophyton mentagrophytes* in foot bath. **Japanese Journal of Medical Mycology**, v. 48, p. 27-36, 2007.

ITO, M.; MURAKAMI, K.; YOSHIMO, M. Antioxidant action of eugenol compounds: role of metal ion in the inhibition of lipid peroxidation. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, p. 461-466, 2005.

JAMALIAN, A.; SHAMS-GHAHFAROKHI, M.; JAIMAND, K.; PASHOOTAN, N.; AMANI, A.; RAZZAGHI-ABYANEH, M. Chemical composition and antifungal activity of *Matricaria recutita* flower essential oil against medically important dermatophytes and soil-borne pathogens. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 22, p. 308-315, 2012.

KIM, E.; PARK, I. Fumigant Antifungal Activity of Myrtaceae Essential Oils and Constituents from *Leptospermum petersonii* against Three *Aspergillus* Species. **Molecules**, v. 17, p.10459-10469, 2012.

KÓNYA, M.; SORRENTI, M.; FERRARI, F.; ROSSI, S.; CSÓKA, I.; CARAMELLA, C.; BETTINETTI, G.; ERÖS, I. Study of the microstructure of oil/water creams with thermal and rheological methods. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 73, p. 623-632, 2003.

KUMAR, P.; MISHRA, S.; MALIK, A.; SATYA, S. Compositional analysis and insecticidal activity of *Eucalyptus globules* (family: Myrtaceae) essential oil against housefly (*Muscadomestica*). **Acta Tropica**, v. 122, p. 212– 218, 2012.

LANDRUM, L. R.; KAWASAKI, M. L. The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic treatment and identification keys. **Brittonia**, v. 49, n. 4, p. 508-536, 1997.

LASZCZ, M.; KOSMACINSKA, B.; KORCZAK, K.; SMIGIELSKA, B.; GLICE, M.; MARUSZAK, W.; GROMAN, A.; BECZKOWICZ H.; ZELAZKO, L. Study on

compatibility of imatinib mesylate with pharmaceutical excipients. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 88, n.2, p. 305-310, 2007.

LASZCZ, M., TRZCIN´SKA, K., FILIP, K., SZYPROWSKA, A., MUCHA, M., KRZECZYN´SKI, P. Stability studies of capecitabine. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 105, p.1015–1021, 2011.

LEE, S.J.; HAN, J.I.; LEE, G.S.; PARK, M.J.; CHOI, I.G.; NA, K.J.; JEUNG, E.B. Antifungal effect of Eugenol and Nerolidol against *Microsporium gypseum* in a Guinea Pig Model. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n. 1, p. 184-188, 2007.

LEMSADDEK, A. **Estudo de dermatófitos por métodos moleculares: identificação, resistência a antifúngicos e virulência**. 2008. 218 f. Tese (Doutoramento em Biologia) Faculdade de Ciências, Departamento de Biologia Vegetal, Universidade de Lisboa, Lisboa/Portugal, 2008.

LEONARDI, G. R.; GASPAR, L. R.; CAMPOS; P. M. B. G. M. Estudo da variação do pH da pele humana exposta à formulação cosmética acrescida ou não das vitaminas A, E ou de ceramida, por metodologia não invasiva. **Rev. Investigação clínica, epidemiológica, laboratorial e terapêutica**, v. 77, n. 5, p. 563-569, 2002.

LIMA, M. E. L.; CORDEIRO, I.; YOUNG, M. C. M.; SOBRA, M. E. G.; MORENO, P. R. H. Antimicrobial activity of the essential oil from two specimens of *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) I. r. Landrum (Myrtaceae) native from São Paulo state – Brazil. **Pharmacology online**, v. 3, p.589-593, 2006.

LIMA, I. P. DE B.; LIMA, N. G. P. B.; BARROS, D. M. C.; OLIVEIRA, T. S.; MENDONÇA, C.M. S.; BARBOSA, E. G.; RAFFIN, F. N.; LIMA E MOURA, T. F. A. de; GOMES, A. P. B.; FERRARI, M.; ARAGÃO, C. F. S. Compatibility study between hydroquinone and the excipients used in semi-solid pharmaceutical forms by thermal and nonthermal techniques. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.120, p.719-732, 2015.

MACHADO, M.L.S.; APPELT, C.E.; FERREIRO,L. Dermatófitos e leveduras isolados da pele de cães com dermatopatias diversas. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32, n. 3, p. 225-232, 2004.

MARTINEZ-ROSSI, N. M.; PERES, N. T. A. Antifungal Resistance Mechanisms in Dermatophytes. **Mycopathologia**, v. 166, p. 369-383, 2008.

MARTINS, R. M.; CORTEZ, L. E. R.; FELIPE, D. F. Desenvolvimento de formulações de uso tópico empregando o óleo essencial extraído do cravo-da-índia. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 1, n. 3, p. 259-263, 2008.

MARZZOCO, A.; TORRES, B.B. **Bioquímica Celular**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 2005, 360p.

MATTEI, A. S.; BEBER, MÁRCIA A.; MADRID, I. M. Dermatophytosis in Small Animals. **SOJ Microbiology & Infectious Diseases**, v. 2, n. 3, p. 1-6, 2014.

MATOS, J. do R.; MERCURI, L.; BARROS, G. **Análise Térmica Aplicada a Fármacos e Medicamentos**. In: STORPIRTIS, S. *et al.* Biofarmacotécnica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. cap.4.

MEDEIROS, K. C. P.; MONTEIRO, J. C.; DINIZ, M. F. F. M.; MEDEIROS, I. A.; SILVA, B. A.; PIUVEZAM, M. R. Effect of the activity of the Brazilian polyherbal formulation: *Eucalyptus globules* Labill, *Peltodonradicans* Pohl and *Schinustereb in thi folius* Radd in inflammatory models. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n.1, p. 23-28, 2012.

MENDONÇA, C. M. S. de, LIMA, I. P. de B., ARAGÃO, C. F. S., GOMES, A. P. B. Thermal compatibility between hydroquinone and retinoic acid in pharmaceutical formulations. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 115, p.2277–2285, 2014.

MENDONZA, M. H.; MENDONZA, J. H.; ALONSO, J. M.; REY, J. M.; SANCHEZ, S.; MARTIN, R.; BERMEJO, F.; CORTES, M.; BENITEZ, J. M.; GARCIA, W. L.; GARCIA-SANCHEZ, A. A zoonotic ringworm outbreak caused by a dysgonic strain of *Microsporium canis* from stray cats. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 27, n. 2, p. 62-66, 2010.

MIRONA, D.; BATTISTI, F.; SILVA, F. K.; LANA, A. D.; PIPPI, B.; CASANOVA, B.; GNOATTO, S.; FUENTEFRIA, A.; PAULO MAYORGA; SCHAPOVAL, E. E.S. Antifungal activity and mechanism of action of monoterpenes against dermatophytes and yeasts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, p. 660-667, 2014.

MONTEIRO, O. S.; SOUZA, A. G.; SOLEDADE, L. E. B.; QUEIROZ, N.; SOUZA, A. L.; MOUCHREK FILHO, V. E.; VASCONCELOS, A. F. F. Chemical evaluation and thermal analysis of the essential oil from the fruits of the vegetable species *Pimenta dioica* Lindl. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 106, p. 595-600, 2011.

MOREIRA, G. F.; BALBO, A.; ACHETE, C. A.; BARIN, J. S.; WOLLINGER, W.; NOGUEIRA, R.; BITTENCOURT, C. F.; RODRIGUES, J. M. Aplicação da Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) para Determinação da Pureza de Fármacos. **Produto & Produção**, v. 11, n. 1, p. 22-29, 2010.

MUGNAINI, L.; NARDONI, S.; PINTO, L.; PISTELLI, L.; LEONARDI, M.; PISSERI, F.; MANCIANTI, F. *In vitro* and *in vivo* antifungal activity of some essential oils against feline isolates of *Microsporium canis*. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 22, p. 179-184, 2012.

MUSYIMI, D. M.; OGUR, J. A. Comparative Assessment of Antifungal Activity of Extracts from *Eucalyptus globules* and *Eucalyptus citriodora*. **Research Journal of Phytochemistry**, v. 2, n. 1, p. 35-43, 2008.

NAKATSU, T.; LUPO, A. T.; CHINN, J. W.; KANG, R. K. L. Biological activity of essential oils and their constituents. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 21, p. 571-631, 2000.

NATARAJAN, V.; VENUGOPAL, P.V.; MENON, T. Effect of *Azadirachta Indica* (Neem) on the Growth Pattern of Dermatohytes. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 21, n. 2, p. 98-101, 2003.

OGUNWANDE, I. A.; OLAWORE, N. O.; ADELEKE, K A, KONIG W A. Chemical composition of the essential oils from the leaves of three *Eucalyptus* Species Growing in Nigeria. **Journal Essential Oil Research**, v.15, p. 297-301, 2003.

OLIVEIRA, C. B.D.; OLIVEIRA, C. R. A nova realidade do marketing farmacêutico veterinário: uma estratégia B2B para o sucesso da linha pet. **Revista Eletrônica de Gestão de Negócios**, v. 3, n. 2, p. 23-43, 2007.

OLIVEIRA, M. A., YOSHIDA, M. I., GOMES, E. C. de L., MUSSEL, W. N., SOARES, C. D. V.; PIANETTI, G. A. Análise térmica aplicada a fármacos e formulações farmacêuticas na indústria farmacêutica. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p. 1224-1230, 2011.

OLMEDO, R. H.; ASENSIO, C. M.; GROSSO, N. R. Thermal stability and antioxidant activity of essential oils from aromatic plants farmed in Argentina. **Industrial Crops and Products**, v. 69, p. 21-28, 2015.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n. 2, p. 301-307, 2008.

PARREIRA, N.A.; MAGALHÃES, L.G.; MORAIS, D.R.; CAIXETA, S.C.; SOUZA, J.P.B de; BASTOS, J.K.; CUNHA, W.R.; SILVA, M.L.A.; NANAYAKKARA, N.P.D.; RODRIGUES, V.; FILHO, A.A.S. Antiprotozoal, Schistosomicidal, and Antimicrobial Activities of the Essential Oil from the Leaves of *Baccharis dracunculifolia*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 7, p. 993-1001, 2010.

PARK, M. J.; GWAK, K. S.; YANG, I.; KIM, K. W.; JEUNG, E. B.; CHANG, J. W.; CHOI, I. G. Effect of citral, eugenol, nerolidol and α -terpineol on the ultrastructural changes of *Trichophyton mentagrophytes*. **Fitoterapia**, v. 80, p. 290– 296, 2009.

PAULA, J. A. M.; PAULA, J. R.; BARA, M. T. F.; REZENDE, M. H.; FERREIRA, H. D. Estudo farmacognóstico das folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L. R. Landrum – Myrtaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 265-278, 2008.

PAULA, J. A. M.; PAULA, J. R.; BARA, FERRI, P.H.; SANTOS, C.; SILVA, L. H. S. Chemical Differences in the Essential Oil of *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L. R. Landrum Leaves from Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, v. 22, p. 555-557, 2010.

PAULA, J. A. M.; FERRI, P.H.; BARA, M. T. F.; TRESVENZOL, L. M. F.; SÁ, F. A. S., PAULA, J. R. Intraspecific chemical variability in the essential oils of *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L.R. Landrum (Myrtaceae). **Biochemical Systematics Ecology**, v. 39, n. 4-6, p. 643-650, 2011.

PEREIRA, F. O. **Atividade antifúngica do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor sobre dermatófitos do gênero *Tricophyton***. 2009. 143f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa/Paraíba, 2009.

PEREIRA, C. S.; BELO, R. S. A.; KHOURI, S., CARDOSO, M. A. G. Desenvolvimento de uma formulação farmacêutica utilizando óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*. In: XIII ENCONTRO LATINO AMERICANO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E IX ENCONTRO LATINO AMERICANO DE PÓS-GRADUAÇÃO – UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA, 2009. **Anais eletrônicos...** Disponível em: <http://www.inicepg.univap.br/cd/INIC_2009/anais/arquivos/0659_1319_02.pdf>. Acesso em: 21 mai. 2015.

PINTO JUNIOR, A. R.; CARVALHO, R. I. N. de; PELLICO NETTO, S.; WEBER, S. H.; SOUZA, E. de; FURIATTI, R. S. Bioatividade de óleos essenciais de sassafrás e eucalipto em cascudinho. **Ciência Rural**, v. 40, n. 3, p. 637-643, 2010.

PIRES, D. C.; GONÇALVES, G. M. S. Obtenção e aplicação do óleo essencial de *Thymus vulgaris* em formulações cosméticas. In: XVI ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E I ENCONTRO DE INICIAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO E INOVAÇÃO DA PUC-CAMPINAS, 2011, Campinas. **Anais eletrônicos...** Campinas: PUC-CAMPINAS, 2011. Disponível em: <https://www.puc-campinas.edu.br/websist/portal/pesquisa/ic/pic2011/resumos/2011830_153624_494403444_reseu.pdf> . Acesso em: 12 ago. 2014.

PONNUNSAMY, K.; PETCHIAMMAL, C.; MOHANKUMAR, R.; HOPPER, W. *In vitro* antifungal activity of indirubin isolated from a South Indian ethnomedicinal plant *Wrightia tinctoria* R. Br. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 132, p. 349-354, 2010.

PRYOR, R. D.; JOHNSON, L. A. S. A classification of the *Eucalyptus*. Camberra: The Australian National University. 1971. 101p.

QUINN, P. J.; MARKEY, B.K.; CARTER, M.E.; DONNELLY, W.J.C.; LEONARD, F.C.; MAGUIRE, D. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infeciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005. p. 219-228.

RAUT, J. S.; KARUPPAYIL, S. M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 250-264, 2014.

RITTER, L. M. O.; RIBEIRO, M. C.; MORO, R. S. Composição florística e fitofisionomia de remanescentes disjuntos de Cerrado nos Campos Gerais, PR, Brasil – limite austral do bioma. **Biota Neotropica**. v.10, n. 3, p. 379-414, 2009.

SAENZ, F. J. C. Capítulo 12: Identificación de hongos dermatofitos. In: PEMÁN, J.; MAZUELOS, E. M.; CALVO, M. C. R. Guia Práctica de Identificación y Diagnóstico em Micología Clínica. **Revista Iberoamericana de Micología**, Bilbao, 2001.

SALAMA, N. N.; MOHAMMAD, M. A.; FATTAH, T. A. Thermal behavior study and decomposition kinetics of amisulpride under non-isothermal and isothermal conditions. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 120, p. 953-958, 2015.

SANTOS, A. C. A.; ROSSATO, M.; SERAFINI, L. A.; BUENO, M.; CRIPPA, L. B.; SARTORI, V. C. *et al.* Efeito fungicida dos óleos essenciais de *Schinus molle* L. e *Schinus terebinthifolius* Raddi, Anacardiaceae, do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 2, p. 154-159, 2010.

SANTOS, J. L. dos; COELHO, M. P. P.; NAPPI, B. P. Diagnóstico laboratorial das dermatofitoses. **Revista Brasileira Análises Clínicas**, v. 34, n. 1, p. 3-6, 2002.

SCOTT, D.W.; MILLER, W.H.; GRIFFIN, C.E. **Fungal skin diseases**. In: Muller and Kirk's Small Animal Dermatology. 6th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co., 2001a, p.336-361.

SCOTT, D.W.; MILLER, W.H.; GRIFFIN, C.E. **Structure and Function of the skin**. In: Muller and Kirk's Small Animal Dermatology. 6th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co., 2001b, p.01-70.

SCOTT, D.W.; MILLER, W.H.; GRIFFIN, C.E. **Diagnostic Methods**. In: Muller and Kirk's Small Animal Dermatology. 6th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co., 2001c, p. 71-206.

SHEHATA, A. S.; MUKHERJEE, P. K.; GHANNOUM, M. A. Comparison between the Standardized Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M38-A2 and a bis (2-methoxy-4-nitro-5-2 [(sulphenylamino) carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide (XTT)-Based Methods for Testing Antifungal Susceptibility of Dermatophytes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 11, p. 3668–3671, 2008.

SHI, J.; ZHANG, H.; ZHANG, Z.; ZHANG, G.; GAO, A.; XIANG, S. Synergistic Effects of Tetrandrine on the Antifungal Activity of Topical Ketoconazole Cream in the Treatment of Dermatophytoses: A Clinical Trial. **Chinese Journal of Integrative Medicine**, v. 17, n. 7, p. 499-504, 2011.

SIDRIM, J. J.; ROCHA, M. F. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 388 p.

SILVA, M. D.; BATISTA, L. R.; REZENDE, E. F.; FUNGARO, M. H. P.; SARTORI, D.; ALVES, E. Identification of fungi the genus *Aspergillus* section Nigri using polyphasic taxonomy. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 761-773, 2011.

SILVA, E. C.; PAOLA, M. V. R.; MATOS, J. R. Análise térmica aplicada à cosmetologia. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.43, n.3, p.347-356, 2007.

SIMMONS, D.; PARSON, R. F. Seasonal variation in the volatile leaf oils of two *Eucalyptus* species. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 15, n. 2, p. 204-215, 1997.

SOUZA, L. K. H e; OLIVEIRA, C. M. A de; FERRI, P.H.; SANTOS, S. C.; JÚNIOR, J. G. O.; MIRANDA, A.T.B.; LIÃO, L. M.; SILVA, M. R. R. Antifungal Properties of Brazilian Cerrado Plants. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 247-249, 2002.

SOUZA, T. M.; FIGHERA, R. A.; SCHMIDT, C.; RÉQUIA, A. H.; BRUM, A. S.; MARTINS, T. B.; BARROS, C. S. L. Prevalência das dermatopatias não-tumorais em cães do município de Santa Maria, Rio Grande do Sul (2005-2008). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 2, p. 157-162, 2009a.

SOUZA, T. M.; FIGHERA, R. A.; KOMMERS, G.D.; BARROS, C.S.L. Aspectos histológicos da pele de cães e gatos como ferramenta para dermatopatologia **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 2, p. 177-190, 2009b.

SRINIVASAN, D.; NATHAN, S.; SURESH, T.; PERUMALSAMY, P.L. Antimicrobial activity of certain Indian medicinal plants used in folkloric medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 74, p. 217-220, 2001.

SUBUDHI, E.; MOHANTY, S.; KUANAR, A.; PANDA, M.K. In vitro antimicrobial study of plant essential oils and extracts. **The Internet Journal of Microbiology**. v. 8, n. 1, p. 01-06, 2010.

SUMMERBELL, R. C.; ROSENTHAL, S. A.; KANE, J. Rapid Method for Differentiation of *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, and Related Dermatophyte Species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 26, n. 11, p. 2279-2282, 1988.

THE UNIVERSITY OF ADELAIDE. **Micology Online**, 2011. Disponível em: <<http://www.mycology.adelaide.edu.au/gallery/index.html>>. Acesso em: 31 out. 2011.

VIEIRA, A. C. Q. de M.; MARQUES, G. S.; MELO, C. M. de; SILVA, K. E. R. da; ROLIM, L. A.; LIMA, M. do C. A. de, GALDINO, S. L.; PITTA, I. da R.; ROLIM NETO, P. J. Physical–chemical characterization of new anti-inflammatory agent (LPSF/GQ-130) and evaluation of its thermal compatibility with pharmaceutical excipients. **J Therm Anal Calorim**, v. 115, p. 2339-2349, 2014.

VOJIN, G. Application of natural and synthetic eugenol and essential oils from cloves, pimentos and cinnamon leaves for the prevention and treatment of animal diseases caused by bacteria, fungi and parasites. **International Patent WO/2005/074965**, 2005.

VOSS-RECH, D.; KLEIN, C. S., TECHIO, V. H.; SCHEUERMANN, G. N.; RECH, G. FIORENTIN, L. Antibacterial activity of vegetal extracts against serovars of *Salmonella*. **Ciência Rural**, v. 41, n. 2, p. 314-320, 2011.

WALLER, S. B.; GOMES, A. dos R.; CABANA, Â. L.; FARIA, R. de O.; MEIRELES, M. C. A.; MELLO, J. R. B. de. Microsporose canina e humana – um relato de caso zoonótico. **Science and Animal Health**, v. 2, n. 2, p. 137-146, 2014.

WEITZMAN, I. SUMMERBELL, R. C. The dermatophytes. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8, p. 240-259, 1995.

WISS, J.; SCHMUCK, J. Cleaning validation using thermogravimetry. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 104, p. 315-321, 2011.

YOKOMIZO, N.K.S.; NAKAOKA-SAKITA, M. Atividade antimicrobiana e rendimento do óleo essencial de *Pimenta pseudocaryophyllus* var. *pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum, Myrtaceae. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v.16, n.3, p.513-520, 2014.

YOSHIDA, M. I.; OLIVEIRA, M. A.; GOMES, E. C. L.; MUSSEL, W. N.; CASTRO, W. V.; SOARES, C. D. V. Thermal characterization of lovastatin in pharmaceutical formulations. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 106, p. 657-664, 2011.

ZHANG, A. Y.; CAMP, W. L.; ELEWSKI, B. E. Advances in Topical and Systemic Antifungals. **Dermatologic Clinics**, v. 25, p. 165-183, 2007.

ZYL, R.L.V.; SEATLHOLO, S.T.; VUUREN, S.F.V.; VILJOEN, A. Pharmacological Interactions of Essential Oil Constituents on the Viability of Microorganisms. **Natural Product Communications**, v. 5, n. 9, p. 1381-1386, 2010.

ANEXO A

Laudo da cepa *Microsporium canis*



Laboratório de Microrganismos de Referência

Informe de Fungo de Referência

21/5/2010

MICROORGANISMO *Microsporium canis*

INCQS 40045

ORIGEM ATCC 32903

LOTE 050940045

HISTÓRIA

ISOLAMENTO gato persa e seu dono, Japão

MEIO DE CULTURA INDICADO Sab 2% glicose

TEMPERATURA (em Graus Celsius): 26

TEMPO DE INCUBAÇÃO (em horas): 432

RESPIRAÇÃO Aeróbica

APLICAÇÃO

SOROLOGIA

PRODUÇÃO DE ENZIMAS

PRODUÇÃO DE TOXINAS

VALIDADE: Indeterminada se mantida a -20 °C (referente a material liofilizado).

OBSERVAÇÕES: O lote é constituído de nove dígitos distribuídos da seguinte forma: os dois primeiros dígitos indicam o mês, os dois seguintes o ano de produção e os cinco últimos dígitos o número da cepa INCQS.

REFERÊNCIAS

Laudo da cepa *Microsporium gypseum*

Laboratório de Microrganismos de Referência

Informe de Fungo de Referência

21/5/2010

MICROORGANISMO *Microsporium gypseum***INCQS** 40005**ORIGEM** ATCC 14683**LOTE** 060540005**HISTÓRIA** ATCC<<<--R.I. Mateles <<<--Tropical Products Inst.
strain TPI**ISOLAMENTO****MEIO DE CULTURA INDICADO** Sabouraud Modificado (Emmons)**TEMPERATURA** (em Graus Celsius): 18**TEMPO DE INCUBAÇÃO** (em horas): 240**RESPIRAÇÃO** Aeróbica**APLICAÇÃO** Ensaio de griseofulvina.**SOROLOGIA****PRODUÇÃO DE ENZIMAS****PRODUÇÃO DE TOXINAS****VALIDADE:** Indeterminada se mantida a -20 °C (referente a material liofilizado).**OBSERVAÇÕES:** O lote é constituído de nove dígitos distribuídos da seguinte forma: os dois primeiros dígitos indicam o mês, os dois seguintes o ano de produção e os cinco últimos dígitos o número da cepa INCQS.**REFERÊNCIAS**

Laudo das cepas *Trichophyton mentagrophytes*



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde



Laboratório de Microrganismos de Referência

Informe de Fungo de Referência

21/5/2010

MICROORGANISMO *Trichophyton mentagrophytes*

INCQS 40117

ORIGEM ATCC 11480

LOTE 119140117

HISTÓRIA

ISOLAMENTO Dermatofitose de gato, Inglaterra

MEIO DE CULTURA INDICADO Sabouraud 2%

TEMPERATURA (em Graus Celsius): 24

TEMPO DE INCUBAÇÃO (em horas): 288

RESPIRAÇÃO Aeróbica

APLICAÇÃO

SOROLOGIA

PRODUÇÃO DE ENZIMAS

PRODUÇÃO DE TOXINAS

VALIDADE: Indeterminada se mantida a -20 °C (referente a material liofilizado).

OBSERVAÇÕES: O lote é constituído de nove dígitos distribuídos da seguinte forma: os dois primeiros dígitos indicam o mês, os dois seguintes o ano de produção e os cinco últimos dígitos o número da cepa INCQS.

REFERÊNCIAS