

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

DANIELLE CRISTINA ZIMMERMANN FRANCO

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO RESINA DE *Copaifera langsdorffii* Desf.  
FRENTE A ESPÉCIES DE FUNGOS DERMATÓFITOS**

**JUIZ DE FORA**

**2012**

**DANIELLE CRISTINA ZIMMERMANN FRANCO**

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO RESINA DE *Copaifera langsdorffii* Desf.  
FRENTE A ESPÉCIES DE FUNGOS DERMATÓFITOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração em Produtos Naturais Bioativos, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Nádia Rezende Barbosa Raposo

**JUIZ DE FORA**

**2012**

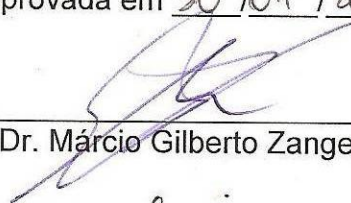
**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO RESINA DE *Copaifera langsdorffii* Desf. FRENTE  
A ESPÉCIES DE FUNGOS DERMATÓFITOS**

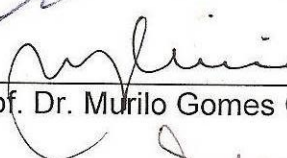
**Danielle Cristina Zimmermann Franco**

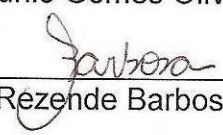
**ORIENTADOR (A): Profª Drª Nádia Rezende Barbosa Raposo**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 30/07/2012

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Márcio Gilberto Zangerônimo

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Murilo Gomes Oliveira

  
\_\_\_\_\_  
Profª. Drª. Nádia Rezende Barbosa Raposo

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pelas oportunidades que me foram dadas na vida, por ter conhecido pessoas e lugares interessantes e por ter vivido fases difíceis, que foram matérias-primas de aprendizado.

Agradeço aos meus pais Maria Helena e José, por terem me fornecido as condições para meu crescimento pessoal e profissional.

A minha irmã Fernanda, grande amiga, que desde pequena está comigo compartilhando momentos e experiências.

Ao Rodrigo, pela paciência, amor e por, às vezes, acreditar mais em mim do que eu mesma.

À Edilene, pela competência e companheirismo que muito me ajudaram na realização deste trabalho.

Aos amigos de laboratório, Annelisa, Érika, Paula, Raquel e Romário, em especial, e a todos os outros que colaboraram nesta caminhada.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nádia, orientadora deste trabalho, pelo conhecimento e atenção com a qual fui acolhida e orientada.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pela oportunidade.

A Pró-Reitoria de Pesquisa (PROPESQ) da Universidade Federal de Juiz de Fora, pela concessão da bolsa de estudos.

*“E aqueles que foram vistos dançando foram julgados insanos por aqueles que não podiam escutar a música.”*

*Friedrich Nietzsche*

## RESUMO

As dermatofitoses são micoses que afetam os tecidos queratinizados, causadas por fungos pertencentes ao grupo dos dermatófitos e que afetam o homem e os animais. O óleo resina de copaíba possui diversas ações farmacológicas, incluindo antimicrobiana. Assim, pode ser uma alternativa para o tratamento farmacológico das dermatofitoses. O objetivo deste estudo foi determinar o perfil químico do óleo resina de *Copaifera langsdorffii* Desf. e investigar sua atividade antifúngica frente aos principais fungos causadores de dermatofitoses: *Microsporium* spp e *Tricophyton* spp. Foram analisados o perfil químico do óleo resina de copaíba por cromatografia gasosa de alta resolução (CG-AR) e a atividade antifúngica do óleo por meio da determinação de sua concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração fungicida mínima (CFM). Os fármacos de referência, cetoconazol e terbinafina, foram empregados como controles positivos. Por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV), foram investigadas as alterações morfológicas causadas nos fungos expostos aos tratamentos propostos. O ácido copálico foi identificado na amostra, confirmando a originalidade do óleo resina de copaíba e o  $\beta$ -cariofileno foi encontrado como componente majoritário (31,4%). O óleo resina de copaíba, por meio do teste de triagem da atividade antifúngica, mostrou-se inativo frente a *M. canis* ATCC 32903, *M. gypseum* ATCC 14683, *T. mentagrophytes* ATCC 9533 e *T. mentagrophytes* ATCC 11480, apresentando atividade fungicida frente às linhagens de *T. mentagrophytes* ATCC 11481, com valores de CIM e CFM iguais a 31,25  $\mu\text{g}$  de  $\beta$ -cariofileno.mL<sup>-1</sup>; e de *T. rubrum* com valores de CIM igual a 250  $\mu\text{g}$  de  $\beta$ -cariofileno.mL<sup>-1</sup> e de CFM igual a 500  $\mu\text{g}$  de  $\beta$ -cariofileno.mL<sup>-1</sup>. Os fungos expostos a ação do óleo e dos fármacos de referência apresentaram deformações em suas estruturas. Os resultados estimulam a realização de ensaios *in vivo* para aplicação do óleo resina de copaíba no tratamento das dermatofitoses humanas e animais causadas por fungos do gênero *Tricophyton* spp.

**Palavras-chave:** Agente antifúngico. *Copaifera*. Dermatofitose. Plantas medicinais.

## ABSTRACT

The dermatophytosis are mycosis that affect the keratinized tissues caused by fungi of the dermatophytes group and affect the humans and the animals. The oleoresin extracted from copaiba has numerous pharmacological actions, including antimicrobial activity. Thus, it may be an alternative for pharmacological treatments of the dermatophytosis. The aim of this study was to determine the chemical profile of the oleoresin extracted from *Copaifera langsdorffii* Desf. and investigate its antifungal activity against the main fungi that cause the dermatophytosis: *Microsporum* spp and *Tricophyton* spp. The chemical profile of the oleoresin extracted from copaiba by high resolution gas chromatography (HR-GC) and the oleoresin's antifungal activity by determination of its minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal fungicidal concentration (MFC) were analyzed. The reference drugs, ketoconazole and terbinafine, were used as positive control. The scanning electron microscopy (SEM) allowed to investigate the morphological alterations caused in the fungi exposed to the proposed treatments. The copalic acid was identified confirming the originality of the oleoresin from copaiba and the  $\beta$ -caryophyllene was the majority compound (31.4%) found. The oleoresin extracted from copaiba showed no active against *M. canis* ATCC 32903, *M. gypseum* ATCC 14683, *T. mentagrophytes* ATCC 9533 and *T. mentagrophytes* ATCC 11480. This oleoresin showed fungicidal activity against the *T. mentagrophytes* ATCC 11481, with the MIC and CFM values equal to 31.25  $\mu\text{g}$  of  $\beta$ -caryophyllene.mL<sup>-1</sup>; and *T. rubrum*, with MIC equal to 250  $\mu\text{g}$  of  $\beta$ -caryophyllene.mL<sup>-1</sup> and MFC equal to 500  $\mu\text{g}$  of  $\beta$ -caryophyllene.mL<sup>-1</sup>. The fungi exposed to the action of the oleoresin and drugs reference presented damage on its structures. The results stimulate the achievement of *in vivo* assays to confirm the benefits from the application of the oleoresin extracted from copaiba in the treatment of dermatophytoses in humans and animal caused by fungi of the *Tricophyton* spp gender.

**Key words:** Antifungal agent. *Copaifera*. Dermatophytosis. Plant, Medicinal.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estruturas típicas dos fungos dermatófitos.	21
Figura 2	Aspectos micro e macroscópico da colônia de <i>Microsporum canis</i> .	24
Figura 3	Aspectos micro e macroscópico da colônia de <i>Microsporum gypseum</i> .	25
Figura 4	Aspectos micro e macroscópico da colônia de <i>Tricophyton rubrum</i> .	27
Figura 5	Aspectos micro e macroscópico da colônia de <i>Tricophyton mentagrophytes</i> .	28
Figura 6	Aspecto da lesão causada por <i>M. canis</i> .	37
Figura 7	Estrutura química do cetoconazol.	43
Figura 8	Estrutura química da griseofulvina.	44
Figura 9	Estrutura química da terbinafina.	45
Figura 10	Fotografia de uma árvore do gênero <i>Copaifera</i> .	49
Figura 11	Estrutura química do ácido copálico e do $\beta$ -cariofileno.	52
Figura 12	Esquema de microcultivo em lâmina de vidro.	59
Figura 13	Perfil cromatográfico do óleo resina de <i>C. langsdorffii</i> Desf.	67
Figura 14	Fotografias do aspecto macroscópico das colônias de <i>M. canis</i> ATCC 32903 e <i>M. gypseum</i> ATCC 14683.	69
Figura 15	Fotografias do aspecto macroscópico das colônias de <i>T. mentagrophytes</i> ATCC 9533, <i>T. mentagrophytes</i> ATCC 11480 e <i>T. mentagrophytes</i> ATCC 11481.	69
Figura 16	Fotografias do aspecto macroscópico das colônias de <i>T. rubrum</i> CCT 5507.	70



Figura 17	Fotografias do aspecto microscópico das colônias de <i>M. canis</i> ATCC 32903.	71
Figura 18	Fotografia da microcultura de <i>M. gypseum</i> ATCC 14683.	71
Figura 19	Fotografia da microcultura da colônia de <i>T. mentagrophytes</i> ATCC 9533.	72
Figura 20	Fotografias do microcultivo e da microcultura de <i>T. rubrum</i> CCT 5507.	72
Figura 21	Eletromicrografias de <i>T. mentagrophytes</i> ATCC 11481 submetido à ação do óleo resina de copaíba e fármacos de referência.	75
Figura 22	Eletromicrografias de <i>T. rubrum</i> CCT 5507 submetido à ação do óleo resina de copaíba e fármacos de referência.	76

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Classificação das dermatofitoses humanas, segundo os sítios acometidos e principais agentes etiológicos.	32
Quadro 2	Classes farmacológicas dos principais agentes antifúngicos utilizados no tratamento das micoses em humanos.	41
Quadro 3	Classe farmacológica dos principais antifúngicos empregados no tratamento de dermatofitoses animais.	42
Quadro 4	Equivalência entre a concentração de $\beta$ -cariofileno com óleo resina de <i>C.langsdorffii</i> .	60
Quadro 5	Suscetibilidade ao óleo resina de <i>C. langsdorffii</i> de fungos dermatófitos em ensaio de triagem.	73

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Composição química do óleo resina de <i>C. langsdorffii</i> obtida por CG-AR.	68
Tabela 2	Suscetibilidade <i>in vitro</i> de fungos dermatófitos frente ao óleo resina de <i>C.langsdorffii</i> e aos fármacos de referência.	74

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\lambda$	Comprimento de onda
$\mu\text{L}$	Microlitro
<b>AIDS</b>	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
<b>ASD</b>	Agar <i>Sabouraud</i> Dextrose
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>ATCC®</b>	<i>American Type Culture Collection</i>
<b>CCT</b>	Coleção de Culturas Tropicais
<b>CFM</b>	Concentração fungicida mínima
<b>CG</b>	Cromatografia gasosa
<b>CG-AR</b>	Cromatografia gasosa de alta resolução
<b>CIM</b>	Concentração inibitória mínima
<b>CLSI</b>	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
<b>cm</b>	Centímetro
<b>CSD</b>	Caldo <i>Sabouraud</i> Dextrose
<b>CYP450</b>	Citocromo P450
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico
<b>FID</b>	<i>Flame ionization detector</i>
<b>IF</b>	Infecção fúngicas
<b>KOH</b>	Hidróxido de potássio
<b>MEV</b>	Microscopia eletrônica de varredura
<b>mm</b>	Milímetro
<b>nm</b>	Nanômetro
<b>M</b>	Molar
<b>MOPS</b>	Ácido 3-[N-morfolino] propanosulfônico
<b>NCCLS</b>	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>UFC</b>	Unidade formadora de colônia
<b>v/v</b>	Volume/volume

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b>	14
2	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b>	16
2.1	FUNGOS: ASPECTOS GERAIS	16
2.1.1	<b>A estrutura dos fungos</b>	17
2.1.2	Fungos dermatófitos	19
2.1.2.1	<b>Gênero <i>Microsporum</i> spp</b>	23
2.1.2.1.1	<i>Microsporum canis</i>	23
2.1.2.1.2	<i>Microsporum gypseum</i>	24
2.1.2.2	<b>Gênero <i>Tricophyton</i> spp</b>	26
2.1.2.2.1	<i>Tricophyton rubrum</i>	26
2.1.2.2.2	<i>Tricophyton mentagrophytes</i>	27
2.2	MICOSES	28
2.3	DERMATOFIToses: CONCEITO E EPIDEMIOLOGIA	31
2.3.1	<b>Interação entre o fungo e o hospedeiro</b>	34
2.3.2	<b>Aspectos clínicos das principais dermatofitoses</b>	36
2.3.3	<b>Diagnóstico laboratorial</b>	39
2.3.4	<b>Tratamento farmacológico das dermatofitoses</b>	40
2.3.4.1	Mecanismo de ação dos principais agentes antifúngicos utilizados no tratamento das dermatofitoses	43
2.3.5	Resistência aos agentes antifúngicos	45
2.4	A IMPORTÂNCIA DAS PLANTAS MEDICINAIS	47
2.4.1	<b>Copaíba: características e ocorrência do gênero</b>	48
2.4.1.1	Características do óleo de copaíba	50
2.4.1.2	Usos farmacológicos do óleo de copaíba	52
2.4.2	Benefícios de formulações associadas à óleos naturais	53
3	<b>OBJETIVOS</b>	55
3.1	GERAL	55
3.2	ESPECÍFICOS	55
4	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	56
4.1	ÓLEO RESINA DE COPAÍBA	56
4.2	CROMATOGRAFIA GASOSA DE ALTA RESOLUÇÃO (GC-AR)	56

4.3	FUNGOS	57
4.4	CARACTERIZAÇÃO MACROSCÓPICA DAS COLÔNIAS	57
4.5	CARACTERIZAÇÃO MICROSCÓPICA DAS COLÔNIAS	58
4.6	ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO RESINA DE COPAÍBA	59
4.6.1	<b>Triagem da atividade antifúngica</b>	59
4.6.2	<b>Determinação da concentração inibitória mínima</b>	60
4.6.2.1	Meio de cultivo	61
4.6.2.2	Padronização do inóculo	61
4.6.2.3	Diluição dos agentes antifúngicos	62
4.6.2.4	Preparo da microplaca	63
4.6.3	<b>Determinação da concentração fungicida mínima</b>	64
4.7	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	65
5	<b>RESULTADOS</b>	67
5.1	PERFIL QUÍMICO DO ÓLEO RESINA DE COPAÍBA	67
5.2	CARACTERIZAÇÃO MACROSCÓPICA DAS COLÔNIAS	68
5.3	CARACTERIZAÇÃO MICROSCÓPICA DAS COLÔNIAS	70
5.4	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA	73
5.4.1	<b>Triagem da atividade antifúngica</b>	73
5.4.2	<b>Determinação da concentração inibitória mínima e concentração fungicida mínima</b>	73
5.5	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	74
6	<b>DISCUSSÃO</b>	77
7	<b>CONCLUSÃO</b>	87
	<b>REFERÊNCIAS</b>	88

## 1 INTRODUÇÃO

Os óleos de origem vegetal são amplamente associados aos mecanismos de defesa das plantas contra micro-organismos, insetos e herbívoros. A extensão dessa propriedade protetora faz com que estes óleos sejam utilizados na elaboração de produtos químicos, farmacêuticos, na agricultura, como conservantes alimentares, entre outros (VILA et al., 2010; MORAIS; CASTANHA, 2011).

A complexa e diversificada composição dos óleos essenciais e resinosos é, de modo geral, a principal responsável pela ampla gama de atividades biológicas que eles apresentam, tornando crescente o interesse em aplicá-los na área de saúde humana e animal (CHENG et al., 2009; DEUS; ALVES; ARRUDA, 2011). Contudo, Vila e colaboradores (2010) ressaltam que ainda é pequena a utilização do potencial desses óleos: de aproximadamente 3.000 espécies produtoras de óleos essenciais e resinosos, apenas cerca de 10% são utilizadas, direta ou indiretamente, em benefício do homem. Alguns deles têm seu uso tradicionalmente descrito para o tratamento de enfermidades, como é o caso do óleo resina extraído de árvores pertencente ao gênero *Copaifera* spp, conhecidas popularmente como copaíba (DUTRA et al., 2012).

Corroborando o uso tradicional, estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que o óleo de copaíba pode atuar como anti-inflamatório, cicatrizante, anti-edematogênico, antitumoral e tripanossomicida (MENDONÇA; ONOFRE, 2009), estimulante da angiogênese (ESTEVÃO et al., 2009), preventivo de doença periodontal (PIERI et al., 2010b), auxiliar no processo de despigmentação cutânea (OLIVEIRA et al., 2010), antibacteriano e antifúngico (DEUS; ALVES; ARRUDA, 2011; SOUZA et al. 2011a; SOUZA et al., 2011b; PIERI et al., 2012b), entre outros.

Dentre os fungos causadores de infecções cutâneas, aqueles pertencentes aos gêneros *Epidermophyton* spp, *Microsporum* spp e *Tricophyton* spp constituem um grupo de fungos taxonomicamente relacionados, denominados dermatófitos (FRIAS; KOZUSNY-ANDREANI, 2010). Segundo Peres e colaboradores (2010), dermatófitos causam um quadro infeccioso denominado dermatofitose e são os responsáveis por afetarem cerca de 25% da população mundial, além de serem consideradas a terceira enfermidade mais frequente na pele de crianças e a segunda na população adulta (RAMADINHA et al., 2010).

Em animais domésticos, correspondem de 7 a 40% das dermatopatias em cães e de 9 a 54,8% em gatos (NEVES et al., 2011). Além disso, fungos dermatófitos podem infectar também coelhos, aves e animais de grande porte, como equinos e bovinos (COELHO; ALEGRIA; RODRIGUES, 2008; AVANTE et al., 2009; AMARAL; PEREIRA; MEIRELES, 2011). No total, representam cerca de 2% de todas as dermatopatias veterinárias diagnosticadas (PALUMBO et al., 2010).

A utilização dos agentes antifúngicos disponíveis no combate às dermatofitoses implicam, na maioria dos casos, em tratamentos caros, de longa duração, com manifestação de inúmeras reações adversas e, se não utilizados adequadamente, apresentam grande chance de recidivas e seleção de micro-organismos resistentes (DEL PALÁCIO; GARAU; CUÉTARA, 2002; DALAZEN et al., 2011; TOMAZ, 2011).

Considerando, portanto, o potencial farmacológico do óleo de copaíba e os problemas relativos aos tratamentos antifúngicos convencionais, o óleo resina proveniente da espécie *Copaifera langsdorffii* Desf. foi escolhido para ser o foco deste estudo. Esta escolha justifica-se pela importância de se buscar novos agentes antifúngicos, alternativos aos fármacos disponíveis atualmente, para o tratamento das infecções causadas por fungos dermatófitos.



## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 FUNGOS: ASPECTOS GERAIS

Os fungos são micro-organismos considerados ubíquos por serem encontrados no solo, água, vegetais, animais e em seres humanos. Até 1969, foram classificados como plantas e, mais tarde, inseridos em um reino separado, denominado Fungi. Trata-se de um reino muito rico em diversidade, apresentando desde espécies que crescem como organismos unicelulares a espécies com hifas ramificadas que produzem uma notável variedade de esporos e outras estruturas reprodutivas (ADAMS, 2004; LEME et al., 2011).

Podem ser classificados em quatro filos: Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota e Basidiomycota. Destes, o filo Ascomycota é o mais extenso, incluindo cerca de 60% de todos os fungos e 85% dos patogênicos. A classificação adequada da espécie fúngica em um filo é feita com base em seu modo de reprodução sexual, nas propriedades fenotípicas e nas relações filogenéticas (BROOKS et al., 2009).

De acordo com Fukuda e colaboradores (2009), os fungos têm a capacidade de ocupar diversos nichos ecológicos, podendo atuar como parasitas, sapróbios ou estabelecer relações simbióticas. Além de serem considerados importantes agentes decompositores, apresentam grande potencial de aplicação em diferentes áreas industriais (alimentos, cosméticos e medicamentos); bem como na área ambiental, como detoxificadores de compostos em ambientes contaminados (JAQUES et al., 2007; SOUZA; OLIVEIRA; ANDRADE, 2008).

Alguns fatores do meio influenciam o desenvolvimento de um fungo, tais como: estação do ano, localização, umidade relativa do ar, entre outros. Seu crescimento pode ser dividido em duas fases: vegetativa e reprodutiva. Assim, a morfologia no estado parasitário é diferente daquela apresentada *in vitro* (LEME et al., 2011).

Estruturalmente, a célula fúngica apresenta-se bem compartimentada, com membrana celular que envolve os cromossomos e o nucléolo; por isso, enquadrarse no grupo dos eucariontes. São seres heterotróficos, ou seja, isentos de pigmentos fotossintéticos capazes de converter a energia luminosa em compostos orgânicos fornecedores de energia (PRADO, 2007).

Segundo Simpanya (2000), os fungos apresentam parede celular rígida sem peptidoglicases, o que os impede de realizar fagocitose. Deste modo, nutrem-se por absorção de nutrientes solúveis obtidos, geralmente, por ação enzimática extracelular (LEME et al., 2011).

### 2.1.1 A estrutura dos fungos

Semelhante a outros organismos eucariontes, os fungos possuem estrutura celular constituída basicamente por: membrana, citoplasma com organelas distribuídas aleatoriamente e um núcleo, responsável por armazenar o material genético (FUKUDA et al., 2009). O desenvolvimento de uma camada externa à membrana, denominada parede celular, é fundamental para o crescimento e sobrevivência da célula fúngica nos diversos meios em que esta pode ser encontrada (PINTO; BARRETO-BERGTER; TABORDA, 2008).

Além de apresentar função protetora, a parede celular mantém a arquitetura da célula e faz a interface entre os meios intracelular e extracelular. Esta interação com

o meio depende de componentes presentes em sua estrutura, responsáveis também pela capacidade de adesão e propriedades de reconhecimento da célula fúngica, que constituem alguns dos fatores de patogenicidade dos fungos (DURÁN; NOMBELLA, 2004; PONTÓN, 2008).

A parede celular é composta por camadas de carboidratos, cadeias longas formadas pela interconexão de unidades de polissacarídeos - sendo as beta-glucanas as mais importante -, glicoproteínas e lípidos (BROOKS et al., 2009). Estes compostos têm grande potencial para regular a patogênese e a resposta imune do hospedeiro (PINTO; BARRETO-BERGTER; TABORDA, 2008; BROOKS et al., 2009).

Apesar de a parede celular apresentar variações de composição substanciais entre diferentes espécies fúngicas, sobretudo com relação à fração protéica, trata-se de um alvo de grande importância para a ação de fármacos (PONTÓN, 2008). Para Fukuda e colaboradores (2009), a eliminação ou defeito em sua formação tem efeitos importantes no crescimento e morfologia da célula, podendo levá-la à morte por lise.

Além da parede celular, cabe ressaltar a presença de outra estrutura, comum à maioria das espécies, denominadas hifas. Constituídas por um conjunto de filamentos tubulares, ramificados e pluricelulares, as hifas podem se agrupar e formar o micélio. Os fungos que assim se apresentam são denominados filamentosos. Apesar de, frequentemente, esses filamentos apresentarem septos, estes não são obrigatoriamente vistos como estruturas de separação entre as células, pois podem conter inúmeros poros, cuja finalidade é permitir a passagem de substâncias entre células vizinhas (BROOKS et al., 2009).

Para se expandirem por novas áreas, os fungos lançam hifas, nas quais podem ser observados conidiósporos e artrósporos. Os conidiósporos são formações presentes nas laterais das hifas, enquanto os artrósporos são segmentações de hifas septadas, mais comuns de serem observadas em fungos cultivados por longos períodos. Tais estruturas podem promover a reprodução assexuada do fungo ao se segmentarem e darem origem a fragmentos com tal capacidade (artroconídios, microconídios e macroconídios) (SIMPANYA, 2000; PRADO, 2007).

De acordo com o tamanho do conídio, ele é classificado em macro ou microconídio. Para Coelho e colaboradores (2008b), macroconídios se apresentam multiseptados e microconídios aparecem na porção final dos conidiósporos. Já os artroconídios, são considerados como uma fragmentação programada das hifas septadas, formando pequenas cadeias ou artroconídios isolados, esféricos ou ovais. Tais estruturas são células metabolicamente ativas, com vacúolos ricos em lípidos e organelas intracelulares. Deste modo, conseguem se manter resistentes aos agentes antifúngicos e viáveis em condições adversas do meio ambiente.

### **2.1.2 Fungos dermatófitos**

Denominam-se dermatófitos os fungos queratinofílicos e com atividade queratinolítica sendo, portanto, restritos aos tecidos queratinizados como cabelos e pelos, unhas e pele; poupando as mucosas. Limitam-se às camadas mais superficiais do estrato córneo por não serem capazes de invadir tecidos profundos ou órgãos de hospedeiros imunocompetentes (BEIFUSS et al., 2009; ARAÚJO et al., 2010; TOMAZ, 2011).

Pertencem à classe dos dermatófitos os fungos do gênero *Epidermophyton* spp, *Microsporum* spp e *Trichophyton* spp. O *Trichophyton* spp, comumente, infecta pelos, pele e unhas; o *Microsporum* spp, usualmente, acomete pelos e pele; e o *Epidermophyton* spp tende a afetar somente a pele e as unhas (HIBBETT et al., 2007; BEIFUSS et al., 2009; FRIAS; KOZUSNY-ANDREANI, 2010).

Os três gêneros de fungos dermatófitos apresentam diferenças estruturais (Figura 1), podendo demonstrar estruturas de frutificação e/ou de ornamentação características de cada gênero. Estruturas de frutificação consistem em células componentes das hifas que, em determinadas condições, sofrem modificação para dar origem as células esporogênicas e as conidiogênicas (origem dos macro e microconídios). Estruturas de ornamentação não têm sua função bem esclarecida para a biologia dos fungos, entretanto, são úteis para a identificação das espécies. São elas: órgãos pectinados, hifas em espiral, hifas em raquete, candelabro fávico, acladium, entre outros (SIMPANYA, 2000; LEFEBVRE, 2006).

Fungos dermatófitos são aeróbios não fermentativos e crescem em temperatura que varia de 25°C a 30°C. Depois de 7 a 21 dias de crescimento, a maioria das colônias começa a produzir esporos, os quais permitem a sua identificação (FOIL, 1994; BROOKS et al., 2009).

São transmitidos pelo contato direto com indivíduos contaminados ou através das formas livres presentes no ambiente ou em fômites (RAMADINHA et al., 2010). Os arthroconídios são as principais formas infectantes e, quando se encontram no interior de segmentos capilares ou de descamações epidérmicas, podem sobreviver por longos períodos de tempo (ZAGNOLI et al., 2004; INSTITUTE FOR INTERNATIONAL COOPERATION IN ANIMAL BIOLOGICS, 2005; COELHO et al., 2008b).

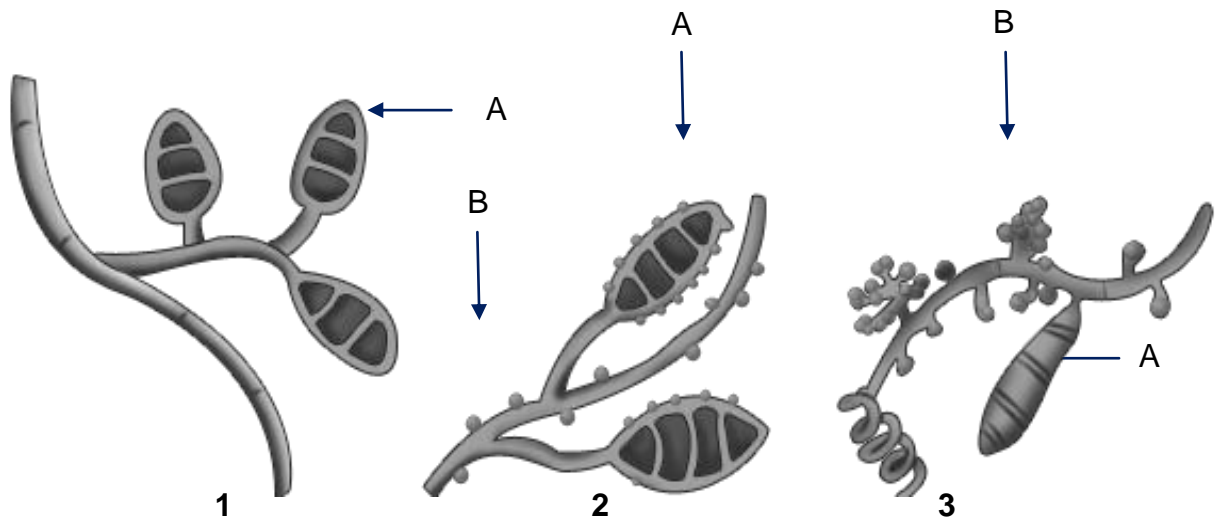


Figura 1 – Estruturas típicas dos fungos dermatófitos.  
 (1) *Epidermophyton* spp. (2) *Microsporium* spp. (3) *Tricophyton* spp.  
 (A) Macroconídios. (B) Microconídios.  
 Fonte: Adaptado de Sidrim e Rocha (2004).

Os fungos dermatófitos podem ser classificados de acordo com seu *habitat* primário em antropofílicos, zoofílicos e geofílicos. As espécies antropofílicas são primariamente associadas com humanos, mas podem infectar outros animais. A transmissão de dermatofitoses antropofílicas está fortemente ligada à vida em comunidade, pois requer contato humano e/ou com objetos/ambientes contaminados por propágulos de lesões ativas. Destaca-se como principal agente, neste caso, o *Tricophyton rubrum* (SIMPANYA, 2000; GARCIA-MARTOS et al., 2004; AQUINO; CONSTANTE; BAKOS, 2007).

Com relação aos dermatófitos zoofílicos, Garcia-Martos e colaboradores (2004) explicam que, usualmente, infectam animais ou estão associados a eles e, ocasionalmente, podem infectar humanos. Estes patógenos podem parasitar algumas espécies animais (em especial aves, suínos, equinos, felinos e caninos) que, devido ao contato, podem ser transmitidos para humanos.

Dentre as espécies fúngicas mais comuns de infectarem animais, o *Microsporium canis* destaca-se por ser o fungo dermatófito isolado na maioria das

micoses cutâneas e superficiais (NEVES et al., 2011; RAMADINHA et al., 2011), seguido por agentes do gênero *Tricophyton spp* (BROOKS et al., 2009; NEVES et al., 2011).

Dermatófitos geofílicos associam-se a materiais orgânicos ricos em queratina (cabelos, penas, cascos e chifres) quando estão em decomposição. As espécies geofílicas podem causar infecções tanto em animais quanto em humanos e são, possivelmente, os ancestrais dos antropofílicos e zoofílicos. O principal dermatófito geofílico é o *Microsporum gypseum* (GARCIA-MARTOS et al., 2004; PEREIRA, 2009).

De acordo com Rezende e colaboradores (2008), a ocorrência dos dermatófitos, de acordo com a sua distribuição geográfica, mostra-se bastante variável. Algumas espécies podem ser cosmopolitas e outras dependentes da adaptação ao meio ambiente, do deslocamento humano, de convívio com animais e de aspectos sócio-econômicos, sexo, idade e imunidade do hospedeiro.

No Brasil, as espécies mais frequentemente isoladas como causadoras de dermatofitoses, tanto em humanos quanto animais, são *M. canis*, *T. mentagrophytes* e *T. rubrum* (ARAÚJO et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2006; SIQUEIRA et al., 2008). Estes também são os principais agentes de dermatofitoses na América Latina e Europa (NEVES et al., 2011; SEEBACHER, BOUCHARA; MIGNON, 2008).

### 2.1.2.1 Gênero *Microsporum* spp

O *Microsporum* spp parasita, preferencialmente, cães e gatos e, por estes se tratarem dos principais animais de companhia, apresentam grande risco de infectarem humanos. Merecem destaque as espécies *M. canis*, pois de acordo com Ramadinha e colaboradores (2011), esta espécie é isolada de cerca de 95% das lesões em animais; e *M. gypseum*, por ser a espécie geofílica mais associada à infecções em animais e humanos (CAFARCHIA et al., 2006; JAKOWSKA-KONSUR, 2009).

#### 2.1.2.1.1 *Microsporum canis*

*M. canis* é uma espécie associada às dermatofitoses em humanos e animais sendo, provavelmente, a zoonose adquirida com maior frequência pelo contato com animais de companhia. Assim, a principal fonte de contágio no meio urbano são os animais domésticos e, no meio rural, cabe destacar a transmissão por coelhos, cavalos e bovinos (TIZANNI et al., 2007; COELHO; ALEGRIA; RODRIGUES, 2008; FRIAS; KOZUSNY-ANDREANI, 2010).

Marques e outros (2005) destacaram esta espécie como o principal agente etiológico de dermatofitoses nas regiões Sul e Sudeste do Brasil. Além disso, em estudo epidemiológico realizado no município de Barretos – São Paulo, por Rezende e colaboradores (2008), identificou-se que esse foi o fungo dermatófito que causou o maior número de infecções do couro cabeludo em humanos (*Tinea capitis*).

As características micromorfológicas de *M. canis* consistem, principalmente, em hifas sinuosas, septadas, bastante ramificadas e finas e cadeias de esporos (Figura 2). Observa-se também micro e macroconídios, sendo estes multisseptados



e, às vezes, apresentam finas projeções especulares na parede da célula. Seus esporos têm uma aparência alongada e fusiforme, podendo ser numerosos ou escassos (SIMPANYA, 2000).

Macroscopicamente, observa-se que este fungo possui colônias de crescimento rápido, aspecto radial, com anverso geralmente esbranquiçado e de textura cotonosa. O reverso da colônia apresenta coloração que pode variar de creme a amarelo-brilhante, tornando-se opaca e alaranjada com o envelhecimento (SYMPANYA, 2000; MENDONZA et al., 2010) (Figura 2).

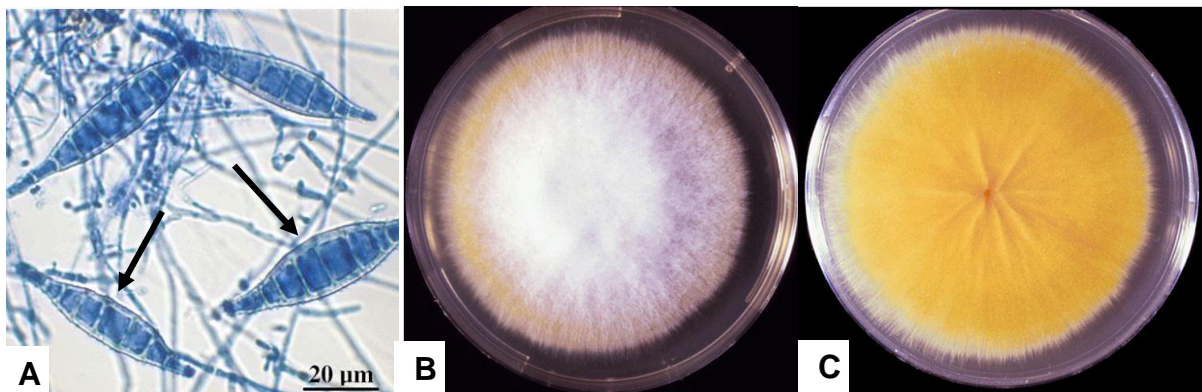


Figura 2 – Aspectos micro e macroscópico da colônia de *Microsporium canis*. (A) Morfologia microscópica da colônia de *M. canis*: abundância de macroconídios com paredes espessas, indicados pelas setas. Escala correspondente a 20 µm. Aspecto da colônia de *M. canis in vitro*: (B) anverso branco e cotonoso e (C) reverso com coloração amarela. Fonte: The University of Adelaide (2011).

#### 2.1.2.1.2 *Microsporium gypseum*

Classificada como a única espécie geofílica com capacidade patogênica, *M. gypseum* apresenta distribuição mundial e pode parasitar o homem e os animais, muitas vezes, de forma assintomática (SAENZ, 2007).

Garcia-Martos e colaboradores (2004) explicam que a distribuição e a sobrevivência de *M. gypseum* no solo dependem de fatores abióticos (temperatura, luz, variações climáticas e altitude) e bióticos (pH, disponibilidade de nutrientes,

húmus, ácidos graxos e sais minerais). Sua presença em áreas habitadas é consequência do acúmulo de produtos orgânicos, sobretudo dejetos, tanto do homem, quanto de animais.

A infecção por *M. gypseum* afeta principalmente crianças, manifestando-se em zonas descobertas do corpo (*Tinea corporis*). Casos de infecção causadas por este patógeno em adultos imunocomprometidos também já foram registrados (LUQUE et al., 2001; GARCIA-MARTOS, 2004). Amaral, Pereira e Meireles (2011) descreveram *M. gypseum* como a espécie mais isolada em amostras de solo e alertaram para a relação saprofítica que esta espécie pode estabelecer com bovinos de corte que comportam-se como “reservatórios” para o mesmo.

Saenz (2007) descreveu que a análise microscópica dessa espécie revela macroconídios contendo até seis células e estes são abundantes, fusiformes e simétricos. A análise macroscópica, segundo Prado (2007), revela colônias com anverso de cor branca e textura pulverulenta e reverso amarelo. Tais características podem ser visualizadas na figura 3 (THE UNIVERSITY OF ADELAIDE; 2011).

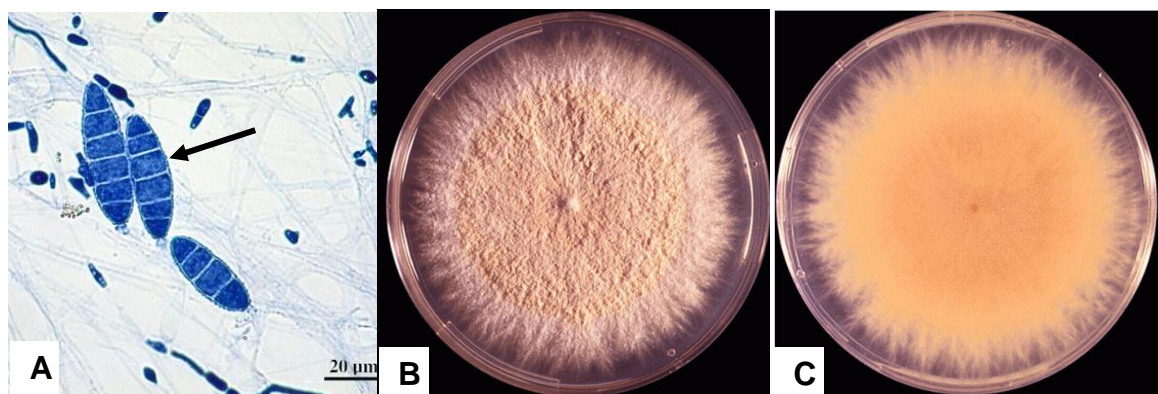


Figura 3 - Aspectos micro e macroscópico da colônia de *Microsporum gypseum*.

(A) Morfologia microscópica da colônia de *M. gypseum*: macroconídios simétricos, elipsóides e abundantes indicados pela seta. Escala correspondente a 20 µm. (B) Aspecto da colônia de *M. gypseum* *in vitro*: anverso branco e com aspecto pulverulento e (C) reverso com produção de pigmento amarelo.

Fonte: The University of Adelaide (2011).

### 2.1.2.2 Gênero *Tricophyton* spp

Nas últimas décadas, houve uma tendência mundial do predomínio de *Tricophyton* spp como agente causador de dermatofitoses. Merecem destaque, as espécies *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* por figurarem entre os três principais e mais ocorrentes dermatófitos em animais e humanos, respectivamente (SEEBACHER; BOUCHARA; MIGNON, 2008).

#### 2.1.2.2.1 *Tricophyton rubrum*

O *T. rubrum* é um fungo antropofílico e cosmopolita, principal causador de *Tinea pedis* e onicomicoses (OLIVEIRA et al., 2006; PERES et al., 2010).

De acordo com o levantamento epidemiológico sobre dermatofitoses realizado por Seebacher, Bochara e Mignon (2008), *T. rubrum* foi considerado como o fungo dermatófito mais comumente isolado de lesões na Europa, Estados Unidos, México e outros países da África e América Latina. No Brasil, de acordo com Peres e colaboradores (2010), esse dado se repete, sobretudo nas regiões Sul e Sudeste do país.

Existe uma tendência mundial do predomínio de infecções por *T. rubrum* com consequente diminuição dos números de casos de dermatofitoses por *T. mentagrophytes*. Essa modificação parece estar relacionada ao fato de que ambos dividem as mesmas características ecológicas, porém o *T. rubrum* estaria melhor adaptado como parasita humano, contribuindo para a diminuição da frequência de casos de infecção por *T. mentagrophytes* (RUIZ; ZAITZ, 2001; AQUINO; CONSTANTE; BAKOS, 2007).

Sob análise microscópica, esta espécie apresenta microconídios piriformes localizados ao longo das hifas que são hialinas e não ramificadas, com macroconídios escassos, longos e em forma de charuto. Os artroconídios, também presentes, podem resistir a longos períodos no ambiente, constituindo a principal forma infecciosa deste fungo (COELHO et al., 2008b; MOYANO et al., 2008). *In vitro*, as colônias de *T. rubrum* apresentam crescimento lento e aspecto aveludado ou cotonoso, com pregas radiais e aparecimento de pigmentação vermelha no reverso (MARANHÃO, 2009) (Figura 4).

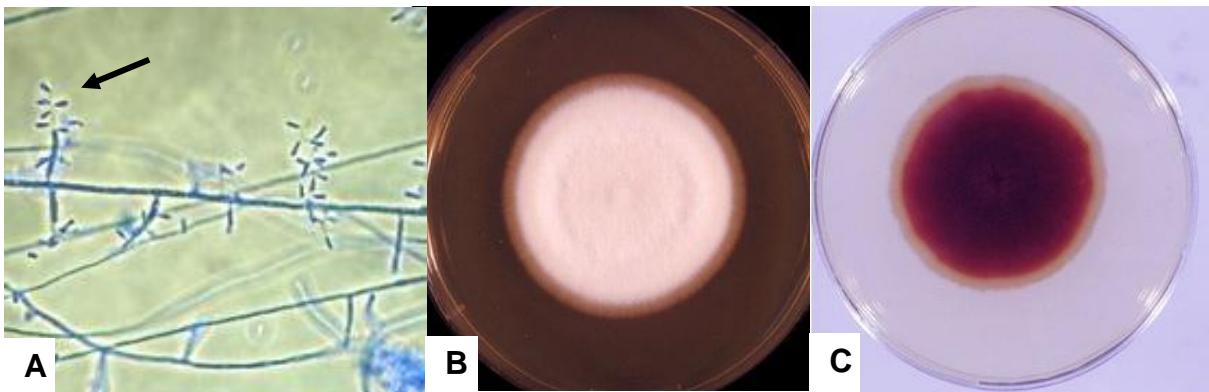


Figura 4 - Aspectos micro e macroscópico da colônia de *Tricophyton rubrum*. (A) Morfologia microscópica de *T. rubrum*: predominância de microconídios piriformes destacados com a seta. (B) Aspecto da colônia de *T. rubrum*: anverso com coloração predominantemente branca e aspecto aveludado e (C) reverso com presença típica de pigmento vermelho. Fonte: The University of Adelaide (2011).

#### 2.1.2.2.2 *Tricophyton mentagrophytes*

*T. mentagrophytes* é considerado um dos principais agentes causadores de onicomicoses, sobretudo em indivíduos imunocomprometidos (CAMBUIM et al., 2011). Esta espécie pode produzir lesões inflamatórias que curam espontaneamente, um dos motivos pelo qual houve a diminuição das dermatofitoses causadas por ela (AQUINO; CONSTANTE; BAKOS, 2007).

Microscopicamente, este fungo, quando tem origem zoofílica, apresenta variados tipos de estruturas em forma de cachos. Já os de origem antropofílica,

apresentam um número menor de microconídios. Os macroconídios são raros, mas quando presentes assemelham-se a charutos. Macroscopicamente, as colônias *in vitro* têm crescimento e coloração variáveis entre o creme e o amarelo, com aspecto de pó de arroz (pulvurulenta) (CABAÑES, 2000; SIMPANYA, 2000).

As características de *T. mentagrophytes* podem ser visualizadas na figura abaixo (Figura 5) (THE UNIVERSITY OF ADELAIDE; 2011).

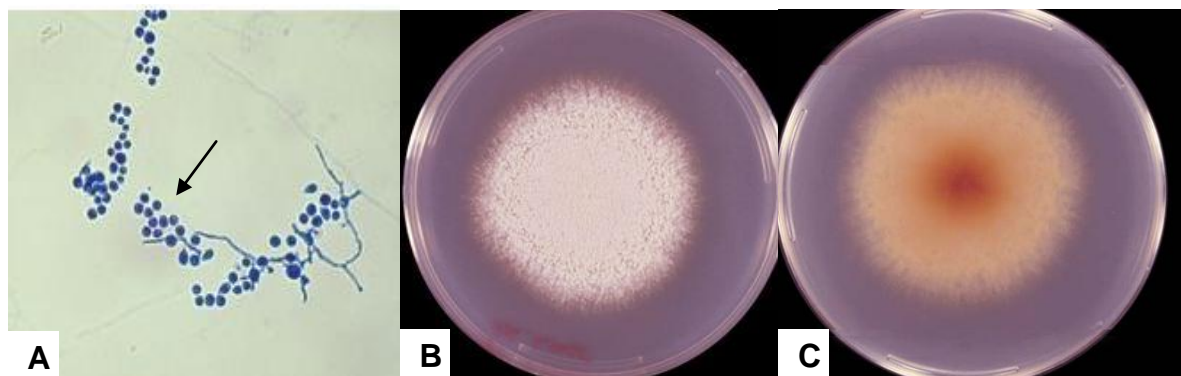


Figura 5 - Aspectos micro e macroscópico da colônia de *Tricophyton mentagrophytes*. (A) Morfologia microscópica de *T. mentagrophytes*: microconídios abundantes, organizados em cachos destacados pela seta. Na imagem, estão ausentes os macroconídios em forma de charuto; (B) aspecto da colônia de *T. mentagrophytes*: anverso com aspecto pulvurulento e coloração branca e (C) reverso com pigmento amarelo. Fonte: The University of Adelaide (2011).

## 2.2 MICOSES

Denomina-se micose um amplo espectro de infecções causadas em humanos e animais por fungos leveduriformes ou filamentosos. Estas infecções fúngicas (IF) podem causar diferentes alterações no hospedeiro dependendo da espécie do fungo envolvida e do sítio acometido (BLANCO; GARCIA, 2008). Segundo Wanke (1988), as IF podem ser classificadas em micoses sistêmicas, subcutâneas, cutâneas e superficiais. As micoses oportunistas também podem ser incluídas neste grupo das IF (WIRK; WINGARD, 2011).

As micoses sistêmicas são formas disseminadas de IF que podem afetar órgãos internos (OSTROSKY-ZEICHNER, 2012). O principal foco de infecção é geralmente pulmonar, por meio da inalação de conídios (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006). Como importantes infecções sistêmicas, destacam-se a blastomicose, a criptococose, a coccidioidomicose e a histoplasmose (SILVA, 2010).

As micoses subcutâneas são infecções crônicas que se localizam na pele e no tecido subcutâneo, geralmente, por implantação traumática. Os agentes etiológicos dessas micoses são representados por fungos leveduriformes (*Malassezia* spp, por exemplo) e fungos filamentosos não dermatófitos (*Piedraia hortae* e *Phaeoannelomyces werneckii*). Segundo Oliveira e colaboradores (2006), a infecção é um processo indolor e comumente localizada no local de entrada do agente etiológico, com propagação lenta para o tecido circundante.

As micoses cutâneas caracterizam-se por serem IF superficiais da pele, cabelo ou unhas em humanos ou em pele, pêlos, cascos e chifres de animais. Podem ser causadas por leveduras, fungos filamentosos dermatófitos ou não dermatófitos (ALMEIDA et al., 2009). Na maioria dos casos, não há riscos de se tornar uma micose invasiva, no entanto, uma variedade de alterações patológicas ocorre no hospedeiro, devido à presença do agente infeccioso e de seus produtos metabólicos (ARAÚJO et al., 2009; ARAÚJO et al., 2010).

As micoses superficiais tratam-se de infecções fúngicas da pele, cabelo ou pêlo. Assim como nas micoses cutâneas, não há invasão de tecido vivo, porém, neste caso, não há resposta celular do hospedeiro (OLIVEIRA et al., 2006). O agente patogênico tende a se localizar na parte mais externa da pele, ao redor dos pelos ou das unhas, nutrindo-se de queratina. Essencialmente, não provocam

alterações patológicas sendo, muitas vezes, tão inócuas aos indivíduos que estes desconhecem sua condição de portador das mesmas (ARAÚJO et al., 2010).

Micoses oportunistas são infecções que acometem, na maioria dos casos, indivíduos com respostas imunológicas diminuídas, com destaque para pacientes em regimes de quimioterapia antineoplásica ou imunossupressora, submetidos a transplantes de órgãos ou de células hematopoiéticas, portadores de doenças autoimunes e do vírus da imunodeficiência humana (HIV) (ARAÚJO et al., 2010; SILVA, 2010). Lafayette e colaboradores (2011) explicam que as micoses oportunistas ocorrem quando espécies de fungos comensais, presentes em indivíduos saudáveis, passam a manifestar uma relação infecciosa com o hospedeiro. Neste grupo, incluem-se as candidíases, as aspergiloses e as zigomicoses.

As IF, em geral, têm ganhado importância nas últimas décadas, visto que sua incidência vem crescendo gradualmente (VYZANTIADIS; JOHNSON; KIBBLER, 2012). Em partes, isso se deve ao aumento da expectativa de vida de indivíduos portadores de doenças que causam deficiência do sistema imunológico (tal como síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), diabetes *mellitus*, depressão, entre outros), bem como a utilização de fármacos imunossupressores e antibióticos (ARAÚJO et al., 2010; SOUZA et al., 2012). Outros fatores relacionados ao hospedeiro como ocupação profissional, hábitos e estado de saúde, podem aumentar a predisposição às micoses, sobretudo dos tipos subcutânea, cutânea e superficial (ALMEIDA et al., 2009).

Entretanto, tais infecções também se manifestam em indivíduos saudáveis, provavelmente, como consequência de uma grande exposição a propágulos infecciosos ou devido a pequenas falhas imunológicas que não comprometem

gravemente a saúde do indivíduo (HAMAD, 2012; VYZANTIADIS; JOHNSON; KIBBLER, 2012).

Dentre os diferentes tipos de IF, as micoses cutâneas destacam-se pela elevada prevalência: estima-se que afetam entre 20 a 25% da população mundial, além de apresentarem incidência crescente. A maioria dos casos é relacionada ao acometimento de pele e anexos por fungos dermatófitos e as alterações produzidas neste tipo de IF, são denominadas dermatofitoses (TOMAZ et al., 2011).

As dermatofitoses vêm sendo consideradas como importante problema de saúde pública por constituírem um dos grupos de infecções fúngicas mais frequentes na prática dermatológica. No entanto, por tratarem-se de doenças cuja notificação não é obrigatória, a exata extensão de sua epidemiologia ainda não pode ser definida (ALMEIDA et al., 2009; ARAÚJO et al., 2009; ARAÚJO et al., 2010).

### 2.3 DERMATOFITOSSES: CONCEITO E EPIDEMIOLOGIA

Dermatofitoses são infecções micóticas que atingem principalmente tecidos queratinizados superficiais da epiderme, pêlos, unhas, cornos e penas, causadas pelo homogêneo grupo dos fungos dermatófitos (HAINER, 2003; ARAÚJO et al., 2010; FRIAS; KOZUSNY-ANDREANI, 2010).

Os fungos dermatófitos causam síndromes clínicas bem peculiares e a mesma espécie pode estar envolvida em outras formas da doença, dependendo do sítio anatômico atingido. Assim, a localização das lesões é um importante fator para classificação dessas micoses cutâneas (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2006).

A todas as dermatofitoses dá-se o nome de epidermofitias ou tinhas, palavra de origem do latim *tinea*, cujo significado é verme ou traça, seguida do nome, também em latim, do sítio acometido. As formas clínicas mais relevantes são as tinhas da



cabeça, do corpo, da região genital, da barba, das unhas, da mão e do pé, que podem ser causadas por diferentes espécies de fungos dermatófitos (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2006; REZENDE et al., 2008) (Quadro 1).

Quadro 1 – Classificação das dermatofitoses humanas, segundo os sítios acometidos e principais agentes etiológicos.

<b>Tipo de dermatofitose</b>	<b>Sítio anatômico atingido</b>	<b>Principais agentes etiológicos</b>
<i>Tinea capitis</i>	Couro cabeludo, sobrancelhas	<i>T. mentagrophytes</i> , <i>T. tonsurans</i> , <i>T. violaceum</i> , <i>M. audouinii</i> , <i>M. canis</i>
<i>Tinea corporis</i>	Região sem pelos do tronco, braços, pernas e dorso de mãos e pés	<i>T. mentagrophytes</i> , <i>T. rubrum</i> , <i>T. tonsurans</i> , <i>T. verrucosum</i> , <i>M. canis</i>
<i>Tinea cruris</i>	Virilhas, períneo e região perianal	<i>T. mentagrophytes</i> , <i>T. rubrum</i> , <i>E. floccosum</i>
<i>Tinea faciei</i>	Pele da face	<i>T. mentagrophytes</i> , <i>T. rubrum</i>
<i>Tinea barbae</i>	Barba e bigode	<i>T. mentagrophytes</i> , <i>T. violaceum</i> , <i>T. verrucosum</i> , <i>T. rubrum</i>
<i>Tinea pedis</i>	Planta do pé, dedos e região interdigital	<i>T. mentagrophytes</i> , <i>T. rubrum</i> , <i>E. floccosum</i>
<i>Tinea manuum</i>	Região interdigital e palmas das mãos	<i>T. mentagrophytes</i> , <i>T. rubrum</i> , <i>E. floccosum</i>

Fonte: Adaptado de Murray, Rosenthal e Pfaller (2006).

Embora ambos os sexos sejam afetados pelas dermatofitoses, os homens tendem a apresentar tinhas do pé e das pregas inguinais mais frequentemente. Após a puberdade, também adquirem tinhas das unhas com maior facilidade do que as mulheres (TOMAZ, 2011).

Com relação à epidemiologia, essas micoses são consideradas como o terceiro distúrbio de pele mais comum em crianças menores de 12 anos e o segundo da população adulta, com a incidência e a prevalência variando em função do clima e do contato com os reservatórios naturais (NEVES et al., 2011). Segundo Rezende e colaboradores (2008), entre 10 a 15% da população humana poderá ser infectada

por esses fungos no decorrer da vida, representando cerca de 30% de todas as infecções micóticas registradas.

Levando em conta a elevada frequência das dermatofitoses, destaca-se o papel disseminador desempenhado pelos pequenos mamíferos domésticos, sobretudo cães e gatos. Estes podem atuar como potenciais reservatórios de fungos patogênicos para o homem (PINHEIRO; MOREIRA; SIDRIM, 1997; AQUINO; CONSTANTE; BAKOS, 2008).

Em animais, essas infecções causam desvalorização da pele, atraso no crescimento e milhões de dólares gastos em tratamentos (ZRIMSEK et al., 2003). De acordo com o estudo de Coelho, Alegria e Rodrigues (2008), a principal espécie causadora de dermatofitose em animais domésticos foi o *M. canis*, responsável por 95% das dermatofitoses em gatos e 65%, em cães. *T. mentagrophytes* e *M. gypseum* também podem ser causadores de dermatofitoses animais e são os dois mais comuns de serem encontrados causando infecções em coelhos (COELHO; ALEGRIA; RODRIGUES, 2008).

Desta forma, as dermatofitoses também podem ser descritas como zoonoses, pois um grande percentual das infecções humanas tem origem no contato com animais infectados. De um modo geral, a infecção ocorre tanto pelo contato direto entre animais, animal e homem ou entre homens (AVANTE et al., 2009).

De acordo com Araújo e colaboradores (2010), as espécies reportadas como predominantes no Brasil e com distribuição em todo mundo são *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. verrucosum*, *T. tonsurans*, *M. canis* e *M. gypseum*. De modo geral, dentre esses, *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* são os mais frequentemente isolados em dermatofitoses humanas e *M. canis*, *M. gypseum* e *T. mentagrophytes* em animais (COELHO et al., 2008; SIQUEIRA et al., 2008; ARAÚJO et al., 2010;

MENDONZA et al., 2010; FRIAS; KOZUSNY-ANDREANI; 2010; MADRID et al., 2012).

### **2.3.1 Interação entre o fungo dermatófito e o hospedeiro**

Os fungos dermatófitos não fazem parte da microbiota autóctone da pele, de modo que, quando ocorre o contato com o hospedeiro, há o estímulo de sua resposta imunológica humoral e celular. Os antígenos mais importantes que desencadeiam a resposta imune são as glicoproteínas, a quitina e as beta-glucanas, presentes na parede celular do fungo. Em resposta, ocorre um aumento da regeneração celular da epiderme, com remoção do fungo da pele (BLANCO; GARCIA, 2008; FUKUDA et al., 2009).

Para conseguir se instalar na epiderme então, o dermatófito deve aderir à superfície do tecido, o artroconídio deve germinar e a hifa, penetrar no estrato córneo. Isso evita que o fungo seja eliminado com a descamação do epitélio. No entanto, a pele pode ser considerada como um ambiente inóspito para o crescimento de micro-organismos patogênicos, devido a sua estrutura física e química, por ser frequentemente exposta à luz solar, às variações de temperatura, falta de umidade e pela presença da microbiota (PERES et al., 2010). Deste modo, em algumas situações, os fungos podem ser eliminados por via mecânica, ou simplesmente não conseguem estabelecer invasão, por incapacidade de competir com a microbiota residente do hospedeiro (MOREIRA, 2009).

Além disso, a pele apresenta a queratinização como um mecanismo importante na defesa do organismo contra agentes infecciosos que acometem sua superfície. Através dela, há a renovação do estrato córneo, realizado pelos queratinócitos, que

levam à descamação epitelial e conseqüentemente, à possível remoção do fungo (WAGNER; SOHNLE, 1995).

Segundo Péres e colaboradores (2010), o estabelecimento de uma infecção e a colonização do tecido só ocorre quando o fungo consegue superar todos os mecanismos de defesa inatos do hospedeiro, que consistem na primeira linha de proteção do organismo contra infecções.

Os dermatófitos, geralmente, não são invasivos às estruturas sub-epidérmicas. Produzem respostas inflamatórias definidas e reações imunes mediadas por células em indivíduos sadios. A imunidade celular, mediada pelas células T, desempenha um papel particularmente importante, uma vez que as citocinas liberadas por tais células ativam os macrófagos que atuam na destruição dos fungos. Desta forma, pacientes com deficiências na resposta imune celular são mais suscetíveis às infecções fúngicas (MACHADO et al., 2004; HAMAD, 2012).

De acordo com Péres e colaboradores (2010), nos estágios iniciais da infecção, em resposta ao pH ácido da pele, o patógeno inicia a síntese de queratinases e proteases não específicas. Estas enzimas atuam com atividade ótima em pH ácido e agem em substratos queratinosos ou não. O metabolismo desses substratos gera peptídeos que são hidrolisados a aminoácidos, utilizados pelo fungo como fontes de carbono, nitrogênio e enxofre. O metabolismo de alguns aminoácidos promove a alcalinização do microambiente hospedeiro, adequando-o para a ação de outras queratinases, cuja atividade ótima ocorre em pH alcalino. Desse modo, possibilita-se a manutenção da dermatofitose.

### 2.3.2 Aspectos clínicos das principais dermatofitoses

As dermatofitoses incluem diferentes formas clínicas, de acordo com a colonização dos tecidos pelos fungos dermatófitos e da resposta inflamatória do hospedeiro. A severidade da doença depende do estado imunológico do indivíduo acometido, bem como da patogenicidade da linhagem infectante (VIEGAS, 2010).

Embora apresentem baixa mortalidade, as dermatofitoses têm elevada morbidade e podem permanecer no hospedeiro durante longos períodos sem produzir manifestações clínicas. Deste modo, a infecção não põe em risco direto a vida do hospedeiro, mas provoca um aspecto externo anti-estético, com lesões cutâneas que podem evoluir para micoses mais graves e/ou provocar cicatrizes. Este tipo de problema tem repercussões negativas na vida pessoal e social do indivíduo (INSTITUTE FOR INTERNATIONAL COOPERATION IN ANIMAL BIOLOGICS, 2005; MOREIRA, 2009).

De acordo com Outerbridge (2006), as dermatofitoses têm apresentação clínica muito variada. Contudo, a manifestação clássica descrita na literatura é caracterizada por lesões circulares discretas, com áreas de alopecia irregular ou difusa, de expansão centrífuga, com bordos eritematosos e vesiculares, que circunscrevem uma parte central descamativa (Figura 6). Possuem intensa descamação, associada ou não à resposta inflamatória, resultante da atividade queratinolítica.

O aspecto da lesão em um hospedeiro animal e em um humano podem ser visualizado também na figura 6 (MENDONZA et al., 2010).

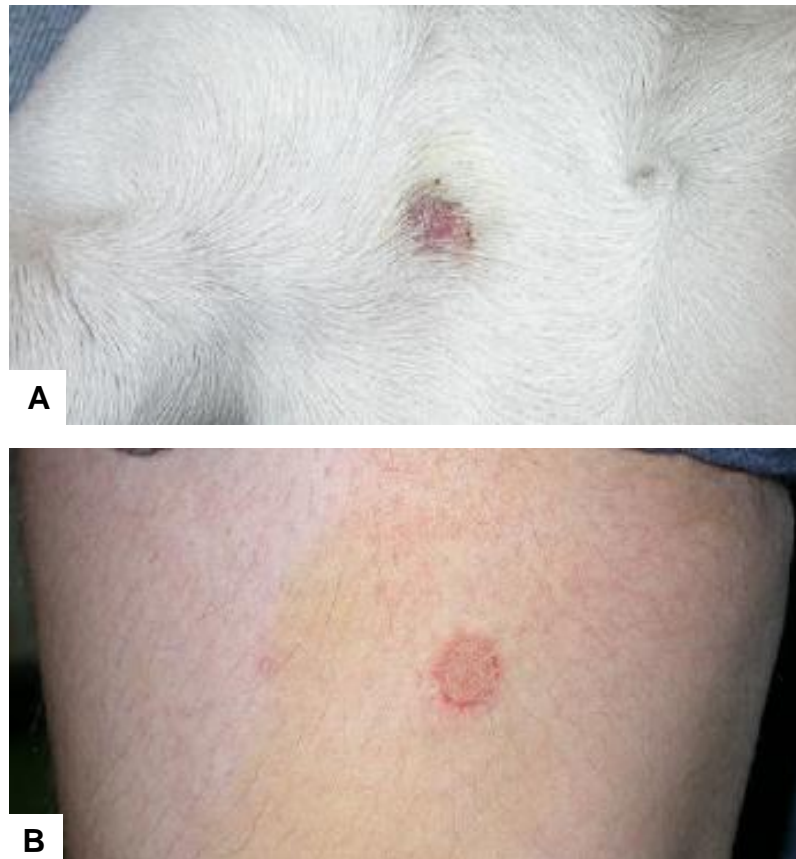


Figura 6 – Aspecto da lesão causada por *M. canis*.  
(A) Lesão anular no peito de um cão; (B) lesão anular na perna de uma mulher.  
Fonte: Mendonza e colaboradores (2010).

As dermatofitoses humanas que atingem o couro cabeludo e cabelos, comumente denominadas *Tinea capitis*, têm como sinais mais comuns a perda de cabelo, descamação, eritema e impetigo. Adultos podem ser afetados, mas este tipo de dermatofitose é mais comum de ocorrer em crianças (PATEL; SCHWARTZ, 2011).

*Tinea pedis* é um termo usado para designar várias infecções clinicamente diferentes da pele do pé. Fungos dermatófitos infectam, invadem e instalam-se no estrato córneo, aumentando a proliferação da pele que resulta no espessamento da epiderme. Além disso, pode ocorrer infecção dos espaços interdigitais e na

superfície plantar, caracterizada por lesões inflamatórias e não-inflamatória (SOARES; CURY, 2001; PURIM et al., 2006).

As principais formas clínicas da *Tinea pedis* são: intertriginosas, hiperqueratose plantar e infecções vesículo-bolhosas. Pelo fato de a infecção se assemelhar a diversas outras doenças cutâneas e tender a se tornar crônica, é importante fazer o diagnóstico o mais cedo possível. O processo fúngico, quando não tratado adequadamente, pode causar desconforto, dor e até inflamações nos membros inferiores (SOARES; CURY, 2001; PURIM et al., 2006; REZENDE et al., 2008).

Outro importante alvo dos dermatófitos, de acordo com Kazemi (2007), são as unhas das mãos e dos pés que podem ser infectados por diferentes espécies causando as onicomicoses. O diagnóstico clínico, de acordo com Araújo e colaboradores (2003), baseia-se na alteração observada na unha e pode ser classificada em: onicomicose subungueal distal e lateral; onicomicose superficial branca; infecção subungueal proximal; e onicomicose distrófica total, caracterizada pela total destruição da lâmina ungueal.

No caso da *Tinea faciei*, o surgimento de rosáceas no rosto que pioram após exposição solar podem confundir o diagnóstico dessa dermatofitose com o de lúpus eritematoso sistêmico (GIMÉNEZ, 1999).

Em animais, as lesões são comuns de ocorrerem na face, orelhas, patas e cauda, podendo evoluir para cura espontânea ou para lesão generalizada crônica que afeta todo o corpo do animal. Em geral, não há prurido, mas quando presente pode ser agravado pela presença de ectoparasitas ou alergias (MACIEL; VIANA, 2005).

### 2.3.3 Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico das dermatofitoses pode ser sugerido pelas manifestações clínicas, porém o agente patogênico só pode ser descoberto por meio de análises laboratoriais. Assim, condições para se isolar e identificar diferentes espécies de fungos dermatófitos são fundamentais (VIEGAS, 2010).

A coleta adequada de material biológico é uma etapa essencial e dela depende a possibilidade de se fazer o diagnóstico correto. A amostra deve ser coletada em quantidade suficiente para que possíveis fragmentos de fungos queratinizados e presos aos tecidos possam se multiplicar em meios de cultura (SANTOS; COELHO; NAPPI, 2002).

Fungos dermatófitos de diferentes espécies podem ser identificadas por meio de características morfológicas micro e macroscópicas de suas colônias. Os critérios macromorfológicos utilizados incluem: taxa de crescimento, textura, topografia, cor, produção de pigmento e alguns elementos da reprodução (GOMES, 2004; COELHO et al., 2008).

No entanto, como a observação de culturas só pode ser realizada com êxito, em geral, cerca de 7 a 28 dias após a incubação, torna-se útil o exame microscópico direto de amostras de pele, cabelo ou unha infectados, usando solução de 10% a 20% de hidróxido de potássio (KOH). Outro corante empregado para a identificação de fungos é o lactofenol azul de algodão. Ambos permitem a visualização de elementos - hifas hialinas (com KOH) ou estruturas reprodutivas e esporos (com lactofenol azul de algodão) – cujas peculiaridades morfológicas, constituem o ponto de partida para o processo de identificação do patógeno (SANTOS; COELHO; NAPPI, 2002; MOREIRA, 2009).



No entanto, outros ensaios complementares podem ser necessários para auxiliar a confirmação do diagnóstico, como provas bioquímicas (MURRAY; ROSENTAHL; PFALLER, 2006).

Contudo, em alguns casos, a análise de características morfológicas e das culturas são ineficientes para a caracterização das espécies, devido à alta similaridade entre algumas espécies de fungos dermatófitos. Deste modo, o uso de técnicas moleculares, através da análise de DNA, possui a vantagem de ser um processo rápido e altamente sensível. Essas técnicas não estão sujeitas a variações fenotípicas, à ação do ambiente, ao estágio de desenvolvimento do fungo e a outros fatores que possam alterar a morfologia do organismo (MENEZES et al., 2009).

#### **2.3.4 Tratamento farmacológico das dermatofitoses**

Existem poucas alternativas de fármacos disponíveis para o tratamento das infecções causadas por fungos, se comparados à extensa lista daqueles com atividade antibacteriana. As infecções por fungos representam o parasitismo de um organismo eucariótico sobre outro (homem ou animal) com inúmeras semelhanças fisiológicas, aspecto este que não está presente na infecção por bactérias. Por isso, fármacos antifúngicos devem ter aplicação clínica cuidadosa, de modo a evitar as reações adversas inerentes aos mesmos (NOBRE et al., 2002).

O tratamento adequado deve ser estabelecido com base no sítio e na extensão da infecção, além de considerar a espécie causadora da mesma. Do mesmo modo, aspectos do medicamento devem ser considerados, tal como: eficácia, segurança, biodisponibilidade e forma farmacêutica. Para o tratamento das dermatofitoses, uma via bastante utilizada para administração de antifúngicos é a tópica, por meio de pomadas, cremes ou soluções (PEREIRA, 2009).

De acordo com Nobre e colaboradores (2002), o mecanismo pelo qual um antifúngico atua, determina sua classificação em fungistática ou fungicida, direta ou indiretamente. Das classes de agentes antifúngicos disponíveis para uso em humanos, as mais utilizadas são os imidazóis e derivados, alilaminas, morfollnas e outros, tal como a griseofulvina (Quadro 2) (VALDÉS, 2005).

Quadro 2 – Classes farmacológicas dos principais agentes antifúngicos utilizados no tratamento das micoses em humanos.

<b>Classe farmacológica</b>	<b>Fármacos</b>
Polienos	Nistatina, natamicina, anfotericina B
Imidazóis e derivados	Imidazol, miconazol, clotrimazol Fluconazol, itraconazol, cetoconazol Voriconazol, ravuconazol, posaconazol
Alilaminas	Terbinafina, naftifina
Lipopeptídeos	Papulacandinas, triterpenos glicosilados
Equinocandinas	Caspofungina, anidulofungina, micafungina
Pirimidinas fluoradas	Fluocitosina
Outros	Iodeto de potássio, ciclopirox, tolnaftato, griseofulvina

Fonte: Valdés (2005).

Os agentes antifúngicos griseofulvina, itraconazol, fluconazol e terbinafina podem ser empregados por via oral, desempenhando uma ação sistêmica contra fungos dermatófitos. Destes, os azóis e a terbinafina são aqueles que apresentam resultados mais rápidos e eficazes (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2006).

As infecções dermatofíticas que não afetam pelos ou unhas, podem ser tratadas com êxito por meio de agentes tópicos, como os azóis (miconazol, clotrimazol, econazol, tioconazol e itraconazol), a terbinafina e a haloprogrina. Formas farmacêuticas combinadas de ácido benzóico e ácido salicílico (pomada de *Whitfield*) podem ser úteis como antimicóticos de uso tópico, porém, os resultados surgem mais lentamente se comparados aos agentes antifúngicos azólicos e alilaminas (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2006).

Para o tratamento de dermatofitoses em animais, o número de fármacos apropriados é ainda mais restrito (Quadro 3). Os medicamentos antifúngicos recomendados, neste caso, assim como para humanos, são os derivados imidazólicos, a terbinafina e a griseofulvina (NOBRE et al., 2002).

Quadro 3 – Classe farmacológica dos principais antifúngicos empregados no tratamento de dermatofitoses animais.

<b>Imidazóis e derivados</b>		
Cetoconazol	Enilconazol	Miconazol
Clotrimazol	Fluconazol	Itraconazol
Econazol		
<b>Alilaminas</b>		
Terbinafina		
<b>Outros</b>		
Solução de iodo 1%	N-triclorometil-mercapto-4-ciclo-hexeno-1,2-dicarboxamina	Griseofulvina

Fonte: Nobre e colaboradores (2002).

Contudo, o uso desses medicamentos apresenta, frequentemente, efeitos adversos, como: distúrbios gastrintestinais, reações cutâneas, hepatotoxicidade e

leucopenia, que podem prejudicar a adesão ao tratamento. Alguns antifúngicos, como os derivados imidazólicos, são responsáveis, ainda, por inúmeras interações medicamentosas, devido à inibição das enzimas hepáticas da família citocromo P450 (CYP450) (principalmente CYP2C9, CYP2C19 e CYP3A4) (DEL PALÁCIO; GARAU; CUÉTARA, 2002; SOUZA et al., 2002).

#### 2.3.4.1 Mecanismo de ação dos principais agentes antifúngicos utilizados no tratamento das dermatofitoses

Os dois principais grupos farmacológicos utilizados no tratamento das dermatofitoses são os azóis e as alilaminas. Polienos (anfotericina B e nistatina) não são eficazes no tratamento de infecções por dermatófitos (WEINSTEIN; BERMAN, 2002).

A classe azol é dividida, conforme a estrutura química do agente antifúngico, em imidázóis (duas moléculas de nitrogênio no anel azol) e triazóis (três moléculas de nitrogênio no anel azol). O cetoconazol (Figura 7) é o único imidazol com ação sistêmica, diferente dos fármacos pertencentes à subclasse dos triazóis, em que todos apresentam esse tipo de ação (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2006).

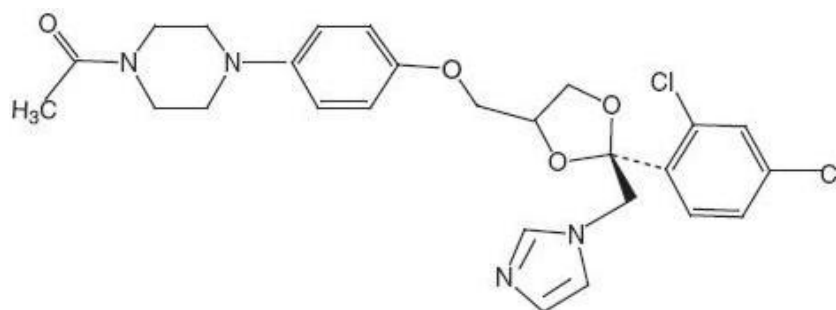


Figura 7 – Estrutura química do cetoconazol.

Com relação ao mecanismo de ação deste grupo, imidazóis e triazóis atuam por inibição da enzima lanosterol-14- $\alpha$ -demetilase, um sistema enzimático microsomal dependente do CYP450 fúngico. Desta forma, a conversão de lanosterol em ergosterol fica comprometida e ocorre o acúmulo de 14- $\alpha$ -metilestéreis, que desagrega o arranjo compacto das cadeias acíclicas dos fosfolípides (BENNET, 2003). Assim, a membrana celular do fungo passa a apresentar propriedades alteradas que comprometem as funções de determinados sistemas enzimáticos ligados à membrana, como a ATPase e as enzimas do sistema de transporte de elétrons. Sem condições de desempenhar as funções básicas necessárias para o desenvolvimento do fungo, o seu crescimento fica impedido/dificultado (BENNET, 2003). Diferentes medicamentos da classe dos azóis podem atuar inibindo o crescimento da célula fúngica (fungistático) ou causando a morte celular (fungicida) (BENNET, 2003; MA et al., 2003; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2006).

A griseofulvina (Figura 8), um antifúngico de importância veterinária, atua por inibição do crescimento (fungistático) dos dermatófitos de todos os gêneros, constituindo um tratamento de escolha das dermatofitoses, especialmente nos quadros crônicos. O crescimento fúngico é inibido por interação do fármaco com os microtúbulos, resultando em inibição da formação do fuso mitótico (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2006).

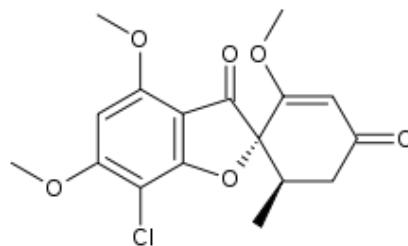


Figura 8 – Estrutura química da griseofulvina.

A terbinafina (Figura 9), fármaco da classe das alilaminas, apresenta natureza lipofílica e queratofílica, o que leva ao seu acúmulo no tecido adiposo e queratinoso. Desta forma, este fármaco altera especificamente uma etapa inicial da biossíntese dos esteróis fúngicos. Por meio da inibição seletiva da esqualeno-epoxidase, na membrana da célula fúngica, a terbinafina promove deficiência de ergosterol e acúmulo intracelular de esqualeno, resultando em morte celular. A enzima esqualeno-epoxidase não está vinculada ao sistema do CYP450, de modo que a terbinafina pode ser considerada um fármaco seletivo para a célula fúngica. Isso se deve à diferença entre as enzimas epoxidases dos mamíferos e dos fungos (DEL PA LÁCIO; GARAU; CUÉTARA, 2002; BENNET, 2003; CATALÁN; MONTEJO, 2006; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2006; MEINERZ, 2007; DIOGO et al., 2010).

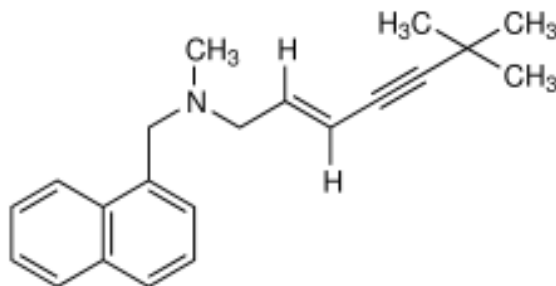


Figura 9 – Estrutura química da terbinafina.

### 2.3.5 Resistência aos agentes antifúngicos

Alguns problemas são considerados como limitantes no tratamento das dermatofitoses, sendo os mais importantes a resistência adquirida por algumas linhagens de fungos, a necessidade de utilizar o medicamento por longos períodos e o elevado custo dos mesmos (SOUZA et al., 2002; ESPINNEL-INGROFF, 2009).

Somam-se a essas dificuldades, os diversos modos de transmissão das dermatofitoses e a realidade dos serviços públicos de saúde, onde as opções de tratamento são limitadas. Tais situações complicam a capacidade do médico em tratar as micoses cutâneas de forma adequada (PATEL; SCHWARTZ, 2011).

Nas duas últimas décadas, o consumo de antifúngicos aumentou no mundo inteiro. Dados globais indicam que a utilização destes agentes cresce, em média, 12% por ano e o gasto com esses medicamentos já supera 3.600 milhões de euros por ano. Além do custo elevado, o amplo uso de antifúngicos aumenta o risco de surgimento de resistência fúngica e, diante desta situação, ressalta-se a necessidade de se conhecer o perfil de suscetibilidade das espécies patogênicas, antes de se estabelecer o melhor tratamento (MÉNDEZ-TOVAR et al., 2007; CUENCA-ESTRELLA et al., 2008).

Novas opções terapêuticas têm sido introduzidas com finalidade antifúngica e são baseadas na modificação estrutural ou química de medicamentos antifúngicos já existentes ou criação de novas classes químicas. A exploração do potencial de produtos naturais também se mostra útil como alternativa de novos antimicrobianos (NWEZE; OGBONA; OKAFOR, 2007).

Frias e Kozusny-Andreani (2010) explicam que, no Brasil, tratamentos à base de plantas medicinais têm ganhado força e muito tem se empenhado na utilização da fitoterapia e de outras terapias alternativas para o controle de diferentes agentes patogênicos.

A utilização de extratos brutos e óleos naturais é um modo de mimetizar a natureza no controle de micro-organismos e, por vezes, menos agressivo ao hospedeiro. Não obstante, o uso de metabólitos secundários produzidos pelas

plantas já é empregado com êxito contra insetos, pragas e algumas doenças (FRIAS; KOZUSNY-ANDREANI, 2010).

## 2.4 A IMPORTÂNCIA DAS PLANTAS MEDICINAIS

Uma das mais antigas formas de prática medicinal utilizadas pelo homem baseia-se no emprego de plantas medicinais para tratamento, cura e prevenção de doenças. Atualmente, o uso de plantas medicinais adquiriu uma posição respeitável em todo o mundo, especialmente nos países em desenvolvimento. Tanto em regiões mais pobres quanto em grandes centros urbanos, é comum a utilização e o comércio de plantas medicinais e seus derivados em feiras livres, mercados populares e o plantio em áreas residenciais (AGRA et al., 2008; USTULIN, 2009).

De acordo com Costa e colaboradores (2008), as plantas medicinais são consideradas, popularmente, como fontes de substâncias ativas e de baixa toxicidade. Desta forma, são vistas como uma alternativa viável, de baixo custo e de fácil acesso, sobretudo para populações com acesso limitado aos serviços de saúde que têm o uso das plantas como única forma de cuidado básico à saúde (VEIGA JR; PINTO; MACIEL, 2005).

Assim, a etnobotânica e a etnofarmacologia contribuem de forma relevante para a sugestão de efeitos medicinais que embasam estudos farmacológicos e químicos. A cura de doenças por meio de substâncias biologicamente ativas deve-se muito à observação do uso popular de diversas plantas (ALBUQUERQUE; HANAZAKI, 2006).

Na medicina tradicional, muitos óleos obtidos de espécies vegetais são empregados contra fungos patogênicos e, por isso, têm despertado interesse de



pesquisadores e da indústria farmacêutica. Por essa razão, pesquisas que comprovem tal atividade, de acordo com protocolos científicos modernos e adequados, tornam-se cada vez mais necessárias (FONTENELLE, 2008).

Corroborando o uso tradicional, estudos demonstraram que 60% dos óleos essenciais apresentam atividade antifúngica e 35% exibem propriedades antibacterianas (SANTOS, 2008). Com base neste potencial, a atividade antimicrobiana de óleos naturais (essenciais e resinosos) frente a fungos dermatófitos e leveduras têm sido explorada. Além de ação antimicrobiana, esses óleos também demonstram uma variedade de ações farmacológicas, devido a sua complexa composição, tornando-os potenciais fontes para o desenvolvimento de novos fármacos (FONTENELLE, 2008; MATASYOH; MAYO; NGURE, 2008).

De acordo com Agra e colaboradores (2008), independente se usadas em seu estado *in natura* ou se usadas como fonte de pesquisa para novos fármacos, as plantas medicinais possuem grande relevância na saúde e na economia de um país. Contudo, seu uso deve ser racional, pautado na sustentabilidade e conservação da biodiversidade. Várias espécies da flora brasileira, entre elas a copaíba, são investigadas, a fim de explorar seu potencial para a formulação de medicamentos e cosméticos (VEIGA JR. et al., 2007; STUPP et al., 2008).

#### 2.4.1 **Copaíba: características e ocorrência do gênero**

A copaíba pertence à família Leguminosae, subfamília Caesalpinoideae, e gênero *Copaifera* que possui mais de 16 espécies identificadas em território brasileiro (OLIVEIRA et al., 2010).

Seu nome de origem do tupi “cupa-yba” que quer dizer a árvore de depósito, uma alusão ao óleo abundante que guarda em seu interior. Popularmente, a copaíba

é conhecida como copaibeira ou pau d'óleo e suas espécies são amplamente distribuídas nas regiões Amazônica e Centro-Oeste e, menos significativamente, na região Sudeste do Brasil (BIAVATTI et al., 2005).

Trata-se de uma árvore de grande porte que pode alcançar cerca de 40 metros de altura, entre 0,4 e 4 metros de diâmetro e viver aproximadamente 400 anos. Possui folhagem densa, casca com aroma peculiar, flores pequenas e frutos do tipo vagem. Suas sementes são negras e ovóides apresentando uma pequena região amarela com elevado teor de lípidos (ARAÚJO JR. et al., 2006; PIERI; MUSSI; MOREIRA, 2009) (Figura 10).



Figura 10 – Árvores da espécie *Copaifera langsdorffii*.  
Fonte: Pieri; Mussi; Moreira (2009).

Os trabalhos realizados com gênero *Copaifera* spp estão relacionados, em grande parte, com o óleo que é exudado de seu tronco. Desde o descobrimento do

Brasil, o óleo de copaíba vem sendo indicado para diversas finalidades, inclusive farmacológicas (ALHO et al., 2012).

No entanto, mesmo com inúmeros estudos realizados sobre este gênero (SOUZA et al., 2011a; SOUZA et al., 2011b; PIERI et al., 2012a; PIERI et al., 2012b), ainda acontecem equívocos relacionados à identificação botânica e composição química dos óleos de copaíba que são, frequentemente, misturados a outros óleos e adulterados (VEIGA JR.; PINTO, 2002). Deste modo, é sempre necessária a análise do mesmo para garantir sua originalidade que, de acordo com alguns autores, pode ser comprovada pela presença de ácido copálico (VEIGA JR. PATITUCCI; PINTO, 1997; VEIGA JR.; PINTO, 2002; RIGAMONTE-AZEVEDO et al., 2004; PIERI; MUSSI; MOREIRA, 2009).

A *Copaifera langsdorffii* Desf., popularmente conhecida como copaíba vermelha e foco deste trabalho, é uma espécie particularmente importante no Brasil, devido ao alto valor econômico agregado à sua madeira e ao óleo extraído de seu tronco. No país, esta espécie é encontrada entre os estados do Amazonas e Santa Catarina. Entretanto, a maioria dos *habitats* da espécie no Brasil foram destruídas (Mata Atlântica), restando apenas entre 11,4% a 16% da área original. Desse modo, *C. langsdorffii* é encontrada apenas em pequenos fragmentos florestais isolados no território brasileiro (SEBBENN et al., 2011).

#### 2.4.1.1 Características do óleo de copaíba

O óleo de copaíba é oriundo de árvores de diversas espécies do gênero *Copaifera* spp, sendo os principais o óleo resina e o óleo essencial. Em geral, esses óleos apresentam-se como um líquido transparente, de coloração entre o amarelo e

o marrom, de viscosidade variável e de ampla aplicação na indústria de tintas e cosméticos (ARAÚJO JR. et al., 2005; BIAVATTI et al., 2005).

O óleo resina da copaíba pode ser encontrado em pequenas bolsas distribuídas nas folhas e no xilema primário. Constitui-se de uma parte sólida (cerca de 60% da massa total) formada por ácidos diterpênicos diluídos em óleo essencial, basicamente composto por sesquiterpenos (CASCON; GILBERT, 2000).

De acordo com Deus, Alves e Arruda (2011), o óleo essencial pode ser obtido a partir da destilação do óleo resina. Além disso, das folhas da copaíba pode ser obtido um óleo com composição semelhante à parte volátil sesquiterpênica do óleo resina. Apesar de distintos, os três tipos apresentam substâncias em comum, como o  $\beta$ -cariofileno e  $\gamma$ -cadineno (PIERI; MUSSI; MOREIRA, 2009).

Veiga, Patitucci e Pinto (1997) sugeriram que o ácido copálico (Figura 11) pode ser utilizado como marcador químico para o gênero *Copaifera* spp, uma vez que, dentre as amostras de óleo de copaíba analisadas por cromatografia gasosa de alta resolução acoplada à espectrometria de massas (CG-AR-EM) por estes autores, esse diterpeno foi o único composto detectado em todas elas. No entanto, não foi estabelecida uma concentração mínima deste composto para garantir a originalidade do óleo, sendo suficiente apenas a constatação de sua presença.

Mendonça e Onofre (2009) descreveram um perfil da constituição do óleo de copaíba como  $\alpha$ -cubeno (2,9 a 3,2%);  $\alpha$ -copaeno (7,9 a 18,7%);  $\beta$ -cariofileno (46,1 a 47,0%);  $\alpha$ -humuleno (5,4 a 5,6%);  $\beta$ -bisaboleno (5,9 a 6,1%); cadineno (6,0-6,2%); entre outros compostos (13,5%).

Dos constituintes mencionados, o ácido caurenóico e o  $\beta$ -cariofileno possuem atividade anti-inflamatória e antimicrobiana, sendo ao  $\beta$ -cariofileno conferida

atividade de inibição do crescimento de espécies fúngicas (VEIGA JR.; PINTO, 2002; VIEIRA; TAKAHASHI; BOAVENTURA, 2002; PAIVA et al., 2004).

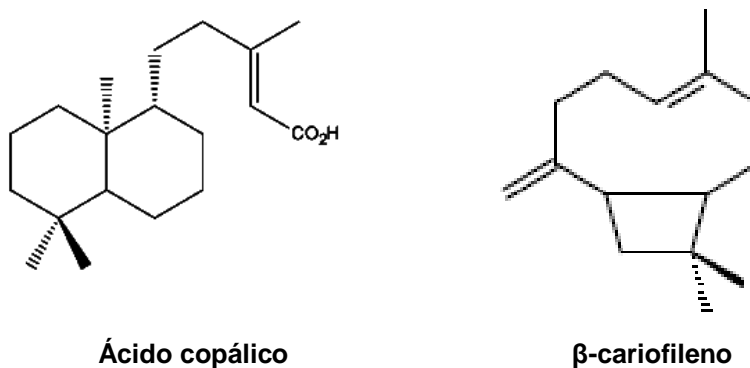


Figura 11 – Estrutura química do ácido copálico e do β-cariofileno.

Contudo, cabe ressaltar que o óleo resina de copaíba é uma mistura complexa de diversos constituintes. Sua composição depende da espécie do qual foi extraído e também de fatores como se a árvore já foi submetida a extrações de óleo anteriores, época do ano, clima e solo (VEIGA JR.; PINTO, 2002; CASTRO et al., 2010; DEUS; ALVES; ARRUDA, 2011).

#### 2.4.1.2 Usos farmacológicos do óleo de copaíba

De acordo com Agra e colaboradores (2008), as indicações etnofarmacológicas usuais do óleo de copaíba são para tratar males do sistema geniturinário, das vias respiratórias, para as infecções da derme e mucosa, além de apresentar outras finalidades, como: afrodisíaco, anti-tetânico, antirreumático, anti-herpético, anti-tumoral, no tratamento de leishmaniose e da leucorréia, contra paralisia, dores de cabeça e picadas de cobra (MACIEL et al., 2002; BRITO et al., 2005).

Cientificamente, os óleos de diferentes espécies de copaíba tiveram confirmados os efeitos na inibição de crescimento de alguns fungos, leveduras

(MENEZES et al., 2009; DEUS; ALVES; ARRUDA, 2011) e bactérias (MENDONÇA; ONOFRE, 2009; PIERI et al., 2010a), como anti-inflamatório, cicatrizante, anti-edematogênico, antitumoral, tripanossomicida (MENDONÇA; ONOFRE, 2009), aumentam a neoangiogênese (ESTEVÃO et al., 2009), melhoram a permeabilidade cutânea para agentes despigmentantes (OLIVEIRA et al., 2010) e preventivos de doença periodontal (PIERI et al., 2010b). Especificamente ao  $\beta$ -bisaboleno, um constituinte mais comumente encontrado nos óleos de copaíba com coloração avermelhada, foi atribuída ação abortiva (MACIEL et al., 2002; NETO, GRAMOSA, SILVEIRA; 2008).

Ao  $\beta$ -cariofileno foram atribuídas ação indutora de apoptose em células tumorais (AMIEL et al., 2012), antimicrobiana e antifúngica (GOREN et al., 2011), anti-inflamatória, inseticida (LEANDRO et al., 2012), entre outras.

No Brasil, os óleos de copaíba são amplamente utilizados na medicina popular. São administrados por via oral, por aplicação tópica do óleo *in natura* ou associados em pomadas e cremes. Suas propriedades anti-inflamatórias são conhecidas desde o início da colonização do Brasil e seu uso já era feito por tribos indígenas (ALFONSO-GOLDFARB; FERRAZ; BELTRAN, 2010).

#### 2.4.2 Benefícios de formulações associadas à óleos naturais

Várias espécies da flora brasileira, tal como a copaíba, apresentam potencial utilidade na formulação de produtos cosméticos e medicamentos (VEIGA JUNIOR et al., 2007; STUPP et al., 2008). O óleo de copaíba, devido aos seus compostos (sesquiterpenos, sesquiterpenos oxigenados e diterpenos de hidrocarbonetos e diterpenos oxigenados) (PINTO et al., 2000), trata-se de uma boa escolha como um

promotor de permeabilidade para outros compostos (EL-KATTAN et al., 2001;. NARISHETTY; PANCHAGNULA, 2004).

A adição de compostos com uma maior capacidade de penetração na pele, também conhecidos como promotores de absorção ou "potenciadores", pode resultar num aumento da difusão de substâncias desorganizando as lamelas do estrato córneo (WILLIAMS; BARRY, 2004). Assim, a incorporação destas substâncias em formulações permite o desenvolvimento de produtos tópicos com uma menor concentração de ingredientes ativos, principalmente de caráter hidrófilo, aumentando assim a eficácia e a segurança do produto (YOURIK; BRONAUGH, 1999).

Além disso, ao se utilizar um óleo essencial ou resinoso como parte de uma formulação farmacêutica, este pode desempenhar um papel importante como adjuvante da atividade farmacológica. No caso do óleo de copaíba, a associação poderia potencializar ou explorar sua atividade anti-inflamatória, antifúngica, antibacteriana, entre outros (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 GERAL

Investigar o potencial antifúngico *in vitro* do óleo resina de *Copaifera langsdorffii* frente às linhagens dos principais fungos dermatófitos.

#### 3.2 ESPECÍFICOS

Caracterizar o óleo resina de copaíba por cromatografia gasosa de alta resolução (CG-AR).

Realizar o teste preliminar *in vitro* de atividade antifúngica do óleo resina de copaíba.

Estabelecer a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração fungicida mínima (CFM) *in vitro* para o óleo resina de copaíba

Documentar, ao microscópio eletrônico de varredura, as alterações nas estruturas morfológicas causadas pelo óleo resina de interesse e os fármacos de referência nas linhagens dos fungos dermatófitos envolvidas no estudo



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 ÓLEO RESINA DE COPAÍBA

No presente estudo, utilizou-se o óleo resina de *C. langsdorffii* Desf. adquirido da empresa Lazlo Aromatologia LTDA e extraído pelo método com trado, conforme informações do fabricante.

### 4.2 CROMATOGRAFIA GASOSA DE ALTA RESOLUÇÃO (CG-AR)

O óleo resina de copaíba foi analisado por CG-AR pelo Departamento de Química/Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) para fins de identificação qualitativa e quantitativa de seus componentes.

A análise foi feita em cromatógrafo a gás HP-5890 equipado com detector de ionização de chama (do inglês *Flame Ionization Detector* - FID) e módulo de injeção com razão de divisão (*split*) de 1:50. O volume de injeção foi de 1  $\mu\text{L}$  de amostra. Como gás de arraste foi utilizado o hidrogênio a uma vazão de 2  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . A programação da temperatura do forno foi de uma isoterma inicial de 1 minuto a 60°C, seguida da taxa de 3°C  $\text{min}^{-1}$  até atingir a temperatura de 250°C. A temperatura utilizada no injetor e no detector foi de 250°C. A coluna utilizada foi HP-BP1 de 30 m de comprimento por 0,25 mm de diâmetro interno. A identificação dos picos foi feita por cálculo de tempo de retenção, com padrões de hidrocarbonetos lineares de C<sub>10</sub> a C<sub>18</sub> e dados da literatura.

### 4.3 FUNGOS

Foram utilizadas linhagens padrão *American Type Culture Collection* (ATCC) e Coleção de Culturas Tropicais (CCT) das espécies de fungos dermatófitos: *Microsporum canis* ATCC 32903, *Microsporum gypseum* ATCC 14683, *Tricophyton mentagrophytes* ATCC 9533, *Tricophyton mentagrophytes* ATCC 11480 e *Tricophyton mentagrophytes* ATCC 11481 e *Tricophyton rubrum* CCT 5507.

Das três linhagens de *T. mentagrophytes*, *T. mentagrophytes* ATCC 9533 era oriunda de uma lesão em humano caracterizada como *tinea pedis*, *T. mentagrophytes* ATCC 11480 foi isolada de uma lesão em gato e *T. mentagrophytes* ATCC 11481, isolado de dermatofitose humana.

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

### 4.4 CARACTERIZAÇÃO MACROSCÓPICA DAS COLÔNIAS

Os fungos foram cultivados em placas de Petri contendo ágar *Sabourad* dextrose (SDA) acrescido de solução de cloranfenicol 0,05% e incubadas a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  por 7 a 10 dias. Após o período de incubação, foram observadas as características macromorfológicas de cada linhagem fúngica envolvida no estudo, levando-se em consideração no anverso da colônia sua coloração, textura e topografia e, no reverso, a presença de pigmento (SIDRIM; ROCHA, 2004).

#### 4.5 CARACTERIZAÇÃO MICROSCÓPICA DAS COLÔNIAS

A observação das estruturas microscópicas dos fungos dermatófitos foi feita conforme técnica descrita por Sidrim e Rocha (2004).

Para o microcultivo, utilizou-se placas de Petri contendo uma lâmina apoiada sobre um suporte, sobre a qual foram colocados blocos de ágar-batata (1 cm<sup>2</sup> de área e 4-5 mm de espessura). A seguir, procedeu-se o repique das colônias nas quatro extremidades do retângulo com posterior cobertura do bloco de ágar com uma lamínula. Um chumaço de algodão embebido em água destilada estéril foi mantido dentro da placa de Petri, a fim de preservar a umidade do meio.

Todo o procedimento foi realizado de forma asséptica e a placa permaneceu incubada à temperatura ambiente até aparecimento visual do crescimento fúngico sob a lamínula.

Após o período de crescimento fúngico, retirou-se a lamínula com o micélio e os esporos aderidos. Acrescentou-se uma gota do corante lactofenol azul de algodão sobre uma lâmina e sobre esta apoiou-se a lamínula e observou-se ao microscópio óptico (Eclipse - E200, Nikon, Japão) com o auxílio da objetiva que ampliou 40 vezes a imagem. Deste modo, visualizam-se as estruturas de reprodução (micro e macroconídios), bem como estruturas de ornamentação (hifas) (SIDRIM; ROCHA, 2004).

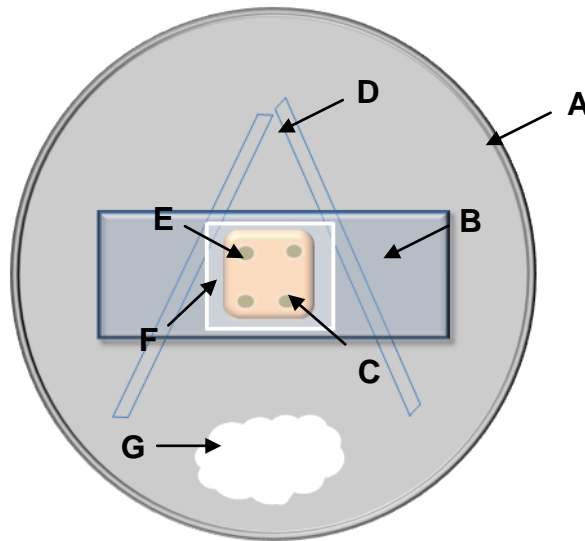


Figura 12 – Esquema de microcultivo em lâmina de vidro.

(A) Placa de Petri; (B) lâmina; (C) lâminula; (D) suporte; (E) bloco de ágar-batata Inóculo; (F) fragmento do fungo; (G) algodão umedecido.

#### 4.6 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO RESINA DE COPAÍBA

##### 4.6.1 Triagem da atividade antifúngica

O teste de triagem da atividade antifúngica do óleo resina de copaíba foi realizado de acordo com a técnica descrita por Souza e colaboradores (2002), com adaptações para este estudo.

O ensaio consistiu em inocular um fragmento de 2 mm da espécie fúngica de interesse em placas contendo caldo *Sabourad* dextrose (CSD), previamente incorporado com uma solução diluída do óleo resina de copaíba.

Neste estudo, o volume de óleo utilizado no preparo da solução estoque (SE) foi calculado com base no percentual do seu componente químico majoritário, ajustando-se a concentração do mesmo para 100% (Quadro 4).

A relação entre a concentração do óleo resina de copaíba e  $\beta$ -cariofileno foi calculada, sabendo-se que a densidade do óleo era igual a  $0,850 \text{ g.cm}^{-3}$ .

Quadro 4 – Equivalência entre a concentração de  $\beta$ -cariofileno com óleo resina de *Copaifera.langsdorffii* Desf.

Concentração de $\beta$ -cariofileno ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Concentração do óleo resina de copaíba ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Concentração de $\beta$ -cariofileno ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Concentração do óleo resina de copaíba ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )
1.000	5.440	62,50	340
500	2.720	31,25	170
250	1360	15,63	85
125	680	7,81	42,50

Assim, foi preparada uma SE com concentração equivalente a 4000  $\mu\text{g}$  de  $\beta$ -cariofileno. $\text{mL}^{-1}$  a partir de 25,6  $\mu\text{L}$  do referido óleo, 20  $\mu\text{L}$  de uma mistura de *Tween* 80 e dimetilsulfóxido (DMSO) PA (1:1, v/v) e solução salina estéril 0,9% em quantidade suficiente para volume final de 2.000  $\mu\text{L}$ .

Dessa SE, 500  $\mu\text{L}$  foram incorporados a 1.500  $\mu\text{L}$  de CSD em placa estéril de 24 poços, agitando-a até obter-se a completa homogeneização do óleo no meio. Assim, a concentração final do óleo resina de copaíba foi equivalente a 1.000  $\mu\text{g}$  de  $\beta$ -cariofileno. $\text{mL}^{-1}$ .

Em seguida, procedeu-se ao repique dos fragmentos (2 mm) dos fungos e a placa foi incubada em estufa à temperatura de 28°C por 7 dias. Ao fim deste período, observou-se visualmente a ocorrência de crescimento fúngico.

#### 4.6.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

O teste para se estabelecer a CIM do óleo resina de copaíba consistiu no preparo do meio de cultivo, suspensão fúngica, das diluições do óleo resina de

copaíba e dos agentes antifúngicos usados como controle positivo (cetoconazol e terbinafina) e da microplaca.

#### 4.6.2.1 Meio de cultivo

O meio de cultivo utilizado foi o RPMI-1640 (com glutamina, sem bicarbonato e com indicador de pH), considerado adequado para o cultivo de fungos filamentosos, segundo o *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)* (2008).

Ao meio RPMI-1640, adicionou-se um tampão, o ácido 3-[N-morfolino] propanosulfônico (MOPS) em uma concentração final de  $0,165 \text{ mol.L}^{-1}$ , capaz de manter o pH em  $7,0 \pm 0,1$ , sem antagonizar o crescimento fúngico. Após o preparo, o meio foi esterilizado por filtração em membrana de  $0,22 \mu\text{m}$  e armazenado a  $4^\circ\text{C}$ , até o momento do uso (CLSI, 2008).

#### 4.6.2.2 Padronização do inóculo

O inóculo foi preparado de acordo com a técnica descrita pelo CLSI (2008), com pequenas alterações baseadas na técnica adotada por Almeida e colaboradores (2009).

Utilizou-se um tubo inclinado contendo colônias de 7 dias em meio ASD do fungo a ser utilizado. As colônias fúngicas foram cobertas com 2 mL de solução salina estéril 0,9% e 20  $\mu\text{L}$  de Tween 80/DMSO PA (1:1, v/v) e a seguir, homogeneizadas delicadamente com o auxílio de uma alça de inoculação estéril.

As colônias foram lavadas por mais três vezes com 2 mL de solução salina estéril 0,9%. A mistura de hifas e conídios foi transferida para um tubo cônico estéril,

homogeneizada em vórtex (Genie 2, Scientific Industries, USA) por 1 minuto e deixada em repouso por 5 minutos para sedimentação de partículas maiores.

O sobrenadante foi transferido para outro tubo cônico e sua densidade foi ajustada, por meio da medida de transmitância ( $\lambda = 530 \text{ nm}$ ) da suspensão, em espectrofotômetro (UVmini-1240, Shimadzu) para 68 – 70%.

A suspensão foi então diluída em meio RPMI-1640 (1:50, v/v), de modo a se obter uma concentração final de  $10^4 \text{ UFC.mL}^{-1}$ .

Posteriormente, a partir da suspensão 1:50 v/v, preparou-se uma suspensão 1:100 v/v em RPMI-1640 e inoculou-se 10  $\mu\text{L}$  desta em ASD, homogeneizando até a completa solidificação do meio. A contagem do número de colônias foi realizada após 7 dias de incubação da placa em estufa a temperatura de  $28^\circ\text{C}$  (CLSI, 2008).

A suspensão 1:50 v/v foi mantida sob refrigeração ( $4^\circ\text{C}$ ) até o momento do uso.

#### 4.6.2.3 Diluição dos agentes antifúngicos

Para a determinação da CIM foi necessário preparar soluções do óleo resina de copaíba e dos dois fármacos de referência, utilizados como controle positivo: terbinafina e cetoconazol. As soluções destas substâncias foram preparadas conforme descrito pelo CLSI (2008).

Foram preparadas 8 diluições do óleo resina de copaíba em RPMI-1640, cujas concentrações variaram de 15,63 a  $2.000 \mu\text{g de } \beta\text{-cariofileno.mL}^{-1}$ .

Para o preparo de 1.500  $\mu\text{L}$  da SE do óleo resina de copaíba, utilizou-se 9,6  $\mu\text{L}$  do óleo, 10  $\mu\text{L}$  de *Tween* 80/DMSO PA (1:1, v/v) e quantidade suficiente de meio RPMI-1640 para um volume final de 1.500  $\mu\text{L}$ . A concentração final de *Tween* 80

respeitou o limite de 0,05% sugerido por Souza e colaboradores (2002), para não interferir no crescimento fúngico.

O preparo dos fármacos de referência, cetoconazol (Janssen-Cilag) e terbinafina (Galena e Química Farmacêutica) foi realizado conforme as orientações do CLSI (2008) que estabeleceu a diluição dos mesmos em 10 concentrações diferentes e utilizando-se DMSO PA como diluente. A faixa de concentração do cetoconazol variou entre  $0,03 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $16 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e foi a mesma proposta por Araújo e colaboradores (2009). Para a terbinafina, utilizou-se concentração entre  $0,005 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $0,24 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , de acordo com o proposto por Barros, Santos e Handan (2007).

Todas as soluções empregadas no ensaio de CIM foram preparadas duas vezes mais concentradas do que as concentrações finais definidas para o ensaio. Deste modo, compensa-se a diluição (1:2, v/v) dos agentes antifúngicos que ocorre quando estes são combinados com o inóculo na microplaca. Assim, as concentrações finais do óleo resina de copaíba testadas estavam na faixa entre 7,8 e  $1000 \mu\text{g de } \beta\text{-cariofileno.mL}^{-1}$ .

#### 4.6.2.4 Preparo da microplaca

As diluições do óleo resina de copaíba foram distribuídas nas colunas de uma microplaca de 96 poços. O mesmo procedimento foi realizado com as 10 concentrações de cada um dos fármacos utilizados como controle positivo (cetoconazol e terbinafina). Em seguida, foi dispensado nesses poços um volume de  $100 \mu\text{L}$  da suspensão do inóculo.



O controle de esterilidade do teste (controle negativo) foi feito com 100  $\mu\text{L}$  da diluição de maior concentração do óleo resina de copaíba, adicionados de 100  $\mu\text{L}$  de meio RPMI-1640 estéril. Para o controle de crescimento (controle absoluto) dos fungos, utilizou-se apenas 200  $\mu\text{L}$  de meio RPMI-1640 inoculado.

O ensaio foi realizado em triplicata e, ao término de montagem da microplaca, esta foi homogeneizada em agitador de microplacas (SI-0400, *Genie Scientific*, Estados Unidos) e incubadas em estufa à temperatura de 28°C, sem agitação por um período de 7 dias. Ao fim deste prazo, observou-se a ocorrência de turvação, indicativa de crescimento fúngico em cada um dos poços da microplaca, nos quais continham diferentes concentrações das substâncias testadas.

#### **4.6.3 Determinação da concentração fungicida mínima (CFM)**

Após o ensaio de CIM, foi feita a determinação da CFM do óleo resina de copaíba e controles positivos, de acordo com técnica descrita por Pereira e colaboradores (2011), com adaptações.

Alíquotas de 20  $\mu\text{L}$  do meio presente nas cavidades onde não ocorreu crescimento fúngico foram transferidas para microplacas de 96 poços contendo 180  $\mu\text{L}$  de CSD, desprovido de agentes antimicrobianos. O sistema foi incubado a 28°C por 8 dias.

A CFM foi definida como a menor concentração da substância testada onde a espécie fúngica não conseguiu estabelecer crescimento, quando inoculada em meio de cultura isento de antifúngicos. Dessa forma, observando-se a ocorrência do crescimento fúngico neste ensaio, este é considerado como agente fungistático. Na ausência de crescimento, a substância é considerada como fungicida.

#### 4.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

O material utilizado para observação por MEV foi composto por colônias das espécies fúngicas submetidas a tratamento idêntico ao descrito no teste de triagem e colônias não tratadas dos mesmos fungos, para fins comparativos. O preparo das amostras foi feito conforme método descrito por Silva e colaboradores (2011).

Neste estudo, padronizou-se que as concentrações do óleo resina de copaíba e dos controles positivos seriam cinco vezes maiores do que as estabelecidas como CFM.

As colônias oriundas de tratamento idêntico ao descrito no método de triagem foram retiradas do CSD e transferidas para uma solução fixativa de Karnovsky modificada (glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,05M, cloreto de cálcio 0,001M, pH 7,2), onde permaneceram por 24 horas.

Em seguida, o material foi lavado três vezes em tampão cacodilato de sódio 0,05M pH 7,2 (10 minutos cada) e transferidos para uma solução aquosa de tetróxido de ósmio 1%, por 1 hora em temperatura ambiente, para pós-fixação. Ao fim deste tempo, o material foi lavado com água destilada por três vezes.

As amostras foram submetidas à desidratação, empregando soluções de acetona/água a 25%, 50%, 75% e 90%, permanecendo em cada uma das concentrações por 10 minutos. Terminado este processo, a desidratação seguiu com 3 ciclos de 10 minutos utilizando-se acetona 100%. A última etapa consistiu em deixar o material em dessecador contendo sílica para completar a secagem.

As amostras obtidas foram montadas em suportes de alumínio (*stubs*), com fita de carbono dupla face, levadas ao metalizador (FL-9496 Balzers/Furstentum Liechtenstein) por 4 minutos, resultando em uma camada de 2 nm de ouro-paládio

sobre as mesmas. A seguir, foram observadas ao MEV (JSM 6390LV, Jeol), sob as condições de 25 Kv de potência e distância de trabalho de 17 mm.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 PERFIL QUÍMICO DO ÓLEO RESINA DE COPAÍBA

A análise por CG-AR permitiu estabelecer o perfil químico do óleo resina de copaíba por meio da identificação e quantificação de seus constituintes. O ácido copálico (1,0%), marcador de originalidade do óleo resina de copaíba, foi identificado na amostra analisada. Como componente majoritário foi identificado o  $\beta$ -cariofileno (31,4%), seguido por  $\gamma$ -muuroleno (16,1%). Picos menores que 0,1%, foram equivalentes a 15,7% da composição total do óleo e não foram considerados neste estudo (Figura 13 e Tabela 1).

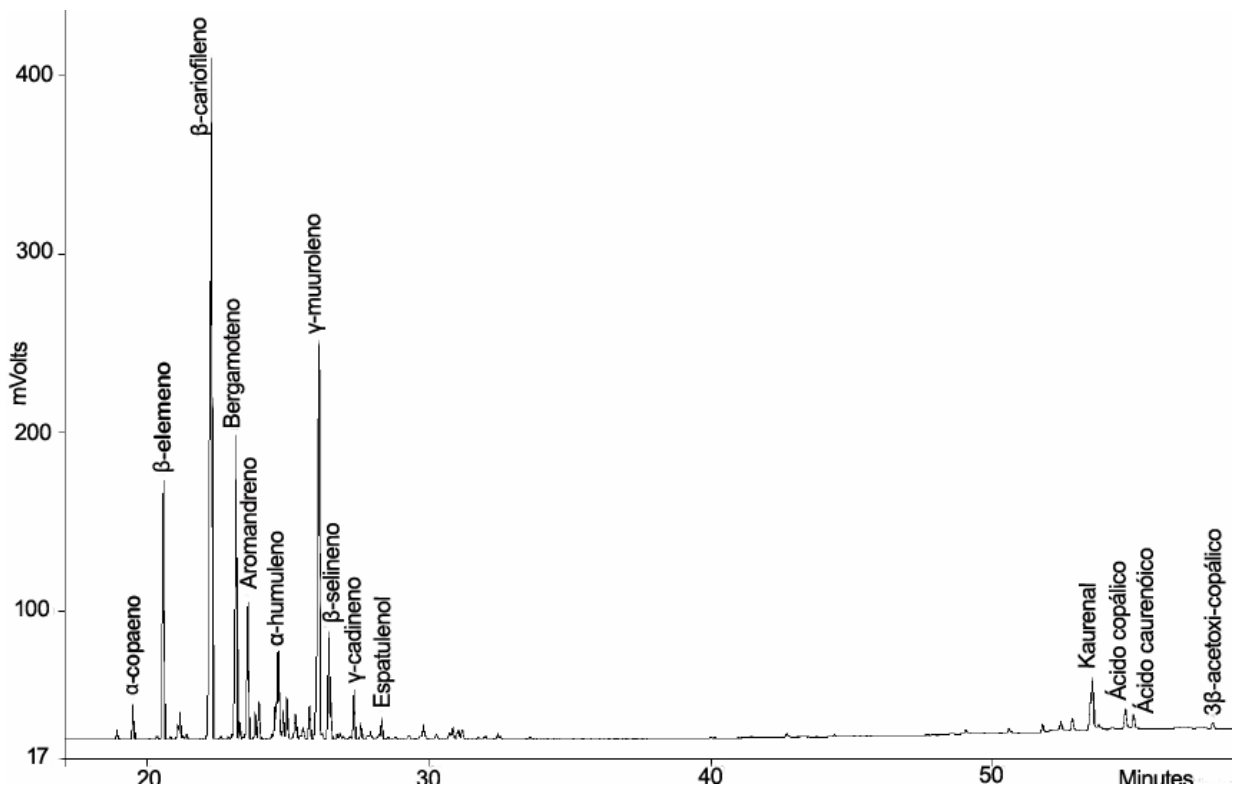


Figura 13 – Perfil cromatográfico do óleo resina de *C. langsdorffii*

Condições de análise: coluna: BP1 30 m x 0,25 mm (HP). Temperaturas: da coluna = 60°C (1 minuto), 3°C/minuto, até 220°C, do injetor = 220°C *Split*: 1/50, do detector por ionização em chama: 220°C; volume de injeção: 1  $\mu$ L. Picos menores que 0,1% foram excluídos.

Tabela 1 – Composição química do óleo resina de *C. langsdorffii* obtida por cromatografia gasosa de alta resolução.

Pico	Constituinte	%	Proporção em relação ao composto majoritário
1	$\alpha$ -copaeno	1,0	0,03
2	$\beta$ -elemeno	8,0	0,26
3	$\beta$ -cariofileno	31,4	1
4	Bergamoteno	10,2	0,32
5	Aromadendreno	4,4	0,14
6	$\alpha$ -humuleno	2,9	0,09
7	$\gamma$ -muuroleno	16,1	0,51
8	$\beta$ -selineno	3,2	0,11
9	$\gamma$ -cadineno	1,4	0,04
10	Espatuleno	0,7	0,02
11	Kaurenal	3,1	0,10
12	Ácido copálico	1,0	0,03
13	Ácido caurenóico	0,6	0,02
14	3 $\beta$ -acetoxi-copálico	0,3	0,01
<b>Total</b>	-	<b>84,3</b>	-

## 5.2 CARACTERIZAÇÃO MACROSCÓPICA DAS COLÔNIAS

As colônias de *M. canis* ATCC 32903 e *M. gypseum* ATCC 14683 (Figura 14), apresentaram-se semelhantes na caracterização macroscópica. A coloração predominantemente branca e o aspecto cotonoso foram observados em ambas as colônias, bem como pigmento amarelo e a presença de pontos marrons no reverso. Com relação à topografia das colônias, as mesmas mostraram-se circulares,

possuindo o *M. gypseum* ATCC 14683, bordos bem definidos, enquanto o *M. canis* ATCC 32903, apresentou projeções de filamentos.

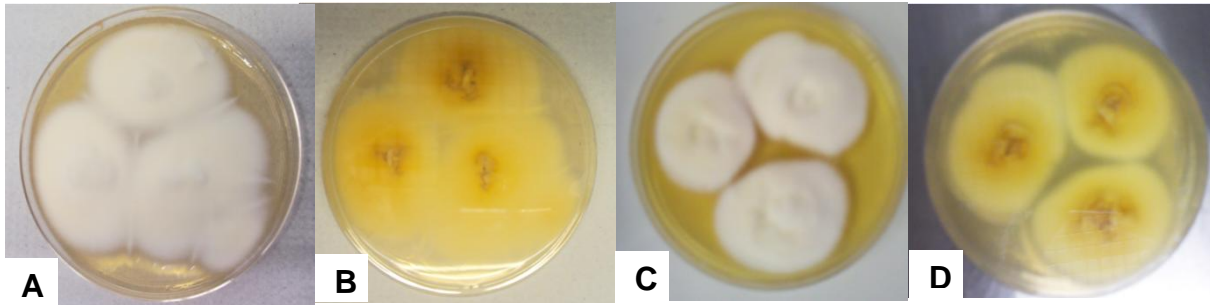


Figura 14 – Fotografias do aspecto macroscópico das colônias de *M. canis* ATCC 32903 e *M. gypseum* ATCC 14683. *M. canis* (A) e *M. gypseum* (C) com anverso branco e aspecto cotonoso. *M. canis* (B) e *M. gypseum* ATCC 14683 (D) com reverso com pigmentos amarelo e pontos acastanhados.

As colônias de *T. mentagrophytes* ATCC 9533, ATCC 11480 e ATCC 11481 podem ser visualizadas na figura 15.

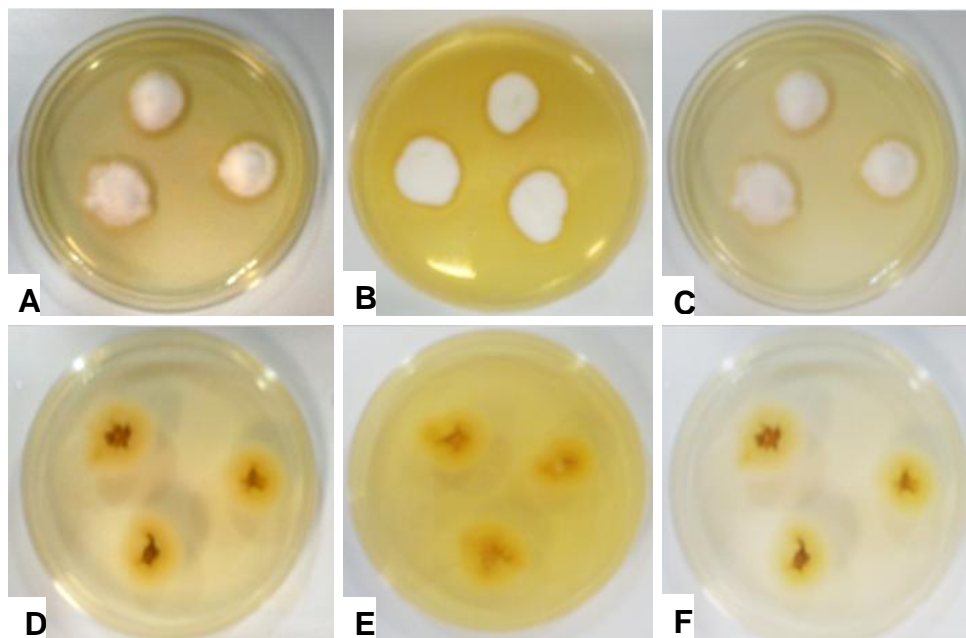


Figura 15 – Fotografias do aspecto macroscópico das colônias de *T. mentagrophytes* ATCC 9533, *T. mentagrophytes* ATCC 11480 e *T. mentagrophytes* ATCC 11481, respectivamente. Colônias com anverso branco e aspecto pulverulento e reverso com pigmento amarelo e centro mais escuro, correspondentes a *T. mentagrophytes* ATCC 9533 (A), *T. mentagrophytes* ATCC 11480 (B) e *T. mentagrophytes* ATCC 11481 (C).

As principais características macroscópicas das colônias de *T. rubrum* CCT 5507 foram o anverso de coloração branca e o aspecto cotonoso. No reverso da colônia, observou-se a presença de pigmento vermelho escuro. A análise da topografia revelou que a colônia apresentou bordos ondulados, circunscrevendo uma área central (Figura 16).

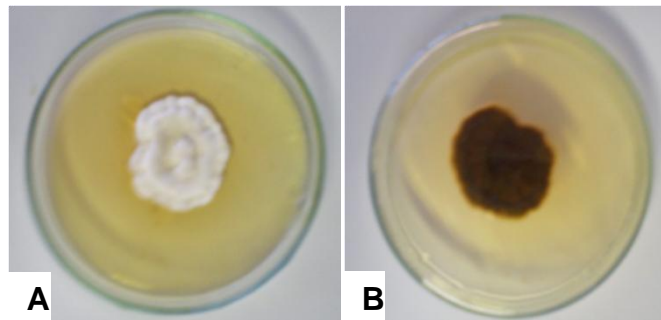


Figura 16 – Fotografias do aspecto macroscópico das colônias de *T. rubrum* CCT 5507. (A) Anverso branco e cotonoso; (B) reverso com presença de pigmento vermelho escuro.

### 5.3 CARACTERIZAÇÃO MICROSCÓPICA DAS COLÔNIAS

A análise microscópica de *M. canis* ATCC 32903 revelou a presença de hifas hialinas septadas e sinuosas e, ainda, de macroconídios fusiformes com parede espessa e extremidades afiladas, divididos por septos transversais, com células em seu interior. A presença de microconídios foi pouco evidenciada (Figura 17).

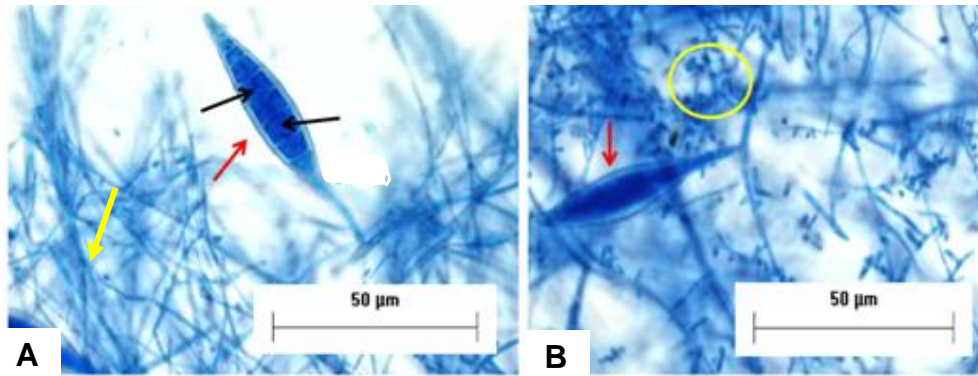


Figura 17 – Fotografias da microcultura de *M. canis* ATCC 32903.

(A) *M. canis* ATCC 32903 apresentando hifas hialinas e septadas, indicadas pela seta amarela, e macroconídios fusiformes com parede espessa, indicados pela seta vermelha. A seta preta destaca as células no interior do macroconídio; (B) microconídios escassos destacados pelo círculo amarelo. A seta vermelha indica macroconídio. Escala correspondente a 50 µm.

A observação de *M. gypseum* ATCC 14683 revelou a presença de abundantes macroconídios em forma de charuto e com células em seu interior. Não foram visualizados microconídios (Figura 18).

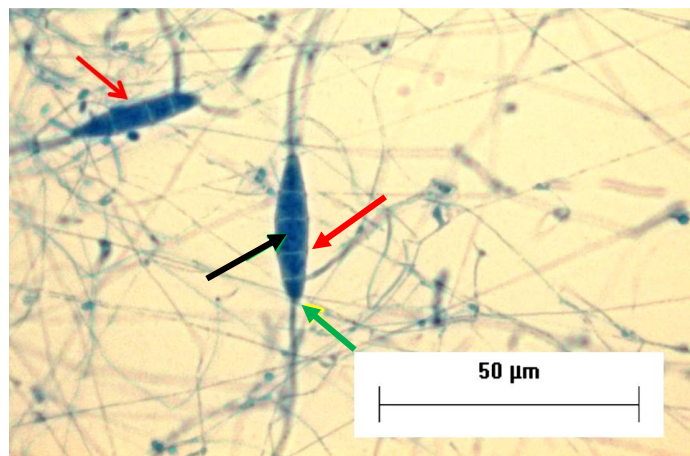


Figura 18 - Fotografia da microcultura de *M. gypseum* ATCC 14683.

A seta vermelha destaca o macroconídio fusiforme e a seta verde destaca a extremidade arredondada do mesmo. A seta preta indica a célula interna ao macroconídio. Escala correspondente a 50 µm.

A análise microscópica de *T. mentagrophytes* ATCC 9533, *T. mentagrophytes* ATCC 11480 e *T. mentagrophytes* ATCC 11481 revelou a presença de



microconídios abundantes e a organização dos mesmos em cachos para as três linhagens (Figura 19).

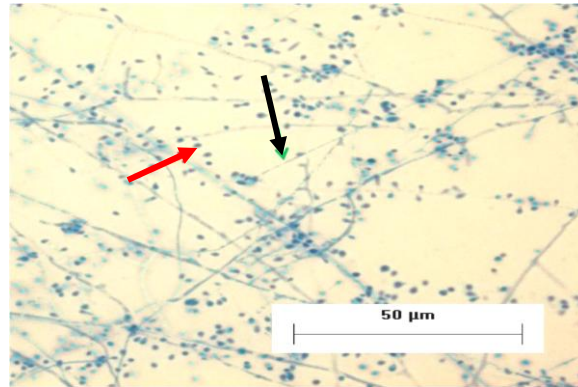


Figura 19 – Fotografia da microcultura de *T. mentagrophytes* ATCC 9533. A seta vermelha indica o microconídio e a seta preta, a hifa. Escala correspondente a 50  $\mu\text{m}$ .

As lâminas provenientes do microcultivo permitiram identificar as características microscópicas de *T. rubrum* CCT 5507: presença de microconídios dispostos ao longo de hifas hialinas e sem ramificações e, ainda, a escassez de macroconídios (Figura 20).

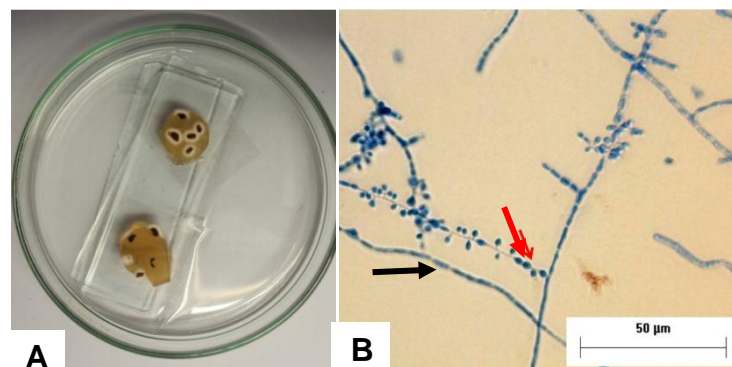


Figura 20 – Fotografias do microcultivo e da microcultura de *T. rubrum* CCT 5507. (A) Técnica do microcultivo com *T. rubrum* CCT 5507 e (B) aspecto microscópico do fungo: a seta vermelha indica o microconídio e a preta, a hifa. Escala correspondente a 50  $\mu\text{m}$ .

## 5.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

### 5.4.1 Triagem da atividade antifúngica

A triagem da atividade antifúngica demonstrou a capacidade do óleo resina de copaíba em inibir o crescimento das espécies *T. mentagrophytes* ATCC 11481 e *T. rubrum* CCT 5507 (Quadro 5).

Quadro 5 – Suscetibilidade ao óleo resina de *C. lansdorffii* de fungos dermatófitos em ensaio de triagem.

<b>Linhagem</b>	<b>Atividade antifúngica do óleo resina de copaíba (1000 µg.mL<sup>-1</sup>)</b>
<i>Microsporum canis</i> ATCC 32903	Ausente
<i>Microsporum gypseum</i> ATCC 14683	Ausente
<i>Tricophyton mentagrophytes</i> ATCC 9533	Ausente
<i>Tricophyton mentagrophytes</i> ATCC 11480	Ausente
<i>Tricophyton mentagrophytes</i> ATCC 11481	Presente
<i>Tricophyton rubrum</i> CCT 5507	Presente

### 5.4.2 Determinação da concentração inibitória mínima e concentração fungicida mínima

A partir dos resultados obtidos no teste preliminar de atividade antifúngica, foram determinadas a CIM e a CFM para o óleo resina de copaíba frente aos micro-organismos *T. mentagrophytes* ATCC 11481 e *T. rubrum* CCT 5507.

*T. mentagrophytes* ATCC 11481 apresentou valores iguais de CIM e CFM: correspondentes a 31,25 µg de β-cariofileno.mL<sup>-1</sup>. Para *T. rubrum* o valor da CIM foi igual a 250 µg de β-cariofileno.mL<sup>-1</sup> e da CFM igual 500 µg de β-cariofileno.mL<sup>-1</sup>.

A CIM e a CFM para os controles negativos (cetoconazol e terbinafina) de todas as linhagens fúngicas empregadas, incluindo àquelas para as quais o óleo resina de copaíba não apresentou atividade na triagem, foram estabelecidas (Tabela 3).

Tabela 2 - Suscetibilidade *in vitro* de fungos dermatófitos frente ao óleo resina de *C. langsdorffii* e aos fármacos de referência.

Substância	Óleo resina de copaíba <sup>1</sup>		Cetoconazol		Terbinafina	
	CIM <sup>2</sup> (µg.mL <sup>-1</sup> )	CFM <sup>3</sup> (µg.mL <sup>-1</sup> )	CIM <sup>2</sup> (µg.mL <sup>-1</sup> )	CFM <sup>3</sup> (µg.mL <sup>-1</sup> )	CIM <sup>2</sup> (µg.mL <sup>-1</sup> )	CFM <sup>3</sup> (µg.mL <sup>-1</sup> )
<i>M. canis</i> ATCC 32903	-	-	0,25	0,25	0,03	0,03
<i>M. gypseum</i> ATCC 14683	-	-	8,01	16,0	0,12	0,12
<i>T. mentagrophytes</i> ATCC 9533	-	-	4,01	4,01	0,12	0,12
<i>T. mentagrophytes</i> ATCC 11480	-	-	2,00	2,00	0,03	0,03
<i>T. mentagrophytes</i> ATCC 11481	31,25	31,25	0,25	0,25	0,03	0,03
<i>T. rubrum</i> CCT 5507	250	500	1,00	4,01	0,06	0,06

“-” : Indica ausência de atividade inibitória do crescimento; <sup>1</sup> resultados expressos em µg de β-cariofileno por mL<sup>-1</sup>; <sup>2</sup> concentração inibitória mínima; <sup>3</sup> concentração fungicida mínima.

## 5.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

As eletromicrografias obtidas para os fungos *T. mentagrophytes* ATCC 11481 e *T. rubrum* CCT 5507 permitiram a observação de diferenças nas estruturas destes fungos ao comparar-se os não expostos a qualquer tipo de tratamento àqueles submetidos ao tratamento com o óleo resina de copaíba e fármacos de referência.

No *T. mentagrophytes* ATCC 11481, observa-se que as hifas sofreram alterações em sua estrutura tubular, adquirindo aspecto compactado, com hifas aglomeradas, quando expostas ao óleo resina de copaíba. No grupo tratado com os fármacos cetoconazol e terbinafina, as hifas tornaram-se ressequidas e com a superfície rugosa, além de apresentarem-se como um aglomerado (Figura 21).

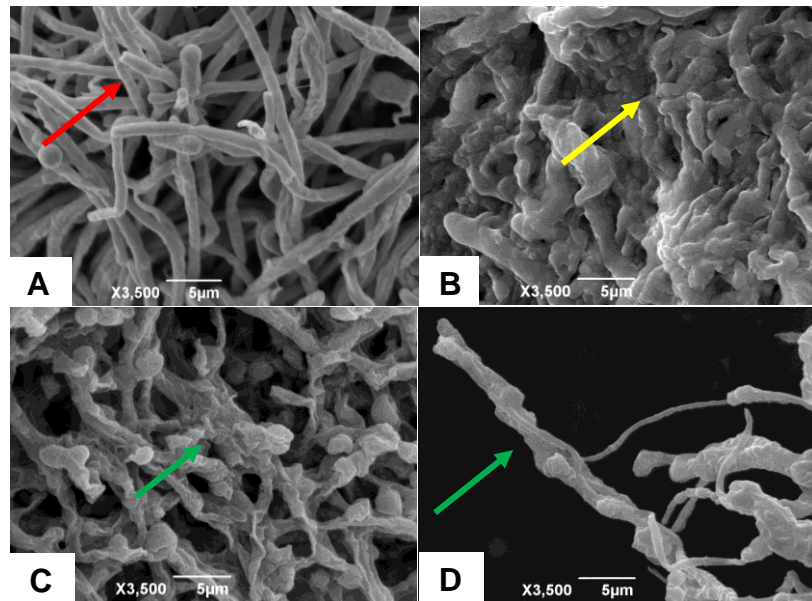


Figura 21 - Eletromicrografias de *T. mentagrophytes* ATCC 11481 submetido à ação do óleo resina de copaíba e fármacos de referência.

(A) *T. mentagrophytes* não exposto aos tratamentos propostos: a seta vermelha indica uma hifa sem alterações morfológicas; *T. mentagrophytes* tratado com (B) óleo resina de copaíba: a seta amarela indica a aglomeração das hifas; (C) cetoconazol e (D) terbinafina: as setas verdes indicam o aspecto ressequido e rugoso da hifa. Escala correspondente a 5 µm.

A exposição de *T. rubrum* CCT 5507 ao óleo resina de copaíba causou alterações semelhantes às identificadas em *T. mentagrophytes* ATCC 11481. Do mesmo modo, o fungo exposto aos fármacos de referência apresentou-se com aspecto disforme e ressequido, se comparados ao fungo não exposto aos tratamentos em questão (Figura 22).

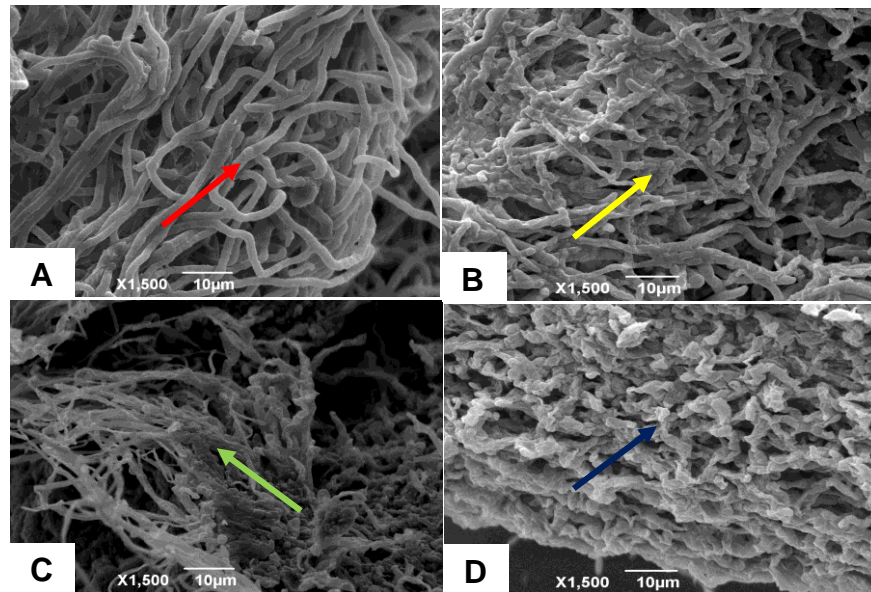


Figura 22 - Eletromicrografias de *T. rubrum* CCT 5507 submetido à ação do óleo resina de copaíba e fármacos de referência.  
(A) *T. rubrum* não exposto aos tratamentos propostos. A seta vermelha indica uma hifa sem alterações morfológicas; *T. rubrum* tratado com (B) óleo resina de copaíba. A seta amarela indica a compactação das estruturas, formando um aglomerado de hifas; (C) cetoconazol. A seta verde indica o aspecto ressequido da hifa e (D) terbinafina. A seta azul aponta para hifas danificadas que não são mais visualizadas como unidades. Escala correspondente a 10  $\mu\text{m}$ .

## 6. DISCUSSÃO

Inúmeros estudos já foram realizados com óleos provenientes de diferentes espécies do gênero *Copaifera*, a fim de confirmar sua eficácia farmacológica para diversas finalidades, bem como estabelecer os riscos de sua utilização indevida (VEIGA JR. et al., 2007; SACHETTI et al., 2011; ALVES et al., 2012; IZUMI et al., 2012; PIERI et al., 2012a). De acordo com Leandro e colaboradores (2012), estudos que não especificam a composição química nem a espécie da qual o óleo utilizado é oriundo, tornam mais difícil a elaboração de um padrão de uso adequado para o óleo de copaíba.

A diferença de composição dos óleos provenientes da mesma espécie pode ser explicada pela variação sazonal, assim como alterações genéticas apresentadas pela espécie vegetal. As enzimas especializadas no metabolismo secundário das plantas também são apontadas como responsáveis, pois estas teriam uma propensão em agir em diversos substratos e, dessa forma, os produtos ficariam susceptíveis aos tipos e concentrações dessas moléculas (PAULA et al., 2011).

Diante disso, ainda que com variações na quantidade, alguns componentes podem sempre ser identificados nos óleos vegetais e servem como identificação de originalidade do produto (SOUZA-MOREIRA et al., 2010). Um exemplo disso é o ácido copálico, no óleo resina de copaíba, cuja presença garante a originalidade da amostra (VEIGA JR.; PATITUCCI; PINTO, 1997; VEIGA JR.; PINTO, 2002).

De acordo com Bakkali e colaboradores (2008), para um componente ser considerado majoritário, este deve apresentar-se em quantidade entre 20 e 70% dos constituintes totais. Para os mesmos autores, geralmente é este componente o responsável pela atividade farmacológica do óleo.

Tais achados estão de acordo com os resultados obtidos na análise por CG-AR do óleo utilizado neste estudo: presença de ácido copálico, que garante a sua originalidade, e  $\beta$ -cariofileno, equivalente a 31,4% dos constituintes totais (componente majoritário e marcador químico dos óleos oriundos de *C. langsdorffii*).

Algumas substâncias presentes no óleo resina de copaíba, como ácido caurenóico,  $\beta$ -cariofileno e  $\gamma$ -muuroleno, já foram relacionados com atividade anti-inflamatória e antimicrobiana de diferentes óleos essenciais e resinosos (VEIGA JR.; PINTO, 2002; VIEIRA; TAKAHASHI; BOAVENTURA, 2002; PAIVA et al., 2004; VEIGA JR.; PINTO; MACIEL, 2005; SANTOS et al., 2010; CARVALHO et al., 2011). Tais constituintes corresponderam a 48,1% da composição total do óleo resina utilizado.

Considerando especificamente a atividade antimicrobiana, substâncias obtidas a partir de espécies vegetais são importantes fontes de novas formas de inibição ou combate de patógenos que adquirem resistência aos antimicrobianos disponíveis (GONÇALVES et al., 2011). Corroborando essa informação,  $\beta$ -cariofileno foi descrito como substância com atividade antimicrobiana e antifúngica por Grujic-Jovanovic e colaboradores (2004). No entanto, essa atividade antifúngica era atribuída apenas ao óxido de cariofileno, supondo-se que este era um antifúngico superior ao hidrocarboneto  $\beta$ -cariofileno. Porém, essa atividade superior devia-se apenas a sua maior solubilidade em meio aquoso próprio dos ensaios de CIM (BLOISE, 2003; GOREN et al., 2011). Contudo, de acordo com Grujic-Jovanovic e colaboradores (2004), a forma de terpenóide não oxigenado é um antimicrobiano ainda mais potente que o óxido de cariofileno, e correspondente a 31,4% da composição total do óleo empregado neste estudo. Esses autores descreveram

ainda que, para manter a atividade do componente  $\beta$ -cariofileno, basta que o mesmo seja adequadamente solubilizado.

O conhecimento acerca da atividade farmacológica dos componentes isolados de um óleo podem direcionar os estudos realizados com o mesmo. Deste modo, a busca pela atividade de tais componentes baseia-se na suposição de que as plantas possuem certos constituintes responsáveis por sua atividade (SOUZA-MOREIRA et al., 2010). Segundo Dal Pozzo e colaboradores (2011), o composto farmacologicamente ativo em um óleo é aquele que aparece em maior quantidade, ou seja, que pode ser chamado de majoritário. Para Souza-Moreira e colaboradores (2010), a determinação da atividade farmacológica do componente majoritário poderia ser útil, uma vez que, o emprego de uma substância isolada substituiria o uso da planta na sua totalidade e permitiria assim, doseamentos precisos e determinação das variações de bioatividade.

Contudo, deve-se lembrar que a atividade farmacológica de uma planta medicinal pode ocorrer devido ao sinergismo entre seus constituintes. Por isso, algumas vezes, ao se isolar certos componentes considerados ativos, ao invés de se obter uma resposta farmacológica mais potente ou mais fácil de ser controlada, surgem efeitos tóxicos ou inatividade e ainda, compostos de solubilidade limitada (LIANG et al., 2004; SPRINGFIELD; EAGLES; SCOTT, 2005).

Cabe ressaltar que, neste estudo, a concentração das soluções do óleo resina de copaíba foram expressas com base no composto majoritário  $\beta$ -cariofileno apenas como forma de se estabelecer um parâmetro para padronização das mesmas. Pois, de acordo com Tappin (2004), o óleo de copaíba, provavelmente, representa um caso onde o perfil químico total, assim como as caracterizações dos componentes



presentes são mais importantes do que apenas uma substância isolada na determinação de suas atividades farmacológicas.

Em relação às linhagens fúngicas, assim como relatado por Copeto (2010), Murray, Rosenthal e Pfaller (2006), Pereira (2009) e Sidrim e Rocha (2004), foi possível evidenciar, por meio do microcultivo em ágar batata, as principais características morfológicas das colônias fúngicas trabalhadas. Além disso, tais análises têm valor no que diz respeito à identificação de contaminações nas colônias por outros fungos, principalmente, anemófilos e, ainda, se existe no ambiente algum fator interferente no crescimento fúngico (calor e umidade em excesso, substâncias inibidoras do crescimento, etc).

Com relação aos testes de atividade antimicrobiana, Araújo e colaboradores (2009) ressaltam que a determinação da susceptibilidade *in vitro* mostra-se útil para prever a capacidade de uma substância na erradicação de um micro-organismo. Deste modo, a realização do teste de CIM apresenta boa correlação entre os dados *in vitro* e o resultado clínico final. No presente estudo, o óleo resina *C. langsdorffii* apresentou atividade antifúngica *in vitro*, do tipo fungicida contra as espécies *T. mentagrophytes* ATCC 11481 e *T. rubrum* CCT 5507.

Para *T. mentagrophytes* (ATCC 11481) a CIM do óleo resina de copaíba foi igual à CFM, ambas iguais a 31,25 µg de β-cariofileno.mL<sup>-1</sup>. Para *T. rubrum* a CIM do óleo teve atividade fungistática e a CFM foi o dobro desta, equivalentes, respectivamente, a 250 e 500 µg de β-cariofileno.mL<sup>-1</sup>.

Santos e colaboradores (2008) propuseram uma classificação para a atividade antimicrobiana das substâncias conforme os valores de CIM encontrados. Assim, substâncias que apresentassem CIM menores ou iguais a 100 µg.mL<sup>-1</sup> poderiam ser consideradas como fortes inibidores; substâncias com CIM entre 100 e 500 µg.mL<sup>-1</sup>,

como inibidores moderados; substâncias com CIM entre 500 e 1.000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , inibidores fracos e com CIM superior a 1.000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , inativas. Com base nesta classificação e sabendo-se que a concentração do óleo resina de *C. langsdorffii* (expressa em  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do óleo resina (vide pag. 59)) que demonstrou atividade antifúngica para *T. mentagrophytes* ATCC 11481 foi igual a 170  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , ele pode ser classificado como inibidor moderado do crescimento fúngico desta espécie. Para *T. rubrum* CCT 5507, a CIM do óleo resina de copaíba foi igual a 1.360  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , sendo classificado, portanto, como inativo frente a esta espécie.

Em contrapartida, resultados de atividade antifúngica do óleo resina de *C. langsdorffii* obtidos por Santos e colaboradores (2008) mostraram que o óleo era ativo apenas contra *T. rubrum*. Em tal estudo, das diferentes espécies de copaíba que tiveram seus óleos resinas testados, nenhum mostrou-se ativo frente a linhagens de *T. mentagrophytes* ATCC 4481 e *M. gypseum* ATCC 14683.

Essa variabilidade nos valores de CIM para o gênero *Trichophyton spp* pode estar relacionada às variedades de cada espécie como, por exemplo, o fato de espécies zoofílicas responderem melhor ao tratamento que as antropofílicas. Contudo, outras características inerentes ao fungo também devem ser investigadas a fim de esclarecer o que os fazem ter respostas diferentes frente aos mesmos agentes antifúngicos (ALMEIDA et al., 2009). Neste estudo, o óleo resina de copaíba apresentou atividade antifúngica frente a uma linhagem de *T. mentagrophytes* de origem antropofílica, mais difícil de ser inibida pelas substâncias disponíveis.

As informações obtidas por Almeida e colaboradores (2009) vão ao encontro do exposto sobre *T. mentagrophytes*. Tais autores encontraram grande variação das CIM's relativas às quatro drogas analisadas, incluindo o cetoconazol e a terbinafina, frente às espécies de *Trichophyton spp* e *M. canis* (exceto frente à terbinafina),

provenientes de isolados clínicos. Entre as 35 amostras de *T. mentagrophytes*, apesar da grande variação quanto à suscetibilidade aos antifúngicos, a tendência de resposta foi para CIMs intermediárias (entre 1 e 2  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). No entanto, oito amostras foram inibidas apenas pela CIM mais alta (16  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) de itraconazol, e outras quatro exibiram esse comportamento para as demais drogas (cetoconazol, terbinafina e fluconazol), sugerindo serem resistentes a todos os antifúngicos testados. Isto posto, é justificável que o óleo resina de copaíba tenha apresentado ação antifúngica apenas frente a uma das três linhagens de *T. mentagrophytes* testadas no presente estudo.

Os resultados de atividade antifúngica do óleo resina de copaíba encontrados no presente estudo somam-se aos achados sobre a atividade farmacológica do gênero *Copaifera* spp. de outros pesquisadores. Deus, Alves e Arruda (2011) identificaram a atividade do óleo resina de *C. multijuga* contra o fungo filamentoso *Aspergillus flavus* e a levedura *Candida parapsilosis*; Santos e colaboradores (2010) encontraram atividade moderada dos óleos de *C. paupera* e *C. lucens* contra *T. rubrum* e *M. canis*, dentre outros (SANTOS et al., 2008).

Muitas outras espécies vegetais apresentam óleos com atividades farmacológicas relevantes, destacando-se aqueles com atividade antimicrobiana. Dentre vários exemplos, cabe ressaltar a atividade antibacteriana do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*, basicamente constituído de citral (70 a 85% v/v), tem sido relatada contra frente a vários patógenos (CIMANGA et al., 2002). Ao óleo essencial de *Mentha piperita* atribuiu-se atividade antibacteriana, antiviral e antifúngica, sendo estas associada, principalmente, aos compostos majoritários mentol, mentona, acetato de metila, iso-mentona (SINGH et al., 2011). O

óleo essencial de *Origanum majorana* é rico em compostos bioativos como terpinen-4-ol, sabineno, acetato de linalol,  $\gamma$ -terpineno e linalol que exibem atividade antibacteriana elevada e amplo espectro de ação (SELLAMI et al., 2009). Em adição o gênero *Ocimum basilicum* é conhecido por possuir uma gama de atividades biológicas, tais como repelente de insetos, inibidora de nematóides, antibacteriana, antifúngica e atividades antioxidantes (LEE et al., 2005).

Uma vez que a constituição dos óleos de copaíba variam entre espécies e, até mesmo dentro da mesma espécie (dependendo de fatores externos como clima, solo, idade da árvore, etc), estão sujeitos a apresentarem espectros de ação e potência de determinada atividade farmacológica distintas.

Os valores de CIM e CFM para cetoconazol e terbinafina para *T. mentagrophytes* ATCC 11481 e *T. rubrum* CCT 5507 foram menores que aqueles obtidos para o óleo resina de copaíba em ambos os casos. Não existe, no entanto, um consenso sobre o nível de inibição aceitável para produtos naturais quando comparados com fármacos padrões (ALIGIANIS et al., 2001).

Como ambos os fármacos mostraram-se ativos contra as demais espécies fúngicas para as quais o óleo testado não mostrou atividade, confirmaram sua eficácia como controles positivos dos ensaios de atividade antifúngica realizados.

Para Almeida e colaboradores (2009), uma dosagem de cetoconazol de até 2  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  é mediana (entre baixa e alta dose) e capaz de inibir o crescimento de boa parte das espécies fúngicas. Considerando este parâmetro e comparando-o com os valores de CIM estabelecidos para o cetoconazol neste estudo, é possível inferir que *M. gypseum* ATCC 14683 e *T. mentagrophytes* ATCC 9533 são espécies que necessitaram de uma dose maior que 2  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , portanto alta, para terem seu crescimento inibido. Essa informação pode ajudar a explicar porque o óleo resina de

copaíba não inibiu o crescimento das espécies em questão, visto que poderiam necessitar de doses mais elevadas do óleo para a manifestação de um efeito fungicida ou fungistático.

A terbinafina, considerada como um antifúngico de alta potência, é capaz de exercer sua atividade fungicida em baixas dosagens. A CIM deste fármaco determinada para *M. canis* ATCC 32903, *M. gypseum* ATCC 14683, *T. mentagrophytes* ATCC 9533, ATCC 11480 e ATCC 11481 e *T. rubrum* CCT 5507 apresentaram-se de acordo com os obtidos em outros estudos (BARROS; HANDAM, 2005; ARAÚJO et al., 2009; SIQUEIRA et al., 2008; ALMEIDA et al., 2009).

Darkes, Scott e Goa (2003) descreveram a terbinafina como um dos antifúngicos mais recomendados para o tratamento das dermatofitoses, sobretudo de onicomicoses. No entanto, alguns casos de dermatófitos (*T. rubrum*, principalmente) resistentes à terbinafina foram relatados. Isso justifica a busca por agentes antifúngicos alternativos, tal como o óleo resina de copaíba e outras plantas medicinais ou derivados das mesmas (MUKHERJHEE et al., 2003).

A comparação das micrografias dos fungos *T. mentagrophytes* ATCC 11481 e *T. rubrum* tratados com óleo resina de copaíba com as amostras que não receberam tratamento e com as amostras que foram tratadas com cetoconazol e com terbinafina, revelou alterações na superfícies das hifas. O óleo resina de copaíba promoveu o entumescimento e a compactação das estruturas, enquanto os fármacos tornaram as hifas ressequidas e com aspecto rugoso.

O cetoconazol e a terbinafina, por inibição de diferentes enzimas envolvidas na síntese de ergosterol, causam alteração na função da célula fúngica e alteram as propriedades da membrana celular. Isso resulta em alterações na permeabilidade, crescimento, acúmulo de metabólitos tóxicos e morte ou paralisação do crescimento

fúngico (BENNET, 2003; MA et al., 2003; MURRAY; CATALÁN; MONTEJO, 2006; ROSENTHAL; PFALLER, 2006). Algumas destas alterações, provavelmente, foram as responsáveis pela perda de formato das hifas, visualizadas como uma massa compacta nas eletromicrografias.

A alteração manifestada pelos fungos tratados com o óleo resina de copaíba sugeriram uma alteração na permeabilidade das células, dando às hifas um aspecto intumescido e compactado. Alterações deste tipo são sugestivas de comprometerem a viabilidade do fungo e seu desenvolvimento. A concentração do óleo resina de copaíba e dos fármacos, utilizadas para tratar as amostras encaminhadas para o MEV, foram 5 vezes maior que a CFM obtidas para cada espécie. A finalidade desse ajuste na concentração foi garantir a atividade antifúngica do óleo e dos controles positivos, pois o fragmento utilizado para análise em questão carregava consigo uma quantidade relativamente grande de células viáveis. Isso ocorre porque não é possível padronizar um intervalo para a quantidade de esporos, do modo como é feito e padronizado no ensaio de CIM.

Devido ao fato de o óleo de copaíba ter sido classificado como um agente facilitador de permeabilidade cutânea (OLIVEIRA et al., 2010), pode-se inferir que, mesmo diante as diferenças estruturais apresentadas pela célula fúngica, essa característica pode ter auxiliado na ação antifúngica do mesmo. Tal característica deve ser considerada para o desenvolvimento de novos fármacos, pois o óleo pode aumentar tanto a permeabilidade da pele para seus próprios ativos, bem como pode atuar como carreador de outros fármacos, o que seria útil, por exemplo, no tratamento de onicomicoses.

Além disso, os óleos resinas de diferentes espécies de *Copaifera* spp. são descritos como anti-inflamatórios (LEANDRO et al., 2012) e o estudo de Vieira e

colaboradores (2008) identificou que processos cicatrizantes são prejudicados com o uso de óleo resina de *C. langsdorffii*. Desta forma, futuros ensaios *in vivo* são necessários para determinar se tais características interferem no processo de cura da lesão dermatofítica.

Por fim, o conhecimento da atividade farmacológica, em especial antimicrobiana, da copaíba vem sendo consolidado a cada novo estudo realizado com a mesma. Certamente, o estudo das plantas medicinais propiciará um impulso, tanto direto como indireto, para a melhoria nas condições de vida de populações de países em desenvolvimento, considerando-se a importância das mesmas, não apenas como recurso terapêutico, mas também como fonte de recursos econômicos.

## 7. CONCLUSÃO

O perfil químico do óleo resina de copaíba obtido por CG-AR apresentou 14 constituintes principais. Foi confirmada a presença de ácido copálico, sugerido como possível marcador químico deste óleo, e determinado o  $\beta$ -cariofileno como componente majoritário (31,4%) do mesmo.

O óleo resina de *C. langsdorffii* demonstrou atividade antifúngica fungicida frente as espécies de fungos dermatófitos *T. mentagrophytes* ATCC 11481 e *T. rubrum* CCT 5507. Para *T. mentagrophytes* (ATCC 11481) a CIM do óleo resina de copaíba foi igual à CFM, ambas iguais a 31,25  $\mu\text{g}$  de  $\beta$ -cariofileno.  $\text{mL}^{-1}$ . Para *T. rubrum* CCT 5507 a CIM do óleo teve atividade fungistática e a CFM foi o dobro desta, equivalentes, respectivamente, a 250 e 500  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  de  $\beta$ -cariofileno.

As eletromicrografias dos fungos não expostos a tratamentos e tratados com óleo resina de copaíba, cetoconazol e terbinafina sugeriram alterações na estrutura das hifas, principalmente.

Frente a potencial atividade fungicida *in vitro* apresentada pelo óleo resina de copaíba, sugere-se que estudos *in vivo* sejam realizados, a fim de confirmar sua utilidade como alternativa no tratamento antifúngico.



## REFERÊNCIAS

ADAMS, D. J. Fungal cell wall chitinases and glucanases. **Microbiology**, v. 150, p. 2029-2036, 2004.

AGRA, M. F.; SILVA, K. N.; BASÍLIO, I. J. L.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 457-508, 2008.

ALBUQUERQUE, U. P.; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, suplemento, p.678-689, 2006.

ALFONSO-GOLDFARB, A. M.; FERRAZ, M. H. M.; BELTRAN, M. H. R". Substitutos do "novo" mundo para as antigas plantas raras: um estudo de caso dos bálsamos. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1620-1626, 2010.

ALHO, C. J. R. Importância da biodiversidade para a saúde humana: uma perspectiva ecológica. **Estudos Avançados**, v. 26 , n. 74, p. 151-165, 2012.

ALIGIANIS N.; KALPOUTZAKIS E.; MITAKU S.; CHINOU I.B. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two *Origanum* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 4168-4170, 2001.

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

ALVES, J. M.; MUNARI, C. C.; MOREIRA NETO, M. A. B.; FURTADO, R. A.; SENEDESE, J. M.; BASTOS, J. K. et al. In vivo protective effect of *Copaifera langsdorffii* hydroalcoholic extract on micronuclei induction by doxorubicin. **Journal of Applied Toxicology**, 2012. Early view. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jat.2777/pdf>>.

AMARAL, C. D. P.; PEREIRA, D. I. B.; MEIRELES, M. C. A. Caracterização da microbiota por fungos filamentosos no tegumento hígido de bovinos de corte. **Ciência Rural**, v. 41, n. 12, p. 2137-2142, 2011.

AMIEL, E.; OFIR, R.; DUDAI, N.; SOLOWAY, E.; RABINSKY, T.; RACHMILEVITCH, S.  $\beta$ -caryophyllene, a compound isolated from the biblical balm of gilead (*Commiphora gileadensis*), is a selective apoptosis inducer for tumor cell lines. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, 8 p. 2012.

AQUINO, V. R.; CONSTANTE, C. C.; BAKOS, L. Frequência das dermatofitoses em exames micológicos em Hospital Geral de Porto Alegre, Brasil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 82, n. 3, p. 239-244, 2007.

ARAÚJO, A. J. G.; SOUZA, M. A. J.; BASTOS, O. M.; OLIVEIRA, J. C. Ocorrência de onicomicose em pacientes atendidos em consultórios dermatológicos da cidade do Rio de Janeiro, Brasil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 78, n. 3, p. 299-308, 2003.

ARAÚJO, C. R.; MIRANDA, K. C.; FERNANDES, O. F. L.; SOARES, A. J.; SILVA, M. R. R. *In vitro* susceptibility testing of dermatophytes isolated in Goiania, Brazil, against Five antifungal agents by broth microdilution method. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 51, n. 1, p. 9-12, 2009.

ARAÚJO, G. M. L.; FARIAS, R. P.; LIMA, M. L. F.; ARAÚJO, N. D.; CAVALCANTI, F. C. N.; BRAZ, R. A. F. S. Micoses superficiais na Paraíba: análise comparativa e revisão literária. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, n. 6, p.943-946, 2010.

ARAÚJO JR., F. A.; BRAZ, M. N.; NETO, O. G. R.; COSTA, F. D. C.; BRITO, M. V. H. Efeito do óleo de copaíba nas aminotransferases de ratos submetidos à isquemia e reperfusão hepática com e sem pré-condicionamento isquêmico. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 20, n. 1, p. 93-99, 2005.

AVANTE, M. L.; CAMPOS, C. P.; FERREIRA, M. M. G.; MARTINS, I. S.; ROSA, B. R. T.; SOUZA, G. D. P. et al. Dermatofitose em grandes animais. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, ano VII, n. 12, 2009.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of 292 essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.

BARROS, M. E. S.; HAMDAN, J. S. Determination of susceptibility/resistance to antifungal of *Tricophyton mentagrophytes* isolates by macrodilution method. **Journal of Medical Microbiology**, v. 51, n. 11, p. 983-987, 2005.

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

BEIFUSS, B. et al. Direct detection of five common dermatophyte species in clinical samples using a rapid and sensitive 24-h PCR–ELISA technique open to protocol transfer. **Mycoses**, v. 54, p. 137-145, 2009.

BENNET, J. E. Fármacos antimicrobianos: fármacos antifúngicos. In: BENNET, J. E. **Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica**, 10 ed. Rio de Janeiro: MacGraw-Hill, 2003. p. 859-875.

BIAVATTI, M. W.; DOSSIN, D.; DESCHAMPS, F. C.; LIMA, M. P. Análise de óleos-resinas de copaíba: contribuição para o seu controle de qualidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.2, p.230-235, 2006.

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

BLOISE, M.I. Óleos vegetais e especialidades da floresta amazônica. **Cosmetics Toiletries**, v. 15, p. 46-49, 2003.

BRITO, M. V. H.; MOREIRA, R. J.; TAVARES, M. L. C.; CARBALLO, M. C. S.; CARNEIRO, T. X.; SANTOS, A. A. S. Efeito do óleo de copaíba nos níveis séricos de uréia e creatinina em ratos submetidos à síndrome de isquemia e reperfusão renal. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 20, n. 3, 243-246, 2005.

BROOKS, G. F.; CARROL, K. C.; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A. **Jawetz, Melnick e Adelberg: Microbiologia Médica**. 24<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill Interamericana do Brasil Ltda., 2009. 817 p.

CABAÑES, F. J. Dermatophytes in domestic animals. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 17, p. 104-108, 2000.

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

CAMBUIM, I. I. F. N.; MACÊDO, D. P. C. M.; DELGADO, M.; LIMA, K. M.; MENDES, G. P.; SOUZA-MOTTA, C. M. et al.. Avaliação clínica e micológica de onicomicose em pacientes brasileiros com HIV/AIDS. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 1, p. 40-44, 2011.

CARVALHO, T. C.; SIMÃO, M. R.; AMBRÓSIO, S. R.; FURTADO, N. A. J. C.; VENEZIANI, R. C. S.; HELENO, V. C. G.; COSTA, F. B.; GOMES, B. P. F. A. et al. Antimicrobial activity of diterpenes from *Viguiera arenaria* against endodontic bacteria. **Molecules**, v. 16, p. 543-551, 2011.

CASCON, V.; GILBERT, B. Characterization of the chemical composition of oleoresins of *Copaifera guianensis* Desf., *Copaifera duckei* Dwyer and *Copaifera multijuga* Hayne. **Photochemistry**, v. 5, p.773-778, 2000.

CASTRO, H. G.; PERINI, V. B. M.; SANTOS, G. R.; LEAL, T. C. A. B. Avaliação do teor e composição do óleo essencial de *Cymbopogon nardus* (L.) em diferentes épocas de colheita. **Revista Ciência Agronômica**, v. 41, n. 2, p. 308-314, 2010.

CATALÁN, M.; MONTEJO, J. C. Antifúngicos sistêmicos. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 23, p. 39-49, 2006.

CHENG, S.; LIU, J.; HUANG, C.; HSUI, Y.; CHEN, W.; CHANG, S. Insecticidal activities of leaf essential oils from *Cinnamomum osmophloeum* against three mosquito species. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 457-464, 2009.

CIMANGA, K.; KAMBU, K.; TONA, L.; APERS, S.; DE BRUYNE, T.; TOTTE, J.; PIETER, L.; VLIETINCK, A. J. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79 n. 2, p.213-20, 2002.

CLSI. **Reference method for broth dilution susceptibility testing of filamentous fungi**; Approved Standard – second edition. CLSI document M38-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.

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

COELHO, I. M.; AQUINO-FERREIRA, R.; MAFFEI, C. M. L.; MARTINEZ-ROSSI, N. M. *In vitro* antifungal drug susceptibilities of dermatophytes microconidia e arthroconidia. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 62, p.758-761, 2008.

COPETO, S. C. M. F. **Contribuição para o diagnóstico molecular das onicomioses**. 2010. Xx f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas). Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa/Portugal, 2010.

COSTA, J. G. M.; RODRIGUES, F. F. G.; ANGÉLICO, E. A.; PEREIRA, C. K. B.; SOUZA, E. O.; CALDAS, G. F. R. et al. Composição química e avaliação da atividade antibacteriana e toxicidade do óleo essencial de *Croton zehneri* (variedade estragol). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 583-586, 2008.

CUENCA-ESTRELLA, M.; RODRIGUEZ-TUDELLA, J. L.; CÓRDOBA, S.; MELHEM, M. C.; SZESZS, M. W.; CASTAÑEDA, E. et al. Red Regional de Laboratorios para La vigilancia de lãs infecciones fúngicas invasoras y susceptibilidad a los antifúngicos. **Revista Panamericana de Salud Publica**, v. 23, n. 2, p. 129-134, 2008.

DAL POZZO, M.; VIÉGAS, J.; SANTURIO, D. F.; ROSSATO, L.; SOARES, I. H.; ALVES, S. H. et al. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos frente a *Staphylococcus* sp.. isolados de mastite caprina. **Ciência Rural**, v. 41, n. 4, 2011.

DALAZEN, D.; ZANROSSO, D.; WANDERLEY, L.; SILVA, N. L.; FUENTEFRIA, A. M. Comparação do perfil de suscetibilidade entre isolados clínicos de *Candida* spp. orais e vulvovaginais no Sul do Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n. 1, p. 33-38, 2011.

DARKES, M. J. M.; SCOTT, L. J.; GOA, K. L. Terbinafine – A review of its use in onychomycosis in adults. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 4, n. 1, p. 39-65, 2003.

DEL PALACIO, A.; GARAU, M.; CUÉTARA, M. S. Tratamiento actual de las dermatofitosis. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 19, p. 68-71, 2002.

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

DIOGO, H. C.; SARPIERI, A.; MELHEM, M.; PIRES, M. C. Avaliação do método de disco-difusão para determinação da eficácia da terbinafina *in vitro* em agentes de micoses superficiais e subcutâneas. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, n. 3, p. 324-330, 2010.

DURÁN, A.; NOMBELA, C. Fungal cell wall biogenesis: building a dynamic interface with the environment. **Microbiology**, v. 150, p. 3099–3103, 2004.

DUTRA, T. R.; GRAZZIOTTI, P. H.; SANTANA, R. C.; MASSAD, M. D. Desenvolvimento inicial de mudas de copaíba sob diferentes níveis de sombreamento e substratos. **Revista de Ciências Agrônômicas**, v. 43, n. 2, p. 321-329, 2012.

EL-KATTAN, A. F.; ASBILL, C. S.; KIM, N.; MICHNIAK, B. B. The effects of terpene enhancers on the percutaneous permeation of drugs with different lipophilicities. **International Journal of Pharmacology**, v.215, p.229-240, 2001.

ESPINNEL-INGROFF, A. Novel antifungal agents, targets or therapeutic strategies for the treatment of invasive fungal diseases: a review of the literature (2005-2009). **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 26, n. 1, p. 15-22, 2009.

ESTEVÃO, L. R. M. et al. Neoangiogênese de retalhos cutâneos em ratos tratados com óleo de copaíba. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 4, p. 406-412, 2009.

FOIL, C. S. Fungal diseases. **Clinical Dermatology**, v. 12, n. 4, p. 529-542, 1994.

FONTENELLE, R.O.S. Efeito antifúngico de óleos essenciais de *Lippia sidoides* Cham., *Croton argyrophylloides* Muell., *Croton zenhtneri* Pax et Hoffm., *Croton nepetaefolius* Baill., e de seus principais constituintes contra dermatófitos e *Candida spp.* isolados de cães. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) Universidade Estadual do Ceará, 2008.

FRIAS, D. F. R.; KOZUSNY-ANDREANI, D. I. Utilização de extratos de plantas medicinais e óleo de *Eucalyptus* no controle *in vitro* de *Microsporum canis*. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 15, n. 3, p. 119-125, 2010.

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

GARCIA-MARTOS, P.; RUIZ-ARAGÓN, J.; GARCÍA-AGUDO, L.; LINARES, M. Dermatofitosis por *Microsporium gypseum*: Descripción de ocho casos y revisión de la literatura. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 21, p. 147-149, 2004.

GIMÉNEZ, J. C. M. Nuevos aspectos clínicos de las dermatomicosis. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 16, p. 822-825, 1999.

GOMES, J. M. **Caracterização dos dermatófitos e leveduras isolados de lesões sugestivas de dermatomicoses em cães**. 2004. Dissertação (Programa de pós-graduação em Ciências Veterinárias). Universidade Estadual do Ceará/Fortaleza 2004, 93 p.

GONÇALVES, D. M.; ARAÚJO, J. H. B.; FRANCISCO, M. S.; COELHO, M. A.; FRANCO, J. M. Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato de *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 2, p. 197-202, 2011.

GOREN, A. C.; PIOZZI, F.; AKCICEK, E.; KIHÇ, T.; ÇARIKÇI, S.; MOZIOGLU, E.; SETZER, W. N. **Phytochemistry Letters**, v. 4, p. 448-453, 2011.

GRUJIC-JOVANOVIC, S.; SKAL TSA, H.D.; MARIN, P.; SOKOVIC, M. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of six *Stachys* species from Serbia. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 19, p. 139-144, 2004.

HAINER, B. L. Dermatophyte infections. **American Family Physician**, v. 67, n. 1, p. 101-108, 2003.

HAMAD, M. Innate and adaptive antifungal immune responses: partners on an equal footing. **Mycoses**, v. 55, p. 205-217, 2012.

HIBBETT, D. S.; BINDER, M.; BISCHOFF, J. F.; BLAKWELL, M.; CANNON, P. F.; ERIKSSON, O. E. et al. A higher-level phylogenetic classification of the *Fungi*. **Mycological Research III**, p. 509-547, 2007.

INSTITUTE FOR INTERNATIONAL COOPERATION IN ANIMAL BIOLOGICS. **Dermatophytosis, Ringworm, Tinea, Dematomyosis**. p. 1-6, 2005.

IZUMI, E.; UEDA-NAKAMURA, T.; VEIGA JR., V.; PINTO, A. C.; NAKAMURA, C. V. Terpenes from *Copaifera* Demonstrated in Vitro Antiparasitic and Synergic Activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, p. 2994-3001, 2012.

JAKOWSKA-KONSUR, A.; DYLAG, M.; HRYNCEWICZ-GWÓZDZ, A.; PLOMER-NIEZGODA, E.; SZEPIETOWSKI, J. C. A 5-year survey of dermatomycoses in southwest Poland, years 2003-2007. **Mycoses**, v. 54, p. 162-167, 2009.

JAQUES, R. J. S.; BENTO, F. M.; ANTONIOLLI, Z. I.; CAMARGO, F. A. O. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Ciência Rural**, v. 37, n. 4, p. 1192-1201, 2007.

KAZEMI, A. Tinea unguium in the North-West of Iran (1996-2004). **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 24, n. 2, p. 113-117, 2007.

LAFAYETTE, T. C. S.; OLIVEIRA, L. T.; LANDELL, M.; VALENTE, P.; ALVES, S. H.; PEREIRA, W. V. *Dipodascus capitatus* (*Geotrichum capitatum*): infecção sistêmica fatal em paciente com leucemia mielocítica aguda. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 5, p. 648-650, 2011.

LEANDRO, L. M.; VARGAS, F. S.; BARBOSA, P. C. S.; NEVES, J. K. O.; SILVA, J. A.; VEIGA-JUNIOR, V. F. Chemistry and biological activities of terpenoids from Copaiba (*Copaifera* spp.) oleoresins. **Molecules**, v. 17, p. 3866-3889, 2012.

LEE, S. J.; UMANO, K.; SHIBAMOTO, T.; LEE, K. G. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. **Food Chemistry**, v. 91, n. 1, p.131-7, 2005.

LEFEBVRE, S. L.; WALTER-TOEWS, D.; PEREGRINE, A. S.; REID-SMITH, R.; HODGE, L.; ARROYO, L. G. et al. Prevalence of zoonotic agents in dogs visiting hospitalized people in Ontario: implications for infection control. **Journal of Hospital Infection**, v. 62, p. 458-466, 2006.

LEME, F. C. O.; NEGREIROS, M. M. B.; KOGA, F. O.; BOSCO, S. M. G.; BAGAGLI, E.; HADDAD JUNIOR, V. Evaluation of pathogenic fungi occurrence in traumatogenic structures of freshwater fish. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 2, p. 182-185, 2011.

LIANG, Y.; XIE, P.; CHAN, K. Quality control of herbal medicines. **Journal of Chromatography B**, v. 812, p. 53-70, 2004.



LUQUE, A. G.; BIASOLI, M. S.; SORTINO, M. A.; LUPO, S. H.; BUSSY, R. F. Atypical *tinea corporis* caused by *Microsporumgypseum* in a subject with acquired immune deficiency syndrome. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v.15, p. 374-375, 2001.

MA, Y. M.; MA, Z. Q.; GUI, C. Q.; YAO, J. S.; SUN, R. Y. Hepatotoxicity and toxicokinetics of ketoconazole in rabbits. **Acta Pharmacologica Sínica**, v.24, n.8, p.778-782, 2003.

MACHADO, P. R. L.; ARAÚJO, M. I. A. S.; CARVALHO, L.; CARVALHO, E. M. Mecanismo de resposta imune às infecções. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 79, n. 6, p. 647-664, 2004.

MACIEL, M. A.; PINTO, A. C.; VEIGA JR., V. E. Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MACIEL, A. S.; VIANA, J. A. Dermatofitose em cães e gatos: uma revisão. **Clínica Veterinária**, v. 57, p. 74-82, 2005.

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. 73-778, 2012.

MARANHÃO, F. C. A. **Análise da expressão gênica no dermatófito *Tricophyton rubrum* mimetizando a infecção *in vitro*: pH e diferentes fontes de carbono regulando genes**. 2008. 117 f. Tese (Doutorado em Ciências: Área de concentração Genética) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo/São Paulo, 2008.

MARQUES, S. A.; CAMARGO, R. M. P.; FARES, A. H. G., TAKAHASHI, R. M.; STOLF, 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**, v. 80, n. 6, p. 597-602, 2005.

MATASYOH, J. C.; MAIYO, Z. C.; NGURE, R. M. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Coriandrum sativum*. **Food Chemistry**, v. 101, p. 1183-1187, 2008

MEINERZ, A. R. M.; CLEFF, M. B.; NASCENTE, P. S.; NOBRE, M. O.; SHUCH, L. F. D.; ANTUNES, T. A.; XAVIER, M. O.; MEIRELES, M. C. A. et al. Efeitos de doses elevadas da terbinafina e itraconazol em ratos Wistar. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 1, p. 105-109, 2007.

MENDÉZ-TOVAR, L. J.; GAYOSSO, P. M.; HERNÁNDEZ, V. V.; CHIU, B. M.; HERNÁNDEZ, F. H.; GONZÁLEZ, R. M. et al. Resistencia a compuestos azólicos de aislamientos clínicos *Trichophyton* spp. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 24, p. 320-322, 2007.

MENDONÇA, D. E.; ONOFRE, S. B. Atividade antimicrobiana do óleo-resina produzida pela copaíba - *Copaifera multijuga* Hayga (Leguminosae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2B, p. 577-581, 2009.

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

MENEZES T. O. A.; ALVES, A. C. B. A.; VIEIRA, J. M. S.; MENEZES, S. A. F.; ALVES, B. P. A.; MENDONÇA, L. C. V. Avaliação in vitro da atividade antifúngica de óleos essenciais e extratos de plantas da região amazônica sobre cepa de *Candida albicans*. **Revista de Odontologia da UNESP**, v.38, n. 3, p. 184-191, 2009.

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**, v. 13, especial, p. 628-632, 2011.

MOREIRA, F. A. B. C. L. **Estudo epidemiológico de factores associados ao diagnóstico laboratorial de dermatofitoses em *Oryctolagus cuniculus* no Norte e Centro de Portugal**. 2009. 51 f. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Veterinária, Universidade de Trás-Os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal, 2009.

MOYANO, E. G.; CRESPO-ERCHIGA, V.; GONZÁLEZ, J. B.; GARCIA, S. M. *Tinea cruris* (glutealis) de importación por *Trichophyton rubrum* var. *raubitschekii* em España. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 25, p. 250-253, 2008.

MUKERJHEE, P. K.; LEIDICH, S. D.; ISHAM, N.; LEITNER, I.; RYDER, N. S.; GHANNOUM, M. A. Clinical *Tricophyton rubrum* strain exhibiting primary resistance to Terbinafine. **Antimicrobials agents and Chemotherapy**, p. 82-86, 2003.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFAELLER, M. A. **Microbiologia Médica**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. 979p.

NEVES, R. C. S. M.; CRUZ, F. A. C. S.; LIMA, S. R.; TORRES, M. M.; DUTRA, V.; SOUSA, V. R. F. Retrospectiva das dermatofitoses em cães e gatos atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Mato Grosso, nos anos de 2006 a 2008. **Ciência Rural**, v. 41, n. 8, p. 1405-1410, 2011.

NETO, J. S. L.; GRAMOSA, N. V.; SILVEIRA, E. R. Constituintes químicos dos frutos de *Copaifera langsdorffii* Desf. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1078-1080, 2008.

NARISHETTY, S.T.K.; PANCHAGNULA, R. Transdermal delivery of zidovudine: effect of terpenes and their mechanism of action. **Journal Controlled Release**, v. 95, p. 367-379, 2004.

NOBRE, M. O.; MEIRELES, M. C.; NASCENTE, P. S.; FERREIRO, L. Drogas antifúngicas para pequenos e grandes animais. **Ciência Rural**, v. 32, n. 1, p. 175-184, 2002.

NWEZE, E. I.; OGBONNA, C. C.; OKAFOR, J. I. *In vitro* susceptibility testing of dermatophytes isolated from pediatric cases in Nigeria against five antifungals. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 49, n. 5, p. 293-295, 2007.

OLIVEIRA, J. A. A.; BARROS, J. A.; CORTEZ, A. C. A.; OLIVEIRA, J. S. R. L. Micoses superficiais na cidade de Manaus, AM, entre março e novembro/2003. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 81, p. 238-243, 2006.

OLIVEIRA, R. V. M.; OHARA, M. T.; VILA, M. M. D. C.; GONÇALVES, M. M. *In vitro* evaluation of copaiba oil as a kojic acid skin enhancer. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 2, 2010.

OSTROSKY-ZEICHNER, L. Invasive mycoses: diagnostic challengs. **The American Journal of Medicine**, v. 125, n. 1A, p. s14-s24, 2012.

OUTERBRIDGE, C. A. Mycologic disorders of the skin. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v. 21, p. 128-134, 2006.

PAIVA, L. A. F.; GURGEL, L. A.; De SOUZA, E. T.; SILVEIRA, E. R.; SILVA, R. M.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. N. Protective effect of *Copaifera langsdorffii* óleo-resin against acetic acid- induced colitis in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 93, n. 1, p. 51-56, 2004.

PALUMBO, M. I. P.; MACHADO, L. H. A.; PAES, A. C.; MANGIA, S. H.; MOTTA, R. G. Estudo epidemiológico das dermatofitoses em cães e gatos atendidos no serviço de dermatologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP – Botucatu. **Semina: Ciências Agrárias**, v.31, n. 2, p. 459-468, 2010.

PATEL, G. A.; SCHWARTZ, R. A. Tinea capitis: un unsolved problem? **Mycoses**, v. 54, n. 3, p. 183-188, 2011.  
 PAULA, J. A. M.; FERRI, P.H.; BARA, M. T. F.; TRESVENZOL, L. M. F.; SÁ, F. A. S., PAULA, J. R. Intraspecific chemical variability in the essential oils of *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L.R. Landrum (Myrtaceae). **Biochemical Systematics Ecology**, v. 39, n. 4-6, p. 643-650, 2011.

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

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* induced by essential oil from *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.42, p.233-242, 2011.

PERES, N. T. A.; ROSSI, A.; MARANHÃO, F. C. A.; MARTINEZ-ROSSI, N. M. Dermatofitos: interação patógeno-hospedeiro e resistência a antifúngicos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, n. 5, p. 657-667, 2010.

PIERI, F. A.; JOSÉ, R. M.; GALVÃO, N. N.; NERO, L. A.; MOREIRA, M. A. S. Antimicrobial activity of autoclaved copaiba oil on *Listeria monocytogenes*. **Ciência Rural**, v. 40, n. 8, p. 1797-1801, 2010a.

PIERI, F. A.; MUSSI, M. C.; FIORINI, J. E.; SCHNEEDORF, J. M. Efeitos clínicos e microbiológicos do óleo de copaíba (*Copaifera officinalis*) sobre bactérias formadoras de placa dental em cães. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 3, p. 578-585, 2010b.

PIERI, F. A.; MUSSI, M. C.; FIORINI, J. E.; MOREIRA, M. A. S.; SCHNEEDORF, J. M. Bacteriostatic effect of copaíba oil (*Copaifera officinalis*) against *Streptococcus mutans*. **Brazilian Dental Journal**, v. 23, n.1, p. 36-38, 2012a.

PIERI, F. A.; MUSSI, M. C.; MOREIRA, M. A. S. Óleo de copaíba (*Copaifera* sp.): histórico, extração, aplicações industriais e propriedades medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 4, p.465-472, 2009.

PIERI, F. A.; SILVA, V. O.; SOUZA, C. F.; COSTA, J. C. M.; SANTOS, L. F.; MOREIRA, M. A. S. Antimicrobial profile screening of two oils of *Copaifera* genus. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n. 1, p. 241-244, 2012b.

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, pp. 287-294, 1997.

PINTO, A. C.; BRAGA, W. F.; REZENDE, C. M.; GARRIDO, F. M. S.; VEIGA JÚNIOR, V. F.; BERGTER, L.; PATITUCCI, M. L.; ANTUNES, O. A. C. Separation of acid diterpenes of *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke by flash chromatography using potassium hydroxide impregnated silica gel. **Journal Brazilian Chemistry Society**, v. 11, p. 355-360, 2000.

PINTO, M. R.; BARRETO-BERGTER, E.; TABORDA C. P. Glycoconjugates and polysaccharides of fungal cell wall and activation of immune system. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 195-208, 2008.

PONTÓN, J. La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 25, p. 78-82, 2008.

PRADO, M. R. **Isolamento de *Microsporum canis*, *Malassezia spp.* e *Candida tropicalis* em cães: um destaque para teste de sensibilidade de *Malassezia pachydermatis in vitro***. 2007. 143 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2007.

PURIM, K. S. M.; NIEHUES, L. P.; FILHO, F. Q. T.; LEITE, N. Aspectos epidemiológicos das micoses dos pés de um time chinês de futebol. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 12, n. 1, 2006.

RAMADINHA, R. R.; REIS, R. K.; CAMPOS, S. C.; RIBEIRO, S. S.; PEIXOTO, P. V. Lufenuron no tratamento da dermatofitose em gatos? **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 2, p. 132-138, 2010.

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**, v. 40, n. 1, p. 13-16, p. 13-16, 2008.

RIGAMONTE-AZEVEDO, O. C.; WADT, P. G. S.; VEIGA JR, V. F.; PINTO, A. C.; REGIANI, A. A. Variabilidade química e física do óleo-resina de *Copaifera* spp. no sudoeste da Amazônia Brasileira. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, v. 8, n.2-3, p. 851-861, 2004.

RUIZ, L. R. B.; ZAITZ, C. Dermatofitos e dermatofitoses na cidade de São Paulo no período de agosto de 1996 a julho de 1998. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 76, n. 4, p. 391-401, 2001.

SACHETTI, C. G.; CARVALHO, R. R.; PAUMGARTTEN, F. J. R.; LAMEIRA, O. A.; CALDAS, E. D. Developmental toxicity of copaiba tree (*Copaifera reticulata* Ducke, Fabaceae) oleoresin in rat. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 1080-1085, 2011.

SAENZ, F. J. C. Capítulo 12: Identificación de hongos dermatofitos. In: PEMÁN, J.; MAZUELOS, E. M.; CALVO, M. C. R. Guia Práctica de Identificación y Diagnóstico em Micología Clínica. **Revista Iberoamericana de Micología**, 2007.

SANTOS, A. P.; ZATTA, D. T.; MORAES, W. F.; BARA, M. T. F.; FERRI, P. H.; SILVA, M. R. R. et al. Composição química, atividade antimicrobiana do óleo essencial e ocorrência de esteróides nas folhas de *Pterodon emarginatus* Vogel, Fabaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 6, p. 891-896, 2010.

SANTOS, A. O.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; VEIGA JÚNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; NAKAMURA, C. V. Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 3, p. 277-281, 2008.

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.

SEEBACHER, C.; BOUCHARA, J. P.; MIGNON, B. Updates on the Epidemiology of Dermatophyte Infections. **Mycopathologia**, v.166, p.335-352, 2008.

SEBBEN, A. M.; CARVALHO, A. C. M.; FREITAS, M. L. M.; MORAES, S. M. B.; GAINO, A. P. S. C.; SILVA, J. M. et al. Low levels of realized seed and pollen gene flow and strong spatial genetic structure in a small, isolated and fragmented population of the tropical tree *Copaifera langsdorffii* Desf. **Heredity**, v. 106, p. 134-145, 2011.

SELLAMI, I. H.; MAAMOURI, E.; THOURAYA, C.; WANNES, W. A.; KCHOUK, M. E.; MARZOUK, B. Effect of growth stage on the content and composition of the essential oil and phenolic fraction of sweet marjoram (*Origanum majorana* L.), **Industrial Crops and Products**, v.30, n.3, p.395-402, 2009.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; TELLES FILHO, F. Q.; MENDES, R. P.; COLOMBO, A. L.; MORETTI, M. L.; GRUPO DE CONSULTORES DO CONSENSO EM PARACOCCIDIOIDOMICOSE. Consenso em paracoccidiodomicose. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 3, p. 297-310, 2006.

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

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

SILVA, R. F. Curso de Atualização – Micoses. Capítulo 8 – Infecções fúngicas em imunocomprometidos. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 36, n. 1, p. 142-147, 2010.

SIMPANYA, M. F. Dermatophytes: Their taxonomy, ecology and pathogenicity. **Revista Iberoamericana de Micologia**, p. 1-12, 2000.

SIQUEIRA, E. R.; FERREIRA, J. C.; PEDROSO, R. S.; LAVRADOR, M. A. S.; CANDIDO, R. C. Dermatophyte susceptibilities to antifungal azole agents *in vitro* by broth macro and microdilution methods. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 50, n. 1, p. 1-5, 2008.

SINGH, R.; SHUSHNI, M. A. M.; BELKHEIR, A. Antibacterial and antioxidant activity of *Mentha piperita* L.. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 4, n. 1, p. 1-20, 2011.

SOARES, M. M. S. R.; CURY, A. E. *In vitro* of antifungal and antiseptic agents against dermatophyte isolates from patients with *Tinea pedis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, p. 130-134, 2001.

SOUZA, A. B.; DE SOUZA, M. G.; MOREIRA, M. A.; MOREIRA, M. R.; FURTADO, N. A.; MARTINS, C. H. et al. Antimicrobial evaluation of diterpenes from *Copaifera langsdorffii* oleoresin against periodontal anaerobic bacteria. **Molecules**, v. 16, n. 11, p. 9611-9619, 2011a.

SOUZA, A. B.; MARTINS, C. H.; SOUZA, M. G.; FURTADO, N. A.; HELENO, V. C.; DE SOUSA, J. P.; ROCHA, E. M. et al. Antimicrobial activity of terpenoids from *Copaifera langsdorffii* Desf. against cariogenic bacteria. **Phytoterapy Research**, v. 25, n. 2, p. 215-220, 2011b.

SOUZA, H. Q.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S. Seleção de *Basidiomycetes* da Amazônia para produção de enzimas de interesse biotecnológico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 28, suplemento, p. 116-124, dez. 2008.

SOUZA, L. K. H.; OLIVEIRA, C. M. A.; FERRI, P. H.; SANTOS, S. C.; OLIVEIRA JR., J. G.; MIRANDA, A. T. B.; LIÃO, L. M.; SILVA, M. R. R. Antifungal properties of brazilian cerrado plants. **Journal of Microbiology**, v. 33, p. 247-249, 2002.

SOUZA, M. M. R. S.; SILVA, C. A. B.; PASCHOALIN, E. L.; MOURA JÚNIOR, J. A.; PASCHOALIN, R. P.; OLIVEIRA, E. P. Bacteremia por *Chryseobacterium indologenes* em diabético em hemodiálise ambulatorial. **Jornal Brasileiro de Patologia Médica e Laboratorial**, v. 48, n. 1, p. 29-31, 2012.

SOUZA-MOREIRA, T. M.; SALGADO, H. R. N.; PIETRO, R. C. L. R. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 3, p. 435-440, 2010.

SPRINGFIELD, E. P.; EAGLES, P. K. F.; SCOTT, G. Quality assessment of South African herbal medicines by means of HPLC fingerprinting. **Journal of Ethnopharmacology**, v.101, p. 75-83, 2005.

STUPP, T.; FREITAS, R. A.; SIERAKOWSKI, M. R.; DESCHAMPS, F. C.; WISNIEWSKI JR, A.; BIAVATTI, M. W. Characterization and potential uses of *Copaifera langsdorffii* seeds and seed oil. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 99, p. 2659- 2663, 2008.



TAPPIN, M. R. R.; PEREIRA, F. G. J.; LIMA, L. A.; SIANI, A. C. Análise química quantitativa para a padronização do óleo de copaíba por cromatografia em fase gasosa de alta resolução. **Química Nova**, v. 27, n. 2, p. 236-240, 2004.

THE UNIVERSITY OF ADELAIDE. **Micology Online**, 2011. Disponível em: <<http://www.mycology.adelaide.edu.au/gallery/index.html>>. Acesso em: 25 out. 2011.

TIZZANI, P.; GALLO, G.; PEANO, A.; MOLINAR MIN, A.; MARTÍNEZ-CARRASCO P.; MENEGUZZ, P. G. Dermatophytosis caused by *Microsporum canis* in Eastern cottontail (*Sylvilagus floridanus*). **European Journal of Wildlife Research**, v. 53, p. 238-240, 2007.

TOMAZ, D. Será fungo? **Revista Portuguesa de Clínica Geral**, v. 27, p. 96-108, 2011.

USTULIN, M.; FIGUEIREDO, B. B.; TREMEA, C.; POTT, A.; POTT, V. J.; BUENO, N. R. et al. Plantas medicinais comercializadas no Mercado Municipal de Campo Grande – MS. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 3, p. 805-813, 2009.

VALDÉS, B. S. G. Estructura y actividad de los antifúngicos. **Revista Cubana de Farmacia**, v. 39, n. 2, p. 1-15, 2005.

VEIGA JR., V. F.; PATITUCCI, M. L.; PINTO, A. C. Controle de autenticidade de óleos de copaíba comerciais por cromatografia de alta resolução. **Química Nova**, v. 20, n. 6, p. 612-615, 1997.

VEIGA JR., V. F.; PINTO, A. O gênero *Copaifera* L. **Química Nova**, v. 25, n. 2, p. 273-286, 2002.

VEIGA JR., V. F.; PINTO, A.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VEIGA JR., V. F.; ROSAS, E. C.; CARVALHO, M. V.; HENRIQUES, M. G. M. O.; PINTO, A. C. Chemical composition and anti-inflammatory of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne - A comparative study. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, p. 248-254, 2007.

VIEGAS, C. S. C. **Exposição a fungos dos trabalhadores dos ginásios com piscina**. 2010. 312 f. Tese (Doutoramento em Saúde Pública) – Escola Nacional de Saúde Pública, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa / Portugal, 2010.

VIEIRA, H. S.; TAKAHASHI, J. A.; BOAVENTURA, M. A. Novel derivatives of ent-17, 19-dihydroxy-16, $\beta$ -kaurane obtained by biotransformation with *Verticillium lecanii*. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 50, p. 3704-3707, 2002.

VIEIRA, R. C.; BOMBARDIERE, E.; OLIVEIRA, J. J.; LINO-JÚNIOR, R. S.; BRITO, L. A. B.; JUNQUEIRA-KIPNIS, A. P. Influência do óleo de *Copaifera langsdorffii* no reparo de ferida cirúrgica em presença de corpo estranho. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 8, p. 358-366, 2008.

VILA, R.; SANTANA, A. I.; PÉREZ-ROSÉS, R.; VALDERRAMA, A.; CASTELLI, M. V.; MENDONÇA, S. et al. Composition and biological activity of the essential oil from leaves of *Plinia cerrocampaensis*, a new source of  $\alpha$ -bisabolol. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 2510-2514, 2010.

VYZANTIADIS, T. A.; JOHNSON, E. M.; KIBBLER, C. From the patient to the clinical mycology laboratory: how can we optimise microscopy and culture methods for mould identification? **Journal of Clinical Pathology**, p. 2-9, 2012.

ZAGNOLI, A.; CHEVALIER, B.; SASSOLAS, B. Dermatophyties et dermatophytes. **Pédiatrie**, v. 2, p. 96-116, 2004.

WAGNER, D. K.; SOHNLE, P. G. Cutaneous defenses against dermatophytes and yeasts. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8, n. 3, p. 317, 1995.

WANKE, B. Quimioterapia de micoses profundas. **Ars Cvrandi**, v. 21, n. 2, p.90-94, 1988.

WEINSTEIN, A.; BERMAN, B. Topical Treatment of Common Superficial *Tinea* Infections. **American Family Physician**, v.65, n.10, p.2095-2103, 2002.

WILLIAMS, A. C.; BARRY, B. W. Penetration enhancers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, p. 603-618, 2004.

WIRK, B.; WINGARD, J. R. Assessing responses to treatment of opportunistic mycoses and salvage strategies. **Current Infectious Disease Reports**, published online, 2011.

YOURICK, J. J.; BRONAUGH, R. L. (Eds.). Percutaneous penetration as it relates to the safety evaluation of cosmetic ingredients. In \_\_\_\_\_: **Percutaneous absorption** - Drugs, cosmetics, mechanisms, methodology. 3.ed. New York: Marcel Dekker, 1999. p.659-671.

ZRIMSEK, P.; KOSS, J.; PINTER, L.; DROBNIC-KOSOROKS, M. Serum-specific antibodies in rabbits naturally infected with *Trichophyton mentagrophytes*. **Medical Mycology**, v.41, p.321-329, 2003.