

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Composição química e atividade antifúngica de óleos essenciais de
manjerição, alecrim, cravo e canela frente a *trichophyton rubrum* e
*trichophyton mentagrophytes***

PATRÍCIA ABREU PEREIRA

Porto Alegre, 2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Composição química e atividade antifúngica de óleos essenciais de manjeriço, alecrim, cravo e canela frente a *trichophyton rubrum* e *trichophyton mentagrophytes*

Dissertação apresentada por Patrícia Abreu
Pereira para obtenção do GRAU DE
MESTRE em Ciências Farmacêuticas

Orientador(a): Prof. Dra. Miriam Anders Apel

Porto Alegre, 2024

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 24/04/2024, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Gilsane Lino Von Poser
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dra Sara Elis Bianchi
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra Renata Vidor Contri
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

CIP - Catalogação na Publicação

Pereira, Patrícia Abreu Pereira
Composição química e atividade antifúngica dos óleos essenciais de manjeriçã, alecrim, cravo e canela frente a trichophyton rubrum e trichophyton mentagrophytes / Patrícia Abreu Pereira Pereira. - 2024.

97 f.

Orientadora: Miriam Anders Apel Apel.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2024.

1. Atividade antifúngica. 2. Óleos essenciais. 3. Caracterização química. I. Apel, Miriam Anders Apel, orient. II. Título.

Este trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios de Micologia (Biomicolab), Laboratório de Fitoquímica (CPNAT) e no Laboratório de Microbiologia Aplicada, todos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. O autor não recebeu bolsa de estudos da CAPES/do CNPq.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que colocou pessoas especiais no meu caminho que me ajudaram a transformar os obstáculos em vitórias.

Agradeço aos meus pais Edmundo, *in memoriam*, pelo carinho, amizade e bons conselhos e a minha mãe Irene, *in memoriam*, por ter me ensinado a ser persistente e ter fé.

Agradeço ao meu marido, Júlio, pelo companheirismo, cumplicidade e amor.

A minha orientadora, Professora Dra Miriam Apel pela oportunidade de fazer parte da sua equipe, pela paciência e orientação.

Agradeço profundamente à minha co-orientadora Professora Dra Adelina Mezzari pela confiança em minha pesquisa e por sempre me apoiar e me motivar tornando-se uma fonte de inspiração.

Ao Professor Alexandre Fuentefria pela colaboração, ajuda e incentivo.

A uma colega e amiga querida Jade Souza pela ajuda e colaboração, tornando essa jornada possível de ser concluída.

A querida colega Juliana Butzge pelos momentos de companheirismo, ajuda e motivação.

Aos professores do PPGCF UFRGS, pelos ensinamentos.

A toda equipe do laboratório Farmacognosia que de alguma forma me ajudaram a alcançar esse objetivo.

RESUMO

O presente estudo teve por objetivo avaliar a atividade antifúngica dos óleos essenciais de alecrim (*Rosmarinus officinalis*), manjeriço (*Ocimum basilicum*), cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) e canela-da-china (*Cinnamomum cassia*) frente aos dermatófitos mais prevalentemente encontrados em onicomicoses: *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes*. Os óleos essenciais de cravo e canela-da-china foram obtidos por hidrodestilação, enquanto os óleos de alecrim e manjeriço foram adquiridos comercialmente obtidos através da técnica de hidrodestilação pelo fabricante. A caracterização química dos óleos essenciais foi realizada por cromatografia à gás acoplada a detector de massas, a investigação da atividade antifúngica *in vitro* pelo método de difusão em disco e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) utilizando a técnica de microdiluição em caldo. A análise cromatográfica do óleo volátil do cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) revelou que o eugenol é o principal componente do óleo, sendo responsável por 80,2% da sua composição. O óleo volátil da canela-da-china (*Cinnamomum cassia*), apresentou o *E*-cinamaldeído como principal componente do óleo essencial, respondendo por 99,4% do conteúdo total de óleo. O óleo volátil de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) apresentou o 1,8-cineol e cânfora como os compostos majoritários, representando 47% e 15% do conteúdo total do óleo volátil, respectivamente. Na análise do óleo essencial de manjeriço (*Ocimum basilicum*), o metil-chavicol foi o principal componente, sendo responsável por 68,81% das substâncias identificadas. Os resultados obtidos no ensaio de microdiluição em caldo para os óleos de cravo, canela-da-china e alecrim não foram satisfatórios, apresentando resultados acima de 8 mg/mL, porém o óleo de manjeriço (*Ocimum basilicum*) inibiu o crescimento de algumas cepas de *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes* nas concentrações de 2 mg/mL a 8 mg/mL e, dessa forma, foi selecionado para dar sequência na investigação do seu potencial antifúngico e suas possíveis aplicações. Ao verificar o potencial antifúngico do óleo volátil de *Ocimum basilicum*, foi realizada a associação deste óleo a uma formulação de esmalte na coloração vermelho e realizado ensaio modelo *ex vivo* para onicomicose visto que, atualmente, não há no mercado esse tipo de formulação com esse óleo promissor para o tratamento de dermatofitoses.

Palavras-chave: Antifúngicos; Óleos essenciais; Onicomicoses; *Trichophyton*.

ABSTRACT

The present study aims to evaluate the antifungal activity of essential oils of rosemary (*Rosmarinus officinalis*), basil (*Ocimum basilicum*), clove (*Syzygium aromaticum*) and Chinese cinnamon (*Cinnamomum cassia*) against the most prevalent dermatophytes found in onychomycosis: *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes*. Clove and cinnamon essential oils were obtained by hydrodistillation and the basil and rosemary oils were commercially acquired. Chemical characterization of essential oils was performed by gas chromatography coupled to a mass detector, investigation of in vitro antifungal activity using the disk diffusion method and determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) using the broth microdilution technique. Chromatographic analysis of the volatile oil of clove (*Syzygium aromaticum*) revealed that eugenol is the main component of the oil, accounting for 80.2% of its composition. The volatile oil of Chinese cinnamon (*Cinnamomum cassia*) presented E-cinnamaldehyde as the main component of the essential oil, accounting for 99.4% of the total oil content. The volatile oil of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) presented 1,8-cineole and camphor as the main compounds, representing 47% and 15% of the total content of the volatile oil, respectively. In the analysis of basil essential oil (*Ocimum basilicum*), methyl-chavicol was the main component, accounting for 68.81% of the substances identified. The results obtained in broth microdilution tests for clove, Chinese cinnamon and rosemary oils were not satisfactory, showing results above 8 mg/mL, but basil oil (*Ocimum basilicum*) inhibited the growth of some strains of *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes* at concentrations of 8 mg/mL to 2 mg/mL and, therefore, was selected to continue the elucidation of its antifungal potential and its possible applications. When verifying the antifungal potential of the volatile oil of *Ocimum basilicum*, the intention was to associate this oil with a red nail polish formulation, since, currently, there is no such formulation on the market with this promising oil for the treatment of dermatophytosis.

Keyword: Antifungals; Essential oils; Onychomycosis; *Trichophyton*.

LISTA DE FIGURAS (opcional)

Figura 1: Foto de folhas de Manjerição (FONTE: freepik)

Figura 2: Foto de botões florais secos de cravo-da- ndia (FONTE AUTOR)

Figura 3: Cascas de *Cinnamomum cassia* (FONTE AUTOR)

Figura 4: Alecrim (*Rosmarinus officinalis*) (FONTE AUTOR)

Figura 5: Estrutura química do Eugenol, principal componente do óleo volátil de *Cinnamomum cassia*.

Figura 6: Cromatograma de óleo essencial de *Syzygium aromaticum* obtido por CG-EM.

Figura 7: Estrutura química do cinamaldeído, principal componente do óleo volátil de *Cinnamomum cassia*.

Figura 8: Cromatograma de óleo essencial de *Cinnamomum cassia* obtido por CG-EM.

Figura 9: Estrutura química dos principais compostos identificados no óleo volátil do alecrim. A) 1,8-cineol; B) Cânfora; e C) alfa-pineno.

Figura 10: Cromatograma do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* obtido por CG-EM.

Figura 11: Estrutura química dos principais compostos encontrados no óleo volátil do manjerição. A) Metil-chavicol; B) Linalol.

Figura 12: Cromatograma de óleo essencial de *Ocimum basilicum* obtido por CG-EM.

Figura 13: Preparação das placas antes do início do tratamento.

Figura 14: In cio do tratamento tempo zero.

Figura 15: Controle de crescimento.

LISTA DE ABREVIATURAS

- CC: Controle de crescimento
- CE: Controle do esmalte
- CG-MS: Cromatografia em fase gasosa acoplada a detector de massas
- CT: Controle de tratamento
- C-: Controle negativo
- EM: Espectrometria de massas
- IR: Índice de refração
- IV: Infravermelho
- TME: *Trichophyton mentagrophytes*
- TRU: *Trichophyton rubrum*
- CC: *Cinnamomum cassia* (canela-da-china)
- SA: *Syzygium aromaticum* (Cravo-da-india)
- RO: *Rosmarinus officinalis* (Alecrim)
- OB: *Ocimum basilicum* (Manjericão)

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 21 |
| 2. OBJETIVOS | 22 |
| 2.1. Objetivo Geral | 22 |
| 2.2. Objetivos específicos | 22 |
| 3. REVISÃO DA LITERATURA | 24 |
| 3.1. Unhas | 25 |
| 3.2. Onicomicoses | 25 |
| 3.3. Antifúngicos | 27 |
| 3.4. Óleos essenciais | 28 |
| 3.5. Espécies vegetais | 32 |
| 3.5.1. Manjeriço | 32 |
| 3.5.2. Cravo-da-índia | 34 |
| 3.5.3. Canela-da-china | 36 |
| 3.5.4. Alecrim | 37 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS | 41 |
| 4.1. Local e desenvolvimento do trabalho | 41 |
| 4.2. Obtenção dos óleos essenciais | 41 |
| 4.3. Análise química dos óleos essenciais | 41 |
| 4.4. Identificação dos compostos dos óleos essenciais | 42 |
| 4.5. Isolados de <i>Trichophyton rubrum</i> e <i>Trichophyton mentagrophytes</i> | 42 |
| 4.6. Avaliação da atividade antifúngica | 43 |
| 4.7. Procedimentos para preparação do esmalte | 43 |
| 4.8. Ensaio modelo <i>ex vivo</i> de onicomicose | 44 |

| | |
|---|-----------|
| 4.9. Limpeza e preparação dos cascos | 44 |
| 4.10. Infecção dos cascos suínos | 44 |
| 4.11. Tratamentodos cascos suínos | 45 |
| 4.12. Procedimentos para tratamento dos resíduos | 45 |
| 4.13. Análise estatística | 45 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 48 |
| 5.1. Rendimento e caracterização dos óleos | 48 |
| 5.2. Caracterização química do óleo de Cravo-da-índia | 48 |
| 5.3. Caracterização química do óleo de Canela-da-china | 50 |
| 5.4. Caracterização química do óleo de Alecrim | 52 |
| 5.5. Caracterização química do óleo de Manjerição | 55 |
| 5.6. Atividade anti- <i>Trichophyton</i> dos óleos essenciais | 57 |
| 5.7. Ensaio de modelo <i>ex vivo</i> de onicomiose | 60 |
| 6. CONCLUSÕES | 71 |
| REFERÊNCIAS | 77 |

1. INTRODUÇÃO

As dermatomicoses são doenças causadas por fungos queratinofílicos, que se alimentam da queratina presente nos tecidos queratinizados como pele, unha e pêlos dos animais e de seres humanos, e podem ser causadas por fungos dermatófitos e não dermatófitos (MARTINEZ et al., 2020). Dermatofitoses são dermatomicoses causadas por fungos dermatófitos e estão entre as doenças mais prevalentes no mundo, atingindo indivíduos de todas as idades e sexo, sendo mais incidentes em adultos e imunocomprometidos. As espécies mais encontradas em micoses superficiais são *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes*. Os sítios de infecção onde as dermatofitoses são mais prevalentes são as unhas, ocasionando a onicomicose, que é um tipo de dermatofitose caracterizada por uma infecção fúngica identificada pelo aparecimento de manchas e deformações. Essa doença, além de causar desconforto físico, também afeta a autoestima do paciente devido ao aspecto da lesão (PEREIRA et al., 2021).

Atualmente, a onicomicose é uma doença que vem se tornando cada vez mais frequente, principalmente em pacientes com alguns fatores de risco associados como *diabetes mellitus*, psoríase, doenças vasculares e imunocomprometidos. Alguns estudos demonstraram que pacientes com insuficiência renal crônica e que fazem hemodiálise são mais vulneráveis a terem infecção fúngica, principalmente a onicomicose (MAGAGNIN et al., 2011). O diagnóstico se dá, na maioria das vezes, pelo exame direto de cultura. Os medicamentos utilizados para tratar essa patologia apresentam certo grau de toxicidade (PEREIRA et al., 2021). Quando o diagnóstico é confirmado, o tratamento de escolha é terbinafina oral ou itraconazol, podendo ser também utilizada terapia tópica. A terapia oral é eficaz, mas seus efeitos adversos, toxicidade e o tempo de tratamento dificultam a adesão ao tratamento. Terapias alternativas seguras e eficazes são de extrema necessidade para o sucesso do tratamento (LEUNG et al., 2020).

Os fungos podem ter seu crescimento inibido por alguns óleos essenciais (MANESS, 2019). Em alguns casos, o uso de óleos essenciais em associação com a terapia antifúngica foi capaz de reduzir a dose efetiva de alguns antifúngicos orais (ROH, 2014). Existem vários estudos que apontam atividade antifúngica para os óleos essenciais, mas não caracterizam os componentes majoritários encontrados nos

diferentes tipos de óleos, sendo necessário mais estudos de identificação dos seus compostos para elucidação do princípio ativo (PEREIRA, 2019).

O uso de terapias alternativas de uso tópico para o tratamento dessa doença é de extrema importância para a efetividade da terapêutica, além de proporcionar menor toxicidade, diminuição do tempo de tratamento e redução dos efeitos adversos. A descoberta de novas terapias alternativas pode ajudar o paciente a ter uma melhor adesão ao tratamento, aumentando as chances de cura.

A aplicação de produtos formulados contendo óleos essenciais é uma alternativa que pode ser eficaz, econômica e com menor grau de toxicidade. A utilização de óleos extraídos de plantas tradicionalmente utilizadas pela população pode aumentar a aceitação do tratamento e, conseqüentemente, a adesão e sucesso terapêutico. Assim, o objetivo deste trabalho é avaliar a atividade antifúngica dos óleos essenciais de alecrim (*Rosmarinus officinalis*), manjerição (*Ocimum basilicum*), cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) e canela-da-china (*Cinnamomum cassia*) frente aos dermatófitos mais prevalentemente encontrados em onicomicoses (*Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes*) e realizar um teste para verificar a aplicação do óleo essencial que apresenta melhor resultado em uma preparação de esmalte vermelho, com o objetivo de avaliar o seu potencial como antifúngico.

2. OBJETIVOS

1.1 Objetivo Geral

Este projeto tem por objetivo avaliar a atividade antifúngica dos óleos essenciais de alecrim (*Rosmarinus officinalis*), manjerição (*Ocimum basilicum*), cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) e canela-da-china (*Cinnamomum cassia*) frente aos dermatófitos mais prevalentemente encontrados em onicomicoses: *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes*. Também visa realizar um teste para verificar a aplicação do óleo essencial de melhor resultado em uma preparação de esmalte de coloração vermelha, com o objetivo de avaliar o seu potencial como antifúngico.

1.2 Objetivos Específicos

As etapas do trabalho executadas foram:

- Obtenção dos óleos essenciais de cravo e canela-da-china por hidrodestilação;
- Caracterização química dos óleos essenciais por cromatografia em fase gasosa acoplada a detector de massas;
- Investigação da atividade antifúngica *in vitro* pelo método de difusão em disco e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) utilizando a técnica de microdiluição em caldo;
- incorporação do óleo de *Ocimum basilicum* em esmalte de cor vermelha.
- Avaliação do óleo essencial de melhor eficiência antifúngica em uma formulação de esmalte vendida comercialmente;

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Unhas

A unha representa uma estrutura especializada da derme feita de queratina, que tem um crescimento médio de cerca de 2 a 3 milímetros mensais e é completamente substituída em um período de 6 a 9 meses (CASHMANN, 2010). As unhas podem revelar informações importantes sobre a saúde e a higiene pessoal, através da sua coloração, formato, aparência e natureza (AGGARWAL, 2020). As afecções ungueais são muito mais do que meras preocupações estéticas e podem interferir significativamente na habilidade de realizar tarefas cotidianas (LEE, 2022).

As unhas são unidades funcionais, apresentando muitas funções importantes, atuando como uma barreira protetora e mecânica do dígito distal. Além disso, as unhas também possuem valor estético, aumentam o sentido do toque e são fundamentais para pegar pequenos objetos. A interrupção desta unidade funcional pode causar considerável incapacidade (LEE, 2022).

Os distúrbios mais comuns das unhas observados na prática clínica são a síndrome das unhas amarelas, onicomicose, paroníquia, psoríase ungueal, melanoniaquia longitudinal, linhas de Beau, onicomadese e retroníquia. Para se obter um diagnóstico preciso é essencial o histórico detalhado além do exame clínico. Dermatoscopia, imagem e testes histopatológicos e micológicos também podem ser necessários para o diagnóstico. Apesar de comumente consideradas preocupações estéticas menores, as alterações nas unhas podem ser manifestações de doenças graves que requerem mais investigação. É primordial distinguir onicomicose de outras doenças das unhas antes de iniciar a terapia antifúngica para evitar efeitos colaterais indesejados e progressão da doença. A história detalhada e o exame físico ajudam a estreitar o diagnóstico diferencial, mas fazer o diagnóstico sem confirmação laboratorial é altamente impreciso. Muitas condições das unhas compartilham semelhanças clínicas com a onicomicose, podendo levar a um diagnóstico equivocado (LEE, 2022).

As unhas podem ser acometidas por vários tipos de doenças além da onicomicose como, por exemplo, a psoríase ungueal, que é uma das doenças frequentemente confundida com onicomicose devido a aparência das lesões ser muito semelhante. A psoríase nas unhas e a onicomicose (infecção fúngica nas unhas) são

condições diferentes. A psoríase ungueal geralmente causa alterações nas unhas, como sulcos, manchas ou descoloração, devido a uma resposta imunológica anormal. Já a onicomicose é causada por fungos e geralmente leva a unhas grossas, quebradiças e descoloridas (GARCIA, 2022).

3.2. Onicomicoses

A onicomicose é uma infecção fúngica que acomete as unhas, geralmente causada por dermatófitos, leveduras ou fungos não dermatófitos. Isso pode levar a unhas espessas, quebradiças, descoloridas e com deformidades. O tratamento pode incluir medicamentos antifúngicos tópicos ou orais, dependendo da gravidade da infecção. Alguns esmaltes antifúngicos estão disponíveis no mercado. Esses produtos são formulados para ajudar a tratar a onicomicose. O tratamento da onicomicose geralmente envolve abordagens antifúngicas como o uso de esmaltes tópicos que são aplicados diretamente nas unhas afetadas, uso de soluções, cremes ou pomadas na área afetada, uso de medicamentos antifúngicos orais prescritos pelos médicos, procedimentos clínicos para remoção cirúrgica da unha em casos graves, boas práticas de higiene como manter as unhas limpas e secas e evitar de compartilhar itens de cuidados pessoais. A onicomicose é uma doença persistente que precisa de adesão ao tratamento para alcançar resultados eficazes (BRESCINI, 2021).

A onicomicose pode ser facilmente confundida com diversas outras enfermidades, sendo a psoríase a mais comumente associada a essa confusão. A psoríase é uma doença sistêmica multifatorial de diferentes fatores genéticos e ambientais. A psoríase ungueal é uma condição crônica de difícil tratamento que afeta as unhas e que apresenta características visuais semelhantes à onicomicose. O tratamento da psoríase ungueal inclui o uso de medicamentos tópicos como cremes ou pomadas contendo corticosteroides, medicamentos orais sistêmicos, injeções de corticosteroides, uso de fármacos biológicos, fototerapia, radioterapia e cuidados com a higiene das unhas e prevenção de traumatismos locais (GARCIA, 2022).

As causas mais comuns de micoses em todo o mundo são os dermatófitos e afetam milhões de pessoas. Os dermatófitos são fungos filamentosos que invadem tecidos queratinizados e se classificam em três grupos ecológicos: geofílicos, zoofílicos e antropofílicos. Os geofílicos geralmente são transportados por animais na sua pele. Os dermatófitos zoofílicos são encontrados nos animais, na sua pele e pêlos

e são facilmente transmitidos aos seres humanos, causando infecções agudas. Os dermatófitos antropofílicos são transmitidos de humano para humano e geralmente causam infecções mais leves e não inflamatórias (BRESCINI, 2021).

As manifestações clínicas provocadas por fungos dermatófitos são denominadas de dermatofitoses. Os três gêneros de dermatófitos que são responsáveis pelas dermatofitoses são *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*. As espécies clínicas mais isoladas são *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton tonsurans*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum* e *Epidermophyton floccosum*. Estudos recentes demonstram que as espécies *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes* apresentam uma alta prevalência nas dermatofitoses (PEREIRA et al., 2021).

Estudos realizados no Brasil e no mundo demonstram o perfil epidemiológico de alta frequência das micoses superficiais e cutâneas. As manifestações clínicas são variadas, podendo comprometer as mãos, pés, unhas, regiões de dobras cutâneas, pele glabra e outros. O diagnóstico é realizado principalmente pelo exame direto e cultura do material biológico proveniente do tecido acometido (STEINER, 2018).

Dentre as infecções fúngicas causadas por dermatófitos, a onicomicose é uma das frequentes, onde *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes* são os agentes etiológicos mais encontrados nas unhas de humanos infectados (BRESCINI, 2021). Estima-se que 90% das onicomicoses das unhas dos pés e 75% das unhas das mãos são causadas por estes fungos. *Trichophyton mentagrophytes* é um fungo zoofílico que coloniza hospedeiros animais e apresenta distribuição mundial. Essa espécie é responsável por lesões inflamatórias na pele, no couro cabeludo e nas unhas. Suas colônias são de cor branca a creme com superfície pulverulenta a granular. Apresenta numerosos microconídios hialinos, unicelulares e em aglomerados. Também podem apresentar macroconídios multicelulares lisos. *Trichophyton rubrum* é um fungo antropofílico amplamente distribuído em humanos e que frequentemente está associado a infecções fúngicas, principalmente onicomicoses. A colônia apresenta coloração branca a creme e tem aspecto felpudo. Apresenta números escassos a moderados de microconídios clavados a piriforme (BRESCINI, 2021).

As principais manifestações clínicas são a descoloração, hiperqueratose e deformação das unhas (LEUNG et al., 2020). Na tentativa de obter sucesso na cura,

várias terapias vêm sendo combinadas com antifúngicos tópicos, orais e agentes anti-inflamatórios (PIRES, 2014). A dificuldade na escolha dos esquemas terapêuticos disponíveis, bem como suas possíveis interações medicamentosas e efeitos negativos dificultam o tratamento (DIAS, 2013).

A onicomicose possui uma vasta gama de tratamentos disponíveis. A unha infectada pode ser removida física ou quimicamente. O agente infeccioso pode ser eliminado por antifúngicos tópicos ou orais ou por terapia a laser, sendo que existe um número de sistemas antifúngicos e a laser disponíveis para esse tratamento. A escolha do melhor tratamento deve ser feita caso a caso, levando-se em consideração o agente causador, o número de unhas envolvidas e os riscos e benefícios associados aos diferentes tratamentos (GUPTA, 2013).

O propósito do tratamento é eliminar a infecção fúngica e restaurar o estado estético normal da unha. A cura micológica e clínica aponta para uma cultura negativa das unhas, microscopia KOH negativa e a cura clínica apresenta uma unha clinicamente normal. Assim, a cura completa é definida como uma cura micológica e clínica. O crescimento das unhas é lento e a melhoria contínua pode ocorrer mesmo após a conclusão do tratamento e a recidiva da doença é comum sem a profilaxia adequada (LEE, 2022).

3.3. Antifúngicos

Os antifúngicos de aplicação tópica são opções de tratamento alternativos para a onicomicose que possuem um baixo risco de efeitos adversos sistêmicos. Eles agem penetrando através ou indo sob a placa ungueal para combater a infecção das unhas. As limitações do tratamento antifúngico tópico incluem uma duração prolongada do tratamento (mínimo de 48 semanas) e geralmente uma eficácia menor. O ciclopirox tópico, o efinaconazol e o tavaborole são aprovados pela Food and Drug Administration para o tratamento dessa patologia. Os produtos de aplicação tópica podem ser utilizados em casos mais leves de onicomicose em adultos e também em crianças, que possuem placas ungueais mais finas e uma taxa de crescimento mais rápida (LEE, 2022).

O tratamento oral geralmente é utilizado nas formas mais graves de infecções. A terbinafina e o itraconazol são os agentes mais utilizados na terapia oral atuando no mesmo alvo que é a membrana celular do fungo. O itraconazol é um triazol que inibe

a enzima 14- α -desmetilase, já a terbinafina que pertence ao grupo das alilaminas, atua inibindo a enzima esqualeno epoxidase. A inibição de ambas as enzimas leva a inibição da síntese de ergosterol. A terbinafina também acarreta em um acúmulo de lanosterol que é um composto intermediário tóxico que faz parte da via da biossíntese de ergosterol. Dessa forma, a terbinafina é o fármaco de escolha para o tratamento contra *Trichophyton* spp. graças a sua eficácia contra esse agente. Na terapia tópica geralmente se faz o uso de derivados azólicos como clotrimazol, miconazol, econazol e oxiconazol. Também são utilizadas alilaminas como terbinafina e naftifina. Nos casos menos graves são aplicados os agentes tópicos ciclopirox ou amorolfina (BRESCINI, 2021).

Após exposição prolongada e falhas na adesão ao tratamento, os fungos podem desenvolver resistência aos agentes antifúngicos, resultando em cepas resistentes aos tratamentos disponíveis e infecções crônicas. A busca por terapias alternativas, como os óleos essenciais, em monoterapia ou associados aos antifúngicos convencionais vem aumentando nos tempos atuais (ROANA, 2021).

O alto custo do tratamento com drogas convencionais, além dos efeitos adversos, corrobora com a importância da pesquisa e descoberta de novos compostos de origem vegetal (DIAS, 2013). Assim, com plantas medicinais têm demonstrado serem uma importante fonte de compostos ativos com amplo espectro de ação, baixa toxicidade e custo reduzido.

3.4. Óleos essenciais

As plantas fazem parte do ecossistema terrestre e possuem diversas funções importantes na natureza. Os vegetais são capazes de fornecer diversos produtos químicos com potencial terapêutico que servem também como modelo para a produção de novas estruturas químicas capazes de apresentar propriedades farmacológicas. Dentre os compostos que têm demonstrado ampla atividade biológica estão os óleos essenciais. A diversidade química dos óleos essenciais obtido de plantas tem justificado o seu emprego em terapias alternativas por apresentarem importante atividade antimicrobiana, antiinflamatória, antioxidante e imunomodulatória (SARAIVA, 2021).

Ao longo da história, os óleos essenciais têm sido utilizados pelo seu aroma agradável e potenciais benefícios terapêuticos. Os óleos têm se mostrado

promissores em diversos campos, incluindo aromaterapia, produtos de cuidados pessoais, medicina natural e até mesmo como alternativa aos produtos de limpeza tradicionais ou soluções de controle de pragas (LOUKILI, 2023).

O sinergismo entre drogas convencionais e óleos essenciais pode permitir a aplicação de doses menores dos fármacos atualmente utilizados. Dessa forma, é possível aumentar a eficácia e a segurança do tratamento, associando ao tratamento convencional, o uso de compostos que contenham óleos essenciais em sua formulação (ROANA, 2021).

Inúmeros estudos relatam o uso de óleos voláteis no tratamento de infecções causadas por fungos dermatófitos. A atividade dos óleos essenciais, especialmente contra aqueles agentes etiológicos de onicomicose, como *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes* e espécies de *Candida*, está bem descrita na literatura. Os óleos essenciais apresentam-se como uma mistura complexa de vários componentes, dependendo da espécie vegetal. Entretanto, são caracterizados por compostos majoritários (geralmente um, dois ou três), que, na maior parte das situações, são responsáveis pelas atividades biológicas (Bakkali et al., 2008). O modo de ação, devido à mistura, é complexo e não envolve apenas um mecanismo (Hammer e Carson, 2011). Além disso, existem vários estudos apresentando sinergismo entre os diversos compostos (Pinto et al., 2006; Yahyazadeh et al., 2008). Porém, o mecanismo de ação predominante está relacionado a interação com a membrana biológica, levando a uma alteração na permeabilidade seletiva celular (Bakkali et al., 2008). Os monoterpenos são capazes de agir através da ligação ao ergosterol, causando desestabilização das membranas fúngicas (Miron et al., 2014) e inibição da esporulação (Inouye et al., 2009). Alguns componentes podem atuar interferindo em diversos tipos de reações radicais, reduzindo a atividade de enzimas mitocondriais (Pinto et al., 2013), produzindo uma reação enzimática sobre a parede celular (Yahyazadeh et al., 2008) e inibindo o metabolismo celular (Zuzarte et al., 2011).

Diante da necessidade de uma terapia tópica eficaz e do surgimento de resistência aos antifúngicos, o desafio é encontrar um tratamento capaz de atuar por diferentes mecanismos ao nível das células fúngicas (Gupta e Simpson, 2015). Assim, os óleos voláteis são excelentes candidatos para preencher esta lacuna, pois há estudos que relatam que, mesmo contra cepas resistentes ao fluconazol, que é um dos fármacos de primeira escolha, os óleos essenciais continuam demonstrando

atividade, indicando que o mecanismo de defesa desenvolvido não interfere na ação antifúngica (10). Estudos realizados com diversos óleos voláteis para tratamento de onicomicoses apontaram, em especial, como promissores, os óleos de: *Syzygium aromaticum* (cravo-da-índia), *Melaleuca alternifolia* (melaleuca), *Thymus vulgaris* (tomilho), *Lavandula angustifolia* (lavanda), *Eucalyptus* spp. (eucalipto) e *Origanum vulgare* (orégano).

O óleo de *Syzygium aromaticum* (cravo-da-índia) tem sido utilizado em formulações para unhas ou em bases de vernizes para o tratamento de unhas enfraquecidas e infecções fúngicas. A atividade antidermatofítica do óleo de cravo-da-índia e do eugenol (composto majoritário do óleo) demonstrou potencial atividade (efeito fungistático e fungicida) contra *Microsporum canis*, *M. gypseum*, *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes* e *Epidermophyton floccosum* isolados de unhas e pele (Inouye et al., 2006; Pinto et al., 2009, Lesage-Meessen et al., 2015).

Estudos com o óleo de *Melaleuca alternifolia* Cheel têm demonstrado resultados promissores no tratamento de onicomicose causada por espécies de *Candida* (Martins et al., 2014), inclusive em experimentos *in vivo*, demonstrando sua eficácia no tratamento (Carson et al., 2006; Finch e Warshaw, 2007). Outros trabalhos apontam interessante ação frente *Trichophyton rubrum* (Benger et al., 2004) e *T. mentagrophytes* (Inouye et al., 2006; Marcos-Tejedor, González-García e Mayordomo, 2021). Flores e colaboradores (Flores et al., 2013) comprovaram a atividade do óleo volátil associado em nanocápsulas, no controle do crescimento de *T. rubrum* em modelo *in vitro* de onicomicose. A forte atividade observada deste óleo foi atribuída ao seu principal constituinte, o terpinen-4-ol (Finch e Warshaw, 2007).

O óleo volátil de *Thymus vulgaris* L. é um dos óleos com maior atividade antimicrobiana, apresentando forte ação antifúngica mesmo contra isolados clínicos de onicomicose. Todas as espécies de tomilho são fontes de óleos voláteis ricos em timol e carvacrol, que são os principais responsáveis pela atividade antimicrobiana do óleo (Tullio et al., 2007). Mesmo considerando diferentes quimiotipos do óleo de *T. vulgaris*, aqueles com maiores teores de carvacrol e timol foram mais ativos, quando testados frente a isolados clínicos de onicomicose (Gonçalves et al., 2010). Gollucci e colaboradores (2014) testaram o óleo de *T. vulgaris* contra espécies de *Candida* resistentes ao fluconazol (fármaco de primeira escolha no tratamento de onicomicoses), e tanto os óleos quanto seus constituintes isolados (carvacrol, timol e

eugenol) foram fungicidas, sugerindo que o óleo ou seus produtos isolados podem ser uma alternativa à terapia com fluconazol. Em estudo realizado com 39 pacientes com paroníquia, infecção do tecido ao redor da unha (*Candida* spp. e *Fusarium* spp. foram isoladas das lesões), foi aplicada solução contendo óleo essencial de tomilho, sendo observado cerca de 60% de alívio e 15% de cura após 3 meses de tratamento (Olaizola et al., 2005). Além disso, estudos relataram uma interação adicional entre carvacrol e timol, aumentando a sua própria atividade antifúngica (Henri et al., 2012). Em estudo sobre a avaliação da atividade antifúngica dos óleos voláteis de três espécies de *Thymus* frente a três fungos patogênicos, *Trichophyton violaceum*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Microsporum canis*, o óleo apresentou forte inibição do crescimento destes fungos no meio, além de demonstrar aumento significativo na taxa de inibição dose-dependente (Labiad et al., 2022).

Lavandula angustifolia Mill. é a espécie do gênero *Lavandula* mais comumente utilizada por suas propriedades medicinais (Lesage-Meessen et al, 2015). O óleo volátil de lavanda demonstrou atividade antifúngica contra dois isolados clínicos de onicomicose (*Scopulariopsis brevicaulis* e *Fusarium oxysporum*) além de outras 42 cepas, incluindo fungos dermatófitos (Tullio et al., 2007; Shin e Lim, 2004). Os autores atribuem a atividade antifúngica aos constituintes principais: linalol, acetato de linalila, beta-cariofileno e terpinen-4-ol. Além disso, o óleo mostrou-se ativo frente a espécies de *Candida* (Inouye et al., 2009). Experimentos sobre a atividade antifúngica com outras duas espécies deste gênero, *L. viridis* e *L. luisieri* (Zuzarte et al., 2012), foram conduzidos frente a três cepas isoladas de onicomicose, três isolados de candidíase e quatro cepas de dermatófitos e demonstraram forte atividade antifúngica, principalmente para dermatófitos.

Muitos estudos sobre a atividade antifúngica de óleos voláteis extraídos de espécies de *Eucalyptus* foram conduzidos e mostraram uma excelente e forte atividade contra vários fungos e leveduras patogênicos (Marzoug et al., 2010), incluindo isolados clínicos de *Fusarium oxysporum* (Gupta et al., 2011), *Candida albicans*, *Trichophyton rubrum* e *T. soudanense* (Elaiissi et al., 2012). Em todos os casos, a atividade foi atribuída ao 1,8-cineol (=eucaliptol), o principal constituinte do óleo. O óleo de eucalipto faz parte do medicamento comercial Vick's VapoRub™®, uma pomada torácica indicada para doenças respiratórias e, devido ao seu “uso popular”, para o tratamento de onicomicose. Ramsewak e colaboradores (2003)

isolaram os monoterpenos cânfora, timol, mentol e óleo de eucalipto desta pomada e avaliaram frente a 16 cepas que causam onicomicose. Os autores sugeriram que, como o constituinte majoritário do óleo essencial é um monoterpeno, misturas de diferentes monoterpenos em composição semelhante poderiam ser consideradas como potenciais candidatas ao tratamento da onicomicose. Esta atividade foi confirmada em estudo *in vivo* com pacientes apresentando culturas positivas para *Candida parapsiolis* e *Trichophyton mentagrophytes* (Derby et al., 2011).

A espécie vegetal *Origanum vulgare* L. também é conhecida pela existência de diferentes quimiotipos, como carvacrol, beta-cariofileno, espatulenol, entre outros, sendo que todos os quimiotipos apresentam atividade antifúngica, mas em diferentes graus. Os quimiotipos mais ativos são aqueles que apresentam carvacrol e timol como compostos majoritários (Palmeira-de-Oliveira et al., 2009). Sahin e colaboradores (2004) verificaram a atividade antidermatofítica do óleo de *O. vulgare* contra 15 cepas de fungos, incluindo *Candida albicans*, *Fusarium oxysporum*, *Trichophyton rubrum* e *T. mentagrophytes* e frente a isolados clínicos de onicomicose (Vale-Silva et al., 2012). Em outro estudo, Inouye e colaboradores (2006) descobriram que o óleo de orégano foi o mais ativo contra *T. mentagrophytes*, quando comparado com os óleos de *Melaleuca* e *Lavandula*.

3.5. Espécies vegetais selecionadas para o presente estudo e seus óleos essenciais

3.5.1. Manjericão (*Ocimum basilicum* L.)

O *Ocimum basilicum* da família Lamiaceae (Figura 1), também conhecida como manjericão, é uma planta aromática muito utilizada por seu aroma e sabor únicos em alimentos. As folhas podem ser usadas frescas ou secas como temperos. Os óleos essenciais obtidos de folhas e flores frescas podem ser usados como aditivos de sabor em alimentos, produtos farmacêuticos e cosméticos. Tradicionalmente, o manjericão tem sido usado como medicamento fitoterápico para tratar dores de cabeça, tosse, diarreia, prisão de ventre, verrugas, vermes e danos renais (ARAUJO, 2016). Esta espécie vegetal é uma planta aromática muito utilizada como tempero alimentar e na indústria farmacêutica. Os principais constituintes do óleo essencial de manjericão são metil-chavicol e linalol. Essa composição pode variar de acordo com a região e a constituição genética da planta. Suas propriedades terapêuticas incluem efeito antiespasmódico, antimicrobiano e anti térmico (VELOSO, 2014).

O manjeriço é uma planta anual com folhagem densa e uma variedade de componentes aromáticos. Apresenta distribuição em todos os continentes tropical e subtropical da América, África e Ásia. É uma planta de fácil cultivo, que exige pouca manutenção tanto em ambientes internos quanto externos. Embora possa sofrer danos por geadas e temperaturas abaixo de zero, essa espécie prospera em condições de longa exposição à luz solar direta e solo com boa drenagem. É uma planta valiosa e possui potencial para o desenvolvimento de medicamentos farmacêuticos. Os componentes presentes na planta apresentam potenciais propriedades medicinais, incluindo atividade antiviral contra vírus de DNA e RNA, antibacteriana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, antifúngica, antioxidante, antidiabético, antitumoral e ação neuroprotetora. A planta contém vários constituintes fitoquímicos, que consistem principalmente de linalol, eucalipto, estragol e eugenol (AZIZAH et al., 2023).

O óleo essencial proveniente de *Ocimum basilicum* apresenta ação antifúngica contra vários fungos patogênicos como *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium ochrochloron*, *Trichoderma viridae*, espécies de *Fusarium* como *F. proliferatum* e *F. subglutinans* e, ainda, frente a *Candida albicans*. As propriedades antifúngicas de *O. basilicum* são possivelmente relacionadas à elevada presença de linalol entre os constituintes do óleo essencial. A interação sinérgica entre os diversos componentes que formam o óleo essencial reduz a probabilidade de resistência. Esse fenômeno ocorre devido à dificuldade dos agentes patogênicos em se adaptarem às características de resistência diante de múltiplos compostos presentes nos óleos essenciais. Esse fato aponta para o potencial de desenvolvimento de *O. basilicum* como uma nova classe de medicamentos antifúngicos naturais (AZIZAH, 2023).

O composto metil chavicol é evidenciado em alguns estudos como inibidor da atividade da tirosinase, provavelmente devido ao seu efeito antioxidante. Segundo o autor, a enzima tirosinase é responsável pela oxidação dos fenóis, e sua inibição pode diminuir a secreção de melanina, tendo o seu uso muito aplicado em cosméticos (QASEM et al., 2023).



Figura 1: Folhas de *Ocimum basilicum* L., foto - fonte: freepik)

3.5.2. Cravo-da-india (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M. Perry)

Syzygium aromaticum, conhecido como cravo-da-índia, é uma planta da família Myrtaceae. É cultivado no Sri Lanka, Índia, Madagascar, sul da China e Indonésia. O óleo essencial de cravo é um tempero comum para doces, condimentos e molhos. Também é utilizado na medicina, principalmente no preparo de preparações para uso bucal. Nas zonas costeiras, o cravo-da-índia é regularmente plantado até 200 m acima do nível do mar. Os botões florais, parte comercializada da árvore, começam a crescer quatro anos após o plantio, e são colhidos durante a fase de maturação, antes da floração. O óleo essencial de cravo-da-índia é obtido por hidrodestilação, a partir dos botões florais secos da planta. O composto majoritário é o eugenol, presente em aproximadamente 85% (FARMACOPEIA, 2019). Além deste composto, acetato de eugenila e β -cariofileno também estão presentes no óleo de cravo (BATIHA et al., 2020).

O óleo essencial obtido do cravo-da-india é usado topicamente na fitoterapia para aliviar a dor e promover a cura e tem sido utilizado nas indústrias de perfumes e aromas (PRASHAR et al., 2006). O eugenol é um dos compostos majoritários de *Syzygium aromaticum* e pode inibir o crescimento fúngico atuando na redução da

expressão de enzimas como proteases em *Candida tropicalis*, o que acarreta na interrupção da obtenção de nutrientes pelas células fúngicas, permitindo invasão e dimorfismo, e perturbando a formação de biofilme. Além do mais, a conexão do eugenol com a superfície da célula e sua entrada no ponto específico (a bicamada lipídica da membrana citoplasmática) induz à despolarização das células fúngicas, resultando no escape de íons e na perda do potencial da membrana. Essa perda provoca a interrupção das atividades celulares, culminando na morte da célula (AISY et al., 2023).

Alguns estudos apontam o efeito antifúngico do óleo de cravo, (BIERNASIUK, 2022) demonstrou o efeito antifúngico do eugenol para as cepas de referência clínicas de *Candida* spp. isoladas da cavidade oral de pacientes com neoplasias hematológicas e concluiu que o Eugenol além de outro composto estudado, parece ser um componente bastante promissor para o desenvolvimento de fitofármacos usados de forma tópica no tratamento da candidíase superficial (BIERNASIUK, 2022). Os extratos de *Syzygium aromaticum* também provaram ser soluções alternativas para o tratamento da resistência à *Candida krusei* (AISY et al., 2023). Também foi demonstrado que *S. aromaticum* apresenta efeito inibitório sobre *Fusarium graminearum* (HARČÁROVÁ et al., 2021).



Figura 2: Botões florais secos de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M. Perry) (FONTE AUTOR).

3.5.3. Canela-da-china (*Cinnamomum cassia* (L.) J. Presl)

Cinnamomum cassia (Lauraceae) é uma árvore profundamente enraizada, que se desenvolve em ambientes quentes, úmidos e ensolarados, e possui alta tolerância à sombra. Não suporta condições de geada, neve, seca, água parada ou frio intenso. Seu crescimento é favorável em solo arenoso, solto, fértil e bem drenado, com pH ácido e rico em matéria orgânica. Esta espécie vegetal tem sido utilizada há milhares de anos na China e está documentada em diversos livros da medicina tradicional chinesa. A casca seca de *Cinnamomum cassia* é utilizada tanto como tempero como medicamento, e seu cultivo e uso são disseminados globalmente há muitos milênios. Mais de 300 componentes já foram isolados de *Cinnamomum cassia*, incluindo óleos essenciais, polifenóis, diterpenos e sesquiterpenos, flavonoides, polissacarídeos e outros. Estudos de farmacologia evidenciam que o *Cinnamomum cassia* possui uma vasta gama de atividades farmacológicas, tais como propriedades anti-inflamatória, antibacteriana, antioxidante, neuroprotetoras, antitumoral e aprimoramento do metabolismo de glicose e lipídios. Esses dados ressaltam o alto potencial do *Cinnamomum cassia* para se tornar um medicamento terapêutico natural, de baixo custo, com baixa toxicidade e altamente eficaz. O componente volátil predominante de *Cinnamomum cassia* é o cinamaldeído, que exala um aroma aromático. Vale destacar que esse óleo é insolúvel em água e pode ser extraído de plantas por meio de destilação a vapor (LIU et al., 2021).

O óleo essencial de canela-da-china apresenta em sua composição terpenoides e fenilpropanoides, sendo estes os componentes bioativos, dentre os quais o cinamaldeído é considerado o componente representativo desta espécie vegetal. Além dos componentes químicos encontrados na casca, também foram relatados os componentes químicos de outras partes de *C. cassia*, incluindo folhas e galhos (ZHANG et al., 2019).



Figura 3: Cascas de *Cinnamomum cassia* (L.) J. Presl (FONTE AUTOR)

3.5.4. Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.)

O alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) é uma planta medicinal aromática pertencente à família Lamiaceae e se desenvolve selvagem na maioria dos países do Mediterrâneo. O alecrim é usado na indústria de alimentos para melhorar o sabor, inibir a oxidação e reduzir a contaminação microbiana e em aplicações clínicas. O seu óleo é um líquido amarelo quase incolor com um cheiro distinto e agradável. As atividades antioxidantes e antimicrobianas do alecrim são atribuídas principalmente aos seus compostos fenólicos, incluindo ácido rosmarínico, ácido carnósico, rosmanol, carnosol e epirosmanol. Em geral, tem sido relatado que as atividades antioxidantes têm uma alta correlação com o teor de flavonoides e fenois presentes no óleo. O alecrim também é utilizado na forma de chá para tratar problemas digestivos (CLEFF et al., 2012).

Alguns estudos elucidaram que os componentes encontrados em *Rosmarinus officinalis* têm potencial para serem desenvolvidos como candidatos a fármacos no tratamento da doença de Alzheimer, com excelentes níveis de absorção, baixa toxicidade e capacidade aprimorada de atravessar a barreira hematoencefálica,

conforme demonstrado por análise de acoplamento experimental e molecular (ORESANYA e ORHAN, 2024).

Nos últimos anos, houve uma extensa investigação acerca do potencial antioxidante do *Rosmarinus officinalis* e seus componentes bioativos, tanto em estudos realizados em laboratório quanto em testes com organismos vivos. Especial atenção foi dada aos seus efeitos terapêuticos promissores no combate ao envelhecimento causado pela exposição aos raios UV, dermatite atópica e envelhecimento da pele devido à poluição. Um dos primeiros estudos in vitro nesse período ressaltou a relação interessante entre a capacidade de inibição de proteínas e a ação antioxidante deste composto (LI POMI et al., 2023).



Figura 4: Folhas de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) (FONTE AUTOR)

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 . Local de Desenvolvimento do Trabalho

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Micologia (Biomicolab), Laboratório de Fitoquímica (CPNAT) e no Laboratório de Microbiologia Aplicada, todos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

4.2 . Obtenção dos óleos essenciais

Os óleos voláteis de canela-da-china (*Cinnamomum cassia*) e cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) foram obtidos por hidrodestilação a partir das cascas e botões florais, respectivamente, adquiridos comercialmente. Os óleos voláteis de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e de manjerição (*Ocimum basilicum*) foram comprados do comércio local na forma de óleo volátil obtido através do método de destilação a vapor.

Obtenção do óleo volátil de canela (*Cinnamomum cassia*) e cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) por hidrodestilação:

Para obtenção do óleo volátil de canela-da-china, foram pesados 101,2 g de casca seca e triturada e, para o cravo-da-índia, 111,6 g de botões de florais secos adquiridos em comércio local na cidade de Porto Alegre-RS . As amostras foram submetidas, separadamente, à hidrodestilação por arraste de vapor em aparelho tipo Clevenger, durante 4 horas (Farmacopeia Brasileira, 2019). Após, os óleos obtidos foram armazenados sob refrigeração a -4 °C, sob proteção da luz, até o momento da análise. A determinação do rendimento foi realizada pela leitura do volume do óleo obtido a partir do peso de cada uma das amostras (p/v).

4.3 . Análise química dos óleos essenciais

As análises qualitativa e quantitativa foram realizadas em cromatógrafo em fase gasosa acoplado a detector de massas (CG-MS), modelo Shimadzu QP5000, equipado com uma coluna capilar de sílica fundida Durabond-DB-5 (John Wiley &

Sons Scientific, US, com 30 m x 0,25 mm e preenchida com um filme de 0,25 µm de espessura de polidimetildifenilsiloxano contendo 5% de grupamentos fenila) para separação dos constituintes. As temperaturas do injetor e do detector foram ajustadas a 200 °C e 250 °C, respectivamente. A temperatura da coluna foi programada com rampa de aquecimento de 60 °C a 300 °C com variação de 3 °C/min, com hélio como gás carreador a 80 kPa e fluxo de 1 ml/min. Para a análise cromatográfica os óleos foram diluídos a 2% em éter etílico (v/v) (Synth®).

4.4. Identificação de compostos do óleo essencial

Os componentes foram identificados por comparação de seu índice de retenção relativo, calculado por interpolação linear relativa para o tempo de retenção de uma série de *n*-alcanos e seu espectro de massa com dados obtidos na literatura (ADAMS, 2017), do banco de dados do grupo de pesquisa do laboratório ou por comparação com espectros de massas registrados nos bancos de dados como NIST 62 e NIST 12 (National Institute of Standards and Technology). As quantidades relativas de cada composto foram calculadas a partir das áreas de pico por normalização.

4.5. Isolados de *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes*

As amostras de fungos das espécies *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes* foram obtidas na micoteca do Laboratório de Microbiologia Aplicada da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Foram utilizadas três cepas de *Trichophyton rubrum* provenientes de isolados clínicos de unha e identificadas como TRU 90, TRU 94 e TRU 47 e mais três cepas de *Trichophyton mentagrophytes* das quais duas são provenientes de isolados clínicos de unha identificadas como TME 16 e TME 32 e uma cepa ATCC 9533. As cepas foram mantidas inoculadas em tubos contendo ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol e incubados a 32 °C por 120 horas. Essas cepas foram repicadas semanalmente para manter as amostras em estado ideal para o estudo.

Para o preparo da solução salina 0,9%, foi utilizado 9 g de cloreto de sódio que será diluído em 1000 mL de água destilada. A solução foi autoclavada para que não

houvesse contaminação do experimento. A solução de RPMI foi preparada conforme instruções do fabricante, autoclavada e filtrada. O meio de cultura também foi preparado conforme orientação do fabricante, em tubo e em placas.

Para o preparo do inóculo para o ensaio de suscetibilidade, foi adicionado 2 mL de solução salina 0,9% estéril no tubo contendo o isolado e raspada a superfície da colônia com a alça microbiológica. Esta suspensão fúngica foi vertida para o tubo estéril e decantada. Foi realizada a leitura da transmitância de que deve ser de 80% a 82%. Após o ajuste da suspensão fúngica no espectrofotômetro, foi feita uma diluição 1:50 em caldo RPMI 1640.

4.6. Avaliação da atividade antifúngica

O teste de suscetibilidade foi realizado através da técnica de microdiluição em caldo de acordo com o documento CLSI M-38 A2 em microplacas de 96 poços estéreis, em duplicata (duas linhas para cada isolado fúngico). Assim, pode-se utilizar até quatro isolados por microplacas. O óleo essencial foi previamente solubilizado em DMSO, para uma concentração de 16 mg/mL. O meio RPMI 1640 foi pipetado nas microplacas de forma organizada de modo a manter o controle positivo e o controle negativo. As substâncias testadas foram pipetadas e foi realizada a microdiluição em caldo com a posterior pipetagem do inóculo fúngico em todos os poços, exceto no controle negativo.

Após a finalização do preparo do material nas placas, as mesmas foram colocadas na estufa a uma temperatura de 32 °C. A leitura das placas foi realizada no tempo de 120h. A CIM (concentração inibitória mínima) é definida como a menor concentração capaz de produzir inibição do crescimento de *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes* em relação ao controle positivo.

4.7. Procedimentos para preparação do esmalte

O esmalte foi preparado a partir de uma formulação de coloração vermelha adquirida comercialmente (Composição: Butyl Acetate, ethyl Acetate, Toluene, Nitrocellulose, Tosylamide/Formaldehyde Resin, Acetyl tributyl Citrate, Stearalkonium Hectorite, Isopropyl Alcohol, Formaldehyde Calcium Carbonate, Cocos Nucifera Oil,

Argania Spinosa, Kernel Oil, Panthenol CI 77891) e acrescentado o óleo essencial em três concentrações de 32 mg/mL, 16 mg/mL, 8 mg/mL. Amostra do esmalte sem a adição do óleo foi usado como controle negativo.

Também foi usado para comparação dos resultados um esmalte antifúngico contendo de amorolfina 4%.

4.8. Ensaio de modelo *ex vivo* de Onicomiose

Para confirmação da atividade antifúngica do óleo de Manjeriço (*Ocimum basilicum*) frente aos dermatófitos *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes* foi aplicado teste de modelo *ex vivo* de onicomiose, utilizando casco de porco como substituto de unhas humanas, e tratamento do mesmo com esmalte contendo o óleo de manjeriço.

Amostras

- Fungos dermatófitos das espécies *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* cultivamos em ágar batata;
- Esmalte na cor vermelho contendo 16 mg/mL de óleo de *Ocimum basilicum*;
- Esmalte sem adição do óleo essencial;
- Esmalte com amorolfina 4%.

4.9. Limpeza e preparação dos cascos suínos

Os cascos suínos foram autoclavados por 15 minutos a 121 °C e mantidos por 24h prensados com o auxílio da morsa de bancada, para facilitar os cortes dos discos. Após o corte, os discos foram armazenados em álcool 30% até sua utilização e autoclavados antes do ensaio por 15 minutos a 121 °C.

4.10. Infecção dos cascos suínos

Após o cultivo dos fungos dermatófitos por aproximadamente 7 dias a 32 °C, foi inoculado 100 µL da suspensão fúngica (10⁵ UFC/mL) em uma placa de Petri

contendo ágar batata, com o auxílio de uma alça de drigalski. Os discos foram adicionados na placa com a ajuda de uma pinça, não ultrapassando quatro discos por placa. O período de infecção para o teste foi de 5 dias em uma temperatura de 32 °C.

4.11. Tratamento dos cascos suínos

Após o período de infecção, os cascos foram transferidos para uma placa contendo ágar Sabouraud, onde foi iniciado o tratamento. O esmalte contendo 16 mg/mL do óleo de manjeriço foi avaliado sendo aplicado diariamente por 7 dias em cada disco suíno, com um volume suficiente para cobrir o material.

Ao final do tratamento, os discos foram transferidos com o auxílio de uma pinça, da placa para falcons contendo 2 mL de solução salina. Esses falcons foram levados ao vórtex por 1 minuto e ao sonicador por 20 minutos, para remover as células fúngicas aderidas aos discos. Uma alíquota de 20 µL dessa suspensão foi plaqueada em ágar batata, com o auxílio da alça de drigalski, e armazenada a 32 °C por aproximadamente 7 dias, para a contagem de UFC no final do experimento.

A recidiva foi avaliada pela adição dos discos excedentes em placas de ágar Sabouraud, armazenadas a 32 °C e acompanhadas por até 7 dias. Essa etapa foi muito importante pois permitiu verificar se as células fúngicas permaneciam viáveis no interior dos cascos suínos.

4.12. Procedimentos para tratamento de resíduos

Os resíduos produzidos durante os experimentos foram segregados de acordo com suas características, conforme estabelecido nas normas preconizadas pela COSAT (Comissão de Segurança do Trabalho da Faculdade de Farmácia da UFRGS).

4.13. Análise estatística

Para análise estatística foi utilizado ANOVA e os também serão comparados os resultados de CIM (que é a menor concentração capaz de produzir inibição do

crescimento de *T. rubrum* e *T. mentagrophytes*) e CFM (que é a concentração fungicida mínima) através da análise de variância e comparação entre as médias geométricas de acordo com o teste de Tukey. O teste será considerado significativo quando $p < 0,05$. Os dados serão analisados utilizando o software Graph Pad Prism 5.0.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Rendimento e caracterização dos constituintes dos óleos voláteis por CG-EM

A obtenção do óleo volátil do cravo-da-índia e da canela-da-china foram realizados no laboratório, utilizando a técnica de hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger e o rendimento de óleo obtido foi de 11,2% e 0,4%, respectivamente. O óleo volátil do alecrim e do manjeriço foram obtidos diretamente do comércio e por isso não se tem o rendimento destes dois óleos.

A caracterização química dos óleos voláteis de *Syzygium aromaticum* (cravo-da-índia), *Cinnamomum cassia* (canela-da-china), *Rosmarinus officinalis* (alecrim) e *Ocimum basilicum* (manjeriço) foi realizada por cromatografia em fase gasosa acoplada a detector de massas (CG-EM). Os constituintes foram identificados considerando seu índice de retenção (IR) em relação a uma série homóloga de *n*-alcanos e confirmados pela comparação do espectro de massa dos compostos com a espectroteca (NIST) e dados da literatura.

5.2. Caracterização química do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (cravo-da-índia)

O perfil cromatográfico do óleo volátil do cravo-da-índia obtido por CG-EM está apresentado na Figura 6. A análise cromatográfica revelou que o eugenol (Figura 5) é o componente majoritário correspondendo a 80,2% da composição do óleo e *Z*-acetato de isoeugenol apresentando 18,7% do conteúdo total foram os principais componentes do óleo, sendo responsáveis por 98,9% do conteúdo total do óleo (Tabela 1).

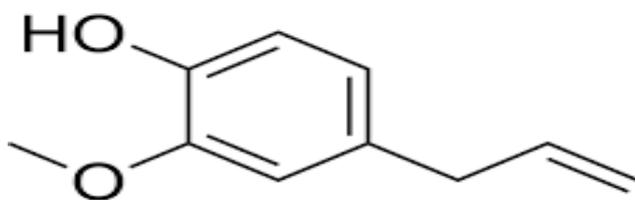


Figura 5: Estrutura química do Eugenol, principal componente do óleo volátil de *Cinnamomum cassia*.

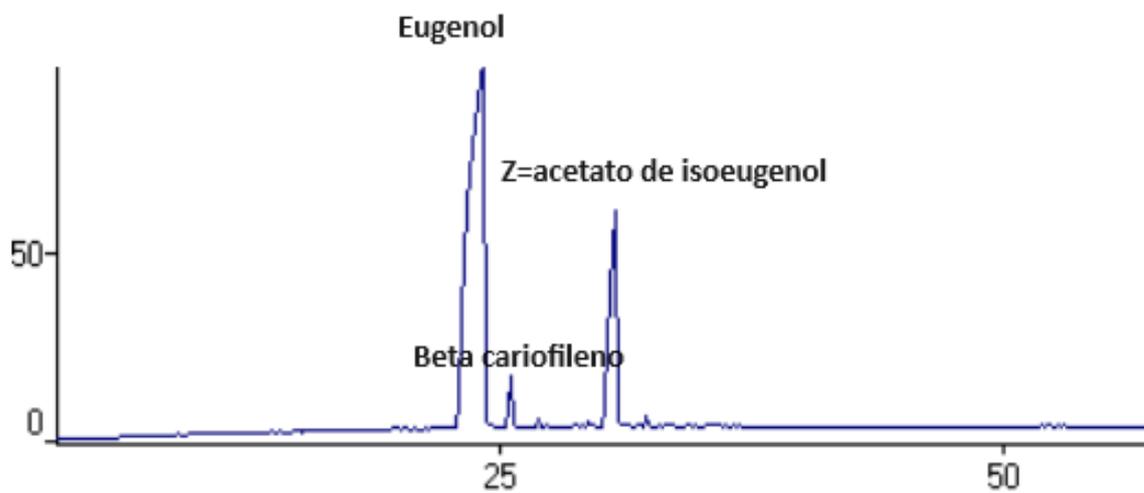


Figura 6: Cromatograma de óleo essencial de *Syzygium aromaticum* obtido por CG-EM.

Tabela 1: Composição percentual dos constituintes do óleo volátil de *Syzygium aromaticum*:

| Constituents | Retention time | IR | % |
|------------------------|----------------|------|------|
| Eugenol | 24,263 | 1382 | 80,2 |
| β -caryophyllene | 26,566 | 1411 | 1,1 |
| Z-isoeugenol acetate | 30,822 | 1539 | 18,7 |

*IR: Índice de retenção em coluna capilar DB-5.

O eugenol é um composto fenilpropanoide, volátil, que apresenta baixa solubilidade em água. Para este composto foi relatada ação antimicrobiana, inseticida, anti-inflamatória e antioxidante. Esse composto fenólico é encontrado em diferentes fontes vegetais, incluindo folhas de canela (*Cinnamomum* spp.), óleo de noz-moscada, entre outras plantas como folhas de tulsi (*Ocimum sanctum*). O Z-acetato de isoeugenol possui propriedades antitumoral, antimutagênica, antioxidante, antiviral e antibacteriana. Já o beta-cariofileno, que é um sesquiterpeno e apresenta propriedades antitumoral, anti-inflamatório, antioxidante e efeito anestésico (PANDEY et al., 2023).

O botão floral de cravo apresenta grande quantidade de óleo essencial, representando de 15 a 21% da planta. O eugenol é o componente principal desse óleo essencial, representando de 70 a 90% do conteúdo, seguido pelo acetato de eugenol, que pode chegar a 17%, e pelo beta-cariofileno, entre 5 e 12% (TAGHIPOUR et al., 2023). Em estudo conduzido por Bariz e colaboradores (2023), o óleo volátil de *S. aromaticum* também foi caracterizado eugenol com um teor de 80,46% e acetato de eugenol representando 16,23% da composição. No estudo de Loukili e colaboradores (2023), o óleo volátil de *S. aromático* apresentou, novamente, eugenol com uma concentração de 72,66%, como principal constituinte, seguido, desta vez, pelo beta-cariofileno, presente em 17,41%.

5.3. Caracterização química do óleo essencial de *Cinnamomum cassia* (canela-da-china)

O perfil cromatográfico do óleo volátil da canela-da-china, obtido por CG-EM, está apresentado na Figura 8. A análise cromatográfica revelou o *E*-cinamaldeído (Figura 7) como principal componente do óleo essencial, respondendo por 99,4% do conteúdo total de óleo (Tabela 2).

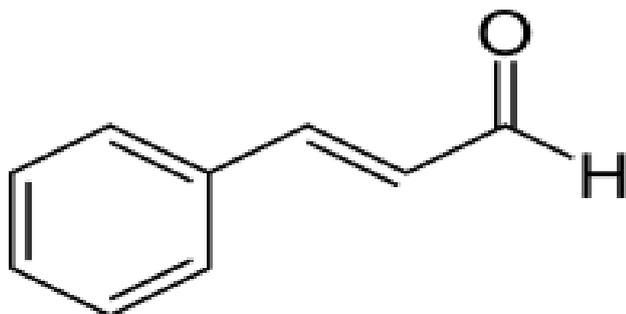


Figura 7: Estrutura química do cinamaldeído, principal componente do óleo volátil de *Cinnamomum cassia*.

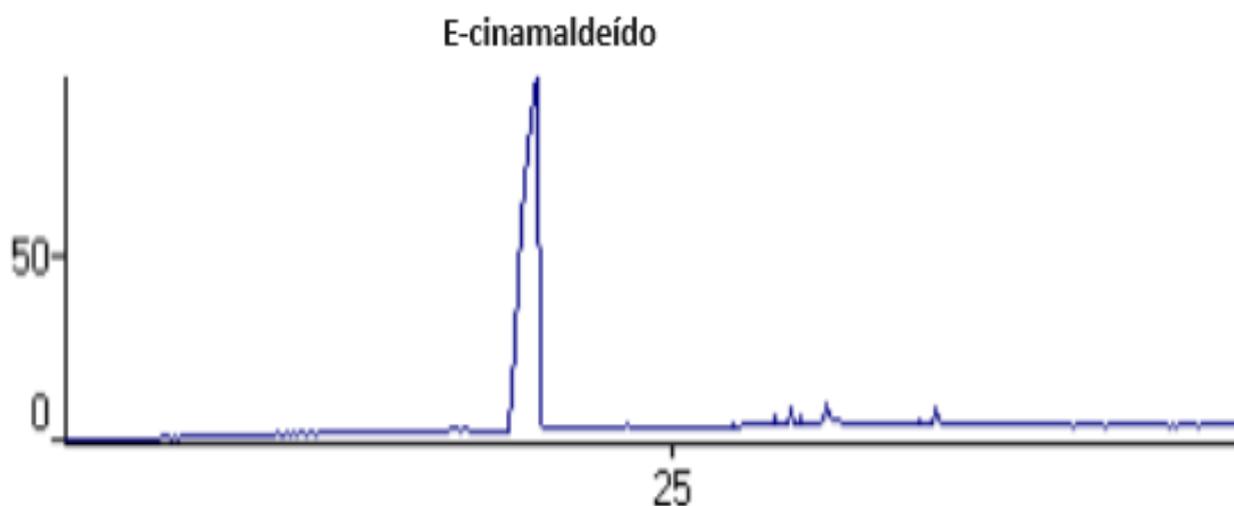


Figura 8: Cromatograma de óleo essencial de *Cinnamomum cassia* obtido por CG-EM.

Tabela 2: Caracterização química do óleo essencial de *Cinnamomum cassia* por CG-EM.

| Constituents | Retention time | IR | % |
|--------------------|----------------|------|------|
| E-cinnamaldehyde | 20,182 | 1291 | 99.4 |
| α -murolene | 28,854 | 1489 | 0.2 |
| E-allyl cinnamate | 30,702 | 1536 | 0.3 |
| Cubenol | 34,67 | 1639 | 0.3 |

*IR: Índice de retenção em coluna capilar DB-5.

Os compostos encontrados corroboram com os dados encontrados na literatura. Liu e colaboradores (2021) relataram, através de uma revisão bibliográfica, mais de 200 componentes encontrados em vários estudos. Segundo os autores, o cinamaldeído é encontrado em abundância, com uma porcentagem relativa de 76% a 91% do conteúdo do óleo volátil. Vepškaitė e colaboradores (2023) obtiveram cinamaldeído (83,32%) como o composto mais abundante no óleo de canela e cássia. O e-cinamaldeído também foi o principal componente encontrado (85,5%) por Rosato e colaboradores (2023), na análise dos componentes do óleo de canela. Zhao et al 2023 também encontraram o E-cinamaldeído como o principal componente do óleo.

Gu e colaboradores (2024) analisaram a composição de 20 óleos essenciais extraídos de *Cinnamomum cassia* cultivada em diferentes regiões geográficas e os principais compostos identificados foram terpenoides (34,04%), compostos aromáticos (4,52%), compostos alifáticos (0,9%) entre outros. A análise hierárquica de agrupamento das composições apresentou uma ampla diversidade de composição química, com quatro principais quimiotipos divididos em grupos A, B, C e D. Todos apresentam *trans*-cinamaldeído como majoritário, porém com teores bem diferentes. O grupo A é o quimiotipo típico de *trans*-cinamaldeído (68,75-91,23%). O grupo B foi dominado como *trans*-cinamaldeído (42,37-6,36%) e acetato de *trans*-cinamila (0,65-3,97%). O grupo C foi dominado por *trans*-cinamaldeído (22,36–29,53%), alfa-calacoreno (0,93-2,71%), alfa-cadinol (0,26-2,93%), enquanto o grupo D por *trans*-

cinamaldeído (28,48%) e benzaldeído (17,2%). A composição do óleo no estudo foi equiparada ao quimiotipo A pelo alto teor de *trans*-cinamaldeído.

5.4. Caracterização química do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* (Alecrim)

O perfil cromatográfico do óleo volátil do alecrim, obtido por CG-EM, está apresentado na Figura 10. A análise cromatográfica revelou que o 1,8-cineol, cânfora e alfa-pineno foram os compostos majoritários do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* (Figura 9), representando 47%, 15% e 12% do conteúdo total do óleo volátil, respectivamente (Tabela 3).

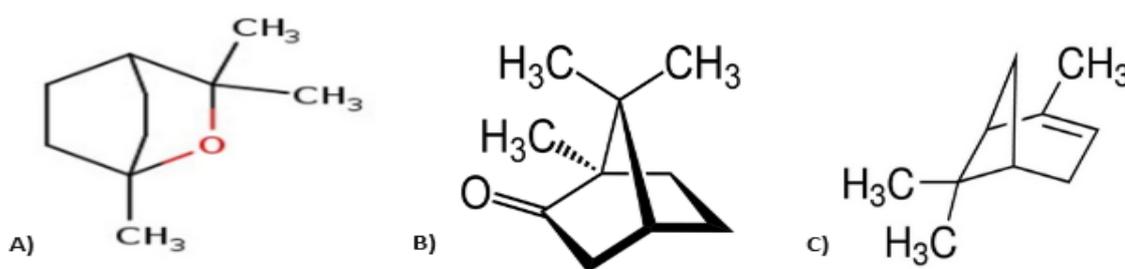


Figura 9: Estrutura química dos principais compostos identificados no óleo volátil do alecrim. A) 1,8-cineol; B) cânfora; e C) alfa-pineno.

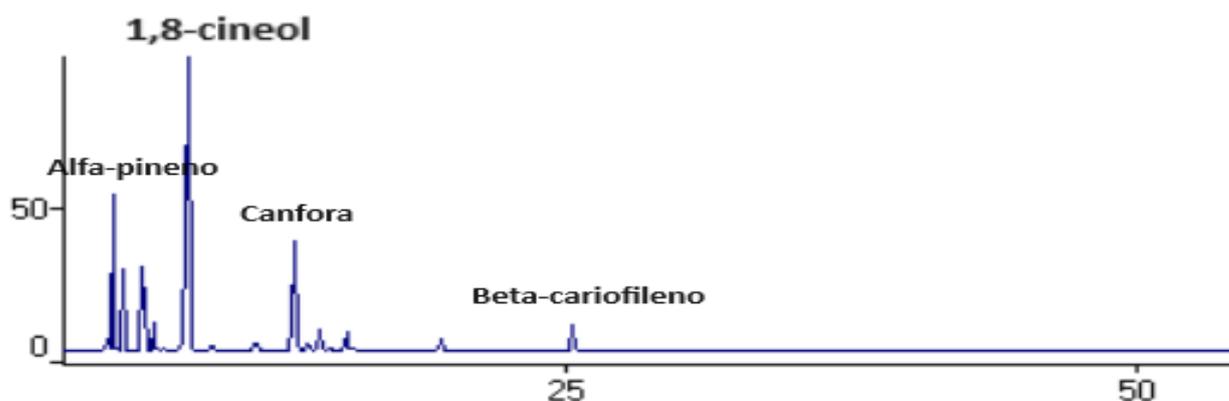


Figura 10: Cromatograma do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* obtido por CG-EM.

Tabela 3: Composição percentual dos constituintes do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis*.

| Constituents | Retention time | IR | % |
|---------------------------|----------------|------|------|
| Tricyclene | 4,937 | 914 | 0.8 |
| α -pinene | 5,277 | 926 | 12.8 |
| Camphene | 5,672 | 939 | 5.9 |
| β -pinene | 6,528 | 967 | 6.4 |
| Myrcene | 7,031 | 984 | 2.0 |
| <i>p</i> -cymene | 8,258 | 1018 | 2.0 |
| 1,8-cineole (=eucalyptol) | 8,561 | 1026 | 47.3 |
| γ -terpinene | 9,55 | 1050 | 0.4 |
| Camphor | 13,207 | 1136 | 15.1 |
| Isoborneol | 13,773 | 1149 | 0.5 |
| Borneol | 14,234 | 1159 | 1.9 |
| α -terpineol | 15,44 | 1185 | 1.5 |
| Isobornyl acetate | 19,562 | 1277 | 1.0 |
| β -caryophyllene | 25,343 | 1406 | 2.4 |

*IR: Índice de retenção em coluna capilar DB-5.

Em estudo científico realizado com o óleo de *R. officinalis*, os compostos detectados também foram monoterpenos como cânfora, 1,8-cineol, α -pineno, verbenona, borneol e piperitona. Estes compostos foram responsáveis pela atividade antioxidante e antimicrobiana relatada (CLEFF et al., 2012).

Em estudos anteriores, Hashemi e colaboradores (2023) identificaram no óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* os monoterpenos alfa-pineno (24,6%), 1,8-cineol (14,1%), cânfora (13,5%), cimeno (8,1%) e limoneno (6,1%), e Bajalan e colaboradores (2018) obtiveram resultado semelhante, no qual os principais compostos de óleo essencial de alecrim também foram alfa-pineno (14,2–21,4%), 1,8-cineol (3,3–28,3%) e cânfora (1,6–25,3%). Em mais um estudo, Oualdi e

colaboradores (2023), confirmam a presença destes compostos como predominantes no óleo de alecrim, sendo eles 1,8-cineol (42,3–53,6%), alfa-pineno (11,6–12,3%) e cânfora (9,6-10,5%). Segundo os autores, a variação na composição química dos óleos essenciais em diferentes pesquisas pode ser atribuída a diferenças nos cultivos, origem geográfica, época de colheita, condições ambientais, métodos de amostragem e extração (Hashemi et al., 2023). Álvarez-Garcia e colaboradores (2023) também encontraram cânfora (20,5%), 1,8-cineol (20,2%), alfa-pineno (18,6%), canfeno (8,35%) e limoneno (5,71%) como compostos predominantes.

5.5. Caracterização química do óleo essencial de *Ocimum basilicum* (Manjericão)

A análise cromatográfica demonstrou que metil-chavicol e o linalol (Figura 11) foram os principais componentes do óleo essencial de *Ocimum basilicum*, sendo responsáveis por 68,81% e 27,94% das substâncias identificadas, respectivamente. Na Figura 12 está apresentado o perfil cromatográfico do óleo volátil de manjericão obtido a partir da sua análise por CG-EM. A Tabela 4 apresenta a composição completa do óleo essencial de *Ocimum basilicum*.

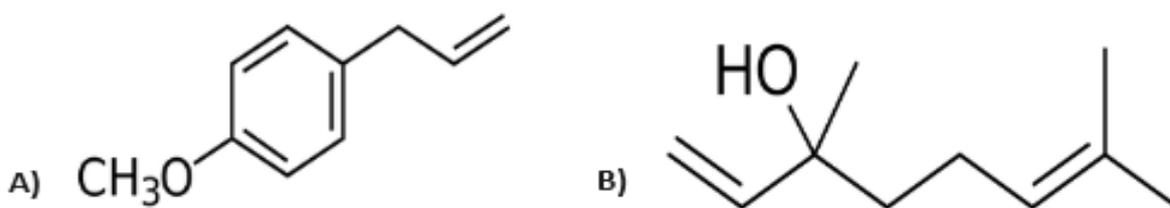


Figura 11: Estrutura química dos principais compostos encontrados no óleo volátil do manjericão. A) Metil-chavicol; B) Linalol.

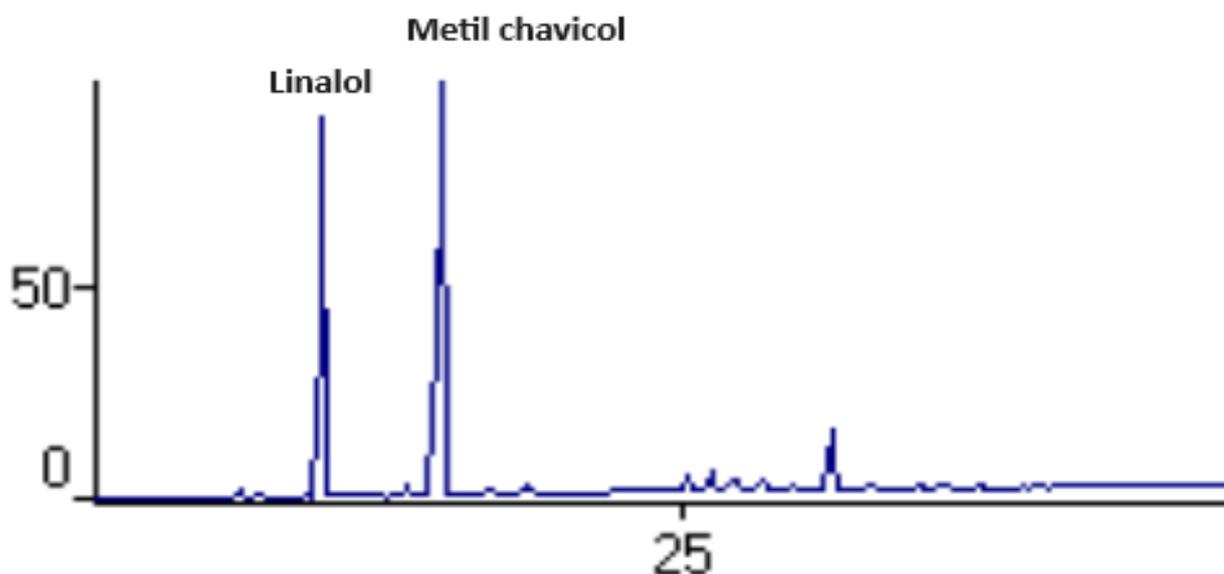


Figura 12: Cromatograma de óleo essencial de *Ocimum basilicum* obtido por CG-EM.

Tabela 4: Composição percentual dos constituintes do óleo essencial de *Ocimum basilicum*.

| Constituents | Retention time | IR | % |
|-------------------------------|----------------|------|------|
| Linalool | 11,579 | 1101 | 27.9 |
| Methyl chavicol (= estragole) | 16,11 | 1200 | 68.8 |
| β -caryophyllene | 25,343 | 1406 | 0.4 |
| α -trans-bergamotene | 26,114 | 1424 | 0.7 |
| α -humulene | 30,637 | 1534 | 2.1 |

*IR: Índice de retenção em coluna capilar DB-5.

O linalol, um dos principais monoterpenos de *O. basilicum*, sendo encontrado nos óleos essenciais de diversas plantas medicinais, principalmente daquelas

pertencentes à família Lamiaceae. O metil-chavicol é um éter monoterpênico volátil encontrado em diversas plantas. Este componente e os seus produtos de biotransformação têm potencial tóxico porque são genotóxicos, mutagênicos e cancerígenos. No entanto, foi considerado seguro pela FEMA (Flavor and Extract Manufacturer's Association, 2008), uma vez que não representa um risco para a saúde humana em pequenas quantidades (0,6 mg/kg/dia). Normalmente, o linalol e o metil-chavicol são os compostos predominantes. Fatores como solo, altitude, temperatura, período de exposição ao sol, cultivo, condições de secagem e armazenamento têm influência sobre a sua composição, o que explica as variações na quantidade desses compostos (MOURA et al., 2021).

Os compostos químicos linalol (monoterpeno) e metil-chavicol (fenilpropanoide) encontrados como os principais constituintes de *O. basilicum* apresentam excelente atividade antifúngica (AZIZAH et al., 2023). Qasem e colaboradores (2023) em um estudo para determinar a composição química de *Ocimum basilicum* também identificaram metil-chavicol (86%) como predominante no óleo essencial, além de outros compostos como *trans*-anetol (8%).

Senthooraja e colaboradores (2021) avaliaram o efeito biológico de *O. basilicum* sobre *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae). A caracterização do óleo essencial de *O. basilicum* revelou a presença de metil chavicol (70,93%) e linalol (9,34%) como constituintes majoritários do óleo. Os autores observaram que as moscas fêmeas adultas mostraram preferência reduzida pela fonte alimentar misturada com óleo essencial de manjericão e metil chavicol, além de um grande efeito ovicida para *O. basilicum* seguido por metil-chavicol e linalol.

5.6. Atividade anti-*Trichophyton* dos óleos essenciais

Inicialmente foi realizada uma investigação com os óleos voláteis para verificar quais deles apresentariam boa resposta frente às cepas das duas espécies de *Trichophyton*. Assim, no primeiro ensaio de microdiluição em caldo em placas de ELISA de 96 poços, foram testadas três cepas de *Trichophyton rubrum* (TRU 90, TRU 94 e TRU 47) e também três cepas de *Trichophyton mentagrophytes* (TME 16, TME 32 e TME ATCC). Apesar de alguns óleos não apresentarem resultados satisfatórios,

os resultados demonstraram inibição do crescimento de algumas cepas conforme está apresentado na Tabela 5.

Tabela 5: Concentração inibitória mínima dos óleos voláteis frente a cepas de *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes*.

| Species | CIM Oil of CC (mg/mL) | CIM Oil of SA (mg/mL) | CIM Oil of RO (mg/mL) | CIM Oil of OB (mg/mL) |
|----------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| TRU 90 | >8 | >8 | >8 | 2 |
| TRU 94 | >8 | >8 | >8 | 2 |
| TRU 47 | >8 | >8 | >8 | 2 |
| TME 16 | >8 | >8 | >8 | 8 |
| TME 32 | >8 | >8 | >8 | 8 |
| TME ATCC 9533 | >8 | >8 | >8 | 2 |

* CIM: concentração inibitória mínima; CC- *Cinnamomum cassia* (canela-da-china); SA- *Syzygium aromaticum* (Cravo-da-india); RO- *Rosmarinus officinalis* (Alecrim); OB- *Ocimum basilicum* (Manjeriçã)

Na tabela 5 estão apresentados os resultados do ensaio de microdiluição em caldo realizados nas espécies de *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes*. No estudo foram utilizadas três cepas de cada espécie sendo elas TRU 90, TRU 94 e TRU 47 para *Trichophyton rubrum* e TME 16, TME 32 e TME ATCC 9533 para *Trichophyton mentagrophytes*. Os resultados obtidos para os óleos de cravo-da-india, canela-da-china e alecrim não foram satisfatórios, apresentando resultados acima de 8 mg/mL, entretanto, o óleo de *Ocimum basilicum* inibiu o crescimento de algumas cepas de *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes* nas concentrações de 8 mg/mL a 2 mg/mL.

Estudos sobre o óleo de *Cinnamomum cassia* têm demonstrado atividade antifúngica frente aos dermatófitos *Microsporum gypseum*, *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes*, apresentando CIM de 18,8 µg/ml a 37,5 µg/ml (OOI, 2006) e contra *Candida albicans* com MIC de 0,25 µL/mL (GU,2024). Quando testado contra *Aspergillus alternata*, *Aspergillus flavus* e *Penicillium crustosum*, apresentou atividade antifúngica (MINOZZO, 2023).

A atividade do óleo de *Syzygium aromaticum* foi avaliado por Khan e Ahmad (2011) apresentando significativa atividade de inibição em uma faixa de concentração de 0,005 a 0,08% v/v, em conídios não germinados e germinados de *Aspergillus fumigatus* e *Trichophyton rubrum*. Em outro estudo, *Syzygium aromaticum* apresentou MIC de 0,5 mg/mL para *A. alternata* (ALLAGUI, 2023).

Para o óleo de *Rosmarinus officinalis* também há relatos de atividade antifúngica frente a *Fusarium culmorum*, *Rhizopus oryzae*, *Penicillium italicum*, e *Aspergillus niger* em outro estudo apresentando valores de CIM que variam de 6,25 a 25 µL/mL (ET-TAZY, 2023). Em outro estudo quando avaliado frente a *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* apresentou CIM de 6,25 a 12,5 mg/mL (TOMASZ, 2023).

O óleo essencial de *Ocimum basilicum* demonstrou atividade antifúngica quando testado frente a *Candida albicans* (RAJALI, 2023), apresentando CIM de 0,125 µg/ml (YIBELTAL, 2022). Outro estudo avaliou a atividade do óleo de *O. basilicum* frente a *Aspergillus niger*, *A. fumigatus*, *Penicillium italicum* and *Rhizopus stolonifer* e a CIM apresentada foi de 50 µL/mL a 100 µL/mL (MASKRI, 2011).

Ao observar os resultados decidimos continuar os testes com o óleo de *Ocimum basilicum* (manjeriçã) que apresentou resultados promissores. Desta forma, foi aplicada novamente a técnica de microdiluição em caldo em placas de ELISA de 96 poços, em triplicata, confirmando o resultado obtido anteriormente. Na Tabela 6 estão apresentados os resultados obtidos para a concentração inibitória mínima (CIM) do óleo de *Ocimum basilicum* (manjeriçã), em mg/mL, utilizando o método de microdiluição em caldo.

A capacidade dos óleos essenciais provenientes de espécies vegetais de inibir o crescimento fúngico depende de sua composição química, tanto qualitativa quanto quantitativa (LORAN et al., 2022). A atividade antifúngica do óleo essencial de *Ocimum basilicum* se deve, principalmente, aos seus compostos principais, eugenol,

linalol e metil-chavicol que agem sinergicamente danificando a membrana celular e afetando uma variedade de funções celulares, como a síntese de energia, a ruptura da bomba de prótons, a diminuição do potencial da membrana e o esgotamento do ATP. Além disso, efeitos da atividade dos compostos essenciais de óleo do *Ocimum basilicum* incluem a coagulação dos conteúdos celulares, o vazamento de citoplasma e, por fim, a apoptose ou necrose celular, que resulta na morte das células (ZHAKIPBEKOV et al., 2024).

5.7. Ensaio de modelo *ex vivo* de Onicomiose

O uso de tecidos *ex vivo* em laboratório pode criar um ambiente favorável para o desenvolvimento de infecções, mantendo a estrutura e as células do tecido. Por isso, os modelos *ex vivo* em laboratório se tornaram uma opção interessante para testes de novos antifúngicos, pois não requerem aprovação de comitê de ética (DA COSTA et al., 2021).

Os resultados obtidos no tratamento dos cascos suínos com o esmalte vermelho contendo o óleo essencial foi comparado com esmalte vermelho sem adição do óleo essencial e esmalte contendo amorolfina 4%, sendo estes comparados com o controle de infecção sem tratamento.

Na Figura 13 estão apresentadas as placas contendo os discos de cascos suínos no momento da preparação do ensaio e antes de iniciar o tratamento. Nela estão apresentadas as imagens identificadas da seguinte maneira: A) Controle de tratamento TME ATCC 9533 constituído de disco de casco suíno contaminado com *Trichophyton mentagrophytes* da cepa TME ATCC 9533; B) Controle de tratamento TRU 47 constituído de disco de casco suíno contaminado com *Trichophyton rubrum* da cepa identificada como TRU 47; C) Controle de tratamento TRU 94 constituído de disco de casco suíno contaminado com *Trichophyton rubrum* da cepa identificada como TRU 94; D) Controle do esmalte TME ATCC 9533 constituído de disco de casco suíno contaminado com *Trichophyton mentagrophytes* da cepa TME ATCC 9533; E) Controle do esmalte TRU 47 constituído de disco de casco suíno contaminado com *Trichophyton rubrum* da cepa identificada como TRU 47; F) Controle do esmalte TRU 94 constituído de disco de casco suíno contaminado com *Trichophyton rubrum* da

cepa identificada como TRU 94; G) Controle de crescimento TME ATCC 9533 constituído de disco casco suíno contaminado com *Trichophyton mentagrophytes* da cepa TME ATCC 9533; H) Controle de crescimento TRU 47 constituído de disco de casco suíno contaminado com *Trichophyton rubrum* da cepa identificada como TRU 47; I) Controle de crescimento TRU 94 constituído de disco de casco suíno contaminado com *Trichophyton rubrum* da cepa identificada como TRU 94; J) TME ATCC 9533 constituído de disco casco suíno contaminado com *Trichophyton mentagrophytes* da cepa TME ATCC 9533; K) TRU 47 constituído de disco de casco suíno contaminado com *Trichophyton rubrum* da cepa identificada como TRU 47; L) TRU 94 constituído de disco de casco suíno contaminado com *Trichophyton rubrum* da cepa identificada como TRU 94 M) Controle negativo constituído de casco suíno não contaminado.

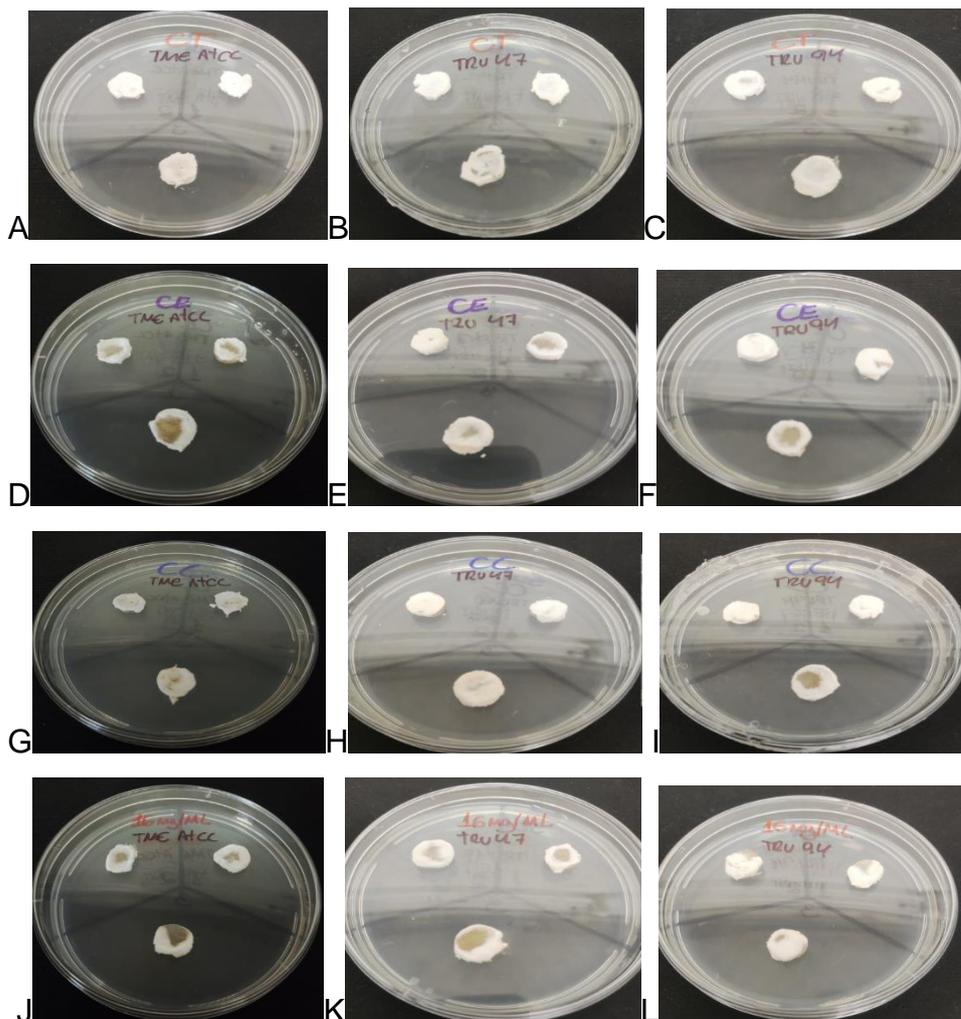




Figura 13: Preparação das placas antes do início do tratamento. A) Controle de tratamento TME ATCC 9533. B) Controle de tratamento TRU 47. C) Controle de tratamento TRU 94. D) Controle do esmalte TME ATCC 9533. E) Controle do esmalte TRU 47. F) Controle do esmalte TRU 94. G) Controle de crescimento TME ATCC 9533. H) Controle de crescimento TRU 47. I) Controle de crescimento TRU 94. J) TME ATCC 9533. K) TRU 47. L) TRU 94. M) Controle negativo = Casco suíno.

A Figura 14 apresenta o início do tratamento, quando o esmalte é aplicado sobre os cascos suínos, momento atribuído como tempo zero. Nessa figura estão apresentadas as imagens dos cascos suínos contaminados com *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes* no momento da aplicação dos tratamentos com esmalte contendo amorolfina 5% que foi utilizado como controle do tratamento nas imagens A, B e C; base de esmalte vermelho adquirido comercialmente sem a adição de nenhum composto, sendo utilizado para controle do esmalte nas imagens D, E e F; apenas os discos de cascos suínos sem aplicação de nenhum tratamento utilizados como o controle de crescimento; base de esmalte vermelho acrescentado de óleo de *Ocimum basilicum* nas imagens J, K e L e o controle negativo onde foi utilizado apenas o disco de casco suíno não contaminado e sem aplicação de tratamento. O tratamento foi aplicado por sete dias consecutivos onde foi padronizado a aplicação de duas gotas do esmalte em cada casco, quantidade suficiente para cobrir os cascos.

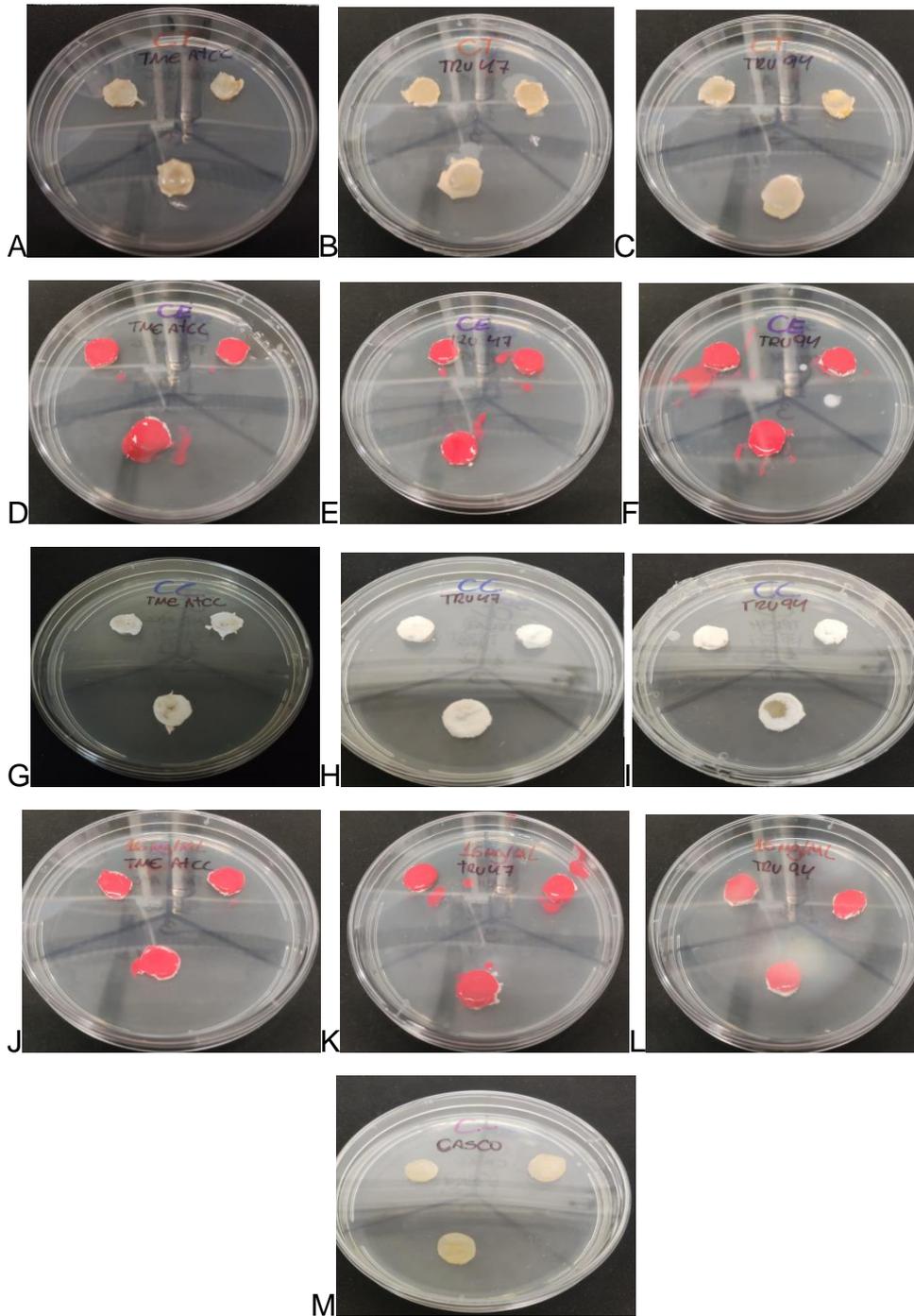


Figura 14: Início do tratamento tempo zero: A) Controle de tratamento (Esmalte com amorolfina 5%) X TME ATCC 9533. B) Controle de tratamento (Esmalte com amorolfina 5%) X TRU 47. C) Controle de tratamento (Esmalte com amorolfina 5%) X TRU 94. D) Controle do esmalte (Esmalte vermelho sem adição do óleo) X TME ATCC 9533. E) Controle do esmalte (Somente esmalte vermelho sem adição do óleo) X TRU 47. F) Controle do esmalte (Somente esmalte vermelho sem adição do óleo) X TRU 94. G) Controle de crescimento TME ATCC 9533. H) Controle de crescimento TRU 47. I) Controle de crescimento TRU 94. J) Esmalte + óleo de *Ocimum basilicum* 16 mg/mL X TME ATCC 9533. K) Esmalte + óleo de *Ocimum basilicum* 16 mg/mL X TRU 47. L) Esmalte + óleo de *Ocimum basilicum* 16 mg/mL X TRU 94. M) Controle negativo.

Após incubação por sete dias, período no qual foi aplicado diariamente o tratamento, é possível observar, na Figura 15, o resultado visual do teste. O crescimento dos fungos *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes* nos discos de cascos suínos sem aplicação de tratamento (controle positivo) nas imagens A, B e C com as cepas TRU 94, TME ATCC 9533 e TRU 47, respectivamente, sem sinais de contaminação o que torna o teste confiável. Na imagem D, temos o controle negativo (somente o disco de casco suíno não contaminado) e é possível verificar que não houve crescimento de fungo nem contaminação da placa o que valida o teste. As imagens E e F apresentam o resultado visual da aplicação do controle de tratamento (esmalte incolor com amorolfina 5%) frente as cepas TRU 94 e TRU 47, podemos observar que não houve crescimento visual dos fungos, a mancha esbranquiçada sobre os cascos é referente ao próprio esmalte de amorolfina. As imagens G, H e I apresentam a aplicação do esmalte de cor vermelho sem adição do óleo essencial de *Ocimum basilicum*, ou seja, somente o esmalte, nas cepas TME ATCC 9533, TRU 47 e TRU 94 respectivamente e não se observa crescimento fúngico nos cascos. As imagens J, K e L são o resultado do tratamento com o esmalte contendo o óleo essencial de *ocimum basilicum* na concentração de 16 mg/mL sobre os cascos suínos contaminados com as TRU 47, TME ATCC 9533 e TRU 94 e também não se observa crescimento fúngico.

Os resultados visuais desse teste indicam que houve inibição do crescimento com a aplicação do tratamento. A confirmação desses resultados só é possível através da aplicação da contagem das unidades formadoras de colônias e a avaliação de recidiva, cujos resultados estão apresentados e discutidos nas tabelas 7 e 8.

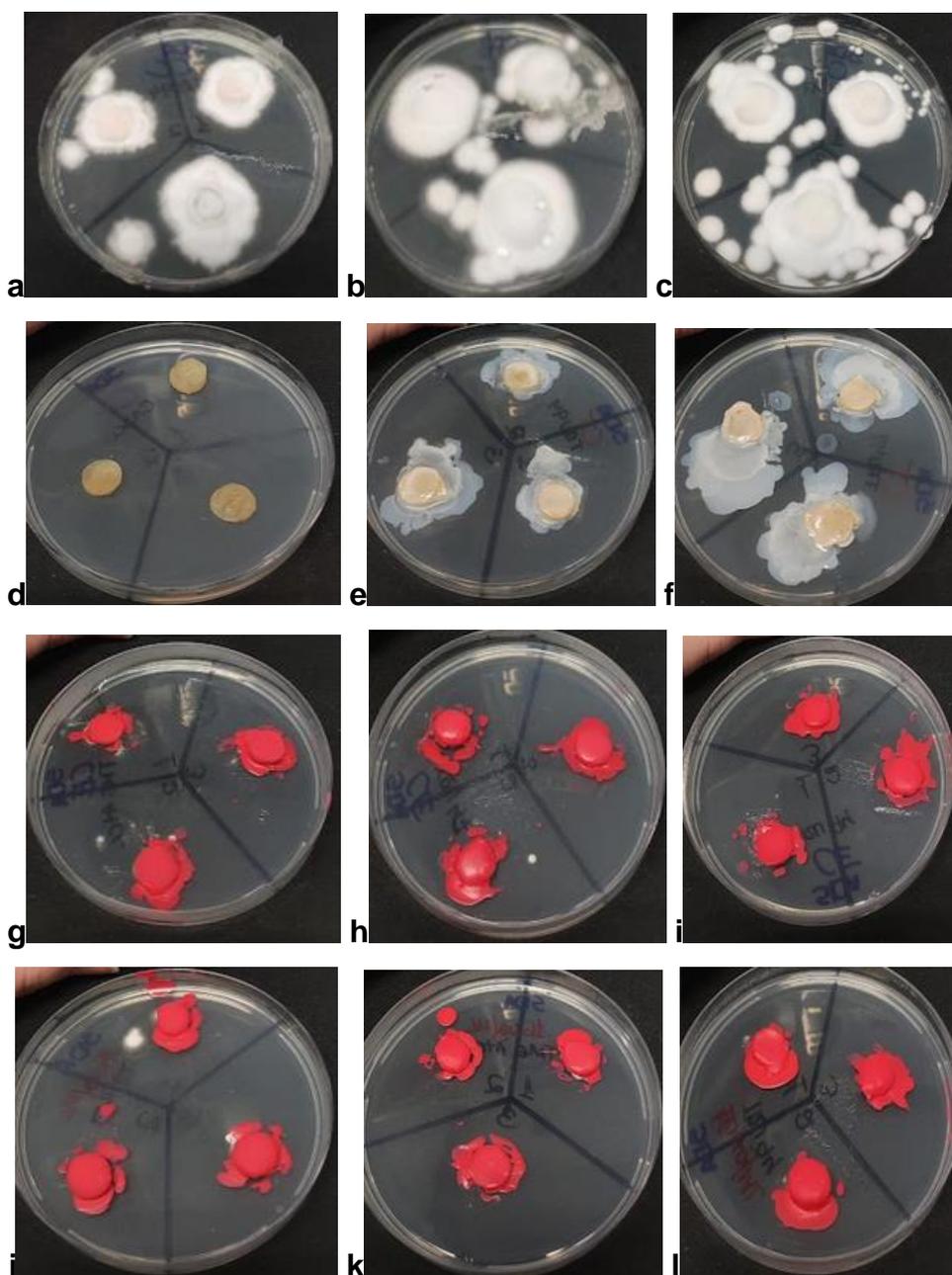


Figura 15: a) Controle de crescimento TRU 94; b) Controle de crescimento TME ATCC 9533; c) Controle de crescimento TRU 47; d) Controle negativo (somente o casco) e) Controle de tratamento (amorolfina 5%)TRU 94; f) Controle de tratamento (amorolfina 5%)TRU 47; g) Controle esmalte (somente esmalte) TME ATCC 9533; h) Controle esmalte (somente esmalte) TRU 47; i) Controle esmalte (somente esmalte) TRU 94; j) Tratamento (Esmalte + óleo essencial de *ocimum basilicum* 16 mg/mL) x TRU 47; k) Tratamento (Esmalte + óleo essencial de

ocimum basilicum 16 mg/mL) x TME ATCC 9533; l) Tratamento (Esmalte + óleo essencial de *ocimum basilicum* 16 mg/mL) x TRU 94.

A Tabela 6 apresenta os resultados obtidos do percentual de inibição do crescimento das espécies de *T. rubrum* e *T. mentagrophytes*, quando aplicado tratamento com o controle do esmalte, onde somente uma formulação de esmalte na cor vermelho vendido comercialmente foi aplicada, esmalte + óleo de *Ocimum basilicum*, onde foi utilizado esmalte vermelho vendido comercialmente adicionado do óleo de *Ocimum basilicum* e o controle de tratamento com esmalte de amorolfina na concentração de 5% vendido comercialmente.

Através da análise dos dados podemos observar que houve inibição do crescimento dos fungos com o esmalte que contém óleo de *Ocimum basilicum* e os resultados foram praticamente idênticos aos do controle do tratamento com o esmalte de amorolfina 5%. Porém, observou-se também que o esmalte base vermelho sem a adição do óleo de *Ocimum basilicum* apresentou resultados de inibição do crescimento muito próximos dos resultados obtidos para o esmalte com o óleo e o controle de tratamento o que evidencia que o uso frequente de esmalte pode reduzir a chance de crescimento dessas espécies nas unhas.

Tabela 6: Resultados do percentual de inibição do crescimento das espécies *Trichophyton rubrum* e *T. mentagrophytes*.

| Espécie | Percentual de inibição do controle do esmalte (somente esmalte) (%) | Percentual de inibição do esmalte + óleo <i>Ocimum basilicum</i> (%) | Percentual de inibição do controle de tratamento Amorolfina 5% (%) |
|---------|---|--|--|
| TRU 47 | 99,99 | 99,99 | 100 |
| TRU 94 | 99,95 | 100 | 100 |

A Tabela 7 apresenta os resultados da avaliação de recidiva da infecção após sete dias do final do tratamento onde podemos verificar se as células fúngicas permaneciam viáveis ou não no interior dos cascos. Esse teste é de extrema importância, visto que apenas a inibição do crescimento fúngico não significa inviabilidade das células fúngicas o que resulta em recorrência da infecção após o término do tratamento. O resultado pretendido é que não haja recidiva após o tratamento o que evidencia que as células fúngicas foram destruídas com o uso da terapêutica. Os resultados foram apresentados como “Sim” que significa que houve recidiva e “Não” que significa que não houve recidiva. Apesar de todos os tratamentos testados apresentaram resultados satisfatórios em relação a inibição do crescimento, apenas o esmalte do controle de tratamento com amorolfina 5% não apresentou recidiva do crescimento dos fungos em nenhuma das cepas, enquanto nos ensaios com esmalte comercial sem adição do óleo e esmalte comercial + óleo de *Ocimum basilicum* houve recidiva de crescimento fúngico em algumas cepas. No caso do esmalte comercial com adição do óleo de *Ocimum basilicum*, a concentração utilizada para o teste foi muito baixa, sendo apenas o dobro da CIM encontrada no estudo. Existem relatos na literatura que esclarecem que a concentração utilizada deveria ser 10 vezes maior que a concentração encontrada no ensaio de microdiluição em caldo e esse fato pode ter sido um fator que impactou nos resultados.

Tabela 7: Resultados da avaliação de recidiva de infecção fúngica.

| Espécie | Esmalte base vermelho com adição do óleo de <i>Ocimum basilicum</i> | Esmalte base vermelho sem adição de óleo de <i>Ocimum basilicum</i> | Controle do tratamento (Esmalte com amorolfina 5%) | Controle do casco contaminado sem tratamento | Controle Negativo (casco não infectado) |
|----------------|--|--|---|---|--|
| TRU 47 | Sim | Sim | Não | Sim | Não |
| TRU 47 | Sim | Sim | Não | Sim | Não |
| TRU 47 | Sim | Não | Não | Sim | Não |
| TRU 94 | Sim | Sim | Não | Sim | Não |
| TRU 94 | Não | Sim | Não | Sim | Não |
| TRU 94 | Não | Não | Não | Sim | Não |
| TME ATCC | Sim | Sim | Não | Sim | Não |
| TME ATCC | Sim | Sim | Não | Sim | Não |
| TME ATCC | Não | Sim | Não | Sim | Não |

* Sim = Houve recidiva e Não = Não houve recidiva

O uso de tecidos *ex vivo* em um ambiente artificial pode criar condições favoráveis para o desenvolvimento de uma condição infecciosa, preservando parcialmente a estrutura e os diferentes tipos de tecido presentes. Dessa forma, os

modelos *ex vivo* se tornaram uma opção atrativa nos testes de desenvolvimento de novas fórmulas antifúngicas, com a vantagem de não exigirem aprovação de um comitê de ética (DA COSTA et al., 2021). Modelos alternativos *ex vivo* que simulam processos infecciosos *in vivo* são de fundamental importância para avaliar novos medicamentos. Embora estudos usando modelos infecciosos alternativos para avaliar a eficácia de moléculas antifúngicas tenham sido cada vez mais descritos e relatados, não há um consenso crítico estabelecendo quais são os mais adequados para cada tipo de infecção (QUATRIN et al., 2019).

A partir da análise dos resultados do modelo de onicomicose podemos observar que as formulações do esmalte sem o óleo essencial e com a adição do óleo de *Ocimum basilicum* na concentração de 16 mg/mL apresentaram valores de percentual de inibição muito próximos que variaram de 99,95% a 100% e, em algumas amostras, houve recidiva para ambos. Isso se deve ao fato de a concentração do óleo utilizada na formulação do esmalte não ser suficiente para inibir o crescimento e evitar recidivas. O controle de tratamento à base de amorolfina 5% apresentou 100% de inibição do crescimento e não apresentou recidiva após o tratamento.

Dentre as espécies do gênero *Ocimum*, *O. basilicum* é a mais conhecida. Vários autores descreveram o potencial antifúngico do óleo essencial desta espécie vegetal. AbouEl-Soud e colaboradores (2015) demonstraram que o óleo volátil desta espécie é capaz de reduzir o crescimento micelial, bem como a produção de aflatoxina B em *Aspergillus flavus*. Além disso, também é capaz de diminuir o crescimento de *A. parasiticus* e a produção de micotoxinas associada (Císarová et al., 2016). O crescimento de *Trichosporon ovoides* é inibido pela presença do óleo essencial de *O. basilicum* (Saxena et al., 2012), além disso, o óleo também é capaz de inibir o crescimento de outros fungos dermatófitos (Bozin et al., 2006; Nardoni et al., 2015). Da mesma forma, o óleo essencial de *O. basilicum* inibe o crescimento de *A. niger* (Shirazi et al., 2014; Fitsiou et al., 2016;) e *Candida albicans* (López et al., 2005; Shirazi et al., 2014).

Outro estudo com o óleo volátil de *O. basilicum*, rico em linalol (35,1%) e eugenol (20,7%), foi testado frente a *Trichophyton mentagrophytes*, *T. rubrum* e *T. verrucosum*. O óleo essencial apresentou atividade fungistática (CIM = 0,64–1,25 µL/mL) e fungicida (MLC = 2,5–5 µL/mL). Em relação aos principais compostos do óleo essencial de manjeriço relatado no estudo, o metil-eugenol e o eugenol

apresentaram uma atividade muito forte, enquanto o linalol exerce uma atividade muito fraca, quando testados isoladamente. O eugenol demonstrou atividade promissora (CIM=0,08–0,64µL/mL) contra todas as cepas testadas. Desta forma, é sugerido que a atividade antifúngica do óleo essencial de *O. basilicum* possa ser devida à quantidade de eugenol, uma vez que o linalol apresentou atividade muito fraca (Piras et al., 2018).

Para o óleo volátil de *Rosmarinus officinalis* L., rico em α -pineno (50,8%) e 1,8-cineol (24,4%), há relatos na literatura especializada sobre a atividade antifúngica, testada frente a duas cepas de fungos dos gêneros *Trichophyton* e *Aspergillus*. Como resultado, foi verificado que o óleo volátil de *R. officinalis* foi ativo contra uma cepa de cada gênero de fungo (Mekonnen et al., 2016).

Dentre deste contexto, estudos têm demonstrado que os óleos voláteis são uma fonte de novas moléculas terapêuticas e que a sua incorporação em formulações de uso tópico é uma alternativa interessante, segura e eficaz para o tratamento de onicomicoses. Como os óleos voláteis são ricos em moléculas de baixo peso molecular e lipofílicas, os compostos ativos podem proporcionar melhor penetração e atingir os elementos fúngicos no interior da lâmina ungueal. Mais estudos são necessários para comprovar a penetração de compostos ativos na lâmina ungueal e a eficácia in vivo no tratamento da onicomicose. O desenvolvimento de novas formulações contendo óleos voláteis apresenta-se como potencial alternativa para o tratamento de onicomicoses.

6. CONCLUSÕES

O presente estudo elucidou resultados promissores através da aplicação de metodologias de pesquisa para evidenciar o potencial efeito antifúngico e o uso de óleos essenciais no tratamento de onicomicoses. Foi realizada a obtenção dos óleos voláteis de canela-da-china (*Cinnamomum cassia*) e cravo-da-india (*Syzygium aromaticum*) a partir das cascas e botões florais, respectivamente, utilizando a técnica de hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger e o rendimento de óleo obtido foi de 11,2% para o óleo de canela-da-china (*Cinnamomum cassia*) e 0,4% para cravo-da-india (*Syzygium aromaticum*). Os óleos voláteis de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e manjerição (*Ocimum basilicum*) foram obtidos diretamente do comércio e por isso não são apresentados o rendimento destes dois óleos.

A caracterização química dos óleos voláteis foi realizada por cromatografia em fase gasosa acoplada a detector de massas (CG-EM). A análise cromatográfica do óleo volátil do cravo-da-india (*Syzygium aromaticum*) revelou que o eugenol é o principal componente do óleo, sendo responsável por 80,2% da sua composição. O óleo volátil da canela-da-china (*Cinnamomum cassia*), apresentou o *E*-cinamaldeído como principal componente do óleo essencial, respondendo por 99,4% do conteúdo total de óleo. O óleo volátil de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) apresenta 1,8-cineol e cânfora como compostos majoritários, representando 47% e 15% do conteúdo total do óleo volátil, respectivamente. Na análise do óleo essencial de manjerição (*Ocimum basilicum*), o metil-chavicol foi o principal componente, sendo responsável por 68,81% das substâncias identificadas.

Os resultados obtidos nos ensaios de microdiluição em caldo para os óleos de cravo-da-india, canela-da-china e alecrim não foram satisfatórios, apresentando resultados acima de 8 mg/mL. Entretanto, o óleo de manjerição (*Ocimum basilicum*) inibiu o crescimento de algumas cepas de *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes* nas concentrações de 8 mg/mL a 2 mg/mL e, dessa forma, foi selecionado para dar sequência na investigação do seu potencial efeito antifúngico e suas possíveis aplicações.

Devido ao potencial antifúngico do óleo volátil de *Ocimum basilicum*, houve a intenção de associar este óleo a uma formulação de esmalte na coloração vermelho, visto que, atualmente, não há no mercado esse tipo de formulação com esse óleo

promissor para o tratamento de dermatofitoses. Foram feitos testes de disco difusão e modelo *ex vivo* para onicomicose com preparado de esmalte com coloração associado ao óleo de *Ocimum basilicum*, obtendo-se resultados promissores e em algumas cepas sem recidiva da infecção fúngica caracterizando que as células fúngicas não permaneciam viáveis no interior do casco após o tratamento. Este resultado é considerado inédito. Há perspectivas de desenvolver mais estudos e outros testes com concentrações maiores do óleo a ser testado.

7. REFERÊNCIAS

ADAMS, R.P. *Identification of essential oils by ion trap mass spectrometry*. New York: Academic Press, 2017.

AGGARWAL, R.; TARGHOTRA, M.; KUMAR, B.; SAHOO, P.K.; CHAUHAN, M.K. Treatment and management strategies of onychomycosis. **Journal of Medical Mycology**, v. 30, n. 2, p. 100949, 2020.

AISY, D.; ADAWIYAH, R.; ROZALIYANI, A.; ESTUNINGTYAS, A.; FADILAH, F. The antifungal activities of *Syzygium aromaticum* and *Alpinia purpurata* extracts against *Candida krusei*: Bioactivity Tests, Molecular Modeling, and Toxicity Tests. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP**, v. 24, n. 10, p 3403-3409, 2023.

ALLAGUI, M. B., MOUMNI, M., & ROMANAZZI, G. Antifungal Activity of Thirty Essential Oils to Control Pathogenic Fungi of Postharvest Decay. **Antibiotics (Basel, Switzerland)**, vol. 13 n.1, p. 28, 2023.

ALBUCKER, S.J.; LIPNER, S.R. A Bibliometric Analysis of the Top 100 Highly Cited Onychomycosis Publications Using SCOPUS Database (1972-2022). **Skin Appendage Disorders**, v. 9, n. 5, p. 333-341, 2023.

ALFARO, S.; DANIELA, A.; GONZÁLEZ, F.; CARMEN, G. Onichomicosis en pediatría: actualización y tratamiento. **Andes Pediatrica**, v. 91, n. 1, p. 131-138, 2020.

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

ALMEIDA, L.F.D.; CAVALCANTI, Y.W.; CASTRO, R.D.; LIMA E.O. Atividade antifúngica de óleos essenciais frente a amostras clínicas de *Candida albicans* isoladas de pacientes HIV positivos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 4, p. 649-655, 2012.

AL-MASKRI, A. Y., HANIF, M. A., AL-MASKARI, M. Y., ABRAHAM, A. S., AL-SABAHI, J. N., & AL-MANTHERI, O. Essential oil from *Ocimum basilicum* (*Omani Basil*): a desert crop. **Natural product communications**, v. 6, n.10, p. 1487–1490, 2011.

ÁLVAREZ-GARCÍA, S.; MOUMNI, M.; ROMANAZZI, G. Antifungal activity of volatile organic compounds from essential oils against the postharvest pathogens *Botrytis cinerea*, *Monilinia fructicola*, *Monilinia fructigena*, and *Monilinia laxa*. **Frontiers in plant science**, v. 14, p. 1274770, 2023.

ARAÚJO SILVA V.; SOUSA, J.P.; PESSÔA, H.L.F.; DE FREITAS, A.F.R.; COUTINHO, H.D.M.; ALVES, L.B.N. *Ocimum basilicum*: Antibacterial activity and association study with antibiotics against bacteria of clinical importance. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 5, p. 863-7, 2016.

AZAMBUJA, C.V.A.; PIMMEL, L.A.; KLAFKE, G.B.; XAVIER, M.O. Onychomycosis: clinical, mycological and in vitro susceptibility testing of isolates of *Trichophyton rubrum*. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 89, n. 4, p. 581-586, 2014.

AZIZAH, N.S.; IRAWAN, B.; KUSMORO, J.; SAFRIANSYAH, W.; FARABI, K.; OKTAVIA, D.; DONI, F.; MIRANTI, M. Sweet Basil (*Ocimum basilicum* L.) - A Review of Its Botany, Phytochemistry, Pharmacological Activities, and Biotechnological Development. **Plants**, v. 12, n. 24, p. 4148, 2023.

BAJALAN, I.; ROUZBAHANI, R.; PIRBALOUTI A.G.; MAGGI, F. Quali-quantitative variation of essential oil from Iranian rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) accessions according to environmental factors. **Journal of Essential Oil Research**, v. 30, p. 16–24, 2018.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils: a review. **Food Chemistry and Toxicology**, 46, p. 446–75, 2008.

BARIZ, K.; TRABELSI, L.; LAHCENE, S.; SALEM-BEKHIT, M.M.; ELOSSAILY, G.M.; ALI ALZHRANI, H.; ALHARBI, O.O.; ABBACI, M.; ABBACI, H.; BENGUERBA, Y.; HOUALI, K. Evaluating the Synergistic Potency of Essential Oils and Antibiotics Against *Klebsiella pneumoniae* BLSE Strains. **Cellular and Molecular Biology**, v. 69, n. 3, p. 198-206, 2023.

BATIHA, G.E.; ALKAZMI, L.M.; WASEF, L.G.; BESHBIHY, A.M.; NADWA, E.H.; RASHWAN, E.K. *Syzygium aromaticum* L. (Myrtaceae): Traditional Uses, Bioactive Chemical Constituents, Pharmacological and Toxicological Activities. **Biomolecules**, v. 10, n. 2, p. 202, 2020.

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

BIERNASIUK A, BAJ T, MALM A. Clove Essential Oil and Its Main Constituent, Eugenol, as Potential Natural Antifungals against *Candida* spp. Alone or in Combination with Other Antimycotics Due to Synergistic Interactions. **Molecules (Basel, Switzerland)** vol. 28, n. 1 p. 215, 2022.

BRESCINI, L.; FIORITI, S.; MORRONI, G.; BARCHIESI, F. Antifungal Combinations in Dermatophytes. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 9, p. 727, 2021.

BUTZGE, J. C.; FERRAO, S. K.; MEZZOMO, L.; CALIL, L. N.; MEZZARI, A.; LIMBERGER, R. P.; APEL, M. Antifungal activity of essential oils from *Cinnamomum cassia*, *Myristica fragrans* and *Syzygium aromaticum* against *Rhodotorula mucilaginosa*. **Drug Analytical Research**, v. 4, p. 3-11, 2020.

CANAL-GARCIA, E.; BOSCH-AMATE, X.; BELINCHÁ, I.; PUIG, L. Psoriasis ungueal, **Actas Dermo-Sifiliogr**, v. 113, n. 5, p. 481-490, 2022.

CARSON, C.F.; HAMMER, K.A.; RILEY, T.V. *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 1, p. 50–62, 2006.

CASHMAN, M.W.; SLOAN, S.B. Nutrition and nail disease. **Clinics in Dermatology**, v. 28, n. 4, p. 420-5, 2010.

CHAKRABORTY, S.; SINGH, S.; SINGH, I. Therapeutic treatment strategies for the management of onychomycosis: a patent perspective. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 6, p. 1-18, 2023.

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

Da Costa, B.; Pippi, B.; Berlitz, S.J.; Carvalho, A.R.; Teixeira, M.L.; Kulkamp-Guerreiro, I.C.; Andrade, S.F.; Fuentefria, A.M. Evaluation of activity and toxicity of combining clioquinol with ciclopirox and terbinafine in alternative models of dermatophytosis. **Mycoses**, v. 64, n. 7, p. 727-733, 2021.

DEL ROSSO, J.Q.; Application of Nail Polish During Topical Management of Onychomycosis: Are Data Available to Guide the Clinician About What to Tell Their Patients, **The Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology**, v. 9, n. 8, p. 29-36, 2016.

DERBY, S.R.; ROHAL, P.; JACKSON, C.; BEUTLER, A.; OLSEN, C. Novel treatment of onychomycosis using over-the-counter mentholated ointment: a clinical case. **Journal of the American Board of Family Medicine**, v. 24, p. 69–74, 2011.

DIAS, M.F.R.G.; BERNARDES-FILHO, F.; QUARESMA-SANTOS, M.V.P.; AMORIM, A.G. F.; SCHECHTMAN, R.C.; AZULAY, D.R. Treatment of superficial mycoses: review - part II. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 88, n. 6, p. 937-944, 2013.

DI VITO, M.; SCAFURO, C.; MARIOTTI, M.; GARZOLI, S.; TORELLI, R.; ZHIRI, A.; Sanguinetti, M.; Bugli, F. Green natural nail polish modified with essential oils to treat onychomycosis. **Mycoses**. V. 65, n. 12, p. 1127-1136, 2022.

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

ET-TAZY, L., LAMIRI, A., SATIA, L., ESSAHLI, M., & KRIMI BENCHEQROUN, S. In Vitro Antioxidant and Antifungal Activities of Four Essential Oils and Their Major Compounds against Post-Harvest Fungi Associated with Chickpea in Storage. **Plants (Basel, Switzerland)**, vol. 12 n. 20, p.3587, 2023.

EL-SOUD, N.H.A.; DEABES, M.; ABOUEL-KASSEM, L.; KHALIL, M. Chemical composition and antifungal activity of *Ocimum basilicum* L. essential oil. **Macedonian Journal of Medical Sciences**, v. 3, p. 374, 2015.

FERRÃO, S.K.; BUTZGE, J.; MEZZOMO, L.; CALIL, L.N.; APEL, M.; MEZZARI, A.; LIMBERGER, R.P. Atividade antifúngica de Óleos essenciais frente a *Candida* spp. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 3, p. 100-113, 2020.

FINCH, J.J.; WARSHAW, E.M. Toenail onychomycosis: current and future treatment options. **Dermatologic Therapy**, v. 20, p. 31–46, 2007.

FLORES, F.C.; DE LIMA, J.A.; RIBEIRO, R.F.; ALVES, S.H.; ROLIM, C.M.; BECK, R.C.; DA SILVA, C.B. Antifungal activity of nanocapsule suspensions containing tea tree oil on the growth of *Trichophyton rubrum*. **Mycopathologia**, v. 175, n. 3-4, p. 281-6, 2013.

GALLUCCI, M.N.; CAREZZANO, M.E.; OLIVA, M.M.; DEMO, M.S.; PIZZOLITTO, R.P.; ZUNINO, M.P.; ZYGADLO, J.A.; DAMBOLENA, J.S. In vitro activity of natural phenolic compounds against fluconazole-resistant *Candida* species: a quantitative structure—activity relationship analysis. **Journal of Applied Microbiology**, v. 116, p. 795–804, 2014.

GONÇALVES, M.J.; CRUZ, M.T.; CAVALEIRO, C.; LOPES, M.C.; SALGUEIRO, L. CHEMICAL, antifungal and cytotoxic evaluation of the essential oil of *Thymus zygis* subsp. *silvestris*. **Industrial Crops and Products**, v. 32, p. 70–5, 2010.

GUPTA, A.; SHARMA, S.; NAIK, S.N. Biopesticidal value of selected essential oils against pathogenic fungus, termites and nematodes. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, p. 703–7, 2011.

GUPTA, A.K.; SIMPSON, F.C. New pharmacotherapy for the treatment of onychomycosis: an update. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 16, n. 2, p. 227–36, 2015.

GU, K.; FENG, S.; ZHANG, X.; PENG, Y.; SUN, P.; LIU, W.; WU, Y.; YU, Y.; LIU, X.; LIU, X.; DENG, G.; ZHENG, J.; LI, B.; ZHAO, L. Deciphering the antifungal mechanism and functional components of *cinnamomum cassia* essential oil against *Candida albicans* through integration of network-based metabolomics and pharmacology, the greedy algorithm, and molecular docking. **Journal of ethnopharmacology** vol. 319, pt 2, 2024.

MINOZZO, M., DE SOUZA, M. A., BERNARDI, J. L., PUTON, B. M. S., VALDUGA, E., STEFFENS, C., PAROUL, N., & CANSIAN, R. L. Antifungal activity and aroma persistence of free and encapsulated *Cinnamomum cassia* essential oil in maize. **International journal of food microbiology**, vol.394, 110178, 2023.

HAMMER, K.A.; CARSON, C.F. *Antibacterial and antifungal activities of essential oils*. In: Thormar, H., editor. Lipids and essential oils as antimicrobial agents. **Chichester, UK: John Wiley & Sons**, Ltd; p. 255–95, 2011.

HARČÁROVÁ, M.; ČONKOVÁ, E.; PROŠKOVCOVÁ, M.; VÁCZI, P.; MARCINČÁKOVÁ, D.; BUJŇÁK, L. Comparison of antifungal activity of selected essential oils against *Fusarium graminearum* *in vitro*. **Annals of agricultural and environmental medicine: AAEM**, v. 28, n. 3, p. 414-418, 2021.

HARO-GONZÁLEZ, J.N.; CASTILLO-HERRERA, G.A.; MARTÍNEZ-VELÁZQUEZ, M.; ESPINOSA-ANDREWS, H. Clove Essential Oil (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): Extraction, Chemical Composition, **Food Applications, and Essential Bioactivity for Human Health**. *Molecules*, v. 26, n. 21, p. 6387, 2021.

HASHEMI, S.M.B.; GHOLAMHOSSEINPOUR A.; BARBA, F.J. *Rosmarinus officinalis* L. Essential Oils Impact on the Microbiological and Oxidative Stability of Sarshir (Kaymak). **Molecules**, v. 28, n. 10, p. 4206, 2023.

HENRI, I.; BASSOLÉ, N.; JULIANI, R. Essential oils in combination and their antimicrobial Properties. **Molecules**, v. 17, p. 3989–4006, 2012.

INOUE, S.; NISHIYAMA, Y.; HASUMI, K.U.Y.; YAMAGUCHI, H.; ABE, S. The vapor activity of oregano, perilla, tea tree, lavender, clove, and geranium oils against a *Trichophyton mentagrophytes* in a closed box. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 12, p. 349–54, 2006.

INOUE, S.; TAKAHASHI, M.; ABE, S. Inhibitory activity of hydrosols, herbal teas and related essential oils against filament formation and the growth of *Candida albicans*. **Japanese Journal of Medical Mycology**, v. 50, p. 243–51, 2009.

ISSA, N.T.; KIRCIK, L. Individual Article: Updated Review of Topical Pharmaceuticals and Complementary and Alternative Medications for the Treatment of Onychomycosis in Both General and Special Populations in the United States. **Journal of Drugs in Dermatology**, v. 22, n. 9, p. SF378719-SF378719s10, 2023.

KHAN MS, AHMAD I. In vitro antifungal, anti-elastase and anti-keratinase activity of essential oils of *Cinnamomum*-, *Syzygium*- and *Cymbopogon*-species against *Aspergillus fumigatus* and *Trichophyton rubrum*. **Phytomedicine**, vol.19, n1 p. 48-55. 2011.

JANSSEN, A.M.; SCHEFFER, J.J.; NTEZURUBANZA, L.; BAERHEIM SVENDSEN, A. Antimicrobial activities of some *Ocimum* species grown in Rwanda. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 26, n. 1, p. 57-63, 1989.

LABIADA, M.H.; BELMAGHRAOUI, W.; GHANIMI, A.; EL-GUEZZANE, C.; CHAHBOUN, N.; HARHAR, H.; EGEEA-GILABERT, C.; ZARROUK, A.; TABYAOU, M. Biological properties and chemical profiling of essential oils of *Thymus (vulgaris, algeriensis and broussonettii)* grown in Morocco. **Chemical Data Collections**, v. 37, p. 100797, 2022.

LEE, D.K.; LIPNER, S.R. Diagnóstico e tratamento de distúrbios comuns das unhas. **Annals of Medicine**, v. 54, n. 1, p. 694-712, 2022.

LEMES, T.H.; NASCENTES, J.A.S.; REGASINI, L.O.; SIQUEIRA, J.P.Z.; MASCHIO-LIMA, T.; PATTINI, V.C.; RIBEIRO, M.D.; DE ALMEIDA, B.G.; DE ALMEIDA, M.T.G. Combinatorial effect of fluconazole, itraconazole, and terbinafine with different culture extracts of *Candida parapsilosis* and *Trichophyton* spp. against *Trichophyton rubrum*. **International Microbiology**, v. 24, 2023.

LESAGE-MEESSEN, L.; BOU, M.; SIGOILLOT, J.C.; FAULDS, C.B.; LOMASCOLO, A. Essential oils and distilled straws of lavender and lavandin: a review of current use and potential application in white biotechnology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, p. 3375–85, 2015.

LEUNG, A.K.C.; LAM, J.M.; LEONG, K.F.; HON, K.L.; BARANKIN, B.; LEUNG, A.A.M.; WONG, A.H.C. Onychomycosis: An Updated Review. **Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery**, v. 14 p. 32-45, 2020.

LI POMI, F., PAPA, V., BORGIA, F., VACCARO, M., ALLEGRA, A., CICERO, N., & GANGEMI, S. *Rosmarinus officinalis* and Skin: Antioxidant Activity and Possible Therapeutical Role in Cutaneous Diseases. **Antioxidants (Basel, Switzerland)**, vol. 12, n.3, p. 680, 2023.

LIU, S.; YANG, L.; ZHENG, S.; HOU, A.; MAN, W.; ZHANG, J.; WANG, S.; WANG, X.; YU, H.; JIANG, H. A review: the botany, ethnopharmacology, phytochemistry, pharmacology of Cinnamomi cortex. **RSC Advances**, v. 11, n. 44, p. 27461-27497, 2021.

LORÁN, S.; CARRAMIÑANA, J.J.; JUAN, T.; ARIÑO, A.; HERRERA, M. Inhibition of *Aspergillus Parasiticus* Growth and Aflatoxins Production by Natural Essential Oils and Phenolic Acids. **Toxins**, v. 14, n. 6, p. 384, 2022.

LOUKILI, E.H.; OUAHABI, S.; ELBOUZIDI, A.; TAIBI, M.; YAHYAOU, M.I.; ASEHRAOU, A.; AZOUGAY, A.; SALEH, A.A.L.; KAMALY, O.; PARVEZ, M.K.; EL GUERROUJ, B.; TOUZANI, R.; RAMDANI, M. Phytochemical Composition and Pharmacological Activities of Three Essential Oils Collected from Eastern Morocco (*Origanum compactum*, *Salvia officinalis*, and *Syzygium aromaticum*): A Comparative Study. **Plants**, v. 12, n. 19, p. 3376, 2023.

MACHADO, G.D.R.M.; PIPPI, B.; BERLITZ, S.; DIEDRICH, D.; DEFFERRARI, D.; LOPES, W.; GNOATTO, S.C.B.; KULKAMP-GUERREIRO, I.C.; VAINSTEIN, M.H.; JEAN, M.; VAN DE WEGHE, P.; DE ANDRADE, S.F.; FUENTEFRIA, A.M. *Ex vivo* potential of a quinoline-derivative nail lacquer as a new alternative for dermatophytic onychomycosis treatment. **Journal of Medical Microbiology**, v. 70, n. 3, p. 001314, 2021.

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

MANESS, L.R.; ZUBOV, T. The Inhibitory Effect of Essential Oils on *Rhizopus stolonifer*, *Trichophyton mentagrophytes*, and *Microsporum gypseum*. **Laboratory Medicine**, v. 50, p. 18-22, 2019.

MARCOS-TEJEDOR, F.; GONZÁLEZ-GARCÍA, P.; MAYORDOMO, R. Solubilization in vitro of tea tree oil and first results of antifungal effect in onychomycosis. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 7, p. S0213-005X(20)30245-7, 2020.

MARCOS-TEJEDOR, F.; GONZÁLEZ-GARCÍA, P.; MAYORDOMO, R. Solubilization in vitro of tea tree oil and first results of antifungal effect in onychomycosis. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 39, p. 395–398, 2021.

MARTINEZ, K.V.; PEREIRA, P.A.; NASCIMENTO, C.G.S.; LEANDRO, R.N.; GIUNDICE, V.M.; GARCIA, E.S.; SILVA, L.P.R.; BORGES, J.S.; CHARLES, F.C.; CALIL, L.N.; MEZZARI, A.; GONÇALVES, S.M.B.; RODRIGUES D.M.G. Identificação do perfil dos agentes etiológicos causadores de micoses superficiais cutâneas no sul do Brasil. **Scientific Eletronic Archives**, v. 13 n.9, 2020.

MARTINS, N.; FERREIRA, I.C.F.R.; BARROS, L.; SILVA, S.; HENRIQUES, M. Candidiasis: predisposing factors, prevention, diagnosis and alternative treatment. **Mycopathologia**, v. 177, p. 223–40, 2014.

MARZOUG, H.N.B.; BOUAJILA, J.; ENNAJAR, M.; LEBRIHI, A.; MATHIEU, F.; COUDERC, F.; ABDERRABA, M.; ROMDHANE, M. *Eucalyptus (gracilis, oleosa, salubris, and salmonophloia)* essential oils: their chemical composition and antioxidant and antimicrobial activities. **Journal of Medicinal Food**, v. 13, n. 4, p. 1005–12, 2010.

MEKONNEN, A.; YITAYEW, B.; TESEMA, A.; TADDESE, S. In Vitro Antimicrobial Activity of Essential Oil of *Thymus schimperi*, *Matricaria chamomilla*, *Eucalyptus globulus* and *Rosmarinus officinalis*. **International Journal of Microbiology**, v. 2016, p. 1-8, 2016.

MIRON, D.; BATTISTI, F.; SILVA, F.K.; LANA, A.D.; PIPPI, B.; CASANOVA, B.; GNOATTO S.; FUENTEFRIA, A.; MAYORGA, P.; SCHAPOVAL, E.E.S. Antifungal activity and mechanism of action of monoterpenes against dermatophytes and yeasts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, p. 660–7, 2014.

MONPEURT, C.; CINOTTI, E.; RAZAFINDRAKOTO, J.; RUBEGNI, P.; FIMIANI, M.; PERROT, J.L.; HEBERT, M. Prediction of a nail polish colour applied on a nail. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 40, n. 1, p. 75-80, 2018.

MOURA, E.D.S.; FARONI, L.R.D.; HELENO, F.F.; RODRIGUES, A.A.Z. Toxicological Stability of *Ocimum basilicum* Essential Oil and Its Major Components in the Control of *Sitophilus zeamais*. **Molecules**, v. 26, n. 21, p. 6483, 2021.

MUGNAINI, L.; NARDONI, S.; PISTELLI, L.; LEONARDI, M.; GIULIOTTI, L.; BENVENUTI, M.N.; PISSERI, F.; MANCIANTI, F. A herbal antifungal formulation of *Thymus serpyllum*, *Origanum vulgare* and *Rosmarinus officinalis* for treating ovine dermatophytosis due to *Trichophyton mentagrophytes*. **Mycoses**. V. 56, n. 3, p. 333-7, 2013.

NARDONI, S.; GIOVANELLI, S.; PISTELLI, L.; MUGNAINI, L.; PROFILI, G.; PISSERI, F.; Mancianti, F. In Vitro Activity of Twenty Commercially Available, Plant-Derived Essential Oils against Selected Dermatophyte Species. **Natural Product Communications**, v. 10, n. 8, p. 1473-8, 2015.

NASCIMENTO, G.P.V.; OLIVEIRA, J.V. Ação da atividade antifúngica in vitro dos óleos essenciais de *Copaifera officinalis*, *Eugenia caryophyllata*, *Melaleuca alternifolia*, *Rosmarinus officinalis* e *Thymus vulgaris* ante os agentes causais de onicomicose. **Revista Ibero-Americana De Podologia**, v. 1, p. 56-64, 2019.

OLAIZOLA, C.; PÉREZ, C.; MATA-ESSAYAG, S.; HARTUNG, C.; COLLELA, M.T.; MAGALDI, S.; ROSELL, A. Experience with thymol in chloroform solution for the treatment of paronychia. **Mycopathologia**, v. 159, p. 209–11, 2005.

OLIVA, B.; PICCIRILLI, E.; CEDIA, T.; PONTIERI, E.; AURELI, P.; FERRINI, A.M. Antimycotic activity of *Melaleuca alternifolia* essential oil and its major components. **Letters in Applied Microbiology**, v. 37, p. 185-187, 2003.

OOI, L. S., LI, Y., KAM, S. L., WANG, H., WONG, E. Y., & OOI, V. E. Antimicrobial activities of *cinnamon* oil and cinnamaldehyde from the Chinese medicinal herb *Cinnamomum cassia* Blume. **The American journal of Chinese medicine**, vol 34, n. 3, p. 511–522, 2006.

OUALDI, I.; DIASS, K.; AZIZI, S.E.; DALLI, M.; TOUZANI, R.; GSEYRA, N.; YOUSFI, E.B. *Rosmarinus officinalis* essential oils from Morocco: new advances on extraction, GC/MS analysis, and antioxidant activity. **Natural Product Research**, v. 37, n. 12, p. 2003-2008, 2023.

ORESANYA, I.O.; ORHAN, I.E. Deciphering Neuroprotective Effect of *Rosmarinus officinalis* L. (syn. *Salvia rosmarinus* Spenn.) through Preclinical and Clinical Studies. **Curr Drug Targets**. 2024.

PALMEIRA-DE-OLIVEIRA, A.; SALGUEIRO, L.; PALMEIRA-DE-OLIVEIRA, R.; MARTINEZ-DE-OLIVEIRA, J.; PINA-VAZ, C.; QUEIROZ, J.A.; RODRIGUES, A.G. Anti-*Candida* activity of essential oils. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 9, p. 1292–305, 2009.

PANDEY, V.K.; SRIVASTAVA, S.; ASHISH DASH K.K.; SINGH, R.; DAR, A.H.; SINGH, T.; FAROOQUI, A.; SHAIKH, A.M.; KOVACS, B. Bioactive properties of clove (*Syzygium aromaticum*) essential oil nanoemulsion: A comprehensive review. **Heliyon**, v. 10, n. 1, p. e22437, 2023.

PEIXOTO, I.S.Y.; MAQUINE, G.; FRANCESCONI, V.A.; FRANCESCONI, F. Dermatofitose por *Tricophyton rubrum* como infecção oportunista em pacientes com doença de Cushing. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, p. 888-890, 2010.

PEREIRA, P.A.; VIEIRA, E.S.; CHARLES, F.C.; GIUDICE, V.M.; NASCIMENTO, C.G.S.; BORGES, J.S.; SILVA, L.P.R.; SILVA, G.S.; FERRÃO, S.K.; MEZZOMO, L.; CALIL, L.N.; MEZZARI, A. Superficial and Cutaneous Mycoses, Epidemiology, Virulence, Susceptibility Profile to Antifungals and Their Infections: A literature review of the Last Twenty Years. **International Journal of Pharmacy and Biological Sciences**, v. 11, p. 176-187, 2021.

PINTO, E.; PINA-VAZ, C.; SALGUEIRO, L.; GONÇALVES, M.J.; COSTA-DE-OLIVEIRA, S.; CAVALEIRO, C.; PALMEIRA, A.; RODRIGUES, A.; MARTINEZ-DE-OLIVEIRA, J. Antifungal activity of the essential oil of *Thymus pulegioides* on *Candida*, *Aspergillus* and *dermatophyte* species. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, p. 1367-73, 2006.

PIRAS, A.; GONÇALVES, M. J.; ALVES, J.; FALCONIERI, D.; PORCEDDA, S.; MAXIAE, A.; SALGUEIRO, L. *Ocimum tenuiflorum* L. and *Ocimum basilicum* L., two species of Lamiaceae Family with bioactive essential oils. **Industrial Crops & Products**, v. 113, p. 89-97, 2018.

PIRES, C.A.; DA CRUZ, N.F.S.; LOBATO, A.M.; DE SOUSA, P.O.; CARNEIRO, F.R.O.; MENDES, A.M.D. Clinical, epidemiological, and therapeutic profile of dermatophytosis. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 89, n. 2, p. 259-264, 2014.

PRASHAR, A.; LOCKE, I.C.; EVANS, C.S. Cytotoxicity of clove (*Syzygium aromaticum*) oil and its major components to human skin cells. **Cell Proliferation**, v. 39, n. 4, p. 241-8, 2006.

QASEM, A., ASSAGGAF, H., MRABTI, H.N., MINSHAWI, F., RAJAB, B.S., ATTAR, A.A., ALYAMANI, R.A., HAMED, M., MRABTI, N.N., BAABOUA, A. E., OMARI, N.E., ALSHAHRANI, M.M., AWADH, A.A.A., SHEIKH, R.A., MING, L.C., GOH, K.W., BOUYAHYA, A. Determination of Chemical Composition and Investigation of Biological Activities of *Ocimum basilicum* L. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 28, n. 2 p. 614, 2023.

QUATRIN, P.M.; LANA, D.F.D.; KAMINSKI, T.F.A.; FUENTEFRIA, A.M. Fungal infection models: Current progress of ex vivo methods. **Mycoses**. v. 62, n. 10, p. 860-873, 2019.

RAJALI, A., ZAIN, N. M., AMRAN, N. A., & AZMI, N. H. E. M. Antifungal Efficacy of *Ocimum Basilicum* Essential Oil in Tissue Conditioner Against *Candida Albicans*: An *In vitro* Study. **Contemporary clinical dentistry**, vol. 14, n. 2, p. 115–122, 2023.

RAMSEWAK, R.S.; NAIR, M.G.; STOMMEL, M.; SELANDERS, L. In vitro antagonistic activity of monoterpenes and their mixtures against 'toe nail fungus' pathogens. **Phytotherapy Research**, v. 17, p. 376–9, 2003.

RANA, P.; SHEU, S.C. Discrimination of four *Cinnamomum* species by proximate, antioxidant, and chemical profiling: towards quality assessment and authenticity. **Journal of Food Science and Technology**, v.60, n. 10, p. 2639-2648, 2023.

ROANA, J.; MANDRAS, N.; SCALAS, D.; CAMPAGNA, P.; TULLIO, V. Antifungal Activity of *Melaleuca alternifolia* Essential Oil (TTO) and Its Synergy with Itraconazole or Ketoconazole against *Trichophyton rubrum*. **Molecules**. v. 26, p. 461 2021.

RODRÍGUEZ, J.V.; PÉREZ-PICO, A.M.; MINGORANCE-ÁLVAREZ, E.; ACEVEDO R.M. Meta-analysis of the antifungal activities of three essential oils as alternative therapies in dermatophytosis infections. **Journal of Applied Microbiology**, v. 133, n. 2, p. 241-253, 2022.

ROH, J.; SHIN, S. Antifungal and Antioxidant Activities of the Essential Oil from *Angelica koreana* Nakai. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, p. 398503, 2014.

ROSATO, R., NAPOLI, E., GRANATA, G., DI VITO, M., GARZOLI, S., GERACI, C., RIZZO, S., TORELLI, R., SANGUINETTI, M., & BUGLI, F. Study of the Chemical Profile and Anti-Fungal Activity against *Candida auris* of *Cinnamomum cassia* Essential Oil and of Its Nano-Formulations Based on Polycaprolactone. **Plants (Basel, Switzerland)**, v.12, n. 2, p .358, 2023.

SAGAVE, L.; GRESSLER, L.T.; FLORES, F.C.; SILVA, C. B.; VARGAS, A.P.C.; LOVATO, M.; SANGIONI, L.A.; PÖTTER, L.; BOTTON, S.A. Atividade de nanoformulações de *Melaleuca alternifolia* e terpinen-4-ol em isolados de *Rhodococcus equi*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, p. 221-226, 2015.

SAHIN, F.; GÜLLÜCE, M.; DAFERERA, D.; SÖKMEN, A.; POLISSIOU, M.; AGAR, G.; HÖZER, H. Biological activities of the essential oils and the methanol extract of

Origanum vulgare ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. **Food Control**, v. 15, p. 549–57, 2004.

SARAIVA FILHO, D.E.; NEVES, A.M.; DE MORAES, S.M.; DE SOUZA, E.B. Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of *Zanthoxylum petiolare* A. St.-Hil. & Tul (RUTACEAE). **Brazilian journal of Development**, v. 7, n. 4 p.379, 2021.

SENTHOORRAJA, R.; SUBAHARAN, K.; MANJUNATH, S.; PRAGADHEESH, V.S.; BAKTHAVATSALAM, N.; MOHAN, M. G.; SENTHIL-NATHAN, S.; BASAVARAJAPPA, S. Electrophysiological, behavioural and biochemical effect of *Ocimum basilicum* oil and its constituents methyl chavicol and linalool on *Musca domestica* L. **Environmental science and pollution research international**, v. 28, p.36, 2021.

SHIN, S.; LIM, S. Antifungal effects of herbal essential oils alone and in combination with ketoconazole Against *Trichophyton* spp. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, p. 1289–96, 2004.

SILVA, M.R.; OLIVEIRA, J.G. JR.; FERNANDES, O.F.; PASSOS, X.S.; COSTA, C.R.; SOUZA, L.K.; LEMOS, J.A.; PAULA, J.R. Antifungal activity of *Ocimum gratissimum* towards dermatophytes. **Mycoses**, v. 48, n. 3, p. 172-5, 2005 .

SIQUEIRA, E.R.; FERREIRA, J.C.; MAFFEI, C.M.L.; CANDIDO, R.C. Ocorrência de dermatófitos em amostras de unhas, pés e mãos coletadas de estudantes universitários. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, p. 269-271, 2006.

SOUZA, P. R. M.; VETTORATO, G.; PINTO, G.M.; DUQUIA, R.P.; AMARO, T.G.; ALMEIRA JUNIOR, H.L.; BREUNIG, J.A. Concordance between direct microscopy and fungal culture for the diagnostic of feet's onychomycosis. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 87, p. 157-159, 2012.

STARACE, M.; MILAN, E.; SUMMA, G.; ALESSANDRINI, A.M.; SECHI, A.; IORIZZO, M.; DI CHIACCHIO, N.G.; DI CHIACCHIO, N.; PIRACCINI, B.M. Onychoscopic characteristics of *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton interdigitalis* fungal infections: A multicentric study. **Mycoses**, v. 67, n.1, p. e13673, 2024.

STEINER, D.; VAIDERGORN, R. Superficial mycosis. **Atualidades Médicas**, v. 2, p. 2-8, 2018.

TAGHIPOUR, Z.; BAHMANZADEH, M.; RAHIMI, R. The Effects of Clove and Its Constituents on Reproductive System: a Comprehensive Review. **Reproductive Sciences**, v. 30, n. 9, p. 2591-2614, 2023.

TOMASZ M. KARPIŃSKI, MARCIN OŻAROWSKI, AGNIESZKA SEREMAK-MROZIKIEWICZ, HUBERT WOLSKI. Anti-Candida and Antibiofilm Activity of Selected Lamiaceae Essential Oils. **Front. Biosci. (Landmark Ed)** v. 28, n. 2, p.28, 2023.

TULLIO, V.; NOSTRO, A.; MANDRAS, N.; DUGO, P.; BANCHE, G.; CANNATELLI, M.A.; CUFFINI, A.M.; ALONZO, V.; CARLONE, N.A. Antifungal activity of essential oils against filamentous fungi determined by broth microdilution and vapour contact methods. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, p. 1544–50, 2007.

VALDEZ, A.F.; ZAMITH-MIRANDA D.; NIMRICHTER, L.; NOSANCHUK, J.D. Micro- and nanoparticles as platforms for the treatment of fungal infections: present and future perspectives. **Future Microbiology**, v., 18, p. 1007-1011, 2023.

VALE-SILVA, L.; SILVA, M.J.; OLIVEIRA, D.; GONÇALVES, M.J.; CAVALEIRO, C.; SALGUEIRO, L.; PINTO, E. Correlation of the chemical composition of essential oils from *Origanum vulgare* subsp. *virens* with their in vitro activity against pathogenic yeasts and filamentous fungi. **Journal of Medical Microbiology**, v. 61, p. 252–60, 2012.

VELOSO, R.A.; CASTRO, H.G.; BARBOSA, L.C.A.; CARDOSO, D.P.; CHAGAS JÚNIOR, A.F.; SCHEIDT, G.N. Teor e composição do óleo essencial de quatro acessos e duas cultivares de manjeriço (*Ocimum basilicum* L.). **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 16, p. 364-371, 2014.

VEPŠTAITĖ-MONSTAVIČĖ I, RAVOITYTĖ B, BŪDIENĖ J, VALYS A, LUKŠA J, SERVIENĖ E. Essential Oils of *Mentha arvensis* and *Cinnamomum cassia* Exhibit Distinct Antibacterial Activity at Different Temperatures In Vitro and on Chicken Skin. **Foods (Basel, Switzerland)**. v. 12, n. 21, p. 3938, 2023.

VILLAR RODRÍGUEZ, J.; PÉREZ-PICO, A.M.; MINGORANCE-ÁLVAREZ, E.; MAYORDOMO ACEVEDO, R. Meta-analysis of the antifungal activities of three essential oils as alternative therapies in dermatophytosis infections. **Journal of Applied Microbiology**, v. 133, n. 2, p. 241-253, 2022.

WANI, S.; RAJPUT, A.; PINGALE, P. Herbal Nanoformulations: A Magical Remedy for Management of Fungal Diseases, **Journal of Herbal Medicine**, v. 42, p. 100810, 2023.

WATJER, R.M.; BONTEN, T.N.; ARKESTEIJN, M.A.; QUINT, K.D.; VAN DER BEEK, M.T.; VAN DER RAAIJ-HELMER, L.M.; NUMANS, M.E.; EEKHOF, J.A. The accuracy of clinical diagnosis of onychomycosis in Dutch general practice: a diagnostic accuracy study. **BJGP Open**, v., 7, n. 3 p. BJGPO.2022.0186, 2023.

YAHYAZADEH, M.; OMIDBAIGI, R.; ZARE, R.; TAHERI, H. Effect of some essential oils on mycelial growth of *Penicillium digitatum*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 1445–50, 2008.

YIBELTAL, G., YUSUF, Z., & DESTA, M. Physicochemical Properties, Antioxidant and Antimicrobial Activities of Ethiopian Sweet Basil (*Ocimum basilicum* L.) Leaf and Flower Oil Extracts. **Recent advances in anti-infective drug discovery**, vol. 17, n. 2, p. 131–138, 2022.

ZHANG, C.; FAN, L.; FAN, S.; WANG, J.; LUO, T.; TANG, Y.; CHEN, Z.; YU, L. *Cinnamomum cassia* Presl: A Review of Its Traditional Uses, Phytochemistry, Pharmacology and Toxicology. **Molecules**, v. 24, n. 19, p. 3473, 2019.

ZHAO, S., WU, Y., QIAN, Y., QIAN, Y., XUE, S., CHEN, J., ZENG, Q., & GU, M. Chemical profiling and identification of anti-osteoporosis chemical-markers of *Cinnamomum cassia* (L.) presl extracts using GC-MS and spectrum-activity analyses. **Natural product research**. Vol. 37, n. 11, p. 1902–1906, 2023.

ZUZARTE, M.; GONÇALVES, M.J.; CAVALEIRO, C.; CANHOTO, J.; VALE-SILVA, L.; SILVA, M.J.; PINTO, E.; SALGUEIRO, L. Chemical composition and antifungal activity of the essential oils of *Lavandula viridis* L'Hér. **Journal of Medical Microbiology**, v. 60, p. 612–8, 2011.

ZHAKIPBEKOV, K.; TURGUMBAYEVA, A.; AKHELOVA, S.; BEKMURATOVA, K.; BLINOVA, O.; UTEGENOVA, G.; SHERTAEVA, K.; SADYKOV, N.; TASTAMBEK, K.; SAGINBAZAROVA, A.; URAZGALIYEV, K.; TULEGENOVA, G.; ZHALIMOVA, Z.; KARASOVA, Z. Antimicrobial and Other Pharmacological Properties of *Ocimum basilicum*, Lamiaceae. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 29, p.388-2, 2024.

ANEXOS

MANUSCRITO

A seguir encontra-se disposto o manuscrito intitulado “**Composição química e atividade antifúngica de óleos essenciais de manjeriço, alecrim, cravo e canela frente a *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes***”, a ser submetido para publicação. Este artigo apresenta a extração por hidrodestilação dos óleos de cravo e canela e a análise da composição química dos óleos voláteis de cravo, canela, alecrim e manjeriço. Também apresenta a avaliação das atividades antifúngicas, através dos métodos de microdiluição em caldo. Os resultados encontrados neste trabalho serão apresentados dentro das normas da revista Drugal and Analytical Research, uma publicação científica da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) para ser submetido à revista. DAR é Qualis C (CAPES - Brasil 2017-2020).

Chemical composition and antimicrobial potential of basil, rosemary, clove and cinnamon essential oils against *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes*.

Patrícia Abreu Pereira ^{*,a}, Jade André de Souza ^a, Luiza Bernardes Chagas ^a, Juliana Butzge ^a, Alexandre M. Fuentefria ^a, Adelina Mezzari ^b, Miriam Anders Apel ^a 

^aPrograma de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas-PPGCF, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

^bFaculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

* Corresponding author: pa.tv.ab@hotmail.com

Onychomycosis is a disease caused by fungi that affects the nails and its incidence is becoming increasingly frequent. The present study aimed the evaluation of the antifungal activity of essential oils from rosemary (*Rosmarinus officinalis*), basil (*Ocimum basilicum*), clove (*Syzygium aromaticum*) and chinese cinnamon (*Cinnamomum cassia*) against the most prevalent dermatophytes found in onychomycosis: *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes*. The chemical composition of the oils was carried by GC-MS. The volatile oil of clove presented eugenol as the main component of the oil (80.2%), while the volatile oil of chinese cinnamon was characterized by *E*-cinnamaldehyde (99.4%). The volatile oil of rosemary presented 1,8-cineole and camphor as the main compounds, representing 47% and 15% of the total content of the volatile oil, respectively. In the analysis of basil essential oil, methyl-chavicol was the main component, accounting for 68.81% of the substances identified. The results obtained in broth microdilution tests indicate that basil oil (*Ocimum basilicum*) presented antifungal potential against the tested strains of *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes* at concentrations that ranged from 8 mg/mL to 2 mg/mL and, therefore, was selected to continue the elucidation of its antifungal potential and its possible applications in onychomycosis.

Keywords: Onychomycosis; essential oils; antifungal; *Trichophyton*

Article received at mm/dd/yyyy and accepted at mm/dd/yyyy.
<https://doi.org/>

Introduction

Dermatomycoses are diseases caused by keratinophilic fungi, which feed on the keratin present in keratinized tissues such as skin, nails and animal hair and of humans, and can be caused by dermatophyte and non-dermatophyte fungi (1). These diseases are among the most prevalent in the world, affecting individuals of all ages and genders, being more incidents in adults and immunocompromised people. The species most found in superficial mycoses are *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes*. The sites of infection where dermatophytosis are most prevalent are the nails, causing onychomycosis, which is a kind of dermatophytosis characterized by a fungal infection identified by the appearance of stains and deformations. This disease, in addition to causing physical discomfort, also affects the patient's self-esteem due to the appearance of the injury (2).

Currently, onychomycosis is a disease that has become increasingly common, especially in patients with some associated risk factors such as *diabetes mellitus*, psoriasis, vascular diseases and immunocompromised patients. Some studies have shown that patients with chronic renal failure who undergo hemodialysis are more vulnerable to

having fungal infections, especially onychomycosis (3). Diagnosis is most often made by direct culture examination. The medications used to treat this pathology have a certain degree of toxicity (2). When the diagnosis is confirmed, the treatment of choice is oral terbinafine or itraconazole, and topical therapy may also be used. Oral therapy is effective, but its adverse effects, toxicity and treatment time make treatment adherence difficult. Safe and effective alternative therapies are extremely necessary for successful treatment (4).

Fungi can have their growth inhibited by some essential oils (5). In some cases, the use of essential oils in association with antifungal therapy was able to reduce the effective dose of some oral antifungals. The use of alternative topical therapies for the treatment of this disease is extremely important for the effectiveness of the therapy, in addition to providing less toxicity, reducing treatment time and reducing adverse effects. The discovery of new alternative therapies can help patients to better adhere to treatment, increasing the chances of a cure (6).

The application of products formulated with essential oils is an alternative that can be effective, economical and with a lower degree of toxicity. The use of oils extracted from plants traditionally used by the population can increase

acceptance of the treatment and consequently, adherence and therapeutic success. Thus, the objective of this study was to evaluate the antifungal activity of essential oils of rosemary (*Rosemary officinalis*), basil (*Ocimum basilicum*), clove (*Syzygium aromatic*) and chinese cinnamon (*Cinnamon cassia*) against the dermatophytes most prevalently found in onychomycosis: *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes*.

Experimental section

Materials

Plant essential oils

The essential oils of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) and basil (*Ocimum basilicum*) were purchased from local stores in the Porto Alegre city. The essential oils of cinnamon (*Cinnamomum cassia*) and clove (*Syzygium aromaticum*) were obtained by hydrodistillation from the bark and flower buds, respectively, purchased commercially.

Obtention of cinnamon (*Cinnamon Cassia*) and clove (*Syzygium aromatic*) essential oils

To obtain the essential oil from cinnamon barks and clove flower buds, 101.2 g and 111.6 g, respectively, were grinded and subjected, separately, to hydrodistillation by using in a Clevenger-type apparatus, for 4 hours (Farmacopeia Brasileira, 2019). Afterwards, the oils obtained were stored under refrigeration at -4 °C and protected from light until analysis. The yield was determined by reading the volume of oil collected based on the weight of each sample (w/v).

Gas chromatography–mass spectrometric analysis of essential oils

Chemical analysis was performed on a gas chromatograph coupled to a mass detector (GC-MS), model Shimadzu QP5000, equipped with a Durabond-DB-5 fused silica capillary column (John Wiley & Sons Scientific, US, with 30 m x 0.25 mm and filled with a 0.25 µm thick film of polydimethyldiphenylsiloxane containing 5% phenyl groups) to separate the constituents. Column temperature was programmed with a heating ramp from 60 °C (held for 3 min) to 300 °C with a variation of 3 °C/min. Helium was used as gas carrier, at 80 kPa and flow of 1.0 mL/min. Injector and detector temperatures were adjusted to 220 °C and 250 °C, respectively. Split ratio of 1:50 and injection volume of 1 µL was used. Mass selective detector was operated in the electron impact mode, EI, at the ionization energy of 70 eV, with scan range 40–550 amu. For chromatographic analysis, the oils were diluted to 2% in ethyl ether (v/v) (Synth®).

Components were identified by comparing their relative retention index, calculated by relative linear interpolation to the retention time of a series of *n*-alkanes (C₈–C₂₂) and their mass spectrum with data obtained in the literature (ADAMS, 2017) (7), in the database of the laboratory's research group or by comparison with mass spectra recorded in databases such as NIST 62 and NIST 12 (National Institute of Standards and Technology). The relative amounts of each compound were calculated from the peak areas by normalization.

Isolated from *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes*

Fungal samples from the species *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes* were obtained from the mycotheque of Microbiology Laboratory Applied from the Faculty of Pharmacy of the Federal University of Rio Grande do Sul.

The strains were kept inoculated in tubes containing Sabouraud dextrose agar with chloramphenicol and incubated at 32 °C for 48 hours. These strains were replicated weekly to keep the samples in an ideal state for the study.

To prepare the 0.9% saline solution, 9 g of sodium chloride was used, which will be diluted in 1000 mL of distilled water. The solution was autoclaved to avoid contamination of the experiment.

The RPMI solution was prepared according to the manufacturer's instructions, autoclaved and filtered. The culture medium was also prepared according to the manufacturer's instructions, in tubes and plates.

To prepare the inoculum for the susceptibility test, 2 mL of sterile 0.85% saline solution was added to the tube containing the isolate and the surface of the colony was scraped with the microbiological loop. This fungal suspension was poured into the sterile tube and decanted. The transmittance reading was taken, which should be 80 to 82%. After adjusting the fungal suspension in the spectrophotometer, a 1:50 dilution was made in RPMI 1640 broth.

Assessment of antifungal activity

Susceptibility testing was performed in sterile 96-well microplates, in duplicate (two lines for each fungal isolate). Thus, up to four isolates can be used per microplate. The RPMI 1640 medium was pipetted into the microplates in an organized manner to maintain the positive control and negative control. The tested substances were pipetted and microdilution in broth followed by pipetting of the fungal inoculum into all wells, except the negative control.

After completing the preparation of the material on the plates, they were placed in the oven at a temperature of 32 °C. The plates were read within 120 hours. The MIC (minimum inhibitory concentration) is defined as the lowest concentration capable of producing inhibition of the growth of *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes* compared to the positive control.

To determine the minimum fungicidal concentration (CFM), an aliquot of 10 µL of each microplate well on plates containing Sabourand dextrose agar. The plate was incubated in an oven at 37 °C for 120 hours to observe the growth of dermatophyte fungus.

Results and Discussion

Yield and chemical characterization of essential oils by GC-MS

The volatile oil from clove and cinnamon was obtained by using the hydrodistillation technique in a Clevenger-type apparatus and the oil yield obtained was 11.2% and 0.4%, respectively. Rosemary and basil essential oils were

obtained directly from commerce and therefore the yield of these two oils is not available.

The chemical characterization of volatile oils from *Syzygium aromaticum* (clove), *Cinnamomum cassia* (cinnamon), *Rosemary officinalis* (rosemary) and *Ocimum basilicum* (basil) was carried out GC-MS and, all together, 24 compounds could be identified (Table 1).

Table 1: Percentual composition of the essential oils from *Syzygium aromaticum* (clove), *Cinnamomum cassia* (cinnamon), *Rosemary officinalis* (rosemary) and *Ocimum basilicum* (basil) obtained by GC-MS.

| Constituents | IR* | Clove | Cinnamon | Rosemary | Basil |
|-----------------------------------|------|------------|------------|-------------|-------------|
| Monoterpene hydrocarbons | | 0 | 0 | 30.3 | 0 |
| Tricyclene | 914 | | | 0.8 | |
| α -pinene | 926 | | | 12.8 | |
| Camphene | 939 | | | 5.9 | |
| β -pinene | 967 | | | 6.4 | |
| Myrcene | 984 | | | 2.0 | |
| <i>p</i> -cymene | 1018 | | | 2.0 | |
| γ -terpinene | 1050 | | | 0.4 | |
| Oxygenated monoterpenes | | 0 | 0 | 67.3 | 27.9 |
| 1,8-cineole (=eucalyptol) | 1026 | | | 47.3 | |
| Linalool | 1101 | | | | 27.9 |
| Camphor | 1136 | | | 15.1 | |
| Isoborneol | 1149 | | | 0.5 | |
| Borneol | 1159 | | | 1.9 | |
| α -terpineol | 1185 | | | 1.5 | |
| Isobornyl acetate | 1277 | | | 1.0 | |
| Sesquiterpene hydrocarbons | | 1.1 | 0.2 | 2.4 | 3.2 |
| β -caryophyllene | 1406 | 1.1 | | 2.4 | 0.4 |

| | | | | | |
|---------------------------------|------|-------------|-------------|----------|-------------|
| α -transbergamotene | 1424 | | | | 0.7 |
| α -muroleone | 1489 | | 0.2 | | |
| α -humulene | 1534 | | | | 2.1 |
| Oxygenated sesquiterpene | | 0 | 0.3 | 0 | 0 |
| Cubene | 1639 | | 0.3 | | |
| Phenylpropanoids | | 98.9 | 99.7 | 0 | 68.8 |
| Methylchavicol (= estragole) | 1200 | | | | 68.8 |
| <i>E</i> -cinnamaldehyde | 1291 | | 99.4 | | |
| Eugenol | 1382 | 80.2 | | | |
| <i>E</i> -allylcinnamate | 1536 | | 0.3 | | |
| <i>Z</i> -isoeugenol acetate | 1539 | 18.7 | | | |
| Total | | 100 | 100 | 100 | 99.9 |

* RI: retention index based in a DB-5 capillary column.

The qualitative and quantitative composition of the analyzed essential oils revealed that the chemical characterization of all the samples was typically for each vegetal species. Clove, cinnamon and basil essential oils were characterized by the predominance of phenylpropanoids, while for rosemary monoterpenes were the predominant compounds in the essential oil (Table 1). The chromatographic analysis of clove revealed that eugenol and *Z*-isoeugenol acetate were the main components of the oil, being responsible for 80.2% and 18.7% of the total content. For cinnamon, the chromatographic analysis revealed that the *E*-cinnamaldehyde was the main component, accounting for 99.4% of the total oil content. Rosemary essential oil was characterized by 1,8-cineole, camphor and α -pinene as the major compounds, representing 47.3%, 15.1% and 12.8% of the total oil content, respectively. In the basil essential oil, the chromatographic analysis demonstrated that methyl-chavicol and linalool were the main components of the essential oil, being responsible for 68.8% and 27.9% of the identified substances, respectively.

Anti-Trichophyton activity

Broth microdilution

Initially, an investigation was carried out with volatile oils in order to evaluate which of them would present a good response against the strains of the two *Trichophyton* species used for this assay. Thus, in the first broth microdilution assay in 96-well ELISA plates, three strains of *Trichophyton rubrum* (TRU 90, TRU 94 and TRU 47) and also three strains of *Trichophyton mentagrophytes* (TME 16, TME 32 and TME ATCC 9533) were used. The MIC of clove, cinnamon, basil and rosemary essential oils are summarized in Table 2. The greatest antifungal activity against all tested strains was exhibited by *O. basilicum* essential oil, which had MICs of 8 mg/mL to 2 mg/mL.

Table 2: Minimum inhibitory concentration (MIC) of volatile oils against strains of *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes*.

| Species | <i>Cinnamomum cassia</i> mg/mL | <i>Syzygium aromaticum</i> mg/mL | <i>Rosmarinus officinalis</i> mg/mL | <i>Ocimum basilicum</i> mg/mL |
|---------------|-----------------------------------|-------------------------------------|--|----------------------------------|
| TRU 90 | >8 | >8 | >8 | 2 |
| TRU 94 | >8 | >8 | >8 | 2 |
| TRU 47 | >8 | >8 | >8 | 2 |
| TME 16 | >8 | >8 | >8 | 8 |
| TME 32 | >8 | >8 | >8 | 8 |
| TME ATCC 9533 | >8 | >8 | >8 | 2 |

DISCUSSION

Essential oils comprise a complex mixture of compounds, including terpenes and aromatic compounds. Much of the antimicrobial activity is attributed to the presence of oxygenated terpenes (such as alcohols and phenolic compounds), however there are reports of hydrocarbons exhibiting antimicrobial effects. Oils characterized by the presence of aldehydes or phenols, such as thymol, carvacrol and cinnamaldehyde, generally show greater effectiveness, followed by those that contain terpene alcohols (8).

Rosmarinus officinalis (Rosemary)

The compounds detected in *Rosmarinus officinalis* essential oil contain monoterpenes such as camphor, 1,8-cineole, α -pinene, verbenone, borneol and piperitone, which are responsible for antioxidant and antimicrobial activity (9). In previous studies, Hashemi and collaborators (2023) (10) found in the essential oil of *R. officinalis* the constituents α -pinene (24.6%), 1,8-cineole (14.1%) and camphor (13.5%), the same main compounds as those found by Bajalan and collaborators (2018) (11), that identified in the rosemary essential oil α -pinene (14.2–21.4%), 1,8-cineole (3.3–28.3%) and camphor (1.6–25.3%). Álvarez-García and colleagues (2023) also found camphor (20.5%), 1,8-cineole (20.2%) and α -pinene (18.6%) as predominant compounds (12). The predominant constituents of rosemary oil were also found in other investigation (13) as being 1,8-cineole (42.3–53.6%), α -pinene (11.6–12.3%) and camphor (9.6–10.5%). Comparing the chemical profile of all studies with the results of the present study, it can be observed that the predominant constituents are quite the same. According to the literature, the variation in the chemical composition of essential oils in different research can be attributed to differences in crops, geographic origin, harvest time, environmental conditions, sampling and extraction methods (14). Özcan and collaborators (2008) mention in its study that the rosemary oils are divided into two chemotypes by the ratio of major components; one with more than 40% of 1,8-cineole and the other with almost the same percentage of 1,8-cineole, α -pinene and camphor (15). Taking this in account, the essential oil used in this study belongs to the first chemotype, with more than 40% of 1,8-cineole.

Syzygium aromaticum (clove)

The clove bud is mainly composed of essential oil, which represents 15 to 21% of the plant. Eugenol is the main component of this essential oil, representing 70 to 90% of the oil content, followed by eugenol acetate, which can reach 17%, and beta-caryophyllene, between 5 and 12% (16).

In a study conducted by Bariz, the main constituents of *S. aromaticum* were eugenol with a content of 80.46% and eugenol acetate representing 16.23% of the composition (17). In Loukili's study regarding the essential oil of *S. aromaticum*, the main components identified were also eugenol, with a concentration of 72.66%, and beta-caryophyllene, present in 17.41% (18).

Cinnamomum cassia (Cinnamon)

The compounds found corroborate data found in the literature. In a previous study, Liu and collaborators (2021) elucidated, through a literature review, more than 200 components found in several studies where cinnamaldehyde was found in abundance, with a relative percentage of 76% to 91% (19). Vepškaitė and collaborators (2023) obtained cinnamaldehyde (83.32%) as the most abundant compound in *Cinnamomum cassia* oil (20). *E*-cinnamaldehyde was also the main component found (85.5%) by Rosato and collaborators (2023), in the

analysis of the components of cinnamon oil (21). Zhao and collaborators (2023) also found *E*-cinnamaldehyde as the main component of the oil (22).

Gu and collaborators (2024) (23) analyzed the composition of 20 essential oils extracted from *Cinnamomum cassia* cultivated in different geographic regions and the main compounds identified were terpenoids (34.04%), aromatic compounds (4.52%), aliphatic compounds (0.9%) among others. The hierarchical grouping analysis of the compositions showed a wide diversity of chemical composition, with four main chemotypes divided into groups A, B, C and D. All present trans-cinnamaldehyde as the majority, but with very different levels. Group A is the typical trans-cinnamaldehyde chemotype (68.75-91.23%). Group B was dominated by trans-cinnamaldehyde (42.37-6.36%) and trans-cinnamyl acetate (0.65-3.97%). Group C was dominated by trans-cinnamaldehyde (22.36-29.53%), α -calacorene (0.93-2.71%), α -cadinol (0.26-2.93%), while group D by trans-cinnamaldehyde (28.48%) and benzaldehyde (17.2%). The composition of the oil in the study was equated to chemotype A due to the high content of trans-cinnamaldehyde (23).

***Ocimum basilicum* (Basil)**

Linalool, one of the main monoterpenes of *O. basilicum* is found in the essential oils of several medicinal plants, mainly those belonging to the Lamiaceae family. Methylchavicol is a volatile monoterpene ether found in several plants. This component and its biotransformation products have toxic potential because they are genotoxic, mutagenic and carcinogenic. However, it has been considered safe by FEMA (Flavor and Extract Manufacturer's Association, 2008), as it does not pose a risk to human health in small quantities (0.6 mg/kg/day). Typically, linalool and methylchavicol are the predominant elements.

The majority of research has shown that the primary compounds found in the essential oils of *O. basilicum* are monoterpene derivatives (such as camphor, limonene, 1,8-cineol, linalool, geraniol) and phenylpropanoid derivatives (including eugenol, methyl eugenol, chavicol, estragole, methyl cinnamate) (Lee and Scagel 2009; Kwee and Niemeyer 2011; Güez et al. 2017). (24, 25, 26) Based on the predominant essential oil components, different chemotypes of *O. basilicum* have been proposed (such as those with high levels of linalool, methylchavicol, methylcinnamate, methyl ester, or eugenol) (Marzouk, 2009; Zhan et al. 2020) (27, 28). In this way, Piras and collaborators (2018) found linalool (35.1%) and eugenol (20.7%) as the major compounds in the essential oil of *O. basilicum*. On the other hand, Mahmoud et al. (2021) (29) identified in *O. basilicum* essential oil estragole (64.47%) and linalool (16.88%) as the main compounds. In another study, the most aroma active compounds in aerial parts of *O. basilicum* obtained from Iran and Turkey was investigated and linalool and methylchavicol were also found to be the main strong aroma-active compounds (Sonmezdag et al., 2018) (30). Qasem and colleagues (2023) in a study to determine the chemical composition of *O. basilicum* identified methylchavicol (86%) as

predominant in the essential oil (31). The chemical compounds found in the essential oil of *O. basilicum* undergo various qualitative transformations based on different factors such as soil, altitude, temperature, period of exposure to the sun, cultivation, drying and storage conditions have an influence on its composition, which explains the variations in the amount of these compounds (32, 33).

For *Rosmarinus officinalis*, few studies have reported the effect of volatile oil against *Trichophyton* species. Mekonnen et al. (2016), using α -pinene-type *R. officinalis* oil (50.8% of α -pinene), tested the antimicrobial activity of this oil against two unknown strains of *Trichophyton*. For this, the authors used agar diffusion and agar dilution tests, and *Rosmarinus officinalis* essential oil presented moderated activity against *Trichophyton* spp. (34). In another study using box vapor assay and agar diffusion assay, the essential oil of *Rosmarinus officinalis* (1,8-cineole (32%), α -pinene (23%), camphor (9%)) and two of its main constituents, camphor and 1,8-cineole, were tested against *T. mentagrophytes*, demonstrating moderate activity against this dermatophyte (35). This result was also observed in another study using the box vapor assay, in which *R. officinalis* oil was tested against *T. mentagrophytes* (2.5 mg/mL) and *T. rubrum* (4 mg/mL) (36).

For *Ocimum basilicum*, two studies report the action of the volatile oil on *Trichophyton mentagrophytes* and *T. rubrum*. The work carried out by Piras and collaborators (2018) describes the action of volatile oil, whose main constituents are linalool (35.1%), eugenol (20.7%) and 1,8-cineole (9.9%), on these two dermatophytes and also reports on the mechanism of action, which is the inhibition of germ tube formation. The essential oil of *O. basilicum* showed an effect against dermatophytes (MIC 0.64 μ L/mL). The effect on germ tube formation of essential oil showed that it decreases germ tube formation at values eight times lower than the MIC. Furthermore, the activity of the main compounds, linalool (MIC 1.25 μ L/mL) and eugenol (MIC 0.16 μ L/mL), was also determined, and their activity was generally similar to that of the essential oil, thus suggesting that these are the main active compounds (37). The other study aimed to investigate the activity of linalool against clinical isolates of *Trichophyton rubrum*. The MIC value was determined (256 mg/mL to 512 mg/mL) and demonstrated that linalool exerts its action against *T. rubrum* by interfering with both mycelial growth, conidiogenesis, conidial germination, fungal morphogenesis and membrane cell phone (38). This study contributes to clarifying the action of one of the main compounds present in the essential oil of *O. basilicum*.

In a study that aimed to evaluate the effects of 4 essential oils, *Cinnamomum verum*, *Syzygium aromaticum*, *Cymbopogon citratus*, *C. martini*, and their main components cinnamaldehyde, eugenol, citral and geraniol respectively, on the growth and hyphal ultrastructure of *Trichophyton rubrum*, at concentrations ranging from 0.005% to 0.32%, v/v. The antifungal activity of essential oils and their major constituents was in the order cinnamaldehyde > eugenol > geraniol = *C. verum* > citral

> *S. Aromaticum* > *C. citratus* > *C. martini*. Furthermore, for eugenol and cinnamaldehyde, both compounds demonstrated inhibitory action against ungerminated and germinated conidia of *T. rubrum*, with cinnamaldehyde being the most active. Furthermore, they found that the mechanism of action involves multiple sites of cinnamaldehyde action, mainly in cell membranes and endomembranous structures of the fungal cell (39). Considering the use as a fumigation agent, the essential oils of *S. aromaticum* (eugenol 87%) and *C. zeylanicum* (cinnamaldehyde 54%) were tested against *Trichophyton mentagrophytes*, using the closed box assay. It was found that oils containing phenol as the majority component were most active, followed by oils whose main constituent is an aldehyde and then by those with alcohol as the major compound (35).

Conclusions

The present study presented results through the application of research methodologies to highlight the potential antifungal effect and the use of essential oils in the treatment of onychomycosis. The results obtained in broth microdilution tests for clove, cinnamon, rosemary and basil essential oils pointed to the potential activity of basil essential oil (*Ocimum basilicum*), inhibiting the growth of *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes* strains at concentrations that ranged from 8 mg/mL to 2 mg/mL, demonstrating potential activity for the treatment of onychomycosis.

Conflict of interest

None to declare.

References

- Martinez, K.V.; Pereira, P.A.; Nascimento, C.G.S.; Leandro, R.N.; Giundice, V.M.; Garcia, E.S.; Silva, L.P.R.; Borges, J.S.; Charles, F.C.; Calil, L.N.; Mezzari, A.; Gonçalves, S.M.B.; Rodrigues D.M.G. Identificação do perfil dos agentes etiológicos causadores de micoses superficiais cutâneas no sul do Brasil. *Scientific Electronic Archives*, v. 13 n.9, 2020.
- Pereira, P.A.; Vieira, E.S.; Charles, F.C.; Giudice, V.M.; Nascimento, C.G.S.; Borges, J.S.; Silva, L.P.R.; Silva, G.S.; Ferrão, S.K.; Mezzomo, L.; Calil, L.N.; Mezzari, A. Superficial and Cutaneous Mycoses, Epidemiology, Virulence, Susceptibility Profile to Antifungals and Their Infections: A literature review of the Last Twenty Years. *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, v. 11, p. 176-187, 2021.
- Magagnin, C.M.; Stopiglia, C.D.O.; Vieira, F.J.; Heidrich, D.; Machado, M.; Vettoratto, G.; Lamb, F.; Scroferneker, M.L. Perfil de suscetibilidade a antifúngicos de dermatófitos isolados de pacientes com insuficiência renal crônica. *Anais Brasileiro de Dermatologia*, v.86, p. 694-701, 2011.
- Leung, A.K.C.; Lam, J.M.; Leong, K.F.; Hon, K.L.; Barankin, B.; Leung, A.A.M.; Wong, A.H.C. Onychomycosis: An Updated Review. *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery*, v. 14 p. 32-45, 2020.
- Maness, L.R.; Zubov, T. The Inhibitory Effect of Essential Oils on *Rhizopus stolonifer*, *Trichophyton mentagrophytes*, and *Microsporum gypseum*. *Laboratory Medicine*, v. 50, p. 18-22, 2019.
- Roh, J.; Shin, S. Antifungal and Antioxidant Activities of the Essential Oil from *Angelica koreana* Nakai. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2014, p. 398503, 2014.
- Adams, R.P. *Identification of essential oils by ion trap mass spectrometry*. New York: Academic Press, 2017.
- Bassolé, I. H. N.; Juliani, H. R. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules*, v. 17, n. 4, p. 3989-4006, 2012.
- Cleff, M. B.; Meinerz, A.R.M.; Madrid, I.; Fonseca, A.O.; Alves, G.H.; Meireles, M.C.A.; Rodrigues, M.R.A. Perfil de suscetibilidade de leveduras do gênero *Candida* isoladas de animais ao óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 14, n. 1, p. 43-49, 2012.
- Hashemi, S.M.B.; Gholamhosseinpour A.; Barba, F.J. *Rosmarinus officinalis* L. Essential Oils Impact on the Microbiological and Oxidative Stability of Sarshir (Kaymak). *Molecules*, v. 28, n. 10, p. 4206, 2023.
- Bajalan, I.; Rouzbahani, R.; Pirbalouti A.G.; Maggi, F. Quali-quantitative variation of essential oil from Iranian rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) accessions according to environmental factors. *Journal of Essential Oil Research*, v. 30, p. 16–24, 2018.
- Álvarez-García, S.; Moumni, M.; Romanazzi, G. Antifungal activity of volatile organic compounds from essential oils against the postharvest pathogens *Botrytis cinerea*, *Monilinia fruticola*, *Monilinia fructigena*, and *Monilinia laxa*. *Frontiers in plant science*, v. 14, p. 1274770, 2023.
- Oualdi, I.; Diass, K.; Azizi, S.E.; Dalli, M.; Touzani, R.; Gseyra, N.; Yousfi, E.B. *Rosmarinus officinalis* essential oils from Morocco: new advances on extraction, GC/MS analysis, and antioxidant activity. *Natural Product Research*, v. 37, n. 12, p. 2003-2008, 2023.
- Hashemi, S.M.B.; Gholamhosseinpour A.; Barba, F.J. *Rosmarinus officinalis* L. Essential Oils Impact on the Microbiological and Oxidative Stability of Sarshir (Kaymak). *Molecules*, v. 28, n. 10, p. 4206, 2023.
- Senthoooraja, R.; Subaharan, K.; Manjunath, S.; Pragadheesh, V.S.; Bakthavatsalam, N.; Mohan, M. G.; Senthil-Nathan, S.; Basavarajappa, S.

- Electrophysiological, behavioural and biochemical effect of *Ocimum basilicum* oil and its constituents methyl chavicol and linalool on *Musca domestica* L. *Environmental science and pollution research international*, v. 28, p.36, 2021.
16. Taghipour, Z.; Bahmanzadeh, M.; Rahimi, R. The Effects of Clove and Its Constituents on Reproductive System: a Comprehensive Review. *Reproductive Sciences*, v. 30, n. 9, p. 2591-2614, 2023.
 17. Bariz, K.; Trabelsi, L.; Lahcene, S.; Salem-Bekhit, M.M.; Elossaily, G.M.; Ali Alzahrani, H.; Alharbi, O.O.; Abbaci, M.; Abbaci, H.; Benguerba, Y.; Houali, K. Evaluating the Synergistic Potency of Essential Oils and Antibiotics Against *Klebsiella pneumoniae* BLSE Strains. *Cellular and Molecular Biology*, v. 69, n. 3, p. 198-206, 2023.
 18. Loukili, E.H.; Ouahabi, S.; Elbouzidi, A.; Taibi, M.; Yahyaoui, M.I.; Asehrou, A.; Azougay, A.; Saleh, A.A.L.; Kamaly, O.; Parvez, M.K.; El Guerrouj, B.; Touzani, R.; Ramdani, M. Phytochemical Composition and Pharmacological Activities of Three Essential Oils Collected from Eastern Morocco (*Origanum compactum*, *Salvia officinalis*, and *Syzygium aromaticum*): A Comparative Study. *Plants*, v. 12, n. 19, p. 3376, 2023.
 19. Liu, S.; Yang, L.; Zheng, S.; Hou, A.; Man, W.; Zhang, J.; Wang, S.; Wang, X.; Yu, H.; Jiang, H. A review: the botany, ethnopharmacology, phytochemistry, pharmacology of Cinnamomi cortex. *RSC Advances*, v. 11, n. 44, p. 27461-27497, 2021.
 20. Vepštaitė-Monstavičė I, Ravoitytė B, Būdienė J, Valys A, Lukša J, Servienė E. Essential Oils of *Mentha arvensis* and *Cinnamomum cassia* Exhibit Distinct Antibacterial Activity at Different Temperatures In Vitro and on Chicken Skin. *Foods (Basel, Switzerland)*. v. 12, n. 21, p. 3938, 2023.
 21. Rosato, R., Napoli, E., Granata, G., Di Vito, M., Garzoli, S., Geraci, C., Rizzo, S., Torelli, R., Sanguinetti, M., & Bugli, F. Study of the Chemical Profile and Anti-Fungal Activity against *Candida auris* of *Cinnamomum cassia* Essential Oil and of Its Nano-Formulations Based on Polycaprolactone. *Plants (Basel, Switzerland)*, v.12, n. 2, p. 358, 2023.
 22. Zhao, S., Wu, Y., Qian, Y., Qian, Y., Xue, S., Chen, J., Zeng, Q., & Gu, M. Chemical profiling and identification of anti-osteoporosis chemical-markers of *Cinnamomum cassia* (L.) presl extracts using GC-MS and spectrum-activity analyses. *Natural Product Research*. Vol. 37, n. 11, p. 1902–1906. (2023).
 23. Gu, K.; Feng, S.; Zhang, X.; Peng, Y.; Sun, P.; Liu, W.; Wu, Y.; Yu, Y.; Liu, X.; Liu, X.; Deng, G.; Zheng, J.; Li, B.; Zhao, L. Deciphering the antifungal mechanism and functional components of *cinnamomum cassia* essential oil against *Candida albicans* through integration of network-based metabolomics and pharmacology, the greedy algorithm, and molecular docking. *Journal of ethnopharmacology* vol. 319, pt 2, 2024.
 24. Lee, Jungmin; Scagel, Carolyn F. Chicoric acid found in basil (*Ocimum basilicum* L.) leaves. *Food Chemistry*, v. 115, n. 2, p. 650-656, 2009.
 25. Kwee, Eileen M.; Niemeyer, Emily D. Variations in phenolic composition and antioxidant properties among 15 basil (*Ocimum basilicum* L.) cultivars. *Food Chemistry*, v. 128, n. 4, p. 1044-1050, 2011.
 26. Kwee, Eileen M.; Niemeyer, Emily D. Variations in phenolic composition and antioxidant properties among 15 basil (*Ocimum basilicum* L.) cultivars. *Food Chemistry*, v. 128, n. 4, p. 1044-1050, 2011.
 27. Marzouk, A. M. Hepatoprotective triterpenes from hairy root cultures of *Ocimum basilicum* L. *Zeitschrift für Naturforschung C*, v. 64, n. 3-4, p. 201-209, 2009.
 28. Zhan, Y., et al. Basil polysaccharides: A review on extraction, bioactivities and pharmacological applications. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 28, n. 1, p. 115179, 2020.
 29. Mahmoud, E., et al. Determination of volatiles, antioxidant activity, and polyphenol content in the postharvest waste of *Ocimum basilicum* L. *Food Chemistry*, v. 375, p. 131692, 2022.
 30. Sonmezdag, A. S., et al. The most aroma-active compounds in shade-dried aerial parts of basil obtained from Iran and Turkey. *Industrial Crops and Products*, v. 124, p. 692-698, 2018.
 31. Qasem, A., Assaggaf, H., Mrabti, H.N., Minshawi, F., Rajab, B.S., Attar, A.A., Alyamani, R.A., Hamed, M., Mrabti, N.N., Baaboua, A. E., Omari, N.E., Alshahrani, M.M., Awadh, A.A.A., Sheikh, R.A., Ming, L.C., Goh, K.W., Bouyahya, A. Determination of Chemical Composition and Investigation of Biological Activities of *Ocimum basilicum* L. *Molecules (Basel, Switzerland)*, v. 28, n. 2 p. 614, 2023.
 32. Moura, E.D.S.; Faroni, L.R.D.; Heleno, F.F.; Rodrigues, A.A.Z. Toxicological Stability of *Ocimum basilicum* Essential Oil and Its Major Components in the Control of *Sitophilus zeamais*. *Molecules*, v. 26, n. 21, p. 6483, 2021.

33. Al-snafi, A. E. Chemical constituents and pharmacological effects of *Ocimum basilicum*-A review. *International Journal of Pharmaceutical Research*, v. 13, n. 2, p. 2997-3013, 2021.
34. Mekonnen, A., Yitayew, B., Tesema, A., & Taddese, S. In vitro antimicrobial activity of essential oil of *Thymus schimperi*, *Matricaria chamomilla*, *Eucalyptus globulus*, and *Rosmarinus officinalis*. *International Journal of Microbiology*, v. 2016, n. 1, p. 9545693, 2016.
35. Inouye, S., Uchida, K., & Abe, S. Vapor activity of 72 essential oils against a *Trichophyton mentagrophytes*. *Journal of Infection and Chemotherapy*, v. 12, n. 4, p. 210-216, 2006
36. Khosravi, R. A., Shokri, H., Farahnejat, Z., Chalangari, R., & Katalin, M. Antimycotic efficacy of Iranian medicinal plants towards dermatophytes obtained from patients with dermatophytosis. *Chinese Journal of Natural Medicines*, v. 11, n. 1, p. 43-48, 2013.
37. Piras A, Gonçalves MJ, Alves J, et al. *Ocimum tenuiflorum* L. and *Ocimum basilicum* L., two spices of Lamiaceae family with bioactive essential oils. *Industrial Crops and Products*. 2018;113(Complete):89-97.
38. Lima, M. I. O., De Medeiros, A. A., Silva, K. S., Cardoso, G. N., de Oliveira Lima, E., & de Oliveira Pereira, Investigation of the antifungal potential of linalool against clinical isolates of fluconazole resistant *Trichophyton rubrum*. *Journal de mycologie medicale*, v. 27, n. 2, p. 195-202, 2017.
39. Khan, M.S.A., I. Ahmad, In vitro antifungal, anti-elastase and anti-keratinase activity of EOs of *Cinnamomum*-, *Syzygium*-and *Cymbopogon*-species against *Aspergillus fumigatus* and *Trichophyton rubrum*, *Phytomedicine* v. 19, p. 48-55, 2011.

