



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE NA AMAZÔNIA
OCIDENTAL – CURSO DE MESTRADO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO
ESSENCIAL DE *Rosmarinus officinalis* L. SOBRE CEPAS DOS
DERMATÓFITOS *Microsporum canis* e *Trichophyton rubrum***

NATANIEL FRANCISCO DA SILVA

RIO BRANCO - ACRE

2018

NATANIEL FRANCISCO DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO
ESSENCIAL DE *Rosmarinus officinalis* L. SOBRE CEPAS DOS
DERMATÓFITOS *Microsporum canis* e *Trichophyton rubrum***

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde na Amazônia Ocidental da Universidade Federal do Acre, em cumprimento aos requisitos necessários para a obtenção do **Título de Mestre em Ciências da Saúde**, linha de pesquisa: Biotecnologia Aplicada à Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Anselmo Fortunato Ruiz Rodriguez.

Coorientador: Prof. Dr. Fernando Sérgio Escócio Drummond Viana de Faria.

Colaboradora: Prof.^a Dr.^a Edeltrudes de Oliveira Lima.

RIO BRANCO – ACRE

2018

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da UFAC

S586d Silva, Nataniel Francisco da, 1985-

Avaliação da atividade antifúngica do óleo essencial de *Rosmarinus Officinalis* L. sobre cepas dos Dermatofitos canis *Trichophyton rubrum*/ Nataniel Francisco da Silva; orientador: Dr. Anselmo Fortunato Ruiz Rodriguez; Coorientador: Dr. Fernando Sérgio Escócio Drummond Viana de Faria. – 2019. 53 f.: il.; 30 cm.

Mestrado (Dissertação) – Universidade Federal do Acre, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Amazônia Ocidental, Rio Branco, 2019. Inclui referências bibliográficas.

1. *Rosmarinus officinalis*. 2. Óleo essencial. 3. Dermatofitoses. I. Rodriguez, Anselmo Fortunato Ruiz (orientador). II. Faria, Fernando Sérgio Escócio Drummond Viana de (Coorientador). III. Título.

CDD: 660

Bibliotecária: Nádia Batista Vieira CRB-11º/882.

NATANIEL FRANCISCO DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO
ESSENCIAL DE *Rosmarinus officinalis* L. SOBRE CEPAS DOS
DERMATÓFITOS *Microsporum canis* e *Trichophyton rubrum***

BANCA EXAMINADORA

Presidente: _____

Prof. Dr. Anselmo Fortunato Ruiz Rodriguez

(Universidade Federal do Acre - UFAC)
Orientador

Examinadores:

Prof.^a Dr.^a Clarice Maia Carvalho

(Universidade Federal do Acre - UFAC)
Membro Interno

Prof. Dr. Flávio Nogueira da Costa

(União Educacional do Norte - UNINORTE)
Membro externo

Nos momentos de dificuldades, de desânimo e de ausência,

O amor, a compreensão, a força e apoio de vocês me fizeram continuar.

À minha família por acreditar em meus sonhos.

Aos meus amigos que foram fundamentais para a conquista dessa etapa da minha vida.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pois é dele que vem minha força e inspiração para lutar pelos meus sonhos.

A minha mãe, Noémia Silva, que em sua simplicidade, sempre cheia de amor e carinho, me encoraja em busca do conhecimento para alcançar meus ideais.

As minhas queridas Irmãs, Ana Cláudia Melo e Leoclíce Sene, que sempre estão ao meu lado para ajudar no que podem, assim como compartilhando de momentos, experiências e se alegrando com as minhas conquistas.

Aos meus cunhados, Elizeu Melo e Jocicleudo Figueiredo, pelo apoio, paciência e companheirismo em vários momentos dos meus estudos desde que se fizeram membro da minha família, principalmente nesta batalha.

Aos grandes companheiros de todas as tardes durante meu último trabalho/estágio (Fórum do Tribunal de Justiça do Estado do Acre/ Comarca de Senador Guimard – Acre), Adriana Maia, Claudenice Fernandes, Lucas Moreira e Dr. Afonso Branã, por emitir boas vibrações e alegrar-se comigo a cada vitória nas etapas de seleção para o mestrado.

Aos amigos que a vida me deu de presente, Andréia Gomes, Eliane Braña, Vagner Sena, Airton Carrilho, Márcia Fittipaldy, Guaiçara Lima, Hemeson Lira, Laura Nogueira, Maria Luciana Teles e Orlenilson Agostinho Batista, pelas boas conversas e palavras de incentivo nos momentos de desânimos durante esta caminhada.

As amigas que o mestrado me trouxe, Dagmar Soares e Mario do Socorro Gonçalves, que se fizeram presentes do início ao fim, não só nos momentos bons, mas também, na angústia, no estresse, no desespero, sempre me aconselhando e incentivando a lutar para vencer as dificuldades, bem como os desafios encontrados.

Aos amigos, Thiago Wudson Medeiros, Iuri Ferreira e Inácia Araújo, pela disponibilidade, apoio e companheirismo durante minha estadia em João Pessoa - PB.

À doutoranda, Daniele de F. Silva, pela amizade, competência, e auxílio no desenvolvimento correto das técnicas durante os ensaios biológicos realizados na Universidade Federal da Paraíba - UFPB.

À Prof.^a Dr.^a Edeltrudes de O. Lima, pela atenção, acolhimento e confiança depositada durante a execução deste trabalho em seu laboratório na Universidade Federal da Paraíba - UFPB.

À secretária, Ana Caroline Vasconcellos, pela amabilidade, cordialidade e disponibilidade em me atender todas as vezes que procurei a secretaria do programa.

Ao Prof. Dr. Romeu Paulo M. Silva, pela oportunidade em ter realizado o estágio obrigatório sob sua supervisão na disciplina de Anatomia Humana no curso de bacharelado em Medicina.

Ao Prof. Dr. Dionatas Ulisses de O. Meneguetti, pelas contribuições iniciais no desenvolvimento da escrita deste trabalho.

À Prof.^a Dr.^a Clarice Maia Carvalho, pelos ensinamentos e despertar meu interesse pela Microbiologia, principalmente pela Médica, durante minha passagem pelo curso de Bacharelado em Enfermagem da Universidade Federal do Acre – UFAC.

Aos professores, Dr. Carrumbeth C. Fernandes e Me. Sandra Ribeiro, pelos incentivos, conhecimentos compartilhados e ensinamentos, perante as minhas visitas em seus respectivos laboratórios na Universidade Federal do Acre - UFAC.

Aos professores, Dr. Anselmo Fortunato R. Rodriguez e Dr. Fernando Sérgio Escócio D. Viana de Faria, orientador e coorientador, respectivamente, pela oportunidade, parceria, paciência em me orientar neste trabalho com seus ensinamentos e assim contribuindo para minha formação científica.

A todos os professores do programa de pós-graduação em Ciências da Saúde, pela partilha de seus conhecimentos de maneira eficiente, ética e compromissada, alavancando o crescimento da turma de forma científica.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior, pela concessão de bolsa de estudo no último ano.

À Universidade Federal do Acre e ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde na Amazônia Ocidental, pela oportunidade de cursar o mestrado, aperfeiçoando assim a busca incessante pelo conhecimento.

À banca examinadora, Prof.^a Dr.^a Carin Gorete H. Hoffmeister, Prof.^a Dr.^a Edeltrudes de O. Lima, Prof.^a Dr.^a Clarice Maia Carvalho e Prof. Dr. Flavio Nogueira da Costa,

pelo aceite do convite e contribuições enriquecedoras no manuscrito, a saber exames de qualificação e defesa da dissertação.

Agradeço a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram de maneira significativa para a conquista dessa grande vitória, muito obrigado!

Enfim, Mestre...!

“Embora ninguém possa voltara atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim.”

(Chico Xavier)

RESUMO

As dermatofitoses são infecções fúngicas cutâneas causadas por um grupo de fungos chamados dermatófitos, que constituem um dos grupos de infecções fúngicas mais frequentes na prática dermatológica. Diante da importância clínica, este estudo teve como objetivo avaliar a atividade antifúngica do óleo essencial *Rosmarinus officinalis* L. sobre cepas de *Microsporum canis* e *Trichophyton rubrum*, por meio da triagem microbiológica, da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM). Também foi realizada a análise da composição química do óleo essencial através da cromatografia a gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM). Na triagem microbiológica, dentre os quatro óleos essenciais testados, o óleo essencial de *R. officinalis* L., apresentou melhor atividade antifúngica, inibindo 66% das cepas ensaiadas. Os valores de CIM e CFM do óleo essencial sobre as cepas ensaiadas, variaram de 128 a 64 µg/mL, respectivamente. A análise fitoquímica de *R. officinalis* L., mostrou que os principais constituintes do óleo essencial são: acetato de isobornila (61,72%), metil-heptenona (17,56%), octynes (12,5%), bomeol (3,4%), inositol (2,74%) e ácido palmítico (1,67%). Assim, os resultados indicam que o óleo essencial de *R. officinalis* L., apresenta forte atividade antifúngica contra *M. canis* e *T. rubrum*, podendo ser considerado uma alternativa para o tratamento doenças micóticas que mais acometem o homem, as dermatofitoses.

Palavras-chave: *Rosmarinus officinalis*, óleo essencial, dermatofitoses, *Microsporum canis*, *Trichophyton rubrum*.

ABSTRACT

Dermatophytoses are cutaneous fungal infections caused by a group of fungi called dermatophytes, which constitute one of the most frequent groups of fungal infections in dermatological practice. The objective of this study was to evaluate the antifungal activity of essential oil *Rosmarinus officinalis* L. on strains of *Microsporum canis* and *Trichophyton rubrum*, by means of microbiological screening, determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC). It was also carried out the analysis of the chemical composition of the essential oil through the gas chromatography coupled to the mass spectrometer (GC-MS). In the microbiological screening, among the four essential oils tested, the essential oil of *R. officinalis* L., presented better antifungal activity, inhibiting 66% of the strains tested. The MIC and MFC values of the essential oil on the strains tested ranged from 128 to 64 µg / mL, respectively. The phytochemical analysis of *R. officinalis* L. showed that the main constituents of the essential oil are: isobornyl acetate (61.72%), methylheptenone (17.56%), octynes (12.5%), bomeol (3.4%), inositol (2.74%) and palmitic acid (1.67%). Thus, the results indicate that the essential oil of *R. officinalis* L., has a strong antifungal activity against *M. canis* and *T. rubrum*, and it can be considered an alternative for the treatment of fungal diseases that affect man, dermatophytoses.

Keywords: *Rosmarinus officinalis*, essential oil, dermatophytosis, *Microsporum canis*, *Trichophyton rubrum*

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Óleos essenciais utilizados no <i>screening</i> para avaliação da atividade antifúngica sobre as cepas de <i>Microsporum canis</i> e <i>Trichophyton rubrum</i>	30
Quadro 2: <i>Screening</i> microbiológico dos óleos essenciais sobre às cepas de <i>M. canis</i> e <i>T. rubrum</i>	34
Quadro 3: Fitoconstituintes do óleo essencial das folhas de <i>R. officinalis</i> L.	36
Quadro 4: Valores da Concentração Mínima Inibitória (CIM) de <i>R. Officinalis</i> L. sobre os dermatófitos.	37
Quadro 5: Valores da Concentração Fungicida Inibitória (CFM) de <i>R. Officinalis</i> L. sobre os dermatófitos.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASD - Ágar Sabouraud Dextrose

ATCC - American Type Culture Collection

CCS - Centro de Ciências da Saúde

CFM - Concentração Fungicida Mínima

CIM - Concentração Inibitória Mínima

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute

DCF - Departamento de Ciências Farmacêuticas

DMSO - Dimetilsulfóxido

LM - Laboratório de Micologia

NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards

OE - Óleo essencial

RPMI - Instituto Roswell Park Memorial

UFC - Unidade Formadora de Colônia

UFPB - Universidade Federal da Paraíba

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo Geral.....	18
2.2 Objetivos Especificos.....	18
3. REFERENCIAL TEÓRICO	20
3.1 Dermatófitos.....	20
3.2 Dermatofitoses.....	21
3.3 <i>Rosmarinus Officinalis</i> L.....	25
4. MATERIAL E METÓDOS	28
4.1 Local da pesquisa.....	28
4.2 Cepas dos micro-organismos.....	28
4.3 Meios de cultura.....	28
4.4 Inóculo.....	28
4.5 Antifúngico.....	29
4.6 Óleos essenciais.....	29
4.7 <i>Screening</i> microbiológico.....	30
4.8 Cromatografia do óleo essencial.....	31
4.9 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	31
4.10 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM).....	32
5. RESULTADOS	34
5.1 <i>Screening</i> microbiológico.....	34
5.2 Cromatografia do óleo essencial <i>R. officinalis</i> L.....	35
5.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	36
5.4 Determinação da Concentração Fungicida (CFM).....	37
6. DISCUSSÃO	40
7. CONCLUSÃO	45
REFERÊNCIAS	47

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Os fungos foram considerados como vegetais durante muito tempo, e somente a partir do ano de 1969, passaram a ser classificados em um reino à parte, denominado Fungi (OLIVEIRA et al., 2015).

Os dermatófitos constituem um grupo de fungos que, em vida parasitária, têm a capacidade de invadir tecidos queratinizados (SIQUEIRA et al., 2006) como cabelos, pele e unhas (ELMEGEED et al., 2015) de seres humanos e outros animais (MOHAMMADI et al., 2015) originando uma infecção denominada de dermatofitose (COELHO et al., 2008). Compreendem os gêneros *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton* (TOLEDO, 2006), semelhantes em sua morfofisiologia, imunologia e taxonomia (COSTA et al., 1999).

As micoses superficiais são frequentes na prática diária, sendo causadas principalmente por fungos filamentosos e, menos comumente, por leveduras (DIOGO et al., 2010). São as infecções fúngicas mais representativas e constituem o principal objeto da micologia médica.

As dermatofitoses, também conhecidas como tinhas ou tineas (SCHOELER et al., 2010) são infecções fúngicas superficiais (CORTEZ et al., 2012), que estão entre as infecções de localização cutânea mais comum no homem (SCHOELER et al., 2010). Apresentando ocorrência preferencial nos adultos jovens, em localizações como unhas, pés e pele lisa do corpo, enquanto as lesões do couro cabeludo são mais comumente diagnosticadas em crianças (COSTA et al., 1999), constituindo um dos grupos de infecções fúngicas mais frequentes na prática dermatológica (SIQUEIRA et al., 2006). Sendo consideradas o terceiro distúrbio de pele mais comum em crianças menores de 12 anos e o segundo da população adulta (PINHEIRO et al., 1997; BRILHANTE et al., 2000; RAMADINHA et al., 2010; NEVES et al., 2011).

A prevalência dos dermatófitos é variável nas diversas regiões do mundo e dentro de um mesmo país, devido a fatores como clima, condições socioeconômicas e higiênicas da população, urbanização, sistema imunológico do hospedeiro, características fúngicas e ações terapêuticas (GÜRTLER et al., 2005). A Organização Mundial de Saúde tem calculado uma frequência global de micoses superficiais de 20% a 25% da população, sendo que destas, 5 a 10% são causados por dermatófitos (SOUZA et al., 2014). Também, estima-se que 10 a 15% da população mundial, pode ser infectada pelos dermatófitos no decorrer de suas vidas (BRILHANTE et al., 2000; SIQUEIRA et al., 2006; PIRES et al., 2014).

As plantas medicinais correspondem às mais antigas “armas” empregadas pelo homem no tratamento de enfermidades de todos os tipos (FIRMO et al., 2011). A utilização de suas propriedades terapêuticas representa uma forma de tratamento e cura das doenças, que está associada ao conhecimento popular empírico e, paulatinamente vem sendo reconhecido e incorporado ao saber científico (DANTAS; GUIMARÃES, 2007). Dentre os agentes terapêuticos oriundos das plantas com uso medicinal e científico, encontramos os óleos essenciais (COSTA et al., 2008).

Os óleos essenciais constituem os elementos voláteis contidos em muitos órgãos vegetais (LIMA et al., 2006), são misturas naturais muito complexas formados por plantas aromáticas como metabolitos secundários (MUGNAINI et al., 2013).

O alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) é de considerável importância em termos de sua grande importância medicinal e valor aromático, sendo o óleo essencial importante para usos medicinais, como poderoso antibacteriano, citotóxico, antimutagênico, antioxidante, antiflogísticas e quimiopreventivas (HUSSAIN et al., 2010). Neste contexto, objetivou-se avaliar a atividade antifúngica do óleo essencial sobre cepas dos dermatófitos *Microsporum canis* e *Trichophyton rubrum* buscando uma alternativa natural para tratamento das dermatofitoses.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 - GERAL

Avaliar *in vitro* a atividade antifúngica do óleo essencial das folhas de *Rosmarinus officinalis* L. sobre cepas de *Microsporum canis* e *Trichophyton rubrum*.

2.2 - ESPECÍFICOS

- Realizar um *screening* com óleos essenciais para selecionar o melhor produto com atividade antifúngica sobre as cepas de *M. canis* e *T. rubrum*;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) do óleo essencial selecionado com melhor atividade antifúngica sobre as cepas de *M. canis* e *T. rubrum*;
- Investigar através da cromatografia gasosa e espectrometria de massa (GC/MS) os compostos orgânicos presentes no óleo essencial selecionado.

REFERENCIAL TEÓRICO

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 - Dermatófitos

Os dermatófitos constituem um grupo de fungos que, em vida parasitária, têm a capacidade de invadir tecidos queratinizados (SIQUEIRA et al., 2006) como cabelos, pele e unhas (ELMEGEED et al., 2015) de seres humanos e outros animais (MOHAMMADI et al., 2015) originando uma infecção denominada de dermatofitose (COELHO et al., 2008).

São classificados em três gêneros: *Epidermophyton* (causa infecções na pele e unhas), *Microsporum* (que causa infecções na pele e do cabelo) e *Trichophyton* (causa infecções na pele, cabelo e unhas) (SAHOO et al., 2016), cujas características morfológicas, fisiológicas e antigênicas relacionam-se entre si (VILANI-MORENO et al., 1999). Possuem propriedades queratinofílicas e queratinolíticas (ELMEGEED et al., 2015) e são os agentes responsáveis pela maioria das micoses cutâneas (STEINER et al., 1999). O gênero *Microsporum* compreende espécies como *Microsporum canis*, *M. gypseum*, *M. audouinii*, *M. cookei* e *M. nanum*. O gênero *Trichophyton* tem como espécies mais importantes *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans*, *T. schoenleinii*, *T. violaceum* e *T. verrucosum* (SANTOS et al., 2002).

O gênero *Trichophyton* é composto por diversas espécies, dentre as quais destaca-se pela frequência de isolamento *Trichophyton rubrum* (SIQUEIRA et al., 2006), um fungo filamentosso antropofílico que mais infecta comumente as unhas e a pele (GHELARDI et al., 2014), sendo responsável por cerca de 70% de todas as infecções por dermatófitos (LANA et al., 2016), tendo as mesmas características de cronicidade e progressão lenta, sugerindo que o fungo tenha-se adaptado ao hospedeiro humano (PERES et al., 2010).

Podem ser divididos em três grupos ecológicos, conforme seu habitat e/ou hospedeiros naturais, em antropofílicos (parasitas exclusivamente humanos), zoofílicos (parasitam animais domésticos ou silvestres) ou geofílicos que desenvolvem-se sobre a queratina presente no solo, originária do homem e/ou dos animais, ou, ainda, produtos de degradação desta (OLIVEIRA et al., 2006; NWEZE, 2011; TOLEDO et al., 2006). Essa especificidade determina variações na expressividade clínica das lesões que produzem (RODRIGUES et al., 2008).

Geralmente, as espécies zoofílicas e geofílicas formam lesões mais inflamatórias que podem resolver espontaneamente ao contrário das antropofílicas que tendem à cronicidade (CARVALHO et al., 2016).

Provavelmente, os dermatófitos apareceram na era mesozoica. No princípio, viviam no solo, e posteriormente, através do contato frequente com animais e humanos, algumas espécies se adaptaram a esses hospedeiros causando infecções (URIBE et al., 2013). Durante o processo evolutivo, os zoofílicos teriam abandonado o solo e se adaptado em espécies animais que apresentam contato mais íntimo com o solo, enquanto os antropofílicos foram paulatinamente galgando andares superiores da escala filogenética, saindo do solo para adaptação a algumas espécies animais e, por último, uma adaptação ao homem (OLIVEIRA et al., 2015).

A prevalência dos dermatófitos é variável nas diversas regiões do mundo e dentro de um mesmo país, devido a fatores como clima, condições socioeconômicas e higiênicas da população, urbanização, sistema imunológico do hospedeiro, características fúngicas e ações terapêuticas (Gürtler et al., 2005).

A Organização Mundial de Saúde tem calculado uma frequência global de micoses superficiais de 20% a 25% da população, sendo que destas, 5 a 10% são causados por dermatófitos (SOUZA et al., 2014). Também, estima-se que 10 a 15% da população mundial, pode ser infectada pelos dermatófitos no decorrer de suas vidas (BRILHANTE et al., 2000).

3.2 - Dermatofitoses

As dermatofitoses, também conhecidas como tinhas ou tineas (SCHOELER et al., 2010) são infecções fúngicas superficiais cutâneas causadas por um grupo de fungos chamados dermatófitos (CORTEZ et al., 2012), que possuem um biotropismo especial por tecidos de estruturas queratinizadas, como pelos, unhas e pele (MEDEIROS et al., 2009), e compreendem os gêneros *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton* (TOLEDO et al., 2006), semelhantes em sua morfofisiologia, imunologia e taxonomia (COSTA et al., 1999).

As dermatofitoses estão entre as infecções fúngicas de localização cutânea mais comum no homem (SCHOELER et al., 2010) e são classificadas clinicamente, de acordo com as localizações anatômicas afetadas por estes fungos. A denominação de cada tipo de dermatofitose é feita adicionando-se um nome latino que designa o

local do corpo afetado à palavra *tinea* (SANTOS et al., 2002). Por exemplo: *tinea capitis* no couro cabeludo, *tinea pedis* nos pés, *tinea corporis* no corpo, *tinea cruris* na região inguinal e *tinea unguium* nas unhas (TOMAZ, 2011).

Apresenta ocorrência preferencial nos adultos jovens, em localizações como unhas, pés e pele lisa do corpo, enquanto as lesões do couro cabeludo são mais comumente diagnosticadas em crianças (COSTA et al., 1999), constituindo um dos grupos de infecções fúngicas mais frequentes na prática dermatológica (SIQUEIRA et al., 2006). São consideradas o terceiro distúrbio de pele mais comum em crianças menores de 12 anos e o segundo da população adulta (PINHEIRO et al., 1997; BRILHANTE et al., 2000; RAMADINHA et al., 2010; NEVES et al., 2011).

A transmissão ocorre pelo contato direto ou indireto com artroconídios fúngicos (MADRID et al., 2012) ou indireto por fômites contaminados (PERES et al., 2010). Também pode ocorrer pela exposição a ambientes que alberguem esporos ou queratinócitos da epidermopose (SILVA et al., 2011), os quais podem permanecer viáveis no ambiente por até 18 meses (MADRID et al., 2012).

Os dermatófitos possuem a capacidade de digerir queratina presente na pele e seus anexos (SOUZA et al., 2014) causando danos mecânicos que resultam em descamação da superfície epitelial e quebra do pelo. Por outro lado, seus metabólitos se difundem pelas células da epiderme (MADRID et al., 2012) podendo desencadear ou não resposta inflamatória no hospedeiro (SOUZA et al., 2014). Para se instalar na epiderme, o patógeno deve aderir à superfície do tecido, o artroconídio deve germinar e a hifa deve então penetrar rapidamente no estrato córneo, evitando que o fungo seja eliminado com a descamação do epitélio (PERES et al., 2010).

A resposta imunológica do hospedeiro frente às infecções pelos dermatófitos depende de fatores como as defesas do hospedeiro a metabólitos do fungo, a virulência da cepa ou da espécie infectante, a localização anatômica da infecção e as características ambientais locais. Os fatores de susceptibilidade individual ainda não foram esclarecidos, podendo estar relacionados a variações na composição dos ácidos graxos no sebo, à tensão de dióxido de carbono na superfície da pele, à presença de umidade ou à existência no suor e no soro de substâncias inibidoras para o crescimento de dermatófitos (CRIADO et al., 2011).

Um mecanismo de defesa importante do hospedeiro é o processo de queratinização, que leva a descamação epitelial e conseqüentemente à possível

remoção do fungo (PERES et al., 2010). Acredita-se que o sistema imune amplifique alguma resposta endógena da epiderme à infecção, pois se observa elevada taxa de substituição epitelial, com pico no máximo da resposta imunológica (CRIADO et al., 2011).

As manifestações clínicas decorrentes das dermatofitoses resultam tanto da colonização e multiplicação dos dermatófitos na camada córnea da pele, quanto pela consequente reação dos hospedeiros (SANTOS et al., 2002).

Os sintomas podem ser brandos ou severos dependendo do estado imunológico do hospedeiro, geralmente não ocorre invasão de tecidos subcutâneos ou órgãos internos (REZENDE et al., 2016), porém quando ocorre processo invasivo, pode ocasionar infecção profunda e disseminada em pacientes imunocomprometidos, até mesmo com surgimento de granulomas dermatofíticos (PERES et al., 2010).

O diagnóstico primeiramente, é realizado através de uma avaliação clínica onde se observam as características das lesões (SOUZA et al., 2014). Entretanto, em muitos casos, o diagnóstico clínico não é confiável, uma vez que existem muitos diferenciais, e o diagnóstico laboratorial é necessário para ganhar acesso ao tratamento em doença mais grave (KIZNY et al., 2016).

O diagnóstico laboratorial é baseado no exame microscópio direto, após clarificação com KOH (hidróxido de potássio) em concentração que varia de 10% a 40% (SOMENZI et al., 2006; SOUZA et al., 2014) onde são visualizadas hifas hialinas septadas e/ou artroconídios, formas que infectam os tecidos queratinizados (SOUZA et al., 2014; CASTRO et al., 2016), que em geral apresentam morfologia semelhante (SANTOS et al., 2002) e no isolamento do fungo em meio de cultura ágar Sabouraud (SANTOS et al., 2002; SHALABY et al., 2016), onde são observadas as características macromorfológicas do fungo. No meio de cultura, a temperatura ótima para crescimento, situa-se na faixa de 25 a 30°C. Nestas condições os dermatófitos crescem num período de uma a três semanas (SANTOS et al., 2002).

Métodos moleculares estão sendo cada vez mais utilizados no algoritmo de diagnóstico no laboratório de microbiologia clínica (KIZNY et al., 2016). Várias novas técnicas como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e a espectroscopia de massa podem ajudar a identificar as diferentes cepas de dermatófitos (SAHOO: MAHAJAN, 2016). A identificação ao nível de espécie, pode ser útil para iniciar um tratamento adequado ou para estabelecer medidas profiláticas (KIZNY et al., 2016).

Geralmente, o tratamento com medicações tópicas é suficiente (clotrimazol, miconazol, terbinafina, amorolfina, cetoconazol, entre outros). Quando o quadro clínico for muito extenso ou quando houver tinha do couro cabeludo, é preciso utilizar medicamentos sistêmicos, como fluconazol em doses semanais, itraconazol, griseofulvina ou terbinafina (RODRIGUES et al., 2010).

As medidas de controle utilizadas nas dermatofitoses visam, principalmente, a interferir na cadeia de transmissibilidade da enfermidade, podendo ser utilizadas medidas higiênico-sanitárias e medidas quimioterápicas (SCHUCH et al., 2008).

A distribuição geográfica dos dermatófitos mostra-se bastante variável; enquanto alguns são cosmopolitas, a distribuição de outros depende dos seguintes fatores: adaptação ao meio ambiente, deslocamentos humanos, convívio com animais domésticos, aspectos socioeconômicos, sexo, idade e imunidade do hospedeiro, promovendo assim variações no espectro destes fungos, de região para região (BRILHANTE et al., 2000).

Fatores climáticos, assim como práticas sociais, migração populacional e características individuais podem afetar a epidemiologia das dermatofitoses (PERES et al., 2010). A enfermidade parece ser mais comum em climas tropicais e subtropicais, particularmente, em países com áreas de condições climáticas quentes e úmidas (RAMADINHA et al., 2010; NEVES et al., 2011) do que em clima frio e seco (AVANTE et al., 2009), constituindo um problema de saúde pública em países tropicais e refletindo baixo nível de educação sanitária (COSTA et al., 1999).

As infecções por dermatófitos tem prevalência mundial (URIBE:CARDONA-CASTRO, 2013) e as espécies infectantes mais prevalentes sofrem variações de tempos em tempos, de países para países e mesmo entre regiões dentro de mesmo país, a depender de fatores ambientais e étnicos, nível socioeconômico e densidade populacional (MARQUES et al., 2005). Segundo Brilhante et al. (2000) é importante o conhecimento das espécies dos dermatófitos de uma dada região, durante um período de tempo prolongado, para que se possa estabelecer as espécies de ocorrência comum, esporádica ou excepcional.

Vários autores têm relatado mudanças no perfil epidemiológico e nos agentes etiológicos das dermatofitoses em diferentes países (DAMÁZIO et al., 2007). A predominância das dermatofitoses antropofílicas representa o perfil provável da flora dermatofítica urbana (BRILHANTE et al., 2000). A infecção mais frequente no

continente americano e em parte da Europa é a causada pelos antropofílicos (CRIADO et al., 2011) e representam cerca de 70% das dermatofitoses, sugerindo que o fungo tenha-se adaptado ao hospedeiro humano (PERES et al., 2010). No entanto, as espécies de todos os três grupos têm sido associadas com a doença humana (ACHTERMAN:WHITE, 2012).

São doenças infecciosas altamente prevalentes na América Latina e que atingem tanto o homem como os animais domésticos (PINHEIRO et al., 1997; BETANCOURT et al., 2009). Por não figurarem entre as doenças de notificação obrigatória no Brasil, apenas estudos epidemiológicos fragmentados são relatados na literatura nacional, fazendo-se inquestionável a necessidade de pesquisas epidemiológicas, clínicas e laboratoriais que relatem dados reais, no tocante a incidência das dermatofitoses no nosso meio (BRILHANTE et al., 2000).

3.3 – *Rosmarinus officinalis* L.

A espécie *Rosmarinus officinalis* L., conhecida popularmente como alecrim, pertencente à família Lamiaceae, é originária da Região Mediterrânea, o termo é derivado do grego "(Rhops e myrinos)" que significa "arbusto marinho" por causa de seu crescimento perto das costas, porém cresce em várias regiões do mundo, principalmente em países de clima temperado (OZCAN:CHALCHAT, 2008; PENTEADO:CECY, 2005; ÁVILA-SOSA et al., 2011).

O *Rosmarinus* é um subarbustivo lenhoso, ereto e pouco ramificado de até 1,5 m de altura. As folhas são lineares, coriáceas e muito aromáticas, medem de 1,5 a 4 cm de comprimento por 1 a 3 mm de espessura e as flores azulado-claras, pequenas e de aromas forte e, muito agradável (HENTZ:SANTIN, 2007; PENTEADO:CECY, 2005).

Em geral é encontrado de forma selvagem em áreas rochosas e arenosas perto do mar, mas devido à sua adaptabilidade e pouca demanda para cultivar se reproduz facilmente em outras áreas, sendo uma planta rica em princípios ativos, usada a fresco, seca ou como o óleo essencial (ÁVILA-SOSA et al., 2011; OZCAN:CHALCHAT, 2008).

Esta planta medicinal tornou-se alvo de muitos estudos por possuir propriedades carminativas, espasmolíticas, antioxidantes, hepatoprotetora, antiulcerogênica e, principalmente, antimicrobianas, as quais podem ser atribuídas aos compostos

majoritários presentes em seu óleo essencial e diversos estudos têm se concentrado na atividade antimicrobiana do óleo essencial, cujo *in vitro* possui esse ação farmacológica e antifúngica (BARBOSA et al., 2014; BARRETO et al., 2014; PENTEADO:CECY, 2005).

O óleo essencial, que é obtido das folhas ou das sumidades floridas apresenta, em sua composição, princípios ativos como: α -pineno, 1,8 cineol, cânfora, β -mirceno, borneol, acetato de isobomila, valerianato de isonila, ácido cítrico, glicólico, glicínico, rosmarímico, nicotianamida, colina, pectina e rosmaricina, sendo que destes 1,8 cineol, α -pineno, borneol e cânfora possuem atividade antimicrobiana conhecida (MAIA et al., 2014; BARBOSA et al., 2014; HENTZ:SANTIN, 2007).

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - Local da Pesquisa

O estudo de avaliação da atividade antifúngica foi realizado no Laboratório de Pesquisa de Atividade Antibacteriana e Antifúngica de Produtos Naturais e/ou Sintéticos Bioativos do Departamento de Ciências Farmacêuticas/Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba.

4.2 - Cepas dos micro-organismos

Para a realização do ensaio *in vitro* de atividade antifúngica dos óleos essenciais e do fluconazol foram selecionadas e utilizadas um total de 12 cepas de fungos filamentosos do gênero *Microsporum* e *Trichophyton*, adquiridas do Laboratório de Micologia/Departamento de Ciências Farmacêuticas/Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba. Foram utilizadas seis cepas da espécie *Microsporum canis*: LM 12, LM 68, LM 110, LM 157, LM 265, LM 665 e seis da espécie *Trichophyton rubrum*: LM 03, LM 115, LM 600, LM 617, LM 629 e LM 640. Todas as cepas foram mantidas em tubos de ensaios contendo o meio sólido ágar Sabouraud dextrose (ASD) inclinado, sob refrigeração de 4°C e temperatura ambiente de 28-30°C.

4.3 - Meios de cultura

Os meios de cultura utilizados nos ensaios para avaliação da atividade antifúngica foram o meio sólido ASD obtido da DIFCO Laboratories, USA/FRANCE e o meio líquido RPMI-1640-L-glutamina (sem bicarbonato), adquirido da Alamar Tecnocientífica Ltda, Diadema, SP, Brasil. Sendo ambos os meios preparados de acordo com as orientações do fabricante, foram solubilizados com água destilada e esterilizados em autoclave, a 121°C por 15 minutos.

4.4 - Inóculo

Para o uso das cepas fúngicas, foram primeiramente cultivadas em tubos contendo o meio ASD inclinado e incubadas a 28°C por 10-14 dias até atingirem um crescimento satisfatório. Transcorrido o tempo de incubação, foram preparadas suspensões das recentes colônias, sendo recobertas com 10 mL de solução salina estéril (NaCl 0,85%) realizando-se suaves agitações, logo em seguida usando uma

alça microbiológica estéril foi efetuado raspagens, sendo a mistura de conídios e hifas transferidas para diferentes tubos de ensaio estéril. Posteriormente, as suspensões foram agitadas no aparelho vortex (FANEM) durante 2 minutos e após agitação, cada suspensão teve sua turbidez ajustada, sendo comparada à suspensão padrão 0.5 McFarland $1-5 \times 10^6$ UFC/mL (CLEELAND et al., 1991; SOUZA et al., 2007; OSTROSKY et al., 2008; MENEZES et al., 2013).

4.5 - Antifúngico

O antifúngico utilizado como padrão nos testes foi o fluconazol, adquirido comercialmente da SIGMA-ALDRICH® /USA. O mesmo foi preparado momentos antes da execução dos ensaios, diluindo-o inicialmente em quantidade suficiente de dimetilsulfóxido (DMSO), até atingir a concentração desejada para os testes de sensibilidade.

4.6 - Óleos Essenciais

Os óleos essenciais(OE) utilizados nos testes da avaliação da atividade antifúngica foram obtidos na Ferquima Ind. e Com. Ltda em Vargem Grande Paulista, São Paulo, Brasil. Suas características físicas e químicas são descritos pelo fornecedor, que produz e comercializa óleos essenciais em escala industrial, como pode ser observado na Quadro 1. Os OE foram armazenados em vidros âmbar e submetidos a refrigeração com temperatura inferior a 4°C.

As emulsões dos OE foram preparadas momentos antes da realização dos testes, consistindo na adição de 0,4 mL do óleo essencial, 0,04 ml de Tween 80 e 5 mL de água destilada estéril, após esse procedimento, cada mistura separadamente foi mantida sob agitação durante 5 minutos no aparelho vortex para serem homogeneizadas (CASTRO et al., 2011).

Quadro 1: Óleos essenciais utilizados no *screening* para avaliação da atividade antifúngica sobre as cepas de *Microsporium canis* e *Trichophyton rubrum*.

Espécie Vegetal	Família	Nome Popular	Parte utilizada
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Lamiaceae	Alecrim	Folhas
<i>Cinnamomum zeylanicum</i> Blume	Lauraceae	Canela-da-índia	Folhas
<i>Mentha arvensis</i> L. Stewart	Lamiaceae	Hortelã comum	Folhas
<i>Ocimum basilicum</i> Schumach. & Thonn	Lamiaceae	Manjeriçã	Folhas
<i>Origanum majorana</i> L.	Lamiaceae	Manjerona	Folhas

4.7 - *Screening* Microbiológico

O *screening* para a avaliação da atividade antifúngica dos óleos essenciais frente às cepas de *M. canis* e *T. rubrum* foi realizado através da técnica de microdiluição em meio líquido, usando placas descartáveis e estéreis de 96 cavidades com fundo no formato de “U” e em duplicata (CLEELAND et al., 1991; ELLOF, 1998; SOUZA et al., 2007). Para o ensaio foram usadas previamente preparadas, três cepas da espécie *Microsporium canis*, codificadas como, LM 68, LM 157, LM 665 e três da espécie *Trichophyton rubrum*, LM 600, LM 617 e LM 640. Inicialmente, foram distribuídos 100 µL do caldo RPMI-1640-L-glutamina, duplamente concentrado em cada cavidade da placa de microdiluição, adicionando em seguida 100 µL da emulsão dos OE teste duplamente concentrado na primeira linha da placa, e por meio de uma diluição seriada a uma razão de dois, foram obtidas concentrações de 1024 µg/mL até 256 µg/mL. Por fim, foram dispensados 10 µL da suspensão fúngica de cada cepa previamente preparadas nas cavidades. Paralelamente, foram realizados controles da viabilidade das cepas ensaiadas, sensibilidade dos filamentosos frente à ação do fluconazol e esterilidade do caldo RPMI-1640-L-glutamina sem o inóculo e óleo essencial. Após todos os procedimentos as placas foram seladas e incubadas sob a temperatura ambiente de 28-30°C por 48 horas, posteriormente a esse período realizou-se a leitura.

A leitura para a determinação da atividade antifúngica dos produtos testados, foi realizado pelo método visual, levando em consideração a formação ou não de

aglomerados de células no fundo de cada orifício da placa. Os ensaios foram realizados em duplicata e o resultado expresso pela média aritmética dos valores expressos da atividade biológica obtidas nos dois ensaios (CLEELAND et al., 1991; ELLOF, 1998; SOUZA et al., 2007).

4.8 - Cromatografia do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L.

A análise dos fitoconstituintes do óleo essencial foi realizado no Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais do Departamento de Química Biológica da Universidade Regional do Cariri - URCA/CE, por cromatografia a gás acoplado a um espectrômetro de massa, usando o cromatógrafo gasoso QP-5050 equipado com GC-17A (Shimadzu, Japão). A cromatografia a gás foi realizada nas seguintes condições analíticas: coluna capilar OV-5(30 m de comprimento x 0.25 mm de diâmetro, 0.25 µm de espessura do filme) com gás de arraste (Hélio): 1,7 mL/min; pressão de entrada da coluna: 48,7 kPa; velocidade linear = 36,0 cm/sec; fluxo total: 50 mL/min; taxa de fluxo do gás transportador: 24 mL/min; temperatura do injetor: 250°C; temperatura do detector: 280°C. A programação da temperatura inicial da coluna foi de 40°C por 2 minutos, com aumento gradual de até 180°C por 1 minuto a uma taxa de 4°C/min, então 180 a 280°C com taxa de 10°C/min. As condições de operação do espectrômetro de massa foi na voltagem de ionização de 70 eV. A identificação dos componentes individuais baseou-se na fragmentação espectral de massa usando duas pesquisas por computador e biblioteca MS (Wiley 229), índices de retenção e comparação com dados da literatura.

4.9 - Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da CIM do óleo essencial de *R. officinalis* L., sobre as cepas de *Microsporum* e *Trichophyton* foi realizada através da técnica de microdiluição em caldo (CLEELAND et al., 1991; ELLOF, 1998; SOUZA et al., 2007), utilizando placas contendo 96 poços com fundo no formato de "U". Inicialmente em cada orifício das placas foram distribuídos 100 µL do caldo RPMI-1640-L-glutamina, duplamente concentrado. Posteriormente, 100 µL da emulsão do óleo essencial solubilizado foram adicionados nas cavidades da primeira linha das placas e por seguinte, a partir da retirada de uma alíquota de 100 µL da cavidade mais concentrada para a sucessora foi realizado diluições seriadas, sendo obtidas concentrações de 1024 µg/mL até 64 µg/mL. Por fim, depositado nos orifícios de cada coluna uma alíquota de 10 µL dos

inóculos de *M. canis* e *T. rubrum*, onde cada coluna da placa referiu-se, a uma cepa, especificamente ensaiada na concentração de 10^6 UFC mL⁻¹. Paralelamente, foram realizado os controles de viabilidade das cepas dos filamentosos, sensibilidade frente ao fluconazol e esterilidade do caldo RPMI-1640-L-glutamina sem inóculo e óleo essencial. Após todos os procedimentos as placas foram seladas, agitadas por 30 segundos, identificadas e incubadas sob a temperatura de 28°C por 5 dias, posteriormente a esse período realizou-se a leitura.

A leitura para a determinação da CIM do produto testado foi realizado pelo método visual, sendo levado em consideração a formação ou não de aglomerados de células no fundo de cada cavidade da placa, quando comparada ao seu controle. Desta forma, a CIM foi definida como a menor concentração do óleo essencial capaz de inibir 100% o crescimento dos inóculos utilizados nos testes.

A avaliação da atividade antifúngica do produto foi interpretada e considerada como ativa ou inativa, conforme os seguintes critérios: 50-500 µg/mL= forte/ótima atividade; 600-1500 µg/mL= moderada atividade; >acima de 1500 µg/mL= fraca atividade ou produto inativo (HOLETZ et al., 2002; SARTORATTO et al., 2004; HOUGHTON et al.; 2007).

4.10 - Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)

A determinação da CFM ocorreu a partir da CIM, no qual foram retiradas alíquotas de 10 µL de cada cavidade onde houve completa inibição do crescimento fúngico e dispensados em placa de microdiluição contendo 100 µL do meio RPMI-1640-L-glutamina. Posteriormente, a placa foi selada, agitada por 30 segundos e incubada a temperatura de 28°C por 5-7 dias. O ensaio foi realizado em duplicata e a CFM definida como a menor concentração do óleo essencial sem nenhum crescimento visível quando subcultivado na ausência de antifúngicos (NCUBE et al., 2008).

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 - Screening Microbiológico

O potencial da atividade antifúngica dos óleos essenciais foi inicialmente avaliado no *screening* microbiológico, frente à três cepas da espécie *Microsporium canis* e três *Trichophyton rubrum*, através da técnica de microdiluição em meio líquido, usando placa de 96 cavidades. O resultado pode ser observado no quadro 2, onde se encontra a descrição quanto aos óleos escolhidos, as concentrações trabalhadas e as diferentes cepas selecionadas para o início da pesquisa.

Quadro 2: Screening microbiológico dos óleos essenciais sobre às cepas de *M. canis* e *T. rubrum*.

Concentrações	Cepas Fúngicas					
	<i>Microsporium canis</i>			<i>Trichophyton rubrum</i>		
	LM 68	LM 157	LM 265	LM 600	LM 617	LM 640
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.						
1024 µg/mL	-	-	-	+	-	+
512 µg/mL	-	-	-	+	-	+
256 µg/mL	-	-	-	+	-	+
<i>Cinnamomum zeylanicum</i> Blume						
1024 µg/mL	-	-	-	+	-	+
512 µg/mL	-	-	-	+	-	+
256 µg/mL	-	+	+	+	-	+
<i>Mentha arvensis</i> L. Stewart						
1024 µg/mL	-	-	-	-	-	-
512 µg/mL	-	-	-	-	-	-
256 µg/mL	+	+	+	-	-	-
<i>Ocimum basilicum</i> Schumach. & Thonn						
1024 µg/mL	-	-	+	+	-	+
512 µg/mL	-	-	+	+	-	+
256 µg/mL	+	+	+	+	+	+
<i>Origanum majorana</i> L.						
1024 µg/mL	-	-	-	+	-	-
512 µg/mL	-	-	-	+	-	-
256 µg/mL	-	-	+	+	-	+
Controles						
Caldo RPMI	-	-	-	-	-	-
Micro-organismo	+	+	+	+	+	+
Fluconazol	+	+	+	+	+	+
(-) Não houve crescimento de micro-organismo (+) Crescimento de micro-organismo						

Como pode ser analisado, os óleos essenciais de *C. zeylanicum* Blume (canela-da-índia), *M. arvensis* L. Stewart (Hortelã comum), *O. basilicum* Schumach. & Thonn (Manjerição) e *O. majorana* L. (Majerona) não apresentaram atividade antifúngica frente às cepas ensaiadas, não sendo possível definir a menor concentração para os produtos testados capaz de inibir o crescimento das diferentes cepas fúngicas utilizadas nos ensaios.

O óleo essencial de *R. officinalis* L. (Alecrim) foi o que apresentou o melhor resultado, exercendo intensa atividade antifúngica sobre todas as cepas, com exceção da *T. rubrum* LM 600 e LM 640, sendo possível observar uma CIM de 256 µg/mL frente a 66% das cepas dos micro-organismos envolvidos nos testes.

Todas as cepas apresentaram-se resistentes ao produto sintético padrão avaliado, o fluconazol, que é um dos antifúngicos de escolha utilizado na terapêutica clínica para tratamento das dermatofitoses. Portanto, não possível determinar uma concentração mínima inibitória, tendo em vista que não apresentou atividade antifúngica frente a nenhuma das cepas dos micro-organismos.

5.2 - Cromatografia do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L.

A análise química dos fitoconstituintes do óleo essencial de *R. officinalis* L., com tempo de retenção e seus respectivos percentuais, encontram-se no quadro 3. Conforme pode ser observado, foram identificados 6 componentes, perfazendo 99,59% do óleo total.

Entre os principais fitoconstituintes, destacam-se o acetato de isobornila com (61,72%) do total dos constituintes presentes, seguido pelo metil-heptenona (17,56%) e octynes (12,5%) em ordem percentual decrescente. Os outros componentes identificados com percentagem significativa que foram o bomeol (3,4%), inositol (2,74%) e ácido palmítico (1,67%).

Quadro 3: Fitoconstituintes do óleo essencial das folhas de *R. officinalis* L.

Fitoconstituante(s) químico(s)	Tempo de retenção/min.	Porcentagem (%)
Metil-heptenona	11,4	17,56
Octynes	15,5	12,5
Ácido Palmítico	15,63	1,67
Inositol	16,05	2,74
Bomeol	16,4	3,4
Acetato de Isobornila	20,84	61,72
Total		99,59%

5.3 - Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação dos valores da CIM do óleo essencial de *R. officinalis* L. frente as cepas de *M. canis* e *T. rubrum*, foi realizado através da técnica de microdiluição em caldo. Conforme pode ser observado, o óleo essencial apresentou uma CIM de 64 µg/ml bem homogêneas para quase todas as cepas utilizadas nos ensaios, com exceção da *T. rubrum* LM 600 e *T. rubrum* LM 640, que apresentaram resistência ao produto em questão. Dessa forma não sendo possível definir a menor concentração, porém podemos afirmar que 83% dos inóculo tiveram seu crescimento inibido até esta concentração.

Diante do resultado, podemos destacar a resistência da cepa de *T. rubrum* LM 600, comportamento igualitário a apresentada na análise inicial do óleo essencial, quando se verificava o poder antifúngico do mesmo. Resultado semelhante para a cepa *T. rubrum* LM 640, que apresentou-se também no segundo ensaio resistente.

Quanto a droga sintética padrão utilizada como controle positivo, o fluconazol, utilizado nas concentrações de 1024 µg/ml a 64 µg/ml, pode-se observar que todas as cepas mostraram-se resistentes em todas as concentrações trabalhadas, não apresentando atividade antifúngica. Os referentes valores e controles realizados estão dispostos no quadro 4.

Quadro 4: Valores da Concentração Mínima Inibitória (CIM) de *R. Officinalis* L. sobre os dermatófitos.

Concentração	<i>Microsporum canis</i>						<i>Trichophyton rubrum</i>					
	LM	LM	LM	LM	LM	LM	LM	LM	LM	LM	LM	LM
	12	68	110	157	265	665	3	115	600	617	629	640
1024 µg/ml	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
512 µg/ml	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
256 µg/ml	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
128 µg/ml	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
64 µg/ml	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
Caldo RPMI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Micro-organismo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fluconazol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(-) Não houve crescimento de micro-organismo (+) Crescimento de micro-organismo

5.4 - Determinação da Concentração Fungicida (CFM)

A determinação da CFM ocorreu a partir de alíquotas retiradas de todas as cavidades da placa de ensaio da CIM. Os respectivos valores resultantes do ensaio, podem ser visualizados no quadro 5. Conforme pode-se observar, foi encontrado uma CFM de 64 µg/ml para praticamente todas as cepas, confirmando ausência de inóculo no meio, pois não houve crescimento fúngico, excetuando as *T. rubrum* LM 600 e *T. rubrum* LM 640, que apresentaram células fúngicas no fundo de suas respectivas cavidades onde foram desprezadas. Resultado idêntico foi observado no ensaio para determinação da concentração inibitória mínima, apresentando-se as referidas cepas crescimento após período de incubação.

Quadro 5: Valores da Concentração Fungicida Inibitória (CFM) de *R. Officinalis* L. sobre os dermatófitos.

Concentração	<i>Microsporum canis</i>						<i>Trichophyton rubrum</i>					
	LM	LM	LM	LM	LM	LM	LM	LM	LM	LM	LM	LM
	12	68	110	157	265	665	3	115	600	617	629	640
1024 µg/ml	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
512 µg/ml	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
256 µg/ml	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
128 µg/ml	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
64 µg/ml	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
(-) Não houve crescimento de micro-organismo (+) Crescimento de micro-organismo												

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Os micro-organismos selecionados para o estudo são considerados agentes etiológicos importantes, visto que *M. canis* e *T. rubrum* apresentam relevância clínica, já que estes são os principais agentes etiológicos causadores da dermatofitoses, *tinea capitis* e onicomicose. A fim de avaliar a presença ou ausência de atividade antifúngica sobre esses micro-organismos foi realizada a triagem da atividade dos óleos essenciais, sendo que este ensaio mostrou-se de extrema importância para a escolha do óleo essencial testado.

Os resultados das CIMs observadas na triagem microbiológica dos óleos essenciais, demonstraram diferenças de ação antifúngica sobre os isolados ensaiados. Dentre os óleos essenciais testados, *R. officinalis* L., apresentou melhores resultados, uma vez que inibiu a maioria das cepas ensaiadas. Segundo, Souza (2010), a triagem do óleo essencial, é geralmente utilizado como teste preliminar do seu potencial antimicrobiano, e de acordo com os resultados, pode-se elaborar uma sequência de análises mais detalhadas com vistas à obtenção de maiores resultados sobre as propriedades biológicas do produto.

Os estudos que avaliaram a ação antimicrobiana de produtos naturais sobre fungos, têm evidenciado que os óleos essenciais são fontes promissoras de compostos bioativos. Levando em consideração, que foi avaliada a atividade antifúngica do óleo essencial de *R. officinalis* L., frente à diferentes cepas dos dermatófitos de *M. canis* e *T. rubrum*, encontrando-se uma CIM de 64 µg/ml, os resultados confirmam que os óleos essenciais podem inibir o crescimento de fungos, mesmo resistentes aos antifúngicos convencionais.

Na pesquisa de Santoyo et al. (2005), a atividade antimicrobiana dos fitoconstituintes de *R. officinalis* L., foi investigada frente à bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*), bactérias gram-negativas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*), levedura (*Candida albicans*) e fungo filamentosos (*Aspergillus niger*). Os resultados mostraram que as frações do óleo essencial foram ativos contra todos os micro-organismos testados.

De acordo com o estudo de Hentz e Santin (2007), que avaliou o efeito antifúngico do óleo essencial de *R. officinalis* L. vendido comercialmente, o óleo inibiu o crescimento de *Salmonella* sp. apenas na sua forma pura (sem diluição).

Özcan e Chalchat (2008) ao investigarem a ação antifúngica do óleo essencial de *R. officinalis* L., contra *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea* e *Fusarium oxysporum*. Os pesquisadores observaram que o óleo exibiu efeito inibitório sobre as cepas ensaiadas.

Papajani et al. (2015) propuseram avaliar a atividade antifúngica do óleo essencial de *R. officinalis* L., na concentração 100 µg/ml. Os ensaios antifúngicos mostraram *R. officinalis* L., apresentou forte atividade antifúngica contra *T. rubrum* e fraca atividade contra *M. canis*.

Moghtader, Salari e Farahm (2011) avaliaram o efeito antifúngico de *R. officinalis* L., contra a cepa de *Aspergillus flavus*. Neste ensaio, os autores observaram que o óleo apresentou efeito fungistático sobre o fungo estudado.

Em estudo realizado por Freire et al. (2012), avaliaram a atividade antifúngica do óleo essencial de *R. officinalis* L. Foi verificado que o óleo produziu intensa ação sobre o crescimento de *C. albicans* e *C. tropicalis*.

Cleff et al. (2012) testaram a atividade O óleo essencial de *R. officinalis* L em isolados de *Candida albicans* da mucosa vaginal de fêmeas caninas, casos clínicos de candidíase em animais cepas padrões e espécies de *Candida* não *albicans*, usando a técnica de microdiluição em caldo. Os resultados demonstraram diferenças de suscetibilidade entre isolados, sendo que as espécies de *C. albicans*, obtidas da mucosa dos animais foram as únicas sensíveis em concentrações médias de 5,0 µL/mL.

Souza et al. (2013) verificaram a atividade antifúngica do óleo essencial de *R. officinalis* L., em combinação com *Origanum vulgare* L. sobre *Aspergillus flavus* e *Aspergillus niger*. Os resultados demonstraram que o óleo inibiu o crescimento micelial e a germinação de esporos dos fungos.

Em pesquisa realizado por Gauch et al., (2014), o óleo essencial de *R. officinalis* L., demonstrou potente atividade inibitória e fungicida contra cepas

específicas de *Candida*, já que foi observado a inibição total do crescimento do tubo germinativo em *C. albicans* e *C. dubliniensis*.

Ao determinarem a CIM do óleo essencial de *R. officinalis* L., sobre o crescimento micelial de *Fusarium verticillioides*, os estudiosos Bomfim et al. (2015) verificaram que houve redução significativa no crescimento micelial sob a concentração de 150 µg/mL.

Dentone e Cauti (2017) avaliaram o óleo essencial de *R. officinalis* L. Os autores observaram que o óleo essencial causou a inibição do crescimento de *M. canis* com CIM de 50 mg/mL.

Os resultado encontrados neste estudo corroboram com outros estudos, nos quais o óleo essencial de *R. officinalis* L. apresentou atividade antifúngica. Apesar do número de cepas utilizadas neste estudo tenha sido pequena, outros estudos devem ser realizados para comprovar tais achados.

Os principais metabólitos secundários encontrados no *R. officinalis* L., são: hidrocarbonetos monoterpênicos, ésteres terpênicos, linalol, verbitol, terpineol, 3-octonona, acetato de isobornila, cânfora, 1,8-cineol, α -pineno, verbenona, borneol, os quais são constituintes do óleo essencial (RIBEIRO et al., 2012; MOURA; MEDEIROS: SOUZA, 2016). A composição química pode apresentar variação devido a fatores ambientais e de manejo das plantas bem como da forma de extração e armazenamento, interferindo em sua atividade antimicrobiana (RIBEIRO et al., 2012).

A análise química do óleo essencial de *R. officinalis* L. do presente estudo, demonstrou que o componente majoritário foi o acetato de isobornila. Este achado está de acordo com os estudos de Pintore et al. (2014) e Ugalde (2014) que demonstraram a presença deste constituintes no óleo essencial de *R. officinalis* L. em diferentes concentrações.

Diferentes resultados na composição química do óleo essencial de *R. officinalis* L., foram encontrados por outros autores, por exemplo Prins e colaboradores (2006), May et al. (2010), Cleff et al. (2012) e Ribeiro et al. (2012). Essas diferenças podem ser explicadas principalmente por fatores ambientais; forma de cultivo da planta; metodologias diversas, além de diferenças das linhagens genéticas das espécies pesquisadas (SOUZA et al., 2014).

Na busca por novos estudos mais eficazes e menos tóxicos, têm sido realizados muitos estudos a partir de produtos naturais, especialmente os óleos essenciais. Os resultados desta pesquisa são significativos, uma vez que apresentaram atividade antifúngica sobre dermatófitos, porém requerem a continuação e aprofundamento dos estudos.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos no presente estudo, observou-se que o óleo de *R. officinalis* L. demonstrou forte atividade antifúngica contra *M. canis* e *T. rubrum* com CIM e CFM 64 µg/mL, respectivamente, podendo ser considerado uma alternativa para os tratamentos das doenças micóticas que mais acometem o homem, as dermatofitoses. O óleo essencial *R. officinalis* L. apresentou o acetato de isobornila, como constituinte majoritário em concentração apreciável, o que pode supor que o mesmo seja responsável pela atividade antifúngica.

REFERÊNCIA

REFERÊNCIAS

- ACHTERMAN, R.R.; WHITE, T.C. A foot in the door for dermatophyte research. **PLoS Pathog**, v. 8, n. 3, p. e1002564, Mar., 2012.
- AVANTE, M.L.; CAMPOS, C.P; FERREIRA, M.M.G.; MARTINS, I.S.; ROSA, B.R.T.; SOUZA, G.D.P; AVANZA, M.F.B. Dermatofitose em grandes animais. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 7, n. 12, 2009.
- AVILA-SOSA, R.; NAVARRO-CRUZ, A. R.; VERA-LÓPEZ, O.; DÁVILA-MÁRQUEZ, R. M.; MELGOZA-PALMA, N.; MEZA-PLUMA, R. Romero (*Rosmarinus officinalis* L.): una revisión de sus usos no culinarios. **Ciencia y mar**, v. 15, n. 43, p. 23-36, 2011.
- BARBOSA, V.; SCHEIFFER, G. F. C.; CARDOZO, A. G. L.; PIETRUCHINSKI, E.; SANTOS, C. Z.; SILVEIRA, D.; BERTOCCO, A. R. P. Avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. e tintura de própolis frente à bactéria causadora da acne *Propionibacterium acnes*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 2, p. 169-173, 2014.
- BARRETO, H. M.; SILVA FILHO, E. C.; LIMA, E. O.; COUTINHO, H. D. M; MORAIS-BRAGA, M. F. B; TAVARES, C. C. A; TINTINO, S.R.; REGO, J.V.; ABREU, A.P.L; LUSTOSA, M.C.G.; OLIVEIRA, R.W.G.; CITÓ, A.M.G.L.; LOPES, J.A.D. Chemical composition and possible use as adjuvant of the antibiotic therapy of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. **Industrial Crops and Products**, v. 59, p. 290-294, 2014.
- BETANCOURT, O.; SALAS, V.; OTAROLA, A.; ZAROR, L.; SALAS, E.; NEUMANN, J. *Microsporium canis* em gatos dermatologicamente sanos em Temuco, Chile. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v.26, n.3, p.206-210, 2009
- BOMFIM, N. S.; NAKASSUGI, L. P.; OLIVEIRA, J. F. P.; KOHIYAMA, C.Y.; MOSSINI, S. A. G. Antifungal activity and inhibition of fumonisin production by *Rosmarinus officinalis* L. essential oil in *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg. **Food Chemistry**, v. 166, p. 330-336, 2015.
- BRILHANTE, R.S.N.; PAIXÃO, G.C.; SALVINO, L.K.; DIÓGENES, M.J.N.; BANDEIRA, S.P.; ROCHA, M.F.G.; SANTOS, J. B. F.; SIDRIM, J.J.C. Epidemiology and ecology of dermatophytosis in fortaleza city: *Trichophyton tonsurans* as an important emergent pathogen of *Tinea capitis*. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 5, p. 417-425, set-out, 2000.
- CARVALHO, S.; MACHADO, S.; VELHO, G.; SELORES, M. Tinha do couro cabeludo: importância do tratamento atempado para prevenção da alopecia cicatricial. **Nascer e Crescer**, v. 25, n. 3, p. 169-172, 2016.
- CASTRO, L.S.O.; MOURÃO, G. C.; SILVA, T.F.P; SILVA, L.D.M.; COSTA, P.P.C. Dermatofitose em gato: Relato de caso. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v.10, n.3, p. 484 – 493, jul – set, 2016.
- CASTRO, R. D.; LIMA, E. O. Atividade antifúngica dos óleos essenciais de sassafrás (*Ocotea odorifera* Vell.) e alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) sobre o gênero *Candida*. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.13, n.2, p.203-208, 2011.

CLEFF, M. B.; MEINERZ, A. R. M.; MADRID, I.; FONSECA, A. O.; ALVES, G. H.; MEIRELES, M. C. A.; RODRIGUES, M. R. A. Perfil de suscetibilidade de leveduras do gênero *Candida* isoladas de animais ao óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 1, p. 43-49, 2012.

CLEELAND, R.; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials “*in vitro*” and in experimental animal infections. In: LORIAN, V. M. D. **Antibiotics in Laboratory Medicine**. 3ª ed. Baltimore: Williams & Wilkins, p. 739-788, 1991.

COELHO, A. C.; ALEGRIA, N.; RODRIGUES, J. Isolamento de dermatófitos em animais domésticos em Vila Real, Portugal. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.60, n.4, p.1017-1020, 2008.

CORTEZ, A.C.A.; SOUZA, J.V.B.; SADAHIRO, A.; OLIVEIRA, J.A.A. Frequency and aetiology of dermatophytosis in children age 12 and under in the state of Amazonas, Brazil. **Revista Iberoamericana de Micología**. v. 29, n. 4, p. 223-226, 2012.

COSTA, M. A. C.; JESUS, J. G.; FARIAS, J. G.; NOGUEIRA, J. C. M.; OLIVEIRA, A. L. R.; FERRI, P. H. Variação estacional do óleo essencial em arnica (*Lychnofora ericoides* Mart.). **Revista de Biologia Neotropical**, v. 5, n. 1, p. 14, 2008.

COSTA, T.R.; COSTA, M.R.; SILVA, M.V.; RODRIGUES, A.B.; FERNANDES, O.F.L.; SOARES, A.J.; SILVA, M.R.R. Etiology and epidemiology in dermatophytosis in Goiânia, State of Goiás, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. 4, p. 367-371, jul-ago, 1999.

CRIADO, P.R.; OLIVEIRA, C.B.; DANTAS, K.C.; TAKIGUTI, F.A.; BENINI, L.V.; VASCONCELLOS, C. Superficial mycosis and the immune response elements. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 86, n. 4, p. 726-731, 2011.

DANTAS, I. C.; GUIMARÃES, F. R. Plantas medicinais comercializadas no município de Campina Grande, PB. **Revista de Biologia e Farmácia**, v. 1, n. 1, p. 1-13, 2007.

DAMÁZIO, P.M.R.B.C; LACERDA, H.R.; FILHO, A.M.L.; MAGALHÃES, O.M.C.; NEVES, R.P. Epidemiologia, etiologia e formas clínicas das dermatofitoses em Pernambuco, 1995-2005. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 40, n. 4, p. 484-86, jul-ago, 2007.

DENTONE, S.; CAUTI, S. M.; Determinación in vitro de la Actividad Antimicótica del Aceite de Romero (*Rosmarinus officinalis*) sobre *Microsporum canis*. **Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú**, v. 28, n. 1, p. 56-61, 2017.

ELLOF, J. N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Medica**, v. 64, p. 711-713, 1998.

ELMEGEED, A. S. M. A.; OUF, S. A.; MOUSSA, T. A. A.; ELTAHLAWI, S. M. R. Dermatophytes and other associated fungi in patients attending to some hospitals in Egypt. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 799-805, 2015.

FIRMO, W. D. C. A.; MENEZES, V. D. J. M.; PASSOS, C. E.C.; DIAS, C. N.; ALVES, L. P. L.; DIAS, I. C. L.; NETO, M.S.; OLEA, R. S. G. **Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais**. Cad. Pesq., São Luís, v. 18, n. especial, dez. 2011.

GAUCH, Lurdete Maria Rocha et al. Effects of *Rosmarinus officinalis* essential oil on germ tube formation by *Candida albicans* isolated from denture wearers. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 3, p. 389-391, 2014.

GORDON, A.K.; MCIVER, C.; KIM, M.; MURRELL, D.F.; TAYLOR, P. Clinical application of a molecular assay for the detection of dermatophytosis and a novel non-invasive sampling technique. **Pathology**, v. 48, n 7, p. 720-726, 2016.

GÜRTLER, T.G.R.; DINIZ, L.M.; NICCHIO, L. Tinea capitis micro-epidemic by *Microsporum canis* in a day care center of Vitória-Espírito Santo (Brazil). **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 80, n. 3, p. 267-272, 2005.

HENTZ, S. M.; SANTIN, N. C. Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) contra *Salmonella* sp. **Evidência-Ciência e Biotecnologia**, v. 7, n. 2, p. 93-100, 2007.

HOLETZ, F. B.; HOMES, M. J.; LEE, C. C.; STEVENTON, G. Screening of some plants used in Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Mémoires do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

HOUGHTON, P. J.; HOMES, M. J.; LEE, C. C.; STEVENTON, G. Uses and abuses of in tests in ethnopharmacology: visualizing, na elephant. **Journal of ethnopharmacology**, v. 110, n. 3, p. 391-400, 2007.

HUSSAIN, A. I.; ANWAR, F.; CHATHA, S. A. S.; JABBAR, A.; MAHABOOH, S.; NIGAM, P. S. *Rosmarinus officinalis* essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 1070-1078, 2010.

LIMA, I.O.; OLIVEIRA, R.A.G.; LIMA, E.O.; FARIAS, N.M.P.; SOUZA, E.L. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.2, p.197-201,2006.

MADRID, I. M.; GOMES, A.R.; MATTEI, A.S.; SANTIN, R.; CLEFF, M.B.; FARIA, R.O.; MEIRELES, M.C.A. Dermatofitose Neonatal Canina por *Microsporum gypseum*. **Veterinária e Zootecnia**, v. 19, n. 1, p. 073-078, Março, 2012.

MAIA, A. J.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; FARIA, C. M. D. R.; OLIVEIRA, J. S. B.; JARDINETTI, V. A.; BATISTA, B. N. Óleo essencial de alecrim no controle de doenças e na indução de resistência em videira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 49, n. 5, p. 330-339, 2014.

MARQUES, S.A.; CAMARGO, R.M.P.; FARES, A.H.G.; TAKASHI, R.M.; STOLF, H.O. *Tinea capitis*: epidemiological and ecological aspects of cases observed from 1983 to 2003 in the Botucatu Medical School, state of São Paulo-Brazil. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 80, n. 6, p. 597-602, 2005.

- MAY, A.; SUGUINO, E.; MARTINS, A. N.; BARATA, L. E. S.; PINHEIRO, M. Q. Biomass production and essential oil of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) in function of the height and interval between the cuts. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 2, p. 195-200, 2010.
- MEDEIROS, F.; CREPALDI, N.; TOGNOLI, L. Dermatofitos- Revisão de Literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 7, n. 12, p. 1-5, 2009.
- MENEZES, C. P.; LIMA, E. O. Avaliação antifúngica de óleo essenciais sobre cepas de *Cladosporium carrionii*. **Rev. Bras. Farm.**, v. 94, n. 1, p. 49-53, 2013.
- MOGHTADER, M.; SALARI, H.; FARAHM, A. Evaluation of the antifungal effects of rosemary oil and comparison with synthetic borneol and fungicide on the growth of *Aspergillus flavus*. **Journal of Ecology and the Natural Environment**, v. 3, n. 6, p. 210-214, 2011.
- MOHAMMADI, R.; ABASTABAR, M.; MIRHENDI, H.; BADALI, H.; SAHDZI, S.; CHADEGANIPOUR, M.; POURFATHI, P.; JALALIZAND, N.; HAGHANI, I. Use of Restriction Fragment Length Polymorphism to Rapidly Identify Dermatophyte Species Related to Dermatophytosis. **Jundishapur journal of microbiology**, v. 8, n. 6, p. e17296, 2015.
- MUGNAINI, L.; NARDONI, S.; PISTELLI, L.; LEONARDI, M.; GIULIOTTI, L., BENVENUTI, M. N.; PISSERI, F.; MANCIANTI, F. A herbal antifungal formulation of *Thymus serpyllum*, *Origanum vulgare* and *Rosmarinus officinalis* for treating ovine dermatophytosis due to *Trichophyton mentagrophytes*. **Mycoses**, v. 56, n. 3, p. 333-337, 2013.
- NCUBE, N. S., AFOLAYAN, A. J., OKOH A. I. Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. **African Journal of Biotechnology** v. 7, n. 12, p. 1797-1806, 2008.
- NEVES, R.C.S.M.; CRUZ, F.A.C.S.; LIMA, S.R.; TORRES, M.M.; DUTRA, V; SOUSA, V.R.F. A retrospective of dermatophytosis in dogs and cats Veterinary Hospital at the Universidade Federal de Mato Grosso, in the years 2006 to 2008. **Ciência Rural, Santa Maria**, v.41, n.8, p.1405-1410, ago., 2011.
- NWEZE, E.I. Dermatophytoses In Domesticad Animals. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 53, n. 2, p. 95-99, 2011.
- OLIVEIRA, J.A.A.; BARROS, J.A.; CORTEZ, A.C.A.; OLIVEIRA, J.S.R.L. Superficial mycoses in the City of Manaus/AM between March and November/2003. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 81, n. 3, p. 238-243, 2006.
- OLIVEIRA, L.M.B.; PINHEIRO, A.Q.; MACEDO, I.T.F.; SILVA, I.N.G.; MOREIRA, O. C.; SILVA, B.W.L.; ALENCAR, E.C.; LEITE, J.J.G. Dermatofitose canina causada pelo fungo antropofílico *Trichophyton tonsurans* - Relato de caso. **Rev Bras Hig e Sanidade Animal**, v. 9, n.1, p.91-98, 2015.
- OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação a atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória(CMI) de plantas medicinais. **Rev. Bras. Farmacog**, v.18, n. 2, p. 301-307, 2008.

- ÖZCAN, M. M.; CHALCHAT, J. C. Chemical composition and antifungal activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) oil from Turkey. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 59, n. 7-8, p. 691-698, 2008.
- PAPAJANI, V. T.; GOCI, E.; HALOCI, H.; MANFREDINI, S. evaluation of antifungal activity of *Origanum vulgare* and *Rosmarinus Officinalis* essential oil before and after inclusion in β -cyclodextrine. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 7, n. 5, p. 270-273, 2015.
- PEREIRA, F. O.; WANDERLEY, P. A.; VIANA, F. A. C.; LIMA, R. B.; SOUSA, F. B.LIMA, E. O. Growth Inhibition and Morphological Alterations of *Trichophyton rubrum* by Essential Oil From *Cymbopogon Winterianus* Jowitt ex bor. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 233-242, 2011.
- PERES, N.T.A.; MARANHÃO, F.C.A.; ROSSI, A.; MARTINEZ-ROSSI, N.M. Dermatophytes: host-pathogen interaction and antifungal resistance. **Anais Brasileiros de dermatologia**, v. 85, n. 5, p. 657-667, 2010.
- PENTEADO, J.G; CECY, A.T. ALECRIM *Rosmarinus officinalis* L. Labiatae (Lamiaceae): UMA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA, 2005.
- PINHEIRO, A.Q.; MOREIRA, J.L.B.; SIDRIM, J.J.C. Dermatofitoses no Meio Urbano e a Coexistência do Homem com cães e gatos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, n. 4, p.287-294, jul-ago, 1997.
- PINTORE, G.; USAI, M.; BRADESI, P.; JULIANO, C.; BOATTO, G.; TOMI, F.; CASANOVA, J. Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. oils from Sardinia and Corsica. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 17, n. 1, p. 15-19, 2002.
- PIRES, C.A.A.; DA CRUZ, N.F.S.; LOBATO, A.M.; DE SOUSA, P.O.; CARNEIRO F.R.O.; MENDES, A.M.D. Clinical, epidemiological, and therapeutic profile of dermatophytosis. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 89, n. 2, p. 259-64, 2014.
- PRINS, C. L.; LEMOS, C. S. L.; FREITAS, S. P. Efeito do tempo de extração sobre a composição e o rendimento do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis*). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, n. 4, p. 92-95, 2006.
- RAMADINHA, R.R.; REIS, R.K.; CAMPOS, S.G.; RIBEIRO, S.S.; PEIXOTO, P.V. Lufenuron no tratamento da dermatofitose em gatos?. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 2, p.132-138, Fev., 2010.
- REZENDE, C.; MALTA, R.C.G.; SANTOS JUNIOR, V.M.; GONÇALVES, R.F.; MANZATO, V.M. Pesquisa de Dermatofitos em Superfícies inaminadas de Academia. **Rev. UNIFEV: Ciências & Tecnologia**, v.1, n. 1, p. 121-134, 2016.
- RIBEIRO, D. S.; MELO, D. B.; GUIMARÃES, A. G.; VELOZO, E. D. S. Avaliação do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) como modulador da resistência bacteriana. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 2, p. 687-696, 2012.
- RODRIGUES, D. A; TOMIMORI, J.; FLORIANO, M. C.; MENDONÇA. F. Doenças causadas por fungos/ Tinhas (Dermatofitoses) e Granuloma Tricofítico. **Atlas de dermatologia em povos indígenas**. São Paulo: Editora Unifesp, p. 59-64, 2010.

RODRIGUES, G.S.; OLIVEIRA, F.M.; PEREIRA, E.F.; CRUZ, R.C.B. *Tinea capitis* in adult caused by *Trichophyton violaceum* in Brazil: report of case and review of literature. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 83, n. 6, p. 544-548, 2008.

SAHOO, A. K.; MAHAJAN, R. Management of *tinea corporis*, *tinea cruris*, and *tinea pedis*: A comprehensive review. **Indian dermatology online journal**, v. 7, n. 2, p. 77-86, 2016.

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

SANTOYO, S.; CAVERO, S.; JAIME, L.; IBANEZ, E.; SENORANS, F. J.; REGLERO, G. Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil obtained via supercritical fluid extraction. **Journal of food protection**, v. 68, n. 4, p. 790-795, 2005.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A. L. M.; DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, M. C. T.; REHDER, V. L. G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, V. 35, P. 275-280, 2004.

SCHOELER, A.P.; SQUISSARDI, C.H.; BERNARDI, E.; CEMBRANEL, L.R.; FUENTEFRIA, A.M. Prevalência de dermatófitos na rotina de micologia em hospital particular de médio porte na cidade de Chapecó, estado de Santa Catarina, Brasil. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 31, n.1, p. 103-106, 2010.

SCHUCH, L.F.D.; WIEST, J.M.; GARCIA, E.L.; PRESTES, L.S.; SCHRAMM, R.C.; COIMBRA, H.; MEIRELES, M.C.A. Atividade antifúngica de extratos de plantas utilizados por agricultores familiares como antimicrobiano. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 36, n. 3, p. 267-271, 2008.

SHALABY, M.F.M.; EL-DIN, A.N.; EL-HAMD, M.A. Isolation, Identification, and In Vitro Antifungal Susceptibility Testing of Dermatophytes from Clinical Samples at Sohag University Hospital in Egypt. **Electronic Physician**, v. 8, n. 6, p. 2557-2567, 2016.

SILVA, V.F.; DRESCHER, G.; MATTIELLO, S.P.; KOLLING, L.; MULLER, G.; FERRONATTO, A.I.; SANTURIO, J.M.; COSTA, M.M. Fungal agents of dermatophytosis in dogs and cats from Xanxerê county, Santa Catarina. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, n. 3, p. 1095-1100, jul/set., 2011.

SIQUEIRA, E. R.; FERREIRA, J. C.; MAFFEI, C. M. L.; CANDIDO, R. C. Occurrence of dermatophyte, in nails, feet and hands of university students. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 3, p. 269-271, mai-jun, 2006.

SOMENZI, C.C.; RIBEIRO, T.S.; MENEZES, A. Características particulares da micologia clínica e o diagnóstico laboratorial de micoses superficiais. **NewsLab**, v. 77, p. 106-118, 2006.

SOUZA, Ana Paula Oliveira et al. Atividade antimicrobiana dos sumos de alecrim, aroeira, guiné e mastruz sobre *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Scientia Plena**, v. 11, n. 7, p. 9, 2015.

SOUZA, E. L.; STAMFORD, T. L. M.; LIMA, E. O.; TRAJANO, V. N. Effectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. **Food Control**, v.18, p.409-413, 2007.

SOUZA, M.; MOURA, A.; MEDEIROS, I. Avaliação do teor de óleo essencial de *Rosmarinus* sp. cultivado em dois níveis de luminosidade. **Revista Eletrônica da Faculdade de Ceres**, v. 5, n. 2, p.1-9, 2016.

SOUZA, T.S.; PAULA, N.C.R.; SOUTO, R.C.F. Prevalência de Micoses Superficiais Diagnosticadas em um Laboratório de Análises Clínicas em Goiânia, Goiás. **Revista estudos, Goiânia**, v. 41, n. 4, p. 855-868, out./dez. 2014.

STEINER, D.; BEDIN, V. Doenças fúngicas superficiais da pele. **Rev. Bras. Med.**, v. 56, p. 167- 177, dez. 1999.

TOLEDO, F.A.; CARVALHO, M.T.F.; GAMONAL, A. Pesquisa de fungos como agentes das dermatoses plantares em pacientes do ambulatório de dermatologia do HU-UFJF. **HU rev, Juiz de Fora**, v.32, n.4, p.103-107, out./dez. 2006.

TOMAZ, D.; Será Fungo?. **Revista Portuguesa de Clinica Geral**, v 27, p. 96-108, 2011.

UGALDE, M. L. **Biofilmes ativos com incorporação de óleos essenciais**. 2014. 168 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2014.

URIBE, M. P.; CARDONA-CASTRO, N. Mecanismos de adherencia e invasión de dermatofitos a la piel. **Rev CES Medicina**, v. 27, n. 1, p. 67-75, 2013.

VILANI-MORENO, F. R.; ARRUDA, M. S. P. ; CLARO, S. G.; MARCOS, E. V. C.; URA, S. - Dermatophytosis: association between ABO blood groups and reactivity to the *Trichophytin*. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, v. 41, n. 5, p. 285-289, 1999.