

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

CÉSAR AUGUSTO CANESCHI

**POTENCIAL ANTIFÚNGICO DO ÓLEO ESSENCIAL DE
Baccharis trimera Less (D.C.)**

Juiz de Fora
2013

CÉSAR AUGUSTO CANESCHI

**POTENCIAL ANTIFÚNGICO DO ÓLEO ESSENCIAL DE
Baccharis trimera Less (D.C.)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: área de concentração: Genética e Biotecnologia, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

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

Juiz de Fora

2013

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Caneschi, César Augusto.
Potencial antifúngico do óleo essencial de *Baccharis trimera* Less (D.C.) / César Augusto Caneschi. -- 2013.
86 f. : il.

Orientadora: Nádia Rezende Barbosa Raposo
Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2013.

1. Dermatófitos. 2. *Baccharis*. 3. Microscopia eletrônica de varredura. 4. Plantas medicinais. I. Raposo, Nádia Rezende Barbosa, orient. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

POTENCIAL ANTIFÚNGICO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Baccharis trimera* Less (D.C.)

CÉSAR AUGUSTO CANESCHI

Dissertação de Mestrado submetida à banca examinadora do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Área: Genética e Biotecnologia, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em: ___/___/___:

Banca examinadora:

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

Prof^a. Dr^a. Pâmela Souza Silva
Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde de Juiz de Fora

Prof. Dr. Murilo Gomes Oliveira
Universidade Federal de Juiz de Fora

DEDICATÓRIA

“Dedico esta Dissertação a minha família, em especial ao meu pai Sebastião de Paulo Caneschi e minha mãe Maria Luiza Caneschi por terem me concedido a oportunidade de realizar o mestrado”.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela força e coragem para nunca desistir dos desafios.

Agradeço aos meus pais por todo carinho, paciência, estímulo, educação e suporte para que eu pudesse chegar a mais esta etapa.

Agradeço ao meu pai Sebastião que me ensinou desde sempre a acreditar e buscar meus sonhos, meus objetivos, aonde quer que estejam, com verdade, persistência e ética. Agradecer a Maria Luiza, minha mãe, é lembrar de todo o amor possível, dedicação e carinho, que me proporciona para seguir em frente.

Agradeço a meu irmão Dr. Fernando que sempre foi fonte de inspiração na minha vida acadêmica.

Agradeço à minha orientadora, professora Dr^a Nádia, por ter me aceito como mestrando e possibilitado meu ingresso nesta jornada. Obrigado pela paciência e transmissão de seu grande conhecimento.

Agradeço ao Rafael que iniciou todo este trabalho.

Aos amigos que me auxiliam continuamente nos trabalhos, em especial à Fran, parceira de bancada.

À Dani e Edilene que me auxiliaram direta e indiretamente na realização das análises.

Aos amigos do NIQUA.

Ao Professor João Picinini que sempre me apoiou, incentivou e confiou em meu trabalho.

À Professora Beth, pelos momentos divertidos e pelo apoio e incentivo.

À FIOCRUZ e Fundação André Tosello que nos cedeu as linhagens fúngicas.

À CAPES pelo financiamento de minha bolsa de estudos.

Enfim, a todos que me ajudaram e torceram pelo sucesso deste trabalho e por este momento.

*“Não importa onde você parou... em que momento da vida você
cansou...
O que importa é que sempre é possível e necessário recomeçar.
Recomeçar é dar uma nova chance a si mesmo...
É renovar as esperanças na vida e, o mais importante...
Acreditar em você de novo. Se desejarmos fortemente o melhor e...
Principalmente, lutarmos pelo melhor...
O melhor vai se instalar em nossa vida.
Porque sou do tamanho daquilo que vejo. E não do tamanho da
minha altura.”*

Carlos Drummond de Andrade

RESUMO

As dermatofitoses são infecções fúngicas que acometem o ser humano e os animais. São causadas principalmente por fungos filamentosos dermatófitos, cuja presença provoca alterações nos tecidos queratinizados. O tratamento destas doenças é longo e recidivas são frequentes. Isto posto, os objetivos deste trabalho foram identificar os componentes do óleo essencial de *Baccharis trimera* Less (D.C.) e investigar *in vitro* seu potencial antifúngico frente a seis linhagens: *Trichophyton rubrum* CCT 5507 URM 1666, *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533, *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 11481 e *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 11480, *Microsporum gypseum* ATCC 14683 e *Microsporum canis* ATCC 32903. Foi realizada a análise da composição química do óleo essencial por cromatografia gasosa (CG) e os ensaios antifúngicos por meio da triagem microbiológica, da determinação das concentrações inibitória mínima (CIM) e fungicida mínima (CFM). Foi empregada a microscopia eletrônica de varredura (MEV) a fim de avaliar as alterações morfológicas nas linhagens fúngicas de interesse submetidas aos tratamentos propostos. Os resultados cromatográficos demonstraram a presença de vinte constituintes, sendo o β -pineno (23,4%) o majoritário. Os valores da CIM para o óleo essencial de *B. trimera* foram de 0,03 a 125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para cinco linhagens de fungos filamentosos avaliados com destaque para sua ação frente a linhagem de *T. rubrum* CCT 5507 URM 1666 que teve seu crescimento inibido na menor concentração. Para o *T. mentagrophytes* ATCC 11481 a CIM foi $\geq 1.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$. A ação deste óleo essencial foi considerada fungicida após realização da CFM que ficou na faixa de 0,06 a 125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Através das eletromicrografias foi possível evidenciar alterações morfológicas nas estruturas fúngicas das cinco espécies submetidas à ação do óleo essencial de *B. trimera*. Os resultados apresentados neste trabalho permitem atribuir ao óleo essencial de carqueja ação antifúngica frente a fungos filamentosos dermatófitos, o que pode representar uma nova alternativa para o tratamento de dermatofitoses.

Palavras-chave: Dermatófitos, *Baccharis*, microscopia eletrônica de varredura, plantas medicinais

ABSTRACT

Dermatophytoses are fungal infections that affect humans and animals. These are mainly caused by filamentous fungi dermatophytes, whose presence causes changes in keratinized tissues. The treatment of this illness is long, and recurrences are frequently detected. In this context, the purpose of the present work was to identify the components of the essential oil of *Baccharis trimera* Less (DC) and to investigate their *in vitro* antifungal activity against six strains: *Trichophyton rubrum* CCT 5507 URM 1666, *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533, *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 11481 e *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 11480, *Microsporum gypseum* ATCC 14683 e *Microsporum canis* ATCC 32903. The chemical composition of the oil was subjected to analysis by gas chromatography (GC) and the antifungal assay by microbial screening, determining its minimum inhibitory concentrations (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC). Scanning electron microscopy (SEM) was used to investigate morphological changes in the strains of interest submitted to the treatments. The chromatography results demonstrated the presence of twenty compounds, with β -pinene being responsible for the majority (23.4%) of its constitution. The MIC values for the essential oil of *B. trimera* were 0.03 to 125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for five strains of filamentous fungi evaluated highlighting on the strain of action against *T. rubrum* CCT 5507 URM 1666 that had their growth inhibited at lower concentrations. For *T. mentagrophytes* ATCC 11481 the MIC was $\geq 1,000 \mu\text{g.mL}^{-1}$. The oil was considered to have fungicide potential after completion of CFM which was in the range from 0.06 to 125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Through the images of scanning electron microscopy it was possible to verify the morphological changes in the structures of the five fungal species subjected to the action of the essential oil of *B. trimera*. The results presented in this work allows us to assign the essential oil of carqueja as having antifungal activity against filamentous fungi dermatophytes, which may represent a new alternative for the treatment of dermatophytoses.

Keywords: Dermatophytes, *Baccharis*, microscopy electron of scanning, medicinal plants.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Aspecto de uma macrocolônia fúngica.	22
Figura 2: Colônia de <i>T. rubrum</i> .	29
Figura 3: Aspectos micromorfológicos de <i>T. rubrum</i> .	29
Figura 4: Colônias de <i>T. mentagrophytes</i> .	30
Figura 5: Aspectos micromorfológicos de <i>T. mentagrophytes</i> .	30
Figura 6: Colônias de <i>M. canis</i> .	32
Figura 7: Aspectos micromorfológicos de <i>M. canis</i> .	32
Figura 8: Colônias de <i>M. gypseum</i> .	33
Figura 9: Aspectos micromorfológicos de <i>M. gypseum</i> .	33
Figura 10: Colônias de <i>Epidermophyton floccosum</i> .	34
Figura 11: Aspectos micromorfológicos de <i>E. floccosum</i> .	34
Figura 12: Estrutura química do cetoconazol.	38
Figura 13: Estrutura química da terbinafina.	39
Figura 14: Fotos de <i>Baccharis trimera</i> .	43
Figura 15: Esquema do microcultivo em lâmina de vidro.	47
Figura 16: Imagem de microcultura de <i>Trichophyton rubrum</i> CCT 5507 URM 1666.	48
Figura 17: Imagem de microcultura de <i>Trichophyton mentagrophytes</i> .	48
Figura 18: Imagem de microcultura de <i>Microsporum gypseum</i> ATCC 14683.	48
Figura 19: Imagem de microcultura de <i>Microsporum canis</i> ATCC 32903.	49
Figura 20: Perfil cromatográfico do óleo essencial de <i>Baccharis trimera</i> .	56
Figura 21: Eletromicrografias de fragmentos de <i>T. rubrum</i> CCT 5507 URM 1666.	61
Figura 22: Eletromicrografias de fragmentos de <i>T. mentagrophytes</i> ATCC 9533.	63
Figura 23: Eletromicrografias de fragmentos de <i>M. canis</i> ATCC 32903.	65
Figura 24: Eletromicrografias de fragmentos de <i>M. gypseum</i> ATCC 14683.	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição das soluções estoques.	50
Tabela 2: Soluções empregadas na triagem microbiológica.	50
Tabela 3: Composição das soluções estoque das substâncias químicas de interesse.	52
Tabela 4: Soluções empregadas no preparo da microplaca.	53
Tabela 5: Perfil químico do óleo essencial de <i>Baccharis trimera</i> .	57
Tabela 6: Suscetibilidade <i>in vitro</i> de fungos filamentosos dermatófitos frente ao óleo essencial de <i>B. trimera</i> e aos fármacos de referência.	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Ag	Ag
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
Al	Alumínio
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
As	Arsênio
ATP	Adenosina Tri-fosfato
Ba	Bário
<i>B. trimera</i>	<i>Baccharis trimera</i>
C	Carbono
Ca	Cálcio
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
Cd	Cádmio
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CG	Cromatografia Gasosa
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
cm	Centímetro
cm ²	Centímetro quadrado
CN	Controle negativo
CP	Controle positivo
Cs	Césio
Cu	Cobre
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
FB	Farmacopéia Brasileira
Fe	Ferro
FR	Fármaco de referência
FID	Detector de Ionização de Chama
g	Gramma
Hg	Mercúrio
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana

K	Potássio
KOH	Hidróxido de potássio
Kv	kilovolt
L	Litro
Li	Lítio
m	Metro
M	Molar
<i>M. canis</i>	<i>Microsporum canis</i>
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
Mg	Magnésio
<i>M. gypseum</i>	<i>Microsporum gypseum</i>
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MOPS	Ácido morfolinopropano-sulfônico
N	Nitrogênio
NaOH	Hidróxido de sódio
nm	Nanômetro
OE	Óleo essencial
OSB	Onicomiose branca superficial
OSDL	Onicomiose subungueal distal e lateral
OsO ₄	Tetróxido de ósmio
OSP	Onicomiose subungueal proximal
P	Fósforo
Pb	Chumbo
pH	Potencial hidrogeniônico
p/v	Peso/volume
RNA	Ácido ribonucléico
S	Enxofre
SDA	Ágar <i>Sabouraud</i> dextrose
SE	Solução estoque
SDB	Caldo <i>Sabouraud</i> dextrose
<i>T. mentagrophytes</i>	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>
<i>T. rubrum</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>

UFC	Unidade formadora de colônia
v/v	Volume/volume
Zn	Zinco
°C	Graus Célcius
µg	Micrograma
%	Porcentagem
µm	Micrômetro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	Objetivos	18
2.1	GERAL.....	18
2.2	ESPECÍFICOS.....	18
3	REVISÃO DA LITERATURA	19
3.1	BIOLOGIA DOS FUNGOS.....	19
3.1.1	Morfologia e constituintes químicos	19
3.1.2	Características primárias dos fungos	21
3.1.3	Características secundárias dos fungos.....	22
3.1.4	Importância médica.....	22
3.2	DERMATOFITOSSES.....	24
3.2.1	Onicomicose	25
3.2.2	Fungos filamentosos dermatófitos.....	27
3.2.3	Diagnóstico laboratorial.....	34
3.2.3.1	Coleta e processamento do material clínico.....	35
3.2.3.2	Microscopia direta	35
3.2.3.3	Diagnóstico por cultura microbiológica	35
3.2.3.4	Diagnóstico por análise micromorfológica	36
3.2.3.5	Teste da urease	36
3.2.3.6	Diagnóstico por análise molecular.....	36
3.2.4	Tratamento farmacológico das dermatofitoses.....	37
3.2.4.1	Derivados azólicos	38
3.2.4.2	Alilaminas	38
3.2.4.3	Terapias tópicas.....	39
3.2.5	Resistência microbiana aos agentes antifúngicos	40
3.3	PRODUTOS NATURAIS PARA O TRATAMENTO DA ONICOMICOSE	41
3.4	<i>BACCHARIS TRIMERA</i> LESS (D.C.)	42
4	MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1	ÓLEO ESSENCIAL DE <i>BACCHARIS TRIMERA</i> LESS (D.C.).....	45

4.2	CROMATOGRAFIA GASOSA.....	45
4.3	LINHAGENS FÚNGICAS.....	45
4.4	REALIZAÇÃO DO MICROCULTIVO.....	46
4.5	ATIVIDADE ANTIFÚNGICA.....	49
4.5.1	Triagem microbiológica	49
4.5.2	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	50
4.5.2.1	Padronização do inóculo	51
4.5.2.2	Diluição dos agentes antifúngicos	52
4.5.2.3	Preparo da microplaca	53
4.5.3	Concentração fungicida mínima (CFM)	54
4.6	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	54
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO -----	56
6	CONCLUSÃO -----	69
	REFERÊNCIAS -----	70
	ANEXOS -----	84

1 INTRODUÇÃO

Entre as infecções fúngicas que acometem o ser humano e os animais temos as dermatofitoses. Trata-se de infecções fúngicas superficiais que afetam tecidos queratinizados como unhas, pele e pelos, sendo causada por fungos dermatófitos pertencentes aos gêneros *Tricophyton spp*, *Microsporum spp* e *Epidermophyton spp* (SEKER, DOGAN, 2011; WISSELINK; ZANTEN; KOOISTRA-SMID, 2011). São considerados a principal causa de micoses superficiais, sendo um problema de saúde pública, sendo a causa frequente de visita ao dermatologista (KHOSRAVI et al., 2013; PELEGRINI et al., 2009).

Nos últimos anos, a incidência de dermatofitoses apresentou crescimento significativo, principalmente entre indivíduos com sistema imunológico deprimidos, crianças e idosos (KHOSRAVI et al., 2013). Estudos nesta área têm mostrado que o aumento desta incidência tem inúmeras causas como população susceptível, aspectos sociais e culturais associados ao esporte, ao uso de calçados com pouca ventilação, a utilização de piscinas públicas e contato com animais portadores dos agentes infecciosos (ALONSO, GIJÓN e PÉREZ, 2010; FRAKI et al., 1997; GABURRI, 2007; WELSH, VERA-CABRERA e WELSH, 2010).

Os dermatófitos também acometem animais domésticos em um percentual de 7 a 40% das dermatopatias em cães e de 9 a 54,8% em gatos. Podem afetar ainda coelhos, aves e animais de grande porte, como equinos e bovinos (FRANCO, 2012).

O tratamento disponível para as dermatofitoses proporciona diversos problemas relacionados à sua toxicidade, reduzida eficácia e penetração e inúmeros casos de recidivas (KHOSRAVI et al., 2013).

Com o objetivo de superar tal problema, inúmeras pesquisas vêm sendo desenvolvidas em busca de novos produtos com ação antifúngica. Dessa forma, pesquisadores têm se engajado em estudos com plantas medicinais, levando em consideração aspectos botânicos, etnofarmacológicos, constituintes químicos e atividade biológica, uma vez que são consideradas uma fonte de novos compostos com grande potencial farmacológico.

Entre as inúmeras espécies vegetais a *Baccharis trimera* Less (D.C.) foi escolhida para a realização do estudo por se enquadrar entre um grupo de plantas originária da América do Sul, possivelmente no Brasil, apresentar fácil cultivo em solos pobres em nutrientes e por apresentar reduzidos estudos científicos a respeito da atividade antifúngica do seu óleo essencial frente a fungos filamentosos, atribuindo ao trabalho características inéditas.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Investigar o potencial antifúngico *in vitro* do óleo essencial de *Baccharis trimera* Less (D.C.) contra linhagens dos de fungos filamentosos dermatófitos.

2.2 ESPECÍFICOS

Caracterizar o óleo essencial de *Baccharis trimera* Less (D.C.) por cromatografia gasosa (CG).

Realizar teste preliminar do poder antifúngico do óleo essencial de *Baccharis trimera*.

Determinar a concentração inibitória mínima e concentração fungicida mínima do óleo essencial de *Baccharis trimera*.

Avaliar ao microscópio eletrônico de varredura as alterações marcantes nas estruturas morfológicas das principais linhagens de fungos filamentosos dermatófitos envolvidas neste estudo proporcionadas pelo óleo essencial de *B. trimera* e compará-las com as produzidas pelos os fármacos de referência.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 BIOLOGIA DOS FUNGOS

3.1.1 Morfologia e constituintes químicos

Os fungos pertencem a um grupo diversificado de organismos que ocupam muitos nichos no ambiente, em geral são de vida livre e abundantes na natureza. São eucariontes, sapróbios, simbiontes, comensais ou parasitas (ESTEVES, CABRITA e NOBRE, 1990; LACAZ, PORTO e MARTINS, 1984; MURRAY, ROSENTHAL e PFALLER, 2006; SIDRIM e ROCHA, 2004).

Apresentam melhor crescimento em pH em torno de 6,0. Não são muito exigentes quanto à temperatura, mas a maioria desenvolve-se melhor entre 25 a 30°C em ambiente úmido (OLIVEIRA, 1999; SIDRIM e ROCHA, 2004).

Os fungos são cromóparos, quando os pigmentos por eles produzidos se difundem no meio de cultura microbiológica. Cromóforos, quando os pigmentos permanecem no micélio e nos esporos. As culturas apresentam-se com variadas colorações: negra, vermelha, amarela, branca, acastanhada, verde, entre outras tonalidades (ESTEVES, CABRITA e NOBRE, 1990; LARONE, 1995; OLIVEIRA, 1999).

Desprovidos de clorofila, restam duas alternativas aos fungos: o saprofitismo ou o parasitismo. São, portanto, heterotróficos, ao contrário das algas e das plantas, seres clorofilados e autotróficos. Retiram o carbono (C) de que necessitam dos compostos orgânicos vivos ou mortos, das proteínas, dos carboidratos, dos lipídios e dos álcoois. Retiram o nitrogênio (N) de nitratos, de sais de amônio, de ácidos aminados, de uréia, da peptona e do ácido glutâmico (KAVANAGH, 2005; OLIVEIRA, 1999).

Em relação ao oxigênio, os fungos são em sua maioria aeróbios, podendo desenvolver-se em anaerobiose, sob certas condições. Outros elementos químicos fundamentais são: potássio (K); magnésio (Mg); ferro (Fe);

cobre (Cu); fósforo (P); zinco (Zn); enxofre (S) e cálcio (Ca) (KAVANAGH, 2005; OLIVEIRA, 1999).

O P é fundamental para a biossíntese de ácidos nucleicos, fosfolipídios, ATP e glicofosfatos. Por outro lado, alguns minerais como prata (Ag), arsênio (As), bário (Ba), céσιο (Cs), cádmio (Cd), mercúrio (Hg), lítio (Li) e chumbo (Pb) são tóxicos por afetarem o crescimento de fungos em concentrações superiores a 100 M (KAVANAGH, 2005).

Apresentam como principais estruturas celulares: parede celular de quitina, plasmalema (composta de glicoproteínas, fosfolipídios e ergosterol), mitocôndrias, retículo endoplasmático, microfibrilas, macro e microvesículas e núcleo. São heterotróficos e bioquimicamente versáteis, produzindo metabólitos primários e secundários e são divididos em filamentosos e leveduriformes, podendo existir espécies dimórficas (SIDRIM e ROCHA, 2004).

A parede celular representa um exoesqueleto dinamicamente formado protegendo os protoplastos do ambiente externo, além de definir o crescimento celular. É composta por elementos microfibrilares insolúveis em água, quitina e glucanos, mergulhados em matriz amorfa, constituída de polissacarídeos solúveis em água. Em fungos filamentosos a parede celular está intimamente ligada ao processo de crescimento apical (KAVANAGH, 2005; SIDRIM e ROCHA, 2004).

Os lipídios são empregados pelos fungos como fonte de reserva de carbono. A classe de lipídios alifáticos previne a desidratação dos esporos e a proteção contra temperaturas extremas. Já os derivados isoprenóis são substâncias que intervêm no metabolismo secundário, na constituição da membrana, no crescimento e na reprodução sexuada. Há também a presença do esteroide ergosterol, um dos principais componentes da membrana celular fúngica exercendo papel semelhante ao do colesterol nas células animais (SANTOS, 2009; SIDRIM e ROCHA 2004).

O componente da membrana celular do envelope da célula fúngica é composto por uma bicamada fosfolipídica interligada com proteínas globulares, constituindo o mosaico fluido, que dita a entrada de nutrientes e a saída de metabólitos além de representar uma barreira seletiva para sua translocação. Em algumas espécies é possível encontrar melanina na parede celular, conferindo resistência aos raios ultravioleta (KAVANAGH, 2005).

No citoplasma ainda podemos encontrar estruturas como retículo endoplasmático, aparelho de Golgi, mitocôndrias, vacúolos, ribossomos e microfilamentos associados aos microtúbulos, os quais compõem o citoesqueleto fúngico. O núcleo apresenta tamanho reduzido quando comparado a outras células eucariotas, assim como menor quantidade de DNA, o qual pode ser encontrado ainda em mitocôndrias e plasmídeos dispersos pelo citoplasma (SIDRIM e ROCHA, 2004).

Todas as espécies fúngicas se reproduzem por processos assexuados, e a maioria pode se reproduzir por mecanismos sexuados (SIDRIM e ROCHA, 2004).

3.1.2 Características primárias dos fungos

Por meio da observação microscópica das diversas espécies de fungos podemos encontrar seres unicelulares como as leveduras a formas complexas chamada de filamentos, ou ainda seres dimórficos. A forma filamentosa é constituída de estruturas tubulares denominadas hifas e o conjunto destas compõe o micélio (SIDRIM e ROCHA, 2004).

O grupo dimórfico pode ser encontrado na forma leveduriforme, quando exposto à temperatura entre 37 – 39°C e filamentosa na temperatura ambiente (25 – 28°C) (SIDRIM e ROCHA, 2004).

As hifas são estruturas ramificadas, pluricelulares. Os septos servem para compartimentar as hifas, mas são tipicamente perfurados, permitindo assim, passagem e comunicação de citoplasma ou mesmo protoplasma entre os compartimentos por meio dos poros. No entanto, os poros dos septos podem ser bloqueados por estruturas denominadas Woronin, que isolam a estrutura lesada do resto do filamento fúngico, preservando a integridade do micélio (KAVANAGH, 2005; MURRAY, ROSENTHAL e PFALLER, 2006; SIDRIM e ROCHA, 2004).

Com o crescimento das hifas há formação da colônia fúngica que pode ser visualizada a olho nu. São constituídas por quatro zonas concêntricas (Figura 1). A região mais periférica apresenta ramificações monopodiais, simpodiais e dicotômicas. Caminhando para o centro da colônia temos a região de crescimento da biomassa que circunda a zona de frutificação, onde é

possível encontrar as estruturas de reprodução. A região central é a mais velha, onde o crescimento fúngico está muito reduzido e está em fase de declínio (SIDRIM e ROCHA, 2004).

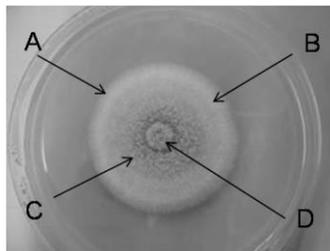


Figura 1: Aspecto de uma macrocolônia fúngica.

A. zona periférica; B. zona de crescimento; C. zona de frutificação; D. zona central.

Fonte: União Brasileira de Educação e Cultura (2011).

3.1.3 Características secundárias dos fungos

As características secundárias são estruturas, características marcantes, pontos chave para a diferenciação e identificação de uma espécie fúngica. Entre elas estão a micromorfologia, padrão enzimático e necessidades nutricionais (LACAZ, PORTO e MARTINS, 1984; SIDRIM e ROCHA, 2004).

Entre os fungos filamentosos as estruturas de identificação são conhecidas como estruturas de frutificação e de ornamentação. As primeiras são responsáveis pela formação de células, conidiogênicas e esporogênicas, necessárias na reprodução assexuada dos fungos filamentosos e dimórficos. As conidiogênicas vão originar os conídios (livres para se destacar das hifas e propagar a espécie), e as esporogênicas produzem os esporos (envolto por uma bolsa chamada esporângio) (LARONE, 1995; SIDRIM e ROCHA, 2004).

As estruturas de ornamentação podem estar presentes em muitas espécies fúngicas e auxiliar em sua identificação. Apesar de não serem específicas de nenhuma espécie, podem ajudar na caracterização final (LACAZ, PORTO e MARTINS, 1984; SIDRIM e ROCHA, 2004).

3.1.4 Importância médica

A maioria dos fungos vive nos mais diversos substratos da natureza e podem ser isolados do solo seco e úmidos, troncos apodrecidos ou nas frutas, leite, água, poeira, entre outros locais. Podem ser classificados como geofílicos

(preferência para o solo), zoofílicos (animais) e antropofílicos (seres humanos) (OLIVEIRA, 1999; SIDRIM e ROCHA, 2004).

São responsáveis por inúmeras infecções/doenças que afetam diversos seres vivos como plantas, animais e seres humanos. Genericamente, são conhecidas como micoses, as quais ocupam lugar de destaque na patologia tropical. Grande número de suas manifestações ocorre em nível superficial, na pele, unhas, cabelos e pelos; no entanto, podem atingir órgãos internos como os pulmões (LACAZ, PORTO e MARTINS, 1984; MURRAY, ROSENTHAL e PFALLER, 2006).

O início de uma micose ocorre com a implantação de um fungo apto ao parasitismo, o qual por meio de toxinas, mecanicamente ou através de outros metabólitos determinam o processo inflamatório (LACAZ, PORTO e MARTINS, 1984, MURRAY, ROSENTHAL e PFALLER, 2006).

No ser humano, o aparecimento das micoses pode estar relacionado a diversos fatores ambientais e aqueles associados ao indivíduo. Alimentos contaminados, calçados e roupas, práticas esportivas, promiscuidade entre objetos, condições climáticas e de vida, contato com animais e a profissão exercida são considerados fatores externos de grande relevância para se dar início a uma infecção fúngica. Entre os fatores associados ao indivíduo estão as lesões preexistentes, distúrbios no sistema imunológico e hormonal, doenças crônicas como diabetes e AIDS, alterações no pH da pele, sexo, idade, uso de medicamentos como antibióticos, imunossupressores e antineoplásicos, entre outros fatores (BROOKS et al., 2012; MURRAY, ROSENTHAL e PFALLER, 2006).

Podem ser divididas em micoses superficiais, cutâneas, subcutâneas e profundas. As primeiras se localizam nas camadas superficiais da pele e cabelo, são responsáveis por processos inflamatórios. As micoses cutâneas são infecções que envolvem as camadas mais profundas da epiderme e seus tegumentos, cabelo e unhas. As micoses subcutâneas atingem os tecidos subcutâneos, músculo e fáscia. Por último, as micoses profundas ou sistêmicas atingem principalmente órgãos internos e vísceras, podendo afetar múltiplos tecidos ou órgãos (BROOKS et al., 2012; COPETO, 2010; MURRAY, ROSENTHAL e PFALLER, 2006).

As micoses cutâneas relacionadas à pele e anexos são conhecidas como tinhas, “tineas” ou *ringworm*. Seus principais agentes são os dermatófitos e não-dermatófitos que podem ter origens variadas (OLIVEIRA, 1999; MURRAY, ROSENTHAL e PFALLER, 2006).

Podem localizar-se na pele, pelos, unhas, dobras periungueais e mucosas, entre outras regiões. Trata-se de uma doença na qual a notificação não é obrigatória, impedindo a afirmação de uma exata extensão do problema em nosso meio (BROOKS et al., 2012).

As tinhas são classificadas clinicamente como tinhas de pele (*Tinea pedis*, *Tinea corporis*, *Tinea nigra*, etc), tinhas dos pelos (*Piedra*, Tricomiose nodular axilar), tinhas da pele e dos pelos (*Tinea capitis*, *Tinea barbae* e *Tinea tonsurans*, entre outras) e tinha de unhas (*Tinea unguium* - onicomicose) (ALMEIDA, 2011; BROOKS et al., 2012; MURRAY, ROSENTHAL e PFALLER, 2006; SIDRIM e ROCHA, 2004).

3.2 DERMATOFITOSSES

Os fungos dermatófitos são as maiores causas de micoses superficiais, possuem a habilidade de invadir tecido ricos em queratina e causar as dermatofitoses, a mais comum infecção fúngica (KHOSRAVI et al., 2013)

As dermatofitoses são infecções que acometem as estruturas de queratina da pele, pelo e unhas de seres humanos e animais. A denominação dermatófito é atribuída somente aos fungos que são queratinofílicos (GOMES, 2004). Suas espécies distribuem-se em três gêneros: *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*. As manifestações clínicas decorrentes das dermatofitoses resultam tanto da colonização e multiplicação dos dermatófitos na região acometida, quanto pela consequente reação dos hospedeiros (SANTOS, COELHO e NAPPI, 2002; SEKER e DOGAN, 2011).

A transmissão das dermatofitoses ocorre pelo contato direto com animais e humanos infectados ou através de fômites contaminados, e as formas clínicas variam de acordo com o agente etiológico e o sítio anatômico afetado (PERES et al., 2010).

As espécies de dermatófitos podem ser classificadas em zoofílicas, geofílicas e antropofílicas. As espécies zoofílicas são responsáveis por

aproximadamente 30% das dermatofitoses humanas e geralmente provocam uma inflamação aguda, enquanto que as espécies antropofílicas são responsáveis por 70% das infecções nesses hospedeiros, levando ao quadro clínico de infecção crônica e de progressão lenta (PERES et al., 2010).

Entre os animais domésticos, as dermatofitoses acometem grande parcela desta população, podendo ser transmitidas de uma espécie animal para outra, bem como do animal para o homem. A principal espécie isolada é o *M. canis*, correspondendo a 80% dos casos nos cães e a 98% nos gatos. Sua infecção ocorre por contato direto com pelos de animais doentes, por objetos contaminados (escovas, toalhas, camas, tesouras, transportes, etc) ou por contaminação ambiental (GOMES, 2004).

Entre os seres humanos, merece destaque a tinea que acomete as unhas, a onicomicose. Nesta infecção pode ocorrer aparecimento de manchas brancas e até distrofia total das unhas e até o descolamento das bordas, espessamento (PERES et al., 2010).

3.2.1 Onicomicose

É considerada uma das dermatofitoses mais frequentes (TANRIVERDI e ÖZER, 2013) com prevalência variando de 7 a 10%, sendo responsável por 15 a 40% das alterações ungueais. Representam 10 a 30% das dermatofitoses e sua incidência é de cerca de 2 a 13% da população mundial (SOUZA, 2007). Aflige 15 a 20 % das pessoas com idade entre 40 e 60 anos e naquelas acima de 60 anos, em algumas circunstâncias pode superar os 60% (GABURRI, 2007; LIMA, RÊGO e MONTENEGRO, 2007; RUIZ e DI CHIACCHIO, 2010) e afetam cerca de 0,3% das crianças (GUPTA e PAQUET, 2012).

A onicomicose é uma micose cutânea de difícil diagnóstico e tratamento, além de apresentar elevada prevalência (RELLOSO et al., 2012). É caracterizada pela deformação da unha, com aumento de sua espessura e descoloração, afetando principalmente as unhas dos pés (BROOKS et al., 2012; CARNEY et al., 2011; VEJNOVIC, SIMMLER e BETZ 2010).

Podem ser classificadas em onicomicose subungueal distal e lateral (OSDL), onicomicose subungueal proximal (OSP), endonyx, onicomicose branca superficial (OSB); onicomicose com distrofia total e onicomicose por

candidíase (ALONSO; GIJÓN e PÉREZ, 2010; GABURRI, 2007; HAY e BARAN, 2011; MARTELOZO, GUILHERMETTI e SVIDZINSKI, 2005; RELLOSO et al., 2012; SIDRIM e ROCHA, 2004; SOUZA, 2007; WELSH, VERA-CABRERA e WELSH, 2010).

A OSDL representa a forma clínica mais frequente de onicomicose. A infecção geralmente se inicia na borda livre da unha, onde o fungo invade a porção inferior da placa ungueal, na camada córnea do hiponíquio e no leito ungueal, sendo a espécie *Trichophyton rubrum* o principal responsável (ELEWSKI et al., 2012; LIMA, RÊGO e MONTENEGRO, 2007; RUIZ e DI CHIACCHIO, 2010, SANTOS, 2007, TANRIVERDI e ÖZER, 2013).

A OSP se caracteriza pelo início da invasão fúngica abaixo da borda ungueal proximal. Há formação de manchas brancas ao nível da lúnula e afeta igualmente as unhas das mãos e pés, sendo o *Trichophyton rubrum* a principal espécie fúngica responsável pela infecção (ALONSO, GIJÓN e PÉREZ 2010; SIDRIM e ROCHA, 2004).

A endonyx pode ser definida como uma forma subungueal proximal com acometimento da lâmina e leito ungueal sem alterações inflamatórias. Caracteriza-se por uma coloração esbranquiçada e difusa da lâmina com ausência de hiperqueratose e onicolise. O principal agente infeccioso é o *Trichophyton soudanense* sendo de reduzida incidência (ALONSO, GIJÓN e PÉREZ 2010; GABURRI, 2007; HAY e BARAN, 2011; TOSTI et al., 1999).

Outro tipo de onicomicose muito comum entre os imunodeprimidos é a OSB, causada na maioria dos casos por *Trichophyton mentagrophytes* e *T. rubrum* (ALONSO, GIJÓN e PÉREZ, 2010). Caracteriza-se pelo aparecimento de manchas de coloração branca em um ponto qualquer da superfície da unha (LIMA et al., 2009; LIMA, RÊGO e MONTENEGRO, 2007b; PEREIRA, 2009; RUIZ e DI CHIACCHIO, 2010, SANTOS, 2007; SOUZA, 2007; WELSH, VERA-CABRERA e WELSH, 2010).

A onicomicose com distrofia total pode ser, muitas das vezes, uma evolução do quadro clínico das lesões anteriormente citadas. Caracteriza-se pela fragilização e queda de todas as lâminas ungueais (COPETO, 2010; GABURRI, 2007; LIMA, RÊGO e MONTENEGRO, 2007 e SIDRIM e ROCHA, 2004).

Por último, está a onicomicose por candidíase. Também conhecida como paroníquia, caracteriza-se pela infecção por leveduras do gênero *Candida* (TANRIVERDI e ÖZER, 2013). A região periungueal fica inchada e coloração avermelhada, podendo apresentar liberação de exsudado purulento na base da unha (ALONSO, GIJÓN e PÉREZ; 2010; COPETO, 2010; LIMA, RÊGO e MONTENEGRO, 2007, WELSH, VERA-CABRERA e WELSH, 2010).

As onicomicoses possuem como principais agentes etiológicos três grupos de fungos bem definidos: dermatófitos, leveduras e os fungos filamentosos não-dermatófitos (LIMA et al., 2008; ZANARDI et al., 2008). No entanto, neste trabalho será abordado o grupo dos dermatófitos, principal responsável por esta patologia fúngica.

3.2.2 Fungos filamentosos dermatófitos

Os dermatófitos são fungos filamentosos que possuem filamentos tubulares ramificados e filiformes denominados hifas, as quais, quando agrupadas, denominam-se micélio. São classificados em três gêneros: *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton* (BROOKS et al., 2012; KAVANAGH, 2005; MURRAY, ROSENTHAL e PFALLER, 2006; PEREIRA, 2009; REZENDE et al., 2008; SANTOS, 2009; SIDRIM e ROCHA, 2004). As hifas vegetativas são septadas e hialinas, possuem a capacidade de penetrar no extrato córneo da pele e das unhas produzindo enzimas como proteases queratinofílicas que são capazes de degradar queratina (KHOSRAVI et al., 2013). Acima destas, e do substrato onde está fixado, encontramos as hifas aéreas, responsáveis pela produção de estruturas reprodutivas denominadas conídios ou propágulos, os quais são de extrema importância na identificação de espécies fúngicas (LACAZ, PORTO e MARTINS, 1984; SIDRIM e ROCHA, 2004).

Ao grupo dos fungos filamentosos dermatófitos, pertencem os fungos passíveis de colonizar e causar lesões clínicas em pelos e/ou extrato córneo de seres humanos e animais. As espécies mais comumente isoladas de dermatofitoses no Brasil são: *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes*, *Microsporum canis*, *M. gypseum* e *Epidermophyton floccosum* (ALMEIDA, 2011; PEREIRA, 2009; VIEIRA, 2009).

Para os dermatófitos a queratina é um substrato necessário para a obtenção de nutrientes importantes para o seu desenvolvimento. Devido à produção de lipases, endopeptidases, glicosidases, nucleases, queratinase, collagenases e elastases, os dermatófitos possuem a capacidade de metabolizar diversas estruturas além de propiciar a penetração e desenvolvimento micelial em tecidos queratinizados, proporcionando respostas inflamatórias no hospedeiro (PEREIRA, 2009).

Para a identificação dos dermatófitos, é necessário analisar os aspectos macroscópicos de sua colônia, com a produção ou não de pigmentos, características do anverso e reverso da colônia, além da avaliação microscópica. Na análise micromorfológica deve-se observar a forma e disposição dos macroconídios, superfície da parede das hifas e microconídios (PEREIRA, 2009).

Gênero *Trichophyton*

O gênero *Trichophyton* é o mais isolado entre os materiais clínicos, afetando pele, cabelo e unhas (SIDRIM e ROCHA, 2004).

Os fungos do gênero *Trichophyton* apresentam grande quantidade de microconídios de forma arredondada distribuídos ao redor das hifas em forma de cachos. Possuem poucos macroconídios em forma de clava alongada, divididos por septos finos e transversais, tendo a superfície externa lisa (MURRAY, ROSENTHAL e PFALLER, 2006; SIDRIM e ROCHA, 2004).

Trichophyton rubrum

É um dermatófito antropofílico, sendo o mais comum e amplamente distribuído, como causador de micoses como onicomicose, *tinea pedis*, *tinea corporis* e *tinea capitis* (COPETO, 2010; PEREIRA, 2009; ROMERO-CERECERO et al., 2009). Sua transmissão é exclusivamente entre os humanos ou por meio de material contaminado (SIDRIM e ROCHA, 2004).

Suas colônias apresentam crescimento intermediário, entre 12 e 16 dias após semeadura. Apresentam aspecto cotonoso e branco com pregas radiais, tornando-se posteriormente algodonosa, podendo adquirir coloração avermelhada (HERNÁNDEZ-SALAZAR, et al., 2007). O reverso apresenta coloração avermelhada, podendo evidenciar em algumas linhagens matizes

castanho, sendo este pigmento difusível pelo meio de cultura microbiológica (Figura 2) (BROOKS et al., 2012; LACAZ, PORTO e MARTINS, 1984; LEMSADDEK, 2008; SIDRIM e ROCHA, 2004).

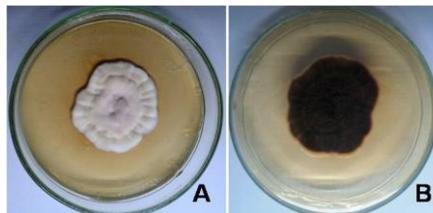


Figura 2: Colônia de *T. rubrum*.
Anverso (A) e reverso (B) da colônia.
Fonte: O autor.

Microscopicamente revela-se grande número de microconídios de 2 – 3µm por 3 - 5µm de tamanho dispostos ao longo das hifas ou em cachos. Possuem raros macroconídios, com aspecto cilíndrico e claviforme e com duas a nove septações (Figura 3) (LARONE, 1995; MURRAY, ROSENTHAL e PFALLER, 2006; SIDRIM e ROCHA, 2004).

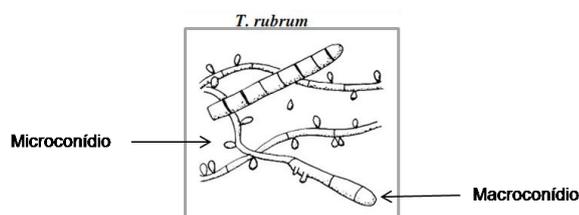


Figura 3: Aspectos micromorfológicos de *T. rubrum*.
Fonte: LARONE, 1995.

Trichophyton mentagrophytes

Esta espécie é responsável por vários tipos de dermatomicoses em animais e nos homens (SYMOENS et al., 2011), sendo as principais denominadas *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes* (zoofílico) e *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* preferencialmente antropofílico (ARNAUD, PASSERON e GARI-TOUSSAINT, 2011; COPETO, 2010; SIDRIM e ROCHA, 2004). São diferenciadas por características relacionadas à ecologia dos dermatófitos, micro e macroscopicamente, sendo que nem sempre é possível a diferenciação (PEREIRA, 2009; SIDRIM e ROCHA, 2004).

T. mentagrophytes é responsável pela segunda causa de onicomicose, lesões no couro cabeludo e lesões interdigitais (RODRIGUES, 2007; SANTOS, 2009; SIDRIM e ROCHA, 2004).

Apresenta crescimento rápido com maturação por volta de 6 - 11 dias após a sementeira (PEREIRA, 2009; SIDRIM e ROCHA, 2004). As colônias possuem coloração bege-clara ou castanho-avermelhado com superfície pulverulenta a granular. Culturas velhas adquirem micélio branco cotonoso (Figura 4). O reverso da colônia é pouco pigmentado de tom castanho ou avermelhado (COPETO, 2010; PEREIRA, 2009; SIDRIM e ROCHA, 2004; SYMOENS et al., 2011).

Microscopicamente é possível visualizar microconídios redondos agrupados, unicelulares de parede fina, isolados ou dispostos em cachos ao longo da hifa em grande número. Macroconídios podem ser raros ou numerosos dependendo da linhagem, sendo clavados com 3 a 5 células, parede fina, com 4 - 8µm por 20 - 50µm de tamanho, semelhante a um charuto (Figura 5) (LARONE, 1995; PEREIRA, 2009; SIDRIM e ROCHA, 2004).

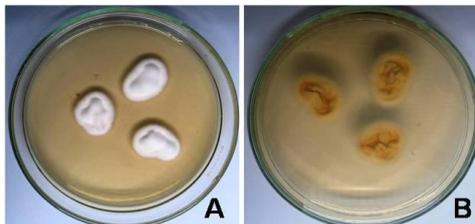


Figura 4: Colônias de *T. mentagrophytes*.
Anverso (A) e reverso (B) da colônia.
Fonte: O autor.

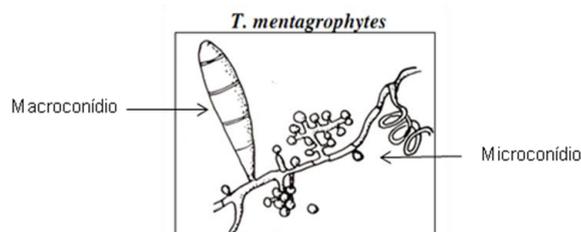


Figura 5: Aspectos micromorfológicos de *T. mentagrophytes*.
Fonte: LARONE, 1995.

Gênero *Microsporum*

O gênero *Microsporum* caracteriza-se pela presença, em cultura, de estruturas de frutificação denominadas macroconídios. São divididos por septos transversais e apresentam em sua superfície, uma grande quantidade de protuberância que lhes conferem um aspecto de verrucoso. Associados aos macroconídios podem ser encontrados, em menor proporção, pequenas estruturas de frutificação denominadas microconídios (MURRAY, ROSENTHAL e PFALLER, 2006; SIDRIM e ROCHA, 2004).

As espécies mais frequentemente isoladas são *M. canis*, *M. gypseum*, *M. audouinii*, *M. ferrugineum* e *M. nanum*, sendo as duas primeiras espécies as mais frequentemente isoladas em patologias humanas (MURRAY, ROSENTHAL e PFALLER, 2006).

Microsporum canis

Microsporum canis é um dermatófito zoofílico que acomete o ser humano por meio do contato com animais domésticos sendo responsáveis por lesões no couro cabeludo caracterizadas por placas de alopecia, podendo ocasionar onicomicose em casos mais raros (SIDRIM e ROCHA, 2004).

Cresce facilmente em meio ágar *Sabouraud* dextrose com maturação em torno de 7 a 8 dias. Sua colônia apresenta micélio cotonoso ou aveludado, de cor branca ou amarelada podendo atingir coloração marrom no centro com discreto relevo. O reverso da colônia é amarelo ou amarelo-limão podendo ficar castanho com o tempo (Figura 6). Sua análise por microscopia óptica revela grande número de macroconídios fusiformes, de paredes espessas com septações variando entre 5 e 7 septos (Figura 7) (BROOKS et al., 2012; LACAZ, PORTO e MARTINS, 1984; LARONE, 1995; MURRAY, ROSENTHAL e PFALLER, 2006; SIDRIM e ROCHA, 2004).

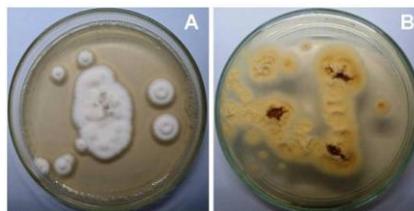


Figura 6: Colônias de *M. canis*.
Anverso (A) e reverso (B) da colônia.
Fonte: O autor.

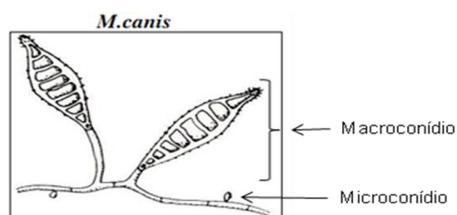


Figura 7: Aspectos micromorfológicos de *M. canis*.
Fonte: LARONE, 1995.

Microsporum gypseum

Trata-se de uma espécie geofílica e abundante no solo. Pode infectar o ser humano por meio do contato com solo contaminado ou através de animais que tenham sido contaminados pelo solo. Afeta regiões da pele sem cabelos ou pelos e unhas (LACAZ, PORTO e MARTINS, 1984; SIDRIM e ROCHA, 2004).

Macroscopicamente, suas colônias apresentam superfície plana, pulverulenta, bordas irregulares, aspecto de areia de praia, com coloração branca a amarelo-acastanhado. O reverso da colônia apresenta coloração do alaranjado ao marrom (Figura 8) (LACAZ, PORTO e MARTINS, 1984; SIDRIM e ROCHA, 2004).

Apresentam grande número de macroconídios com 3 a 7 septos de paredes finas, extremidades arredondadas e superfície rugosa (Figura 9) (LACAZ, PORTO e MARTINS, 1984; LARONE, 1995; MURRAY, ROSENTHAL e PFALLER, 2006; SIDRIM e ROCHA, 2004).

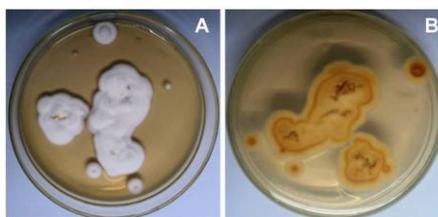


Figura 8: Colônias de *M. gypseum*.
Anverso (A) e reverso (B) da colônia.
Fonte: O autor.

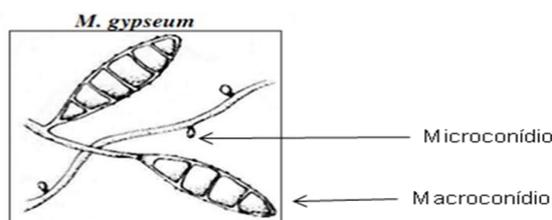


Figura 9: Aspectos micromorfológicos de *M. gypseum*.
Fonte: LARONE, 1995.

Gênero *Epidermophyton*

É composto apenas pelas espécies *E. stockdaleae* e *E. floccosum*, sendo apenas esta última de importância humana (SIDRIM e ROCHA, 2004).

Quando observado microscopicamente, demonstra apenas macroconídios na forma de clava divididos por septos, com superfície externa lisa, arredondados na extremidade distal e agrupados em um único ponto de inserção na hifa. Podem aparecer agrupados uns aos outros em forma de cacho, estando os microconídios sempre ausentes (MURRAY, ROSENTHAL e PFALLER, 2006; SIDRIM e ROCHA, 2004).

Epidermophyton floccosum

As colônias desta espécie possuem crescimento rápido, entre 7 e 10 dias com textura algodoadosa evoluindo para pulverulenta na região intermediária (COPETO, 2010). As bordas e o reverso possuem coloração amarelo-esverdeada ou castanho-amarelada ou, ainda, rubra. Reverso com coloração semelhante ao verso, no entanto, pode ser encontrado um tom mais acentuado dessa coloração, com pigmento difusível no meio de cultura microbiológica (Figura 10) (BROOKS et al., 2012; SIDRIM e ROCHA, 2004).

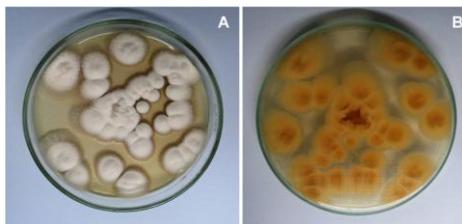


Figura 10: Colônias de *Epidermophyton floccosum*.
Anverso (A) e reverso (B) da colônia.
Fonte: O autor.

Microscopicamente possuem macroconídios de parede finas, com dois a cinco septos agrupados em cacho e microconídios ausentes (Figura 11) (LARONE, 1995; SIDRIM e ROCHA, 2004).

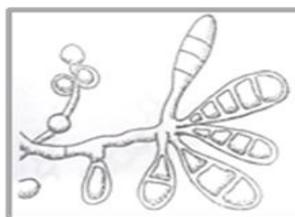


Figura 11: Aspectos micromorfológicos de *E. floccosum*.
Fonte: LARONE, 1995.

3.2.3 Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico clínico de uma infecção fúngica se orienta em pontos fundamentais como o aspecto da lesão, condições e hábitos de vida do paciente, nos antecedentes familiares, nas patologias correlatas, além da avaliação de tratamentos específicos feitos anteriormente. Esta patologia é considerada uma das micoses cutâneas mais difíceis de diagnosticar. Através de análises laboratoriais os elementos fúngicos por vezes não são observados ao exame direto em microscópio óptico, e quando observados, na maioria dos casos não crescem em cultura microbiológica, podendo o tempo de espera variar de uma a três semanas, no entanto, a ausência do crescimento fúngico não exclui a possibilidade de apresentar a infecção (ARAÚJO et al., 2003; BROOKS et al., 2012; DHIB et al., 2012; PURIM, 2006).

O tipo e a qualidade da amostra biológica, submetida ao laboratório de micologia, são fatores importantes no sucesso do isolamento e identificação do verdadeiro agente etiológico da infecção fúngica. A amostra deve ser

submetida ao exame microscópico direto e cultura em meios de crescimento para isolamento e identificação acurada do agente etiológico (ARAÚJO et al., 2003; PURIM, 2006; ZANARDI et al., 2008).

Apesar da notável evolução tecnológica ocorrida nas últimas décadas na área da saúde, seu diagnóstico ainda apresenta grandes dificuldades (BONIFAZ et al., 2012; GABURRI, 2007).

3.2.3.1 Coleta e processamento do material clínico

Antes da realização da coleta do material biológico, é importante assegurar que o paciente não esteja utilizando medicação antifúngica, seja ela tópica ou sistêmica (COPETO, 2010).

As amostras devem ser separadas para exame microscópico e cultura, pois, para exame direto são clarificadas com solução aquosa de hidróxido de potássio (KOH) (BRASIL, 2010a; SIDRIM e ROCHA, 2004).

3.2.3.2 Microscopia direta

A observação direta de um fungo na amostra biológica é um exame preliminar e complementar, mas tem grande valor diagnóstico, no entanto, não devendo nunca substituir a cultura microbiológica do agente (BONIFAZ et al., 2012; COPETO, 2010).

3.2.3.3 Diagnóstico por cultura microbiológica

A cultura é o único método pelo qual o micro-organismo causador da infecção pode ser identificado de forma mais fácil. No entanto, há a ocorrência de grande número de contaminação (DHIB et al., 2012). No caso das culturas de fungos filamentosos, a avaliação de suas características como textura da superfície das colônias, coloração do anverso e reverso e os pigmentos libertados no meio de cultura microbiológica deverá ser efetuada após atingirem seu período de maturação (COPETO, 2010). A maioria das culturas deve permanecer incubada por período de pelo menos quatro semanas antes de serem consideradas negativas (COPETO, 2010; SIDRIM e ROCHA, 2004).

3.2.3.4 Diagnóstico por análise micromorfológica

A identificação de estruturas de frutificação e de ornamentação é de fundamental importância para a identificação final de um fungo filamentoso e garantir um diagnóstico preciso (SIDRIM e ROCHA, 2004).

A análise micromorfológica é realizada empregando uma pequena amostra de uma cultura microbiológica fúngica de interesse e montada entre uma lâmina e uma lamínula na presença de azul de algodão. Posteriormente, toda esta estrutura montada deverá ser observada em microscópio óptico em aumento de 40x. Nestas condições será possível evidenciar a presença de macro e microconídios e hifas em espiral, além de outras estruturas de ornamentação (SIDRIM e ROCHA, 2004).

Entretanto, essa observação muitas das vezes não será possível, sendo necessária a realização da técnica do microcultivo empregando meio de cultura microbiológica ágar batata (SIDRIM e ROCHA, 2004).

3.2.3.5 Teste da urease

Esta prova bioquímica é processada em ágar-uréia de Christensen, e detecta a presença ou ausência da enzima urease produzida pelo fungo. Este meio rico em uréia, quando em contato com a enzima urease, produzida por algumas espécies de fungos, é hidrolisado com liberação de amônia, acarretando mudanças de pH, que vira para um pH alcalino e, posteriormente, ocorre a viragem do indicador para rosa-escuro. A metodologia consiste em semear fragmentos da colônia no em ágar-uréia de Christensen e incubar a temperatura ambiente (25°C) por 96 horas. O resultado é considerado positivo quando houver a mudança do meio de amarelo para rosa-escuro e é considerado negativo quando o meio se mantiver amarelo. (GOMES, 2004, SIDRIM e ROCHA, 2004).

3.2.3.6 Diagnóstico por análise molecular

Por meio do isolamento e sequenciamento do DNA fúngico é possível a realização de um diagnóstico rápido e direto, não necessitando isolar o fungo (COPETO, 2010; DHIB et al., 2012).

O DNA e o RNA têm sido utilizados como principal ferramenta para a classificação e identificação de micro-organismos (fungos e bactérias) na microbiologia clínica. Tais estruturas permitem ainda análises filogenéticas, epidemiológicas e estudos de genética de populações (DHIB et al., 2012).

3.2.4 Tratamento farmacológico das dermatofitoses

O diagnóstico da infecção fúngica é fundamental para se estabelecer a terapia e o período de uso do medicamento, além de reduzir efeitos indesejáveis da medicação e proporcionar gastos desnecessários. Recomenda-se ainda avaliar possíveis interações medicamentosas com terapias destinadas a outras patologias e interações alimentares, além de considerar a idade do paciente (NUNLEY e CORNELIUS, 2008; WELSH; VERA-CABRERA e WELSH, 2010).

O tratamento deve ser realizado a partir da espécie fúngica identificada, extensão da infecção, eficácia e biodisponibilidade do fármaco, assim como possíveis casos de interações medicamentosas (TANRIVERDI e ÖZER, 2013). Podem ser empregados quatro tipos de procedimentos: a terapia tópica, a sistêmica, a associação de ambas ou o uso de métodos mecânicos (PEREIRA, 2009; PURIM, 2006). A administração via oral é o tratamento de escolha (MAGAGNIN et al., 2011), no entanto, apresenta limitações tendo em vista o grande número de interações medicamentosas e toxicidade (ELEWSKI et al., 2012), empregando a classe dos derivados azólicos e as alilaminas (WELSH; VERA-CABRERA e WELSH, 2010).

Os medicamentos antifúngicos empregados se dividem em dois grupos, os fungistáticos, os quais proporcionam apenas a parada do crescimento fúngico e os fungicidas, capazes de matar as células fúngicas (PEREIRA, 2009).

O tratamento tópico pode ser suficiente quando não houver o acometimento da matriz, uma vez que apresenta eficácia reduzida (ELEWSKI et al., 2012). A associação das terapias, tópica e sistêmica, geralmente é recomendada quando existe envolvimento da matriz ungueal (PURIM, 2006).

3.2.4.1 Derivados azólicos

Os fármacos deste grupo apresentam estrutura química e mecanismo de ação semelhante. Quimicamente, são divididos em imidazóis (duas moléculas de nitrogênio no anel azol): cetoconazol (Figura 12), miconazol, tioconazol, clotrimazol, entre outros e os triazóis (três moléculas de nitrogênio no anel azol): fluconazol, itraconazol e voriconazol (MURRAY, ROSENTHAL e PFALLER, 2006; RANG et al., 2007; WELSH; VERA-CABRERA e WELSH, 2010).

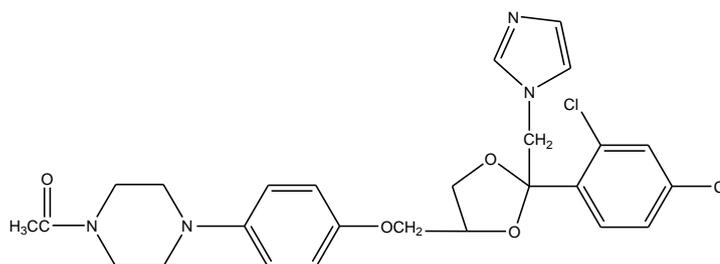


Figura 12: Estrutura química do cetoconazol.

Fonte: SIDRIM e ROCHA, 2004.

A classe dos imidazóis inibe a enzima 14- α -demetilase, presente no citocromo P-450 da célula fúngica, a qual é fundamental na biossíntese de ergosterol para a formação da parede celular, aumentando a permeabilidade desta (BROOKS et al., 2012; RANG et al., 2007; SIDRIM e ROCHA, 2004; WELSH; VERA-CABRERA e WELSH, 2010).

3.2.4.2 Alilaminas

São os fármacos responsáveis pela inibição da enzima esqualeno epoxidase de forma independente do citocromo P-450, o que garante à inibição da síntese de ergosterol e acúmulo tóxico de esqualeno dentro da membrana celular fúngica levando à morte do fungo (BROOKS et al., 2012; MURRAY, ROSENTHAL e PFALLER, 2006). Como principais representantes têm a terbinafina e naftifina. A terbinafina foi sintetizada e corresponde a um análogo da naftifina (RANG et al., 2007; SIDRIM e ROCHA, 2004; WELSH; VERA-CABRERA e WELSH, 2010).

As alilaminas apresentam atividade fungicida contra *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *M. canis* e *E. floccosum* e potencial fungistático frente às espécies de *Candida* (WELSH; VERA-CABRERA e WELSH, 2010).

A terbinafina é um agente fungicida de uso oral e está entre os mais potentes agentes antifúngicos contra dermatófitos (Figura 13) (TANRIVERDI e ÖZER, 2013). Apresenta elevada lipossolubilidade, sendo facilmente absorvida por via oral e desencadeia diversos efeitos colaterais (MURRAY, ROSENTHAL e PFALLER, 2006; RANG et al., 2007; SIDRIM e ROCHA, 2004).

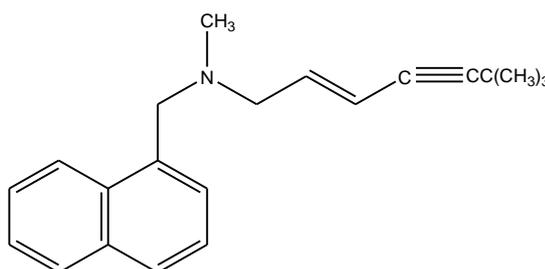


Figura 13: Estrutura química da terbinafina.

Fonte: FUGLSETH et al., (2009) e MATYSOVÁ et al., (2006).

3.2.4.3 Terapias tópicas

A terapia tópica possui aplicação limitada quando utilizada como monoterapia, em função da sua reduzida capacidade de penetração pela unha (NUNLEY e CORNELIUS, 2008). As preparações tópicas estão disponíveis para grande parte dos antifúngicos nas apresentações como cremes, loções, pomadas, pós e aerossóis (MURRAY, ROSENTHAL e PFALLER, 2006).

O ciclopirox, disponível na forma de esmalte, membro da família hidroxipirimidina, atua na inibição de enzimas dependentes de metais como alumínio (Al) e Fe, não deixando disponíveis os íons polivalentes Fe^{3+} e Al^{3+} , levando à produção de peróxidos tóxicos à célula fúngica e a redução da síntese protéica (WELSH, VERA-CABRERA e WELSH, 2010).

Podem ser utilizados ainda na terapia tópica os esmaltes contendo os medicamentos antifúngicos tioconazol 28% e amorolfina e gel de terbinafina (WELSH, VERA-CABRERA e WELSH, 2010).

3.2.5 Resistência microbiana aos agentes antifúngicos

Em oposição aos mecanismos de resistência aos agentes antibacterianos, os fungos não estão aptos a destruir ou alterar os fármacos antifúngicos, a fim de adquirir resistência. Outra característica peculiar aos fungos é o fato de seus genes de resistência não serem transmissíveis de célula a célula como ocorre entre as bactérias (MURRAY, ROSENTHAL e PFALLER, 2006).

A resistência antifúngica desenvolve-se lentamente, quando comparadas às bactérias, e promove o surgimento de espécies intrinsecamente resistentes ou com alterações das estruturas ou funções celulares, levando à resistência a um agente que tenha sido exposto previamente (MURRAY, ROSENTHAL e PFALLER, 2006).

Nos dermatófitos, a resistência a medicamentos envolve a participação de modificadores de enzimas alvo, super expressão de transportadores ABC (*ATP binding cassette*) e proteínas relacionadas ao estresse. Na espécie de *T. rubrum*, os transportadores ABC e os genes TruMDR1 e TruMDR2 também estão ligados ao estabelecimento do processo infeccioso (MARTINEZ-ROSSI; PERES e ROSSI, 2008). Outro mecanismo responsável pela resistência aos antifúngicos são as respostas de estresse celular necessárias para superar seus efeitos tóxicos, proporcionando a sobrevivência do fungo (PERES et al., 2010).

O tratamento das onicomicoses é complicado já que a infecção apresenta um grande número de formas de contágio e as recidivas são frequentes (GUPTA, COOPER, 2012; ROMERO-CERECERO et al., 2009). O sucesso do tratamento depende do correto diagnóstico etiológico (RUIZ e DI CHIACCHIO, 2010). Outro fator importante para a eliminação do fungo é a adesão do paciente à terapia, uma vez que o tratamento é de elevado custo e por longo período (ESTEVES, CABRITA e NOBRE, 1990).

As recidivas são rápidas e frequentes após a suspensão da terapia medicamentosa (KHOSRAVI et al., 2013) em função da presença de estruturas reprodutíveis resistentes ao tratamento medicamentoso. Este fato, associado com a dificuldade de diagnóstico torna as onicomicoses uma problemática da atualidade (ZANARDI et al., 2008).

O tratamento das onicomicoses dura em média seis meses para as unhas das mãos e até dezoito meses para as unhas dos pés (NUNLEY e CORNELIUS, 2008).

Ao longo do tempo percebe-se o desenvolvimento de resistência de fungos a medicamentos eficazes dificultando a obtenção da cura da infecção. Assim, frente a estes problemas os pesquisadores buscam por novos antifúngicos para um tratamento eficaz da onicomicose. Concomitantemente ao avanço da medicina, as pesquisas com plantas medicinais estão ganhando espaço, tendo importante papel e proporcionando grandes contribuições no tratamento de doenças (PONNUSAMY et al., 2010).

3.3 PRODUTOS NATURAIS PARA O TRATAMENTO DA ONICOMICOSE

O emprego de produtos naturais na medicina se baseia nos seus efeitos farmacológicos, além de ser uma possibilidade de desenvolvimento de novos fármacos. Assim, o uso de material de origem vegetal com propriedades antimicrobianas popularmente relatadas pode ser de grande significado na medicina contemporânea (KHAN e AHMAD, 2011). Suas propriedades farmacológicas estão relacionadas muitas das vezes aos metabólitos secundários, tais como os compostos fenólicos presentes em óleos essenciais, alcalóides, flavonóides, saponinas, cumarinas, taninos entre outros compostos (SILVA, 2004b).

No tratamento de infecções fúngicas, poucos medicamentos são considerados eficazes, especialmente para onicomicoses. Dessa forma, as plantas que apresentam substâncias farmacologicamente ativas e seus derivados vêm ganhando espaço na terapêutica contemporânea (PONNUSAMY et al., 2010).

Entre espécies com potencial para o tratamento de infecções por fungos filamentosos está a *Copaifera langsdorffii* Desf. (FRANCO, 2012) e a *Melaleuca alternifolia* (BENGER et al., 2004) que demonstraram ação contra o *Trichophyton rubrum*, uma das principais linhagens causadora de onicomicose. De acordo com estudos realizados por Khosravi et al, (2013) os óleos essenciais extraídos das espécies *Artemisia sieberi*, *Cuminum cyminum*,

Foeniculum vulgare, *Heracleum persicum*, *Menta spicata*, *Nigella sativa*, *Rosmarinus officinalis*, *Zataria multiflora* e *Ziziphora clinopodioides* demonstraram ação contra as linhagens clínicas de *T. mentagrophytes*, *T. rubrum*, *E. floccosum*, *M. gypseum* e *M. canis*.

Os óleos essenciais podem ser encontrados em mais de 3.000 espécies de plantas, das quais cerca de 300 são comercialmente importantes tanto na área farmacêutica, na agricultura e no setor de alimentos, em cosméticos e perfumes, com destaque para o óleo essencial de *B. trimera* que foi material de estudo deste trabalho (ANTIGNAC et al., 2011; VILA et al., 2010).

3.4 *BACCHARIS TRIMERA* LESS (D.C.)

Popularmente conhecida como carqueja-amarga, carqueja-amargosa, carqueja-do-mato, carquejinha ou simplesmente carqueja, a espécie *Baccharis trimera* Less (D.C.) pertence à família Asteraceae (Compositae), um dos grupos sistemáticos mais numerosos dentro das angiospermas, compreendendo cerca de 1.100 gêneros e 25.000 espécies (FLORÃO, 2006; LORENZI e MATOS, 2008; MARTINS et al., 2003).

O gênero *Baccharis* está representado por mais de quinhentas espécies distribuídas principalmente no Brasil, Argentina, Colômbia, Chile e México, sendo encontrada nas regiões mais altas e solos arenosos (CARIDDI et al., 2012; GRECCO et al., 2012). O elevado número de espécies no Brasil e nos Andes indica que uma dessas regiões pode ser o provável ponto de origem desse gênero (BIONDO et al., 2011; FLORÃO, 2006; LORENZI e MATOS, 2008; PÁDUA et al., 2010).

A carqueja também é conhecida como *Baccharis genistelloides* var. *trimera* (Less.) Baker (BRASIL, 2010b), trata-se de um subarbusto perene, ereto, ramificado na base, de caule e ramos verdes com expansões trialadas, de 50 - 80 cm de altura. As folhas estão dispostas ao longo do caule sendo a inflorescência do tipo capítulo (AMARAL et al., 2010; XAVIER et al., 2012) (Figura 14). Entre os constituintes do seu metabolismo secundário, pode-se mencionar os diterpenos, sesquiterpenos, flavonóides, saponinas, lactonas, taninos, compostos fenólicos e o óleo essencial, lignina, α e β – pineno,

esteroides, polifenóis, beta cardineno, calameno, sesquiterpenos, cânfero, ledol, acetato de carquejila, nerotidol, hispirulina, campferol, esqualeno, glicosídeos e muitos outros (ABOY et al., 2012; GONÇALVES, 2010; GRECCO et al., 2012; SILVA, 2004a; SILVA et al., 2007).



Figura 14: Fotos de *Baccharis trimera*.
Fonte: O autor.

As folhas de *Baccharis trimera* são largamente utilizadas na medicina popular na forma de infusão a fim de obter as propriedades anti-inflamatórias, cicatrizantes, antiúlcera e digestivas (ABOY et al., 2012; DIAS et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2012; SILVA et al., 2010), além de potencial antioxidante (PÁDUA et al., 2010), sendo utilizada também no tratamento de reumatismo, desordens hepatobiliares (RODRIGUES et al., 2009), diabetes, ação antimicrobiana (MARTINS et al., 2003; SILVA et al., 2007) e contra leveduras (GONÇALVES, 2010).

Fenner e colaboradores (2006), por meio de uma pesquisa de revisão de literatura etnobotânica, apresentam a carqueja amarga como uma das espécies de plantas brasileiras com potencial antifúngico. O gênero *Bacharis* apresenta ainda atividade antimicrobiana, antifúngica e antiviral (GUIMARÃES et al., 2012; LÁZARO et al., 2013; PAUL, 2005; SCHUCH, 2007) e seu óleo

essencial revelou atividade contra *Candida albicans* (GONÇALVES, 2010; LERMEN et al., 2009).

A toxicidade do óleo essencial de *B. trimera* foi avaliada demonstrando sua ação inibitória sobre as células de retina em cultura *in vitro*, tendo sido observada a inibição da arborização axodendrítica e diminuição na proliferação e diferenciação de células gliais (LOSQUI et al., 2009). Seu óleo essencial também foi empregado por Oliveira e colaboradores (2012) que realizaram trabalho inédito demonstrando seu potencial shistosomicida.

O carquejol, um dos principais constituintes isolados das partes aéreas da *B. trimera*, é irritante a mucosa ocular e nasal. Em solução de óleo de oliva, este composto químico apresentou baixa toxicidade quando utilizado via oral ou intraperitonealmente (SILVA, 2004a).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ÓLEO ESSENCIAL DE *BACCHARIS TRIMERA* LESS (D.C.)

O óleo essencial de folhas de *B. trimera*, lote BATRI01111, foi adquirido da empresa Laszlo Aromatologia LTDA e obtido por arraste de vapor. Foi fornecido ainda pela Empresa o laudo de certificação de pureza do óleo e o cromatograma do mesmo.

4.2 CROMATOGRAFIA GASOSA

A fim de se caracterizar quali e quantitativamente os principais constituintes químicos deste óleo essencial, uma alíquota (50 µL) foi enviada para análise por cromatografia gasosa (CG) no Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais.

A análise foi realizada em cromatógrafo a gás de alta resolução (HP 5890) equipado com detector por ionização de chamas. Foi utilizada uma coluna BP-1 (SGE) 25 m x 0,25 mm, com gradiente de temperatura de 60°C/1minuto, 3°C/minuto até 220°C; injetor (*split* de 1/ 50) a 220°C e detector a 220°C. O gás de arraste utilizado foi o hidrogênio (2 mL/minuto) e volume de injeção de 1 µL. As amostras foram diluídas a 0,5% em clorofórmio. A caracterização dos picos foi feita através do cálculo do índice de retenção de Kovats e comparados com os dados da literatura.

4.3 LINHAGENS FÚNGICAS

Foram empregadas linhagens-padrão de fungos filamentosos dermatófitos, *Trichophyton rubrum* CCT 5507 URM 1666, *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533 e *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 11481 isoladas do ser humano e *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 11480 isoladas de gato, *Microsporum gypseum* ATCC 14683 e *Microsporum canis* ATCC 32903, as quais ficaram armazenadas em criotubos contendo água destilada estéril sob temperatura de - 20°C.

O *T. rubrum* CCT 5507 URM 1666 foi adquirido da Fundação André Tosello, as demais linhagens fúngicas foram fornecidas pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz.

Embora a espécie de *Epidermophyton floccosum* esteja entre os principais agentes responsáveis pela onicomicose, não foi possível realizar as análises necessárias para o estabelecimento da atividade antifúngica com a mesma, no período de trabalho. Diversas tentativas estão sendo elaboradas pela equipe deste núcleo de pesquisa.

4.4 REALIZAÇÃO DO MICROCULTIVO

Após a obtenção das linhagens fúngicas, foi realizada a transferência do material fúngico liofilizado para tubos estéreis com tampa contendo meio de enriquecimento, caldo *Sabourad* dextrose (SDB), que possui em sua formulação, nutrientes necessários para que as linhagens possam multiplicar-se.

O microcultivo em lâmina para fungos filamentosos corresponde a uma técnica que permite a análise da morfologia microscópica, uma vez que preserva a disposição original dos conídios sobre as hifas e mantém íntegras as estruturas responsáveis pela formação dos conídios (BRASIL, 2010a). Trata-se de uma técnica que causa reduzidos danos às estruturas fúngicas, mantendo a disposição original das hifas, macro e microconídios (BRASIL, 2010a; PEREIRA, 2009; SIDRIM e ROCHA, 2004).

O procedimento consiste no emprego de lâminas de vidro e placa de Petri estéril, um bloco de ágar batata de 1,0 cm² com 4 – 5 mm de altura e um suporte (Figura 15). A lâmina deve ser colocada sobre o suporte de forma asséptica e sobre esta o bloco de ágar. Semear o fungo, a partir de um repique recente, nas quatro extremidades do bloco de ágar. Recobrir com uma lamínula estéril e montar uma câmara úmida adicionando um pedaço de algodão estéril umedecido com água também estéril no interior da placa, a fim de evitar a dessecação do meio de cultura microbiológica. Tampar a placa e incubar a 28 ± 2°C por 7 a 10 dias, até o aparecimento de hifas (BRASIL, 2010a; PEREIRA, 2009; SIDRIM e ROCHA, 2004).

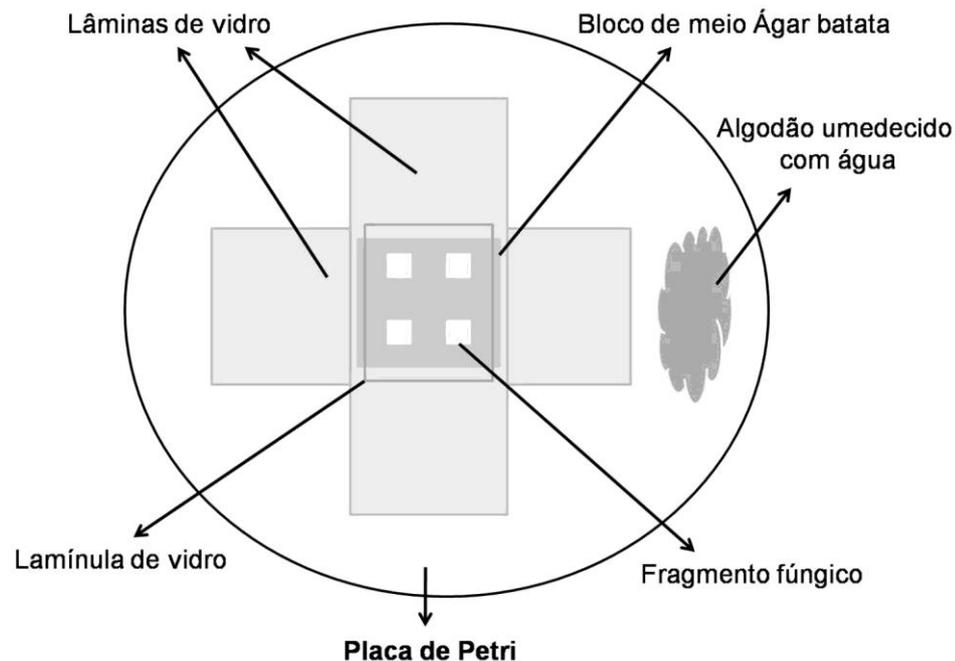


Figura 15: Esquema do microcultivo em lâmina de vidro.
Fonte: O autor.

Após o período de crescimento fúngico, retirar a lamínula na qual estarão aderidos o micélio e os conídios. Acrescentar uma gota do corante lactofenol azul de algodão sobre uma lâmina e sobre esta apoiar a lamínula, vedar com parafina ou esmalte e observar ao microscópio óptico (Eclipse - E200, Nikon, Japão) com o auxílio da objetiva que amplia 40 vezes a imagem. Nestas condições, é possível visualizar as estruturas de reprodução (micro e macroconídios), bem como estruturas de ornamentação (hifas) (BRASIL, 2010a; SIDRIM e ROCHA, 2004).

As lâminas do microcultivo das linhagens de *T. rubrum* CCT 5507 URM 1666 (Figura 16) e *T. mentagrophytes* ATCC 9533, *T. mentagrophytes* ATCC 11480 e *T. mentagrophytes* ATCC 11481 (Figura 17) permitiram constatar a presença de hifas septadas. Foi observado ainda a predominância de microconídios em forma de cachos distribuídos em torno das hifas e ausência de macroconídios para ambas as linhagens, como descrito por Murray, Rosenthal e Pfaller (2006) e Pereira (2009).

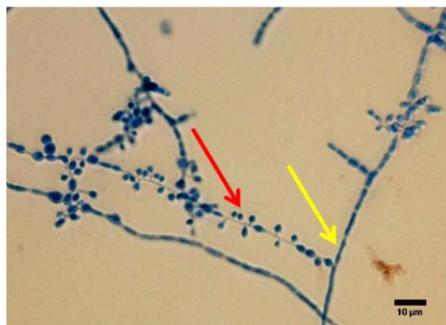


Figura 16: Imagem de microcultura de *Trichophyton rubrum* CCT 5507 URM 1666. A seta vermelha indica a presença de microconídios e a amarela uma hifa. A barra corresponde a 10 µm.

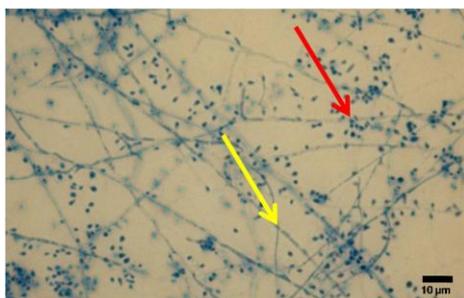


Figura 17: Imagem de microcultura de *Trichophyton mentagrophytes*. A seta vermelha indica a presença de microconídios e a amarela uma hifa. A barra corresponde a 10 µm.

Para a linhagem de *M. gypseum* ATCC 14683 (Figura 18) foram observados macroconídios fusiformes com as extremidades arredondadas contendo cinco células em seu interior e uma superfície rugosa, sendo menos fusiformes que os do *M. canis* como foi descrito por Copeto (2010).

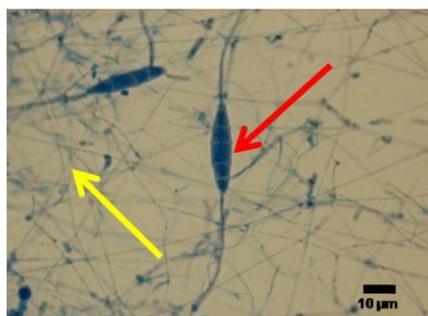


Figura 18: Imagem de microcultura de *Microsporium gypseum* ATCC 14683. A seta vermelha indica um macroconídio fusiforme e a amarela uma hifa. A barra corresponde a 10 µm.

No cultivo da linhagem de *M. canis* ATCC 32903 (Figura 19) foram evidenciados macroconídios fusiformes, de paredes espessas e extremidades afiladas. São divididos por septos transversais com a presença de nove células

internas, e com as extremidades afiladas, confirmando o que foi descrito por Marques e colaboradores (2005) e Sidrim e Rocha (2004). Para as duas linhagens do gênero *Microsporium*, a presença de microconídios foi pouco evidenciada.

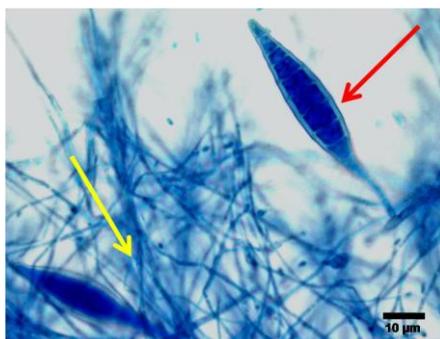


Figura 19: Imagem de microcultura de *Microsporium canis* ATCC 32903. A seta vermelha indica um macroconídio e a amarela o micélio. A barra corresponde a 10 μm .

4.5 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

4.5.1 Triagem microbiológica

A triagem microbiológica foi realizada de acordo com a técnica do fragmento fúngico descrito por Souza e colaboradores (2002), a fim de avaliar o potencial antifúngico do óleo essencial de *B. trimera*.

As análises foram realizadas em placas estéreis para cultura de células com vinte e quatro poços (*Sarstedt*, Alemanha). Foi avaliada a atividade do óleo essencial de *B. trimera*, calculando-se a concentração-teste em função do teor de β – pineno, para que o mesmo estivesse na concentração de $1.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$; do controle reacional e do controle de viabilidade fúngica como descrito nas Tabelas 1 e 2. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Tabela 1: Composição das soluções estoques.

	Tween80/ DMSO (1:1, v/v) (µL)	Óleo essencial de <i>B. trimera</i> (µL)	Salina estéril 0,9% (µL)
Óleo essencial	35	42	423
Controle reacional	35	-	465

-: ausência.

A concentração da solução estoque (SE) do óleo essencial foi calculada de acordo com o ajuste da concentração para 100% do constituinte majoritário, β - pineno.

Tabela 2: Soluções empregadas na triagem microbiológica.

	Ágar <i>Sabourad</i> dextrose** (µL)	*Óleo essencial (µL)	* Controle reacional (µL)	Fragmento fúngico (2 mm)
Teste (óleo)	1.900	100	-	+
Controle de viabilidade fúngica	1.900	-	100	+
Controle reacional	1.900	-	100	-

*: solução estoque; **: ágar *Sabourad* dextrose contendo 0,05% de cloranfenicol e mantido a 37 – 40°C; -: ausência e +: presença.

Após a completa homogeneização e solidificação do meio de cultura, foi acrescentado o fragmento de 2 mm de cada linhagem fúngica (SOUZA et al., 2002).

Finalmente, a placa foi incubada à temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$ por 7 dias. Após período de incubação, o crescimento de cada espécie fúngica frente ao óleo essencial de *B. trimera* foi avaliado com o auxílio do microscópio (SMZ800, Nikon, Japão).

Poços nos quais ocorreu crescimento fúngico são sugestivos de ausência de atividade antifúngica do óleo essencial e a inibição total do crescimento pode representar possível atividade antifúngica, ambos nestas condições de análise.

4.5.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A determinação da CIM do óleo essencial de *B. trimera* foi realizada conforme o protocolo M38-A2 do *The National Committee for Clinical*

Laboratory Standards (CLSI) (2008) adaptado, conforme estabelecido por Almeida e colaboradores (2009).

Foram utilizadas placas de microtitulação estéreis de 96 poços (*Sarstedt*, Alemanha); todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.5.2.1 Padronização do inóculo

No preparo da suspensão fúngica, foram utilizadas culturas de 7 dias. Ao tubo com meio ágar *Sabouraud* dextrose (SDA), contendo 0,05% de cloranfenicol, inclinado contendo o fungo de interesse, foi realizada a primeira lavagem por meio da adição de 2 mL de solução salina estéril 0,9% e 20 µL de solução *Tween-80*/ DMSO PA (1: 1, v/v) com o auxílio de uma alça de inoculação estéril.

Procedeu-se mais 3 lavagens sequenciais, utilizando apenas solução salina estéril 0,9%. A mistura de hifas e conídios formada foi transferida para um tubo cônico de 50 mL estéril e homogeneizado em vórtex (*Genie 2*, *Scientific Industries, USA*) por 1 minuto. Após 5 minutos em repouso para decantação das partículas maiores, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 50 mL estéril e a ele adicionado salina estéril 0,9% e homogeneizado formando uma suspensão (CLSI, 2008).

A seguir, a suspensão foi analisada em espectrofotômetro (Libra S12, Biochrom, UK) empregando cubeta de quartzo com 1,0cm de caminho óptico e transmitância ajustada na faixa de 68 - 70% em comprimento de onda fixo de 530 nm (ALMEIDA et al., 2009). Posteriormente esta suspensão foi diluída na proporção de 1: 50 (v/v) em meio RPMI-1640 (Sigma, EUA) tamponado com ácido 3(N-morfolino) propanosulfônico (MOPS, JTBaker, EUA).

A suspensão final preparada foi empregada para a determinação da CIM, por meio da transferência de uma alíquota de 100 µL desta solução para a microplaca. Todas as soluções e suspensões descritas foram empregadas logo após o preparo das mesmas.

4.5.2.2 Diluição dos agentes antifúngicos

Para a realização da atividade antifúngica foi necessário realizar o preparo dos fármacos de referência: terbinafina e cetoconazol e do óleo essencial de *B. trimera*.

Os fármacos terbinafina e cetoconazol foram avaliados nas concentrações finais de 0,0234 a 12 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 0,0313 a 16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente (ALMEIDA et al., 2009; CLSI, 2008).

As soluções de trabalho são duas vezes mais concentradas do que as concentrações finais, uma vez que ocorre uma diluição 1: 2 (v/v) dos agentes antifúngicos, quando combinados com o inóculo na microplaca.

Foram preparadas dez SE dos fármacos terbinafina e cetoconazol nas respectivas faixas de concentração 0,0468 a 24 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 0,0626 a 32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em meio RPMI-1640 tamponado com MOPS (ALMEIDA et al., 2009; CLSI, 2008). Para a solubilização dos mesmos foi empregado dimetilsulfóxido (DMSO P.A., Sigma, Brasil) (CLSI, 2008).

O óleo essencial de *B. trimera* foi avaliado empregando oito SE com concentrações na faixa de 15,6 a 2.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ do constituinte majoritário em meio RPMI-1640 tamponado com MOPS. A solubilização deste óleo foi auxiliada pela adição de uma alíquota da solução de *Tween-80*/ DMSO P.A. (1: 1, v/v), na proporção de 83,33% do volume de óleo essencial utilizado.

Os controles, positivo e negativo, foram preparados conforme descrito na Tabela 3.

Tabela 3: Composição das soluções estoque das substâncias químicas de interesse.

	<i>Tween80</i> / DMSO (1: 1, v/v) (μL)	DMSO (μL)	Terbinafina (μg)	Cetoconazol (μg)	RPMI-1640* (μL)
Controle positivo 1 (terbinafina)	-	30,0	36,0	-	1470,0
Controle positivo 2 (cetoconazol)	-	30,0	-	48,0	1470,0
Controle reacional 1	3,5	-	-	-	496,5
Controle reacional 2	-	10,0	-	-	490,0

DMSO: Dimetilsulfóxido; *: RPMI-1640 tamponado com MOPS; *Tween80*: polissorbato 80 e -: ausência.

4.5.2.3 Preparo da microplaca

Em cada microplaca foram avaliados os fármacos de referência, o óleo essencial e os controles, positivo e negativo, sendo todos realizados em triplicata.

Para a terbinafina, cetoconazol e o óleo essencial, foi transferida uma alíquota de 100 µL de cada SE preparada para o poço da microplaca, seguida pela adição de 100 µL de meio RPMI-1640 tamponado com MOPS e contendo o inóculo padronizado (ALMEIDA et al., 2009; CLSI, 2002).

O preparo das soluções de interesse dos controles positivos e negativos foi realizado como descrito na Tabela 4.

Tabela 4: Soluções empregadas no preparo da microplaca.

Amostras	Soluções estoque preparadas (µL)						RPMI*	RPMI**
	FR	OE	Controle reacional 1	Controle reacional 2	CP 1	CP 2		
OE	-	100	-	-	-	-	-	100
FR	100	-	-	-	-	-	-	100
CN OE	-	-	100	-	-	-	100	-
CN FR	-	-	-	100	-	-	100	-
CP 1	-	-	-	-	100	-	-	100
CP 2	-	-	-	-	-	100	-	100
CM 1	-	-	100	-	-	-	-	100
CM 2	-	-	-	100	-	-	-	100

FR: fármacos de referência; OE: óleo essencial; CN: controle negativo; CP 1: controle positivo (terbinafina); CP 2: controle positivo (cetoconazol); CM: controle dos micro-organismos; RPMI*: meio RPMI-1640 tamponado com MOPS; RPMI**: meio RPMI-1640 tamponado com MOPS contendo inóculo fúngico e -: ausência.

O teste de viabilidade fúngica foi preparado pela adição de 200 µL de meio RPMI-1640 tamponado com MOPS contendo o inóculo fúngico à microplaca.

Após estes procedimentos, a microplaca foi homogeneizada em agitador de microplacas (SI-0400, *Genie Scientific*, Estados Unidos), durante 2 minutos e incubada a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ por 7 dias.

A CIM é a menor concentração que uma solução contendo uma substância antifúngica capaz de inibir o crescimento fúngico visualmente detectado. O crescimento fúngico em cada poço da microplaca foi visualmente

comparado ao crescimento obtido no poço do controle negativo e no teste de viabilidade fúngica de acordo com o protocolo do CLSI (2002).

4.5.3 Concentração fungicida mínima (CFM)

A CFM é estabelecida como a menor concentração da substância testada na qual a linhagem fúngica não apresenta capacidade de crescimento, quando inoculada em meio de cultura microbiológico sem antifúngicos (PEREIRA, 2009).

Após a leitura da CIM, foi determinada a CFM (MAGAGNIN et al., 2011). Para tal, alíquotas de 10 μ L do meio de cultura microbiológico presente nos poços nos quais não se observou, visualmente, crescimento fúngico foram transferidas para microplacas de 96 poços contendo 200 μ L de SDB desprovidas de qualquer antifúngico.

Dessa forma, caso o crescimento fúngico ocorra após a diluição do meio contendo o agente antifúngico, este é considerado um agente fungistático ou fungicida na ausência de crescimento e incubada a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ por 7 dias (ESPINEL-INGROFF et al., 2002).

4.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Para a realização de MEV, foram preparados os seguintes materiais: fragmentos fúngicos não tratados e fragmentos fúngicos após serem submetidos ao tratamento com terbinafina, cetoconazol ou com óleo essencial de *B. trimera*. Todas as substâncias foram empregadas na concentração máxima de interesse ($1.000 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ em relação ao constituinte β - pineno).

Inicialmente, foi realizado plaqueamento dos fungos em placas de Petri contendo meio SDA, contendo 0,05% de cloranfenicol, e incubados em estufa à temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$ por 7 dias. Após a formação de colônias, foi retirado um fragmento fúngico de 2 mm e transferido para uma nova placa de Petri estéril contendo a substância a ser testada incorporada no meio SDA a $1.000 \mu\text{g}/\text{mL}$, contendo 0,05% de cloranfenicol, já solidificado. Posteriormente, a placa foi incubada a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ por 7 dias (SOUZA et al., 2002).

Decorrido este período, o fragmento fúngico foi retirado e preparado para a realização de MEV, segundo Martinelli e Santos (2010) e Mio, Novaes e Alves (2006).

Os fragmentos fúngicos submetidos ao MEV, foram preparados de acordo com as seguintes etapas:

- a) fixação com aldeído: foi usada a solução de *Karnovsky* como fixador – (glutaraldeído 2,5%, formaldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,05 M, cloreto de cálcio 0,001 M, pH 7,2). A amostra ficou submersa nesta solução durante 24 horas na geladeira;
- b) pós-fixação com solução de tetróxido de ósmio a 1% (OsO_4): as amostras pré-fixadas com aldeído foram lavadas (3 passagens consecutivas de cerca de 10 minutos cada em tampão cacodilato 0,05 M pH 7,2 e deixadas por mais 1 hora em solução de OsO_4 1%, a temperatura ambiente ao abrigo da luz;
- c) desidratação: decorrido o tempo de uma hora, as amostras fixadas em solução de OsO_4 1% foram lavadas com água destilada por três vezes;
- d) dessecação: as amostras passaram por concentrações crescentes de solução de acetona (25%, 50%, 70% e 90%), permanecendo cerca de 10 minutos em cada uma. Posteriormente a amostra foi lavada três vezes com acetona 100%;
- e) por último, o fragmento resultante foi fixado sobre *stubs* de alumínio com auxílio de uma fita de carbono dupla face e levadas ao metalizador (FL-9496 Balzers/ Furstentum Liechtenstein), onde receberam um banho de vapor de ouro por 180 segundos (equivalente a uma camada de ouro de 2 nm de espessura).

As amostras de cada linhagem fúngica avaliada foram submetidas ao processo de MEV (JSM-5310, JEOL) sob as condições de 25 Kv de potência e distância de trabalho de 17 mm. As análises foram realizadas no Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram identificados através da CG vinte constituintes químicos na composição do óleo essencial de *B. trimera* com destaque para o β - pineno e o acetato de carquejila com os maiores percentuais, como pode ser visualizado na Figura 20 e na Tabela 5. No entanto, de acordo com Bakkali e colaboradores (2008), para que um marcador químico seja considerado majoritário, este deve apresentar percentual entre 20 e 70%, o que permite atribuir apenas ao β - pineno esta característica.

Foi identificada ainda a presença de constituintes que são considerados como marcadores químicos do óleo essencial desta espécie como o acetato de carquejila e o carquejól (GONÇALVES, 2010; LERMEN et al., 2009; MORAIS e CASTANHA, 2011; SILVA, 2004a, SILVA et al., 2010), no entanto, estes estavam presentes em pequenos percentuais.

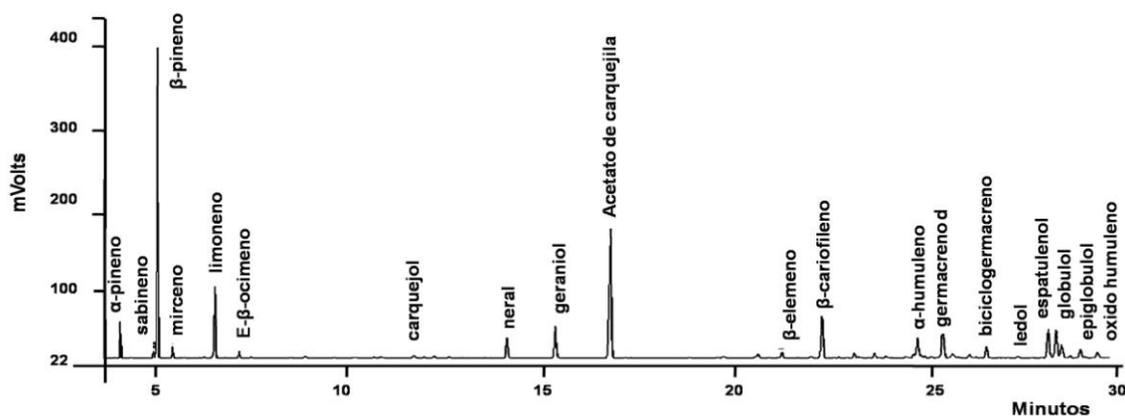


Figura 20: Perfil cromatográfico do óleo essencial de *Baccharis trimera*.

Tabela 5: Perfil químico do óleo essencial de *Baccharis trimera*.

Pico	Constituintes	%	KI
1	α -pineno	2.2	928
2	Sabineno	0.5	967
3	β -pineno	23.4	973
4	Mirceno	0.8	986
5	Limoneno	5.9	1021
6	E- β -ocimeno	0.6	1039
7	Carquejol	0.4	1150
8	Neral	2.3	1231
9	Geranial	4.1	1258
10	Acetato de carquejila	19.0	1295
11	β -elemeno	0.8	1388
12	β -cariofileno	6.4	1412
13	α -humuleno	3.1	1477
14	Germacreno D	5.0	1494
15	biciclogermacreno	1.6	1523
16	Ledol	4.6	1563
17	Espatulenol	4.4	1569
18	Globulol	2.3	1575
19	Epiglobulol	1.3	1586
20	Óxido humuleno	1.0	1596
Total		89.7	

KI: índice de retenção de Kovats calculado.

Ao empregar o mesmo processo de extração do óleo essencial descrito, Silva e colaboradores (2007) obtiveram valores de germacreno D (26,0%) e β -cariofileno (17,0%). Da mesma forma, Silva e colaboradores (2006) encontraram como constituintes majoritários do óleo essencial de carqueja o espatulenol (27,45%) e epiglobulol (11,10%) e, Lago e colaboradores (2008) caracterizaram o α -humuleno (19,44%) como constituinte majoritário. Empregando outra técnica de extração, supercrítica, para o mesmo tipo de óleo essencial, Silva e colaboradores (2009) encontraram constituintes com diferenças quali e quantitativa dos apresentados na tabela 5.

Tais diferenças entre os constituintes nos diferentes estudos realizados podem estar relacionadas aos distintos processos extrativos empregados, arraste de vapor e extração supercrítica. Cabe ressaltar que existem outros fatores que também podem proporcionar alterações na composição química do óleo essencial, tais como: época de coleta e secagem do material vegetal, tipos

de solos, fatores genéticos, climáticos (SILVA et al., 2009; SIMÕES et al., 2004) e o percentual de nitrogênio disponível para a planta no solo (PALÁCIO et al., 2007).

Embora alguns autores afirmem que o marcador químico deste óleo é o carquejol e o acetato de carquejila (GONÇALVES, 2010; LERMEN et al., 2009; MORAIS e CASTANHA, 2011; SILVA, 2004a, SILVA et al., 2010); tal afirmativa pode ser questionada, uma vez que a constituição de um óleo essencial está sujeita a inúmeras variações como já descritas (PALÁCIO et al., 2007; SILVA et al., 2009; SIMÕES et al., 2004). Na quarta edição da Farmacopéia Brasileira (FB) especifica que o óleo essencial de *B. trimera* deve ser “constituído de, no mínimo, 9% de carquejol e 45% de acetato de carquejila”; no entanto, na última edição da FB (BRASIL, 2010b) não é apresentado nenhum parâmetro que caracterize sua autenticidade, uma vez que diversas monografias de fitoterápicos estão passando por reavaliação.

Por meio da análise preliminar dos fragmentos fúngicos, as linhagens de *T. mentagrophytes* ATCC 9533; *T. mentagrophytes* ATCC 11480, *T. rubrum* CCT 5507 URM 1666, *M. canis* ATCC 32903 e *M. gypseum* ATCC 14683 não apresentaram crescimento fúngico visível quando expostas ao óleo de *B. trimera* (1.000 µg.mL⁻¹ em relação ao teor de β – pineno). No entanto, *T. mentagrophytes* ATCC 11481 demonstrou crescimento. Dessa forma, foi possível sugerir ação antifúngica do respectivo óleo essencial frente a cinco linhagens de fungos testadas.

Os valores da CIM para o óleo essencial de *B. trimera* estão listados na Tabela 6 e permitem realizar uma comparação com os fármacos de referência, terbinafina e cetoconazol. *B. trimera* apresentou valor da CIM e CFM inferiores aos dos fármacos de referência frente à espécie de *Tricophyton rubrum* CCT 5507 URM 1666, demonstrando assim ser mais potente que os mesmos nos testes realizados. Estes resultados são de grande importância para a terapêutica da onicomicose, uma vez que o *T. rubrum* está entre as principais espécies causadoras da onicomicose.

Embora os valores de CIM do óleo essencial para as demais linhagens tenham sido maiores que as dos fármacos listados, o emprego desta substância de origem vegetal (óleo essencial) pode representar um tratamento alternativo para a onicomicose, quer seja como nova opção medicamentosa ou

como adjuvante terapêutico. Com o aumento de recidivas, desenvolvimento de resistência fúngica e o elevado número de reações adversas ocasionadas pelo tratamento disponível; o emprego de um produto da flora nacional pode representar uma solução para os problemas listados.

Tabela 6: Suscetibilidade *in vitro* de fungos filamentosos dermatófitos frente ao óleo essencial de *B. trimera* e aos fármacos de referência.

Linhagem fúngica	Óleo essencial de <i>B. trimera</i>		Terbinafina		Cetoconazol	
	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
<i>T. mentagrophytes</i> ATCC 9533	31,25	62,5	3	3	2	4
<i>T. mentagrophytes</i> ATCC 11480	125	125	0,03	0,03	1	1
<i>T. mentagrophytes</i> ATCC 11481	>1.000	-	0,03	0,03	0,25	0,25
<i>T. rubrum</i> CCT 5507 URM 1666	0,03	0,06	0,19	0,19	1	4
<i>M. canis</i> ATCC 32903	0,24	0,98	0,19	0,19	0,06	8,01
<i>M. gypseum</i> ATCC 14683	125	125	0,12	0,12	8	16

CIM: concentração inibitória mínima; CFM: concentração fungicida mínima; resultados expressos como $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

É importante evidenciar e destacar a proximidade entre os valores de CIM e CFM proporcionados pelo óleo essencial de carqueja frente às linhagens fúngicas, o que lhe garante maior potência frente aos dermatófitos analisados, com destaque para as linhagens de *T. mentagrophytes* ATCC 11480, *T. rubrum* CCT 5507 URM 1666, *M. canis* ATCC 32903 e *M. gypseum* ATCC 14683.

Almeida e colaboradores (2009), ao avaliarem o perfil *in vitro* de susceptibilidade de linhagens clínicas de fungos filamentosos frente aos antifúngicos cetoconazol e terbinafina, encontraram CIM de $8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para o cetoconazol frente ao *M. canis*. Em relação à terbinafina, foram obtidos valores médios de CIM $\geq 32 \mu\text{g.mL}^{-1}$ frente ao *T. mentagrophytes* e de $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ frente ao *T. rubrum*. Ao estabelecer uma comparação com os valores da CIM apresentados na Tabela 6, é notória a elevação das concentrações inibitórias, o que pode representar indícios de resistência fúngica das linhagens clínicas aos fármacos citados e, conseqüentemente, dificuldade de tratamento da infecção.

O óleo essencial de carqueja revelou CIM $>1.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ frente ao *T. mentagrophytes* ATCC 11481, não sendo efetivo diante desta linhagem, ratificando o resultado obtido no teste preliminar.

As eletromicrografias permitiram identificar morfológicamente as estruturas fúngicas e evidenciar expressivos danos ocasionados nas mesmas, quando submetidas aos tratamentos propostos. As imagens foram obtidas dos fragmentos de *T. rubrum* CCT 5507 URM 1666 (Figura 21), *T. mentagrophytes* ATCC 9533 (Figura 22); *M. canis* ATCC 32903 (Figura 23) e *M. gypseum* ATCC 14683 (Figura 24) submetidos à ação dos fármacos de referência (terbinafina e cetoconazol) ou ao óleo essencial de *B. trimera*, além das eletromicrografias de linhagens que não receberam nenhum tratamento com as três substâncias descritas.

Observa-se na Figura 21A grande número de hifas em formato tubular e com ramificações, as quais formam o micélio como demonstrado por Koroishi e colaboradores (2010). Foi possível identificar ainda, alterações proporcionadas pelos fármacos de referência (Figuras 21B e 21C) e pelo óleo essencial de *B. trimera* (Figura 21D) como o encolhimento e a presença de rugosidades nas hifas.

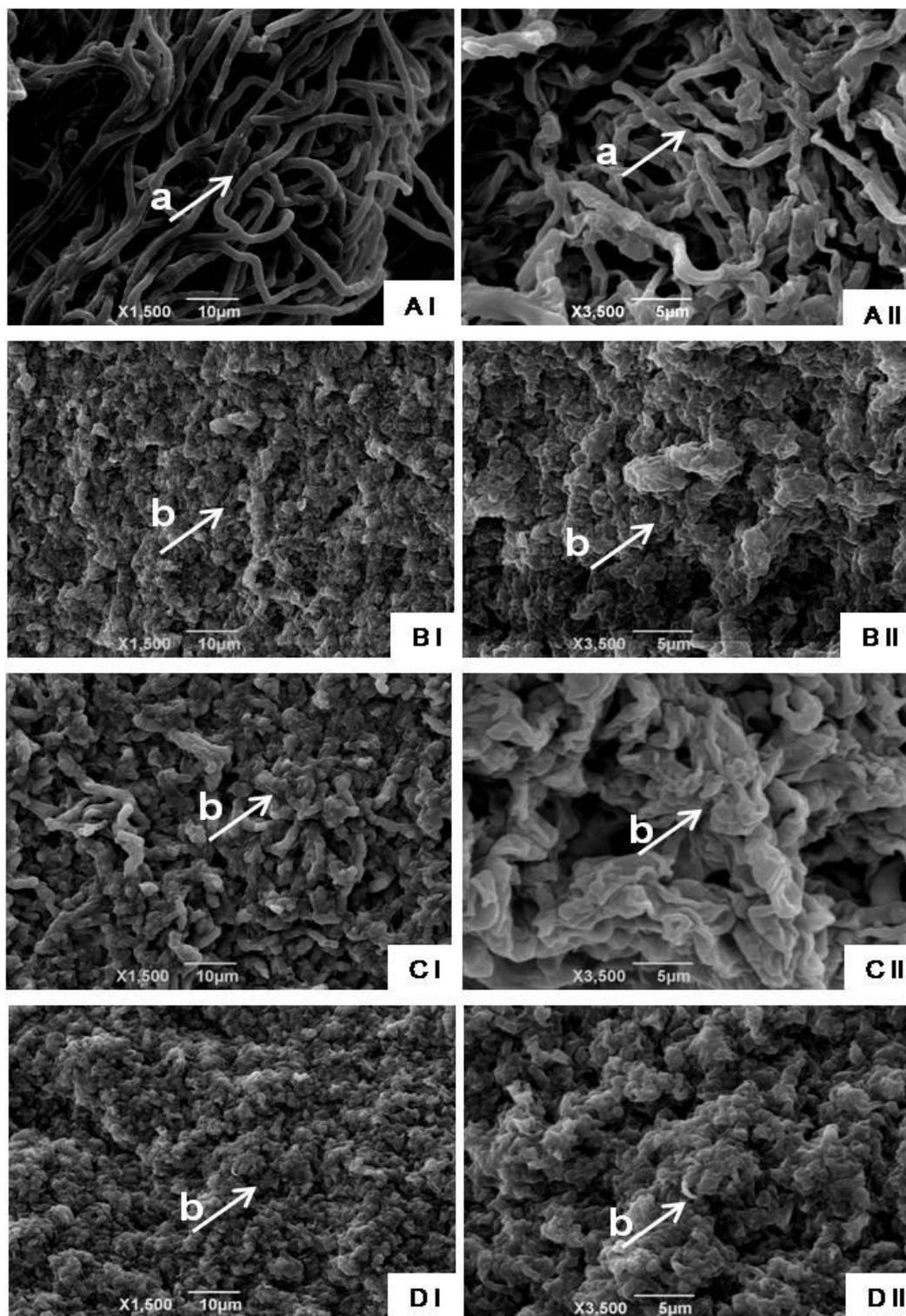


Figura 21: Eletromicrografias de fragmentos de *T. rubrum* CCT 5507 URM 1666.

Imagens com letras e o número I correspondem ao aumento de 1500x e letras seguidas do número II ao aumento de 3500x. Fragmentos fúngicos: não expostos a nenhuma substância de interesse (A); expostos ao cetoconazol (B); à terbinafina (C) e ao óleo essencial de *B. trimera* (D). “a” indica hifas sem alterações e com aspecto tubular. “b” demonstra hifas/ micélio enrugadas e/ou compactadas

Através das Figuras 22AI e 22AII é possível observar um grande número de hifas com forma cilíndrica e paredes lisas (seta “a”) e a presença de microconídios em formato esférico (seta “b”). Nas Figuras 22BI e 22BII ocorreu a destruição das hifas e há presença de estruturas arredondadas que se assemelham a microconídios, o que pode caracterizar a ação do cetoconazol como fungistática. Por outro lado, a terbinafina, de ação fungicida, ocasionou o achatamento das hifas formando uma espécie de placas sobrepostas (Figuras 22CI e 22CII) revelando danos às estruturas fúngicas. A ação do óleo essencial de carqueja ficou evidente nas Figuras 22DI e 22DII nas quais as hifas ganharam aspecto segmentado formando uma massa compacta. Dessa forma, por meio da análise morfológica é possível observar a diferença entre a ação farmacológica de cada substância testada.

Observa-se nas Figuras 22AI e 22AII a presença de hifas com morfologia semelhantes às encontradas por Park e colaboradores (2009), assim como alterações nas estruturas da linhagem de *T. mentagrophytes* submetidos à ação de nerolidol, terpineol e citral. Inouye e colaboradores (2007), também demonstraram mudanças na morfologia do *T. mentagrophytes* TIMM 2798 submetidas à ação do timol, como o “achatamento e enrugamento” das estruturas fúngicas.

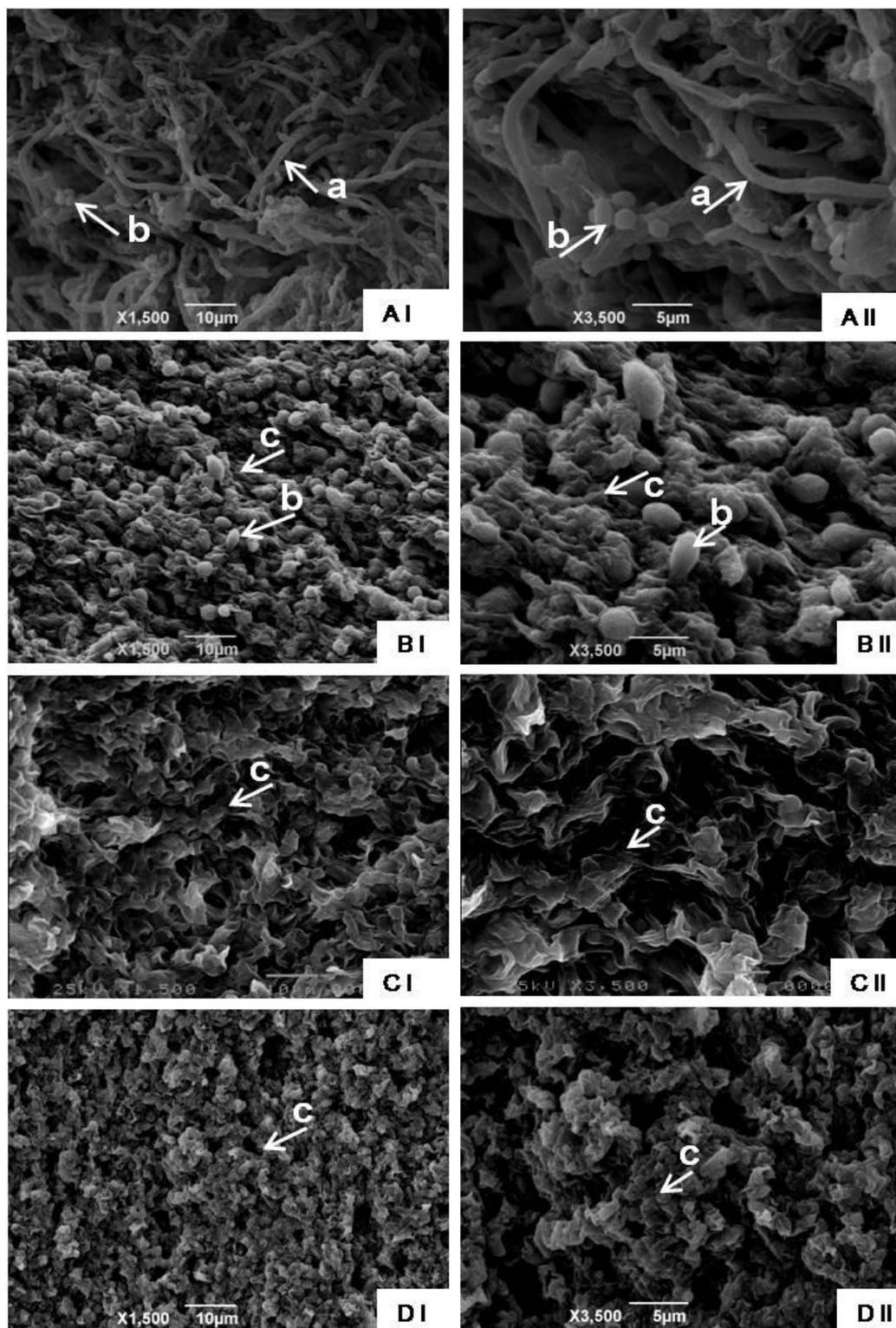


Figura 22: Eletromicrografias de fragmentos de *T. mentagrophytes* ATCC 9533.

Imagens com letras e o número I correspondem ao aumento de 1500x e letras seguidas do número II ao aumento de 3500x. Fragmentos fúngicos: não expostos a nenhuma substância de interesse (A); expostos ao cetoconazol (B); à terbinafina (C) e ao óleo essencial de *B. trimera* (D). “a” hifas sem alterações e “b” indica os microconídios; “c” indica hifas/ micélio formando uma massa compacta.

Na Figura 23 é possível visualizar a linhagem de *M. canis* ATCC 32903 em AI e AII, com destaque para um macroconídio (seta “a”) e o micélio (seta “b”). No entanto, quando a mesma linhagem fúngica foi submetida ao tratamento com cetoconazol (Figuras 23BI e 23BII), terbinafina (Figuras 23CI e 23CII) e óleo essencial de *B. trimera* (Figuras 23DI e 23DII), foram observadas hifas contorcidas com rugosidades e compactadas.

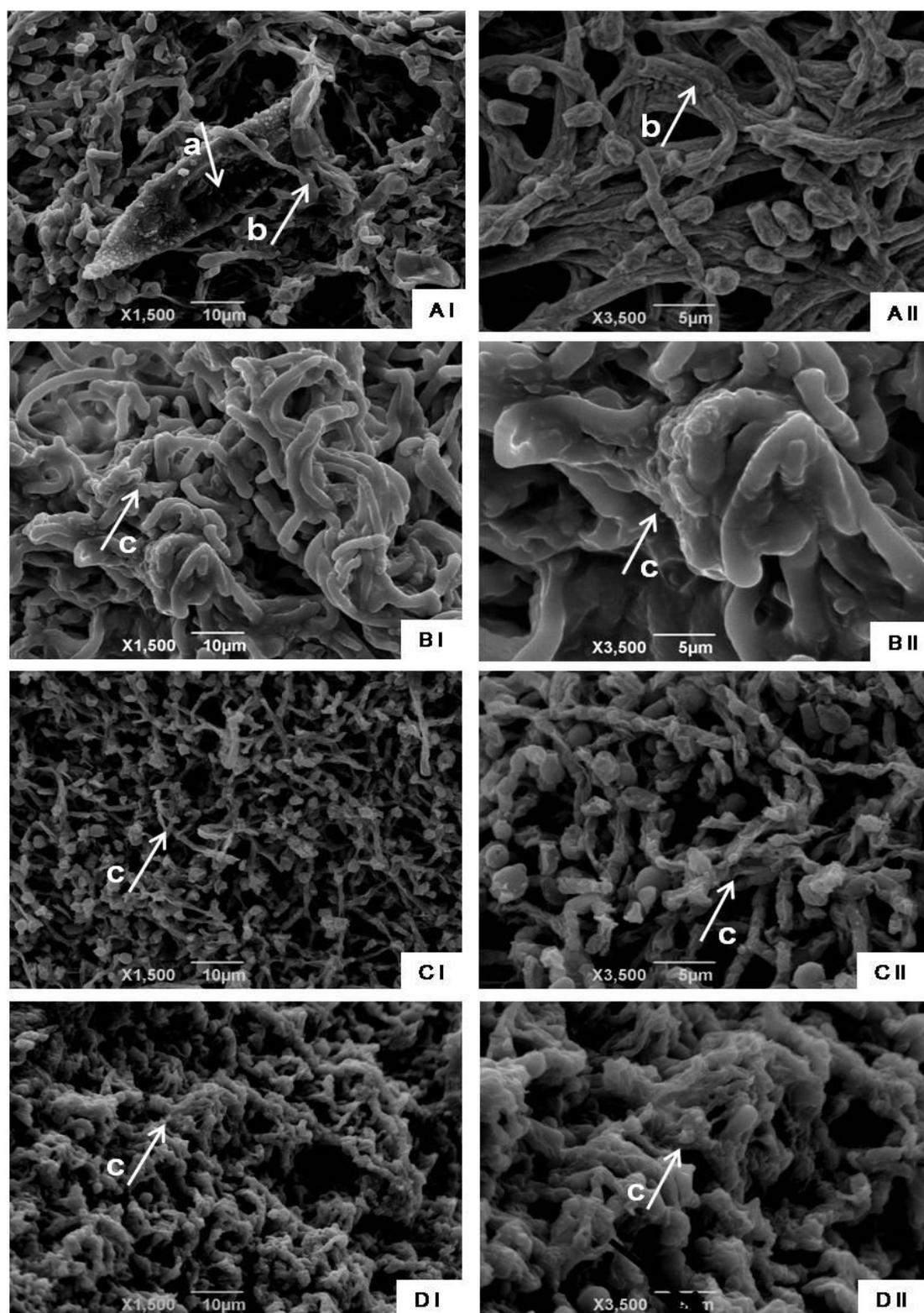


Figura 23: Eletromicrografias de fragmentos de *M. canis* ATCC 32903.

Imagens com letras e número I correspondem ao aumento de 1500x e letras seguidas do número II ao aumento de 3500x. Fragmentos fúngicos: não expostos a nenhuma substância com potencial antifúngico (A); expostos ao cetozonazol (B); terbinafina (C) e ao óleo essencial de *B. trimera* (D). "a": indica um macroconídio, "b": hifas sem alterações e "c": hifas/ micélio compactados e/ou contorcidas e aspecto rugoso.

Observando a Figura 24, em AI e AII é possível notar a presença de hifas tubulares com superfície lisa (seta “a”) e a presença de macroconídios (seta “b”). Após serem submetidos aos fármacos de referência, cetoconazol (Figuras 24BI e 24BII) e terbinafina (Figuras 24CI e 24CII), e ao óleo essencial de carqueja (Figuras 24DI e 24DII) as hifas ficaram compactadas (seta “c”) e os macroconídios apresentaram considerável enrugamento (seta “d”).

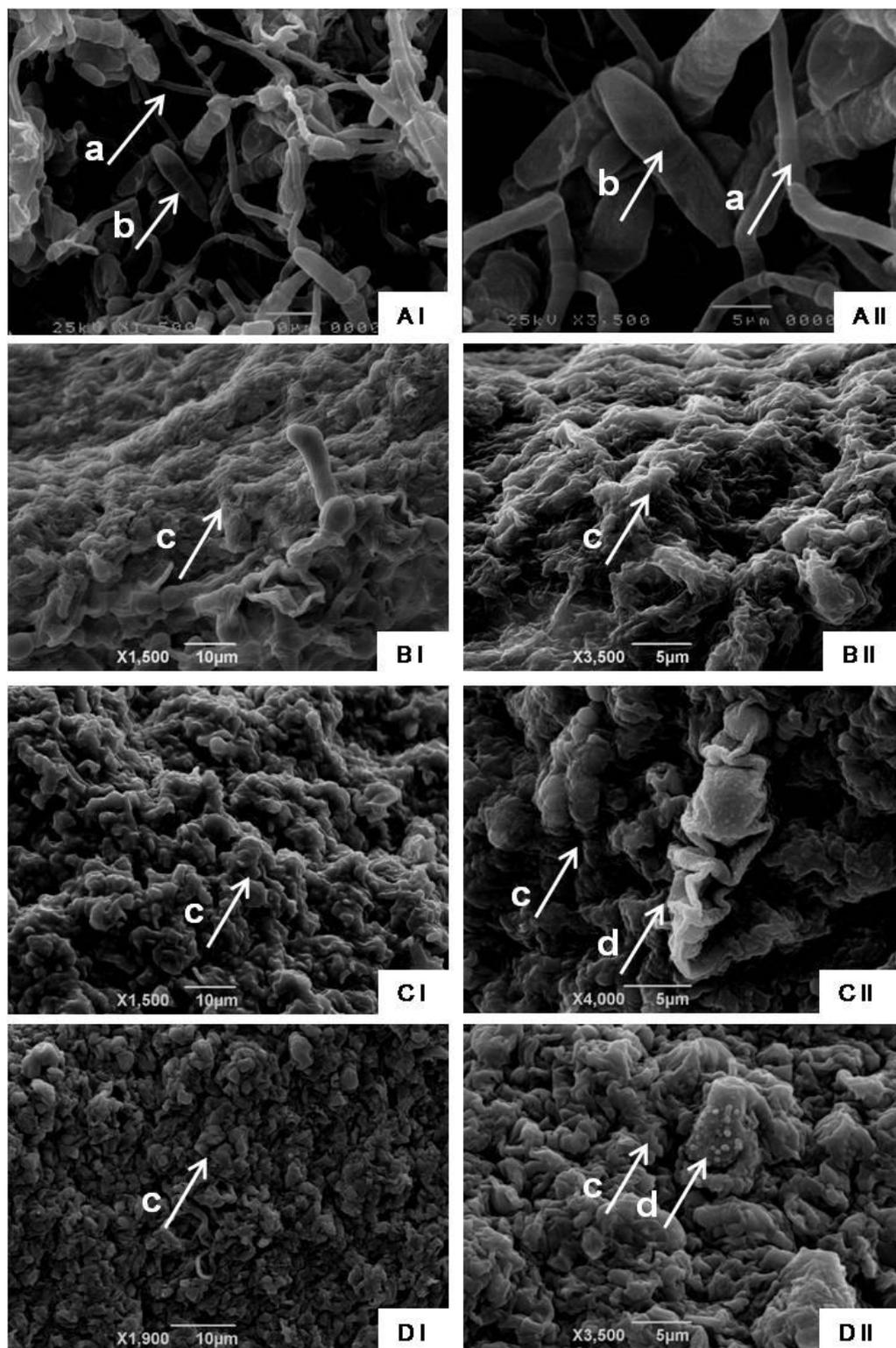


Figura 24: Eletromicrografias de fragmentos de *M. gypseum* ATCC 14683.

Imagens com letras e número I correspondem ao aumento de 1500x e, letras seguidas do número II ao aumento de 3500x; com exceção das imagens CII e DI que estão nos respectivos aumentos de 4000x e 1900x. Fragmentos fúngicos: não expostos a nenhuma substância de interesse (A); expostos ao ceticonazol (B); à terbinafina (C) e ao óleo essencial de *B. trimera* (D). "a" e "b" indicam respectivamente as hifas e os macroconídios sem alterações. "c" indica hifas/ micélio compactados e "d" um macroconídio enrugado.

Khan e Ahmad (2011) acreditam que o caráter lipofílico dos óleos essenciais pode ajudar na penetração da membrana celular e o acúmulo de polissacarídeos em condição de estresse pode levar à sua ruptura em células fúngicas. Mencionam ainda que tais efeitos sobre hifas fúngicas são responsáveis por uma diminuição na taxa de crescimento de esporos, micélio, produção de biomassa e da morfogênese.

As alterações observadas nas eletromicrografias dos fungos tratados com cetoconazol podem estar relacionadas diretamente às membranas internas. De fato, sabe-se que essas substâncias inibem a síntese do ergosterol, o que ocasiona maior fluidez da membrana e conseqüentemente sua desestabilização. Este dano também pode afetar a montagem da parede celular fúngica ao inibir enzimas de membrana responsáveis pela síntese de quitina (ROMAGNOLI et al., 2001).

Portanto, a análise conjunta dos dados demonstra a atividade antifúngica do óleo essencial de *B. trimera* frente a cinco linhagens de fungos filamentosos dermatófitos causadores de onicomicose, o que possibilitará o desenvolvimento de formulações inovadoras e o emprego das mesmas no controle alternativo da onicomicose. No entanto, estudos mais elaborados serão necessários para sabermos se a utilização deste óleo ou de alguns de seus componentes representará uma alternativa segura e viável para o controle destes fungos.

6 CONCLUSÃO

Os ensaios *in vitro* com o óleo essencial de *B. trimera* utilizado neste estudo demonstraram potencial antifúngico frente a cinco linhagens de fungos filamentosos dermatófitos.

Por meio da cromatografia gasosa foi evidenciada a presença de vinte constituintes químicos do óleo essencial de carqueja, entre eles o β – pineno, caracterizado como majoritário.

No teste preliminar não foi observada a ação do óleo essencial de *B. trimera* apenas frente à linhagem de *T. mentagrophytes* ATCC 11481. Através da atividade antifúngica foi possível observar sua efetividade com destaque para os valores da CIM ($0,03 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e CFM ($0,06 \mu\text{g.mL}^{-1}$) obtidos diante a linhagem de *T. rubrum* CCT 5507 URM 1666; para as demais linhagens testadas, os valores da concentração inibitória e fungicida mínima variaram de $0,03$ a $125 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Foi possível evidenciar e destacar a proximidade entre os valores de CIM e CFM proporcionados pelo óleo essencial de carqueja que lhe garante maior potência frente aos dermatófitos analisados.

Por meio da análise das eletromicrografias foi possível identificar as estruturas fúngicas e avaliar os expressivos danos ocasionados nos fragmentos fúngicos nos quais o óleo essencial de interesse foi ativo e, ainda, sugerir resultados semelhantes ao dos fármacos de referência, mas com intensidade distinta.

Tais resultados justificam a realização futura de ensaios que demonstrem o mecanismo de ação deste óleo e/ou componentes do mesmo, o desenvolvimento de formulações tópicas antifúngicas e a realização de ensaios *in vivo* a fim de confirmar sua eficácia e garantir sua segurança.

REFERÊNCIAS

ABOY, A. L.; APEL, M. A.; DEBENEDETTI, S.; FRANCESCATO, L.; ROSELLA, M. A.; HENRIQUES, A. T. Assay of caffeoylquinic acids in *Baccharis trimera* by reversed-phase liquid chromatography. **Journal of Chromatography, A (1219)**, p. 147 - 153, 2012.

ALMEIDA, S. R. APOSTILA DE MICOLOGIA CLÍNICA. FACULDADE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS. UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Disponível em: <<http://www.portalbrasil.net/downloads/micoses.pdf>>. Acesso em: 03 abr., 2011.

ALMEIDA, L. M. M.; SOUZA, E. A. F.; BIANCHIN, D. B.; SVIDZINSKI, T. I. Resposta in vitro de fungos agentes de micoses cutâneas frente aos antifúngicos sistêmicos mais utilizados na dermatologia. **Anais Brasileiros de Dermatologia, 84 (3)**, p. 249 - 255, 2009.

ALONSO, M. D. C. F.; GIJÓN, E. G.; PÉREZ, P. U. Onicomycosis. **Formación Médica Continuada en Atención Primaria, 17 (4)**, p. 251 - 256, 2010.

AMARAL, A. S.; MOSSI, A. J.; RADÜNZ, L. L.; TREICHEL, H.; TEIXEIRA, A. J.; LERIN, L. A.; ARGENTA, G. A. Cultivo de carqueja (*Baccharis trimera*) em solução nutritiva com diferentes concentrações de nitrogênio, fósforo e potássio. **Perspectiva, 34 (127)**, p. 25 - 34, 2010.

AMRI, M.; GORCII, M.; ESSABBAH, N.; BELHAJALI, H.; LETSCHER-BRU, V.; ZILI, J.; AZAIEZ, R.; BABBA, H. *Aspergillus sclerotiorum*: About a case of onychomycosis in Tunisia. **Journal de Mycologie Médicale, 20**, p. 128 - 132, 2010.

ANTIGNAC, E.; NOHYNEK, G. J.; RE, T.; CLOUZEAU, J.; TOUTAIN, H. Safety of botanical ingredients in personal care products/cosmetics. **Food and Chemical Toxicology, 49**, p. 324 - 341, 2011.

ARAÚJO, A. J. G.; BASTOS, O. M. P.; SOUZA, M. A. J.; OLIVEIRA, J. C. Onicomycoses por fungos emergentes: análise clínica, diagnóstico laboratorial e revisão. **Anais Brasileiros de Dermatologia, 78 (4)**, p. 445 - 455, 2003.

ARNAUD, P.; PASSERON, T.; GARI-TOUSSAINT, M. Épidermophytie rapidement extensive à *Trichophyton mentagrophytes* chez un sujet Immunocompétent. **Journal de Mycologie Médicale, 21**, p. 277 - 280, 2011.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 10520**: informação e documentação: citações em documentos: apresentação. Rio de Janeiro, 2002.

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

BENGER, S.; TOWNSEND, P.; ASHFORD, R. L.; LAMBERT, P. An in vitro study to determine the minimum inhibitory concentration of *Melaleuca alternifolia* against the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. **The Foot**, v. **14**, p. 86 – 91, 2004.

BIONDO, T. M.; TANAE, M. M.; COLETTA, E. D.; LIMA-LANDMANA, M. T. R.; LAPA, A. J.; SOUCCAR, C. Antisecretory actions of *Baccharis trimera* (Less.) DC aqueous extract and isolated compounds: Analysis of underlying mechanisms. **Journal of Ethnopharmacology**, **136**, p. 368 - 373, 2011.

BONIFAZ, A.; RIOS-YUIL, J. M.; ARENAS, R.; ARAIZA, J.; FERNÁNDEZ, R.; MERCADILLO-PÉREZ, P.; PONCE-OLIVERA, R. M. Comparison of direct microscopy, culture and calcofluor white for the diagnosis of onychomycosis. **Revista Iberoamericana de Micología**. 2012. Disponível em: http://ac.els-cdn.com/S1130140612000824/1-s2.0-S1130140612000824-main.pdf?_tid=11b9c058-7437-11e2-ac07-00000aab0f6c&acdnat=1360579244_ab6ce89a0a4daf99d569caff27625686. Acesso em: 11 fev. 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Detecção e Identificação dos Fungos de Importância Médica. Módulo VII. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicos/saude/microbiologia/mod_7_2004.pdf. Acesso em: 15 set. 2010a.

_____. _____. **Farmacopéia Brasileira. 5 ed., v. 2**, Brasília, 2010b.

BROOKS, G. F.; CARROLL, K. C.; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A.; MIETZNER, T. A. Microbiologia médica de Jawetz, Melnick e Adelberg. 25. ed. Porto Alegre: Ed. AMGH, 2012. 813 p.

CARIDDI, L.; ESCOBAR, F.; SABINI, C.; TORRES, C.; REINOSO, E.; CRISTOFOLINI, A.; COMINI, L.; MONTOYA, S. N.; SABINI, L. Apoptosis and mutagenicity induction by a characterized aqueous extract of *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. (Asteraceae) on normal cells. **Food and Chemical Toxicology**, **50**, p. 155 - 161, 2012.

CARNEY, C.; TOSTI, A.; DANIEL, R.; SCHER, R.; RICH, P.; DECOSTER, J.; ELEWSKI, B. A New Classification System for Grading the Severity of Onychomycosis. **Archives of Dermatology**, **147 (11)**, p. 1277 - 1282, 2011.

COPETO, S. C. M. F. Contribuição para o diagnóstico molecular das onicomicoses. Tese apresentada para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas. Universidade Nova de Lisboa. 2010.

CLINICAL AND LABORATORY AND STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi. Approved Standard M38-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, 2002.

_____. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi. Approved Standard – Second edition M38-A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, 2008.

DHIB, I.; FATHALLAH, A.; CHARFEDDINE, I. B.; MEKSI, S. G.; SAID, M. B.; SLAMA, F.; ZEMNI, R. Evaluation of Chitine synthase (CHS1) polymerase chain reaction assay in diagnosis of dermatophyte onychomycosis. **Journal de Mycologie Médicale**, **22**, p. 249 - 255, 2012.

DIAS, L. F. T.; MELO, E. S.; ERNANDES, L. S.; BACCHI, E. M. Atividades antiúlcera e antioxidante *Baccharis trimera* (Less) DC (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, **19 (1B)**, p. 309 - 314, 2009.

ELEWSKI, B. E.; RICH, P.; POLLAK, R.; PARISER, D. M.; WATANABE, S.; SENDA, H.; IEDA, C.; SMITH, K.; PILLAI, R.; RAMAKRISHNA, T.; OLIN, J. T. Efinaconazole 10% solution in the treatment of toenail onychomycosis: Two phase III multicenter, randomized, double-blind studies. **Journal of the American Academy of Dermatology**. 2012. Disponível em: http://ac.els-cdn.com/S0190962212011401/1-s2.0-S0190962212011401-main.pdf?_tid=1702e0fc-743d-11e2-ac59-0000aacb361&acdnat=1360581830_086d2a379dc8c50788e3bf909a91ca87. Acesso em: 11 fev. 2012.

ESPINEL-INGROFF, A.; FOTHERGILL, A.; PETER, J.; RINALDI, M. G. e WALSH, T. J. Testing Conditions for Determination of Minimum Fungicidal Concentrations of New and Established Antifungal Agents for *Aspergillus* spp.: NCCLS Collaborative Study. **Journal of Clinical Microbiology**, **40 (9)**, p. 3204 - 3208, 2002.

ESTEVEES, J. A.; CABRITA, J. D.; NOBRE, G. N. Micologia médica. 2. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1990. 1058 p.

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

FLORÃO, A. Avaliação de atividades biológicas de óleos essenciais de quatro espécies de *Baccharis*, Asteraceae. 2006. 97f. Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

FRAKI, J. E., HEIKKILA, H. T.; KERO, M. O.; KUOKKANEN, K. E.; OKSMAN, R. O.; RANTANEN, T. T.; SAARI, S. S.; STEN, M. S.; STUBB, S. H. A., UGELDAHL, P. E. An open-label, noncomparative, multicenter evaluation of fluconazole with or without urea nail pedicure for treatment of onychomycosis. **Current Therapeutic Research**, **58 (8)**, 1997.

FRANCO, D. C. Z. Atividade antifúngica do óleo resina de *Copaifera langsdorffii* Desf. frente a espécies de fungos dermatófitos. 2012, 107f. Dissertação para obtenção do título de Mestre apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal de Juiz de Fora. Juiz de Fora, MG.

FUGLSETH, E.; OTTERHOLT, E.; HOGMOEN, H.; SUNDBY, E.; CHARNOCK, C. e HOFF, B. H. Chiral derivatives of Butenafine and Terbinafine: synthesis and antifungal activity. **Tetrahedron**, **65**, p. 9807 - 9813, 2009.

GABURRI, D. Onicomicoses em pacientes com doenças inflamatórias intestinais: prevalência e fatores de risco. 2007. 100f. Dissertação (mestrado em Saúde Brasileira) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2007.

GOMES, J. M. F. Caracterização dos dermatófitos e leveduras isolados de lesões sugestivas de dermatomicoses em cães. 2004. 92f. Dissertação (mestrado em Ciências Veterinárias) Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Ceará.

GONÇALVES, J. M. Avaliação da atividade antimicrobiana e triagem fitoquímica dos extratos de espécies da família Asteraceae encontradas no semi-árido baiano. 2010. 91f. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana. Feira de Santana, BA.

GRECCO, S. S.; FERREIRA, M. J. P.; ROMOFF, P.; FAVERO, O. A.; LAGO, J. H. G. Phenolic derivatives from *Baccharis retusa* DC. (Asteraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, **42**, p. 21 - 24, 2012.

GUIMARÃES, N. S. S.; MELLO, J. C.; PAIVA, J. S.; BUENO, P. C. P.; BERRETTA, A. A.; TORQUATO, R. J.; NANTES, I. L.; RODRIGUES, T. *Baccharis dracunculifolia*, the main source of green propolis, exhibits potent antioxidant activity and prevents oxidative mitochondrial damage. **Food and Chemical Toxicology**, **50**, p. 1091 - 1097, 2012.

GUPTA, A.; COOPER, E. Examination of cure and relapse of dermatophyte toenail onychomycosis during long-term follow-up after oral therapy. **Journal of the American Academy of Dermatology**, **66**, **Is. 4**, **Sup. 1**, p. AB119, 2012.

_____; PAQUET, M. Onychomycosis in children. **Journal of the American Academy of Dermatology**, **66**, **Is. 4**, **Sup. 1**, p. AB120. 2012. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S019096221101735X>. Acesso em: 11 fev.2012.

HANEKE, E. Achilles foot-screening project: background, objectives and design. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, **12**, p. s2 – s5, 1999.

HAY, R. J. E BARAN, R. Onychomycosis: A proposed revision of the clinical classification. **American Academy of Dermatology**, **65**, p. 1219 - 1227, 2011.

HERNÁNDEZ-SALAZAR, A.; CARBAJAL-PRUNEDA, P.; MARTÍNEZ, R. F.; ARENAS, R. Dermatofitosis por *Trichophyton rubrum*. Experiencia de 10 años (1996 - 2005) en un servicio de dermatología de un hospital general de la Ciudad de México. **Revista Iberoamericana de Micología**, **24**, p. 122 - 124, 2007.

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 *Tricophyton mentagrophytes* in the foot bath. **Japanese Journal of Medicine Mycology**, **48**, p. 27 - 36, 2007.

KAVANAGH, K. Fungi : biology and applications. England: John Wiley & Sons Ltda, 2005. 293 p.

KHAN, M. S. A. e AHMAD, I. *In vitro* antifungal, anti-elastase and anti-keratinase activity of essential oils of *Cinnamomum*-, *Syzygium*- and *Cymbopogon*-species against *Aspergillus fumigates* and *Trichophyton rubrum*. **Phytomedicine**, **19**, p. 48 - 55, 2011.

KHOSRAVI, A. R.; SHOKRI, H.; FARAHNEJAT, Z.; CHALANGARI, R.; KATALIN, M. Antimycotic efficacy of Iranian medicinal plants towards dermatophytes obtained from patients with dermatophytosis. **Chinese Journal of Natural Medicines**, **11 (1)**, p. 0043 - 0048, 2013.

KOROISHI, A. M.; SEHN, E.; BAESSO, M. L.; UEDA-NAKAMURA, T.; NAKAMURA, C. V.; CORTEZ, D. A. G.; FILHO, B. P. D. Antifungal activity and nail permeation of nail lacquer containing *Piper regnellii* (Miq.) C. CD. var. *pallascens* (C. DC.) Yunck (Piperaceae) leave extracts and derivatives. **Molecules**, **15**, p. 3920 - 3931, 2010.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C. Micologia médica, fungos actinomicetos e algas de interesse médico. 7. ed. São Paulo: Ed. Savier, 1984. 695 p.

LAGO, J. H. G.; ROMOFF, P.; FAVERO, O. A.; SOUZA, F. O.; SOARES, M. G.; BARALDI, P. T. e CORRÊA, A. G. Chemical composition of male and female *Baccharis trimera* (Less) D.C. (Asteraceae) essential oils. **Biochemical Systematics and Ecology**, **36**, p. 737 - 740, 2008.

LARONE, D. H. Medically important fungi, a guide to identification. 3. ed. EUA: ASM press, 1995. 274 p.

LÁZARO, S. F.; FONSECA, L. D.; MARTINS, E. R.; OLIVEIRA, N. J. F.; DUARTE, E. R. Effect of aqueous extracts of *Baccharis trimera* on development and hatching of *Rhipicephalus microplus* (Acaridae) eggs. **Veterinary Parasitology**. 2013. Disponível em: http://ac.els-cdn.com/S0304401712006735/1-s2.0-S0304401712006735-main.pdf?_tid=e9379994-745d-11e2-8faf-00000aab0f26&acdnat=1360595926_fc4326d01ad96e1a568357a726796b3d. Acesso em: 11 fev. 2013.

LEE, S. L.; AHN, J. Y.; PARK, M. Y. Photodynamic therapy with methyl 5-aminolevulinic acid for treatment of onychomycosis: The efficacy and safety, **Journal of the American Academy of Dermatology**, **66**, **Is. 4**, **Sup. 1**, p. AB121. 2012. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0190962211017397>. 2012.

LEMSADDEK, A. Estudo de dermatófitos por métodos moleculares: identificação, resistência a antifúngicos e virulência. 2008. 218f. Tese de doutorado (Biologia). Departamento de Biologia Vegetal - Universidade de Lisboa, Lisboa, 2008.

LERMEN, C.; CAGNINI, C. Z.; PELISSON, D. C.; GIROTTO, D.; RODRIGUES, K. P. L. C.; NICARETA, L.; POYER, M.; CASTELLI, S.; BLANCO, R. F.; BENEDETTI, V. P. AÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL OBTIDO DA CARQUEJA – *Baccharis trimera* D.C. (ASTERACEAE) SOBRE *Cândida albicans*. **Biology & Health Journal**, **3 (2)**, p. 30 - 36, 2009.

LIMA, K. M.; DELGADO, M.; RÊGO, R. S. M.; CASTRO, C. M. M. B. *Candida albicans* e *Candida tropicalis* Isoladas de onicomicose em Paciente HIV-positivo: co-resistência *in vitro* aos azólicos. **Revista de Patologia Tropical**, **37 (1)**, p. 57 - 64, 2008.

_____; RÊGO, R. S. M.; MONTENEGRO, F. Diagnósticos Clínicos e Laboratoriais das Onicomicoses. **NewsLab**, 83 ed., p. 184 – 196, 2007.

_____; _____; PEREIRA, C. F. A.; DELGADO, M.; CASTRO, C. M. M. B. Características clínicas e microbiológicas de onicomicoses em pacientes HIV-positivos. **Revista Panamericana Infectologia**, **11 (3)**, p. 7 - 14, 2009.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas. 2. ed.. Nova Oeste, SP: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda. 2008. 544 p.

LOSQUI, Y. R.; ROZETE, F. S. S.; ALMEIDA, M. B.; BITTENCOURT, A. H. C.; PEREIRA, S. P. F. Atividade de *Baccharis trimera* (Less.) DC., (Asteraceae) sobre cultura de células *in vitro*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, **19 (4)**, p. 931 - 936, 2009.

MAGAGNIN, C. M.; STOPIGLIA, C. D. O.; VIEIRA, F. J.; HEIDRICH, D.; MACHADO, M.; VETORATTO, G.; LAMB, F. M.; SCROFERNEKER, M. L. Perfil de suscetibilidade a antifúngicos de dermatófitos isolados de pacientes com insuficiência renal crônica. **Anais Brasileiros Dermatologia**, **86 (4)**, p. 694 - 701, 2011.

MALAY, D. S.; YI, S.; BOROWSKY, P.; DOWNEY, M. S.; MLODZIENSKI, A. J. Efficacy of debridement alone versus debridement combined with topical antifungal nail lacquer for the treatment of pedal onychomycosis: a randomized, controlled trial. **The Journal of Foot & Ankle Surgery**, **48 (3)**, p. 294 - 308, 2009.

MARQUES, S. A.; CAMARGO, R. M. P.; FARES, A. H. G.; TAKASHI, R. M.; STOL, H. O. *Tinea capitis*: epidemiologia e ecologia dos casos observados entre 1983 e 2003 na Faculdade de Medicina de Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, **80 (6)**, p. 597 - 602, 2005.

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

MARTINELLI, P. R. P.; SANTOS, J. M. Microscopia eletrônica de varredura de fungos nematófagos associados a *Tylenchulus semipenetrans* e *Pratylenchus jaehni*. **Bioscience Journal**, **26 (5)**, p. 809 - 816, 2010.

MARTINEZ-ROSSI, N. M.; PERES, N. T. A.; ROSSI, A. Antifungal resistance mechanisms in dermatophytes. **Mycopathologia**, **166**, p. 369 - 383, 2008.

MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D. C.; DIAS J. E. Plantas medicinais. 5. ed. Viçosa: UFV, 2003. 220 p.

MATYSOVÁ, L.; SOLICH, P.; MAREK, P.; HAVLIKOVÁ, L.; NOVÁKOVÁ, L.; SICHA, J. Separation and determination of terbinafine and its four impurities of similar structure using simple RP-HPLC method. **Talanta**, **68**, p. 713 - 720, 2006.

MIO, L. L. M.; NOVAES, Q. S.; ALVES, E. Metodologias de preparação de amostras de ferrugem para estudos morfológicos de urediniósporos por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura. **Summa Phytopathologica**, **32 (3)**, p. 267 - 273, 2006.

MORAIS, L. A. S.; CASTANHA, R. F. Composição química do óleo essencial de duas amostras de carqueja (*Baccharis* sp.) coletadas em Paty do Alferes – Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, **13**, p. 628 - 632, 2011.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. Microbiologia Médica. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. 948 p.

NUNLEY, K. S.; CORNELIUS, L. Current management of onychomycosis. **Journal Hand Surg**, **33**, p. 1211 – 1214, 2008.

OLIVEIRA, J. C. Micologia Médica. Rio de Janeiro: Control-Lab, 1999.

OLIVEIRA, R. N.; REHDER, V. L. G.; OLIVEIRA, A. S. S.; JÚNIOR, I. M.; CARVALHO, J. E.; RUIZ, A. L. T. G.; JERALDO, V. L. S.; LINHARES, A. X.; ALLEGRETTI, S. M. *Schistosoma mansoni*: In vitro schistosomicidal activity of essential oil of *Baccharis trimera* (less) DC. **Experimental Parasitology**, **132**, p. 135 - 143, 2012.

PÁDUA, B. C.; SILVA, L. D.; JÚNIOR, J. V. R.; HUMBERTO, J. L.; CHAVES, M. M.; SILVA, M. E.; PEDROSA, M. L.; COSTA, D. C. Antioxidant properties of *Baccharis trimera* in the neutrophils of Fisher rats. **Journal of ethnopharmacology**, **129**, p. 381 - 386, 2010.

PALÁCIO, C. P. A. M.; BIASI, L. A.; NAKASHIMA, T.; SERRAT, B. M. Biomassa e óleo essencial de carqueja (*Baccharis trimera* (Less) DC.) sob influência de fontes e doses de nitrogênio. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, **9 (3)**, p. 58 - 63, 2007.

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**, **80**, p. 290 - 296, 2009.

PAUL, E. L. Análise Experimental da ação hepatoprotetora e anti-inflamatória de *Baccharis trimera* (Less) D.C. Asteraceae. 2005. 117f. Dissertação de mestrado (Curso de Pós-Graduação em Ciências Médicas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

PELEGRINI, A.; TAKAHASHI, J. P.; PEREIRA, C. Q. M.; PESSONI, R. B.; SOUZA, M. C. Incidence of dermatophytosis in a public hospital of São Bernardo do Campo, São Paulo State, Brazil. **Revista Ibero americana Micology**, **26 (2)**, p.118 - 120, 2009.

PEREIRA, F. O. Atividade antifúngica do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor sobre dermatófitos do gênero *Trichophyton*. 2009. 119f. Dissertação de mestrado (Programa de Pós-graduação em produtos naturais e Sintéticos Bioativos) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

PERES, N. T. A.; MARANHÃO, F. C. A.; ROSSI, A.; MARTINEZ-ROSSI, N. M. Dermatófitos: interação patógeno-hospedeiro e resistência a Antifúngicos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, **85 (5)**, p. 657 – 667, 2010.

PONNUSAMY, 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**, **132**, p. 349 - 354, 2010.

PURIM, K. S. M.; BORDIGNON, G. P. F.; QUEIROZ-TELLES, F. Fungal infection of the feet in soccer players and non-athlete individuals. **Revista Iberoamericana de Micología**, **22**, p. 34 - 38, 2005.

_____. Pele e esporte: Infecções fúngicas cutâneas podais no futebol profissional. 2006. 136f. Tese de doutorado (Curso de Pós- Graduação em Medicina Interna, Setor de Ciências da Saúde), Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. Rang & Dale Farmacologia. 6 ed. Rio de Janeiro: Ed. Elsevier, 2007.829 p.

RELLOSO, S.; ARECHAVALA, A.; GUELFAND, L.; MALDONADO, I.; WALKER, L.; AGORIO, I.; REYES. S.; GIUSIANO, G.; ROJAS, F.; FLORES, V.; CAPECE, P.; POSSE, G.; NICOLA, F.; TUTZER, S.; BIANCHI, M. Onicomycosis: estudio multicéntrico clínico, epidemiológico y micológico. **Revista Iberoamericana de Micología**, **29 (3)**, p. 157 – 163, 2012.

REZENDE, C.; BORSARI, G. P.; SILVA, A. C. F.; CAVALCANTI, F. R. Estudo epidemiológico das dermatofitoses em instituições públicas da cidade de Barretos, São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, **40 (1)**, p. 13 - 16, 2008.

RODRIGUES, C. R. F.; DIAS, J. H.; MELLO, R. N.; RICHTER, M. C.; PICADA, J. N.; FERRAZ, A. B. F. Genotoxic and antigenotoxic properties of *Baccharis trimera* in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, **125**, p. 97 - 100, 2009.

RODRIGUES, E. R. Estudo da ação de extratos vegetais de *Pothomorphe umbellata* e drogas antifúngicas sobre linhagens de *Trichophyton rubrum* e análise da expressão proteica. 2007. 104f. Dissertação de mestrado (Biotecnologia de Plantas Mediciniais e Microrganismos) – Universidade de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto.

ROMAGNOLI, C.; MARES, D.; BRUNI, A., ANDREOTTI, E.; MANFRINI, M.; VICENTINI, C. B. Antifungal activity of 5 new synthetic compounds vs. *Trichophyton rubrum* and *Epidermophyton floccosum*. **Mycopathologia**, **153**, p. 129 – 132, 2001.

ROMERO-CERECERO, O.; ROMÁN-RAMOS, R.; ZAMILPA, A.; JIMÉNEZ-FERRERA, J. E. J.; ROJAS-BRIBIESCA, G.; TORTORIELLO, J. Clinical trial to compare the effectiveness of two concentrations of the *Ageratina pichinchensis* extract in the topical treatment of onychomycosis. **Journal of Ethnopharmacology**, **126**, p.74 - 78; 2009.

ROSEEUW, D. Achilles foot screening project: preliminary results of patients screened by dermatologists. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, **12 (1)**, p. s6 – s9, 1999.

RUIZ, L. R. B.; DI CHIACCHIO, N. Manual de conduta nas onicomicoses Diagnóstico e tratamento Sociedade Brasileira de Dermatologia. Disponível em: < <http://www.cuce.com.br/arq/oncomicoses.pdf>>. Acesso em: 25 jan.2010.

SANTOS, D. A., ARAÚJO, R. A. C.; KOHLER, L. M.; MACHADO-PINTO, J.; HAMDANA, J. S.; CISALPINO, P. S. Molecular typing and antifungal susceptibility of *Trichophyton rubrum* isolates from patients with onychomycosis pre- and post-treatment. **International Journal of Antimicrobial Agents**, **29**, p. 563 - 569, 2007.

Santos, J. I.; Coelho, M. P. P. e Nappi, B. P. Diagnóstico laboratorial das dermatofitoses. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, v. 34, n. 1, p. 3 - 6, 2002.

SANTOS, M. L. Atividade antifúngica *in vitro* de cinco espécies de plantas medicinais contra *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes*. 2009. 83f. Dissertação de mestrado (Pós-Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Vale do Rio Doce, Governador Valadares.

SCHUCH, L. F. D. Plantas medicinais em atenção primária veterinária: atividade antimicrobiana frente a bactérias relacionadas com mastite bovina e dermatófitos. 2007. 206f. Tese de doutorado (Pós-Graduação em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

SEKER, E.; DOGAN, N.. Isolation of dermatophytes from dogs and cats with suspected dermatophytosis in Western Turkey. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 98, p. 46 – 51, 2011.

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

SILVA, D. C. M. N. Determinação experimental de parâmetros de processo na extração supercrítica de óleo essencial de carqueja (*Baccharis trimera* Less). 2004a. 130f. Dissertação de mestrado (Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos Centro Tecnológico) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

_____; BRESCIANI, L. F. V. DALAGNOL, R. L.; DANIELSKI, L.; YUNES, R. A.; FERREIRA, S. R. S. Supercritical fluid extraction of carqueja (*Baccharis trimera*) oil: Process parameters and composition profiles. **Food and bioproducts processing**, **87**, p. 317 - 326, 2009.

SILVA, F. G.; OLIVEIRA, C. B. A.; PINTO, J. E. B. P.; NASCIMENTO, V. E.; SANTOS, S. V.; SERAPHIND, J. C. e FERRI, P. H. Seasonal variability in the essential oils of wild and cultivated *Baccharis trimera*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, **18 (5)**, p. 990 - 997, 2007.

_____; NASCIMENTO, V. E.; PINTO, J. E. B. P.; OLIVEIRA, C. B. A.; SANTOS, M. R.; FERRI, P. H. Influência do processamento pós-colheita e armazenamento na composição química da droga vegetal e do óleo essencial de carqueja [*Baccharis trimera* (Less) D.C.] **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, **12 (4)**, p.436 - 442, 2010.

SILVA, M. R. O. Detecção da atividade antifúngica de extratos de plantas do manguezal de vila velha, Itamaracá-Pe. 2004b. 63f. Dissertação de mestrado (Pós-Graduação em Biologia de Fungos –Micologia Médica) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

SILVA, F. G.; PINTO, J. E. B. P.; CARDOSO, M. G.; NASCIMENTO, E. A.; NELSON, D. L.; SALES, J. F.; MOL, D. J. S. Influence of radiation level on plant growth, yield and quality of essential oil in carqueja. **Ciências e agrotecnologia**, **30 (1)**, p. 52 - 57, 2006.

SIMÕES, C. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G., MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. UFRGS/ UFSC, 2004. 1102 p.

SOUZA, L. K. H.; OLIVEIRA, C. M. A.; 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**, **33**, p. 247 - 249, 2002.

SOUZA, S. F. R. Onicomicose causadas por fungos filamentosos não dermatófitos. 2007, 119f. Dissertação de mestrado (Pós-graduação em Dermatologia) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

SYMOENS, F.; PLANARD, O. J. C.; FRATTI, M.; STAIB, P.; MIGNON, B.; MONOD, M. Molecular analysis and mating behaviour of the *Trichophyton mentagrophytes* species complex. **International Journal of Medical Microbiology**, **301**, p. 260–266, 2011.

TANRIVERDI, S. T. e ÖZER, O. Novel topical formulations of Terbinafine-HCl for treatment of onychomycosis. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. **48**, p. 628 – 636, 2013.

TOSTI, A.; BARAN, R.; PIRACCINI, B. M.; FANTI, P. A. "Endonyx" Onychomycosis: A New Modality of Nail Invasion by Dermatophytes. **Acta dermato-venereologica (Stockolm)**, **79**, p. 52 – 53, 1999.

UNIÃO BRASILIENSE DE CULTURA E EDUCAÇÃO. O laboratório de Fitopatologia auxilia ADAPEC na confirmação de Sigatoka Negra no Tocantins. Disponível em:

<<http://www.ubec.edu.br/ubec/objeto/texto/impressao.wsp?tmp.estilo=&tmp.area=1072&tmp.texto=2305>>. Acesso em: 15 abril 2011.

VEJNOVIC, I.; SIMMLER, L.; BETZ, G. Investigation of different formulations for drug delivery through the nail plate. **International Journal of Pharmaceutics**, **386**, p. 185 - 194, 2010.

VIEIRA, P. R. N. Atividade antifúngica dos óleos essenciais de espécies de *Ocimum* frente a cepas de *Candida spp.* e *Microsporum canis*. 2009. 89f. Dissertação de mestrado (Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza.

VILA, R.; SANTANA, A. I.; PÉREZ-ROSÉS, R.; VALDERRAMA, A.; CASTELLI, M. V.; MENDONÇA, S.; ZACCHINO, S.; GUPTA, M. P. e CAÑIGUERAL, S. Composition and biological activity of the essential oil from leaves of *Plinia cerrocampaensis*, a new source of a-bisabolol. **Bioresource Technology**, **101**, p. 2510 - 2514, 2010.

WELSH, O.; VERA-CABRERA, L.; WELSH, E. Onychomycosis. **Clinics in Dermatology**, **28**, p.151 - 159, 2010.

WEN, W.; MENG, Y.; XIAO, J.; ZHANG, P.; ZHANG, H. Comparative study on keratin structural changes in onychomycosis and normal human finger nail specimens by Raman spectroscopy. **Journal of Molecular Structure**, v. **1038**, p. 35 – 39, 2013.

WISSELINK, G. J.; ZANTEN, E. V.; KOOISTRA-SMID, A., M., D. Trapped in keratin; a comparison of dermatophyte detection in nail, skin and hair samples directly from clinical samples using culture and real-time PCR. **Journal of Microbiological Methods**, v. **85**, p. 62 – 66, 2011.

XAVIER, M. V. A.; BRITO, S. S. S.; OLIVEIRA, C. R. F.; MATOS, C. H. C.; PINTO, M. A. D. S. C. Óleo essencial de *Baccharis trimera* (Less.) DC. sobre o potencial fisiológico de sementes de feijão caupi. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, **14 (esp.)**, p. 214 - 217, 2012.

ZANARDI, D.; NUNES, D. H.; PACHECO, A. S.; TUBONE, M. Q.; FILHO, J. J. S. Avaliação dos métodos diagnósticos para onicomicose. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, **83 (2)**, p. 119 - 124, 2008.

YARAK, S.; ARAÚJO, T. M. A. Afecções ungueais nas doenças sistêmicas. O que as unhas podem dizer-nos. **Revista Brasileira de Medicina**, **66 (6)**, p. 15 - 19, 2009.

ANEXOS

Anexo A - Laudo de análise do óleo essencial de *Baccharis trimera*

Universidade Federal de Minas Gerais
 Instituto de Ciências Exatas
 Departamento de Química / Colegiado de Extensão
 Telefone : (31) 3409-5724 - e-mail: núcleo@qui.ufmg.br

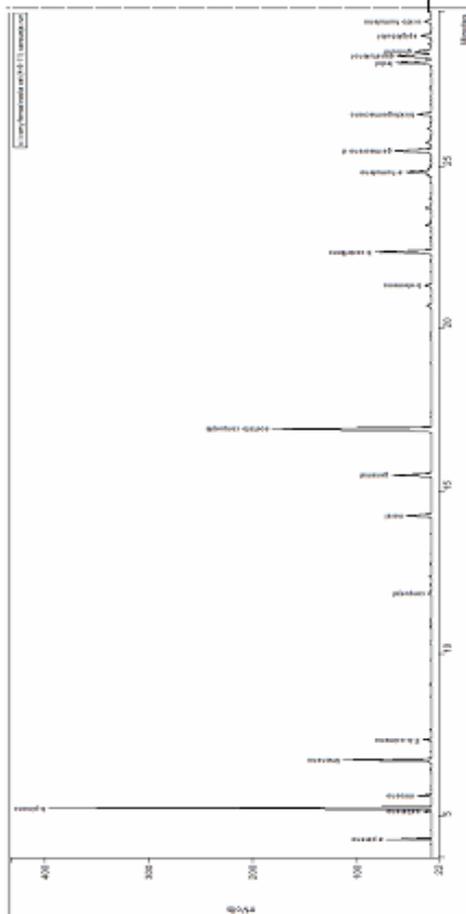
CERTIFICADO DE ANÁLISE QUÍMICA

Composição Química:

Solicitante: Profa. Nádia Raposo - UFJF

ÓLEO ESSENCIAL DE CARQUEJEJA AMARGA

Nome comercial: óleo de carquejeja amarga
 Nomenclatura botânica: *baccharis trimera*
 Lote: BATR10111
 Extração: destilação por arraste a vapor
 Parte da planta: folhas



Dra. Vany Ferraz
 Laboratório de Cromatografia
 Departamento de Química - UFMG
 vanyferraz@ufmg.br
 Belo Horizonte, 13/04/2011

Método de análise:

Cromatografia Gasosa de Alta Resolução, Cromatógrafo a Gás HP 5890.
 Coluna: BP-1 30m x 0,25mm (HP). Temp.: Coluna: 60°C (1min), 3°C/min, até 220°C. Injetor: 220°C
 Split: 1/50. Detetador FID: 220°C. Volume de injeção: 1 µl (conc 0,5 % em clorofórmio)

Obs: Picos menores que 0,1% foram excluídos

Av. Antônio Carlos, 6527 - Campus - Pampulha - Belo Horizonte / MG - Brasil - Cep: 31.270-901

Anexo B - Preparo do meio RPMI- 1640

O meio de cultura foi preparado conforme preconizado pelo CLSI (2008). Adicionar 10,4g de RPMI-1640 e 34,53g de tampão MOPS para cada 1 litro de água destilada. Após ajustar o volume, o pH da solução foi corrigido para 7,0 a 25°C, pela adição NaOH 1,0 mol/L. Posteriormente foi filtrado em membrana de 0,22 µm (CLSI, 2008).