



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

MILENA BINATTI FERREIRA

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE ÓLEOS ESSENCIAIS FRENTE A FUNGOS
DEMATIÁCEOS**

CAMPINAS

2023

MILENA BINATTI FERREIRA

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE ÓLEOS ESSENCIAIS FRENTE A FUNGOS
DEMATIÁCEOS**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra, em Ciências, na área de Fármacos, Medicamentos e Insumos para a Saúde.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Derlene Attili de Angelis

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA MILENA BINATTI FERREIRA, ORIENTADA PELA PROF.^a DR.^a DERLENE ATTILI DE ANGELIS.

CAMPINAS

2023

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

F413a Ferreira, Milena Binatti, 1979-
Atividade antifúngica de óleos essenciais frente a fungos dematiáceos /
Milena Binatti Ferreira. – Campinas, SP : [s.n.], 2023.

Orientador: Derlene Attili de Angelis.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade
de Ciências Farmacêuticas.

1. Susceptibilidade. 2. Agente antifúngico. 3. Óleos essenciais. 4. Fungos.
5. Compostos químicos. I. Angelis, Derlene Attili de, 1963-. II. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. III. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Antifungal activity of essential oils against dematiaceous fungi

Palavras-chave em inglês:

Susceptibility

Antifungal agents

Essential oils

Fungi

Chemical compounds

Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos para a Saúde

Titulação: Mestra em Ciências

Banca examinadora:

Derlene Attili de Angelis [Orientador]

Angélica Zaninelli Schreiber

Alexandra Christine Helena Frankland Sawaya

Data de defesa: 15-09-2023

Programa de Pós-Graduação: Ciências Farmacêuticas

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0009-0008-7777-4289>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/3357435313458419>



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Autora Milena Binatti Ferreira

Orientador Prof^a Dr^a Derlene Attili de Angelis

Dissertação aprovada em 15 de setembro de 2023

Comissão Examinadora

Prof^a Dr^a Derlene Attili de Angelis

Prof^a Dr^a Alexandra Christine Helena Frankland Sawaya

Prof^a Dr^a Angelica Zaninelli Schreiber

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

Campinas, 15 de setembro de 2023.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por proporcionar na minha vida mais uma etapa de aprendizado, crescimento e realização, de acordo com a Sua vontade, que é boa, perfeita e agradável. Deus, obrigada por sua presença diariamente na minha vida.

Agradeço aos meus pais, Osvaldo e Neide, pelo amor incondicional, pelo exemplo de caráter, honestidade, dedicação e por não medirem esforços. Tudo o que sou hoje, devo a vocês.

Aos meus irmãos Leandro, Mariana, e ao meu cunhado Michel, obrigado por todo amor e apoio em mais essa etapa da minha vida. Ao meu sobrinho Pedro, obrigada por trazer alegria a nós.

Ao meu marido Elias, obrigada por toda compreensão, companheirismo, paciência, por sempre caminhar ao meu lado. Tenho orgulho de ser sua esposa e agradeço a Deus por ter você na minha vida. Te amo.

Aos meus primos Ana Paula e Paulo, por toda ajuda e incentivo nos momentos que precisei. Agradeço também todos os outros primos e primas, tias e tios pelo carinho e pelo apoio.

Ao Pr. Vanderli Carreiro e sua esposa Alina Carreiro, pelo apoio, ensinamentos e orações, assim como a todos da Igreja Evangélica Congregacional de Campinas.

À minha orientadora Dra. Derlene Attili de Angelis, por todo ensinamento, atenção, carinho e por estar presente mesmo diante de tantas dificuldades acontecendo em sua vida. Muito obrigada pela amizade e pela dedicação por tudo que faz, minha gratidão.

Agradeço a Laura Marcela, minha parceira de mestrado, pelo companheirismo, aprendizado e amizade.

À Divisão de Recursos Microbianos, agradeço pelos incentivos dos alunos da pós-graduação, pelo apoio da Dra. Fabiana Fantinatti Garboggini, Dra. Valéria Maia Merzel e dos técnicos Gilberto, Viviane e Tulio por entenderem as minhas necessidades de conciliar o meu trabalho com o meu projeto de pesquisa, sempre dispostos a me ajudar.

Aos pós doutorandos, Pedro Monteiro e sua esposa Pilar, obrigada por toda ajuda e ensinamentos durante a escrita deste trabalho.

A todos os meus amigos, agradeço por todo carinho, ensinamentos. Tenho vocês dentro do meu coração. Vocês fazem parte dessa minha conquista.

À Divisão de Microbiologia, em especial a Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte, pela atenção, pelos ensinamentos e por toda colaboração, o meu muito obrigada. À técnica Camila, por sempre ser prestativa.

À Divisão de Química Orgânica e Farmacêutica e ao Dr. Adilson Sartoratto, pelo conhecimento, ensinamentos e colaboração neste projeto.

Agradeço aos técnicos Edson e Camila de Sá, do Laboratório de Microbiologia do Hospital das Clínicas da Unicamp, pela atenção e por me receberem tão bem. Também à Profa. Dra. Angélica Zaninelli Schreiber, pela colaboração e críticas construtivas.

RESUMO

Fungos dematiáceos são encontrados em todos os ambientes desempenhando diversas atividades, inclusive como oportunistas e patógenos humano e animal, papel esse favorecido pela presença de melanina na parede celular, relacionada com a capacidade de provocar micoses tópicas ou sistêmicas. Antifúngicos sintéticos são utilizados como terapêuticos, porém com as desvantagens de apresentar efeitos colaterais e provocar resistência fúngica em função dos tratamentos de longo prazo. Assim, a indústria farmacêutica tem buscado novos princípios ativos na intenção de controlar as doenças causadas por fungos. Considera-se o uso de compostos como os óleos essenciais (OEs) uma alternativa natural importante, em função da atividade farmacológica que apresentam. Neste contexto, o objetivo principal do presente trabalho foi avaliar a atividade antifúngica de 8 OEs frente a isolados de fungos dematiáceos ambientais e clínicos, e determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração fungicida mínima (CFM) dos mesmos. Para tal, foi empregado o método de diluição em meio de cultura sólido com 5 diferentes concentrações dos óleos (0,25; 0,5; 0,75; 1,0 e 1,25mg/mL) acrescidos de 2,5% DMSO e 0,5% Tween 80. A avaliação da CIM ocorreu ao final do décimo dia de incubação, quando foi mensurado o crescimento radial fúngico, e a CFM durante os 30 dias subsequentes. Além disso, análises qualitativas e quantitativas da composição química dos OEs foram realizadas por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM). A identificação molecular dos isolados utilizados na CIM ocorreu por meio do sequenciamento da região ITS do DNA genômico e análise de distância filogenética. Os fungos foram submetidos ao teste de tolerância a diferentes temperaturas (28; 30; 33; 37; 40° C) por um período de incubação de 21 dias. Os resultados obtidos da CIM confirmaram que os OEs de *Cymbopogon citratus* e *C. martinii* apresentaram a maior atividade inibitória na concentração de 0,75 mg/mL para todos os isolados testados. Para os isolados clínicos, o monoterpene Citral apresentou a CIM de 0,5mg/mL para *Fonsecaea* sp. A CFM foi observada na concentração de 1,0 mg/mL para o isolado *Phialophora* sp. Para os isolados ambientais, as melhores CFM foram obtidas com os OEs de *C. citratus* e *Syzygium aromaticum*, que controlaram 46% e 40% do crescimento das culturas fúngicas, respectivamente. Foi inesperada a ausência de inibição dos óleos de *Ocimum basilicum* e *Melaleuca alternifolia*, principalmente dessa última cujo efeito tem sido relatado em diversas situações. Contudo, a análise química revelou que o óleo comercial de *M. alternifolia* utilizado nesse estudo apresentou baixas taxas do composto tido como majoritário (terpinen-4-ol), o que pode ter reduzido a qualidade e eficiência do mesmo. Os gêneros de fungos identificados foram *Cladosporium*, *Cladophialophora*, *Curvularia*, *Exophiala* e *Penidiellopsis*. O crescimento ótimo dos isolados ocorreu na faixa de 28 a 30°C, com exceção das linhagens LMA 484 (*Curvularia* sp.) e LMA 836 (*Exophiala bergeri*) que cresceram a 37°C. Neste trabalho podemos concluir que para os isolados fúngicos dematiáceos ambientais, OEs *C. citratus* e *C. martinii* possuem atividade inibitória e *C. citratus* e *S. aromaticum* apresentam ação fungicida. Para os isolados fúngicos dematiáceos clínicos, o monoterpene Citral apresentou atividade inibitória e fungicida. Os OEs são promissores para o desenvolvimento de novos fármacos, como evidenciado nesse trabalho, e por serem de origem natural contribuem de forma saudável para o bem-estar, contribuindo para melhorar a qualidade de vida da nossa sociedade.

Palavras-chaves: susceptibilidade, agente antifúngico, óleos essenciais, fungos, compostos químicos.

ABSTRACT

Dematiaceous fungi are ubiquitous to all environments, and responsible for various functions, including as opportunistic and pathogenic agents in humans and animals, favored by the presence of melanin in the cell wall, which is related to the ability to cause topical or systemic mycoses. Synthetic antifungals are used for treatment of those mycoses, but they come with disadvantages of side effects and fungal resistance due to long-term treatments. Thus, the pharmaceutical industry has been searching for new active principles to control fungal-caused diseases. The use of essential oils (EOs) compounds is considered an important natural alternative due to their pharmacological activity. In this context, the main objective of this study was to evaluate the antifungal activity of 8 EOs against isolates of environmental and clinical dematiaceous fungi and to determine their minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC). For this purpose, the solid culture medium dilution method was employed with 5 different concentrations of oils (0.25; 0.5; 0.75; 1.0 and 1.25 mg/mL) added with 2.5% DMSO and 0.5% Tween 80. MIC tests were performed at the end of the tenth day of incubation, fungal radial growth was also measured, and MFC was determined during the subsequent 30 days. Additionally, qualitative and quantitative analyses of the chemical composition of EOs were carried out by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS). Molecular identification of the isolates used in the MIC tests was achieved through sequencing of the ITS region of genomic DNA and phylogenetic distance analysis. The fungi were subjected to tolerance testing at different temperatures (28; 30; 33; 37; 40°C) for a 21-day incubation period. The MIC results obtained confirmed that the EOs from *Cymbopogon citratus* and *C. martinii* exhibited the highest inhibitory activity at a concentration of 0.75 mg/mL for all tested isolates. For clinical isolates, the monoterpene Citral presented an MIC of 0.5 mg/mL for *Fonsecaea* sp. MFC was detected at a concentration of 1.0 mg/mL for the *Phialophora* sp. isolate. For environmental isolates, the best MFCs were obtained with the EOs from *C. citratus* and *Syzygium aromaticum*, which controlled 46% and 40% of fungal culture growth, respectively. The absence of inhibition by the oils of *Ocimum basilicum* and *Melaleuca alternifolia* was unexpected, especially the latter, whose effect has been reported in various situations. However, chemical analysis revealed that the commercial *M. alternifolia* oil used in this study had low levels of the compound considered as the major component (terpinen-4-ol), which may have reduced its quality and efficiency. The identified fungal genera were *Cladosporium*, *Cladophialophora*, *Curvularia*, *Exophiala*, and *Penidiellopsis*. Optimal growth of the isolates occurred in the range of 28 to 30°C, except for the LMA 484 (*Curvularia* sp.) and LMA 836 (*Exophiala bergeri*) strains, which grew at 37°C. In this study, we concluded that for environmental dematiaceous fungi, EOs from *C. citratus* and *C. martinii* have inhibitory activity, and *C. citratus* and *S. aromaticum* exhibit fungicidal action. For clinical dematiaceous fungal isolates, the monoterpene Citral showed inhibitory and fungicidal activity. EOs are promising for the development of new drugs, as seen from our results, and as they are of natural origin, they contribute to improve human healthy way to well-being, ensuring quality of our lives.

Keywords: susceptibility, antifungal agents, essential oils, fungi, chemical compounds.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Técnica de microcultivo	27
Figura 2: Preservação dos fungos pelo método de <i>Castellani</i>	28
Figura 3: Medição do crescimento micelial	31
Figura 4: (a) Técnica de microcultivo realizada para identificação preliminar; (b) e (c) as imagens mostram o resultado obtido com a técnica, para melhor observação morfológica.	35
Figura 5: Análise da interferência do DMSO e do Tween 80 no crescimento dos fungos dematiáceos: (a) 2,5% de DMSO + 0,5% Tween 80; (b) 5% DMSO.	37
Figura 6: Porcentagem inibitória dos OEs frente aos 15 isolados de fungos dematiáceos.	40
Figura 7 A: Resultado do teste de tolerância dos isolados de fungos dematiáceos em MA2% após 21 dias. Coluna, da esquerda para direita: 28, 30, 33, 37 e 40°C. Linha, da cima para baixo: LMA 436; LMA 484; LMA 836; LMA 969; LMA 986; LMA 1005; LMA 1007 e LMA 1059.	56
Figura 7 B: Resultado do teste de tolerância dos isolados de fungos dematiáceos em MA2% após 21 dias. Coluna, da esquerda para direita: 28, 30, 33, 37 e 40°C. Linha, da cima para baixo: LMA 1074; LMA 1082; LMA 1091; LMA 1105; LMA 1129; PB 03 e PB 04.	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Relação dos OEs utilizados	29
Tabela 2: Ensaios de solubilidade dos OEs	29
Tabela 3: Reação de PCR: relação dos reagentes e suas concentrações finais	33
Tabela 4: Reação de sequenciamento: relação dos reagentes e o volume por reação	34
Tabela 5: Programa da reação do sequenciamento	34
Tabela 6: Relação dos 15 isolados selecionados para os ensaios de atividade antifúngica com os OEs	35
Tabela 7: Efeito inibitório (CIM mg.mL ⁻¹) dos OEs frente aos 15 isolados de fungos dematiáceos	39
Tabela 8: Resultado de CFM dos OEs frente aos isolados de fungos dematiáceos	42
Tabela 9: Efeito inibitório dos OEs de <i>C. citratus</i> e <i>S. aromaticum</i> e do monoterpeno Citral frente aos 2 isolados clínicos fúngicos.	43
Tabela 10: Resultado da CFM frente aos 2 isolados clínicos de fungos dematiáceos	44
Tabela 11: Composição química do óleo essencial de <i>C. citratus</i>	45
Tabela 12: Composição química do óleo essencial de <i>C. martinii</i>	46
Tabela 13: Composição química do óleo essencial de <i>S. aromaticum</i>	47
Tabela 14: Composição química do óleo essencial de <i>M. alternifolia</i>	48
Tabela 15: Composição química do óleo essencial de <i>O. basilicum</i>	49
Tabela 16: Composição química do óleo essencial de <i>C. nardus</i>	50
Tabela 17: Composição química do óleo essencial de <i>O. gratissimum</i>	51
Tabela 18: Composição química do óleo essencial de <i>T. vulgaris</i>	52
Tabela 19: Identificação molecular	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DOPA - melanina dopaquinona
DHN - melanina dihidroxinaftaleno
L-DOPA - 3,4-dihidroxifenilalanina
OMS - Organização Mundial da Saúde
UNESP – Universidade Estadual Paulista
DMSO - Dimetilsulfóxido
MA2% - Extrato de malte a 2%
LIF – Laboratório de Investigação em Fungos
FCM - Faculdade de Ciências Médicas
DBO – Demanda Bioquímica de Oxigênio
DMB - Divisão de Microbiologia
CPQBA - Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas
UNICAMP - Universidade Estadual de Campinas
UFC – Unidades Formadoras de Colônias
CIM – Concentração Inibitória Mínima
CFM – Concentração Fungicida Mínima
CG-EM - Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrômetro de Massas
DNA – Ácido desoxirribonucléico (Deoxyribonucleic acid)
rpm - rotação por minuto
UV – Ultravioleta
PCR - Reação em Cadeia da Polimerase (Polymerase Chain Reaction)
ITS - Espaço Interno Transcrito (Internal Transcribed Spacer)

LISTA DE SÍMBOLOS

% - porcentagem

°C - graus Celsius

μL - microlitros

mm³ - milímetro cúbico

mL - mililitros

cm - centímetros

mg/mL - miligramas/mililitros

ng - nanogramas

SUMÁRIO

1. Introdução	13
2. Revisão Bibliográfica	15
2.1. Fungos dematiáceos	15
2.2. Fungos dematiáceos e saúde pública	17
2.3. Óleos essenciais	19
2.3.1. Família Poaceae	22
2.3.2. Família Myrtaceae	23
2.3.3. Família Lamiaceae	23
3. Objetivos	25
3.1. Objetivo geral	25
3.2. Objetivos específicos	25
4. Materiais e Métodos	26
4.1. Seleção dos isolados fúngicos	26
4.1.1. Avaliação da viabilidade e pureza	26
4.1.2. Caracterização macro e microscópica dos isolados	27
4.1.3. Preservação dos isolados	28
4.2. Óleos essenciais e Emulsificantes	29
4.2.1. Solubilização dos OEs	29
4.2.2. Avaliação da Interferência do DMSO e Tween 80	30
4.3. Triagem da atividade antifúngica	30
4.3.1. Efeito inibitório dos OEs sobre o crescimento micelial	30
4.3.2. Determinação do efeito fungicida	31
4.4. Determinação da composição química dos OEs por CG-EM	31
4.5. Caracterização molecular dos isolados fúngicos	32
4.5.1. Extração do DNA	32
4.5.2. PCR e purificação dos produtos de PCR	33
4.5.3. Sequenciamento do produto de PCR purificado	33
4.6. Teste de tolerância à temperatura	34
5. Resultados e Discussão	35
5.1. Identificação morfológica preliminar e seleção dos isolados fúngicos	35
5.2. Solubilização dos OEs	36
5.3. Interferência dos emulsificantes	37
5.4. Atividade antifúngica e fungicida dos OEs	38
5.4.1. CIM dos OEs sobre os isolados de fungos dematiáceos	38
5.4.2. CFM dos OEs sobre os isolados de fungos dematiáceos	41
5.4.3. CIM dos OEs sobre os isolados clínicos de fungos dematiáceos	43
5.4.4. CFM dos OEs sobre os isolados clínicos de fungos dematiáceos	43
5.5. Determinação dos constituintes dos OEs	44
5.6. Identificação molecular	52
5.7. Teste de tolerância a temperatura	55
6. Conclusões	59
7. Referências Bibliográficas	60
8. Apêndices	71

1. Introdução

Os microrganismos apresentam enorme diversidade de formas e metabolismos, sendo considerados essenciais para a manutenção da vida no planeta, pois possuem alto valor para os processos bioquímicos da natureza. Desde o começo do século XX, quando evidenciamos o despertar da biotecnologia, estes seres chamaram a atenção de setores produtivos como agropecuária, indústria farmacêutica e alimentícia, dentre outras, em função do número de aplicações em que poderiam ser envolvidos. Fungos e bactérias possuem a capacidade de colonizar praticamente todos os nichos ecológicos conhecidos, desenvolvendo inúmeras atividades biológicas, muitas delas de potencial biotecnológico. Por outro lado, existem aqueles que atraem o interesse de pesquisadores pelos efeitos negativos que causam no bem-estar de outros organismos, como doenças humanas, animais e vegetais (MADIGAN, 2010; TORTORA et al., 2012; NASCIMENTO, 2013).

Dentre suas características, os fungos dematiáceos biosintetizam pigmentos escuros conhecidos por melaninas, em sua estrutura celular. Estas, constituem compostos polifenólicos e/ou poliindólicos, os quais conferem proteção aos raios ultravioleta e resistência contra condições adversas como pH e temperaturas extremas (DUARTE, 2013; MEGIOLARO, 2016, LIN e XU, 2020). Além de ajudar na sobrevivência e adaptação da célula fúngica a diferentes ambientes, a melanina confere vantagens para que o fungo possa invadir o sistema imunológico do hospedeiro, facilitando o desenvolvimento de patologias. Existem registros de diversos representantes dematiáceos, que são agentes causadores de infecções oportunistas em humanos, como micetoma, feo-hifomicose e cromoblastomicose, causando desde pequenas a grandes lesões cutâneas que comprometem a capacidade funcional dos pacientes e a sua qualidade de vida (HOFFMANN, 2011).

O tratamento terapêutico utiliza drogas antifúngicas sintéticas, com destaque para os azóis. Sabe-se, contudo, que o uso constante destes medicamentos resulta no surgimento de cepas resistentes, desistência do tratamento pelo paciente (em função da duração), e por apresentarem diferentes níveis de toxicidade (HOSSAIN *et al.* 2022; VITIELLO *et al.* 2023). Diante disso, a procura por produtos naturais tem aumentado, dentre estes os óleos essenciais (OEs) com ação antifúngica (NAZZARO *et al.* 2017).

Os OEs são sintetizados pelo metabolismo secundário das plantas medicinais e aromáticas, como resposta ao estresse e ataque de patógenos, podendo ser extraídos por hidrodestilação ou arraste à vapor, a partir de partes ou da planta toda. São caracterizados como lipofílicos, o que favorece a ação antifúngica e os torna um produto de interesse

biotecnológico. A eficiente atividade antifúngica de alguns OEs pode ser devido às suas substâncias majoritárias, ou pelo sinergismo entre compostos minoritários. Um exemplo de atividade conferida por um composto majoritário pode ser observado no monoterpeno timol, presente no tomilho (*Thymus vulgaris*), como concluiu Stević *et al.* (2014) em seus experimentos.

Pensando em contribuir para esse contexto e selecionar o óleo mais eficiente, o presente trabalho avaliou a atividade antifúngica de 8 OEs frente a 15 linhagens ambientais de fungos dematiáceos e duas de origem clínica, principalmente com base na determinação da concentração mínima inibitória. A análise qualitativa dos óleos essenciais estudados trouxe ainda uma abordagem relevante para o emprego de produtos naturais como alternativa, ressaltando a importância de sempre buscarmos produtos confiáveis, os quais tem sido indicado no tratamento de infecções causadas ou não por microrganismos.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Fungos dematiáceos

Também denominados fungos negros ou melanizados, possuem representantes nos filos Ascomycota e Basidiomycota, variando o nível de pigmentação de acordo com o estágio de desenvolvimento e as condições ambientais. Estão dispersos em algumas ordens, principalmente dentre os Dothideales, que abrange gêneros de ampla capacidade de adaptação, como *Cladosporium*, e os Chaetothyriales que possuem representantes sapróbios e oportunistas como *Exophiala* e *Cladophialophora*, junto à família Herpotrichiellaceae (de HOOG *et al.* 2020; AMETRANO, MUFFIA e GRUBE, 2019). Os Moniliellales (Basidiomycota) abrigam o gênero *Moniliella* que, apesar de ter registros como agente de lesões de pele, apresenta baixa patogenicidade (de HOOG *et al.* 2020).

Destacando-se de outros grupos de fungos, os dematiáceos possuem metabolismos adaptativos para se desenvolver em ambientes com insuficiência ou escassez de nutrientes ou variações extremas de temperatura, pH, salinidade e toxicidade (GUNDE-CIMERMAN e PLEMENITAŠ, 2007; SATOW *et al.* 2008; MEGIOLARO, 2016; BARON *et al.* 2021). Com isso, são capazes de colonizar os mais diversos substratos como os encontrados em cavernas e regiões inóspitas (MARTIN-SANCHEZ *et al.* 2012), ambientes hipersalinos, apresentando halotolerância em climas temperados, subtropicais e tropicais (ZALAR *et al.* 2019), e em rochas localizadas na Antártica (SELBMANN *et al.* 2017). Segundo Grishkan e Nevo (2012) foram encontrados em abundância no monte Hermon (cordilheira na fronteira Líbano-Síria) tanto no verão como no inverno, local quase sempre coberto de neve. Esse grupo de fungos também foi isolado no Park Ekant, situado na Índia, em diferentes ambientes como solo, água e plantas, sendo o maior número isolado a partir de folhas de plantas (SAHAY, 2013). Segundo Vicente *et al.* (2008) foram encontrados diversos fungos dematiáceos oportunistas na região subtropical do Brasil. Também, a presença de fungos negros com potencial patogênico também foi constatada em ambientes domésticos, como em máquinas de lavar louças, saunas e outros ambientes artificiais quentes e úmidos (GOSTINCAR; GRUBE e GUNDE-CIMERMAN, 2011).

A morfologia desse grupo de fungos é variada e favorece sua colonização nos ambientes que conquistou. De maneira geral, existem colônias restritas a expandidas, de aspectos pulverulentos a lanosos, aveludadas ou felpudas. Quanto à pigmentação, resultado da presença de melanina na estrutura celular, ocorrem variações de tons de verde, marrom escuro até preto (de HOOG *et al.* 2000; GUNDE-CIMERMAN e PLEMENITAŠ, 2007). A melanina

pode ser classificada em várias classes de pigmentos como pretos, marrons, vermelhos e amarelos, que são produzidos através de diferentes vias metabólicas. A melanina dopaquinona (DOPA) e melanina dihidroxinaftaleno (DHN) são predominantes no reino Fungi (SMITH e CASADEVALL, 2019). Tal pigmentação constitui um fator importante para sua sobrevivência sob condições adversas em ambientes de estresse constante onde encontramos alta exposição aos raios ultravioleta ou agentes tóxicos, por exemplo (SATOW *et al.* 2008).

A melanina DOPA é uma forma marrom-escura produzida a partir da hidroxilação da tirosina e da oxidação de catecolaminas, como L-DOPA (3,4-dihidroxifenilalanina) sendo catalisadas por enzimas, formando assim a via biossintética eumelanina, comum em leveduras patogênicas do gênero *Cryptococcus* (SMITH e CASADEVALL, 2019). A melanina DHN é uma forma preta-escura e utiliza como precursor a acetil-CoA ou malonil-CoA para oxidação da 1,8-DHN, resultando na formação da melanina DHN (SMITH e CASADEVALL, 2019; LIU *et al.* 2022), tipo de melanina encontrada no gênero *Fonsecaea*, segundo Coelho (2017).

Conforme mencionado anteriormente, a presença desta pigmentação confere aos fungos dematiáceos proteção contra os raios ultravioletas, resistência a temperaturas extremas, e sobrevivência em ambientes tóxicos, como aqueles poluídos por hidrocarbonetos (SATOW *et al.* 2008; VICENTE *et al.* 2008; MEGIOLARO, 2016). Grishkan e Nevo (2012) também mencionam que a pressão seletiva de fatores como radiação solar, altas e baixas temperaturas e umidade devem estar relacionadas à presença de melanina, conferindo vantagens ecológicas para a sobrevivência desses fungos em ambientes onde outras espécies geralmente não conseguem se desenvolver. Gunde-Cimerman e Plemenitaš (2007) demonstraram a relação entre o aumento da quantidade de sal e o aumento de melanina, comprovando assim a relação direta entre estes dois fatores, justificando a halotolerância desses fungos.

Os pigmentos responsáveis pela cor escura são encontrados na parte intracelular ou constituindo a própria parede, que é capaz de evitar a ação nociva de agentes químicos, físicos e biológicos. Em uma avaliação frente a isolados do gênero *Paracoccidioides*, EMIDIO *et al.* (2020) observaram uma relação diretamente proporcional entre o grau de melanina e o fator de virulência, ou seja, quanto mais melanina maior a patogenicidade dos isolados. No hospedeiro, a melanina promove mecanismos de sobrevivência para proteção da célula fúngica contra estresse oxidativo, apoptose, fagocitose. Também consegue neutralizar as substâncias químicas liberadas pelo sistema imunológico inato, inclusive em altas temperaturas, pois é estável ao calor, além de impedir a entrada de algumas drogas

antifúngicas sintéticas na célula, anulando seu efeito terapêutico (SMITH e CASADEVALL, 2019).

A capacidade de crescimento a 37°C ou acima, apresentada por várias espécies de dematiáceos, é igualmente considerada vantajosa em termos de oportunismo e patogenicidade, pois favorece sua adaptação as condições do hospedeiro como observado em *Exophiala dermatitidis* (BRUNKE *et al.* 2016; ZAJC *et al.* 2019). Assim, presença da melanina e termotolerância nas células fúngicas são fatores que podem indicar o grau de virulência das mesmas, contribuindo para o desenvolvimento de doenças nos hospedeiros, principalmente os endotérmicos.

2.2. Fungos dematiáceos e saúde pública

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) e Organização Pan Americana de Saúde/OMS (OPAS/OMS), patogenicidade é definida “quando o agente infeccioso é capaz de causar doença ao hospedeiro após a infecção”. Algumas espécies de fungos dematiáceos provocam doenças que influenciam negativamente a qualidade de vida e a capacidade funcional dos indivíduos acometidos. Dependendo da gravidade pode ocorrer amputação de membros do corpo como alternativa para o tratamento clínico. Muitas vezes, isso é consequência do estado avançado da doença resultado da procura tardia pelo serviço médico.

Como exemplo, pode-se mencionar a cromoblastomicose, doença cutânea crônica de evolução lenta, que provoca lesões nodulares, tumoral, verrucosas, cicatriciais e em placas no exame histopatológico, caracterizado pela presença de células muriformes (VICENTE *et al.* 2008; QUEIROZ-TELLES *et al.* Jan, 2017; WANG *et al.* 2019). Normalmente acomete agricultores, lenhadores e jardineiros, sendo causada por traumas mecânicos em contato com solo, plantas ou objetos que possuem agentes infecciosos como *Fonsecaea pedrosoi*, *F. monophora*, *Cladophialophora carrionii* e, eventualmente, a *Phialophora verrucosa*, *Rhinocladiella aquaspersa*, e *Exophiala dermatitidis* (QUEIROZ-TELLES *et al.* Nov,2017; WANG *et al.* 2019; BIENVENU e PICOT, 2020).

A OMS considera a cromoblastomicose uma doença tropical negligenciada, capaz de provocar impedimentos com consequências graves na saúde pública e no desenvolvimento socioeconômico, colaborando para o aumento do empobrecimento (QUEIROZ-TELLES *et al.* Nov,2017; BIENVENU e PICOT, 2020). Os agentes etiológicos desta doença são encontrados no mundo inteiro, com prevalência nas regiões tropicais e subtropicais e, segundo You Z *et al.* (2019) a maioria das cepas patogênicas foi relatada na América do Sul e no leste

da China. No Brasil, o estado do Maranhão é considerado uma região com hiperendemicidade. De Azevedo *et al.* (2015) isolaram uma linhagem originada de lesões no braço, rosto e cérebro de um homem acometido por cromoblastomicose que resultou na descrição de uma nova espécie: *Fonsecaea pugnacius*.

Os gêneros *Cladophialophora*, *Rhinocladiella*, *Curvularia*, *Verruconis*, *Exophiala* e *Veronaea* também são conhecidos agentes causadores de micoses que desenvolvem características manchas verrucosas negras, lesões no formato de nódulos císticos em tecidos superficiais ou profundos, infecções do sistema nervoso central, infecções disseminadas e infecções pulmonares (HE *et al.* 2022). Indivíduos com deficiência no CARD9 têm predisposição para feo-hifomicose, o que leva à infecção no sistema nervoso cerebral, como relataram Wang *et al.* (2019) que relataram um caso raro dessa infecção no cérebro, com o agente etiológico *E. dermatitidis*. Hospedeiros imunocompetentes também apresentam esta predisposição (REVANKAR e SUTTON, 2010; e MODY *et al.* 2022), bem como pacientes imunossuprimidos que realizaram transplantes renais e pulmonar (KLASINC *et al.* 2019; LATAWA *et al.* 2022; LIMA *et al.* 2022).

Existem, contudo, tratamentos conhecidos que buscam controlar agentes microbianos patogênicos, e dentre as drogas antifúngicas existentes, são classificadas como polienos (anfotericina B, nistatina); Benzofurano heterocíclico (griseofulvina); Azóis (Clotrimazol, Cetoconazol, Fluconazol, Itraconazol) e Alinamina (Terbinafrina). Estes agem na célula fúngica, na membrana plasmática, ou na parede celular; na divisão nuclear; na síntese do ergosterol (SILVA, 2010; PERLIN, RAUTEMAA-RICHARDSON e ALASTRUEY-IZQUIERDO, 2017).

Para o tratamento de micoses, é comum utilizar o Itraconazol como monoterapêutico, caso não apresente bons resultados, então é utilizado o voriconazol ou terbinafina. Outra possibilidade tem sido a terapia combinada de 2 antifúngicos como o Itraconazol e a terbinafrina, Itraconazol e 5-flucitosina, Itraconazol e posaconzol, e anfotericina B, que também apresentou bons resultados quando combinados. (REVANKAR e SUTTON, 2010; QUEIROZ-TELLES *et al.* Jan,2017; Wang *et al.* 2019; LIMA *et al.* 2022). O estudo de suscetibilidade *in vitro* desenvolvido por Usuda *et al.* (2021) corroborou com os resultados obtidos por Duarte *et al.* (2013), em que o Itraconazol apresentou o melhor resultado, quando comparado com outras drogas antifúngicas frente à espécie *E. dermatitidis*.

Em contrapartida, drogas antifúngicas possuem algumas desvantagens como o longo tempo de administração (pode durar até anos), aumentando o risco de descontinuidade do tratamento por parte do paciente, e o surgimento de efeitos adversos como pancreatite e

disfunções hormonais causando alopecia, ginecomastia, insuficiência adrenal. Também pode ocorrer interação medicamentosa e toxicidade em alguns casos, como a Anfotericina B que é um fármaco nefrotóxico e os azóis que causam toxicidade hepática (SILVA, 2010; BENÍTEZ e CARVER, 2019; RAKHSHAN *et al.* 2023). É igualmente preocupante o aumento da resistência às drogas antifúngicas devido às mutações genéticas, a adaptação em consequência do estresse celular, provocado pelo uso do próprio antifúngico, além do quadro atual de drogas antifúngicas disponível não apresentar ampla escolha para o tratamento terapêutico (PERLIN, RAUTEMAA-RICHARDSON e ALASTRUEY-IZQUIERDO, 2017).

Esse quadro se explica pela dificuldade em encontrar novos antifúngicos com alvos específicos, que interfiram somente no funcionamento da célula fúngica, sem causar danos às células humanas, já que ambos são eucariotos (AHMAD *et al.* 2021). Em geral, os tratamentos terapêuticos contra micoses têm demonstrado resultados satisfatórios apesar de morosos, porém é recomendável a busca por novas substâncias potencialmente mais eficientes, e principalmente que não estimulem a resistência microbiana. Uma alternativa está nos produtos naturais, com destaque para os óleos essenciais (OEs), que já demonstraram apresentar atividade antimicrobiana. Um único OE possui dezenas de compostos, que podem agir simultaneamente em vários alvos nas células microbianas, resultando na susceptibilidade fúngica.

2.3. Óleos essenciais

A procura por produtos naturais tem aumentado significativamente ao longo das últimas décadas, devido à pressão dos consumidores que buscam melhor saúde, bem-estar e qualidade de vida, conforme relatado pelo serviço brasileiro de apoio às micro e pequenas empresas (SEBRAE, 2023). Os óleos essenciais (OEs) possuem potencial terapêutico e econômico; no Brasil as espécies mais estudadas são: *Citrus limon* (L.) Burm.f.; *Eucalyptus citriodora* Hook; *E. urograndis*; *E. microcoris*; *Mentha arvensis* L.; *M. piperita* L.; *Cedrus atlantica* (Endl.) Manetti ex Carrière; *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor; *C. citratus* (DC.) Stapf; *Myrocarpus frondosus* Allemão; *Citrus sinensis* (L.) Osbeck; *C. bergamia* Risso; *Pelargonium graveolens* L'Hér (BUENO *et al.* 2021; BIESKI *et al.* 2022).

A nível mundial o Brasil tem um papel importante, pois encontra-se entre os 5 principais países exportadores de OEs, com destaque para o de laranja (BIZZO e REZENDE, 2022). Diante disso, alguns segmentos da indústria têm utilizado cada vez mais os OEs com propriedades antimicrobianas e antioxidantes como alternativa aos aditivos sintéticos na indústria de alimentos e bebidas, e aumentando também a vida de prateleira dos produtos

como relatou a pesquisa da Fortune Business Insights, 2021. Da mesma forma, foi constatado por Fontana *et al.* (2021) que avaliaram a atividade antifúngica dos OEs *Aloysia citriodora*, *C. winterianus*, *Lippia alba* e *Ocimum americanum*, e apresentaram potencial para controlar doenças pós colheita em morangos e pêssegos. Os OEs também são utilizados nas formulações da indústria cosmética, por possuírem características organolépticas, além de estar presentes nos produtos direcionados para acne, dermatite seborreica, envelhecimento cutâneo, saúde oral, higiene das mãos (RIBEIRO *et al.* 2022; SIMÕES, 2022).

A portaria nº 702, de 21 de março de 2018, do Ministério da Saúde diz que as práticas integrativas e complementares como a aromaterapia podem ser benéficas ao paciente e contribuir economicamente, pois o custo do OE em comparação a algumas drogas é relativamente baixo e consequentemente possui vantagens, colaborando assim com o Sistema Único de Saúde.

Segundo Cavaleiro (2007), os OEs apresentam variadas atividades biológicas com interações na fisiologia humana e animal, podendo ter atividade farmacodinâmica no sistema respiratório e digestivo, bem como ações analgésicas, anti-inflamatórias, anti-virais, dentre outras. Souza *et al.* (2021) descreveram que o OE de *Mentha piperita* apresenta funções hepatoprotetora, larvicida e anti-inflamatória. Dhakad *et al.* (2017) concluíram que o OE de eucalipto apresenta propriedades farmacológicas, como ação antidiabética e antioxidante, bem como antimicrobiana devido à presença de compostos como 1,8-cineol, α -pineno, β -pineno e limoneno. Os autores verificaram ainda as ações larvicida, analgésica e anti-inflamatória sendo utilizado em tratamentos respiratórios por causa de seu efeito mucolítico, conferido pela presença de 1,8-cineol. D-limoneno é o principal componente do OE extraído de frutas cítricas, como limão, lima e laranja, e possui ação antiarrítmica e bradicardia, como descreveram Nascimento *et al.* (2019).

A maioria dos OEs apresentam propriedades antimicrobianas; os mais conhecidos são tomilho (*Thymus vulgaris*), cravo-da-Índia (*Syzygium aromaticum*), alfavaca (*Lavandula* sp.) e segurelha (*Satureja* spp) (Cavaleiro, 2007). Atividade bactericida dos OEs de *Caryophyllus aromaticus* e *Rosmarinus officinalis* frente a linhagens de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella* spp. foi confirmada por Probst (2012).

Além da atividade antibacteriana, a ação fungicida dos OEs também tem sido explorada. Os mesmos apresentam potencial frente à resistência a medicamentos e infecções causadas por biofilme de *Candida* spp, conforme Khan e Ahmad (2012), que estudaram os OEs de *Cymbopogon citratus* e *Syzygium aromaticum* com resultados promissores de atividade anti-biofilme. Além disso, os autores sugeriram a exploração desses óleos como

novos produtos frente ao problema da resistência a medicamentos e infecções recorrentes. Os OEs de *Zingiber officinale*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Cymbopogon martinii* foram testados contra *Fusarium verticillioides*, sendo os melhores resultados obtidos para *C. zeylanicum* e *C. martinii*, que mostraram ação fungitóxica (CASTRO, 2020).

Diánez *et al.* (2018) realizaram uma triagem buscando atividade antifúngica a partir dos óleos *Citrus sinensis*, *Cupressus sempervirens*, *Eucalyptus globulus*, *Lavandula angustifolia*, *Mentha piperita*, *Pelargonium graveolens*, *Pogostemon patchouli*, *Rosmarinus officinalis*, *Santolina chamaecyparissus*, *S. aromaticum*, *Thymus mastichina* e *T. vulgaris*, frente a 8 fungos patogênicos de vegetais e cogumelos. Os resultados demonstraram que todos os óleos tiveram atividade inibitória, porém se destacaram o de cravo (*S. aromaticum*), hortelã-pimenta (*Mentha piperita*), patchouli (*P. patchouli*) e rosa gerânio (*P. graveolens*).

Nas plantas, os OEs podem ser armazenados nas flores, como é o caso da laranjeira, nas folhas como no capim-limão, nas cascas dos caules como ocorre na canela, rizomas (gengibre), raízes como no vetiver, nos frutos (anis-estrelado) e sementes como na noz-moscada. O método de extração mais adequado depende da localização na planta, podendo ser por enfloração, extração com solventes orgânicos, prensagem, extração por CO₂ supercrítico, arraste a vapor, ou pelo método clássico de hidrodestilação em aparelho do tipo Clevenger (SIMÕES, SPITZER, 2007). A farmacopeia brasileira (2019) descreve OEs como “obtidos de plantas, por processos físicos, que evaporam à temperatura ambiente sem deixar resíduo. São constituídos por misturas complexas de substâncias de baixa massa molecular, que determinam seu odor e sabor”.

A composição química dos OEs pode sofrer variações de acordo com a área geográfica, circunstâncias climáticas, período da colheita e método de extração, dentre outros. Portanto, os compostos podem apresentar variações em todo o mundo, mas não é impedimento para suas diversas aplicações. (AKSIT *et al.*, 2022; ASHOKKUMAR *et al.*, 2020; KAUR, BHARDWAJ, KAUR, 2021; TRINDADE *et al.* 2022).

OEs são produzidos a partir do metabolismo secundário vegetal, a partir do ácido chiquímico derivam os fenilpropanóides, e a partir do ácido mevalônico originam-se as unidades de isopreno (C₅H₈) que formam os terpenóides, classe predominante e mais diversa. Nesta encontram-se os compostos monoterpenos (C₁₀H₁₆), dentre estes o citral, geraniol, linalol, limoneno, timol, mentol e outros, e também os compostos sesquiterpenos (C₁₅H₂₄), como farnesol, β-cariofileno e outros. Esses compostos são os principais constituintes dos OEs e apresentam grande capacidade para diversas atividades terapêuticas (SIMÕES, SPITZER, 2007; LUDWICZUK¹, SKALICKA-WOŹNIAK e GEORGIEV, 2017; AHMAD

et al. 2021). Segundo Rashed *et al.* (2021), os monoterpenos presentes nas espécies *Lavandula* sp., *Salvia* sp., *Thymus* sp., *Citrus* sp. e *Cymbopogon* sp. apresentam propriedades antifúngicas, confirmando assim a importância dos terpenos nas ações farmacológicas. Recentemente, Ferreira *et al.* (2022) relataram que em OEs obtidos a partir de espécies da Amazônia foram identificados terpenos, monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides com potencial para novos produtos, como pesticidas naturais, antioxidantes, antimicrobianos e citotóxicos.

As famílias botânicas Poaceae, Myrtaceae e Lamiaceae estão descritas na literatura por apresentar atividade antifúngica e com isso seus OEs podem inibir o crescimento de fungos, como relatou Zimmermann *et al.* 2023. Em função disso, essas famílias são mencionadas a seguir.

2.3.1. Família Poaceae

O gênero *Cymbopogon* pertence à família Poaceae e apresenta características morfológicas e anatômicas típicas de gramíneas ou capins. Como exemplos temos a citronela e o capim-limão. Seus odores são conferidos pelos OEs produzidos, além de serem muito utilizados popularmente e nas indústrias tendo ampla aplicação como inseticidas, aromatizantes, cosméticos e outros (PROCHNOW, 2014).

A espécie *C. citratus* é conhecida como capim-limão, erva cidreira ou capim-santo, entre outros (SANTOS, 2021). Seu composto majoritário é o citral, que é uma mistura de 2 monoterpenos: os isômeros cis-citral (geranial) e trans-citral (neral), que apresentam as funções farmacológicas sedativa, anti-inflamatória, analgésica, antibacteriana e antifúngica. Seu OE também é utilizado em fragrâncias, aromas, perfumaria, cosméticos e detergentes (BOUKHATEM *et al.* 2014).

C. martinii, popularmente conhecida como Palmarosa, tem como composto majoritário o geraniol que apresenta propriedades antiviral, antibacteriana, antioxidante, anticâncer, antidepressivo e citotóxica (LYRA, 2019). Também provoca inibição do sistema de detecção de *quorum* em bactérias, segundo Önem (2022). Além disso, Castro *et al.* (2020) confirmaram sua eficiência contra o fungo *Fusarium verticillioides* e *Candida albicans* (LEITE *et al.* 2015).

A citronela é o nome popular da espécie *C. nardus*, e tem como compostos majoritários o citronelal e o geraniol. O OE de citronela tem várias aplicações como repelente (GIRAO, 2014), até mesmo para combater o *Aedes aegypti*, segundo Zulfikar; Aditama e

Sitepu (2019). Apresenta ainda ação antifúngica contra *C. albicans* (TRINDADE *et al.*, 2022), *F. verticillioides* e *Dreschlera maydis*, presentes no milho (KAUR *et al.* 2021).

2.3.2. Família Myrtaceae

Uma das espécies mais utilizadas para a extração e uso de óleo essencial chama-se *Melaleuca alternifolia*. Originária da Austrália, seu óleo é conhecido como o da “árvore do chá” e possui compostos como terpineno-4-ol, γ - e α -terpineno, α -terpineol e 1,8 cineol. Apresenta atividade antiviral, anti-inflamatória, antiprotozoária, antibacteriana e antifúngica (LUDWICZUK, SKALICKA-WOŹNIAK e GEORGIEV, 2017; BRUN *et al.* 2019)

S. aromaticum, conhecido como cravo-da-índia, é outro representante de importância comercial da família Myrtaceae. Apresenta os compostos majoritários β -cariofileno, α -humuleno e eugenol, cujas atividades antioxidante, inseticida, anti-inflamatória, analgésica, anestésica, antinociceptiva e anticancerígena (HARO-GONZÁLEZ *et al.*, 2021), além de antimicrobiana e antifúngica, têm sido muito valorizadas. Hiwandika, Sudrajat e Rahayu (2021) relataram que o extrato etanólico de cravo-da-índia foi capaz de inibir 11 bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e os fungos *Venturia inaequalis*, *Candida albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*.

2.3.3. Família Lamiaceae

Da família Lamiaceae destacam-se as espécies *Ocimum basilicum* e *O. gratissimum*, com odor característico e popularmente são conhecidos como manjerição e alfavacão, respectivamente. *O. basilicum* é utilizado na culinária e seu OE é constituído pelos compostos α -Pineno, β -Pineno, Metil chavicol, 1,8 cineol, Linalol, Geraniol, β -cariofileno e Eugenol. Possuem também atividades anticâncer, antimicrobiana, anti-inflamatória, inseticida, antipirética, antiartrítica. (SHAHRAJABIAN, SUN e CHENG, 2020; VASCONCELOS *et al.* 2021).

Além das atividades farmacológicas apresentada pelo *O. basilicum*, o *O. gratissimum* também possui as propriedades antioxidante, hepatoprotetora, antidiabéticas, anti-hipertensivas, antidiarreicas, e seu OE é composto por canfeno, β -cariofileno, α - e β -pineno, α -humuleno, sabineno, β -mirceno, limoneno, 1,8-cineol, trans- β -ocimeno, linalol, α - e δ -terpineol, eugenol, α -copaeno, β -elemeno, p-cimeno, timol e carvacrol. (UGBOGU *et al.* 2021).

De maneira geral, as principais características dos OE são a volatilidade e o odor agradável e intenso, sendo por este motivo também denominados de essência, apresentam

coloração incolor ou ligeiramente amarelados e são instáveis na presença de luz e calor. Quanto às características físico-químicas são lipofílicos, solúveis em solventes orgânicos apolares (SIMÕES e SPITZER, 2007).

O fato de serem lipofílicos contribui para sua interação com a parede celular, permitindo a passagem de seus componentes para o interior da célula fúngica. Segundo Konuk e Ergüden (2020), os monoterpenos timol e carvacrol causaram rompimento da membrana e extravasamento do conteúdo celular, e consequentemente a morte microbiana. Isso foi possível devido ao fato desses terpenóides possuírem a porção aromática hidrofóbica e o grupo fenólico –OH, que são essenciais para atividade antifúngica.

Perante a diversidade química presente nos OEs de plantas medicinais e aromáticas, bem como suas inúmeras aplicações, é justo dizer que estes são de grande importância econômica para a indústria cosmética no emprego em perfumes, fragrâncias e também como conservantes, na indústria de alimentos como condimentos e aromatizantes, na indústria farmacêutica devido às propriedades farmacológicas (SIMÕES e SPITZER, 2007), e também em saúde animal, como aditivos naturais em substituição a antibióticos utilizados na dieta de suínos, frangos e peixes como consta na patente de código: 1460_pescado com o título “desenvolvimento de ração à base de extratos naturais para o setor de piscicultura”.

Diante do exposto sobre as características apresentadas pelos fungos dematiáceos, o potencial fator de virulência de alguns isolados oportunistas para humanos, e frente às desvantagens dos tratamentos terapêuticos com antifúngicos sintéticos, os OEs surgem como uma opção promissora no controle desses microrganismos. Por suas comprovadas propriedades farmacológicas, dentre elas a antimicrobiana, é relevante a exploração de sua atividade antifúngica frente aos isolados selecionados para o presente estudo, bem como a identificação molecular dos mesmos a fim de comparação com os fungos dematiáceos já descritos na literatura.

Assim, este trabalho visa a bioprospecção de OEs quanto à atividade antifúngica frente a isolados de diferentes fungos dematiáceos, buscando oferecer uma alternativa eficiente aos indivíduos acometidos por esse grupo de fungos, e então contribuir para a sugestão de novos antifúngicos.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Avaliar a atividade antifúngica de óleos essenciais frente a isolados de fungos dematiáceos ambientais e clínicos.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar o efeito de 8 OEs selecionados sobre o crescimento radial de isolados de fungos dematiáceos;
- Determinar a concentração mínima inibitória e atividade fungicida dos OEs frente aos isolados estudados;
- Avaliar o crescimento dos isolados fúngicos a diferentes temperaturas;
- Realizar análise qualitativa dos óleos essenciais estudados;
- Confirmar a identificação morfológica dos isolados mediante sequenciamento e análise de distância filogenética.

4. Materiais e Métodos

4.1. Seleção dos isolados fúngicos

Os isolados fúngicos utilizados neste trabalho foram obtidos de ambientes associados à presença de hidrocarbonetos. Pertencem à coleção de pesquisa da Dra. Derlene Attili de Angelis, e se encontram preservados pelo método *Castellani* no Laboratório de Microbiologia Ambiental- Táxon, da UNESP - Campus de Rio Claro, SP. A atividade de acesso ao Patrimônio Genético Nacional foi cadastrada no SisGen sob o código: A50F329.

Partindo-se de 60 culturas fúngicas ambientais de micélio escuro, 15 isolados foram selecionados para a realização dos testes de atividade antimicrobiana frente aos OEs. Como critérios de seleção utilizou-se a confirmação da viabilidade e da pureza das mesmas, suas características microscópicas buscando a identificação genérica preliminar, e o crescimento na presença de 2,5% DMSO + 0,5% Tween 80, usados na solubilização dos óleos, e posteriormente incorporado no meio de cultura MA2%. Em todos os ensaios, o meio de cultura MA2% foi utilizado pois observou-se um crescimento ótimo das culturas nesse meio.

Dois isolados fúngicos cedidos pelo Laboratório de Investigação em Fungos – LIF, do Departamento de Patologia do Hospital das Clínicas, FCM/UNICAMP, foram utilizados para determinar o potencial de dois OEs de maior atividade e o monoterpeno Citral (marca Acros Organics). Os isolados clínicos foram *Fonsecaea* sp. (LIF 2337) e *Phialophora* sp. (LIF 2443), isolados de abscesso cerebral e lesão de pele humana, respectivamente.

4.1.1. Avaliação da viabilidade e pureza

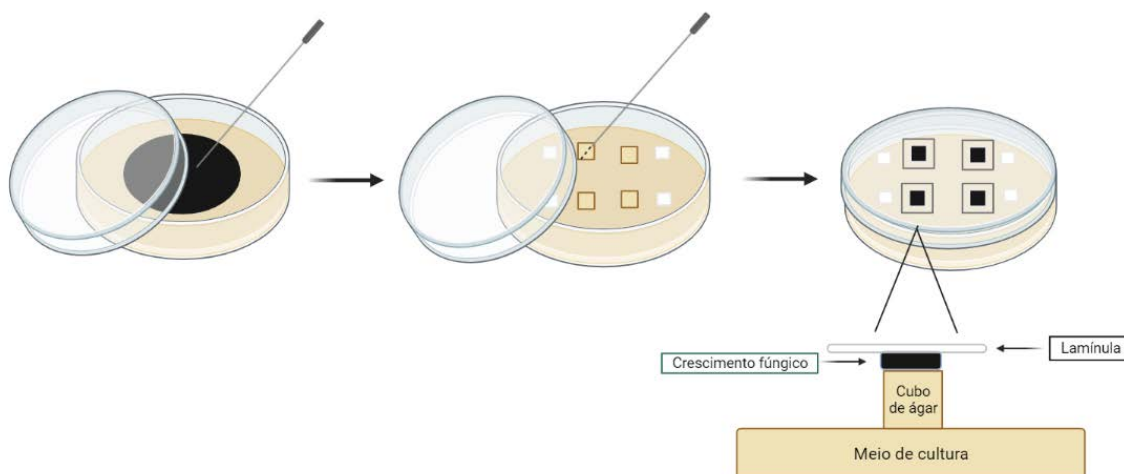
Para o ensaio de viabilidade e pureza dos isolados estudados foi utilizada a técnica de cultivo monospórico, a partir da cultura crescida em meio de cultura MA2%, incubada em câmara DBO a 28 °C por 10 dias. Após este período, uma alçada de micélio foi transferida para 1mL de água destilada esterilizada em um microtubo, e homogeneizada manualmente. Com o auxílio de uma micropipeta, aproximadamente 100 µL da solução inicial foram transferidos para a Câmara de Neubauer, onde ocorreu a contagem do número de células por cm³. O número ideal para esse teste é de até 5 UFC/mL; quando obtido um número acima desse, o inóculo foi diluído. Em seguida, foi realizado o espalhamento da suspensão final sobre a superfície do meio de cultura em placas de Petri, com auxílio de uma alça de Drigalsky. As placas foram incubadas em câmara de DBO a 28°C por até 10 dias (CROUS *et al.* 2019).

4.1.2. Caracterização macro e microscópica dos isolados

Após a confirmação da pureza e viabilidade do material, a caracterização macro e microscópica dos isolados foi realizada por meio de observação das estruturas obtidas em lâmina a fresco com glicerina. Esta técnica selecionou 30 isolados que apresentaram estruturas reprodutivas. Estes foram submetidos à técnica de microcultivo com o intuito de caracterizar morfológicamente os isolados na busca dos principais gêneros.

A técnica de microcultivo (de HOOG *et al.* 2000 adaptado) foi realizada em placa de Petri, com o auxílio de uma lâmina de bisturi esterilizada, com a qual obteve-se um cubo de ágar de 4 a 6 mm³, que foi disposto sobre o meio sólido. Sobre este cubo de ágar foi transferido um pequeno inóculo da colônia, com o auxílio de uma agulha de inoculação esterilizada. Após a inoculação, cobriu-se o cubo inoculado com uma lamínula esterilizada, conforme a Figura 1.

Figura 1: Técnica de microcultivo.



Fonte: Elaborado pela autora. Criado em BioRender.

Este procedimento foi realizado em quadruplicata. O conjunto foi incubado em câmara DBO a 28 °C durante o período de até 15 dias. As análises das características macroscópicas foram observadas sob estereomicroscópio binocular e para a microscopia utilizou-se glicerina. Nesta etapa, o objetivo foi visualizar as estruturas fúngicas férteis para identificação preliminar do gênero ou do grupo, e selecionar táxons diferentes.

4.1.3. Preservação dos isolados

A preservação dos isolados buscou garantir um estoque confiável do material, para a segurança da continuidade do estudo. Após a confirmação da viabilidade e da pureza das colônias, os isolados foram preservados pelo método de *Castellani* para constituir o acervo de trabalho (CASTELLANI, 1963). As culturas foram repicadas em placas de Petri com ágar MA2% e em seguida incubadas em câmara DBO a 28 °C por 10 dias. Após esse período de crescimento dos isolados foi realizado um corte em forma de cubo no ágar, com dimensões de aproximadamente 5 mm³, com auxílio de uma lâmina de bisturi esterilizada. Foram transferidos 10 cubos para frascos de rosca contendo 10 mL de água destilada esterilizada (Figura 2), em duplicata. Estes foram acondicionados em suportes plásticos e armazenados sob refrigeração à temperatura de 4-6 °C.

Figura 2: Preservação dos fungos pelo método de *Castellani*.



Fonte: Elaborado pela autora.

4.2. Óleos essenciais e emulsificantes

Dos OEs utilizados neste estudo, 6 foram obtidos comercialmente, e 2 foram cedidos pela Profa. Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte, da Divisão de Microbiologia (DMB), do CPQBA/UNICAMP, como consta na Tabela 1.

Tabela 1: Relação dos OEs utilizados.

Planta medicinal	Nome popular	Obtenção
<i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf	Capim limão	Comercial/BioEssência
<i>Cymbopogon martinii</i> (Roxb.) W.Watson	Palmarosa	DMB
<i>Cymbopogon nardus</i> (L.) Rendle	Citronela	Comercial/ Terra Flor
<i>Melaleuca alternifolia</i> (Maiden & Betche) Cheel	Melaleuca	Comercial/sem especificação da marca
<i>Ocimum basilicum</i> L.	Manjerição	Comercial/ BioEssência
<i>Ocimum gratissimum</i> L.	Alfavacão	DMB
<i>Syzygium aromaticum</i> (L.) Merr. & L.M.Perry	Cravo-da-índia	Comercial/ BioEssência
<i>Thymus vulgaris</i> L.	Tomilho	Comercial/ Terra Flor

4.2.1. Solubilização dos OEs

Com o intuito de padronizar a solubilização dos óleos, foram realizados três ensaios experimentais utilizando os OEs mencionados na Tabela 1 em água destilada, onde foram aplicadas as concentrações de Tween 80 e DMSO mencionadas abaixo (Tabela 2).

Tabela 2: Ensaios de solubilidade dos OEs.

	Primeiro Ensaio TWEEN 80	Segundo Ensaio DMSO	Terceiro Ensaio DMSO + Tween 80
Concentrações	0,1%	0,1%	
	0,5%	0,5%	
	1%	1%	2% DMSO + 0,5% Tween 80
	2%	2%	
	2,5%	2,5%	2,5% DMSO + 0,5% Tween 80
	3%	3%	
	4%	4%	
	5%	5%	

4.2.2. Avaliação da Interferência do DMSO e Tween 80

A interferência do DMSO e Tween 80 no crescimento micelial dos 60 isolados foi avaliada por meio de dois ensaios, um contendo 5% DMSO e o segundo com uma concentração reduzida de 2,5% DMSO acrescida de 0,5% Tween 80, incorporados no meio de cultura MA2%. Em placas de Petri foram inoculados discos de 0,5 cm de diâmetro de cada fungo, seguido de incubação em câmara DBO a 28 °C por 10 dias. Controles positivos, sem adição de DMSO e Tween 80 foram incluídos para comparação. O critério de avaliação foi com base no crescimento dos isolados. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

4.3. Triagem da atividade antifúngica

4.3.1. Efeito inibitório dos OEs sobre o crescimento micelial

A determinação do efeito inibitório dos OEs foi realizada pelo método de diluição em ágar, com determinação da concentração inibitória mínima (CIM). Cada OE foi diluído nas concentrações de 0,25 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,75 mg/mL, 1,0 mg/mL e 1,25 mg/mL, solubilizados em 2,5% DMSO + 0,5% Tween 80 e incorporados no meio MA2%. Placas de Petri de 5,0 cm de diâmetro contendo o meio sólido foram inoculadas com os 15 isolados selecionados, com auxílio de canudos plásticos, e discos de 0,5 cm a partir do crescimento fúngico em MA2%. Nos controles negativos, os OEs foram substituídos por água destilada esterilizada. Os experimentos foram realizados em duplicata e as placas incubadas em câmara DBO a 28 °C por 10 dias. Após este período, o crescimento radial foi observado sob estereomicroscópio binocular e mensurados os diâmetros das colônias com auxílio de uma régua milimetrada, de acordo com a Figura 3. A porcentagem de inibição do crescimento micelial foi calculada a partir da fórmula:

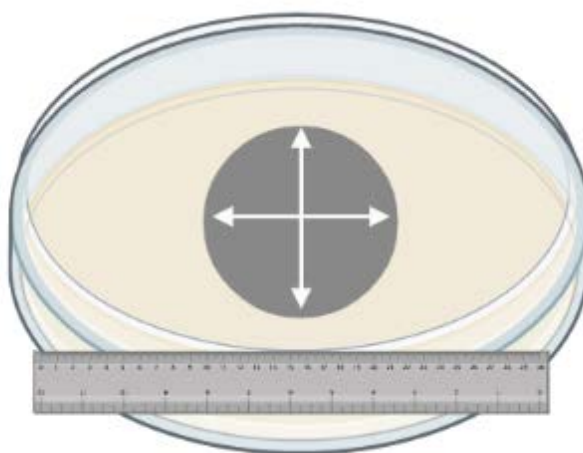
$$\text{Porcentagem de inibição (\%)} = \left(\frac{D_c - D_t}{D_c} \right) \cdot 100$$

Onde:

D_c: diâmetro de crescimento na placa controle;

D_t: diâmetro de crescimento na placa com os tratamentos (BALOUIRI, SADIKI, e IBNSOUDA, 2016).

Figura 3: Medição do crescimento micelial.



Fonte: Elaborado pela autora. Criado em BioRender.

Outra análise da CIM foi realizada com os dois isolados clínicos de fungos dematiáceos (*Fonsecaea* sp. (LIF 2337) e *Phialophora* sp. (LIF 2443), utilizando os óleos de *C. citratus* e de *S. aromaticum*, e o monoterpreno Citral (marca Acros Organics).

4.3.2. Determinação do efeito fungicida

A Concentração Fungicida Mínima (CFM) foi aplicada nas duas menores concentrações dos OEs onde não foi observado crescimento micelial. Então, a partir destas duas menores concentrações foram retirados os discos inoculados nos ensaios de determinação da MIC, que em seguida foram transferidos para outra placa de Petri (5,0 cm de diâmetro), contendo o meio de cultura MA2% + 2,5% DMSO + 0,5% Tween 80. As placas foram incubadas em câmara DBO a 28 °C por até 30 dias, e o crescimento radical micelial observado por até 10 dias, sendo considerada somente a ausência ou a presença de crescimento. O ensaio foi realizado em duplicata.

4.4. Determinação da composição química dos OEs por CG-EM

A análise cromatográfica dos OEs foi realizada por Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrômetro de Massas – CG-EM, na Divisão de Química Orgânica e Farmacêutica do CPQBA/UNICAMP. A identificação dos constituintes dos OEs foi realizada em cromatógrafo a gás Hewlett-Packard 6890, equipado com detector seletivo de massas Hewlett-Packard 5975, injetor *split/splitless*, utilizando-se uma coluna capilar HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). Temperaturas: injetor = 220 °C, detector = 250 °C, coluna = 60 °C, 3

°C.min⁻¹, 240 °C. Vazão do gás de arraste (He super seco) = 1,0 mL.min⁻¹. A identificação foi realizada através do cálculo dos índices de retenção dos analitos (utilizando-se a co-injeção de uma mistura de padrões de hidrocarbonetos C8-C24), comparação com a biblioteca eletrônica do equipamento (NIST-11) e com os dados da literatura (ADAMS, 2007).

4.5. Caracterização molecular dos isolados fúngicos

4.5.1. Extração do DNA

Para a extração de DNA dos isolados de fungos dematiáceos foi utilizado o protocolo proposto por Aamir *et al.* (2015), com modificações. Os isolados foram cultivados em placas de Petri no meio MA2%, e incubados em câmara DBO a 28 °C por 10 dias. Os inóculos foram transferidos para microtubos de 2,0 mL, contendo 900 µL da solução de lise e esferas de vidro para auxiliar na quebra da parede celular. Em seguida, foram agitados em vórtex por 2 min e mantidos em banho-maria a 65 °C por 20 min. Após, foram agitados em vórtex por 2 min e centrifugados a 13.200 rpm por 10 min a 4 °C, sendo os sobrenadantes transferidos para novo microtubo de 2,0 mL e adicionado 800 µL de fenol, com homogeneização em vórtex. O microtubo foi novamente centrifugado a 13.200 rpm por 5 min a 4 °C. A transferência do sobrenadante foi novamente feita para um novo microtubo de 2,0 mL, adicionou-se 400 µL de fenol e 400 µL de clorofórmio, sendo o conteúdo homogeneizado e centrifugado, como na etapa anterior. Ao sobrenadante desta etapa foi realizado o mesmo procedimento da etapa anterior, porém foram adicionados 800 µL de clorofórmio. O sobrenadante foi transferido para um microtubo de 1,5 mL e adicionado de 600 µL de isopropanol. Após homogeneização manual, o microtubo foi incubado em freezer a -20 °C por 20 min. Em seguida, o material foi centrifugado a 13.200 rpm por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado, e ao resíduo foi adicionado 100 µL de etanol 70%, sendo o tubo invertido algumas vezes, centrifugado a 13.200 rpm por 2 min a 4 °C e o sobrenadante novamente descartado. O *pellet* foi seco à temperatura ambiente, e depois ressuspensionado em água reagente para biologia molecular. Na etapa que se seguiu foi adicionado 1 µL RNase (10 mg/mL), e o material incubado a 37 °C durante 1 h. Após isso, o DNA foi estocado em freezer a -20 °C. A concentração do DNA foi estimada de acordo com o padrão lambda (50 ng), mediante eletroforese em gel de agarose 1% corada com SYBR Safe, e posteriormente visualizada no fotodocumentador sob luz UV.

4.5.2. PCR e purificação dos produtos de PCR

A reação de PCR (Polymerase Chain Reaction) visou amplificar os fragmentos da região ITS, utilizando-se os primers ITS1 e ITS4, sugeridos para a identificação fúngica inicial, conforme a Tabela 3.

Tabela 3: Reação de PCR: relação dos reagentes e suas concentrações finais.

Reagentes	Concentração da Solução Estoque	Concentração final por reação	Volume por reação (µL)
H ₂ O reagente de biologia molecular autoclavada	--	--	15,35
Solução tampão da <i>Taq</i>	10 X	1 X	2,5
Solução de MgCl ₂	50 mM	1,5 mM	0,75
Primer ITS1	20 µM	0,4 µM	0,5
Primer ITS4	20 µM	0,4 µM	0,5
dNTP's	25 mM	200 µM	0,2
<i>Taq</i> DNA-polimerase	5 U/µL	1 U	0,2
DNA genômico	--	5-25 ng	5,0
Volume total	--	--	25,0

A amplificação foi realizada em um termociclador Eppendorf Mastercycler, com o seguinte programa: 95 °C por 2 min, 30 ciclos a 94 °C por 1 min, 55 °C por 1 min e 72 °C por 3 min, e 1 ciclo de extensão final a 72 °C por 3 min, 4°- ∞. (WHITE *et al.* 1990; BELGINI *et al.* 2014).

Os produtos da PCR foram avaliados em eletroforese com gel de agarose corado com SYBR Safe e visualizados em fotodocumentador. Para purificação e limpeza do DNA foi utilizado o kit GFX™ PCR DNA e Gel Band Purification (GEHealth Care).

4.5.3. Sequenciamento do produto de PCR purificado

Na reação de sequenciamento foi utilizada uma placa com 96 poços, compatível com o sequenciador ABI3500 XL (Applied Biosystems). A quantidade de DNA foi avaliada de acordo com o tamanho do fragmento do produto da PCR purificada de cada amostra. O mix (mistura) foi preparado para a reação de sequenciamento com os reagentes de acordo com a Tabela 4, sendo os mesmos *primers* utilizados na reação de sequenciamento, porém com concentrações diferentes.

Tabela 4: Reação de sequenciamento: relação dos reagentes e o volume por reação.

Reagentes	Volume por reação (µL)
Tampão save money	2,0
Primer (5 µM)	0,5
Big DYE (Life Technologies)	0,5
DNA (10-20 ng/µL)	0,5 - 2
Água MilliQ	5,0
Volume total	10,0

Após o preparo da reação de sequenciamento, foi distribuído o mix e o DNA correspondente em cada poço da microplaca, que foi colocada no termociclador com o programa seqABI, de acordo com a Tabela 5. Após o término da ciclagem, foi realizada a precipitação da microplaca e então colocada no sequenciador ABI3500 XL.

Tabela 5: Programa da reação do sequenciamento.

	1 ciclo	96°C / 1min
Ciclos	Ciclos (30X)	96°C / 15 seg
		50°C / 15 seg
		60°C / 4 min
		4°C

Para análise de distância genética foi utilizado o software BioEdit versão 7.0.9.0, para editar e alinhar as sequências. Em seguida a sequência consenso foi alinhada utilizando a ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool (Blast)* em National Center for Biotechnology Information-Gen Bank (NCBI-GenBank), para pesquisa de similaridade.

4.6. Teste de crescimento a diferentes temperaturas

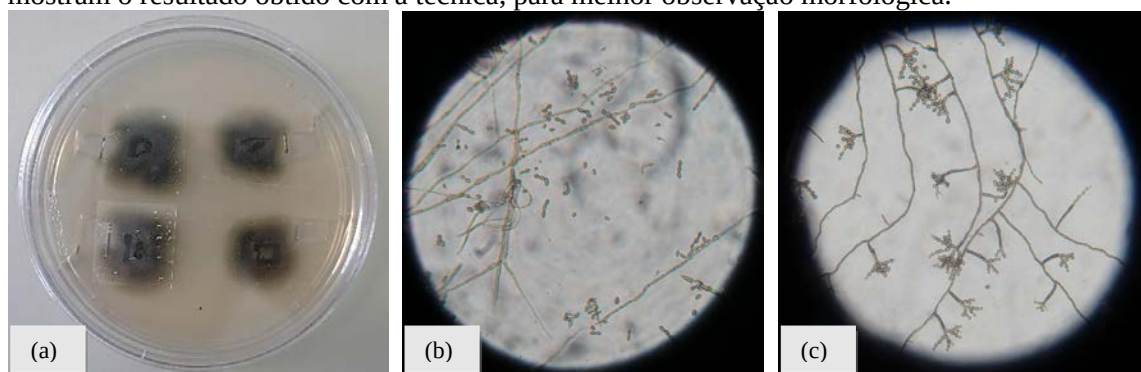
O teste de temperatura foi realizado com os 15 isolados selecionados previamente. A partir do crescimento fúngico em MA2%, discos de 0,2 cm foram inoculados centralmente em placa de Petri contendo o meio de cultura MA2%, em duplicata. Os mesmos foram incubados nas temperaturas de 28 °C, 30 °C, 33 °C, 37 °C e 40 °C por 30 dias. Após este período, foi observado o crescimento radical micelial, considerando somente a ausência ou presença de crescimento (de HOOG *et al.* 2011; DUARTE, 2013).

5. Resultados e Discussão

5.1. Identificação morfológica preliminar e seleção dos isolados fúngicos

Como mencionado no item 4.1.2., a técnica de microcultivo foi utilizada para a etapa de identificação morfológica preliminar e seleção dos isolados. A Figura 4 mostra o crescimento dos isolados sobre os blocos de ágar, conforme orienta a técnica e observação da morfologia microscópica. Na Tabela 6 encontra-se a lista dos isolados selecionados para os ensaios.

Figura 4: (a) Técnica de microcultivo realizada para a identificação preliminar; (b) e (c) as imagens mostram o resultado obtido com a técnica, para melhor observação morfológica.



Fonte: elaborada pela autora (2020).

Tabela 6: Relação dos 15 isolados selecionados para os ensaios de atividade antifúngica com os OEs.

Isolados	Identificação preliminar
LMA 436	<i>Cladosporium</i> sp.
LMA 484	<i>Curvularia</i> sp.
LMA 836	<i>Exophiala</i> sp.
LMA 969	<i>Cladophialophora</i> sp.
LMA 986	<i>Phialophora</i> sp.
LMA 1005	<i>Cladosporium</i> sp.
LMA 1007	<i>Cladophialophora</i> sp.
LMA 1059	<i>Penidiella</i> sp.
LMA 1074	<i>Cladosporium</i> sp.
LMA 1082	<i>Penidiella</i> sp.
LMA 1091	<i>Cladophialophora</i> sp.
LMA 1105	<i>Exophiala</i> sp.
LMA 1129	<i>Cladosporium</i> sp.
PB 03	<i>Cladosporium</i> sp.
PB 04	<i>Phialophora</i> sp.

Vivenciamos um momento onde os avanços tecnológicos criam interface com inúmeras áreas. Assim, hoje temos uma taxonomia muito mais dinâmica, sujeita a atualizações constantes (conforme novas informações tornam-se disponíveis), e com impacto direto em mudanças na classificação, nomenclatura, critérios de identificação e reconhecimento de novas espécies (ATTILI-ANGELIS *et al.* 2022). Características morfológicas são relevantes quando desejamos identificar o grupo ao qual o fungo pertence e muitas vezes seu gênero, de forma preliminar. Contudo, informações mais específicas sobre sua identidade acabam pedindo análises moleculares, onde respostas mais confiáveis podem ser encontradas. Outra limitação que as técnicas como sequenciamento do DNA conseguem resolver é a falta de estruturas reprodutivas, muito comum quando as culturas fúngicas são repicadas em condições artificiais.

A identificação morfológica de fungos depende em grande parte da observação e reconhecimento de células reprodutivas já descritas na literatura (de HOOG *et al.* 2020). A presença unicamente de micélio estéril dificulta uma análise mesmo que preliminar, a não ser pelo fato de podermos observar se as hifas são hialinas ou dematiáceas, e septadas ou cenocíticas. Mesmo as análises moleculares podem não revelar a espécie do microrganismo de forma imediata. Sabemos que o sequenciamento da região ITS, por exemplo, considerada a base para identificar fungos filamentosos não apresenta resolução para muitas espécies.

Assim como relatado na literatura, em nosso experimento também foi possível observar que, compreendendo suas limitações, a análise morfológica foi importante na escolha dos isolados a serem utilizados nesse estudo. A microscopia realizada com a técnica de microcultivo permitiu separar as linhagens esporulantes das estéreis, que foi usada como um dos critérios. Das que apresentavam estruturas reprodutivas, buscou-se selecionar as morfolologicamente diferentes, com a intenção de incluir no estudo uma maior diversidade de espécies. Entretanto, como mostra a Tabela 6, todas as identificações se limitaram ao nível genérico, não sendo possível, apenas com a morfologia, definir alguma espécie.

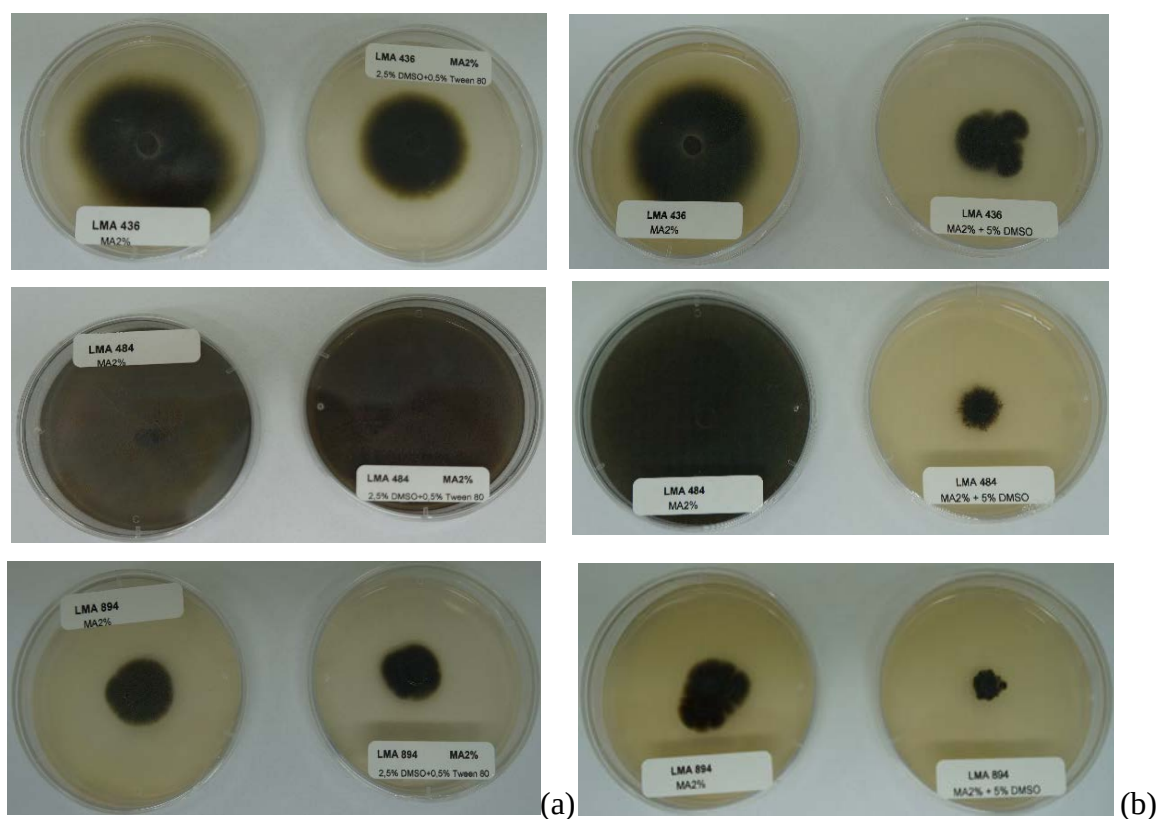
5.2. Solubilização dos OEs

Os resultados mostraram que a solubilização dos óleos mais satisfatória ocorreu na combinação de 2,5% DMSO + 0,5% Tween 80, porque houve a redução da tensão superficial do OE (substância apolar) na água destilada (substância polar), com concentrações homogêneas do óleo no ágar, permitindo assim a completa solubilização todos os OEs utilizados neste estudo. A solubilidade dos OEs foi um fator primordial para garantir a confiabilidade dos resultados de atividade antifúngica.

5.3. Interferência dos emulsificantes

Foi analisada a interferência do DMSO e/ou Tween 80 no crescimento dos 60 isolados fúngicos, sendo que 95% destes não houve interferência no crescimento, na concentração de 2,5% de DMSO + 0,5% de Tween 80, somente 3 isolados não cresceram nessas condições (Figura 5-a). Assim, a mistura acima mencionada foi determinada para a solubilizar os OEs nos ensaios de CIM. Enquanto que, a concentração de 5,0% de DMSO, apresentou interferência no crescimento fúngico em 44 dos 60 isolados, tornando inviável utilizar essa condição (Figura 5-b).

Figura 5: Análise da interferência do DMSO e do Tween 80 no crescimento dos fungos dematiáceos: (a) 2,5% de DMSO + 0,5% Tween 80; (b) 5% DMSO.



Fonte: elaborada pela autora (2023).

Apesar do DMSO não ter registros de interferência tóxica sobre o crescimento microbiano, sendo inclusive indicado como solvente, nosso estudo revelou que as colônias dos fungos dematiáceos estudados cresceram de forma restrita na concentração de 5%.

5.4. Atividade inibitória e fungicida dos OEs

5.4.1. Concentração Inibitória Mínima dos OEs sobre os isolados de fungos dematiáceos

A determinação da CIM empregou a técnica de diluição em ágar, com concentração dos óleos entre 0,25 e 1,25mg/mL, e o controle positivo ausente de OE, sendo a metodologia validada pelo controle de crescimento fúngico com presença ou ausência de crescimento.

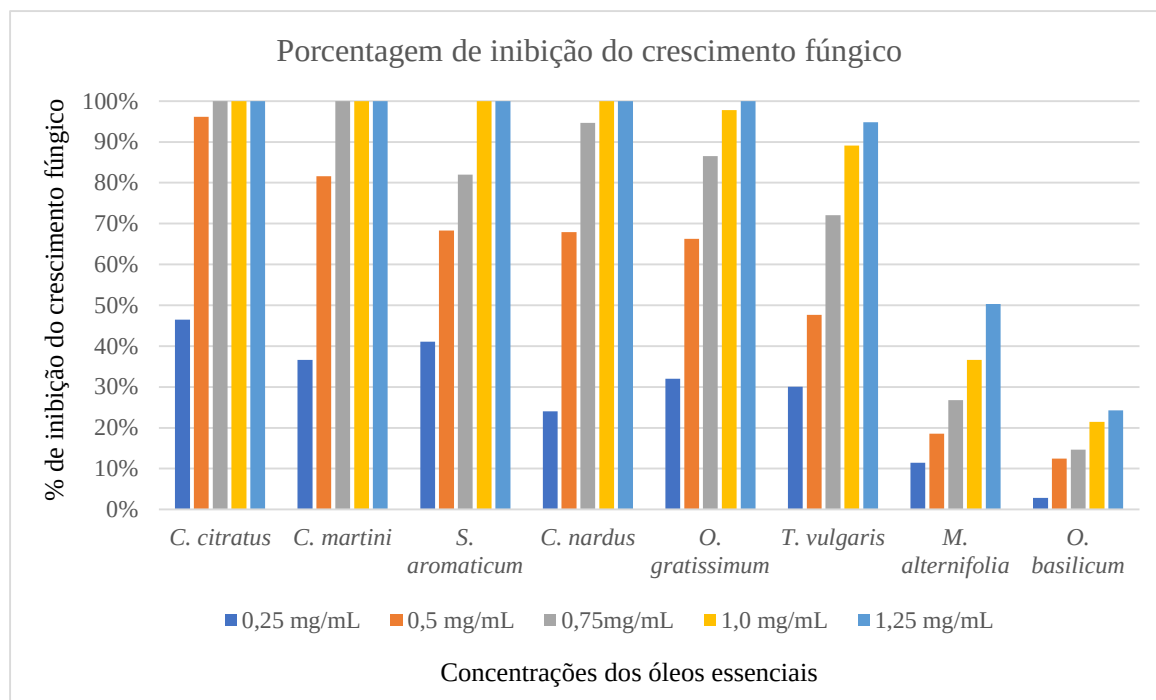
De acordo com resultados obtidos foi observado inibição dos fungos pelos OEs *C. citratus*, *C. martinii*, *C. nardus*, *O. gratissimum*, *S. aromaticum* e *T. vulgaris*, exceto para os *M. alternifolia* e *O. basilicum* (Tabela 7 e Figura 6). Para os OEs de *C. citratus* e *C. martinii* a CIM foi de 0,75 mg/mL, inibindo o crescimento de 100% dos isolados fúngicos, mostrando um amplo espectro da ação destes óleos. No caso de *S. aromaticum* e *C. nardus* a inibição total foi observada na concentração de 1,0 mg/mL, enquanto que para o óleo de *T. vulgaris* a inibição foi nas duas maiores concentrações avaliadas (1,00 e 1,25 mg/mL), porém não para todos os isolados. No teste com o OE de *O. gratissimum* a CIM aconteceu a 1,25 mg/mL, com a inibição de todos isolados fúngicos. O resultado desses 4 OEs demonstra uma eficiência de moderado a baixo espectro de ação com CIM nas concentrações de 1,00 e 1,25 mg/mL. Finalmente, os óleos de *O. basilicum* e *M. alternifolia* e não inibiram o crescimento de nenhum dos isolados fúngicos em todas as concentrações testadas.

Tabela 7: Efeito inibitório (CIM mg.mL⁻¹) dos OEs frente aos 15 isolados de fungos dematiáceos.

Isolados fúngicos	CIM (mg.mL ⁻¹)							
	<i>C. citratus</i>	<i>C. martinii</i>	<i>C. nardus</i>	<i>S. aromaticum</i>	<i>O. gratissimum</i>	<i>T. vulgaris</i>	<i>M. alternifolia</i>	<i>O. basilicum</i>
LMA 436	0,5	0,5	0,75	1,0	0,75	1,0	*	*
LMA 484	0,75	0,75	0,75	1,0	1,0	*	*	*
LMA 836	0,5	0,75	0,75	1,0	1,25	*	*	*
LMA 969	0,5	0,5	0,5	1,0	0,5	1,0	*	*
LMA 986	0,5	0,75	1,0	0,75	1,0	*	*	*
LMA 1005	0,5	0,75	0,75	0,75	0,75	1,25	*	*
LMA 1007	0,5	0,75	1,0	1,0	0,75	1,0	*	*
LMA 1059	0,5	0,5	0,75	1,0	0,5	0,75	*	*
LMA 1074	0,5	0,75	0,75	1,0	0,75	1,0	*	*
LMA 1082	0,5	0,5	0,5	1,0	0,5	0,5	*	*
LMA 1091	0,5	0,5	0,5	0,75	0,75	0,75	*	*
LMA 1105	0,5	0,5	0,75	0,75	0,75	0,75	*	*
LMA 1129	0,5	0,75	0,75	1,0	1,0	1,0	*	*
PB 03	0,5	< 0,25	0,75	0,75	0,75	0,75	*	*
PB 04	0,5	0,75	1,0	0,75	0,75	1,0	*	*

< 0,25 = crescimento não detectado nesta concentração. * = > 1,25, inibição não detectada na concentração máxima avaliada.

Figura 6: Porcentagem inibitória dos OEs frente aos 15 isolados de fungos dematiáceos



Sharma *et al.* (2017), avaliaram a atividade antifúngica dos OEs de *S. aromaticum*, *C. citratus*, menta (*Mentha × piperita*) e eucalipto (*Eucalyptus globulus*) frente à linhagem de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* 1322, e observaram efeito inibitório de todos os óleos nas concentrações testadas, com destaque para o OE de *S. aromaticum* a 125 ppm (0,125mg/mL) que apresentou 100% de inibição. O mesmo foi observado para os OEs de *C. citratus* e menta nas concentrações de 250 e 500 ppm (0,25 mg/mL e 0,50 mg/mL), respectivamente. Em relação à ação fungicida, o OE de *S. aromaticum* apresentou melhor resultado, seguido do OE de *C. citratus*, ao contrário do encontrado neste trabalho. Isso pode ser devido a diferentes fatores. Um deles seria em razão dos grupos de fungos estudados: dematiáceos neste caso e *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* no estudo acima citado. Outras interferências poderiam ser em função das características das linhagens em si, e/ou da marca ou origem dos óleos utilizados em cada trabalho.

A atividade inibitória alcançada neste trabalho com o OE de *C. martinii* também foi obtida por Xavier, França e Cardoso (2020) que mostraram inibição total a partir da concentração de 0,05% (0,5 mg/mL) dos táxons *M. phaseolina*, *S. rolfsii* e *Phomopsis* sp. e 0,1% (1 mg/mL) para *F. solani*.

Os OEs de *O. basilicum* e *M. alternifolia* não demonstraram inibição em nenhuma concentração testada, pois todos os isolados apresentaram crescimento micelial. No entanto, a

atividade antifúngica destes óleos foi descrita anteriormente, como no trabalho de Michalczyk e Ostrowska (2021), que avaliaram a concentração de 10 µg/µL (0,01mg/mL) para 14 OEs comerciais, incluindo os óleos de *O. basilicum* e *M. alternifolia*, frente a *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum gypseum*, *Microsporum canis*, *Trichophyton violaceum*, *Scopulariopsis brevicaulis*, *Aspergillus niger* e uma linhagem da própria pele canina (IZ 1). Os OEs de *O. basilicum* e *M. alternifolia* apresentaram de 71% a 100% de inibição dos isolados, exceto *A. niger* cujo efeito foi em torno de 45% para ambos os óleos. Dessa forma, demonstraram o elevado efeito inibitório destes óleos, e sua atividade antifúngica, diferente do observado nesse trabalho, com a hipótese que o composto químico terpinen-4-ol não é o majoritário na composição química do OE *M. alternifolia* e isso interferiu na atividade antifúngica.

5.4.2. CFM dos OEs sobre os isolados de fungos dematiáceos

A concentração fungicida mínima (CFM) foi determinada com base nos cultivos montados para as análises da CIM, isto é, reinoculando os blocos de ágar das placas sem crescimento inicial. Os resultados da CFM encontram-se na Tabela 8, e indicam que todos os OEs testados apresentaram atividade fungistática, parcial ou total. Destaca-se, contudo, a atividade fungicida nos OEs de *C. citratus* com CFM de 0,75mg/mL (46% dos isolados) e *S. aromaticum* com CFM de 0,75mg/mL a 1,25mg/mL (40% dos isolados), seguido do OE *C. martinii* com CFM de 1,0 mg/mL somente para o isolado LMA 484.

Tabela 8: Resultado de CFM dos OEs frente aos isolados de fungos dematiáceos.

Isolados fúngicos	CFM (mg.mL ⁻¹)							
	<i>C. citratus</i>	<i>C. martinii</i>	<i>C.nardus</i>	<i>S. aromaticum</i>	<i>O. gratissimum</i>	<i>T. vulgaris</i>	<i>M. alternifolia</i>	<i>O. basilicum</i>
LMA 436	0,75	#	#	#	#	#	*	*
LMA 484	0,75	1,0	#	#	#	*	*	*
LMA 836	#	#	#	#	#	*	*	*
LMA 969	0,75	#	#	1,25	#	#	*	*
LMA 986	#	#	#	#	#	*	*	*
LMA 1005	#	#	#	1,0	#	#	*	*
LMA 1007	0,75	#	#	#	#	#	*	*
LMA 1059	0,75	#	#	1,25	#	#	*	*
LMA 1074	#	#	#	1,25	#	#	*	*
LMA 1082	#	#	#	1,25	#	#	*	*
LMA 1091	#	#	#	#	#	#	*	*
LMA 1105	#	#	#	#	#	#	*	*
LMA 1129	0,75	#	#	#	#	#	*	*
PB 03	0,75	#	#	0,75	#	#	*	*
PB 04	#	#	#	#	#	#	*	*

Óleo essencial não apresentou ação fungicida; * Não foi realizada CFM porque a CIM foi > 1,25 mg.mL⁻¹.

Os OEs de *C. citratus* e *S. aromaticum* por apresentarem maior atividade fungicida, foram selecionados para os ensaios de CIM e CFM frente aos 2 isolados clínicos. O monoterpeno citral (Acros Organics) também foi utilizado por ser o composto majoritário do óleo de *C. citratus*, de acordo com a análise química dos compostos realizada neste estudo.

5.4.3. CIM dos OEs sobre os isolados clínicos de fungos dematiáceos

Os resultados de atividade antifúngica para os isolados clínicos demonstraram a inibição do crescimento de *Fonsecaea* sp. pelo monoterpeno Citral e pelo OE de *C. citratus*, com CIM de 0,5 mg/mL e 0,75 mg/mL, respectivamente (Tabela 9).

Tabela 9: Efeito inibitório dos OEs de *C. citratus* e *S. aromaticum* e do monoterpeno Citral frente aos 2 isolados clínicos fúngicos.

Isolados fúngicos clínicos	CIM (mg.mL ⁻¹)		
	<i>C. citratus</i>	Citral	<i>S. aromaticum</i>
<i>Fonsecaea</i> sp. LIF 2337	0,75	0,5	1,0
<i>Phialophora</i> sp. LIF 2443	1,0	1,0	*

* = > 1,25 mg.mL⁻¹ inibição não detectada na concentração máxima avaliada.

O monoterpeno Citral também apresentou atividade antifúngica segundo Caldas *et al.* (2016), que avaliaram a ação do monoterpeno Citral frente a 2 cepas de *Cladosporium oxysporum* e 2 cepas de *Cladosporium sphaerospermum*, com resultados da MIC de 128 e 256 µg/mL (0,128 e 0,256 mg/mL). Os autores concluíram que o citral apresenta um forte efeito antifúngico e promissor frente as cepas de *C. oxysporum* e *C. sphaerospermum*, que são espécies causadoras das doenças feohifomicose e cromoblastomicose. Ainda no estudo citado foi avaliada a atividade dos antifúngicos padrões, voriconazol e anfotericina B, e o resultado foi a ausência de inibição frente à cepa *C. oxysporum* URM 6056, demonstrando resistência a maior concentração, com MIC de >1024 µg/mL (1,024 mg/mL). Esse resultado confirma a baixa ação dos antifúngicos sintéticos por não apresentarem o resultado clínico esperado e a busca constante por novos antifúngicos.

5.4.4. CFM dos OEs sobre os isolados clínicos de fungos dematiáceos

Os resultados de CFM frente aos 2 isolados clínicos estão representados na Tabela 10. Os óleos e o monoterpeno Citral demonstraram atividade fungistática frente ao isolado *Fonsecaea* sp. LIF 2337. Sobre o isolado *Phialophora* sp. LIF 2443 observou-se uma

atividade fungicida sendo que o Citral e o OE de *C. citratus* foram inibitórios a 1,0 mg/mL e 1,25 mg/mL, respectivamente.

Tabela 10: Resultado da CFM frente aos 2 isolados clínicos de fungos dematiáceos.

Isolados fúngicos clínicos	CFM (mg.mL ⁻¹)		
	<i>C. citratus</i>	Citral	<i>S. aromaticum</i>
<i>Fonsecaea</i> sp. LIF 2337	#	#	#
<i>Phialophora</i> sp. LIF 2443	1,25	1,0	*

Óleo essencial não apresentou ação fungicida; * Não foi realizada CFM porque a CIM foi > 1,25 mg.mL⁻¹.

Os antifúngicos sintéticos como equinocandinas e azóis, dentre eles o itraconazol e fluconazol, são considerados de atividade fungistática devido à resistência observada de vários fungos como *Trichophyton mentagrophytes* e *Candida glabrata* dentre outros (GUPTA e VENKATARAMAN, 2022). Geralmente, itraconazol é o medicamento de escolha para o tratamento da cromoblastomicose, mas segundo Hellwig *et al.* (2019) esse antifúngico não apresentou 100% de eficiência nos tratamentos *in vivo*. Isso pode ser porque enquanto os testes *in vitro* são realizados com esporos, *in vivo* o fungo apresenta células muriformes as quais aumentam os níveis de citocinas inflamatórias. Além disso, o mesmo gênero pode conter espécies cujas linhagens apresentam suscetibilidades diferentes frente ao mesmo antifúngico.

Assim, neste trabalho o resultado obtido com a atividade fungicida pelo monoterpeno Citral e OE de *C. citratus* são promissores na busca de novos antifúngicos frente à resistência fúngica, pois como mencionado na literatura consultada, as drogas sintéticas têm mostrado perda de eficiência com o passar do tempo.

5.5. Determinação dos constituintes dos OEs

A identificação dos componentes químicos dos óleos essenciais utilizados neste trabalho foi feita através de análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas – CG-EM. Em destaque está apresentado o resultado da composição química do OE de *C. citratus* (Tabela 11), que apresentou a melhor CIM e CFM frente aos 15 fungos testados. Existe a hipótese que as atividades antifúngicas observadas ocorreram devido à presença do composto majoritário citral (isômeros geranial e neral), que apresenta

características lipofílicas e promove, de acordo com trabalhos anteriores, o rompimento da parede celular fúngica (DEBONNE *et al.* 2022).

Tabela 11: Composição química do óleo essencial de *C. citratus*.

t _R (min) ^(a)	IR ^(b)	Identificação	% rel. ^(c)
5,52	948	canfeno	1,02
6,45	985	6-metil-5-hepten-2-ona	3,13
7,74	1028	limoneno	0,64
7,82	1030	1,8-cineol (eucaliptol)	0,60
9,19	1071	4-nonanona	1,21
10,20	1101	linalol	3,02
13,41	1182	n.i. ^(d)	0,60
15,86	1242	neral (cis-citral)	29,66
16,42	1255	geraniol	6,33
17,13	1273	geranial (trans-citral)	38,53
21,33	1370	n.i. ^(d)	0,72
21,75	1380	acetato de geranila	9,19
23,10	1417	trans-cariofileno	3,53
26,88	1512	gama-cadineno	0,87
29,47	1579	óxido de cariofileno	0,97

Notas: a) tempo de retenção; b) índice de retenção; c) fração em porcentagem da área total integrada para o cromatograma; d) não identificado.

Através da análise química do OE de *C. citratus* foi encontrado o composto majoritário citral, resultado da mistura dos isômeros geranial (trans-citral) – 38,53% e neral (cis-citral) – 29,66%. Da mesma forma, Mourão *et al.* (2017) realizaram a análise química do OE de *C. citratus*, obtendo também o citral como composto majoritário, sendo geranial (41,46%) e neral (32,43%). Neste trabalho, os autores observaram a inibição do crescimento micelial do fungo *Curvularia luneta*. Igualmente, no presente trabalho também foi observada a inibição do crescimento micelial do isolado LMA 484 (*Curvularia* sp.) pelo OE de *C. citratus*. Almeida (2015) igualmente comprovou a ação antifúngica do OE de *C. citratus* frente ao fungo *Colletotrichum gloeosporioides* com elevada CIM, confirmando a presença do citral como composto majoritário (geranial - 36,03% e neral – 30,00%).

Os resultados da análise química do OE de *C. martinii* estão apresentados na Tabela 12. O OE de *C. martinii* apresentou como composto majoritário o geraniol (83,44%).

Tabela 12: Composição química do óleo essencial de *C. martinii*.

t _R (min) ^(a)	IR ^(b)	Identificação	% rel. ^(c)
8,02	1036	cis-beta-ocimeno	0,33
8,37	1046	trans-beta-ocimeno	1,15
10,20	1101	linalol	1,61
16,59	1260	geraniol	83,44
17,06	1271	geranial (trans-citral)	0,46
21,77	1380	acetato de geranila	9,94
23,10	1417	trans-cariofileno	2,24
34,68	1721	2-cis-6-trans-farnesol	0,57
35,82	1754	n.i. ^(d)	0,27

Notas: a) tempo de retenção; b) índice de retenção; c) fração em porcentagem da área total integrada para o cromatograma; d) não identificado.

Da mesma forma, Oliveira Filho *et al.* (2021) também obtiveram alta concentração de geraniol (83,82%) a partir do OE de *C. martinii*, que foi ativo frente ao fungo *Botrytis cinerea*. O OE de *C. martinii* também foi avaliado por Castro *et al.* (2020) e apresentou atividade antifúngica frente ao fungo *F. verticillioides*, assim como composto majoritário o geraniol (79,2%), seguido do acetato de geranial (10,5%). Esses resultados da análise química corroboram com o obtido neste trabalho, além da observação da atividade antifúngica.

O eugenol foi o composto majoritário (91,52%) encontrado no OE de *S. aromaticum*, de acordo com os resultados da Tabela 13. Esse composto é formado por um núcleo aromático e grupos OH, que possuem como alvo a parede celular fúngica, atingindo assim a permeabilidade da membrana celular e causando danos no funcionamento da célula (DEBONNE *et al.* 2022). Isso confirma os resultados de CIM e CFM obtidos no presente estudo, o que demonstra a eficiência do óleo de *S. aromaticum* na inibição de fungos dematiáceos.

Kačániová *et al.* (2021) avaliaram a composição química do OE de *S. aromaticum* e sua atividade antimicrobiana e antibiofilme, e encontraram o eugenol (82,4%) e o (E)-cariofileno (14,0%), resultados semelhantes aos obtidos neste trabalho. Os autores avaliaram a atividade antifúngica de *S. aromaticum* através da exposição de fungos aos seus compostos voláteis. Como resultado do experimento com a fase de vapor foi observada atividade inibitória frente a *Penicillium expansum* e *P. chrysogenum*.

Esses resultados corroboram os relatados por Haro-González *et al.* (2021), de que no mínimo 50% da composição química de *S. aromaticum* corresponde ao eugenol, e 10% a 40% são representados pelo acetato de eugenila, β -cariofileno e α -humuleno.

Tabela 13: Composição química do óleo essencial de *S. aromaticum*.

t_R (min) ^(a)	IR ^(b)	Identificação	% rel. ^(c)
20,81	1358	eugenol	91,52
23,11	1417	trans-cariofileno	6,79
24,47	1451	alfa-humuleno	1,69

Notas: a) tempo de retenção; b) índice de retenção; c) fração em porcentagem da área total integrada para o cromatograma.

Os resultados da análise química do OE de *M. alternifolia* estão representados na Tabela 14, que apresentou como composto majoritário o alfa-santaleno (23,28%), seguido dos compostos alfa-terpineol (14,80%), terpinen-4-ol (10,36 %).

Zimmermann *et al.* (2023) avaliaram a atividade fungicida de 5 OEs, dentre estes o de *M. alternifolia*, frente aos fungos *Aspergillus niger*, *A. nomius*, *A. flavus*, e *Fusarium graminearum*. Foi realizada a análise química dos componentes dos 5 OEs, e o de *M. alternifolia* apresentou como composto majoritário o terpinen-4-ol (41,34 %), seguido do γ -terpineno (19,19%) e do α -terpineno (9,12%). Os autores observaram que este óleo causou danos no crescimento micelial e na esporulação das espécies fúngicas avaliadas. Da mesma forma, Paramalingam *et al.* (2023) analisaram o OE de *M. alternifolia* e obtiveram como composto majoritário o terpinen-4-ol (22,98 %), seguido do eucaliptol (20,46%), além de observarem inibição no crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. Por outro lado, o OE de Melaleuca utilizado no presente trabalho não apresentou o terpinen-4-ol como composto majoritário, o que sugere que este pode ter sido o motivo para não ter havido inibição micelial em 100% das concentrações testadas.

Tabela 14: Composição química do óleo essencial de *M. alternifolia*.

t _R (min) ^(a)	IR ^(b)	Identificação	% rel. ^(c)
5,16	933	alfa-pineno	0,40
6,23	977	beta-pineno	0,50
7,30	1015	1,4-cineol	2,21
7,61	1024	para-cimeno	4,69
7,75	1028	limoneno	8,36
7,82	1030	1,8-cineol (eucaliptol)	7,73
9,77	1088	terpinoleno	3,79
10,70	1114	endo-fenchol	1,26
12,73	1165	endo-borneol	1,57
12,78	1166	n.i. ^(d)	1,62
13,22	1177	terpinen-4-ol	10,36
13,55	1186	para-cimen-8-ol	0,81
13,79	1192	alfa-terpineol	14,80
21,35	1371	alfa-copaeno	1,10
22,04	1387	beta-elemeno	2,10
22,59	1405	metil eugenol	1,06
23,10	1417	trans-cariofileno	3,36
23,18	1419	alfa-santaleno	23,28
23,80	1435	alfa-trans-bergamoteno	2,52
24,46	1451	alfa-humuleno	3,58
24,78	1459	beta-santaleno	3,20
27,26	1522	delta-cadineno	1,73

Notas: a) tempo de retenção; b) índice de retenção; c) fração em porcentagem da área total integrada para o cromatograma; d) não identificado.

A análise química do OE de *O. basilicum* está representada na Tabela 15. Os resultados mostram que o OE apresentou como composto majoritário o metil chavicol (estragol) (67,05%), seguido do linalol (31,57%).

El-Soud *et al.* (2015) também avaliaram a composição química do óleo de *O. basilicum* mostrando como composto majoritário o linalol (48,4%), seguido do 1,8-Cineol (12,2%), que apresentou atividade antifúngica com inibição total do *A. flavus*.

Dhama *et al.* (2023) relataram que os compostos metil chavicol (estragol) e linalol estão entre os principais componentes do óleo de *O. basilicum*, o que corrobora com os resultados deste trabalho. O autor também afirmou que esse óleo apresenta potencial antifúngico frente a *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Botrytis fabae*, *Uromyces fabae*, *Aureobasidium pullulans*, *Trichophyton rubrum*, *Microsporum gypseum* e *Trichoderma viride*, e aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. Comparando os

resultados de CIM e CFM obtidos para o OE de *O. basilicum* neste trabalho, com dados da literatura, podemos inferir que o OE de *O. basilicum* apresenta baixa atividade antifúngica frente a fungos dematiáceos.

Tabela 15: Composição química do óleo essencial de *O. basilicum*.

t _R (min) ^(a)	IR ^(b)	Identificação	% rel. ^(c)
10,23	1102	linalol	31,57
14,15	1201	metil chavicol (estragol)	67,05
23,80	1435	alfa-trans-bergamoteno	0,54
28,05	1542	M = 204 ^(d)	0,84

Notas: a) tempo de retenção; b) índice de retenção; c) fração em porcentagem da área total integrada para o cromatograma; d) não identificado.

A análise da composição química do OE de *C. nardus* está representada na Tabela 16 que demonstrou como composto majoritário o geraniol (26,56%), seguido dos compostos citrônella (20,26%), acetato de geranila (14,00 %) e citrônella (11,88%).

Entretanto, Trindade *et al.* (2022) obtiveram na caracterização química do OE de citrônella como composto majoritário o citrônella (42,28%), seguido do geraniol (16,78%) e citrônella (11,5%), além de apresentar ação inibitória frente todas as cepas testadas de *Candida albicans*.

Kaur, Bhardwaj e Kaur (2021) também analisaram a composição química do OE de *C. nardus* e obtiveram como compostos majoritários citrônella (22,15%), citrônella (16,34%) e geraniol (11,16%) com atividade antifúngica frente a *Fusarium verticillioides* (atualmente *Fusarium fujikuroi* Nirenberg) e *Drechslera maydis* (nome atual *Cochliobolus heterostrophus* Drechsler) segundo a base de dados Index Fungorum (<https://www.indexfungorum.org/names/names.asp>).

Mesmo diante das diferenças nas quantidades dos compostos químicos, comparando com outros autores, foi possível constatar a ação inibitória do OE de *C. nardus* frente aos isolados de fungos dematiáceos aqui estudados.

Tabela 16: Composição química do óleo essencial de *C. nardus*.

t _R (min) ^(a)	IR ^(b)	Identificação	% rel. ^(c)
6,45	985	6-metil-5-hepten-2-ona	0,49
7,74	1028	limoneno	4,21
9,19	1071	4-nonanona	0,67
10,20	1101	linalol	2,38
11,92	1144	n.i. ^(d)	0,37
12,27	1153	citronelal	20,26
15,35	1230	citronelol	11,88
15,80	1240	neral (cis-citral)	3,82
16,49	1257	geraniol	26,56
17,05	1271	geranial (trans-citral)	5,62
20,50	1351	acetato de carvomentila	1,98
21,76	1380	acetato de geranila	14,00
23,10	1417	trans-cariofileno	3,85
26,88	1512	gama-cadineno	2,82
27,26	1522	delta-cadineno	1,09

Notas: a) tempo de retenção; b) índice de retenção; c) fração em porcentagem da área total integrada para o cromatograma; d) não identificado.

A composição química do OE de *O. gratissimum* está representada na Tabela 17, cujo composto majoritário foi o eugenol (83,87%).

Ashokkumar *et al.* (2020) avaliaram a composição química do OE de *O. gratissimum* e obtiveram o eugenol como composto majoritário (54,42%) seguido de germacreno D (15,43%) e concluíram que houve predomínio de fenilpropeno seguido por sesquiterpeno e por fim, monoterpenos.

Da mesma forma Silva *et al.* (2022) avaliaram a composição química de *O. gratissimum* e *S. aromaticum* e o composto majoritário foi eugenol para ambos, sendo a maior concentração encontrada no primeiro com 92,7%. O objetivo foi analisar o potencial antifúngico desses OEs frente ao fungo *Colletotrichum lindemuthianum*, responsável pela antracnose do feijoeiro.

Tabela 17: Composição química do óleo essencial de *O. gratissimum*.

t _R (min) ^(a)	IR ^(b)	Identificação	% rel. ^(c)
4,99	926	tricicleno	0,09
6,14	973	sabineno	0,10
6,58	991	beta-mirceno	0,10
7,61	1024	para-cimeno	0,10
8,03	1036	cis-beta-ocimeno	5,90
8,37	1046	trans-beta-ocimeno	0,37
20,79	1361	eugenol	83,87
21,37	1375	alfa-copaeno	0,44
21,72	1383	beta-bourboneno	0,22
23,11	1417	trans-cariofileno	1,42
25,58	1479	gama-muuroleno	1,55
26,75	1509	trans-alfa-farneseno	5,44
27,27	1522	delta-cadineno	0,17
29,48	1580	óxido de cariofileno	0,13
32,92	1672	kusinol	0,11

Notas: a) tempo de retenção; b) índice de retenção; c) fração em porcentagem da área total integrada para o cromatograma.

O resultado da análise química do OE de *T. vulgaris* está representado na Tabela 18. Apresentou como composto majoritário o para-cimeno (38,17%), seguido dos compostos carvacrol (15,45%) e timol (13,00%).

Oliveira *et al.* (2020) também avaliaram a composição química do óleo de *T. vulgaris* e o timol foi o composto majoritário (50,53%), seguido do para-cimeno (19,42%), γ -terpineno (9,15%) e carvacrol (5,34%). O mesmo apresentou efeito inibitório no crescimento do fungo *A. flavus*. A ação antifúngica do OE de *T. vulgaris* e seu composto timol frente a *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp., *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus laurentii* também foi confirmada no estudo realizado por Kowalczyk *et al.* (2020).

Aksit *et al.* (2022), analisaram os compostos químicos de 3 espécies de *Thymus*, sendo que em maior quantidade para *T. vulgaris* o composto majoritário foi o carvacrol (72,47%) seguido do γ -terpineno (4,61%). A causa da baixa inibição do OE de *T. vulgaris* frente aos fungos dematiáceos testados pode ser justificada pelas diferentes proporções dos compostos majoritários obtidos neste estudo em relação aos resultados encontrados na literatura.

Tabela 18: Composição química do óleo essencial de *T. vulgaris*.

t _R (min) ^(a)	IR ^(b)	Identificação	% rel. ^(c)
5,16	933	alfa-pineno	4,98
5,52	948	canfeno	3,34
6,23	977	beta-pineno	0,82
6,58	991	beta-mirceno	1,97
7,00	1006	alfa-felandreno	1,97
7,17	1011	delta-3-careno	0,55
7,37	1017	alfa-terpineno	0,53
7,53	1021	1-para-menteno	0,21
7,63	1025	para-cimeno	38,17
7,75	1028	limoneno	3,99
7,82	1030	1,8-cineol (eucaliptol)	2,55
8,73	1057	gama-terpineno	1,17
9,77	1088	terpinoleno	1,26
10,21	1101	linalol	5,69
11,85	1143	cânfora	0,66
12,36	1156	iso-borneol	0,72
12,73	1165	endo-borneol	1,45
13,19	1176	terpinen-4-ol	0,47
13,74	1190	alfa-terpineol	0,32
17,70	1286	acetato de bornila	0,75
18,13	1297	timol	13,00
18,53	1306	carvacrol	15,45

Notas: a) tempo de retenção; b) índice de retenção; c) fração em porcentagem da área total integrada para o cromatograma.

5.6. Identificação molecular

Os resultados do sequenciamento da região ITS dos isolados estudados encontram-se na Tabela 19. As árvores originadas das análises de distância filogenética encontram-se no Apêndice 9.

Tabela 19: Identificação molecular.

Isolados fúngicos	Identificação final
LMA 436	<i>Cladosporium</i> sp. complexo <i>cladosporioides</i>
LMA 484	<i>Curvularia</i> sp.
LMA 836	<i>Exophiala bergeri</i>
LMA 969	<i>Cladosporium</i> sp. complexo <i>cladosporioides</i>
LMA 986	<i>Cladophialophora</i> sp.
LMA 1005	<i>Cladosporium</i> sp. complexo <i>cladosporioides</i>
LMA 1007	<i>Cladosporium</i> sp. complexo <i>cladosporioides</i>
LMA 1059	<i>Penidiellopsis</i> sp.
LMA 1074	<i>Cladosporium</i> sp. complexo <i>cladosporioides</i>
LMA 1082	<i>Penidiellopsis</i> sp.
LMA 1091	<i>Penidiellopsis</i> sp.
LMA 1105	<i>Penidiellopsis</i> sp.
LMA 1129	<i>Cladosporium</i> sp. complexo <i>cladosporioides</i>
PB 03	<i>Cladosporium</i> sp. complexo <i>cladosporioides</i>
PB 04	<i>Cladosporium</i> sp. complexo <i>cladosporioides</i>

Como mencionado anteriormente, a região ITS pode não alcançar a resolução necessária para definir a espécie de determinados gêneros. Apesar de ser considerada uma região universal usada no sequenciamento de linhagens fúngicas, outras podem ser mais específicas e resolutivas, dependendo do grupo. Como foi observado na Tabela 19, a identificação de vários isolados manteve-se a nível genérico, com exceção de 9 isolados onde foi possível identificar a espécie (LMA 836 – *Exophiala bergeri*) e o complexo ao qual pertencem (LMA436, LMA 969, LMA 1005, LMA 1007, LMA 1074, LMA 1129, PB03 e PB04 – *Cladosporium* sp. complexo *cladosporioides*).

Comparando-se as Tabelas 06 e 19 é possível evidenciar que mesmo apenas a nível de gênero a morfologia pode não ser confiável. Por exemplo, observou-se que a identidade molecular de 8 isolados não confirmou a preliminar. Existem vários fatores que concorrem para equívocos como esses: as características fenotípicas apresentam grande plasticidade, tanto na natureza como sob condições artificiais; existem espécies morfológicamente indistinguíveis, mas geneticamente diferentes, conhecidas como crípticas; algumas chaves dicotômicas são ineficientes para um determinado estágio do ciclo de vida de um microrganismo; inexperiência e falta de atualização da literatura.

Nesse estudo oito isolados foram confirmados como sendo do gênero *Cladosporium* (Apêndice 9A). Seus representantes são cosmopolitas e o grupo é conhecido como um dos mais numerosos em diversidade de espécies e genótipos. Estudos taxonômicos voltados à elucidação desse táxon reforçam a necessidade de análises polifásicas para identificação específica de seus isolados. Citados comumente como contaminantes em laboratório, podem causar alergias e infecções pulmonares. O complexo *cladosporioides*

reúne representantes com numerosas espécies-irmãs ambientais, sapróbias em sua maioria e poucas de relatos clínicos (de HOOG *et al.* 2020). Atualmente mais de 40 espécies são encontradas nesse complexo, o que muito dificulta a identificação e separação das mesmas.

Exophiala bergeri, ascomiceto da família Herpotrichiellaceae e conhecida como levedura negra, é mencionada como uma espécie rara associada a infecções cutâneas e subcutâneas (de HOOG *et al.* 2020). O isolado estudado (LMA 836) foi analisado na árvore filogenética (Apêndice 9B) e identificado como *Exophiala bergeri*. Essa cultura foi isolada de solo contaminado com graxa e óleo de motor, sendo a preferência de alguns fungos dematiáceos por substratos associados a hidrocarbonetos já foi anteriormente demonstrada e discutida (BARON *et al.* 2021). Registros taxonômicos mencionam que a espécie já foi citada dentro dos gêneros *Candida*, *Torula* e *Sporotrichum* antes de ter sido finalmente classificada como *Exophiala*, segundo a base de dados Index Fungorum (<https://www.indexfungorum.org/names/names.asp>).

Os gêneros *Curvularia* e *Cladophialophora* também estiveram representados nessa investigação. Segundo as análises de distância filogenética o isolado LMA 484 agrupou-se com bom suporte com as espécies *C. geniculata* e *G. thailandicum* (Apêndice 9C), ambas mencionadas originalmente como sapróbias. A primeira pode ser ocasionalmente encontrada em casos clínicos colonizando sinus nasais, mais frequentemente em animais (de HOOG *et al.* 2020) e a segunda colonizando material vegetal (www.indexfungorum.org/names/names.asp). No caso do gênero *Cladophialophora*, também da família Herpotrichiellaceae, várias espécies são relacionadas a casos de patogenicidade em humanos, sem conhecermos exatamente seu habitat natural. Em função da grande similaridade morfológica, é facilmente confundida com *Cladosporium*. Na árvore filogenética (Apêndice 9D), o isolado estudado ficou próxima de 3 espécies envolvidas em casos clínicos: *C. exuberans*, *C. recurvata* e *C. mycetomatis*, isoladas de material vegetal, com exceção da última que foi descrita colonizando um pé machucado (de HOOG *et al.* 2020).

O gênero *Penidiellopsis* pertence a classe Dothideomycetes e possui somente duas espécies *P. radicales* (SANDOVAL-DENIS *et al.* 2016) com acrônimo CBMAI 1938 e *P. ramosus* (DUARTE *et al.* 2017) acrônimo CBMAI 1937, ambas isoladas de tegumento de formigas no Brasil. Não existe relato de casos patogênicos humanos ou animais causados por representantes desse gênero. No presente estudo, através da análise da distância filogenética (Apêndice 9E) foram identificados 4 isolados LMA 1059, LMA 1082, LMA 1091 e LMA 1105 pertencentes a esse gênero, mas não houve definição a nível de espécie, por não

apresentarem bom suporte de agrupamento. Outros primers serão sequenciados, oportunamente, buscando-se a identificação específica de todas as linhagens estudadas.

5.7. Teste de tolerância a temperatura

A temperatura ótima de crescimento é aquela que apresenta a máxima taxa de crescimento microbiano, e no presente estudo os isolados foram classificados como mesófilos, apresentando temperatura ótima de crescimento entre 28 - 30°C para todos os isolados. Somente os isolados *Curvularia* sp. (LMA 484) e *Exophiala bergeri* (LMA 836) apresentaram crescimento a 37°C, no entanto nenhum dos isolados apresentou crescimento a 40°C (Figura 7 A e 7 B).

Figura 7 A: Resultado do teste de tolerância dos isolados de fungos dematiáceos em MA2% após 21 dias. Coluna, da esquerda para direita: 28, 30, 33, 37 e 40°C. Linha, da cima para baixo: LMA 436; LMA 484; LMA 836; LMA 969; LMA 986; LMA 1005; LMA 1007 e LMA 1059.

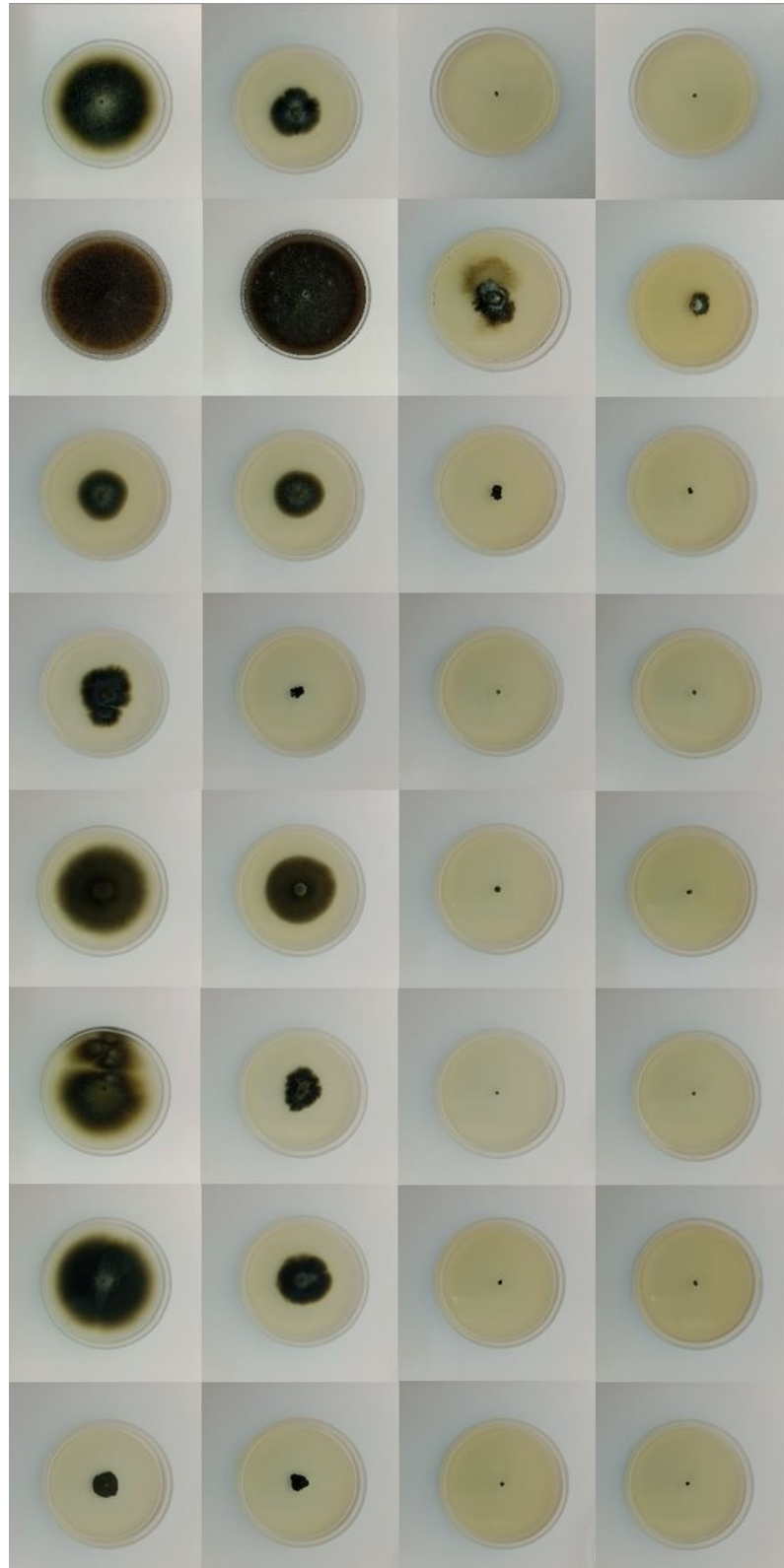
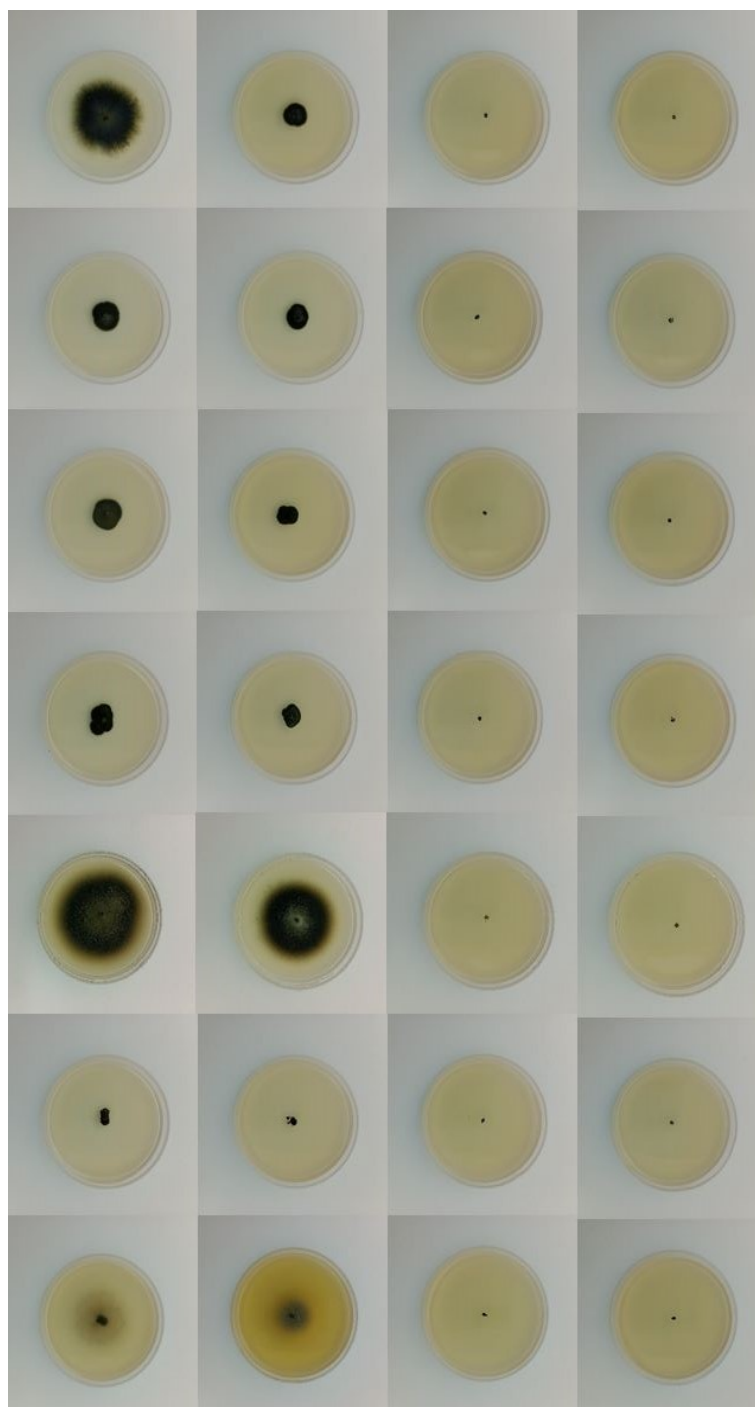


Figura 7 B: Resultado do teste de tolerância dos isolados de fungos dematiáceos em MA2% após 21 dias. Coluna, da esquerda para direita: 28, 30, 33, 37 e 40°C. Linha, da cima para baixo: LMA 1074; LMA 1082; LMA 1091; LMA 1105; LMA 1129; PB 03 e PB 04.



Alves (2015) analisou a termotolerância de diferentes gêneros de fungos melanizados isolados de meio ambiente (área rural) e 7 isolados demonstraram crescimento a 37°C, sendo 3 deles pertencentes do gênero *Curvularia*. Porém a 40°C não apresentou crescimento de nenhum isolado, esses resultados corroboram com os resultados obtidos no presente estudo.

Exophiala bergeri não possui alta prevalência em infecções clínicas, mas é relatado como um fungo oportunista e pode causar infecções em pacientes imunossuprimidos, como já observado em um transplantado renal (CHOWDHARY, PERFECT e de HOOG, 2015)

Duarte e colaboradores (2013) avaliaram a termotolerância de espécies de *Exophiala* isoladas do meio ambiente e os resultados indicaram que são fungos mesófilos, em geral, com temperatura ótima de crescimento de 30-33°C, apesar de 2 espécies crescerem a 37 - 40°C. Esses resultados corroboram com os resultados do presente estudo, indicando assim que isolados ambientais têm capacidade de crescimento em temperatura corporal, considerado um fator potencial de patogenicidade.

6. Conclusões

- O óleo essencial comercial (BioEssência) de *C. citratus* (capim limão) possui atividade inibitória frente aos fungos dematiáceos estudados e também ação fungicida;
- O OE de *C. martinii* (palmarosa) produzido no laboratório da Divisão de Microbiologia (DMB) do CPQBA apresenta boa atividade frente a fungos dematiáceos;
- O O.E. comercial (BioEssência) de *S. aromaticum* (cravo-da-Índia) apresenta atividade inibitória e fungicida frente aos fungos dematiáceos estudados.
- O composto Citral com elevada CIM (0,5mg/mL) é eficiente e mostra boa ação frente a isolados clínicos (*Fonsecaea* sp.), além da atividade fungicida na concentração de 1,0 mg/mL (*Phialophora* sp.).
- A análise química é fundamental quando desejamos avaliar o desempenho dos O.E. O presente trabalho mostra que os compostos geranial (trans-citral) e neral (cis-citral) majoritários do OE de *C. citratus*, são eficientes, contudo, óleos comerciais onde essa condição não é respeitada, perde seu efeito;
- Tanto óleos essenciais comerciais como os produzidos em laboratório podem ser indicados para tratamento de fungos dematiáceos, desde que mantenham seus compostos majoritários ativos;
- *Cladosporium*, *Curvularia*, *Exophiala*, *Cladophialophora* e *Penidiellopsis* são os gêneros identificados referentes aos 15 isolados estudados;
- Os isolados ambientais *Curvularia* sp. (LMA 484) e *Exophiala bergeri* (LMA 836) devem ser manipulados com maior atenção, pois apresentam ao menos 2 fatores de potencial virulência: crescimento a 37°C e melanina na parede celular.

7. Referências Bibliográficas

- AAMIR, S.; SUTAR, S.; SINGH, S.K.; BAGHELA, A. A rapid and efficient method of fungal genomic DNA extraction, suitable for PCR based molecular methods. **Plant Pathology & Quarantine**, V.5, n.2, p.74–81, 2015. DOI:10.5943/ppq/5/2/6.
- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/ mass spectrometry**. 4. ed. 2007. p.804.
- AHMAD, A.; ELISHA, I. L.; VUUREN, S.; VILJOEN, A. Volatile phenolics: A comprehensive review of the anti-infective properties of an important class of essential oil constituents. **Phytochemistry**. V. 190. 2021. DOI: 10.1016/j.phytochem.2021.112864.
- AKSIT, H.; BAYAR, Y.; SIMSEK, S.; ULUTAS, Y. Chemical Composition and Antifungal Activities of the Essential Oils of Thymus Species (*Thymus pectinatus*, *Thymus convolutus*, *Thymus vulgaris*) Against Plant Pathogens. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**. V.25, n.1, p.200-207, 2022. DOI: 10.1080/0972060X.2022.2043189.
- ALMEIDA, G. S. **Potencial de óleos essenciais no controle de fungos fitopatogênicos em pós-colheita de morango**. 2015. 65f. Dissertação (mestrado em ciências de alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- ALVES, M.J. **Estudo de fungos melanizados em amostras ambientais de áreas rurais do Amazonas e avaliação da sua relação com os fungos melanizados causadores de micoses**. 2015. 102 f. Dissertação (Mestrado em Saúde, Sociedade e Endemias na Amazônia) - Universidade Federal do Amazonas - Universidade Federal do Pará, Manaus, 2015.
- AMETRANO, C. G.; MUGGIA, L.; GRUBE, M. Extremotolerant black fungi from rocks and lichens. In **Fungi in Extreme Environments: Ecological Role and Biotechnological Significance** (pp. 119-143). Springer, Cham, 2019. DOI:10.1007/978-3-030-19030-9_7.
- ASHOKKUMAR, K.; VELLAIKUMAR, S.; MURUGAN, M.; DHANYA, M.K.; AISWARYA, S.; NIMISHA, M. Chemical composition of *Ocimum gratissimum* essential oil from the South Western Ghats, India. **Journal of Current Opinion in Crop Science**. V.1, n.1, p.27-30, 2020. Disponível em <https://jcocs.com/index.php/ej/article/view/14>.
- ATTILI-ANGELIS, D.; TANIWAKI, M.H.; SILVA, N.; OLIVEIRA, V.M.; LIMA, N. Microbial ex situ preservation supporting science and bioeconomy in Brazil. **Biota Neotropica**. V.22, e20221438, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1590/1676-0611-BN-2022-1438>.
- BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S. K. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**. V.6, n. 2, p. 71-79, 2016. DOI: 10.1016/j.jpha.2015.11.005.
- BARON, N.C.; PAGNOCCA, F.C.; OTSUKA, A.A.; PRENAFETA-BOLDÚ, F.X.; VICENTE, V.A.; ATTILI DE ANGELIS, D. Black Fungi and Hydrocarbons: An Environmental Survey for Alkylbenzene Assimilation. **Microorganisms**. V.9, n.5, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms9051008>.

BELGINI, D.R.B.; DIAS R.S.; SIQUEIRA, V.M.; VALADARES L.A.B.; ALBANESE, J.M.; SOUZA R.S.; TORRES A.P.R.; SOUSA, M.P.; SILVA, C.C.; de PAULA, S.O.; OLIVEIRA, V.M. Culturable bacterial diversity from a feed water of a reverse osmosis system, evaluation of biofilm formation and biocontrol using phages. **World J Microbiol Biotechnol**, V.30, n.10, p.2689-700, 2014. DOI: 10.1007/s11274-014-1693-1.

BENITEZ, L.L.; CARVER, P.L. Adverse Effects Associated with Long-Term Administration of Azole Antifungal Agents. **Drugs** V.79, p.833–853, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40265-019-01127-8>

BIENVENU, A-L.; PICOT, S. Mycetoma and Chromoblastomycosis: Perspective for Diagnosis Improvement Using Biomarkers. **Molecules**. V. 25, n. 11:2594. 2020. DOI: 10.3390/molecules25112594.

BIESKI, I.G.C.; SANTOS, J. L. U. DOS.; FERREIRA, M. L.; GARCIA, P. C.; DOURADO, S. H. A.; JANUÁRIO, A. B.; MESSIAS, T. E.; APOLINÁRIO, J. M. S. S. Potencial econômico e terapêutico dos óleos essenciais mais utilizados no Brasil. **Revista Fitos**. V. 15, n. Supl 1, p. 125–137, Jan, 2022. DOI: 10.32712/2446-4775.2022.1203.

BIZZO, H.R.; REZENDE, C.M. O mercado de óleos essenciais no Brasil e no mundo na última década. **Química Nova**, V. 45, N. 8, p. 949-958, 2022. DOI: <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170889>.

BOUKHATEM, M.N.; FERHAT, M.A.; KAMELI, A.; SAIDI, F.; KEBIR, H.T. Lemon grass (*Cymbopogon citratus*) essential oil as a potent anti-inflammatory and antifungal drugs. **Libyan Journal of Medicine**. V. 19, n. 1, Sep, 2014. DOI: 10.3402/ljm.v9.25431.

BRUN, P.; BERNABÈ, G.; FILIPPINI, R.; PIOVAN, A. *In Vitro* Antimicrobial Activities of Commercially Available Tea Tree (*Melaleuca alternifolia*) Essential Oils. **Current Microbiology**. V.76, p.108–116, 2019. DOI: 10.1007/s00284-018-1594-x.

BRUNKE, S.; MOGAVERO, S.; KASPER, L.; HUBE, B. Virulence factors in fungal pathogens of man. **Current Opinion in Microbiology**. V. 32, p. 89-95. 2016. DOI: 10.1016/j.mib.2016.05.010.

BUENO, C. C.; DYNA, F. A. G. M.; OLIVEIRA, F. A. G. M. de .; SILVA, T. A. R. .; LEMBI, M. K. dos S.; MORITZ, C. M. F.; SAKAI, O. A. Profile of the export and import of essential oils in Brazil, between 2020 and 2021, and the predominance of essential oil from *Melaleuca alternifolia* in Paraná. **Research, Society and Development**, [S. l.], V. 10, n. 13, p. e560101321574, 2021. DOI: 10.33448/rsd-v10i13.21574.

CALDAS, C. P. M.; SOUSA, J. P.; PÉREZ, A. L. A. L.; SANTOS, J. M. C. G.; OLIVEIRA, H.M. B. F.; OLIVEIRA FILHO, A. A.; LIMA, E. O. Atividade antifúngica in silico e in vitro do monoterpeno citral. **Revista Vale**. V. 14, n. 2, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.5892/ruvrd.v14i2.3154>.

CASTELLANI A. Further researches on the long viability and growth of many pathogenic fungi and some bacteria in sterile distilled water. **Mycopath Mycol appl**; V.20, n.17, p.1-6. 1963.

CASTRO, J.C.; PANTE, G.C.; CENTENARO, B.M.; ALMEIDA, R.T.R.; PILAU, E.J.; DIAS FILHO, B.P.; MOSSINI, S.A.G.; ABREU FILHO, B.A.; MATIOLI, G.; MACHINSKI JUNIOR, M. Antifungal and antimycotoxigenic effects of *Zingiber officinale*, *Cinnamomum zeylanicum* and *Cymbopogon martinii* essential oils against *Fusarium verticillioides*. **Food Addit Contam Part A**. V.37, n. 9, p. 1531-1541, 2020. DOI: 10.1080/19440049.2020.1778183.

CAVALEIRO, C. Plantas aromáticas e óleos essenciais em farmácia e medicina. IN: **Potencialidades e aplicações das plantas aromáticas e medicinais curso teórico-prático**. FIGUEIREDO, A. C. S.; BARROSO, J. M. G.; PEDRO, L. M. 3ª ed., Lisboa: ed. Faculdade de Ciências da Universidade Centro de Biotecnologia Vegetal. 2007. p. 55-62.

CHOWDHARY, A.; PERFECT, J.; de HOOG, G.S. Black Molds and Melanized Yeasts Pathogenic to Humans. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**. V.5, n.8, 2015. DOI: 10.1101/cshperspect.a019570.

COELHO, R. A. **Susceptibilidade de *Fonsecaea* spp. aos antifúngicos: relações com a produção de melanina fúngica, associação de fármacos e aspectos clínicos dos pacientes**. 2017. 97f. Dissertação (mestrado em pesquisa clínica de doenças infecciosas) Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2017. Link: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/26502>.

CROUS, P.W.; VERKLEIJ, G.J.M.; GROENEWALD, J.Z.; HOUBRAKEN, J. WESTERDIJK. Laboratory Manual Series N. 1. In: **Fungal Biodiversity**. Webmaster Laboratory Manual Series, p.425, 2019.

de AZEVEDO, C. M. P. S.; GOMES, R. R.; VICENTE, V.A.; SANTOS, D. W. C. L.; MARQUES, S. G.; NASCIMENTO, M. M. F.; et al. *Fonsecaea pugnacius*, a Novel Agent of Disseminated Chromoblastomycosis. **Journal of Clinical Microbiology**. V. 53, n. 8, p. 2674–2685. 2015. DOI: 10.1128/jcm.00637-15

de HOOG, G.S.; GARRO, J.; GENÉ, J.; FIGUERAS, M.J. **Atlas of clinical fungi**. 2nd edition. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures. 2000.

de HOOG, G.S.; VICENTE, V.A.; NAJAFZADEH, M.J.; HARRAK, M.J.; BADALI, H.; SEYEDMOUSAVI, S. Waterborne *Exophiala* species causing disease in cold-blooded animals. **Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, V.27, p.46-72, 2011. DOI: 10.3767/003158511X614258.

de HOOG, G.S.; GUARRO, J.; GENÉ, J.; AHMED, S.A.; AL-HATMI, A.M.S.; FIGUERAS, M.J.; VITALE, R. **Atlas of clinical fungi**. 4th edition. Foundation Atlas of Clinical Fungi, Hilversum, N.L. 2020.

DEBONNE, E.; YILMAZ, M.S.; SAKIYAN, O.; EECKHOUT, M. Comparison of antifungal activity of essential oils of clove, lemongrass and thyme for natural preservation of dried apricots. **Food Science and Technology International**. V.28, n.7, p.641-649. 2022. DOI:10.1177/10820132211049603.

DHAKAD, A. K.; PANDEY, V.V.; BEG, S.; RAWAT, J.M.; SINGH, A. Biological, medicinal and toxicological significance of Eucalyptus leaf essential oil: a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. V. 98, n. 3, p. 833-848, 2017. DOI: 10.1002/jsfa.8600

DHAMA, K., SHARUN, K., GUGJOO, M.B., TIWARI, R., ALAGAWANY, M., YATOO, M.I., THAKUR, P., IQBAL, H. MN., CHAICUMPA, W., MICHALAK, I., ELNESR, S.S., FARAG, M.R. A Comprehensive Review on Chemical Profile and Pharmacological Activities of *Ocimum basilicum*. **Food Reviews International**. V.39, n.1, p.119-147, 2023. DOI: 10.1080/87559129.2021.1900230

DIÁNEZ, F.; SANTOS, M.; PARRA, C.; NAVARRO, M. J.; BLANCO, R.; GEA, F. J. Screening of antifungal activity of 12 essential oils against eight pathogenic fungi of vegetables and mushroom. **Letters in Applied Microbiology**. V. 67, n. 4, p. 400–410, 2018. DOI: 10.1111/lam.13053

DUARTE; A. P. M.; PAGNOCCA, F. C.; BARON, N. C. *et al.* In Vitro Susceptibility of Environmental Isolates of *Exophiala dermatitidis* to Five Antifungal Drugs. **Mycopathologia**. V.175, p. 455–461. 2013. DOI: 10.1007/s11046-012-9597-9.

DUARTE, A.P.M.; ATTILI-ANGELIS, D.; BARON, N.C.; GROENEWALD, J.Z.; CROUS, P.W.; PAGNOCCA, F.C. Riding with the ants. **Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, V.38, p.81-99, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3767/003158517X693417>.

EL-SOUD, N.H.A.; DEABES, M.; EL-KASSEM, L.A.; KHALIL, M. Chemical Composition and Antifungal Activity of *Ocimum basilicum* L. Essential Oil. **Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences**. V.3, n.3, p.374-379. 2015. DOI: <https://doi.org/10.3889/oamjms.2015.082>.

EMIDIO, E.C.P.; URÁN J, M.E.; SILVA, L.B.R.; DIAS, L.S.; DOPRADO, M.; NOSANCHUK, J. D.; TABORDA, C.P. Melanin as a Virulence Factor in Different Species of Genus *Paracoccidioides*. **Journal of Fungi**. V. 6, n. 4, p.291. 2020. DOI: 10.3390/jof604029.

Farmacopeia Brasileira, 2019 – 6ª edição V. I, p. 42.

FERREIRA, O.O.; CRUZ, J.N.; DE MORAES, Â.A.B.; DE JESUS PEREIRA FRANCO, C.; LIMA, R.R.; ANJOS, T.O.D.; SIQUEIRA, G.M.; NASCIMENTO, L.D.D.; CASCAES, M.M.; DE OLIVEIRA, M.S.; et al. Essential Oil of the Plants Growing in the Brazilian Amazon: Chemical Composition, Antioxidants, and Biological Applications. **Molecules**. V.27, n.14, 4373. 2022. <https://doi.org/10.3390/molecules27144373>.

FONTANA, D.C.; DOURADO, NETO D.; PRETTO, M.M.; MARIOTTO, A.B.; CARON, B.O.; KULCZYNSKI, S.M.; SCHMIDT, D. Using essential oils to control diseases in strawberries and peaches. **International Journal of Food Microbiology**. V.338, p.1-11, 2021. DOI: doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108980.

FORTUNE BUSINESS INSIGHTS. Essential oils market size, share & COVID-19 impact analysis, by type (Citrus, Eucalyptus, Lavander, Rosemary, Tea Tree, and others), by application (food & beverages, personal care & cosmetics, pharmaceuticals, and others), and regional forecast, 2021-2028. 2021. Report ID: FBI101063.

GIRÃO FILHO, J.E.; ALCÂNTARA NETO, F.; PÁDUA, L.E.M.; PESSOA, E. F. Repelência e atividade inseticida de pós vegetais sobre *Zabrotes subfasciatus* Boheman em feijão-fava armazenado. **Revista brasileira de plantas medicinais**. V.16, n.3, p.499-504, 2014. DOI: https://doi.org/10.1590/1983-084X/13_087.

GOSTINCAR, C.; GRUBE, M.; GUNDE-CIMERMAN, N. Evolution of Fungal Pathogens in Domestic Environments? **Fungal Biology**. V. 115, n. 10, p 1008-1018. 2011. DOI: 10.1016/j.funbio.2011.03.004.

GRISHKAN. I.; NEVO E. Spatiotemporal dynamics of culturable microfungi in soil of Mount Hermon, Israel. **Plant Biosyst - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology**. V. 146, n. 1, p.150–63, 2012. DOI: 10.1080/11263504.2012.687405.

GUNDE-CIMERMAN, N.; PLEMETITAŠ, A. Ecology and molecular adaptations of the halophilic black yeast *Hortaea werneckii*. In **Life in Extreme Environments**. P 177-185. Reviews in Environmental Science and Bio/Technology. 2007. DOI: 10.1007/978-1-4020-6285-8_11.

GUPTA, A.K., VENKATARAMAN, M. Antifungal resistance in superficial mycoses. **Journal of Dermatological Treatment**. V.33, n.4, p.1888-1895. 2022. DOI: 10.1080/09546634.2021.1942421.

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, p. 2021. DOI: 10.3390/molecules26216387.

HE, Y.; ZHENG, H.; MEI, H.; LV, G.; LIU, W.; LI, X. Phaeohyphomycosis in China. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. V.12. 2022. DOI: 10.3389/fcimb.2022.895329.

HELLWIG, A.H.S., HEIDRICH, D., ZANETTE, R.A., SCROFERNEKER, M.L. In vitro susceptibility of chromoblastomycosis agents to antifungal drugs: A systematic review. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**. V.16, p.108-114. 2019. DOI: 10.1016/j.jgar.2018.09.010.

HIWANDIKA, N.; SUDRAJAT, S.E.; RAHAYU, I. Antibacterial and Antifungal Activity of Clove Extract (*Syzygium Aromaticum*): Review. **Eureka Herba Indonesia**. V.2, n.2, p.86-94, 2021. DOI: <https://doi.org/10.37275/ehi.v2i2.18>.

HOFFMAN, C.C.; DANUCALOV, I. P.; PURIM, K.S.M.; QUEIROZ-TELLES, F. Infecções causadas por fungos demácios e suas correlações anátomo-clínicas. **An. Bras. Dermatol**. V.86, n.1, p. 138-141. 2011.

HOSSAIN, C.M.; RYAN, L.K.; GERA, M.; CHOUDHURI, S.; LYLE, N.; ALI, K.A.; DIAMOND, G. Antifungals and Drug Resistance. **Encyclopedia**. [V. 2, n.4, p.1722-1737. 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/encyclopedia2040118>.

KAČÁNIOVÁ, M.; GALOVIČOVÁ, L.; BOROTOVÁ, P.; VALKOVÁ, V.; ĎÚRANOVÁ, H.; KOWALCZEWSKI, P.Ł.; SAID-AL AHL, H.A.H.; HIKAL, W.M.; VUKIC, M.;

SAVITSKAYA, T.; GRINSHPAN, D.; VUKOVIC, N.L. Chemical Composition, *In Vitro* and *In Situ* Antimicrobial and Antibiofilm Activities of *Syzygium aromaticum* (Clove) Essential Oil. **Plants**. V.10, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants10102185>

KAUR, H.; BHARDWAJ, U.; KAUR, R. *Cymbopogon nardus* essential oil: a comprehensive review on its chemistry and bioactivity, **Journal of Essential Oil Research**, V.33, n.3, p.205-220, 2021. DOI:10.1080/10412905.2021.1871976.

KAUR, H.; BHARDWAJ, U.; KAUR, R.; KAUR, H. Chemical Composition and Antifungal Potential of Citronella (*Cymbopogon nardus*) Leaves Essential Oil and its Major Compounds, **Journal of Essential Oil Bearing Plants**. V.24, n.3, p.571-581, 2021. DOI: 10.1080/0972060X.2021.1942231.

KHAN, M.S.A.; AHMAD, I. Biofilm inhibition by *Cymbopogon citratus* and *Syzygium aromaticum* essential oils in the strains of *Candida albicans*. **Journal of Ethnopharmacology**, V. 140, n. 2, p. 416-423, 2012. DOI: 10.1016/j.jep.2012.01.045.

KLASINC, R.; RIESENHUBER, M.; BACHER, A.; WILLINGER, B. Invasive Fungal Infection Caused by *Exophiala dermatitidis* in a Patient After Lung Transplantation: Case Report and Literature Review. **Mycopathologia**. V. 184, p. 107–113. 2019. DOI: 10.1007/s11046-018-0275-4.

KONUK, H.B.; ERGÜDEN, B. Phenolic –OH group is crucial for the antifungal activity of terpenoids via disruption of cell membrane integrity. **Folia Microbiologica**. V.65, p.775–783, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12223-020-00787-4>.

KOWALCZYK, A.; PRZYCHODNA, M.; SOPATA, S.; BODALSKA, A.; FECKA, I. Thymol and Thyme Essential Oil-New Insights into Selected Therapeutic Applications. **Molecules**. V.25 (18), 4125, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules25184125>.

LATAWA, A.; PANDA, I.; KAUR, H.; AGGARWAL, A.; RADOTRA, B. D.; GUPTA, K.; SALUNKE, P. Cerebral phaeohyphomycosis: The ‘Dark Side’ of fungal infections. **Clinical Neurology and Neurosurgery**. V. 214. 2022. DOI:10.1016/j.clineuro.2022.107173.

LEITE, M.C.A.; BEZERRA, A.P.B.; SOUSA, J.P. DE.; LIMA, E.O. Investigating the antifungal activity and mechanism(s) of geraniol against *Candida albicans* strains. **Medical Mycology**. V.53, n.3, p. 275–284, Apr, 2015.

LIMA, A. C. C.; SANTOS, D. W. C. L.; HIRATA, S. H.; NISHIKAKU, A. S.; ENOKIHARA, M. M. S. S.; OGAWA, M. M. Therapeutic management of subcutaneous phaeohyphomycosis and chromoblastomycosis in kidney transplant recipients: a retrospective study of 82 cases in a single center. **International Journal of Dermatology**. V.61, n.3, p. 346-351, 2022. DOI:10.1111/ijd.15948.

LIN, L.; XU, J. Fungal Pigments and Their Roles Associated with Human Health. **Journal of Fungi** (Basel). V.6, n.4, 2020. DOI: 10.3390/jof6040280.

LIU, R.; MENG, X.; MO, C.; WEI, X.; MAL, A. Melanin of fungi: from classification to application. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. V. 38, n. 228, 2022. DOI:10.1007/s11274-022-03415-0

LUDWICZUK, A.; SKALICKA-WOŹNIAK, K.; GEORGIEV, M. I. Terpenoids. In: Badal, S.; Delgoda, R. (Org.). **Pharmacognosy: Fundamentals, Applications and Strategies**. Chapter 11, Academic Press; 2017. p. 233-266. DOI:10.1016/B978-0-12-802104-0.00011-1

LYRA, L. P. S. **Desenvolvimento de nanoemulsão de geraniol e óleo essencial da palmarosa (*Cymbopogon martinii*) e sua ação inibitória sobre linhagens de *Cutibacterium acnes***. 2019. 129f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação Biologia Geral e Aplicada, Área de aplicação: Biologia de Parasitas e Micro-organismos, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, São Paulo, 2019.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. Microbiologia de Brock. 10. Ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2010.

MARTIN-SANCHEZ, P. M.; NOVÁKOVÁ, A.; BASTIAN, F.; ALABOUVETTE, C.; SAIZ-JIMENEZ, C. Use of biocides for the control of fungal outbreaks in subterranean environments: the case of the Lascaux Cave in France. **Environmental Science Technology**. V.46, n.7, p.3762-3770. 2012. DOI: 10.1021/es2040625.

MEGIOLARO, F. **Potencial biotecnológico de fungos melanizados na degradação e assimilação de hidrocarbonetos**. 2016. 78f. Dissertação (mestrado). Videira: Universidade do Oeste de Santa Catarina, 2016.

MICHALCZYK, A.; OSTROWSKA, P. Essential oils and their components in combating fungal pathogens of animal and human skin. **Journal of Medical Mycology**. V.31, n.2, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2021.101118>.

MODY, P.; WADA, P.; BLOCH, K. C. *et al.* Gram stain to the rescue: a case report of cerebral phaeohyphomycosis by *Cladophialophora bantiana* in an immunocompetent 24-year-old. **BMC Infectious Diseases**. V.22, n.13, 2022. DOI: 10.1186/s12879-021-07008-4.

MOURÃO, D.S.C.; PEREIRA, T.F.S. de SOUZA, D.J.; CHAGAS JÚNIOR, A.F.; DALCIN, M.S.; VELOSO, R.A.; LEÃO, E.U.; dos SANTOS. G.R. Essential Oil of *Cymbopogon citratus* on the Control of the *Curvularia* Leaf Spot Disease on Maize. **Medicines**. V.4, n. 62, 2017. DOI: 10.3390/medicines4030062.

NASCIMENTO, G. A. do.; SOUZA, D. S. de.; LIMA, B. S., VASCONCELOS, C. M. L. de.; ARAÚJO, A. A. de S.; DURÇO, A. O.; QUINTANS-JUNIOR, L. J.; ALMEIDA, J. R. G. da S.; OLIVEIRA, A. P.; SANTANA-FILHO, V. J. de.; BARRETO, A. S.; SANTOS, M. R. V. dos. Bradycardic and Antiarrhythmic Effects of the D-Limonene in Rats. **Arquivos Brasileiros De Cardiologia**. V. 113, n. 5, p. 925–932, Fev. 2019.

NASCIMENTO, MMF. **Ecologia molecular de leveduras negras**. [Dissertação]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2013.

NAZZARO, F., FRATIANNI, F., Coppola, R., Feo, V. Essential Oils and Antifungal Activity. **Pharmaceuticals** (Basel). V.10, n.4, 2017. DOI: 10.3390/ph10040086.

OLIVEIRA FILHO, J.G.; da CRUZ SILVA, G.; de AGUIAR, A.C. *et al.* Chemical composition and antifungal activity of essential oils and their combinations against *Botrytis cinerea* in strawberries. **Food Measure**. V.15, p.1815–1825, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11694-020-00765-x>

OLIVEIRA, R. C.; CARVAJAL-MORENO, M.; CORREA, B.; ROJO-CALLEJAS, F.; Cellular, physiological and molecular approaches to investigate the antifungal and anti-aflatoxigenic effects of thyme essential oil on *Aspergillus flavus*. **Food Chemistry**. Volume 315, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.126096>.

ÖNEM, E. New green solutions against bacterial resistance: palmarosa (*Cymbopogon martini*) essential oil and quorum sensing. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**. V. 25, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scp.2021.100587>

PARAMALINGAM, P.; BAHARUM, N.A.; ABDULLAH, J.O.; HONG, J.K.; SAIDI, N.B. Antifungal Potential of *Melaleuca alternifolia* against Fungal Pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense*. Tropical Race 4. **Molecules**. V.28, n. 11, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules28114456>

PERLIN, D. S.; RAUTEMAA-RICHARDSON, R.; ALASTRUEY-IZQUIERDO, A. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. In **The Lancet Infectious diseases**. V. 17, n. 12, p. 382-392, 2017. DOI: 10.1016/S1473-3099(17)30316-X.

PROBST, I. S. **Atividade antibacteriana de óleos essenciais e avaliação de potencial sinérgico**. 2012. 100f. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu.

PROCHNOW, D. **Caracterização morfo-anatômica e metabólica de espécies do gênero *Cymbopogon*: uma contribuição para o melhoramento das espécies**. 2014. 103f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal de Pelotas, 2014.

QUEIROZ-TELLES, F.; de HOOG, S.; SANTOS, D. W.; SALGADO, C. G.; VICENTE, V. A.; BONIFAZ, A. *et al.* Cromoblastomicose. **Clinical Microbiology Reviews**. V. 30, n. 1, p. 233–276, Jan.2017. DOI: 10.1128/CMR.00032-16.

QUEIROZ-TELLES, F.; FAHAL, A. H.; FALCI, D. R.; CACERES, D. H.; CHILLER, T.; PASQUALOTTO, A. C. Neglected endemic mycoses. In **The Lancet Infectious diseases**. V. 17, n. 11, p. 367-377, Nov.2017. DOI:10.1016/S1473-3099(17)30306-7.

RAKSHAN, A.; KAMEL, B.R., SAFFAEI, A.; TAVAKOLI-ARDEKANI, M. Hepatotoxicity Induced by Azole Antifungal Agents: A Review Study. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**. V.22, n.1, 2023. DOI: <https://doi.org/10.5812/ijpr-130336>.

RASHED, A. A.; RATHI, D.-N.G.; NASIR, N.A.H.A.; RAHMAN, A.Z.A. Antifungal Properties of Essential Oils and Their Compounds for Application in Skin Fungal Infections: Conventional and Nonconventional Approaches. **Molecules**. V.26, n. 4, p. 1-44, 2021. DOI: 10.3390/molecules26041093

REVANKAR, S. G.; SUTTON, D. A. Melanized Fungi in Human Disease. **Clinical Microbiology Reviews**. V. 23, n. 4, p. 884–928. 2010. DOI: 10.1128/CMR.00019-10.

RIBEIRO, M. C. M. C.; OLIVEIRA, V. C. de.; VIRGENS, A. P. das.; PEREIRA, T. Development of natural cosmetics with essential oils of capim-santo and rose pepper with extraction by enzymatic process. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 15, p. 01-08, 2022. DOI: 10.33448/rsd-v11i15.37174.

SHAHRAJABIAN, M.H.; SUN, W.; CHENG, Q. Chemical components and pharmacological benefits of Basil (*Ocimum basilicum*): a review, **International Journal of Food Properties**. V.23, n.1, p.1961-1970, 2020. DOI: 10.1080/10942912.2020.1828456.

SAHAY, S. Environment-isolates of black yeasts from Ekant park. **Biomedical & Pharmacology Journal**. V. 6, n. 2, p. 395–397. 2013. DOI: 10.13005/bpj/433

SANDOVAL-DENIS, M.; GENÉ, J.; SUTTON, D.; GUARRO, J. *Penidiellopsis radicularis* gen. et sp. nov. Fungal Planet description sheets, IN: **Persoonia** V.36, p.438-439, 2016. DOI: 10.3767/003158516X692185.

SANTOS, M. A. dos. **Bioatividade de extratos e óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf frente ao fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides***. 2021. 70 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Sistemas Agroindustriais) - Programa de Pós-Graduação em Sistemas Agroindustriais, Centro de Ciências e Tecnologia Agroalimentar, Universidade Federal de Campina Grande, Pombal, Paraíba, Brasil, 2021.

SATOW, M.M.; ATTILI-ANGELIS, D.; de HOOG, G.S.; ANGELIS, D.F.; VICENTE, V.A. Selective factors involved in oil flotation isolation of black yeasts from the environment. **Studies in Mycology**. V.61, p.157–163. 2008. DOI:10.3114/sim.2008.61.16.

SHARMA, A., RAJENDRAN, S., SRIVASTAVA, A., SHARMA, S., KUNDU, B. Antifungal activities of selected essential oils against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* 1322, with emphasis on *Syzygium aromaticum* essential oil. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. V.123, n.3, P. 308-313, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2016.09.011>.

SELBMANN, L.; ONOFRI, S.; COLEINE, C.; BUZZINI, P.; CANINI, F.; ZUCCONI, L. Effect of environmental parameters on biodiversity of the fungal component in lithic Antarctic communities. **Extremophiles**. V. 21, p.1069–1080, 2017. DOI: 10.1007/s00792-017-0967-6.

SEBRAE

<https://sebraepr.com.br/comunidade/artigo/sebrae-em-dados-mercado-de-produtos-naturais-no-brasil>

SILVA, P. Fármacos antifúngicos. In: **Farmacologia**. 8. ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan; p.1076-1083, 2010.

SILVA, A.A., PEREIRA, F.A.C., DE SOUZA, E.A. *et al.* Inhibition of anthracnose symptoms in common bean by treatment of seeds with essential oils of *Ocimum gratissimum* and *Syzygium aromaticum* and eugenol. **European Journal of Plant Pathology**. V. 163, p. 865–874, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10658-022-02525-7>.

SMITH, D. F. Q.; CASADEVALL, A. The Role of Melanin in Fungal Pathogenesis for Animal Hosts. In: **Fungal Physiology and Immunopathogenesis**. Current Topics in Microbiology and Immunology. V. 422. 2019. pp. 1-30. Springer, Cham. DOI:10.1007/82_2019_173.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C.M.O; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P. de; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ed. Porto Alegre; Editora da UFRGS, 2007, p. 467-495.

SIMÕES, R. J. G., **Óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia* e o seu interesse em cosmética**. 2022. 69 f. Dissertação (mestrado em ciências farmacêuticas), Universidade do Algarve, 2022.

SOUZA, M. V. de C.; CARVALHO, J. G. de.; FALCÃO, L. C. N.; SANTOS, L. P. M. dos.; COELHO, M. L. Propriedades fitoquímicas, uso terapêutico e toxicidade da *Mentha piperita*. **Revista de Casos e Consultoria**. V. 12, n. 1, p. e27028, 2021. <https://periodicos.ufrn.br/casoseconsultoria/article/view/27028>.

STEVIC, T.; BERIC, T.; ŠAVIKIN, K.; SOKOVIĆ, M.; GOĐEVAC, D.; DIMKIĆ, I.; STANKOVIĆ, S. Antifungal activity of selected essential oils against fungi isolated from medicinal plant. **Industrial Crops and Products**, V.55, p.116-122, 2014. DOI: 10.1016/j.indcrop.2014.02.011.

TORTORA GJ. **Microbiologia**. Coautoria de Berdell R Funke, Christine L Case. 10. ed. Porto Alegre, RS: Artmed; c2012.

TRINDADE, L.A.; CORDEIRO, L.V.; DE FIGUERÊDO SILVA, D. *et al*. The antifungal and antibiofilm activity of *Cymbopogon nardus* essential oil and citronellal on clinical strains of *Candida albicans*. **Braz J Microbiol**. V.53, p.1231-1240, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s42770-022-00740-2>.

UGBOGU, O.C.; EMMANUEL, O.; AGI, G.O.; CHIBUIKE IBE, C.; EKWEOGU, C.N.; UDE, V.C.; UCHE, M.E.; NNANNA, R.O.; UGBOGU, E.A. A review on the traditional uses, phytochemistry, and pharmacological activities of clove basil (*Ocimum gratissimum* L.). **Heliyon**. V.7, n.11, 2021, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e08404>.

USUDA, D.; HIGASHIKAWA, T.; HOTCHI, Y.; USAMI, K.; SHIMOZAWA, S.; TOKUNAGA, S.; OSUGI, I.; KATOU, R.; ITO, S.; YOSHIZAWA, T.; ASAKO, S.; MISHIMA, K.; KONDO, A.; MIZUNO, K.; TAKAMI, H.; KOMATSU, T.; OBA, J.; NOMURA, T.; SUGITA, M. *Exophiala dermatitidis*. **World Journal Clinical Cases**. V. 09, n. 27, p. 7963-7972, 2021. DOI:10.12998/wjcc.v9.i27.7963.

VASCONCELOS, S. C.; RÉGIS, L. A.; MENEZES FILHO, A. C. P. de.; CAZAL, C. de M.; PEREIRA, P. S.; CHRISTOFOLI, M. Chemical composition, bactericidal, and antioxidant activity of the essential oils in the leaves of *Ocimum basilicum* and *Ocimum gratissimum* (Lamiaceae). **Research, Society and Development**, V.10, n. 8, 2021. DOI: 10.33448/rsd-v10i8.17109.

VICENTE, V. A.; ATTILI-ANGELIS, D.; PIE, M. R.; QUEIROZ-TELLES, F.; CRUZ, L. M.; NAJAFZADEH, M. J.; HOOG, G. S.; ZHAO, J.; PIZZIRANI-KLEINER, A. Environmental isolation of black yeast-like fungi involved in human infection. **Studies in Mycology**. V. 61, p. 137–44. 2008. DOI: 10.3114/sim.2008.61.14.

VITIELLO, A.; FERRARA, F.; BOCCELLINO, M.; PONZO, A.; CIMMINO, C.; COMBERIATI, E.; ZOVI, A.; CLEMENTE, S.; SABBATUCCI, M. Antifungal Drug Resistance: An Emergent Health Threat. **Biomedicines**. V.11, n.4, 2023. DOI: 10.3390/biomedicines11041063.

WANG, C.; XING, H.; JIANG, X.; ZENG, J.; LIU, Z.; CHEN, J.; WU, Y. Cerebral Phaeohyphomycosis Caused by *Exophiala dermatitidis* in a Chinese CARD9-Deficient Patient: A Case Report and Literature Review. **Frontiers in Neurology**. V. 3, n. 10, 2019. DOI:10.3389/fneur.2019.00938.

WHITE, T.J., BRUNS, T., LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J., Eds., PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, **Academic Press**, San Diego, 315-322. 1990. DOI: 10.1016/b978-0-12-372180-8.50042-1.

XAVIER, A. L. dos S.; FRANÇA, K. R. da S.; CARDOSO, T. A. L. Effect of the essential oil of palmarosa (*Cymbopogon martinii*) on fungos phitopatogenic in soybean seeds. **Research, Society and Development**. V.9, n.10, p. e4529108660, 2020. DOI: 10.33448/rsd-v9i10.8660.

YOU, Z.; YANG, X.; YU, J.; ZHANG, J.; RAN, Y. Chromoblastomycosis Caused by *Fonsecaea nubica*: First Report in Northern China and Literature Review. **Mycopathologia**. V. 13; n. 184, p. 97–105. 2019. DOI: 10.1007/s11046-018-0307-0.

ZAJC, J.; GOSTINČAR, C.; CERNOŠA, A.; GUNDE-CIMERMAN, N. Stress-Tolerant Yeasts: Opportunistic Pathogenicity Versus Biocontrol Potential. **Genes**. V. 10, n. 42, 2019. DOI:10.3390/genes10010042.

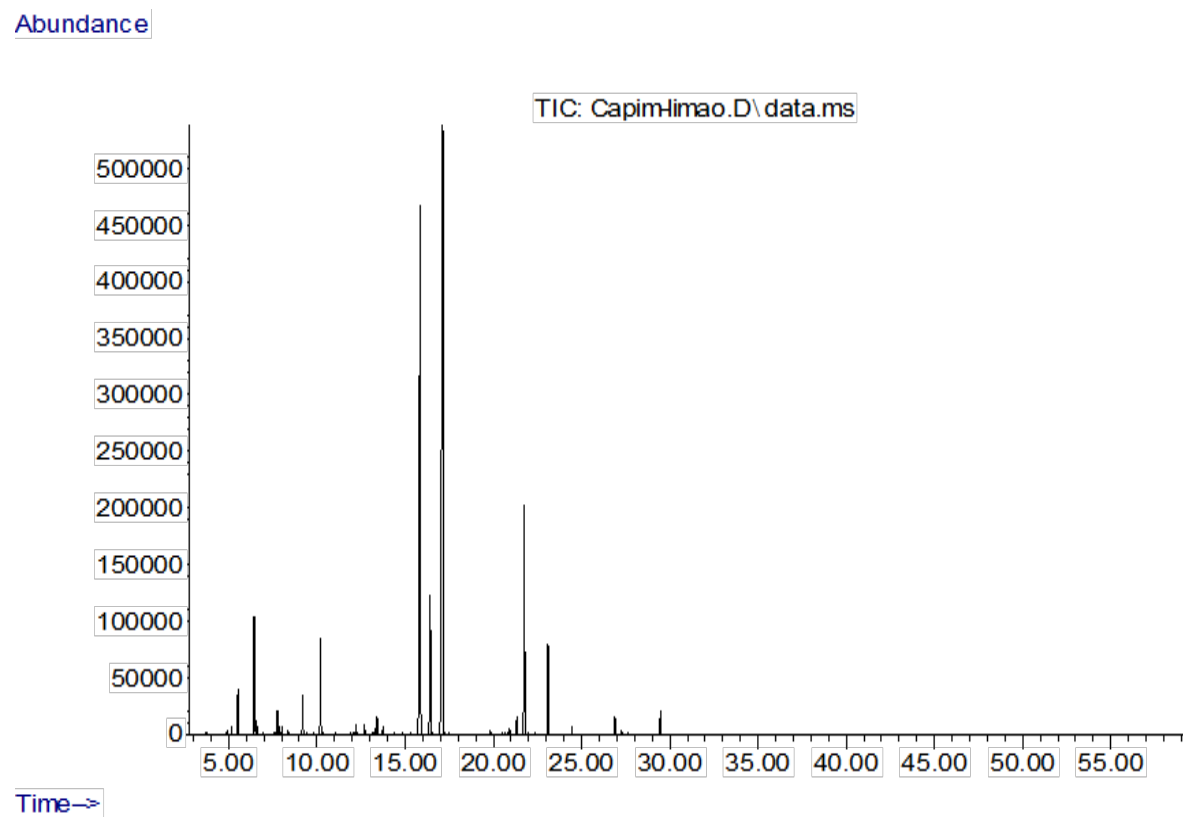
ZALAR, P.; ZUPANČIČ, J.; GOSTINČAR, C.; ZAJC, J.; HOOG, G. S. DE.; DE LEO, F.; AZUA-BUSTUS, A.; GUNDE-CIMERMAN, N. The extremely halotolerant black yeast *Hortaea werneckii* - a model for intraspecific hybridization in clonal fungi. **IMA Fungus**. V.10, n.10, p. 2019. DOI: 10.1186/s43008-019-0007-5.

ZIMMERMANN, R.C.; POITEVIN, C.G.; DA LUZ, T.S. *et al.* Antifungal activity of essential oils and their combinations against storage fungi. **Environmental Science and Pollution Research**. V.30, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-023-25772-5>.

ZULFIKAR; ADITAMA, W; SITEPU, F.Y. The effect of lemongrass (*Cymbopogon nardus*) extract as insecticide against *Aedes aegypti*. **International Journal of Mosquito Research**. V. 6, n. 1, p. 101-103, 2019.

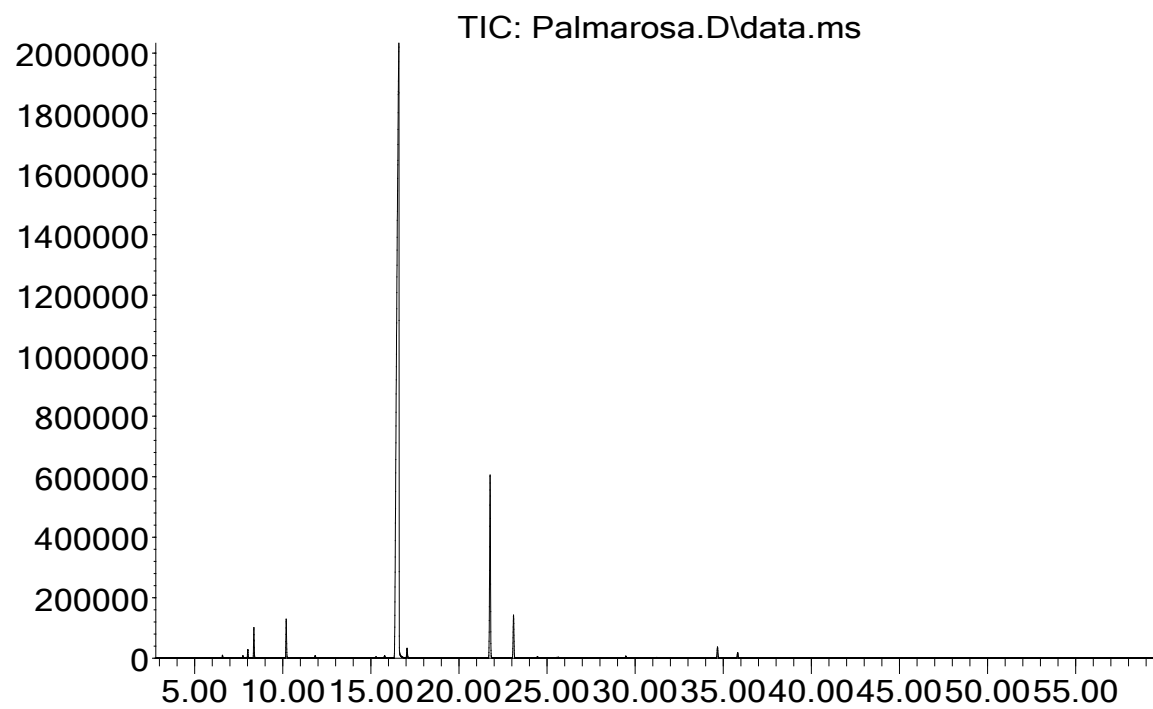
8. Apêndices

Apêndice 1. Cromatograma do óleo essencial de *C. citratus*



Apêndice 2. Cromatograma do óleo essencial de *C. martinii*

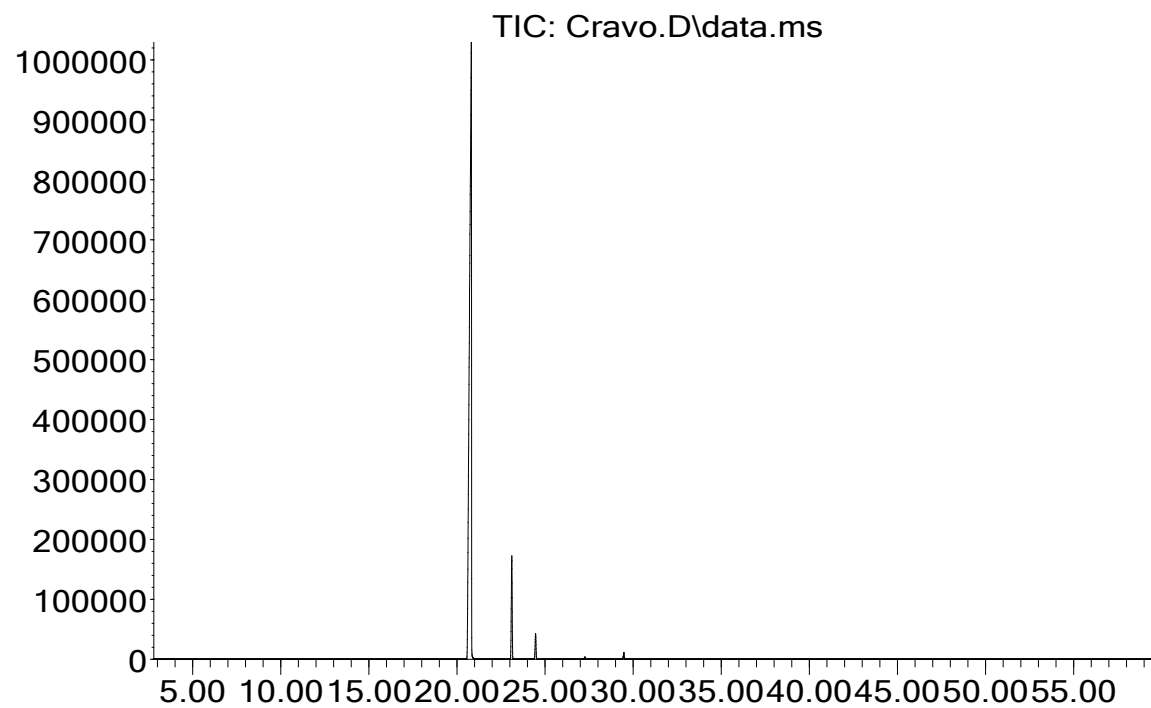
Abundance



Time-->

Apêndice 3: Cromatograma do óleo essencial de *S. aromaticum*

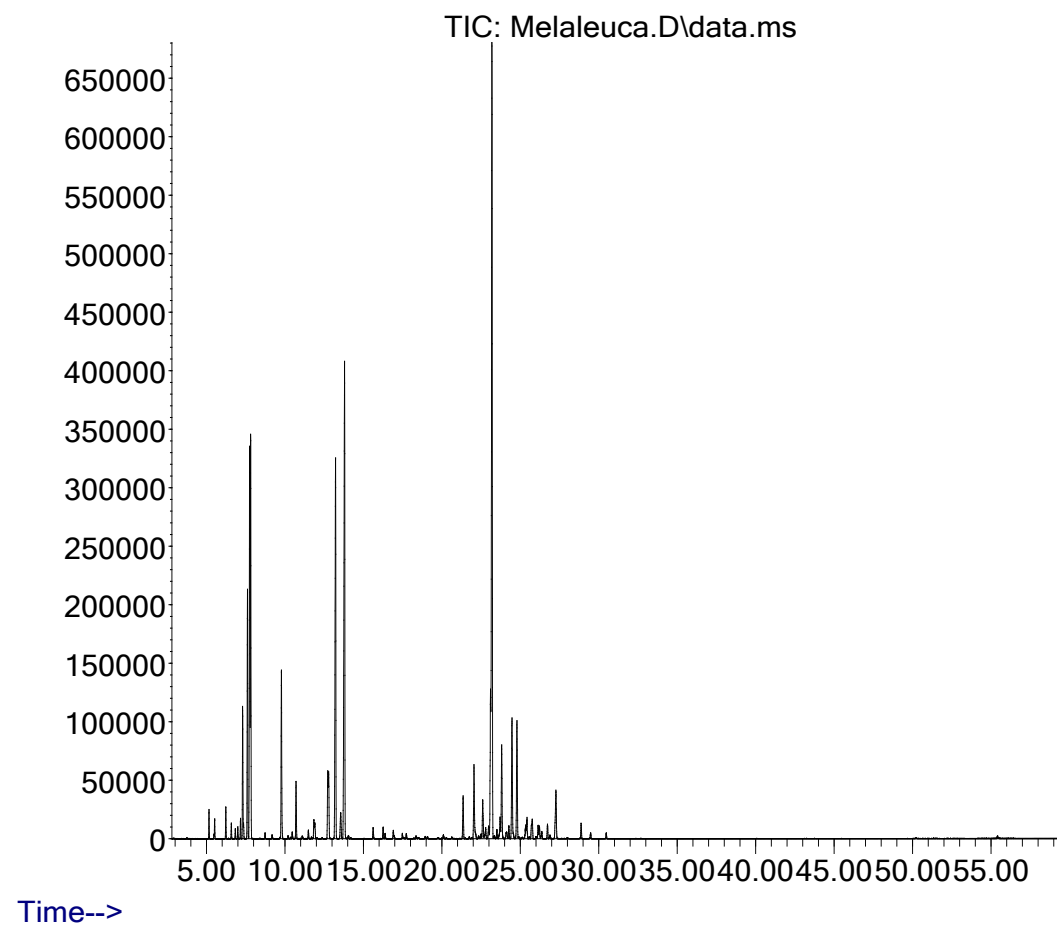
Abundance



Time-->

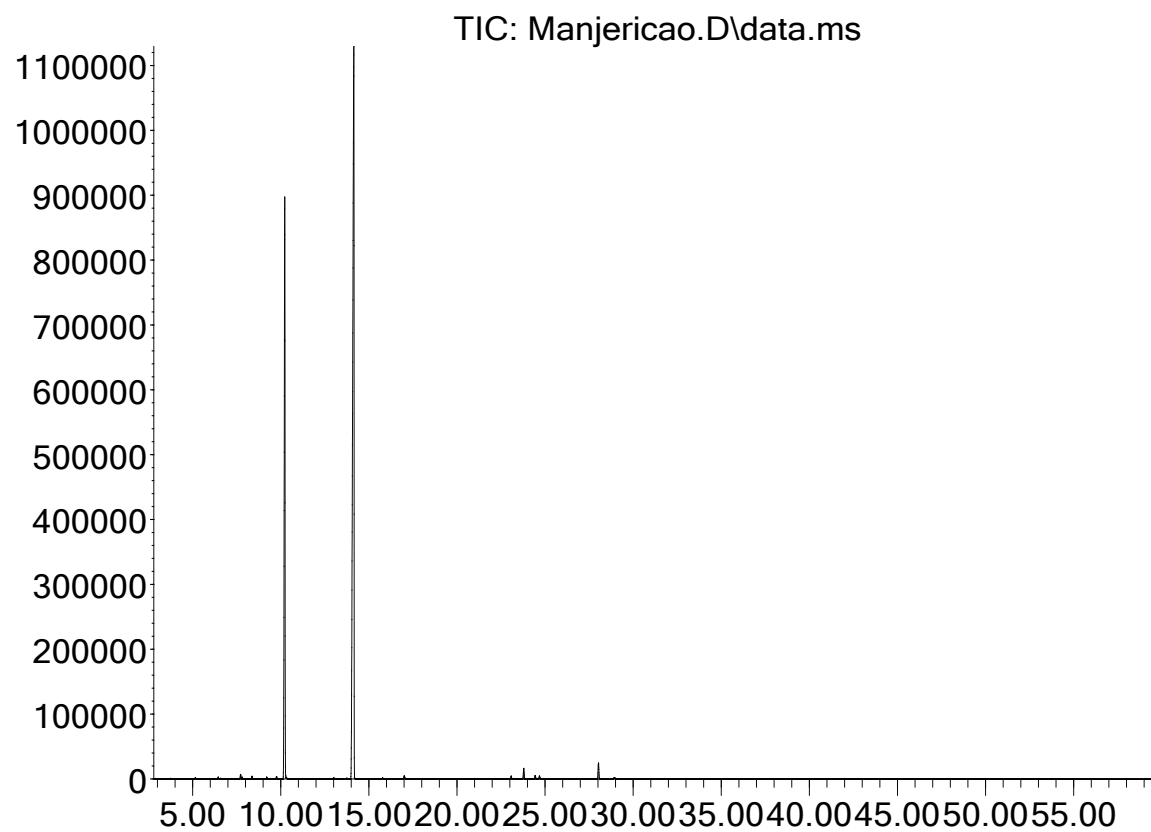
Apêndice 4: Cromatograma do óleo essencial de *M. alternifolia*

Abundance



Apêndice 5: Cromatograma do óleo essencial *O. basilicum*

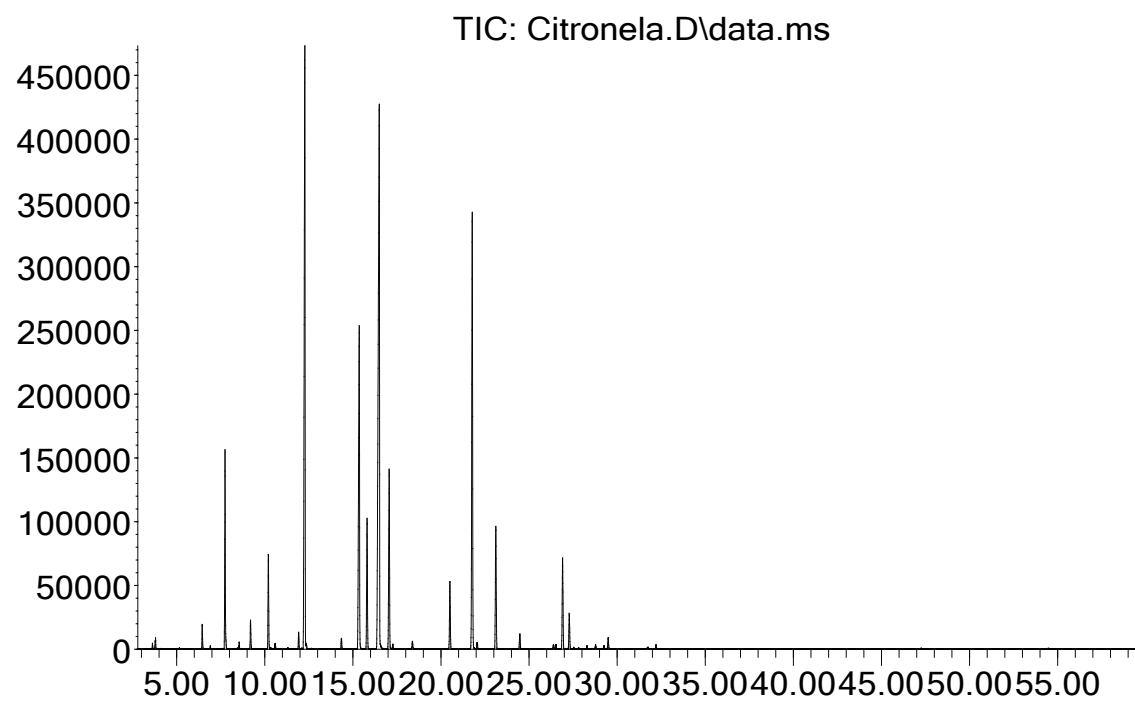
Abundance



Time-->

Apêndice 6: Cromatograma do óleo essencial *C. nardus*

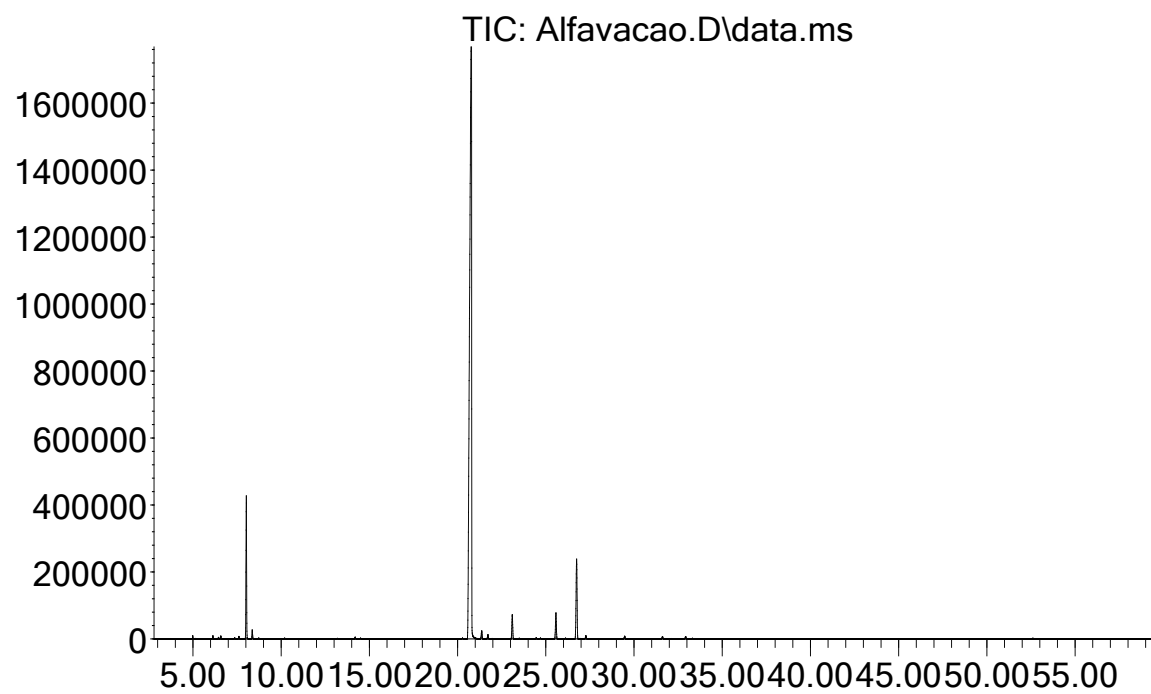
Abundance



Time-->

Apêndice 7: Cromatograma do óleo essencial de *O. gratissimum*

Abundance

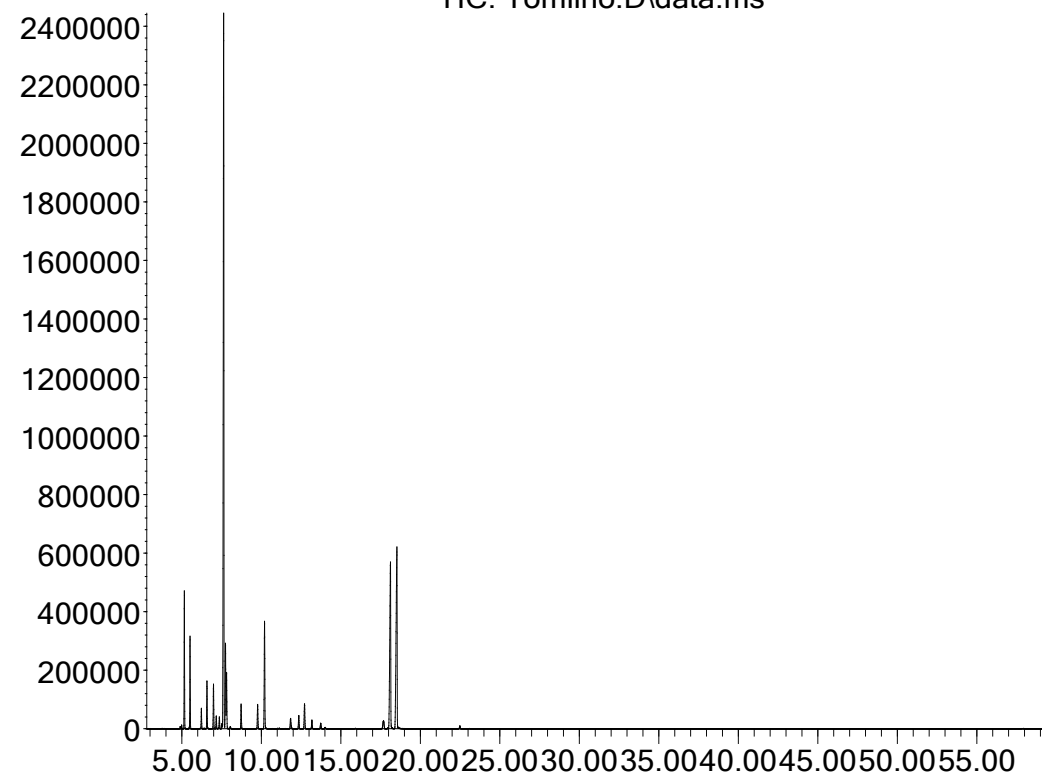


Time-->

Apêndice 8: Cromatograma do óleo essencial de *T. vulgaris*

Abundance

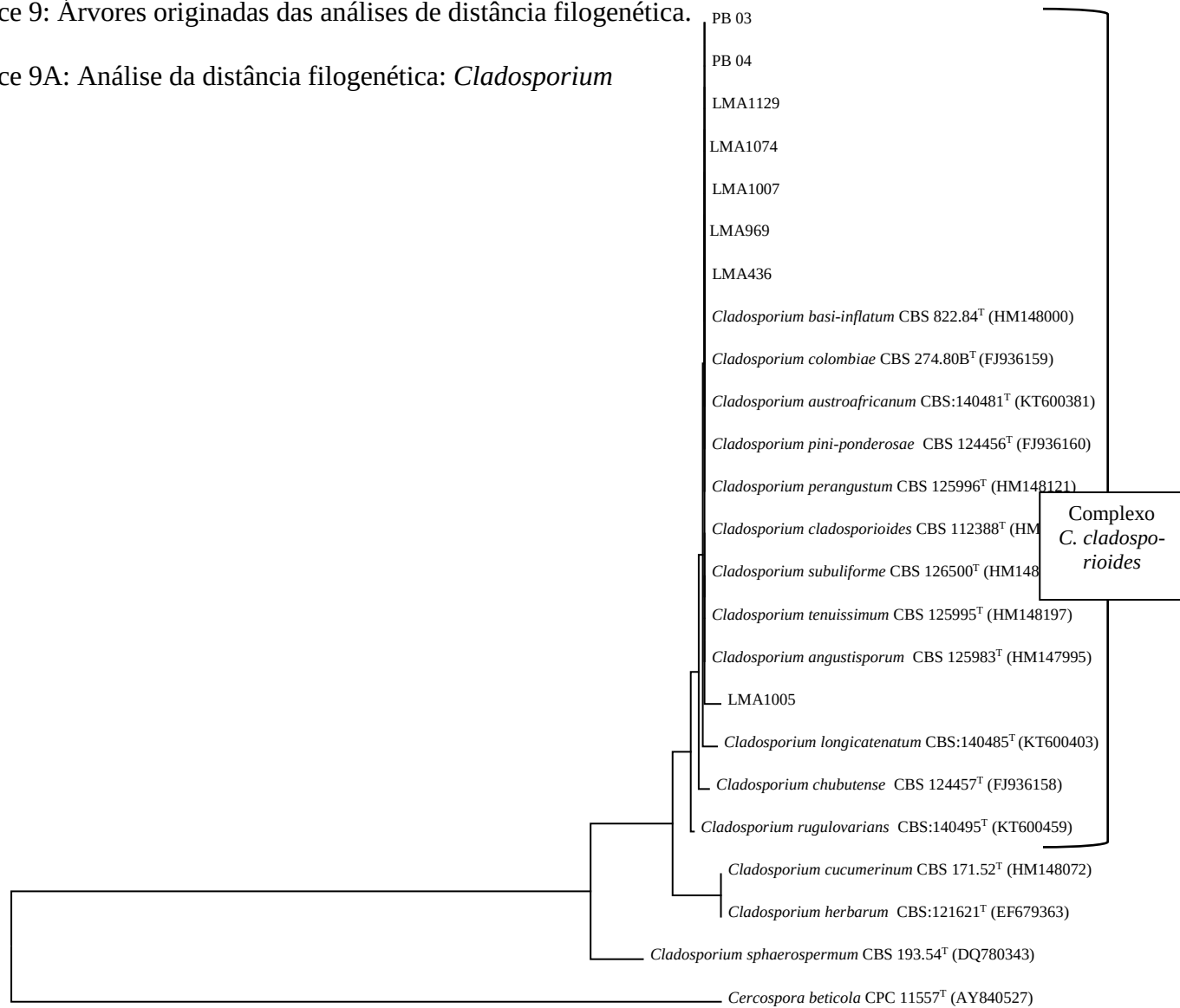
TIC: Tomilho.D\data.ms

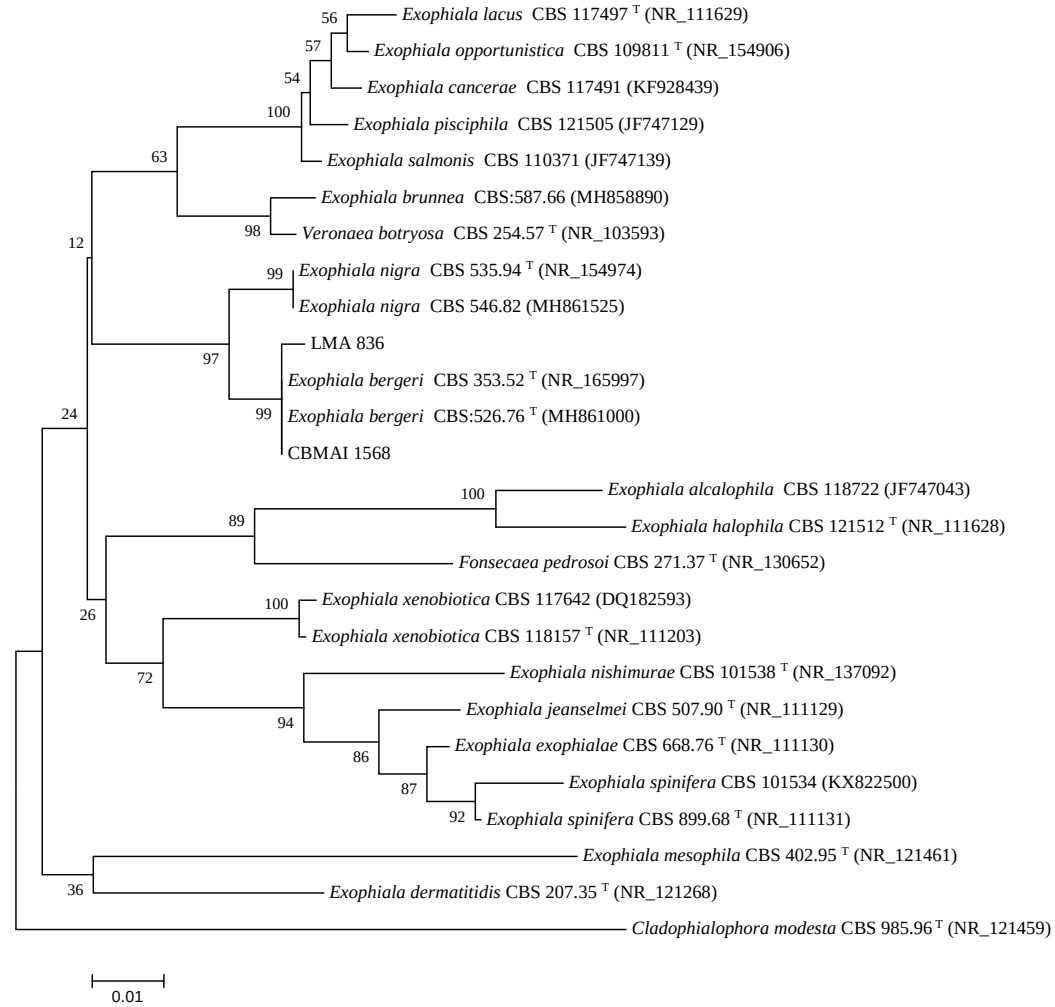


Time-->

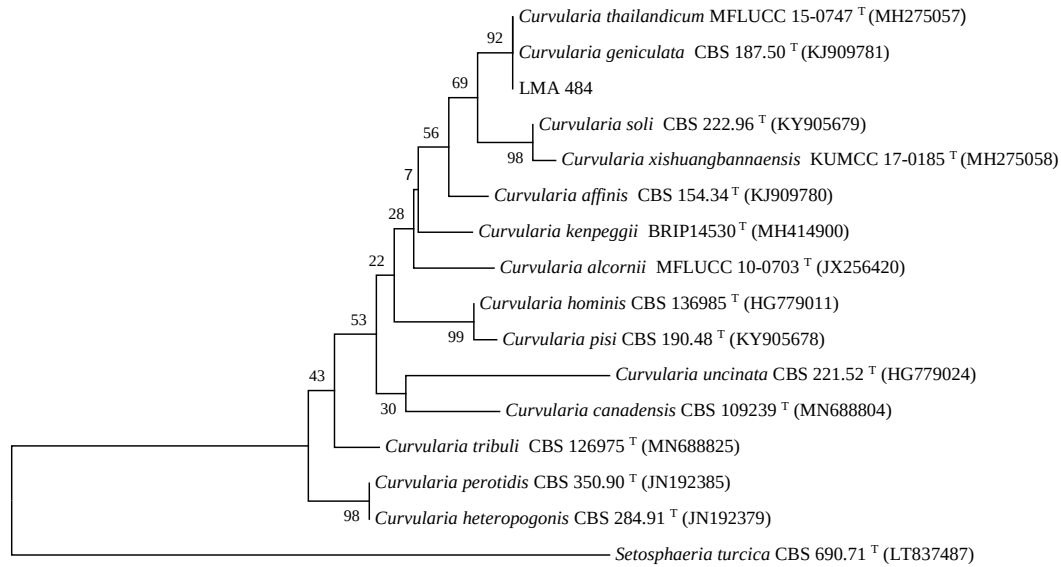
Apêndice 9: Árvores originadas das análises de distância filogenética.

Apêndice 9A: Análise da distância filogenética: *Cladosporium*

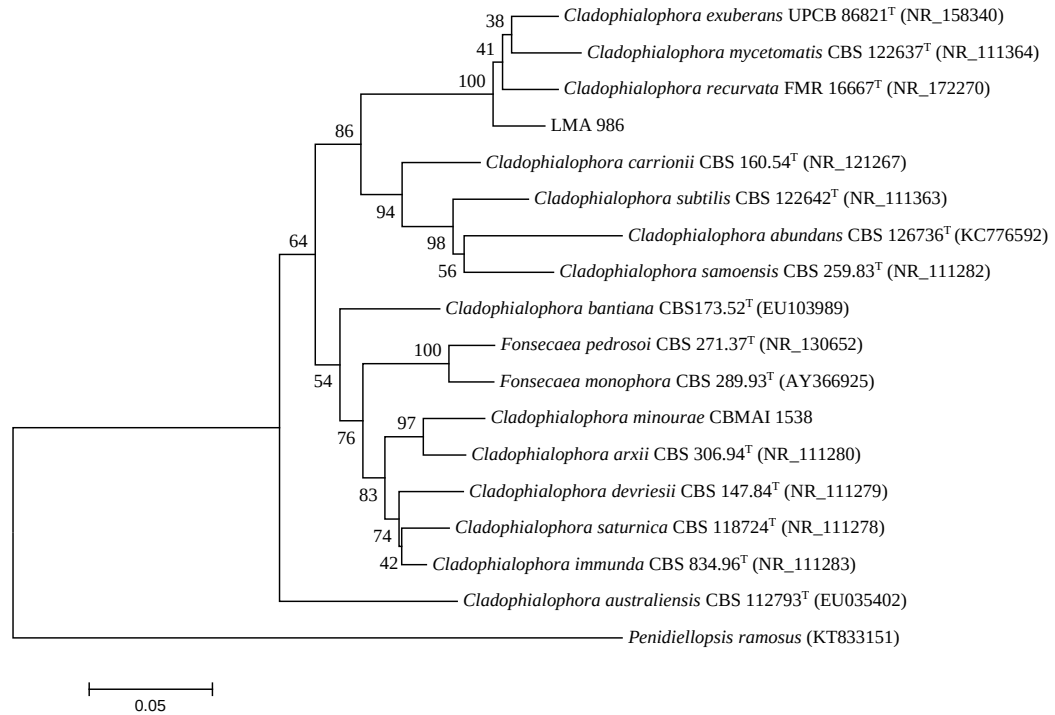


Apêndice 9B: Análise da distância filogenética: *Exophiala*

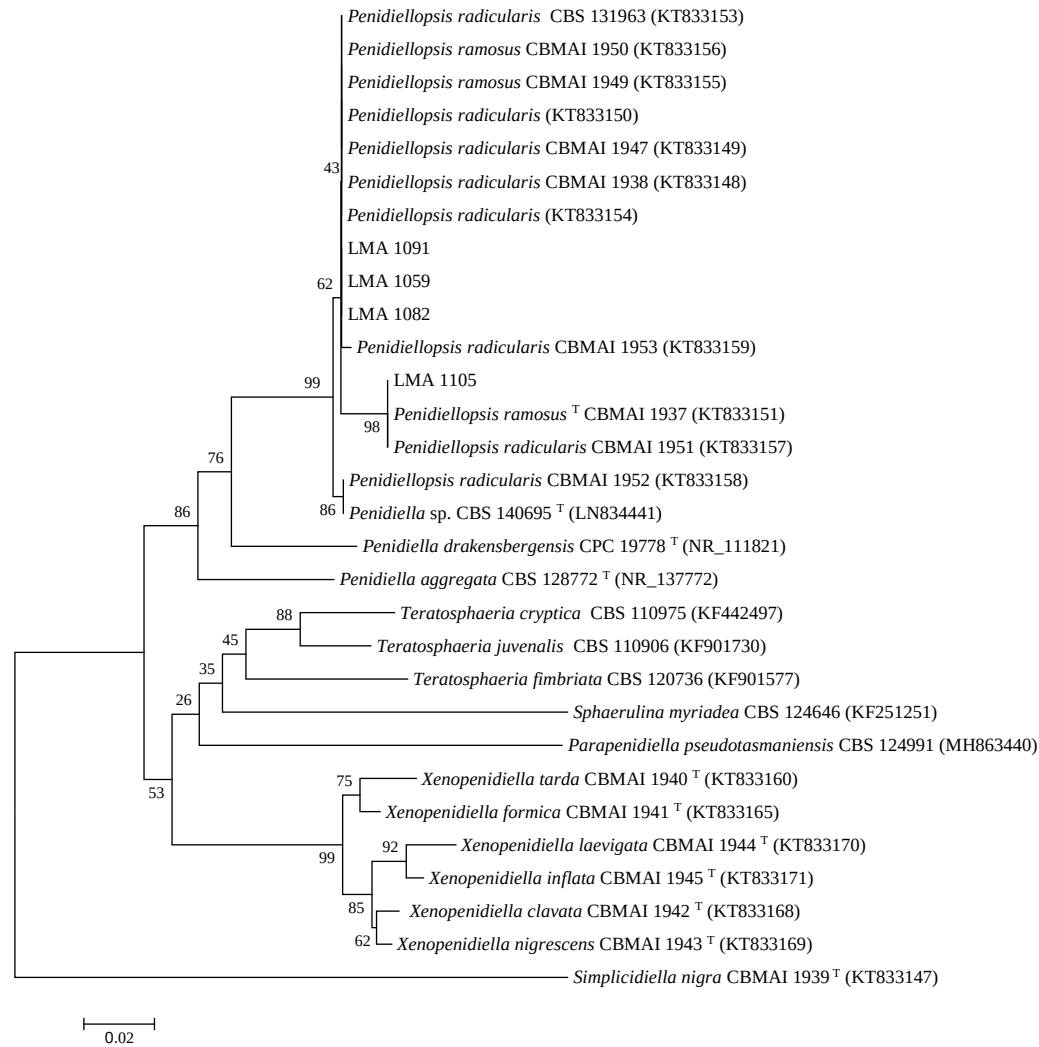
Apêndice 9C: Análise da distância filogenética: *Curvularia*



Apêndice 9D: Análise da distância filogenética: *Cladophialophora*



Apêndice 9E: Análise da distância filogenética: *Penidiellopsis*



Apêndice 9F: Análise da distância filogenética: *Fonsecaea*

