

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE

CENTRO DE EDUCAÇÃO E SAÚDE

UNIDADE ACADÊMICA DE ENFERMAGEM

CURSO DE BACHARELADO EM ENFERMAGEM

MARIA ISLAINE DE OLIVEIRA LIMA

**EFEITO PROMISSOR DO LINALOL FRENTE À
PATOGENICIDADE DE *Trichophyton rubrum* RESISTENTES
A FLUCONAZOL**

Cuité-PB

2017

MARIA ISLAINE DE OLIVEIRA LIMA

**EFEITO PROMISSOR DO LINALOL FRENTE À PATOGENICIDADE DE
Trichophyton rubrum RESISTENTES A FLUCONAZOL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Unidade Acadêmica de Enfermagem da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito obrigatório para obtenção de título de Bacharel em Enfermagem.

Orientador: Prof. Dr. Fillipe de Oliveira Pereira

Cuité-PB

2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA NA FONTE
Responsabilidade Jesiel Ferreira Gomes – CRB 15 – 256

L732e Lima, Maria Islaine de Oliveira.

Efeito promissor do linalol frente á patogenicidade de Trichophyton rubrum resistentes a fluconazol. / Maria Islaine de Oliveira Lima. – Cuité: CES, 2017.

45 fl.

Monografia (Curso de Graduação em Enfermagem – Centro de Educação e Saúde / UFCG, 2017.

Orientador: Fillipe de Oliveira Pereira.

1. Antifúngico. 2. Trichophyton rubrum. 3. Linalol. 4. Cetoconazol. I. Título.

Biblioteca do CES - UFCG

CDU 315.281.9

MARIA ISLAINE DE OLIVEIRA LIMA

**EFEITO PROMISSOR DO LINALOL FRENTE À PATOGENICIDADE DE
Trichophyton rubrum RESISTENTES A FLUCONAZOL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Unidade Acadêmica de Enfermagem da Universidade
Federal de Campina Grande, como requisito
obrigatório para obtenção de título de Bacharel em
Enfermagem.

Aprovado em ____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fillipe de Oliveira Pereira
Universidade Federal de Campina Grande
Orientador

Prof. Dra. Alana Tamar Oliveira de Sousa
Universidade Federal de Campina Grande
Examinador

Prof. Dra. Igara Oliveira Lima
Universidade Federal de Campina Grande
Examinador

Cuité-PB

2017

**À minha querida mãe e aos meus irmãos por todo
apoio, incentivo e amor.
Ao meu orientador, por todo seu empenho a mim,**

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida e por me proporcionar motivos de existência quando na caminhada apenas visualizava pedras, e com sua infinita bondade, dava-me paciência e perseverança para seguir. Agradeço por estar comigo todos os dias, me proporcionando dias mais belos.

Dedico os meus agradecimentos a minha guerreira e batalhadora mãe Noêmia de Lima, por ser meu porto seguro, por toda dedicação durante toda minha vida e principalmente na academia, por toda paciência, cumplicidade e sorrisos construtores.

A meus irmãos Aurimar, Aureliano, Isaurislânia e Islane por toda dedicação, empenho e por todas as palavras sábias.

Agradeço aos meus cunhados e minha cunhada que contribuíram para minha carreira profissionalizante.

A toda a minha família, que de forma direta e indireta, estiveram presente.

As famílias Cavalcanti e Farias, que me proporcionaram os primeiros passos para vida acadêmica e sempre estiveram presentes, sendo, minha segunda família.

A Joaquim Francisco, por acreditar em mim, pelas palavras sabia e de fortaleza, e por estar ao meu lado em todos os momentos.

Aos meus amigos Ananda Sabrina, Débora Rodrigues, Danielle Pereira, Carlos Emmanuel, Daguia Monteiro, Maíra Calvacanti, Maísa Calvacanti, Marton Kaique, por fazerem presente durante todo meu percurso. E aos demais não citados, que contribuíram de forma significativa.

Agradeço de maneira calorosa ao meu orientador e amigo Fillipe Pereira, que me proporcionou a oportunidade de andarmos juntos dentro da Universidade, sem ausência de dedicação e paciência. Por toda troca de conhecimentos e por acreditar em mim.

A todos os professores da academia que contribuíram para minha formação acadêmica e por todos os ensinamentos.

A EREMPBMG por todos os conhecimentos proporcionados e pelas amizades construídas.

As professoras que aceitaram participar da minha banca de defesa de trabalho.

Agradeço aos meus companheiros de laboratório Aldeir Sabino, Gezaildo dos Santos, Hellen Pontes, Gustavo Nunes, Kaltz Victor, Mara Rúbia e todos que fazem parte do grupo GPFungos, por toda parceria durante a execução dos trabalhos para a conclusão desta pesquisa.

Agradeço imensamente a Universidade Federal de Campina Grande – Campus Cuité, por permitir realizar a conclusão do curso de forma brilhante.

Agradeço ao diretor da UFCG – Cuité, José Justino Filho e ao vice-diretor Marciano H. de Lucena Neto, pela dedicação e suporte.

Muito obrigada!

“A sabedoria suprema é ter sonhos bastante grandes para não se perderem de vista enquanto os perseguimos.”

William Faulkner

RESUMO

LIMA, M. I. O. **Potencial antifúngico de linalol sobre isolados clínicos de *trichophyton rubrum* resistentes a fluconazol** 2017. 45 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Enfermagem) - Universidade Federal de Campina Grande, Cuité, 2017.

Trichophyton rubrum é responsável por elevados índices de quadros de dermatofitoses. Este é um tipo de infecção fúngica que acomete tecidos queratinizados como unhas, pele e couro cabeludo. Desta maneira, é necessária a busca de estudos com novos agentes terapêuticos, com destaque para os produtos naturais a exemplo de terpenos. Este estudo investigou as atividades do linalol, um monoterpene alcoólico com potencial atividade antifúngica, frente aos isolados clínicos de *T. rubrum*. Inicialmente, foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM) de linalol e cetoconazol por microdiluição, em meio RPMI 1640. Em seguida, foi avaliada a ação do linalol nas concentrações 128 µg/mL (1/2CIM), 256 µg/mL (CIM), 512 µg/mL (2XCIM) e para o azólico cetoconazol em 4 µg/mL (1/2CIM), 8 µg/mL (CIM), 16 µg/mL (2xCIM) sobre o crescimento micelial de *T. rubrum* LM 305, os quais apresentaram atividade inibitória diferindo estatisticamente do controle ($p < 0,05$). Posteriormente, o efeito da droga-teste sobre a conidiogênese foi analisado, mostrando efeito inibitório ($p < 0,05$), destacando sua concentração de 512 µg/mL que foi semelhante a do cetoconazol. Por fim, observou-se a atividade antifúngica sobre a germinação dos conídios ($p < 0,05$) e, mais uma vez, o linalol apresentou ação inibitória semelhante ao cetoconazol. Com isso, pode-se concluir que o linalol é um agente antifúngico com grande potencial contra *T. rubrum*, um agente importante nas dermatofitoses.

Palavras-chave: *Trichophyton rubrum*, linalol, cetoconazol, antifúngico.

ABSTRACT

LIMA, M. I. O. Antifungal potentiation of linalool on clinical isolates of *trichophyton rubrum* resistant to fluconazole 2017. f. Course Completion Work (Undergraduate Nursing) - Federal University of Campina Grande, Cuité, 2017.

Trichophyton rubrum is responsible for high rates of dermatophytosis. This is a type of fungal infection that affects keratinized tissues such as nails, skin and scalp. In this way, it is necessary to search for studies with new therapeutic agents, with emphasis on natural products such as terpenes. This study investigated the activities of linalool, an alcoholic monoterpene with potential antifungal activity, against clinical isolates of *T. rubrum*. Initially, minimal inhibitory concentration (MIC) of linalool and ketoconazole were determined by microdilution in RPMI 1640 medium. The action of linalool at concentrations of 128 µg / mL (1 / 2MIC), 256 µg / mL), 512 µg / mL (2xMIC), and for azole ketoconazole in 4 µg / mL (1 / 2MIC), 8 µg / mL (MIC), 16 µg / mL (2xMIC) on the mycelial growth of *T. rubrum* LM 305 , which presented inhibitory activity differing statistically from the control (p <0.05). Subsequently, the effect of the test drug on conidiogenesis was analyzed, showing inhibitory effect (p <0.05), highlighting its concentration of 512 µg / mL, which was similar to that of ketoconazole. Finally, antifungal activity on conidia germination (p <0.05) was observed, and once again, linalool presented a similar inhibitory action to ketoconazole. Thus, it can be concluded that linalool is an antifungal agent with great potential against *T. rubrum*, an important agent in dermatophytosis.

Keywords: *Trichophyton rubrum*, linalool, ketoconazole, Antifungal.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Macromorfologia de <i>Trichophyton rubrum</i> cultivados em ágar batata dextrose. ...	18
Figura 2- Morfologia de <i>Trichophyton rubrum</i> (aumento 400x).	19
Figura 3- <i>Tinea unguium</i> causada por <i>Trichophyton rubrum</i>	20
Figura 4- <i>Tinea pedis</i> causada por <i>Trichophyton rubrum</i>	21
Figura 5- <i>Tinea capitis</i> causada por <i>Trichophyton rubrum</i>	21
Figura 6- Estrutura química dos triazólicos.....	24
Figura 7- Estrutura química do linalol.....	27
Figura 8- Crescimento radial do micélio <i>Trichophyton rubrum</i> LM 305 na presença e ausência de linalol e cetoconazol.	34
Figura 9- Efeitos de linalol e cetoconazol sobre a conidiogênese de <i>Trichophyton rubrum</i> LM 305.....	35
Figura 10- Efeitos de linalol e cetoconazol sobre a germinação dos conídios de <i>Trichophyton rubrum</i> LM 305.....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Valores de concentração inibitória mínima (CIM) de linalol e cetoconazol sobre cepas de <i>Trichophyton rubrum</i>	32
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ABD	Ágar Batata Dextrose
ASD	Ágar Sabouraud Dextrose
CIM	Concentração Inibitória Mínima
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio Padrão
NaCl	Cloreto de Sódio
CES	Centro de Educação e Saúde
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
EUA	Estados Unidos da América
UAS	Unidade Acadêmica de Saúde
UFMG	Universidade Federal de Campina Grande
°C	Grau Célsius
mL	Mililitro
µL	Microlitros
µg/mL	Micrograma por Mililitro
µm	Micrômetro
%	Percentual

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL.....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
3.1 DERMATOFITOSSES E <i>Trichophyton rubrum</i>	17
3.2 TRATAMENTO FARMACOLÓGICO	22
4 MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1 LOCAL DE TRABALHO	28
4.2 DROGAS-TESTE.....	28
4.3 CEPA FÚNGICA	28
4.4 MEIOS DE CULTURA.....	28
4.5 INÓCULO	29
4.6 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA	29
4.7 EFEITOS SOBRE O CRESCIMENTO MICELIAL	30
4.8 EFEITOS SOBRE A CONIDIOGÊNESE	30
4.9 EFEITOS SOBRE A GERMINAÇÃO DOS CONÍDIOS	31
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	31
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
6 CONCLUSÕES	38
REFERÊNCIAS	39
ANEXO	45

1 INTRODUÇÃO

Dermatofitose é um tipo de infecção cutânea produzida por dermatófitos, um grupo de fungos queratinofílicos que normalmente infectam tecidos queratinizados do corpo humano, como unhas, pele e cabelo (BALTAZAR et al., 2013). Embora a diversidade encontrada na frequência de espécies de dermatófitos no Brasil seja evidenciada em diversos trabalhos, registros epidemiológicos apontam *Trichophyton rubrum* como um dos principais agentes causadores de dermatofitoses em humanos em todo o mundo (HAVLICKOVA et al., 2008; ACHTERMAN et al., 2012).

T. rubrum é um fungo antropofílico que recentemente se tornou o mais comum e largamente distribuído dermatófito que acomete o homem (SOARES et al., 2014). É um dos dermatófitos mais comumente isolados de micoses superficiais, com distribuição mundial, sendo responsável por grande parte dos casos de dermatofitoses em humanos, com reconhecida resistência à terapêutica local (HAVLICKOVA et al., 2008; SEEBACHER et al., 2008).

Além das lesões cutâneas, também é descrito a ocorrência de processos infecciosos mais profundos envolvendo *T. rubrum*. Geralmente, indivíduos imunodeficientes, em uso prolongado de corticosteroides, de quimioterapia e drogas imunossupressoras em transplantados são os mais acometidos (WU et al., 2013).

O tratamento das dermatofitoses tem sido motivo de muita preocupação em todo o mundo, justificada principalmente pelo aumento no número de casos e aparecimento de linhagens resistentes aos principais antifúngicos utilizados na terapêutica. As dermatofitoses causadas por *T. rubrum* são de difícil tratamento, pois há poucos números de antifúngicos disponíveis clinicamente para controlar esta infecção (BITENCOURT et al., 2013). Além disso, a eficácia terapêutica pode ser prejudicada porque geralmente as infecções são associadas com elevada recidiva. Especificamente, *T. rubrum* tem desenvolvido fenômenos de resistência aos principais agentes antifúngicos (PERES et al., 2010; DEISING et al., 2008).

Ainda nesse aspecto, *T. rubrum* é conhecido por representar quase 70% de todas as infecções dermatofíticas e a incidência das infecções ocasionadas por esta espécie não se modificou nas últimas décadas, apesar da eficácia de muitos antifúngicos inseridos no mercado (GHELARDI et al., 2014).

Com relação à população mundial, as dermatofitoses afetam cerca de 25%, e estima-se que uma parcela de 10 a 15% pode ser infectada no decorrer da sua vida. Estudos indicam que conforme o avanço da idade, a doença torna-se mais incidente e 30 a 70% dos indivíduos adultos podem ser portadores assintomáticos (CORDEIRO, 2015). A mesma autora ainda relata que no Brasil, há diferentes distribuições dos dermatófitos conforme a região.

Ainda menciona que em São Paulo, a incidência de dermatofitoses em um hospital público local, constatou um total de 32,7% dos casos clínicos, em estes apresentavam resultados positivos para tais fungos. No estado de Santa Catarina, pesquisadores verificaram que a espécie *T. mentagrophytes* correspondia ao agente etiológico encontrado em 52% dos casos de dermatofitoses, seguida de *T. rubrum* (17%). Outra análise, na região centro-oeste, mostrou que de 445 isolados de dermatófitos, 49,4% correspondiam a *T. rubrum*, 30,8%.

Desta forma, o cuidado de pessoas com dermatofitoses representa um grande desafio, principalmente para os enfermeiros que lidam diretamente com a higiene corporal e realização de curativos, é constante encontrar pacientes com este tipo de problema, sobretudo em unhas e nas regiões interdigitais.

Pesquisas relatam que as dermatofitoses são comuns em pacientes diabéticos, imunodeprimidos e que fazem uso de corticoides (ALQUINO et al., 2007). Ademais apontam resistência desse problema.

Assim, a educação em saúde para os pacientes de como proceder ao tratamento, a persistência na aplicação do produto pelo tempo determinado e proteção da área para prevenção de novos traumas devem estar aliados ao uso de substâncias eficazes.

Com isso, é notável pesquisas em busca de novos agentes virem intensificando-se continuamente. Neste contexto, muitos estudos de atividade antifúngica têm sido realizados com produtos naturais, a exemplo de terpenos. Estes são compostos presentes em óleos essenciais de uma ampla variedade de plantas aromáticas. Dentre eles, os monoterpenos se destacam por serem dotados de uma grande diversidade estrutural e potencial antimicrobiano (BAKKALI et al., 2008).

Neste estudo, foi investigada a atividade antifúngica do monoterpeno linalol, um constituinte classificado como monoterpenos, frente a cepas de *T. rubrum* resistentes a fluconazol. Poucas informações a respeito dos efeitos inibitórios de linalol sobre os conídios e crescimento micelial da espécie em questão ainda existem na literatura. Fatores relevantes como esses que em conjunto, nos impulsionam para a realização deste projeto de pesquisa.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a atividade antifúngica *in vitro* de linalol frente a cepas de *Trichophyton rubrum*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a concentração inibitória mínima de linalol e cetoconazol (controle positivo).
- Avaliar o efeito das drogas-teste sobre a conidiogênese, germinação de conídios e crescimento micelial das cepas ensaiadas.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 DERMATOFIToses E *Trichophyton rubrum*

Os fungos abrangem grupo de micro-organismo heterotróficos, que vivem em associação com outros micro-organismos, apresentando atuações como sapróbrios, parasitas e com menor frequência, como simbioses (OLIVEIRA et al., 2011). São seres estudados como agentes que causam doenças tanto em humanos, animais e plantas, bem quanto na indústria de alimentos e medicamentos como contaminantes ou produtores de substâncias tóxicas (ENGELKIRK; DUBEN-ENGELKIRK, 2012). As dermatofitoses em seres humanos são causadas por várias espécies de fungos dermatófitos pertencentes aos gêneros *Trichophyton*, *Microsporum* ou *Epidermophyton* (ANJU, 2015).

Dermatófito tem a denominação concedida ao grupo de fungos filamentosos que apresentam características taxonômicas, fisiológicas, morfológicas e de antigenidades semelhantes. Apresenta capacidade de colonizar tecidos queratinizados como unhas, pelos e estrato córneo, esses micro-organismos são os agentes causadores das micoses superficiais conhecidas como dermatofitoses (CARDEIRO, 2015).

Essas são infecções cutâneas causadas por fungos queratinofílicos, que estão distribuídos entre os gêneros *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*. Desta forma, as dermatofitoses tornou-se um tipo de infecção comum na população humana, particularmente em indivíduos idosos, diabéticos ou imunocomprometidos (GHELARDI et al., 2014; CORDEIRO, 2015).

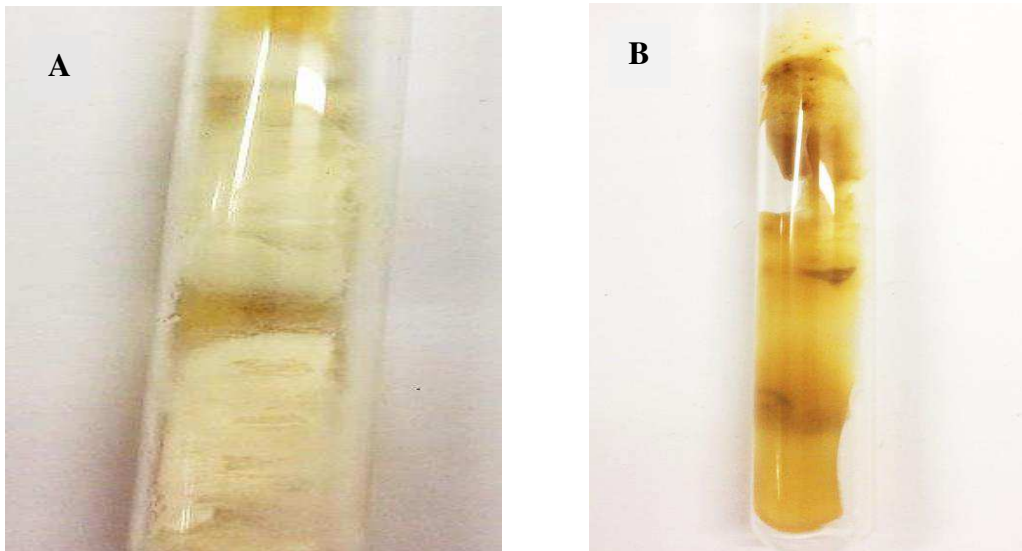
De acordo com o *habitat* primário e afinidade por hospedeiros, os dermatófitos podem ser classificados em três grupos: geofílicos, zoofílicos e antropofílicos. Desta forma, as manifestações clínicas das dermatofitoses são relacionadas tanto aos agentes etiológicos quanto ao hospedeiro. Assim, os dermatófitos zoofílicos normalmente acometem infecções em animais ou associam a estes, mas que ocasionalmente infectam seres humanos. Os dermatófitos geofílicos são associados principalmente a materiais queratinosos como pelos, penas, cascos e chifres. Por sua vez, as infecções ocasionadas pelos dermatófitos antropofílicos se relacionam a seres humanos e raramente infectam outros animais, causando respostas inflamatórias bem menores no hospedeiro do que aquelas causadas pelos dois

outros grupos de fungos. (DAMÁZIO, 2006; MARTINEZ-ROSSI et al.,2008; LOPES, 2016).

Portanto, as dermatofitoses podem ser transmitidas através do contato direto com animais e homens ou pelo contato indireto através de fômites contaminados. Os aspectos clínicos apresentam-se de forma bastante variada, que depende da espécie do fungo, sítio anatômico do local da infecção e resposta inflamatória ao hospedeiro (LOPES, 2016).

Trichophyton rubrum é um fungo antropofílico que recentemente se tornou o mais comum e largamente distribuído dermatófito que acomete o homem. Do ponto de vista morfológico, *T. rubrum* é um fungo com uma taxa de crescimento lenta, tornando-se completamente maduro em torno de 14 dias. Suas colônias são macias, brancas, algumas vezes tornam-se roseadas no decorrer do seu envelhecimento, o reverso da colônia pode se encontrar corado de vermelho ou amarelo (Fig.1). Possui escassos macroconídios, de tamanho variável e forma de charuto. Suas hifas são hialinas, septadas com microconídios em forma de gota, com aproximadamente 2-3 por 3-5 μm , dispostos ao longo das hifas (GRÄSER et al, 2000).

Figura 1- Macromorfologia de *Trichophyton rubrum* cultivados em ágar batata dextrose.



Fonte: Lima (2016).

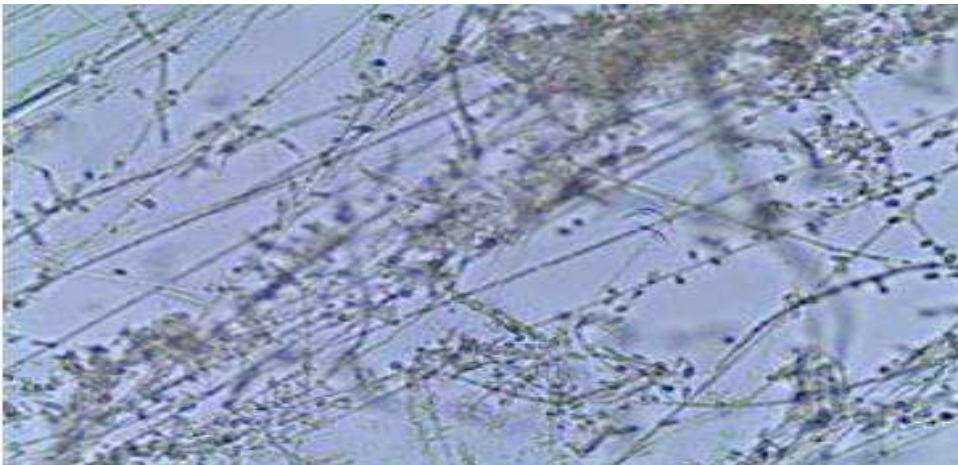
A: Colônias macias e brancas no verso. **B:** coloração amarelada no reverso da cepa.

A patogenia das dermatofitoses é iniciada pela inoculação de conídios ou artroconídios. Sendo assim, a infecção da pele é estabelecida por meio do contato entre artroconídios e estrato córneo. A adesão de fungos a células hospedeiras é mediada por adesinas fúngicas e suas interações com hospedeiros (BALDO et al., 2011).

Neste sentido, os dermatófitos são fornecidos com um arsenal de proteases visando à digestão da rede de queratina em oligopéptidos assimiláveis ou aminoácidos (TAINWALA; SHARMA, 2011). Desse modo, os dermatófitos iniciam o processo de adesão quando se fixam à superfície do tecido queratinizado, atingindo a epiderme através da germinação de conídios, conseqüentemente, as hifas entram no estrato córneo. Há uma dependência do tempo para aumentar o número de conídios aderentes (WALAILAK; TECH 2015).

Portanto, as formações dos conídios ocorrem a partir de hifas fragmentadas (Fig. 2) que se expandem para formação de um novo material, ou, quando formam conídios dentro de uma hifa e há síntese de material novo (McLAUGHLIN; SPATAFORA, 2013). No entanto, os conídios de *T. rubrum* são considerados uma das maneiras de estabelecer a dermatofitose tanto em seres humanos quanto em animais. Eles aderem nos tecidos queratinizados onde irá ocorrer o processo da germinação, conseqüentemente, a invasão do estrato córneo. Desse modo, as hifas podem crescer em múltiplas direções e formar o micélio (ANJU, et al, 2015).

Figura 2- Morfologia de *Trichophyton rubrum* (aumento 400x).



Fonte: Oliveira (2014)

Esses fungos ao ocasionar doenças em seres humanos, eles precisam alcançar o hospedeiro, aderir a tecidos específicos, resistir aos mecanismos do sistema imune e proliferar a uma dada extensão do tecido, onde a doença é revelada clinicamente (ODDS, 2000).

Sabendo que o principal agente causador das dermatofitoses nos países desenvolvidos é *T. rubrum*, em particular, representam a maior parte das dermatofitoses superficiais, como a *Tinea pedis* e a *Tinea unguium* (onicomicose). A predominância da espécie antropofílica na etiologia das infecções fúngicas superficiais é relacionado ao aumento da mobilidade populacional, da migração e do turismo, bem como da diversidade de atividades e hábitos sociais (HRYNCEWICZ-GWO'Z'DZ et al., 2013; MARTINEZ et al., 2012).

Tinea unguium é identificada como onicomicoses causada por dermatófitos na unha (Fig.3). A onicomicose aparece como branco exterior (cavidades fora da unha) e subungueais (infecção abaixo da placa ungueal), normalmente se fixam a ponta da unha do pé e se espalham pela matriz das unhas (SALMON; FULLER, 2013; SHARMA, et al., 2015).

Figura 3- *Tinea unguium* causada por *Trichophyton rubrum*.



Fonte: Salmon e Fuller (2013).

Tinea pedis é uma infecção muito observada desde o início da adolescência até a fase adulta, afetando tanto as solas dos pés quanto os espaços interdigitais (Fig. 4). As manifestações apresentadas no decorrer do processo infeccioso são o prurido e o derramamento de escamas de pele, que se apresenta inchada e rachada. Há predominância

da dor e inflamação, que se diferencia como a formação de vesículas e pústulas (SALMON; FULLER, 2013; SHARMA, et al., 2015).

Figura 4- *Tinea pedis* causada por *Trichophyton rubrum*.



Fonte: Salmon e Fuller (2013).

Já a *Tinea capitis* ocorre predominantemente em crianças. A infecção é iniciada pela invasão do folículo piloso e da pele circulante. Nesta lesão, os cabelos, próximos da área da pele apresentam-se quebradiços, e nas áreas tonsuradas pode conter ainda fragmentos de cabelos fixos, como pode ser visualizado na figura 5 (SALMON; FULLER, 2015; LOPES, 20016).

Figura 5- *Tinea capitis* causada por *Trichophyton rubrum*.



Fonte: Salmon e Fuller (2013).

Registros epidemiológicos relatam que *T. rubrum* é um dos dermatófitos mais comumente isolados de micoses superficiais em humanos. Trabalhos desenvolvidos por pesquisadores da América do Sul e do Norte, além das regiões Norte e Central da Europa colocam este micro-organismo como sendo um dos mais comumente isolado em casos de dermatofitoses nessas regiões e com reconhecida resistência à terapêutica local (HERNÁNDEZ-SALAZAR et al., 2007; HAVLICKOVA et al., 2008; SEEBACHER et al., 2008).

3.2 TRATAMENTO FARMACOLÓGICO

Os antimicrobianos são fármacos que apresentam propriedade de suprir o crescimento do patógeno ou destruí-los e cuja utilização na prática clínica modificou o curso natural, melhorando o prognóstico das doenças infecciosas. Estes fármacos podem ser utilizados de forma profilática e terapêutica, porém seu emprego crescente e indiscriminado tem se tornado um fator para o aumento das cepas microbianas resistentes (CARNEIRO, et al., 2011).

Deste modo, uma escolha adequada e satisfatória do tratamento das dermatofitoses é necessária à determinação do sítio e extensão da infecção, da espécie envolvida, tão bem quanto pela eficácia, segurança e biodisponibilidade dos fármacos, podendo ser tratadas topicamente, sistemicamente ou associando-se ambas as formas de tratamento (GUPTA; COOPER, 2008).

Na maioria das vezes, o tratamento das dermatofitoses é avaliado inicialmente pela resposta imune apresentada pelo hospedeiro. A infecção é iniciada quando o dermatófito ultrapassa os mecanismos de defesa do organismo ou evita suas respostas imunológicas. Portanto, faz-se necessário à utilização de drogas fungicidas ou fungistáticas que atuem no agente infeccioso evitando futuros danos ao hospedeiro (LOPES, 2016).

Desta forma, os fármacos com propriedades queratinófila e lipofílica, quando administrado em doses mais elevadas, terão efeito reservatório e conduzirá a uma melhor depuração micológica (SHOO; MAHAJAN, 2016).

Existem duas classes principais de agentes antifúngicos para o tratamento de dermatofitoses: os azóis e as alilaminas, juntamente com griseofulvina, ciclopirox e tolnaftato. Esses estão disponíveis nas formas oral e tópica. A classe azol de antifúngicos incluem imidazóis tais como bifonazol, clotrimazol, econazol, cetoconazol, luliconazol, miconazol,

sertaconazol e tioconazol, e triazóis tais como fluconazol, isavuconazol, itraconazol, posaconazol, ravuconazol, voriconazol, luliconazol e lanconazol. Já os antifúngicos Alilamina, por sua vez, incluem amorolfina, butenafina, naftifina e terbinafina (GHANNOUM, 2016).

Destes, destacam-se na utilização clínica para o tratamento das dermatofitoses o grupo dos compostos azólicos o que possui maior aplicabilidade clínica. Os azólicos de maior aplicabilidade compreendem os fármacos imidazólicos como o cetoconazol e drogas da classe dos triazólicos a exemplo do itraconazol e fluconazol (GUPTA; COOPER, 2008).

O cetoconazol e outros compostos azólicos eles tem a capacidade de causar efeitos colaterais devido a sua ação sobre vias enzimáticas que metabolizam esteroides no hospedeiro. Ao fazer uso de terapias prolongadas com azóis, alguns efeitos colaterais podem ser ocasionados a exemplo da diminuição na síntese de testosterona ou glicocorticoides e hepatotoxicidade. Diante deste aspecto, é preciso ter precauções no seu uso sistêmico em longo prazo no tratamento de micoses extensas ou de difícil tratamento como as onicomioses. Este antifúngico possui como apresentação em comprimidos de 200 mg, e sua administração é realizada por via oral (FERREIRA, et al., 2013; VANDEPUTTE et al., 2012).

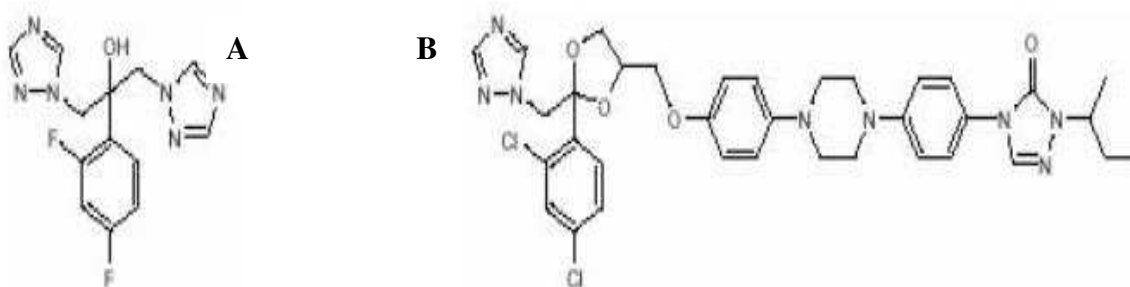
Com relação ao fluconazol (Fig.6) que é um antifúngico triazólico, apresenta atuação na inibição da síntese de esteroide fúngico e praticamente não modifica a síntese de ergosterol dos mamíferos, sendo, portanto, considerado menos tóxico e melhor absorvido que os outros azóis. Atualmente este antifúngico vem sendo utilizado rotineiramente por pacientes humanos que apresentam micoses superficiais e sistêmicas. Deste modo, o antifúngico expõe elevado mecanismo de resistências às cepas fúngicas, principalmente em indivíduos imunossuprimidos (NOBRE et al., 2002; NETT; ANDES, 2016).

Ele demonstra alta biodisponibilidade, aproximadamente 90%, e sua absorção não é afetada pela acidez ou alimento. Atualmente, existem 2 formulações orais, comprimido e pó para suspensão, e uma solução intravenosa. As dosagens recomendadas não são afetadas pela via de administração. A apresentação deste antifúngico é expresso em comprimidos com 50, 100 e 150 mg, e sua administração ocorre por via oral (NOBRE et al., 2002; FERREIRA et al., 2013; NETT; ANDES, 2016).

Itraconazol (Fig. 6) é um derivado triazólico sintético, que apresenta ampla ação nas micoses superficiais e sistêmicas. O antifúngico tem como apresentação cápsula de 100 mg, e sua administração ocorre por via oral. Esta apresenta biodisponibilidade superior, próxima de

80% e a absorção de itraconazol não é afetado pela acidez gástrica ou pela ingestão de alimentos (FFERREIRA et al., 2013; NETT; ANDES, 2016).

Figura 6- Estrutura química dos triazólicos.



Fonte: Vandeputte et al., 2012.

A: Estrutura do fluconazol. **B:** Estrutura do itraconazol.

A eficácia no tratamento com antifúngicos pode ser prejudicada porque as dermatofitoses ocasionadas por *T. rubrum* geralmente são associadas com elevada recidiva e resistência às drogas. Assim como outros micro-organismos, as células fúngicas possuem uma grande habilidade de desenvolver resistência a compostos tóxicos (MICELI et al., 2011; PERES et al., 2010). Especificamente, *T. rubrum* tem desenvolvido fenômenos de resistência aos principais agentes antifúngicos.

Diante disto, o tratamento das dermatofitoses tem sido motivo de muita preocupação em todo o mundo, justificada principalmente pelo aumento no número de casos e aparecimentos de linhagens resistentes aos principais antifúngicos utilizados na terapêutica (BAKKALI et al., 2008; ANJU, 2015).

No entanto, o homem tornou-se o principal responsável pelo aparecimento de micro-organismos resistentes, isto, devido às atitudes incoerentes, falta de informações e até mesmo o uso irracional de antimicrobianos (FIOL et al., 2010).

O arsenal de drogas antifúngicas em uso clínico pode estar relacionado ao número limitado de fármacos derivados de cinco classes antifúngicas disponíveis. Alguns destes fármacos apresentam toxicidade e desenvolvimento de mecanismo de resistência, devido ao tratamento intensivo com drogas antifúngicas. Portanto, há uma necessidade clara e urgente de novos compostos alternativos para terapia antifúngica (SVETAZ et al., 2010).

Os produtos naturais, designados por metabólitos secundários são uma fonte essencial e respeitável de fármacos originados da flora e da fauna. Contemporaneamente, muitos destes metabólitos secundários são importantíssimos para a produção de numerosos medicamentos, coadjuvando novas estratégias com produtos químicos medicinais e naturais para a descoberta de medicamentos inovadores (DAVID et al., 2015; MIKHAILOV et al., 2016).

Desse modo, os medicamentos à base de plantas apresentam bioatividades e são benéficos para a saúde humana, tendo em vista que são derivados da maior biodiversidade da terra. Esses produtos naturais encontrados em plantas medicinais podem atenuar eficientemente os efeitos colaterais de doenças graves, por exemplo, e aliviar os efeitos da onco-quimioterapia ou da radioterapia (DAVID et al., 2015).

Sendo assim, as plantas são fontes importantes de moléculas biologicamente ativas que podem ser utilizadas como modelo para a síntese e obtenção de novos fármacos. Na área de agentes antimicrobianos, é notável o número de drogas derivadas de produtos naturais para uso clínico ou como agente saneante de ambientes (BRAZ FILHO, 2010; NEWMAN; CRAGG, 2007).

Portanto, o estudo e a descoberta de produtos naturais que apresentam como princípio ativo atividade antimicrobiana intrínseca ou combinada a exemplo dos antibióticos/antifúngicos de uso comum podem apresentar mecanismos inovadores diante dos produtos sintéticos, torna-os menos estável ao mecanismo de resistência. Dessa forma, indústrias farmacêuticas poderão intervir cada vez mais na produção, como também no uso de fitoterápicos com adjuvantes para o tratamento contra agentes infecciosos ou outras doenças (COUTINHO, 2008).

Sabendo que os produtos naturais são oriundos das plantas e apresentam atividades antifúngicas, podem-se destacar os óleos essenciais e seus componentes. Os óleos essenciais são compostos aromáticos, voláteis e hidrofóbicos. São obtidos a partir de várias partes de plantas, tais como flores, brotos, sementes, folhas, galhos, cascas, madeiras, frutos e raízes. Os principais componentes dos óleos essenciais são mono e sesquiterpenos, incluindo carboidratos, fenóis, álcoois, éteres, aldeídos e cetonas responsáveis pela atividade biológica, bem como para a sua fragrância (TABASSUM; VIDYASAGAR et al., 2013).

É dentro desse contexto que muitos estudos de atividade antifúngica têm sido realizados com produtos naturais, a exemplo de terpenos. Estes são compostos presentes em óleos essenciais de uma ampla variedade de plantas aromáticas. Dentre eles, os monoterpenos se

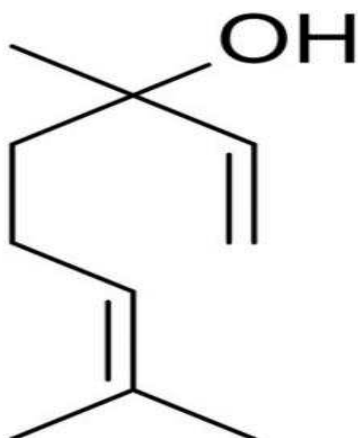
destacam por serem dotados de uma grande diversidade estrutural e potencial antimicrobiano (BAKKALI et al., 2008; GUPTA; COOPER, 2008). Entre os terpenos, os compostos) e o classificados como monoterpenos são os mais representativos, geralmente encontrados na maioria dos óleos essenciais e dotados de uma grande diversidade estrutural (SIMÕES; SPITZER, 2007; BAKKALI et al., 2008).

Algumas atividades biológicas são descritas para drogas do tipo terpenos, entre elas podem-se destacar a atividade sobre o sistema nervoso central, antibacteriano, antifúngico, repelente, inseticida, antineoplásica, antioxidante e larvicida (PADUCH et al., 2007; BAKKALI et al., 2008).

Neste estudo, foi utilizado o linalol (3,7-dimetil-1,6-octadien-3-ol) visto na Figura 7, um constituinte classificado como monoterpeno, formado pela união de duas unidades de isopreno (C₁₀). Apresenta aroma floral que é normalmente encontrado como um componente volátil primária dos óleos essenciais de várias plantas aromáticas, incluindo lavanda (*Lavandula angustifolia*), bergamota (*Citrus bergamia* manjerição (*Ocimum basilicum* L.). Além disso, o linalol é um ingrediente comum na fragrância que é usada nos produtos de higiene e agentes de limpeza, sendo amplamente usado como um ingrediente de perfumaria, além de outras propriedades, incluindo anti-inflamatório, anti-nociceptiva, e anticonvulsivo, inibidor reversível da acetilcolinesterase, repelente de insetos, como também na utilização cicatrização de feridas (HS et al., 2013; SOKOVIC et al., 2012; BAIER et al., 2014).

Ainda neste sentido, algumas atividades biológicas são descritas para o linalol, entre elas podem-se destacar a atividade antibacteriana (KLEIN et al., 2014), propriedades ansiolíticas e de melhoria na socialização e comportamento agressivo de camundongos (LINCK et al., 2010; CLINE et al., 2008), atividade antiolesterolêmica por reduzir a expressão de 3-hidroxi-3-metilglutarilCoA redutase (CHO et al., 2011) e atividade anticonvulsivante (SOUSA et al., 2010).

Figura 7- Estrutura química do linalol



Fonte: Elsharif et al., 2015.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LOCAL DE TRABALHO

O trabalho foi realizado no Laboratório de Bioquímica e no Laboratório de Microbiologia, ambos da Unidade Acadêmica de Saúde do Centro de Educação e Saúde, da Universidade Federal de Campina Grande, Campus Cuité-PB.

4.2 DROGAS-TESTE

Linalol e cetoconazol foram adquiridos da Sigma-Aldrich[®]. As soluções foram preparadas no momento de execução dos testes, dissolvendo-os primeiramente em 100 µL dimetilsulfóxido (DMSO) a 100% e utilizando água destilada esterilizada em quantidade suficiente para obter a concentração inicial de 1024 µg/mL. A partir desta concentração, foram feitas diluições seriadas em razão de dois até alcançar a concentração de 1 µg/mL utilizando o próprio meio RPMI 1640.

4.3 CEPA FÚNGICA

Para os ensaios de atividade antifúngica, foram selecionadas cepas de *T. rubrum* obtidas da coleção do Laboratório de Micologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal da Paraíba. Estas cepas foram originadas de amostras biológicas de diversos sítios anatômicos, codificadas como: *T. rubrum* LM 62 (isolada de unhas), *T. rubrum* LM 148 (isolada de couro cabeludo), *T. rubrum* LM 341 (isolada de couro cabeludo), *T. rubrum* LM 498 (isolada de pele) e *T. rubrum* LM 305 (isolada de pele), sendo esta aduzida no estudo. O perfil de sensibilidade das cepas foi estabelecido (dados não mostrados), onde todas apresentam resistência a fluconazol e 5-fluorocitosina (LIMA et al., 2017 – Anexo I). Todas as cepas foram mantidas em tubos de ensaio contendo ágar batata dextrose inclinado sobre refrigeração (8°C), no Laboratório de Bioquímica do CES (UFCG).

4.4 MEIOS DE CULTURA

Os meios de cultura que foram utilizados são os meios sólidos ágar Sabouraud dextrose (ASD) e ágar batata dextrose (ABD), os quais foram solubilizados com água destilada e

esterilizados em autoclave, a 121°C por 15 minutos, conforme normas do fabricante (Difco®). O meio líquido RPMI 1640 com glutamina e sem bicarbonato também foram utilizados e preparados de acordo o documento M38-A do CLSI (2002).

4.5 INÓCULO

Para induzir a formação de conídios, as cepas fúngicas foram cultivadas em ABD a 28°C por 7 dias. As recentes colônias fúngicas foram cobertas com solução salina estéril (NaCl 0,9 %), e as suspensões feitas por suaves agitações com auxílio de uma pipeta de transferência. A mistura resultante de conídios e fragmentos de hifas foi transferida para tubos de ensaio esterilizados. Após agitação de 15 segundos, cada suspensão foi deixada em repouso por 3-5 minutos e o sobrenadante foi recolhido em tubos de ensaio estéreis. As densidades das suspensões de cada cepa foram ajustadas em espectrofotômetro a 520 nm para um valor de 70-72% de transmitância, a qual corresponde a um inóculo de aproximadamente $0,5 - 5 \times 10^6$ unidades formadoras de colônias em 1 mL (UFC/mL) (CLSI, 2002; SANTOS et al., 2006).

4.6 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

A determinação da CIM das drogas-teste foi realizada pela técnica de microdiluição, utilizando placas de microtitulação contendo 96 cavidades com fundo chato (CLSI, 2002; SANTOS, 2006). Em cada linha da placa, foram adicionados 100 µL das drogas-teste duplamente concentradas diluídas em RPMI 1640. Em cada cavidade da placa, foram adicionados 100 µL do inóculo previamente preparado, diluído em RPMI 1640 na proporção 1:50. Um controle fúngico foi realizado substituindo as drogas-teste por solução salina esterilizada (controle de crescimento). Um controle de esterilidade também foi realizado, colocando-se apenas o meio de cultura, sem o inóculo. Para verificar a ausência de interferência nos resultados pelo DMSO utilizado na preparação das soluções, foi feito um controle com DMSO na concentração usada para a solubilização das drogas acrescido do inóculo e do meio de cultura. As placas foram seladas e incubadas a 28°C por até 7 dias para a realização da leitura. Os valores de CIM foram determinados pela análise visual da inibição do crescimento em cada cavidade. A CIM é definida como a menor concentração das drogas

(produto natural ou droga-padrão) capaz de inibir 100% o crescimento fúngico observado nas cavidades. Critérios foram estipulados para categorizar o poder antimicrobiano dos óleos essenciais com base em valores de CIM. Drogas com uma CIM 500 mg / mL são consideradas como tendo uma forte atividade antimicrobiana, uma CIM entre 500 mg / mL e 1500 mg / mL mostra atividade moderada e um CIM > 1500 mg / mL é considerado como tendo atividade fraca (SANTOS; HAMDAN, 2005; SARTORATTO, et al, 2004).

4.7 EFEITOS SOBRE O CRESCIMENTO MICELIAL

A análise da interferência das drogas-teste sobre o crescimento micelial foi realizada pela medição do crescimento micelial radial em meio sólido. Para isto, inicialmente foram preparadas placas de Petri com 10 mL de ASD acrescido das drogas-teste nas concentrações 128 µg/mL (1/2CIM), 256 µg/mL (CIM), 512 µg/mL (2XCIM) e 4 µg/mL (1/2CIM), 8 µg/mL (CIM), 16 µg/mL (2XCIM), para o linalol e cetoconazol, respectivamente. Em seguida, um fragmento de aproximadamente 5 mm do micélio das cepas fúngicas recém cultivadas foram colocadas no centro da placa contendo o ASD. Um controle negativo foi também realizado na ausência de qualquer droga. Todo o sistema foi incubado a 28°C por um tempo total de 7 dias, quando a cada dia o crescimento micelial radial foi registrado (KHAN; AHMAD, 2010).

4.8 EFEITOS SOBRE A CONIDIOGÊNESE

Os efeitos das drogas-teste sobre a produção de conídios pelas cepas fúngicas foram analisados após cultivo das cepas em ASD na ausência e presença de diferentes concentrações das drogas- teste de linalol 128 µg/mL (1/2CIM), 256 µg/mL (CIM), 512 µg/mL (2XCIM) e cetoconazol 4 µg/mL (1/2CIM), 8 µg/mL (CIM), 16 µg/mL (2xCIM), conforme Tzortzakis e Economakis (2007). Em tubos de ensaio, foram vertidos 10 mL de ASD fundido e ajustado na temperatura de 35°C em banho-maria. Em seguida, foi adicionada a droga com o objetivo de alcançar diferentes concentrações. Um experimento controle sem adição dos produtos ao ASD fundido também foi realizado. Os fungos foram cultivados na superfície do meio e as placas incubadas a 28°C por 7 dias. Após período de incubação, os conídios foram coletados adicionando 5 mL de solução salina estéril sobre a superfície das colônias fúngicas, e após suaves agitações com auxílio de uma pipeta de

transferência. O inóculo foi analisado em um hemocitômetro para contagem do número de conídios em cada grupo testado.

4.9 EFEITOS SOBRE A GERMINAÇÃO DOS CONÍDIOS

Em tubos de ensaio estéreis, 500 μL do CSD acrescido das drogas-teste em diversas concentrações para o linalol 128 $\mu\text{g/mL}$ (1/2CIM), 256 $\mu\text{g/mL}$ (CIM), 512 $\mu\text{g/mL}$ (2xCIM) e o cetoconazol 4 $\mu\text{g/mL}$ (1/2CIM), 8 $\mu\text{g/mL}$ (CIM), 16 $\mu\text{g/mL}$ (2xCIM), foram homogeneamente misturadas com 500 μL da suspensão dos conídios fúngicos e imediatamente incubados a temperatura de 28°C. Amostras dessa mistura foram tomadas após 24h para análise. O número de conídios germinados e não germinados foi determinado em cada grupo experimental, utilizando um hemocitômetro. O percentual de conídios germinados foi calculado para cada grupo experimental. Um controle com ausência das drogas-teste foi utilizado (PEREIRA et al., 2011).

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os experimentos foram realizados em triplicata. Os valores de CIM serão expressos pela média geométrica. Os resultados dos ensaios que avaliaram os efeitos das drogas-teste sobre o crescimento micelial, a conidiogênese e a germinação dos conídios foram expressos como média \pm desvio padrão (DP). A avaliação estatística destes resultados foi feita empregando-se o teste t não pareado para determinar diferenças significantes, quando um valor de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente foram realizados os testes para determinar a CIM do linalol e cetoconazol frente às cepas de *T. rubrum*, e seus valores encontram-se expressos na tabela 1. Como resultados obtidos, nota-se que o linalol foi capaz de inibir o crescimento fúngico frente às cepas *T. rubrum* LM 62, LM 148, LM 305 e LM 341 na concentração 256 µg/mL, e para a cepa LM 498 na concentração 512 µg/mL, enquanto que o cetoconazol frente as cepas *T. rubrum* LM 62 e LM 305 inibiu na concentração 8 µg/mL, e para as cepas LM 148, LM 341 e LM 498 a inibição ocorreu na concentração 4 µg/mL. Deste modo, a droga em estudo comprova o potencial de inibição sobre a cepa analisada.

Ainda, para confirmar a viabilidade do teste, foram realizados testes controles, onde foi possível atestar, em primeiro momento, o crescimento dos fungos na ausência da droga, onde o crescimento fúngico foi detectado quando todas as cepas que foram cultivadas na ausência de drogas, confirmando a viabilidade do inóculo. Em seguida, foi observado o não crescimento dos fungos quando utilizado apenas o meio de cultura sem a presença do inóculo, evidenciando a esterilidade do meio de cultura e, por fim, a não interferência do crescimento do fungo nas concentrações testadas, quando foi utilizado o DMSO.

Tabela 1- Valores de concentração inibitória mínima (CIM) de linalol e cetoconazol sobre cepas de *Trichophyton rubrum*.

Cepas	CIM (µg/mL)*	
	Linalol	Cetoconazol
LM 62	256	8
LM 148	256	4
LM 305	256	8
LM 341	256	4
LM 498	512	4

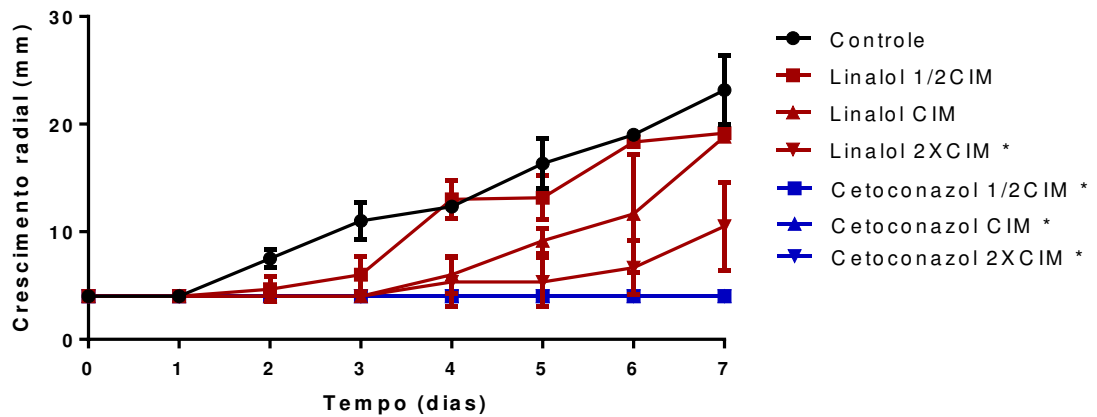
*Média geométrica de três experimentos.

A literatura mostra uma grande disponibilidade de linalol em óleos essenciais de várias espécies de plantas, como em manjeriço (*Ocimum basilicum* L.). Carvalho Filho et al. (2006) afirmam que o óleo essencial de manjeriço, com alta concentração de linalol, é valorizado no mercado internacional e amplamente usado na indústria de condimentos e cosméticos. A propriedade do óleo *O. basilicum* L. é conhecida pela sua cicatrização de feridas, e, portanto, é usado no tratamento de infecções fúngicas (SOKOVIC et al., 2012). Segundo Ranünz (2004), o linalol tem sido amplamente usado como compostos de partida para várias sínteses importantes como a do acetato de linalila, e testado com acaricida, bactericida e fungicida. O mesmo terpeno apresentou também uma atividade inibitória contra as espécies de *Candida*, interrompendo a biossíntese de ergosterol e a integridade da membrana dos fungos, bem como a inibição da extração de H⁺ (KHAN; AHMAD, 2010).

Linalol demonstrou atividade antifúngica sobre *Candida albicans*, agindo diretamente na parede fúngica e impedindo seu desenvolvimento (HSU et al., 2013). Ainda, mostrou igualmente frente a cepas de *C. krusei*, alterando a parede celular e outras estruturas celulares dessa levedura (TABASSUM; VIDYASAGAR, 2013). Embora seja relatada a atividade antifúngica de linalol na literatura, não há relatos sobre o seu poder inibitório sobre *T. rubrum*.

Após determinação da CIM, foram realizados testes para averiguar a interferência de linalol e cetoconazol sobre o crescimento micelial, formação e germinação de conídios de *T. rubrum* LM 305. Para analisar seus efeitos sobre o crescimento micelial realizou-se o ensaio de crescimento micelial radial. No último dia de análise (sétimo dia), pôde-se perceber que linalol inibiu o crescimento micelial na concentração 2xCIM (512 µg/mL) quando comparado ao controle ($p < 0,05$), conforme Figura 8. Da mesma forma, todas as concentrações de cetoconazol também inibiram o crescimento micelial ($p < 0,05$), inclusive de forma mais forte que o linalol quando se compararam suas respectivas concentrações.

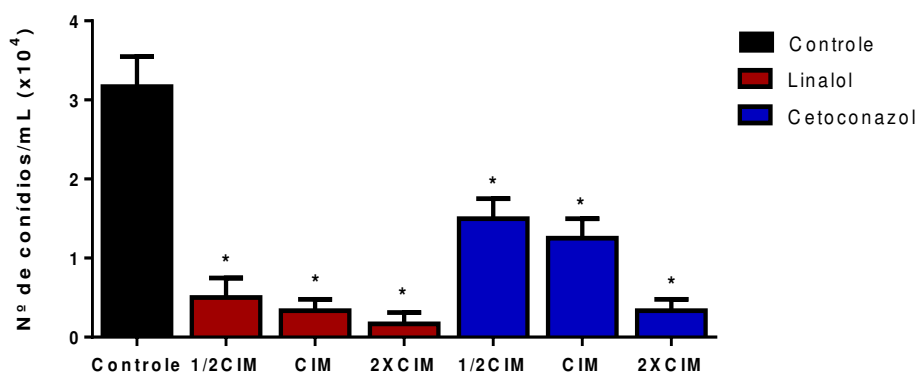
Figura 8- Crescimento radial do micélio *Trichophyton rubrum* LM 305 na presença e ausência de linalol e cetoconazol.



*Comparado ao controle ($p < 0,05$).

Após analisar os efeitos sobre o crescimento micelial, jugou-se necessário avaliar a interferência de linalol e cetoconazol sobre a conidiogênese e germinação de conídios de *T. rorum* LM 305. Foi perceptível que tanto o linalol quanto o cetoconazol inibiram a formação de conídios em todas as concentrações testadas quando comparadas ao controle ($p < 0,05$), conforme a figura 9.

Figura 9- Efeitos de linalol e cetoconazol sobre a conidiogênese de *Trichophyton rubrum* LM 305.



*Comparado ao controle ($p < 0,05$)

É importante mencionar que o micélio é caracterizado como um conjunto de células que formam hifas septadas ou um segmento do micélio. Deste modo, para que ocorra o crescimento fúngico é necessário o transporte e assimilação de nutrientes, que em seguida ocorrerá à divisão celular e conseqüentemente aumento da biomassa fúngica (WALKER; WHITE, 2005).

Aderência de dermatófitos aos tecidos do hospedeiro, seguidos de germinação dos conídios e crescimento fúngico são passos importantes no estabelecimento das maiores das infecções e um pré-requisito para dermatofitoses. As camadas mais profundas da epiderme são penetradas por hifas que produzem e se ramificam, se estabelecendo paralelamente às camadas celulares. Desta forma, as hifas fúngicas que invadirem as estruturas queratinizadas revelam clinicamente o processo infeccioso (BRAND, 2011; BALDO et al., 2011).

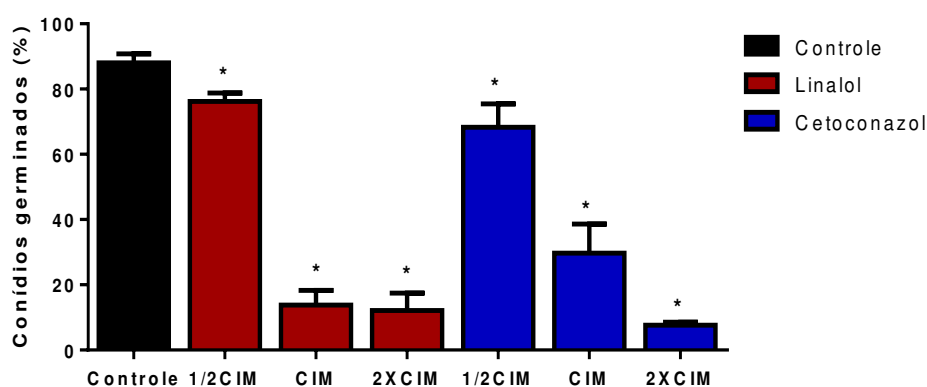
Os conídios fúngicos são propágulos assexuados formados de diversas maneiras a partir de hifas conidiogênicas. Durante a germinação dos conídios, eles apresentam um crescimento isotrópico com posterior crescimento celular polarizado, originando hifas fúngicas posterior ao inchaço (MICHAEL et al, 1996; GRIMM et al., 2005). *T. rubrum* produz numerosos conídios assexuados os quais são considerados a causa primária das infecções no hospedeiro. Ao penetrar na pele com auxílio de uma área escoriada, os conídios

podem germinar e se desenvolver até formar o micélio, causando danos aos tecidos (BALDO et al., 2011; ACTHERMAN; WHITE, 2012).

Segundo Anju et al. (2015), conídios em *T. rubrum* são considerados o principal meio de estabelecimento de dermatofitose em humanos e animais. Atualmente o tratamento tem sido motivo de preocupação, justificado pela dificuldade de tratamento devido ao aparecimento de linhagens resistente aos principais fármacos. Portanto, é importante a busca de novas alternativas que bloqueiem esta etapa de germinação dos conídios. Os óleos essenciais e seus produtos são conhecidos por causar alterações morfológicas e fisiológicas em fungos provocando falta de conidiogênese, despigmentação e desenvolvimento aberrante de conidióforos (SHARMA; TRIPATHI, 2008; MOREIRA et al, 2010).

Considerando isto, a atividade antifúngica de linalol e o cetoconazol sobre a germinação de conídios em *T. rubrum* LM 305 foi avaliada e está apresentada na Figura 10. Os resultados mostram que todas as concentrações do linalol e cetoconazol foram igualmente capazes de inibir a germinação, diferindo estatisticamente do controle ($p < 0,05$).

Figura 10- Efeitos de linalol e cetoconazol sobre a germinação dos conídios de *Trichophyton rubrum* LM 305.



*Comparado ao controle ($p < 0,05$)

A germinação é iniciada pelo inchaço de conídios através da mobilização das reservas de carbono e de energia internas. Estes conídios estando em um ambiente adequado, são germinados, crescendo frequentemente o que se estenderá por um fio, sendo chamado de hifa (HAYER et al. 2013, PAZOUKI; PANDA, 2000). Não existem relatos da participação de

linalol na inibição da germinação de conídios de *T. rubrum*, porém há relatos de outros produtos naturais inibindo a germinação de conídios fúngicos.

Os extratos etanólico e óleo essencial de folhas de *Lonicera japonica* exibiram efeitos inibitórios potentes sobre a germinação de conídios de *T. rubrum* KCTC 6352 e *T. rubrum* KCTC 6375 (RAHMAN et al, 2014). Chee e Lee (2007) mostraram que o vapor volátil de óleo de cravo da índia (*Syzygium aromaticum*) foi fortemente ativo para todos os fungos testados, exceto *C. albicans*. A germinação de conídios de *T. mentagrophytes* e *T. rubrum* foram completamente inibidas pelo vapor volátil da *Syzygium aromaticum*. O linalol foi relatado para induzir a germinação anormal de *C. albicans* e que interferiu na formação de tubo germinativo em concentrações subinibitórias. Embora *C. albicans* seja levedura, sua transformação de seu estado unicelular para estado filamentososo pode ser usado, neste caso, como evento celular semelhante à formação micelial a partir da germinação de conídios (HSU et al., 2013).

Considerando que a produção de hifas e a consequente formação de micélio são importantes para a patogenicidade da doença, ao entrar em contato com o extrato córneo expressam-se como fatores desencadeantes e condicionantes de quadros infecciosos. Assim, o terpeno linalol se comportou com agente relevante no processo inibitório da formação de micélio fúngico de *T. rubrum*.

6 CONCLUSÕES

Esta pesquisa é de grande relevância para o meio científico tendo em vista, ser a primeira a se desenvolver sobre o potencial antifúngico de linalol sobre isolados clínicos de *T. rubum* resistentes a fluconazol.

Sua significância pode ser analisada através dos resultados obtidos, concluindo que o terpeno linalol exerceu relevante atividade antifúngica frente a *T. rubum*. Sabendo que *T. rubrum* tem o poder de causar micoses cutâneas em animais e principalmente em humanos, o terpeno interferiu nas diversas fases do desenvolvimento fúngico como crescimento micelial, formação de conídios e germinação.

Considerando a importância da produção de hifas e conídios, os quais são elementares para a patogenicidade das dermatofitoses, linalol se mostrou bastante promissor, pois conseguiu bloquear estas etapas apresentando-se como agente com grande potencialidade para o tratamento das dermatofitoses provocadas por *T. rubum*.

Presumindo que os profissionais de enfermagem como membro da equipe de saúde, estão constantemente cuidando de pessoas com dermatofitoses, é necessário que a equipe detenha o conhecimento a respeito do uso indiscriminado dos antifúngicos e as possíveis complicações para a saúde humana, assim como, compreender a importância dos produtos naturais, suas bioatividades, seu fácil acesso, baixo custo e benefícios para o tratamento. Desta forma, a educação em saúde é primordial, para que os pacientes obtenham estes conhecimentos e realizem um tratamento de maneira eficaz, livre de complicações e prevenção de novos traumas.

Sugere-se que sejam realizadas novas pesquisas utilizando o antifúngico linalol *in vivo* e em seres humanos, analisando seu efeito promissor para a patogenicidade da doença, visando à redução dos índices de dermatofitoses em humanos, assim como, a prevenção de novos agravos e a promoção da saúde.

REFERÊNCIAS

- ACHTERMAN, R. R.; WHITE, T. C. Dermatoplyte virulence factors: Identifying and analyzing genes that may contribute to chronic or acute skin infections. **International Journal of Microbiology**, v. 2012, p. 8, 2012.
- ANJU, S. et al. Synergistic combination of violacein and azoles that leads to enhanced killing of major human pathogenic dermatophytic fungi *Trichophyton rubrum*. **Journal in Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 5, 2015.
- 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.
- BAIER, R. C. et al. Evaluation of linalool, a natural antimicrobial and insecticidal essential oil from basil: Effects on poultry. **Poultry Science**, n. 93, n. 2, p. 267-272, 2014.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.
- BALDO, A. et al. Mechanisms of skin adherence and invasion by dermatophytes. **Journal Blackwell Verlag Gmbh Mycoses**, v. 55, p. 218-223, 2011.
- BALTAZAR, L. M. et al. Photodynamic inhibition of *Trichophyton rubrum*: In vitro activity and the role of oxidative and nitrosative bursts in fungal death. **Journal Antimicrob. Chemother**, v. 68, p.253-361, 2013.
- BITENCOURT, T. A. et al. Trans-chalcone and quercetin down-regulate fatty acid synthase gene expression and reduce ergosterol content in the human pathogenic dermatophyte *Trichophyton rubrum*. **Journal BCM Complementary Alternative Medicine**, v. 13, p. 229, 2013.
- BRAND, A. Hyphal growth in human fungal pathogens and its role in virulence. **International journal of Microbiology**. v. 2012, p.11, 2011.
- BRAZ FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 229-239, 2010.
- BARROS, M. E. S; SANTOS, D. A.; HAMDAN, J. S. *In vitro* methods for antifungal susceptibility testing of *Trichophyton* spp. **Mycological Research**, v. 110, n. 11, p. 1355-1360, 2006.
- CARNEIRO, M. et al, O uso de antimicrobianos em um hospital de ensino: uma breve avaliação. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.57, n.4, p. 421-424, 2011.
- CARVALHO FILHO, J. L. S. et al. Influence of the hesting time, temperature and drying period on basil (*Ocimum basilicum* L.) essential oil. **Revista brasileira de farmacognosia**, João Pessoa, v.16, n.4 p. 24-30, jan. / mar. 2006

CHEE, H.Y.; LEE, M. H. Antifungal activity of clove essential oil and its volatile vapour against dermatophytic fungi. **Journal Mycobiology**, v. 4, 2007.

CHO, S.; JUN, H.; LEE, J. H.; JIA, Y.; KIM, K. H.; LEE, S. Linalool reduces the expression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase via sterol regulatory element binding protein-2- and ubiquitin-dependent mechanisms. **FEBS Letters**. v. 585, n. 20, p. 3289-3296, 2011.

CLINE M., TAYLOR J. E., FLORES J., BRACKEN., MECALL S., CEREMUGA T.E. **Investigation of the anxiolytic effects of linalool, a lavender extract, in the male sapraque-Dawley rat**. v. 76, n.1, p. 47-52, 2008.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard M38-A**. v. 22, n. 16, Clinical and Laboratory Standards Institute, Pennsylvania, United States of America, 2002.

CORDEIRO, L. V. Perfil Epidemiológico de Dermatofitoses Superficiais em Pacientes Atendidos em um Laboratório da Rede Privada de João Pessoa-PB. Monografia (Graduação) – UFPB/CCS, - João Pessoa, 2015.

COUTINHO, H. D. et al. Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine. **Chemotherapy**, v. 54, p. 328–330, 2008.

DAMÁZIO, P. M. R. B. C. **Dermatofitoses no Estado de Pernambuco: Perfil Epidemiológico e série de casos**. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Medicina Tropical, Recife, 2006.

DAVID, B; WOLFENDER, J. L; DIAS, D. A. The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends. **Phytochemistry Reviews**, v. 14, p. 299–315, 2015.

DE SOUSA, D. P.; NÓBREGA, F. F.; SANTOS, C. C.; DE ALMEIDA, R. N. Anticonvulsant activity of the linalool enantiomers and racemate: investigation of chiral influence. **Natural Product Communications**. v. 5, n. 12, p. 1847-51, 2010.

DEISING, H. B.; REIMANN, S.; PASCHOLATI, S. F. Mechanisms and significance of fungicide resistance. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 286-295, 2008.

ELSHARIF, S. A.; BANERJEE, A.; BUETTNER, A. Structure-odor relationships of linalool, linalyl acetate and their corresponding oxygenated derivatives. **Journal List Frontiers in Chemistry**, v. 3, n. 57, 2015.

ENGELKIRK, P. G.; DUBEN-ENGELKIRK, J. **Burton, microbiologia para ciências da saúde**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 388, 2012.

FERREIRA, R. C. S; et al. **Bulário explicativo**, São Paulo: Rideel, 2013.

FIOL, F. S. D. et al. Perfil de prescrições e uso de antibióticos em infecções comunitárias. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 1, 2010.

GHANNOUM, M. Azole resistance in dermatophytes: prevalence and mechanism of action. **Journal of the American Podiatric Medical Association**, v. 106, n.1, p. 79-86, 2016.

GHELARDI, E. et al. Potential of Ergosterol Synthesis Inhibitors To Cause Resistance or Cross-Resistance in *Trichophyton rubrum*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 58, n. 5, p.2825–282, 2014.

GRÄSER, Y. et al. Molecular taxonomy of the *Trichophyton rubrum* complex. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 9, p. 9 3329-3336, 2000.

GRIMM, L. H. et al. Morphology and productivity of filamentous fungi. **Journal Applied Microbiology and Biotech Nology**, v. 69, p. 375-384, 2005.

GUPTA, A. K.; COOPER, E. A. Update in antifungal therapy of dermatophytosis. **Mycopathologia**, v. 166, n. 5-6, p. 353-367, 2008.

HAVLICKOVA, B.; CZAIIKA, V. A.; FRIEDRICH, M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. **Mycoses**, v. 51, n. 4, p. 2-15, 2008.

HAYER. K.; STRATFORD, M.; ARCHER, D. Structural features of sugars that trigger or support conidial germination in the filamentous fungus *Aspergillus niger*. **Journal Applied Environmental Microbiology**, v. 79, 2013.

HERNÁNDEZ-SALAZAR, A. et al. Dermatophytosis due to *Trichophyton rubrum*. Ten-year period (1996-2006) data collection in a Dermatology Department in Mexico City [Spanish]. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 24, n. 2, p. 122-124, 2007.

HRYNCEWICZ-GWOŹDZ. et al. Increase in resistance to fluconazole and itraconazole in *Trichophyton rubrum* clinical isolates by sequential passages in vitro under drug pressure. **Mycopathologia**, v. 176, n.1-2, p. 49-55, 2013.

HSU, C. C; et al. The inhibitory activity of linalool against the filamentous growth and biofilm formation in *Candida albicans*. **Medical Mycology**. v. 51, n. 5, p. 473-482, 2013.

KHAN, M. S.; AHMAD, *in vitro* antifungal, anti-elastase and anti-keratinase activity of essential oil of *Cinnamomum*-, *Syzygium*- and *Cymbopogon*-species against *Aspergillus fumigatus* and *Trichophyton rubrum*. **Phytomedicine**, v. 19, p. 48-55, 2010.

KLEIN, G.; RUBEN, C.; UPMANN, N. Antimicrobial Activity of Essential Oil Components against Potential Food Spoilage Microorganisms. **Current Microbiology**. v. 67, n. 2, p. 200-208, 2014.

LINCK, V. M. et al. Effects of inhaled Linalool in anxiety, social interaction and aggressive behavior in mice. **Phytomedicine**. v. 17, p. 679-83, 2010.

- LOPES, T. D. P. **Potencial Antidermatofítico de Mo- CBP4 uma Proteína ligante à quitina de sementes de *Moringa oleífera***. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em bioquímica, Fortaleza, 2016.
- MARTINEZ, D. A. et al. Comparative Genome Analysis of *Trichophyton rubrum* and Related Dermatophytes Reveals Candidate Genes Involved in Infection. **Journal List Mbio**, v.3, n.5, 2012.
- MARTINEZ-ROSSI, N. M.; PERES, N. T. A.; ROSSI, A. Antifungal resistance mechanisms in dermatophytes. **Mycopathologia**, v. 166, p. 369-383, 2008.
- McLAUGHLIN, D; SPATAFORA, J. W. Systematics and Evolution, Parte 1. **The Mycota**, ed: Springer Science & Business Media, 2013.
- MICELI, M. H.; DÍAZ, J. A.; LEE, S. A. Emerging opportunistic yeast infections. **Lancet Infectious Diseases**, v. 11, p. 142-151, 2011.
- MICHAEL, R; Mc GINNIS.; STEPHEN, K; TYRING. Introduction to mycology. **Medical Microbiology**, 4ª Ed. Samuel Baron, 1996.
- MIKHAILOV, S. N, et al. Perspectives in Medicinal Chemistry. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 23, 2016.
- MOREIRA, A.C. P. et al. Chemical composition and antifungal activity of Hyptis suaveolens (L.) Poit leaves essential oil against Aspergillus species. **Brazilian Journal of Microbiology** Vol. 41, pp. 28-33, 2010.
- NETT, J. E; ANDES, D. R. Antifungal agentes spectrum of activity, pharmacology, and clinical indications. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, p. 51-83, 2016.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 3, p. 461-77, 2007.
- NOBRE, M. O. et al. Drogas Antifúngicas para pequenos e grandes animais. **Ciência Rural**, v. 32, n. 1, p. 175-184, 2002.
- ODDS, F. C. Pathogenic fungi in the 21st century. **Trends in Microbiology**, v. 8, n. 5, p. 200–201, 2000.
- OLIVEIRA, et al. Filamentous fungi isolated from Candeias Beach, Pernambuco, Brazil. **Hoehnea**, v. 38, n. 2, 2011.
- OLIVEIRA, J. C. Um Guia para o Laboratório de Micologia Médica. **Diagnóstico Micológico por Imagens**, 2014.
- PADUCH, R. et al Terpenes: substances useful in human healthcare. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis (Warsz)**, v. 55, n. 5, p. 315-327, 2007.
- PAZOUKI, M.; PANDA, T. Understanding the morphology of fungi. **Journal Bioprocess Engineering**, v. 22, p. 127-143, 2000.

- PEREIRA, F. O. et al. Growth inhibition and morphological alterations of *Trichophyton rubrum* induced by essential oil from *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 233-242, 2011a.
- PERES, N. T. A. et al. Dermatophytes: Host-pathogen interaction and antifungal resistance. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, p. 657-67, 2010.
- RANDÜNZ, L. L. **Efeitos da temperatura de secagem no teor e na composição dos óleos essenciais de guaco (*Mikania glomerata* Sprengel) e hortelã comum (*Mentha X vilosa* Hunds)**. 2004. 90F. Tese (doutorado) - engenharia agrícola, Universidade federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2004.
- RAHMAN, A. et al. Antifungal potential of essential oil and ethanol extracts of *Lonicera japonica* Thunb. Against dermatophytes. **Journal EXCLI**, v. 13, p. 427-436, 2014.
- SALMON, N. FULLER, C. Fungal skin infections: current approaches to management. **Drug review Fungal skin infections**, 2013.
- SANTOS, D. A.; HAMDAN, J. S. Evaluation of Broth Microdilution Antifungal Susceptibility Testing Conditions for *Trichophyton rubrum*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1917-1920, 2005.
- SANTOS, D. A.; BARROS, M. E. S.; HAMDAN, J. S. Establishing a method of inoculum preparation for susceptibility testing of *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 98-101, 2006.
- SARTORATTO A.; MACHADO A. L. M.; DELARMELINA C, et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Braz J Microbiol.** v. 35, p. 275–80, 2004.
- SEEBACHER, C.; BOUCHARA, J. P.; MIGNON, B. Updates on the epidemiology of dermatophyte infections. **Mycopathologia**, v. 166, n. 5-6, p. 335-352, 2008.
- SHARMA, N. & TRIPATHI, A. Effect of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem. **Microbiological Research**, Vol. 163, p. 337-344, 2008.
- SHARMA, V. et al. Dermatophytes: Diagnosis of dermatophytosis and its treatment. **African Journal of Microbiology Research**, v. 9, n. 19, p. 1286-1293, 2015.
- SIMÕES, C. M. O.; SPITZER. Óleos voláteis. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 6. ed, 2007.
- SHOO, A. K.; MAHAJAN, R. Management of tinea corporis, tinea cruris, and tinea pedis: A comprehensive review. **Journal Online Indian Dermatology**, v. 7, n.2, p. 77–86, 2016.
- SVETOZ, L. et al. Value of the ethnomedical information for the discovery of plants with antifungal properties. A survey among seven Latin American countries. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, p. 137-158, 2010.

SOARES, L. A. et al. Anti-trichophyton activity of protocatechuates and their synergism with fluconazole. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, n. 1, p. 1-9, 2014.

SOKOVIC, M. et al. Antifungal activity of the essential oils and components in vitro and in vivo on experimentally induced dermatomycoses at rats. **Digest journal of nanomaterials and biostructures**, v.7, n.3, p. 959-966, 2012.

TABASSUM, N.; VIDYASAGAR, G.M. antifungal investigations on plant essential oils: a review. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 5, n. 2, 2013.

TAINWALA, R; SHARMA, Y. K. Pathogenesis of dermatophytoses. **Indian journal of dermatology**, v. 56, n. 3, p. 256-261, 2011.

TZORTZAKIS, N. G.; ECONOMAKIS, C. D. Antifungal activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus* L.) essential oil against key postharvest pathogens. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 8, n. 2, p. 253-258, 2007.

VANDEPUTTE, P; FERRARI, S; COSTE, A. T. Antifungal Resistance and New Strategies to Control Fungal Infections. **International Journal of Microbiology**, v. 2012, n. 2012, p. 26, 2012.

WALAILAK, J. S. C. I; TECH. Virulence Factors Involved in Pathogenicity of Dermatophytes. **Journal walailak**, v.12, n.7, p. 573-580, 2015.

WALKER, G.; WHITE, N. A. Introduction to fungal physiology. In: KAVANAGH, K. (Editor). **Fungi: biology and applications**. England: John Wiley & Sons Ltd., p. 1-10 2005.

WU, L. C.; SUN, P. L.; CHANG, Y. T. Extensive deep dermatophytosis cause by *Trichophyton rubrum* in a patient with liver cirrhosis and chronic renal failure **Mycopathologia**, v. 176, p. 457-462, 2013.

ANEXO

Journal de Mycologie Médicale (2017) 27, 195–202



Available online at
ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com



ORIGINAL ARTICLE/ARTICLE ORIGINAL

Investigation of the antifungal potential of linalool against clinical isolates of fluconazole resistant *Trichophyton rubrum*



Investigation potentielle antifongique du linalol contre des isolats cliniques de Trichophyton rubrum résistant au fluconazole

M.I. de Oliveira Lima ^a, A.C. Araújo de Medeiros ^a,
 K.V. Souza Silva ^a, G.N. Cardoso ^a, E. de Oliveira Lima ^b,
 F. de Oliveira Pereira ^{a,*}

^aLaboratory of Biochemistry, Academic Unit of Health, Education and Health Center, Federal University of Campina Grande, Cuité, Brazil

^bLaboratory of Mycology, Department of Pharmaceutical Science, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil

Received 25 July 2016; accepted 12 January 2017
 Available online 9 February 2017

KEYWORDS

Trichophyton rubrum;
 Linalool;
 Ketoconazole;
 Antifungal;
 Terpene

Summary The aim of this study was to investigate the activity of the monoterpene linalool against clinical isolates of *Trichophyton rubrum*. Initially, a sensitivity assay for commercial antifungals with solid disks in diffusion medium was performed. Minimum inhibitory concentration (MIC) of linalool and ketoconazole (positive control) were determined by microdilution in RPMI 1640 medium (CLSI M38-A2). We then evaluated the action of linalool and ketoconazole at different concentrations (1/2MIC, MIC and 2 × MIC) on mycelial growth (radial mycelial growth), conidia production and conidia germination using a hemacytometer. The effects on cell membrane (release of intracellular material) were also investigated. Finally, changes in fungal morphology as induced by the test drugs were analyzed. Based on the sensitivity tests, the fungal strains showed resistance to 5-fluorocytosine and fluconazole. The linalool MIC values ranged from 256 µg/mL to 512 µg/mL, whereas ketoconazole showed values of 4 µg/mL to 8 µg/mL. For the LM 305 strain, the test drugs showed the following MIC values: linalool 256 µg/mL and ketoconazole 8 µg/mL. The mycelial growth of *T. rubrum* LM 305 was inhibited by linalool

* Corresponding author. Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Educação e Saúde, Unidade Acadêmica de Saúde, Olho D'Água da Bica, s/n, 58175-000, Cuité, Paraíba, Brasil.
 E-mail address: fillipeopereira@ufcg.edu.br (F. de Oliveira Pereira).

