

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

BEATRIZ GOMES DE SOUZA SANTOS

AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DA ATIVIDADE QUERATINOLITICA DE
DERMATÓFITOS E DO *BACILLUS SUBTILIS* PELO MONOTERPENO LINALOL

DUQUE DE CAXIAS, RJ

2023

BEATRIZ GOMES DE SOUZA SANTOS

AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DA ATIVIDADE QUERATINOLITICA DE
DERMATÓFITOS E DO *BACILLUS SUBTILIS* PELO MONOTERPENO LINALOL

Monografia apresentada à Universidade Federal do Rio de Janeiro, Campus Duque de Caxias Prof. Geraldo Cidade, como pré-requisito para a obtenção do grau de bacharel em Ciências Biológicas: Biotecnologia.

Orientador: Prof^a Dr. Daniela Sales Alviano Moreno
Prof^a Dr. Celuta Sales Alviano.

Duque de Caxias, RJ

2023

CIP - Catalogação na Publicação

d633a de Souza Santos, Beatriz Gomes
AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DA ATIVIDADE
QUERATINOLITICA DE DERMATÓFITOS E DO
BACILLUS SUBTILIS PELO MONOTERPENO LINALOL /
Beatriz Gomes de Souza Santos. -- Rio de Janeiro,
2023. 41 f.

Orientadora: Daniela Sales Alviano Moreno.

Coorientadora: Celuta Sales Alviano.

Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro,
Campus Duque de Caxias Professor Geraldo Cidade,
Bacharel em Ciências Biológicas: Biotecnologia,
2023.

1. linalol. 2. dermatófito. 3. atividade
queratinolítica. 4. bacillus subtilis. I. Sales
Alviano Moreno, Daniela, orient. II. Sales Alviano,
Celuta, coorient. III. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Beatriz Gomes de Souza Santos

AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DA ATIVIDADE QUERATINOLITICA DE
DERMATÓFITOS E DO *BACILLUS SUBTILIS* PELO MONOTERPENO LINALOL

Monografia apresentada à Universidade Federal do Rio de Janeiro, Campus Duque de Caxias Prof. Geraldo Cidade, como pré-requisito para a obtenção do grau de bacharel em Ciências Biológicas: Biotecnologia.

Aprovada em

(Daniela Sales Alviano Moreno, Doutorado, IMPG-UFRJ)

(Rodrigo Rollin Pinheiro, Doutorado, IMPG-UFRJ)

(Carolina Alvares da Cunha de Azeredo Braga, Doutorado, UFRJ-Duque de Caxias)

AGRADECIMENTOS

Agradeço toda minha família pelo infinito amor, dedicação e apoio durante todos os anos da minha vida, sendo minha base e minha referência. Agradeço, especialmente, aos meus pais, Maria Cristina e Adonias, que me incentivam sempre a ser uma pessoa melhor e fazer o meu máximo para entregar o que estou fazendo, e por serem minha maior motivação para continuar.

Agradeço aos meus todos amigos por fazerem parte da minha vida nessa etapa tão cheia de descobertas, com a presença deles os meus dias foram os mais felizes e levarei nossos momentos no meu coração para toda minha existência.

Agradeço às professoras Daniela e Celuta pela orientação acadêmica e prática ao longo desse período de graduação, pela oportunidade de aprendizado acadêmico e crescimento profissional e pessoal, por serem inspirações de profissionais na ciência.

Agradeço aos colegas de laboratório pelos ensinamentos, amizade e troca de conhecimento e experiências.

Agradeço a Universidade Federal do Rio de Janeiro Campus Duque de Caxias Professor Geraldo Cidade, ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes e ao Laboratório de Estruturas de Superfície de Microrganismos por viabilizar a realização desse trabalho.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo apoio financeiro concedido em forma de bolsa de iniciação científica.

RESUMO

BEATRIZ GOMES DE SOUZA SANTOS

AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DA ATIVIDADE QUERATINOLITICA DE DERMATÓFITOS E DO *BACILLUS SUBTILIS* PELO MONOTERPENO LINALOL

Orientadoras: Daniela Sales Alviano e Celuta Sales Alviano

Resumo do Trabalho de Conclusão de Curso apresentado na Universidade Federal do Rio de Janeiro Campus Duque de Caxias Professor Geraldo Cidade, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Biotecnologia.

As dermatofitoses são infecções fúngicas bastante comuns que afetam a pele, unhas e cabelos de humanos e animais. Elas são micoses superficiais causadas por fungos do gênero *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*, conhecidos como dermatófitos. Esses fungos são microrganismos queratinolíticos que hidrolisam a queratina, principal proteína presente nos locais de sua infecção, permitindo sua invasão e colonização nos tecidos do hospedeiro. Os microrganismos queratinolíticos possuem enzimas, conhecidas como queratinases, que desempenham um papel fundamental na quebra e utilização da queratina como fonte de nutrientes. Algumas bactérias também possuem a capacidade de degradar a queratina. O *Bacillus subtilis* é uma espécie bacteriana conhecida por sua atividade queratinolítica. Essa bactéria produz diversas enzimas queratinolíticas, incluindo proteases e peptidases, que atuam na quebra da queratina. Nos últimos anos, há um crescente interesse na busca por alternativas aos antifúngicos convencionais, muitos dos quais apresentam efeitos colaterais indesejáveis. Nesse contexto, os produtos naturais, especialmente aqueles derivados de plantas medicinais, têm recebido atenção devido seu potencial na atividade antifúngica. O linalol é um monoterpene com propriedades aromáticas

presente em composições de diferentes óleos essenciais, algumas de suas propriedades biológicas já foram relatadas na literatura como propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias e antioxidantes. No óleo essencial derivado da planta *Lippia alba*, conhecida popularmente como erva-cidreira, o linalol é um dos principais compostos presentes e já foi descrito como um potencial inibidor da atividade queratinolítica de dermatófitos e bactérias bacilares. Porém os seus mecanismos de ação ainda não foram elucidados, representando um obstáculo para compreender o potencial antimicrobiano do linalol. O objetivo do presente estudo foi investigar a influência do linalol na expressão da atividade queratinolítica dos dermatófitos e da bactéria *Bacillus subtilis*. Utilizando como substrato a *Keratin azure* (queratina azul), foram realizados ensaios colorimétricos com leitura das reações em espectrofotômetro. Dessa forma, verificou-se que o linalol é capaz de inibir a atividade queratinolítica de duas das três espécies de dermatófitos estudadas: *T. rubrum* e *M. gypseum*. Em *T. rubrum* houve um potencial maior de inibição, considerando que o monoterpene foi capaz de inibir aproximadamente 80% da atividade queratinolítica. Em *M. gypseum*, o linalol inibiu aproximadamente 60% da atividade queratinolítica. Já em *E. floccosum*, o linalol não atingiu uma inibição satisfatória da atividade da queratinase. Para o *Bacillus subtilis*, verificou-se que a metodologia testada não atingiu um resultado satisfatório da ação do linalol na inibição da atividade queratinolítica. Com a inibição da queratinase dos dermatófitos, um fator importante para a gravidade da infecção, o linalol destaca-se como um potencial agente antifúngico direcionando os trabalhos futuros para a investigação aprofundada dos mecanismos de ação do monoterpene na relação parasito-hospedeiro dos fungos.

Palavras-chave: Linalol, Dermatófito, *Bacillus subtilis*, Atividade Queratinolítica.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

KOH: Hidróxido de potássio

PCR: Reação em cadeia da polimerase

DNA: Ácido desoxirribonucleico

D.O: Dosagem ótica

KCl: Cloreto de potássio

pH: Potencial hidrogeniônico

B. subtilis: *Bacillus subtilis*

B. subtilis + L: *Bacillus subtilis* mais linalol

B. subtilis (+): *Bacillus subtilis* positivo

T. rubrum: *Trichophyton rubrum*

M. gypseum: *Microsporium gypseum*

E. floccosum: *Epidermophyton floccosum*

SUMÁRIO

RESUMO	6
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	8
1 INTRODUÇÃO	11
1.1 Dermatofitose	12
1.1.1 Epidemiologia	13
1.1.2 Diagnóstico	15
1.2 Microrganismos Queratinolíticos	15
1.2.1 Queratinases	16
1.3 Plantas Medicinais e Óleos Essenciais	17
1.4 Linalol	18
1.5 Atividade Antimicrobiana do Linalol em Dermatófitos	20
1.5.1 Efeito inibitório do óleo essencial de <i>Lippia alba</i> rico em linalol na atividade queratinolítica dos dermatófitos	20
1.6 Atividade Antimicrobiana do Linalol em Bactérias	21
2 JUSTIFICATIVA	23
3 OBJETIVOS	24
3.1 Objetivo Geral	24
3.2 Objetivos Específicos	24
4 METODOLOGIA	25
4.1 Crescimento e cultivo dos microrganismos	25
4.1.1 Dermatófitos	25
4.1.2 <i>Bacillus subtilis</i>	26
4.2 Dosagem da atividade queratinolítica	26
4.2.1 Dermatófitos	27
4.2.2 <i>Bacillus subtilis</i>	27
4.3 Análise de Dados	28

5	RESULTADOS	30
5.1	Inibição da atividade queratinolítica dos dermatófitos pelo linalol	30
5.2	Atividade queratinolítica das amostras de sobrenadante de cultivo de <i>B. subtilis</i> , na ausência e na presença de linalol e o sobrenadante pré-incubado com o mesmo	32
6	DISCUSSÃO	34
7	CONCLUSÃO	36
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

1 INTRODUÇÃO

As dermatofitoses são infecções fúngicas bastante comuns que afetam a pele, unhas e cabelos de humanos e animais. Elas são causadas por fungos do gênero *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*, conhecidos como dermatófitos. Esses fungos têm a capacidade de utilizar a queratina, uma proteína estrutural presente na pele, unhas e cabelos, como fonte de nutrientes, permitindo sua invasão nos tecidos do hospedeiro (Gupta, *et al.*, 2017; Nweze, *et al.*, 2016; Peres, *et al.*, 2010).

Além dos dermatófitos, existem outros microrganismos que também possuem a capacidade de degradar a queratina, como certas bactérias queratinolíticas, como o *Bacillus subtilis* (Welsh, *et al.*, 2010; Onifade, *et al.*, 1998). A atividade queratinolítica desses microrganismos é mediada por enzimas conhecidas como queratinases, que são capazes de quebrar os componentes da queratina em aminoácidos e peptídeos menores, que podem ser utilizados como fonte de nutrientes. (Li Q., 2021; Bragulla, *et al.*, 2009)

Nos últimos anos, houve um crescente interesse na busca por alternativas aos antifúngicos convencionais, muitos dos quais apresentam efeitos colaterais indesejáveis. Nesse contexto, os produtos naturais, especialmente aqueles derivados de plantas medicinais, têm se mostrado relevante devido ao seu potencial antifúngico (Bakkali, *et al.*, 2008). Os óleos essenciais, extraídos de diversas plantas, têm sido amplamente estudados devido às suas propriedades antimicrobianas (Prakash, *et al.*, 2012).

Uma planta que tem chamado a atenção é a espécie *Lippia alba*, conhecida popularmente como erva-cidreira, que contém um composto majoritário conhecido como linalol. Que é um monoterpeno presente em vários óleos essenciais, incluindo o óleo essencial de lavanda. Estudos prévios relataram diversas atividades biológicas do linalol, como propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias e antioxidantes (Costa, *et al.*, 2014; Silva, *et al.*, 2011; Bagg, *et al.*, 2006).

Diante disso, este estudo tem como objetivo avaliar a atividade do monoterpeno linalol sobre a atividade queratinolítica dos dermatófitos. A investigação dos efeitos do linalol nesse contexto pode fornecer informações importantes sobre seu

potencial como agente antifúngico natural e para o desenvolvimento de novas terapias no tratamento das dermatofitoses.

1.1 Dermatofitose

A dermatofitose (*Tinea*) é uma infecção fúngica superficial que afeta a pele, unhas e cabelos de humanos e animais. Essa condição é causada por fungos do grupo dos dermatófitos, com mais de 40 espécies já descritas que incluem principalmente os gêneros *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton* (Gupta, *et al.*, 2017; Peres, *et al.*, 2010). As espécies de fungos podem ser subdivididas em zoofílicas, geofílicas e antropofílicas dependendo do hospedeiro primário. Espécies zoofílicas são as com origem em animais e são a causa de, aproximadamente, 30% das dermatofitoses humanas, já as espécies geofílicas tem origem do solo e as espécies antropofílicas tem origem em humanos, representando, aproximadamente, 70% das infecções em seus hospedeiros. Enquanto as espécies zoofílicas desencadeiam infecções agudas, as antropofílicas causam infecções crônicas e com uma evolução lenta (Peres, *et al.*, 2010; Molina de Diego, 2011).

Os dermatófitos são classificados como fungos que possuem a habilidade de utilizar a queratina, uma proteína estrutural encontrada na pele, unhas e cabelos, como fonte de nutrientes essenciais para o seu crescimento e invasão dos tecidos queratinizados (Nweze, *et al.*, 2016).

A queratina é uma proteína resistente e fibrosa que compõe a camada externa da pele, as unhas e os cabelos, que desempenha um papel importante na proteção e sustentação, conferindo força e resistência a essas estruturas. No entanto, os dermatófitos desenvolveram mecanismos adaptativos que lhes permitem se alimentar da queratina, utilizando-a como fonte de nutrientes para sua sobrevivência (Gupta, *et al.*, 2006; Kasperova, *et al.*, 2013). Essa capacidade de degradar a queratina é essencial para que esses fungos possam colonizar e invadir os tecidos, causando os sintomas característicos da dermatofitose (Peres, *et al.*, 2010; Kasperova, *et al.*, 2013).

Os dermatófitos possuem enzimas, como as queratinases, que desempenham um papel fundamental na quebra da queratina em proteínas menores, que podem ser

utilizadas como fonte de nutrientes pelos fungos. Essas enzimas atuam na degradação da queratina, desencadeando uma resposta inflamatória localizada e resultando nos sintomas observados na dermatofitose, como vermelhidão (Figura 1), descamação, coceira e formação de lesões características (Vishnu, *et al.*, 2015; Moskaluk, *et al.*, 2022; Gupta, *et al.*, 2006).



Figura 1 - Lesão de Dermatofitose
Fonte: Heilman, 2012.

A capacidade dos dermatófitos de se adaptarem ao ambiente queratinizado do hospedeiro, utilizando a queratina como fonte de nutrientes, é um fator-chave na patogenicidade desses fungos. Essa capacidade de degradar a queratina permite que os dermatófitos invadam os tecidos, como a pele, as unhas e os cabelos, estabelecendo uma infecção superficial (Weitzman, *et al.*, 1995; Molina de Diego, 2011; Gupta, *et al.*, 2017).

1.1.1 Epidemiologia

A dermatofitose é uma micose amplamente difundida em todo o mundo, com variações na sua frequência dependendo de fatores como região geográfica, condições socioeconômicas e hábitos culturais (Havlickova, *et al.*, 2009; Tirado-Sánchez, *et al.*, 2020). Por ser comum, no caso da infecção em humanos, não há dados precisos referentes a incidência da doença, ou seja, pode haver uma subnotificação de casos. As análises atuais de epidemiologia se baseiam em estudos de casos isolados de diferentes regiões, focadas em identificar os fatores

epidemiológicos da infecção (Ministério da Saúde, 2023). É estimado que cerca de 20% a 30% da população mundial já sofreu com micoses de pele (Havlickova, *et al.*, 2009).

Estudos em 16 países da Europa, mostrou que 35% a 40% de indivíduos adultos analisados desenvolveram dermatofitose no couro cabeludo. Dados analisados em creches nos Estados Unidos, mostrou que 22% a 50% das crianças também apresentaram infecções no mesmo local. No Chile, uma análise realizada em Valparaíso com 1.004 pacientes diagnosticados com micoses superficiais, a dermatofitose foi a mais comum (Silva, *et al.*, 2019).

A transmissão da dermatofitose ocorre principalmente por contato direto com indivíduos ou animais infectados, ou indiretamente por meio do compartilhamento de objetos contaminados, como roupas, toalhas, calçados e superfícies de ambientes públicos, como vestiários e piscinas. Ambientes quentes e úmidos favorecem o crescimento dos dermatófitos e aumentam o risco de contágio (Peres, *et al.*, 2010; Tirado-Sánchez, *et al.*, 2020).

Certos grupos populacionais são mais suscetíveis à dermatofitose. Isso inclui atletas, devido à maior exposição a ambientes úmidos e compartilhamento de equipamentos esportivos; crianças, devido ao contato próximo em ambientes escolares; e pessoas idosas, devido a alterações no sistema imunológico e menor resistência da pele (Havlickova, *et al.*, 2009; Sabadin, *et al.*, 2011; Vishnu, *et al.*, 2015).

A dermatofitose também pode apresentar variações sazonais, com aumento da incidência em determinadas épocas do ano, como o verão, quando as condições de calor e umidade são favoráveis ao crescimento dos fungos (Havlickova, *et al.*, 2009, Tirado-Sánchez, *et al.*, 2020).

Além disso, fatores individuais, como a presença de lesões cutâneas, indivíduos imunocomprometidos, má higiene pessoal e uso prolongado de antibióticos ou corticosteroides, podem aumentar a suscetibilidade à infecção por dermatófitos (Havlickova, *et al.*, 2009).

1.1.2 Diagnóstico

O diagnóstico da dermatofitose é geralmente realizado por meio de exame clínico das lesões e de testes laboratoriais complementares. O médico examina cuidadosamente as características das lesões, como a aparência, cor, textura e distribuição, para obter pistas diagnósticas. Além do exame clínico, os testes laboratoriais desempenham um papel crucial no diagnóstico preciso da dermatofitose. Os métodos mais comuns incluem a cultura fúngica e o exame direto do material coletado (Weitzman, *et al.*, 1995; Vishnu, *et al.*, 2015).

A cultura fúngica envolve o isolamento e identificação do fungo a partir de uma amostra da lesão. Um pequeno fragmento da lesão é coletado e cultivado em meios de cultura adequados, como Agar Sabouraud. Os dermatófitos têm um tempo de crescimento entre 4 a 7 dias ou até que suas estruturas características sejam observadas, a uma temperatura de 25°C a 30°C e pH entre 5 e 7 (Costa, *et al.*, 2014.)

O exame direto é realizado por meio da observação microscópica do material coletado. O fragmento da lesão é tratado com uma solução de hidróxido de potássio (KOH), que dissolve as células da pele e dos tecidos, deixando apenas as estruturas fúngicas visíveis. Sob o microscópio, são observadas as hifas fúngicas, que são longas e ramificadas, e os esporos fúngicos, que podem ter diferentes formas e características (Vishnu, *et al.*, 2015).

Outros testes laboratoriais podem incluir a realização de PCR (reação em cadeia da polimerase), que permitem a detecção do DNA (Ácido desoxirribonucleico) fúngico, e a microscopia de fluorescência, que utiliza corantes fluorescentes para destacar as estruturas fúngicas (Vishnu, *et al.*, 2015; Molina de Diego, 2011).

1.2 Microrganismos Queratinolíticos

Os microrganismos queratinolíticos são aqueles capazes de degradar a queratina, uma proteína resistente encontrada em tecidos queratinizados, como pele, cabelos, unhas e penas. Esses microrganismos possuem enzimas, conhecidas como

queratinases, que desempenham um papel fundamental na quebra e utilização da queratina como fonte de nutrientes. (Li Q., 2021; Bragulla, *et al.*, 2009).

Os microrganismos queratinolíticos incluem diferentes grupos de organismos, como fungos, bactérias e actinomicetos. Dentre eles, destacam-se os dermatófitos, que secretam queratinases, permitindo a invasão e colonização dos tecidos queratinizados, resultando em infecções como a dermatofitose (Li Q, 2021; Brandelli, *et al.*, 2010; Zhang, *et al.*, 2019).

Além dos fungos, algumas bactérias também possuem a capacidade de degradar a queratina. *Bacillus subtilis* é uma espécie bacteriana conhecida por sua atividade queratinolítica. Essa bactéria produz uma variedade de enzimas queratinolíticas, incluindo proteases e peptidases, que atuam na quebra da queratina em fragmentos menores, facilitando sua utilização como fonte de nutrientes (Riffel, *et al.*, 2003).

Os microrganismos queratinolíticos desempenham um papel importante no ciclo de degradação da queratina na natureza, contribuindo para a reciclagem desse importante componente proteico. Além disso, eles também têm sido estudados por seu potencial biotecnológico em diversas aplicações, como na produção de enzimas queratinolíticas para uso industrial, na biorremediação de resíduos ricos em queratina e na produção de biofertilizantes (Onifade *et al.*, 1998; Li Q., 2021).

1.2.1 Queratinases

As queratinases são enzimas que desempenham um papel importante no organismo e na natureza, permitindo que microrganismos como fungos, bactérias e actinomicetos utilizem a queratina como fonte de nutrientes (Li Q., 2021).

As queratinases têm sido extensivamente estudadas devido à sua ampla aplicabilidade em várias indústrias e processos biotecnológicos. Elas são classificadas em diferentes grupos com base nas suas características bioquímicas e estruturais, como endoqueratinases, exoqueratinases e metaloqueratinases. Essas enzimas atuam na quebra das ligações peptídicas da queratina, convertendo-a em fragmentos

menores que podem ser absorvidos e utilizados pelos microrganismos (Gupta, *et al.*, 2006; Li Q., 2021).

As queratinases têm diversas aplicações industriais. Por exemplo, elas são usadas na produção de detergentes enzimáticos para remoção de manchas de proteínas em tecidos, na indústria têxtil para modificação e tratamento de fibras de queratina, e na indústria de alimentos para melhorar a digestibilidade de alimentos ricos em proteínas de queratina, como penas de aves (Wang, *et al.*, 2003; Gupta, *et al.*, 2006; Rocha, 2022).

Além disso, as queratinases também têm sido exploradas na biorremediação de resíduos ricos em queratina, como penas, pêlos de animais e resíduos de abatedouros. Essas enzimas podem ser utilizadas para degradar e converter a queratina em compostos mais simples, reduzindo a quantidade de resíduos e contribuindo para a sustentabilidade ambiental (Mazotto, *et al.*, 2011a; Li Q., 2021; Rocha, 2022).

No contexto da dermatofitose, as queratinases produzidas pelos dermatófitos desempenham um papel crucial na invasão e colonização dos tecidos queratinizados. Essas enzimas quebram a queratina presente no tecido permitindo que os fungos obtenham nutrientes para seu crescimento e proliferação. Portanto, o estudo das queratinases dos dermatófitos é importante para compreender os mecanismos de patogenicidade desses fungos e desenvolver estratégias terapêuticas personalizadas, diminuindo efeitos colaterais e tempo de tratamento (Baldo, *et al.*, 2012; Mercer, *et al.*, 2019).

1.3 Plantas Medicinais e Óleos Essenciais

O tratamento da dermatofitose tem sido tradicionalmente baseado no uso de antifúngicos convencionais, como fluconazol, itraconazol e terbinafina. No entanto, o uso de produtos naturais, como plantas medicinais e óleos essenciais, tem despertado interesse como alternativa terapêutica devido às suas propriedades antifúngicas (Cavaleiro, *et al.*, 2006; Molina de Diego, 2011; Zhou, *et al.*, 2023).

As plantas medicinais têm sido utilizadas há séculos em diversas culturas tradicionais para o tratamento de doenças, incluindo infecções fúngicas. Muitas delas contêm compostos bioativos, como flavonoides, alcaloides e terpenóides, que demonstraram atividade antifúngica contra dermatófitos. Estudos têm investigado o potencial antifúngico de plantas medicinais, como a alho (*Allium sativum*), a árvore-do-chá (*Melaleuca alternifolia*) e o extrato de semente de uva (*Vitis vinifera*), com resultados promissores na inibição do crescimento dos dermatófitos (Shams-Ghahfarokhi, *et al.*, 2006; Roana, *et al.*, 2021; Cassella, *et al.*, 2002)

Os óleos essenciais, por sua vez, são extraídos de plantas aromáticas e apresentam uma alta concentração de compostos voláteis. Muitos óleos essenciais têm demonstrado atividade antifúngica significativa contra diversas espécies de fungos, incluindo os dermatófitos, devido à presença de substâncias bioativas como terpenos, fenóis e aldeídos. Alguns exemplos de óleos essenciais com atividade antifúngica incluem o óleo de melaleuca (*tea tree*), o óleo de lavanda, o óleo de cravo e o óleo de alecrim. Esses óleos essenciais podem ser utilizados topicamente, diluídos em óleo vegetal, para o tratamento de infecções fúngicas superficiais, incluindo a dermatofitose (Vishnu, *et al.*, 2015; Zhou, *et al.*, 2023).

Sintetizando, as plantas medicinais e os óleos essenciais apresentam um potencial promissor no tratamento da dermatofitose devido às suas propriedades antifúngicas. No entanto, é necessário realizar mais pesquisas para determinar seu uso clínico adequado (Vishnu, *et al.*, 2015).

1.4 Linalol

O linalol (3,7-dimetil-1,6-octadien-3-ol) é um monoterpene encontrado em diversos óleos essenciais de plantas, como *Lavandula spp.* (lavanda), *Melissa officinalis* (melissa) e *Citrus spp.* (citrus). Esse composto pertence à classe das substâncias conhecidas como monoterpenos, que são compostos orgânicos voláteis amplamente distribuídos na natureza (Figura 2) (Pereira, *et al.*, 2018; Maćzka, *et al.*, 2022).

Além de suas propriedades aromáticas, o linalol também tem sido objeto de estudos quanto à sua atividade biológica e terapêutica. Dentre as suas propriedades, destaca-se a atividade antifúngica, incluindo ação contra os dermatófitos, fungos causadores da dermatofitose (Nguefack, *et al.*, 2004).

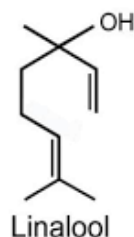


Figura 2 – Estrutura química do Linalol

Fonte: Estrutura obtida através do programa ChemDraw, 2023

A atividade antifúngica do linalol está relacionada ao seu mecanismo de ação, que pode incluir a interferência na integridade e função da membrana celular dos fungos. Essa ação pode resultar na inibição do crescimento e proliferação dos dermatófitos, contribuindo para o tratamento da dermatofitose (Nguefack, *et al.*, 2004).

Além das propriedades antifúngicas, a citotoxicidade é um aspecto importante a ser considerado ao avaliar a aplicação de compostos como o linalol. Estudos têm investigado a citotoxicidade do linalol em células humanas, buscando determinar sua toxicidade em concentrações terapêuticas. Essas pesquisas têm mostrado resultados encorajadores, indicando baixa toxicidade do linalol em células humanas (Teixeira, *et al.*, 2013; Silva, *et al.*, 2011; Silva, *et al.*, 2022).

Em resumo, o linalol é um monoterpene encontrado em diversos óleos essenciais de plantas e possui propriedades antifúngicas. Sua atividade contra os dermatófitos o torna um composto promissor para o tratamento da dermatofitose. Além disso, estudos têm mostrado baixa citotoxicidade do linalol em células humanas, o que sugere um perfil de segurança favorável quanto ao seu uso terapêutico. No entanto, são necessárias mais pesquisas clínicas para avaliar sua eficácia e segurança no contexto da dermatofitose (Teixeira, *et al.*, 2013; Pereira, *et al.*, 2018; Mączka. *et al.*, 2022).

1.5 Atividade Antimicrobiana do Linalol em Dermatófitos

O tratamento das dermatofitoses pode ser desafiador devido à resistência crescente desses fungos aos antifúngicos convencionais. Nesse contexto, substâncias naturais têm sido investigadas como alternativas terapêuticas (Dudareva, *et al.*, 2006; Peres, *et al.*, 2010).

Óleos essenciais ricos em linalol tem demonstrado atividade antimicrobiana promissora contra dermatófitos. Estudos têm revelado que o monoterpeno é capaz de inibir o crescimento e a viabilidade desses fungos. Por exemplo, uma pesquisa investigou a atividade antifúngica do linalol contra espécies de *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*, demonstrando sua eficácia na inibição do crescimento desses dermatófitos (Costa, *et al.*, 2014; Maćzka, *et al.*, 2022).

Mecanismos de ação propostos para a atividade antifúngica do linalol incluem a alteração da permeabilidade da membrana celular dos dermatófitos e a inibição de enzimas essenciais para seu crescimento e desenvolvimento. Essa atividade antifúngica do linalol tem despertado interesse como uma possível opção de tratamento para as infecções fúngicas causadas por dermatófitos (Cavaleiro, *et al.*, 2006; Costa, *et al.*, 2014).

1.5.1 Efeito inibitório do óleo essencial de *Lippia alba* rico em linalol na atividade queratinolítica dos dermatófitos

Costa *et al.* (2014), observou que o óleo essencial de *Lippia alba* apresentou alta concentração de linalol em sua composição, sendo responsável por mais de 70% dos constituintes identificados. Os ensaios de inibição de atividade enzimática revelaram que o óleo essencial foi capaz de inibir a atividade das peptidases dos dermatófitos em até 50%, dependendo da cepa avaliada. Além disso, o óleo essencial também demonstrou um efeito inibitório significativo na atividade queratinolítica dos dermatófitos, reduzindo a degradação da queratina em até 60%.

Esses resultados sugerem que o óleo essencial de *Lippia alba*, rico em linalol, possui uma potente atividade inibitória sobre as enzimas peptidases e queratinases produzidas por dermatófitos. O linalol tem sido amplamente estudado por suas propriedades antimicrobianas e antifúngicas, o que pode explicar o efeito observado neste estudo. Além disso, a inibição das atividades peptidásicas e queratinolíticas é importante para o controle do crescimento e invasão dos dermatófitos nos tecidos queratinizados (Costa, *et al.*, 2014; Cassella, *et al.*, 2002; Hammer, *et al.*, 2002; Shams-Ghahfarokhi, *et al.*, 2006).

O óleo essencial rico em linalol da planta *Lippia alba* apresentou um efeito inibitório significativo nas atividades de peptidases e queratinases produzidas por dermatófitos. Esses resultados sugerem que o linalol pode ser uma opção promissora para o desenvolvimento de novos tratamentos antifúngicos para dermatofitoses. Estudos futuros são necessários para elucidar os possíveis mecanismos de ação do linalol sobre as enzimas dos dermatófitos e para avaliar sua eficácia em modelos *in vivo* de infecções fúngicas. A utilização de compostos naturais, como o linalol, pode representar uma alternativa terapêutica mais segura e sustentável para o tratamento de infecções fúngicas da pele e unhas (Costa, *et al.*, 2014).

1.6 Atividade Antimicrobiana do Linalol em Bactérias

Além de sua atividade antifúngica, óleos essenciais em que o linalol está presente na sua composição também tem mostrado atividade antimicrobiana contra bactérias. Um estudo avaliou a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais contra bactérias do gênero *Bacillus*, incluindo a espécie *Bacillus subtilis*. Os resultados indicaram que o linalol sendo o componente principal pode exercer efeito inibitório sobre o crescimento dessas bactérias, demonstrando seu potencial antimicrobiano como composto isolado (Pereira, *et al.*, 2018; Santamarta, *et al.*, 2023).

A atividade antimicrobiana do linalol em bactérias bacilares pode ser atribuída a sua capacidade de interferir com a membrana celular bacteriana e seus componentes, bem como a sua capacidade de inibir enzimas essenciais para o metabolismo bacteriano. Esses mecanismos de ação contribuem para a inibição do

crescimento e proliferação das bactérias, tornando o linalol um composto promissor para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos (Santamarta, *et al.*, 2023).

O *Bacillus subtilis* é uma bactéria gram-positiva, que tem chamado atenção por ter uma alta capacidade de produção de queratinases, com isso está sendo utilizada para biorremediação de resíduos queratinizados e na indústria alimentícia. Pode ser empregada na degradação de penas descartadas de abatedouros de animais convertendo os resíduos em compostos mais simples e reutilizáveis. Na produção de alimentos para animais, o *B. subtilis* pode auxiliar na digestão de proteínas animais (Cedrola, *et al.*, 2012; Mazotto, *et al.*, 2011b; Zaghloul, *et al.*, 2011).

Pesquisas realizadas indicam que óleos essenciais ricos em linalol também exercem atividade antimicrobiana, podendo afetar a membrana celular do *Bacillus subtilis*, resultando em danos estruturais e alterações sua permeabilidade. Esse efeito pode comprometer a integridade da bactéria e levar à sua morte ou inibição do crescimento (Aguiar, *et al.*, 2008; Mamun-or-Rashid, *et al.*, 2012).

Com a diferença de concentração de compostos nos óleos essenciais a atividade antimicrobiana apresentada na literatura não é específica do linalol. Outro fator que pode influenciar nessa atividade é a origem dos óleos essenciais, ou seja, dependendo o seu local de extração a concentração dos compostos pode variar e induzir a uma maior ou menor inibição das queratinases desse gênero de bactéria (Santamarta *et al.*, 2023).

Até o momento, não há estudos suficientes comprovando que o composto isolado linalol tem alguma atividade de inibição da atividade das queratinases no *Bacillus subtilis*.

2 JUSTIFICATIVA

A dermatofitose é uma infecção fúngica superficial comum que afeta a pele, unhas e cabelos de humanos e animais. O aumento da resistência dos dermatófitos aos antifúngicos convencionais representa um desafio no tratamento dessas infecções. Além disso, compreender os mecanismos de ação dos microrganismos queratinolíticos, incluindo dermatófitos e bactérias bacilares, é fundamental para o desenvolvimento de estratégias personalizadas de controle e prevenção dessas infecções. A identificação de compostos naturais capazes de inibir o crescimento desses microrganismos pode levar ao desenvolvimento de novos agentes terapêuticos e produtos antimicrobianos.

Em um trabalho anterior o óleo essencial de *Lippia alba* rico em linalol foi utilizado para avaliar o potencial antimicrobiano contra três gêneros de dermatófitos (Costa, *et al.*, 2014). No projeto atual, o composto linalol isolado foi utilizado para avaliar o potencial de inibir a atividade queratinolítica de três gêneros de dermatófitos e de *Bacillus subtilis*, bactéria bacilar utilizada como controle positivo por ter uma intensa atividade queratinolítica. A justificativa para este trabalho se baseia na importância de compreender o potencial do monoterpeneo linalol como uma opção terapêutica no tratamento da dermatofitose e como agente antimicrobiano contra microrganismos queratinolíticos, como dermatófitos e bactérias bacilares.

A investigação do linalol como uma substância antimicrobiana é relevante devido à sua origem natural, sua atividade comprovada contra dermatófitos e bactérias, e sua possível aplicação como uma opção de tratamento. Assim, compreender o potencial do linalol nesses aspectos pode contribuir para o avanço no tratamento da dermatofitose e no controle de microrganismos queratinolíticos, abrindo caminho para o desenvolvimento de novas terapias e estratégias antimicrobianas mais eficazes e sustentáveis.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade queratinolítica dos dermatófitos dos gêneros *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*, e da bactéria bacilar da espécie *Bacillus subtilis* sob a influência do composto isolado Linalol, utilizando a queratina azul como substrato para as queratinases.

3.2 Objetivos Específicos

- Identificar o potencial do linalol em inibir a atividade queratinolítica dos dermatófitos e do *Bacillus subtilis*.
- Comparar a inibição da atividade queratinolítica fúngica e bacteriana mediado pelo óleo essencial de *Lippia alba* rico em linalol em trabalho realizado por Costa *et al*, 2014, com a inibição da atividade queratinolítica mediada pelo linalol purificado.
- Avaliar a influência do linalol na atividade queratinolítica do sobrenadante de cultivo de *Bacillus subtilis*, realizando a pré-incubação do sobrenadante rico nessa atividade com o linalol e colocando o sobrenadante e o linalol concomitantemente.

4 METODOLOGIA

4.1 Crescimento e cultivo dos microrganismos

4.1.1 Dermatófitos

Os fungos das espécies *T. rubrum*, *E. floccosum* e *M. gypseum* foram crescidos em meio PDA (Potato Dextrose Agar) durante sete dias à temperatura ambiente. Posteriormente os conídios dos microrganismos foram retirados da placa a partir da suspensão com salina, com 2ml transferidos de cada placa respectivamente para Erlenmeyers com 20 ml de meio pena contendo:

- Meio salina tamponada: 0,85%
- Extrato de levedura: 0,1%
- Penas de frango: 1%
- pH: 7.4

Este meio foi utilizado pois estimula a produção de queratinases. Os fungos foram incubados em temperatura ambiente, por sete dias, e 20ml do sobrenadante de cultivo foi coletado e transferido para um tubo cônico de 50 ml. O tubo foi centrifugado a 7500 rpm (rotações por minuto) durante cinco minutos e foram feitas alíquotas de 500 microlitros em tubos cônicos de 1,5ml. Em seguida, as alíquotas foram concentradas (20 vezes) no SpeedVac durante três horas. SpeedVac é um aparelho de centrifugação a vácuo e calor para remover solventes e concentrar amostras mantendo a sua integridade. Tais amostras foram ressuspendidas em tampão com pH 9.0, pois sabe-se que é o melhor pH para a expressão da atividade queratinolítica, e ideal para realização do ensaio de queratinase e inibição dessa atividade pelo linalol (Costa, *et al.*, 2014).

4.1.2 *Bacillus subtilis*

A cepa de *Bacillus subtilis* LFB - FIOCRUZ 1267 SLC foi cultivada em 5 ml de caldo de extrato de levedura em tubos de vidro a 37°C por 24 horas com agitação orbital a 250 rpm. O meio de levedura era composto de:

- Extrato de levedura: 0,5%
- Peptona: 0,5%
- KCl (cloreto de potássio): 2%
- Sacarose: 2%
- Água destilada: 100 ml

Após 24 horas, a cultura foi centrifugada a 5000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado uma vez com tampão fosfato pH 7,4 para uso na segunda fase.

O sedimento de *Bacillus subtilis* foi transferido para um frasco Erlenmeyer com meio pena contendo:

- Tampão fosfato: 25ml e pH 8,0,
- Extrato de levedura: 0,01%
- Peptona: 0,5%
- KCl: 2%
- Sacarose: 2%
- Penas de frango brancas lavadas e desengorduradas: 1%

Os frascos foram incubados com agitação orbital a 250 rpm por 7 dias. Após a fermentação, o meio contendo penas completamente degradadas foi filtrado com papel de filtro para remover resíduos maiores, e o sobrenadante foi centrifugado a 5000 rpm por 20 minutos em temperatura ambiente. O sedimento foi descartado e o sobrenadante foi utilizado para o ensaio de queratinases.

4.2 Dosagem da atividade queratinolítica

4.2.1 Dermatófitos

Utilizando a *Keratin azure* (queratina azul) como substrato, foi feito um ensaio colorimétrico com leitura da reação em espectrofotômetro. Essa queratina, comercialmente vendida, é composta pela lã de carneiro, lavada e tratada. O corante é específico para a enzima, se acoplado no pelo, com isso, quando há enzima queratinolítica o corante degrada na cor azul (Scott, *et al.*, 2004).

Para determinar a atividade queratinolítica, 2 mg de queratina azul (Sigma-Aldrich) foram incubados em banho maria com 100 µL da amostra com as queratinases dos dermatófitos, em tampão Tris-HCl 100 mM e pH 9.0 durante 1 hora a 50°C sob agitação de 160 rpm. Em seguida, a absorbância foi determinada a 595 nm no espectrofotômetro, capaz de medir e comparar a quantidade de luz absorvida, transmitida ou refletida por uma determinada amostra.

As amostras foram previamente incubadas com diferentes concentrações de linalol (2mg, 1mg e 0,5mg). As triplicatas continham 400 µl de tampão, 100 µl do sobrenadante e suas respectivas concentrações. A amostra controle (branco) foi preparada da mesma forma, adicionando tampão (500 µl), sem adicionar as queratinases (Mazotto, *et al.*, 2011b; Costa, *et al.*, 2014).

O controle positivo utilizado foi a bactéria *Bacillus subtilis*, pois na literatura há poucos trabalhos em relação à fungo, então não foi encontrado uma cepa de controle positivo eficiente. Sendo assim, se a atividade queratinolítica da bactéria estiver ativa e eficiente, o sistema de dosagem também estará funcionando.

4.2.2 *Bacillus subtilis*

Também foi utilizado a *Keratin azure* (queratina azul) como substrato e feito um ensaio colorimétrico com leitura da reação em espectrofotômetro. Para determinar a atividade queratinolítica foram utilizados dez tubos de ensaio: um em branco, triplicata do sistema 1 (controle positivo de atividade queratinolítica = tampão + sobrenadante de *B. subtilis* + *Keratin Azure*) e triplicata do sistema 2 (influência direta do linalol como

inibidor = tampão + sobrenadante de *B. subtilis* + linalol + *Keratin Azure*) e triplicata do sistema 3 (pré-incubação do linalol com as queratinases = tampão + sobrenadante de *B. subtilis* + linalol). Com as medidas descritas na Tabela 1.

	BRANCO	Sistema 1 Controle positivo de atividade queratinolítica	Sistema 2 Influência direta do linalol	Sistema 3 Pré-incubação do linalol com as queratinases
Tampão (µL)	500	299,5	299,5	299,5
<i>K. azure</i> (mg)	400	400	400	X
<i>B. subtilis</i> (µL)	X	200	200	200
Linalol (µL)	X	X	0,5	0,5

Tabela 1 - Concentração de reagentes de cada um dos sistemas utilizados para a dosagem de atividade queratinolítica do sobrenadante de cultivo de *B. subtilis*.

* Todos os sistemas foram realizados em triplicata

Na primeira etapa, os tubos de todos os sistemas foram colocados em banho maria, em uma incubadora com agitação orbital e aquecimento nas seguintes condições: temperatura de 50°C e agitação a 200 rpm, por 1 hora. Apenas o sistema 3, de pré-incubação do linalol com as queratinases, foi então incubado com a queratina azul em banho maria e nas mesmas condições (50°C e 200 rpm) por mais 1 hora.

Todas as amostras foram transferidas para uma cubeta de 500 µL e foram analisadas em espectrofotômetro para a determinação da absorbância que foi medida no comprimento de onda de 595 nm.

4.3 Análise de Dados

A atividade enzimática foi calculada utilizando a fórmula:

- Atividade enzimática (U/mL) = (Absorbância da amostra - Absorbância do branco) * 1000 / (Absorbância do padrão * Volume da enzima)

Uma unidade (U) de atividade queratinolítica foi definida como a quantidade de enzima necessária para aumentar a absorbância (A₅₉₅) em 0,01 unidades nas

condições descritas. A atividade enzimática foi calculada para cada amostra dos dermatófitos e dos *Bacillus subtilis*.

5 RESULTADOS

5.1 Inibição da atividade queratinolítica dos dermatófitos pelo linalol

Os dermatófitos geralmente crescem de 5 a 7 dias em cultura e coincidentemente o tempo máximo de crescimento é o pico máximo da atividade queratinolítica (Figura 3). A Figura 3 é a curva resultante da atividade queratinolítica do fungo *T. rubrum* medida a cada dia de crescimento, onde sua atividade máxima no sobrenadante de cultivo se encontra nos dias 6 e 7. Sendo assim, foi determinado que a execução do experimento de inibição da atividade queratinolítica seria sempre feito com o sobrenadante do crescimento dos dermatófitos por 7 dias, o que também foi estabelecido para *Microsporum gypseum* e *Epidermophyton floccosum*.

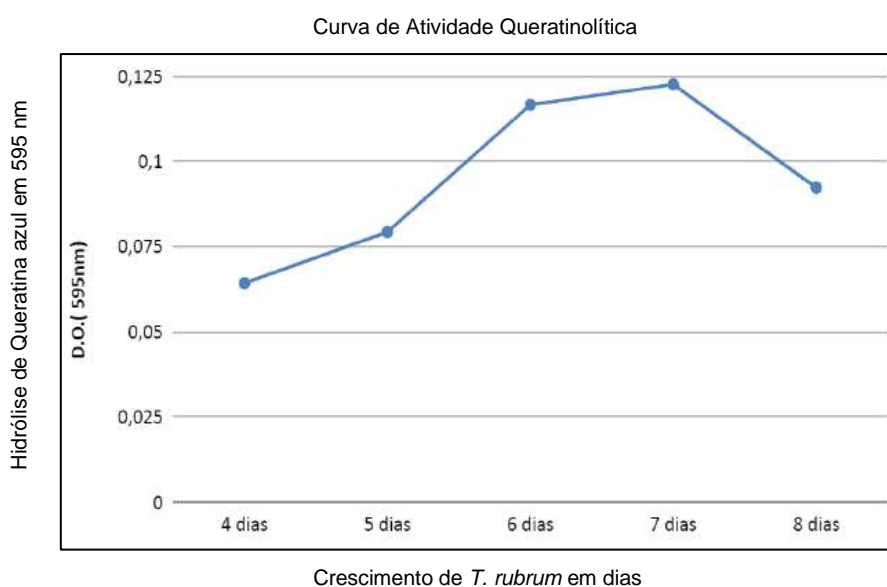


Figura 3 - Crescimento de *T. rubrum* durante vários dias para visualizar qual o melhor dia da expressão da queratinase. O fungo foi concentrado 20x devido a sua baixa atividade quando puro.

T. rubrum apresentou o pico máximo de atividade queratinolítica no sobrenadante do sétimo dia de crescimento. Verificou-se que a concentração de 0.5 microlitros de linalol foi a mais eficiente para inibir a atividade queratinolítica em aproximadamente 80% (Figura 4). Sendo assim, essa concentração do linalol foi estabelecida para testar a inibição da atividade queratinolítica dos fungos *Microsporum gypseum* e *Epidermophyton floccosum*.

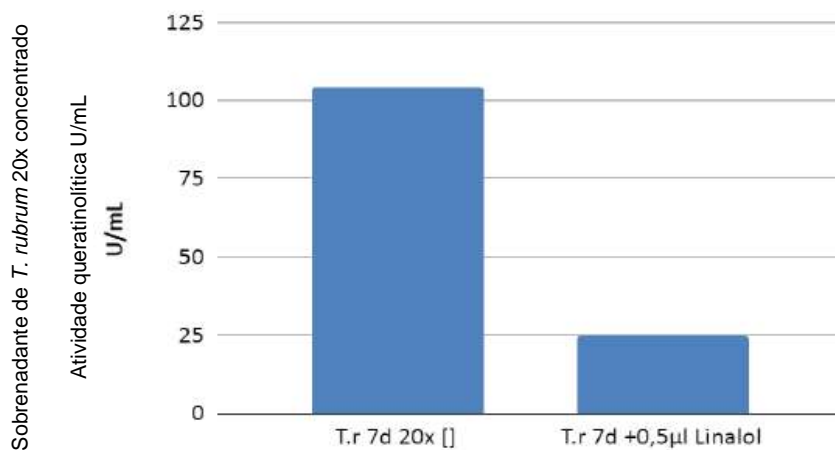


Figura 4 – Ensaio de inibição da atividade queratinolítica do sobrenadante do crescimento de *T. rubrum* (20x concentrado) após 7 dias utilizando 0,5 microlitros de linalol.

O linalol inibiu cerca de 40% da atividade queratinolítica do *M. gypseum*. Já no *E. floccosum*, não houve inibição da atividade queratinolítica pelo linalol (Figura 5).

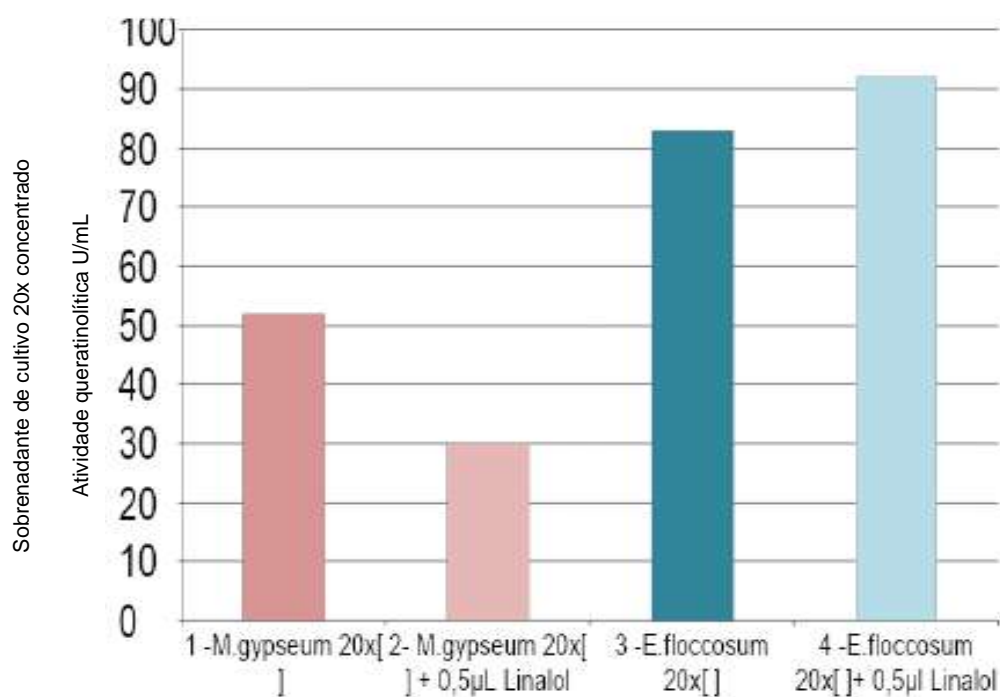


Figura 5 - Inibição da atividade queratinolítica de *M. gypseum* e *E. floccosum* pelo linalol.

5.2 Atividade queratinolítica das amostras de sobrenadante de cultivo de *B. subtilis*, na ausência e na presença de linalol e o sobrenadante pré-incubado com o mesmo.

	1	2	3	MÉDIA	Atividade queratinolítica
<i>B. subtilis</i> (Controle +)	0,043	0,098	0,098	0,080	40 U/mL
<i>B. subtilis</i> + Linalol	0,094	0,097	0,086	0,093	46,5 U/mL
<i>B. subtilis</i> pré-INCUBADA com Linalol	0,091	0,097	0,059	0,082	41 U/mL

Tabela 2 – Influência do linalol na absorbância e atividade queratinolítica das amostras do sobrenadante de *B. subtilis*.

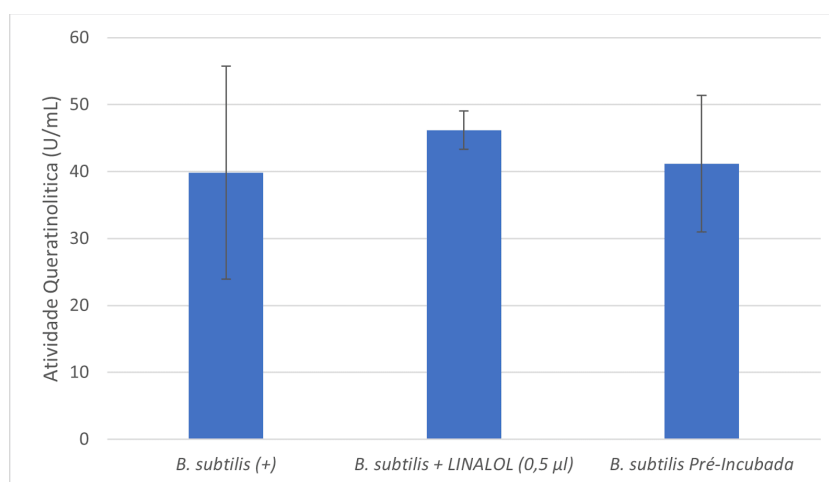


Figura 6 - Inibição da atividade queratinolítica de *B. subtilis* pelo linalol.

A Figura 6 mostra que a atividade queratinolítica do *B. subtilis* não foi inibida pelo linalol nem utilizado diretamente e nem pré-incubado com o sobrenadante de cultivo rico em atividade queratinolítica, utilizando a técnica de hidrólise da queratina azul.

O linalol não foi capaz de inibir as queratinases bacterianas do *B. subtilis*, sendo um inibidor em potencial apenas para as queratinases de dermatófitos, mais especificamente para as do *T. rubrum*. Porém, tal fato não impede que o sobrenadante de cultivo de *B. subtilis* continue a ser usado como um controle positivo para

determinar a eficácia da degradação da queratina azul nos experimentos com dermatófitos.

6 DISCUSSÃO

De acordo com os resultados dos experimentos, a atividade queratinolítica dos dermatófitos foi inibida consideravelmente, cerca de 60% a 80% de inibição, em duas das três espécies estudadas: *M. gypseum* e *T. rubrum*. Esse resultado corrobora com Costa, *et al.* (2014), onde o óleo essencial de *Lippia alba* rico em linalol inibiu cerca de 60% da atividade das queratinases dos dermatófitos.

Nos resultados dos experimentos da atividade queratinolítica do *B. subtilis*, foi observado que a presença de linalol não tem efeito na sua inibição. A análise da absorbância em 595 nm não revelou diferenças significativas entre as amostras testadas. Esperava-se que por se tratar de uma bactéria caracterizada por uma alta atividade queratinolítica, o potencial de inibição pelo linalol pudesse ocorrer. Como foi adotado apenas uma concentração padronizada de linalol (0,5 µl) para *B. subtilis*, essa concentração pode ter sido insuficiente para ter um resultado inibitório.

É importante ressaltar que o presente estudo possui algumas limitações. Os experimentos foram realizados em condições específicas e em concentrações padronizadas de linalol. Variações nas concentrações de linalol e tempo de incubação podem influenciar os resultados e devem ser consideradas em estudos futuros. Além disso, a compreensão dos mecanismos exatos pelos quais o linalol afeta a atividade queratinolítica dos microrganismos requer investigações mais aprofundadas.

Essas descobertas podem contribuir para elucidar novos mecanismos de ação do monoterpeno linalol contra dermatófitos, auxiliando no desenvolvimento de tratamentos alternativos da dermatofitose, com fármacos derivados de produtos naturais que não causem resistência fúngica, efeitos colaterais e não afetem as células saudáveis.

O problema dos fungos que desenvolvem resistência a medicamentos antifúngicos convencionais representa uma ameaça significativa para a saúde pública e agricultura. A resistência fúngica pode levar a infecção a se espalhar para camadas mais profundas do tecido, aumentando o risco de contaminação por patógenos mais virulentos (Roy, *et al.*, 2023). Na Índia, há uma preocupação crescente com a prevalência de dermatofitose, que está se tornando um importante problema de saúde

pública podendo se difundir globalmente devido a imigração e diversidade de locais de transmissão (Russo, *et al.*, 2023).

Devido à sua ocorrência comum e à necessidade de tratamento a longo prazo, existe o risco de tratamento inconsistente, o que pode agravar ainda mais a infecção. O uso prolongado de medicamentos antifúngicos também pode contribuir para a seleção de fungos resistentes, prolongando assim a duração da infecção e piorando sua gravidade (Hube, *et al.*, 2015). Hospedeiros imunocomprometidos também podem se tornar alvos mais suscetíveis a forma mais invasiva da infecção. Silva *et al.* (2021) analisou pacientes transplantados que contraíram de forma grave a dermatofitose causada pelo *T.rubrum*, o tratamento por antifúngicos tradicionais teve que ser interrompido por interações farmacológicas com os medicamentos imunossupressores e substituídos por outro antifúngico que possuísse menos interações farmacológicas.

Nas últimas décadas, a busca por novas drogas e tratamentos com base em produtos naturais está crescendo devido à ineficácia nos tratamentos convencionais, muitos deles causando efeitos colaterais e tóxicos, selecionando fungos e bactérias resistentes e sendo inespecíficos para casos como o de pacientes imunocomprometidos. Os óleos essenciais já são amplamente difundidos por suas propriedades terapêuticas e seus compostos isolados por apresentarem atividades antimicrobianas (Pereira. *et al.*, 2018).

Em suma, neste estudo verificou-se que o linalol, um monoterpene presente em diversos óleos essenciais derivados de plantas medicinais, possui propriedades inibitórias na atividade queratinolítica de certas espécies de dermatófitos. Esta descoberta abre novas possibilidades para pesquisas no desenvolvimento de potenciais drogas no tratamento de dermatofitoses.

7 CONCLUSÃO

Em conclusão, os resultados obtidos neste estudo sugerem que a presença de linalol tem um efeito satisfatório na inibição da atividade queratinolítica dos dermatófitos do gênero *T.rubrum* e *M. gypseum*. Já a atividade queratinolítica do *Bacillus subtilis* não foi inibida com a presença do monoterpene linalol.

Os resultados com os dermatófitos estão em linha com estudos anteriores que investigaram os efeitos do óleo essencial de *Lippia alba* rico em linalol, em atividades enzimáticas específicas e propriedades biológicas. Tais estudos destacaram o potencial do linalol como agente antimicrobiano e citotóxico, indicando que o composto pode ter propriedades biológicas significativas.

Este estudo contribui para o entendimento da influência do linalol na atividade queratinolítica de dermatófitos e do *B.subtilis*, podendo contribuir para elucidar novos mecanismos de ação do linalol contra microrganismos e no desenvolvimento de tratamentos alternativos para dermatofitose.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguiar, J.S.; Costa, M.C.C.D.; Nascimento, S.C.; Sena, K.X.F.R. (2008) **Atividade antimicrobiana de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae)**. Rev bras farmacogn. 18:436-440. doi:10.1590/S0102-695X2008000300018.
- Bagg, J.; Jackson, M.S.; Petrina Sweeney, M.; Ramage, G.; Davies, A.N. (2006). **Susceptibility to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil of yeasts isolated from the mouths of patients with advanced cancer**. Oral Oncology. 2006;42(5):487-492. doi:10.1016/j.oraloncology.2005.10.002.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). **Biological effects of essential oils: a review**. Food Chem Toxicol, 46(2), 446-75. doi:10.1016/j.fct.2007.09.106.
- Baldo, A.; Monod, M.; Mathy, A.; Cambier, L.; Bagut, E.T.; defaweux, V.; Symoens, F.; Antoine, N.; Mignon, B. (2012). **Mechanisms of skin adherence and invasion by dermatophytes**. Mycoses. 55(3):218-223. doi:10.1111/j.1439-0507.2011.02081.x.
- Bragulla, H.H.; Homberger, D.G. (2009). **Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia**. J Anat. 214(4):516-559. doi:10.1111/j.1469-7580.2009.01066.x.
- Brandelli, A.; Daroit, D.J.; and Riffel, A. (2010). **Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications**. Appl. Microbiol. Biotechnol. 85, 1735–1750. doi:10.1007/s00253-009-2398-5.
- Cassella, S.; Cassella, J.P.; Smith, I. (2002). **Synergistic antifungal activity of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) and lavender (*Lavandula angustifolia*) essential oils against dermatophyte infection**. International Journal of Aromatherapy. 12(1):2-15. doi:10.1054/ijar.2001.0127.
- Cavaleiro, C.; Pinto, E.; Gonçalves, M.J.; Salgueiro, L. (2006). **Antifungal activity of Juniperus essential oils against dermatophyte, Aspergillus and Candida strains**. Journal of Applied Microbiology. 100(6):1333-1338. doi:10.1111/j.1365-2672.2006.02862.x.
- Cedrola, S.M.L.; de Melo, A.C.N.; Mazotto, A.M.; Lins, U.; Zingali, R.B.; Rosado, A.S.; Peixoto, R.S.; Vermelho, A.B. (2012) **Keratinases and sulfide from *Bacillus subtilis* SLC to recycle feather waste**. World J Microbiol Biotechnol. 28(3):1259-1269. doi:10.1007/s11274-011-0930-0.
- Costa, D.C.M.; Vermelho, A.B.; Almeida, C.A.; Dias, E.P de S.; Cedrola, S.M.L.; Arrigoni-Blank, M. de F.; Blank, A.F.; Alviano, C.S.; Alviano, D.S. (2014). **Inhibitory effect of linalool-rich essential oil from *Lippia alba* on the peptidase and keratinase activities of dermatophytes**. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, v. 29, n. 1, p. 12–17.
- Dudareva, N.; Negre, F.; Nagegowda, D.A.; Orlova, I. (2006). **Plant Volatiles: Recent Advances and Future Perspectives**. Critical Reviews in Plant Sciences. 25(5):417-440. doi:10.1080/07352680600899973.

Gupta, A.K, Foley, K.A, Versteeg, S.G. (2017). **New Antifungal Agents and New Formulations Against Dermatophytes**. *Mycopathologia*. 182(1-2):127-141. doi:10.1007/s11046-016-0045-0.

Gupta, R.; Ramnani, P. (2006). **Microbial keratinases and their prospective applications: an overview**. *Appl Microbiol Biotechnol*. 70(1):21-33. doi:10.1007/s00253-005-0239-8.

Hammer, K.A.; Carson, C.F.; Riley, T.V. (2002). **In vitro activity of Melaleuca alternifolia (tea tree) oil against dermatophytes and other filamentous fungi**. *J Antimicrob Chemother*. 50(2):195-199. doi:10.1093/jac/dkf112.

Havlickova, B.; Czaika, V.A, Friedrich, M. (2009) **Epidemiological trends in skin mycoses worldwide**. [published correction appears in *Mycoses*. 2009 Jan;52(1):95]. *Mycoses*. 51 Suppl 4:2-15. doi:10.1111/j.1439-0507.2008.01606.x.

Hube, B.; Hay, R.; Brasch, J.; Veraldi, S.; Schaller, M. (2015). **Dermatomycoses and inflammation: The adaptive balance between growth, damage, and survival**. *Journal de Mycologie Médicale*. 25(1):e44-e58. doi:10.1016/j.mycmed.2014.11.002.

Heilman, J. (2012), MD, CC BY-SA 3.0 <<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/>>, via Wikimedia Commons.

Kasperova, A.; Kunert, J.; Raska, M. (2013). **The possible role of dermatophyte cysteine dioxygenase in keratin degradation**. *Med Mycol*. 51(5):449-454. doi:10.3109/13693786.2013.794310.

Li, Q. (2021) **Structure, Application, and Biochemistry of Microbial Keratinases**. *Front Microbiol*. 12:674345. doi: 10.3389/fmicb.2021.674345. PMID: 34248885; PMCID: PMC8260994.

Li, Y.; Ren, F.; Chen, D.; Chen, H.; Chen, W. (2022). **Antibacterial Mechanism of Linalool against Pseudomonas fragi: A Transcriptomic Study**. *Foods*. 11(14):2058. doi:10.3390/foods11142058.

Maczka, W.; Duda-Madej, A.; Grabarczyk, M.; Winska, K. (2022) **Natural Compounds in the Battle against Microorganisms-Linalool**. *Molecules* (Basel, Switzerland), v. 27, n. 20, p. 6928.

Mamun-or-Rashid, A.N.M.; Islam, M.R. & Dash, B.K. (2012). **In vitro Antibacterial Effect of Bushy Matgrass (Lippia alba Mill.)**. *Research Journal of Medicinal Plant*, 6(4), 334-340.

Mazotto, A.M.; Coelho, R.R.R; Cedrola, S.M.L.; de Lima, M.F.; Couri, S.; de Souza, E.P.; Vermelho, A.B. (2011a). **Keratinase Production by Three Bacillus spp. Using Feather Meal and Whole Feather as Substrate in a Submerged Fermentation**. *Enzyme Res*. 2011:523780. doi:10.4061/2011/523780.

Mazotto, A.M.; de Melo, A.C.N.; Macrae, A.; Rosado, A.S.; Peixoto, R.; Cedrola, S.M.I.; Couri, S.; Zingali, R.B.; Vila, A.L.V.; Rabinovitch, L.; Chaves, J.Q.; Vermelho, A.B. (2011b). **Biodegradation of feather waste by extracellular keratinases and gelatinases from Bacillus spp**. *World J Microbiol Biotechnol*. 27(6):1355-1365. doi:10.1007/s11274-010-0586-1.

Mercer, D.K.; Stewart, C.S. (2019). **Keratin hydrolysis by dermatophytes**. *Med Mycol.* 57(1):13-22. doi:10.1093/mmy/myx160.

Molina de Diego, A. (2011). **Aspectos clínicos, diagnósticos y terapéuticos de las dermatofitosis**. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.* 29:33-39. doi:10.1016/S0213-005X(11)70025-8.

Moskaluk, A.E.; VandeWoude, S. (2022) **Current Topics in Dermatophyte Classification and Clinical Diagnosis**. *Pathogens.* 11(9):957. doi:10.3390/pathogens11090957.

Nguefack, J.; Budde, B.B.; Jakobsen, M. (2004) **Five essential oils from aromatic plants of Cameroon: their antibacterial activity and ability to permeabilize the cytoplasmic membrane of *Listeria innocua* examined by flow cytometry**. *Letters in Applied Microbiology.* 39(5):395-400. doi:10.1111/j.1472-765X.2004.01587.x.

Nweze, E.I.; Eke, I. (2016). **Dermatophytosis in northern Africa**. *Mycoses*, v. 59, n. 3, p. 137–144. doi:10.1111/myc.12447.

Onifade. A.A.; Al-Sane, N.A.; Al-Musallam, A.A.; Al-Zarban, S. (1998). **A review: Potentials for biotechnological applications of keratin-degrading microorganisms and their enzymes for nutritional improvement of feathers and other keratins as livestock feed resources**. *Bioresource Technology.* 66(1):1-11. doi:10.1016/S0960-8524(98)00033-9.

Pereira, I.; Severino, P.; Santos, A.C.; Silva, A.M.; Souto, E.B. (2018). **Linalool bioactive properties and potential applicability in drug delivery systems**. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 171:566-578. doi:10.1016/j.colsurfb.2018.08.001.

Peres, N.T. de A.; Maranhão, F.C.A.; Rossi, A.; Martinez-Rossi, N.M. (2010). **Dermatófitos: interação patógeno-hospedeiro e resistência a antifúngicos**. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 85, p. 657–667.

Prakash, B., Singh, P., Kedia, A., & Dubey, N.K. (2012). **Assessment of some essential oils as food preservatives based on antifungal, antiaflatoxin, antioxidant activities and in vivo efficacy in food system**. *Food Res Int*, 49(1), 201-8. doi:10.1016/j.foodres.2012.07.021.

Riffel, A.; Lucas, F.S.; Heeb, P.; Brandelli, A. (2003). **Characterization of a new keratinolytic bacterium that completely degrades native feather keratin**. *Arch Microbiol.* 179(4):258–265. doi:10.1007/s00203-003-0525-8.

Roana, J.; Mandras, N.; Scalas, D.; Campagna, P.; Tullio, V. (2021). **Antifungal Activity of *Melaleuca alternifolia* Essential Oil (TTO) and Its Synergy with Itraconazole or Ketoconazole against *Trichophyton rubrum***. *Molecules.* 26(2):461. doi:10.3390/molecules26020461.

Rocha, N.U. (2022). **Seleção de microrganismo degradador de pena isolado do solo para a obtenção de queratina e fabricação de fibras têxteis**. Published online March 10, 2022. <http://pantheon.ufrj.br/handle/11422/17463>

Roy, M.; Karhana, S.; Shamsuzzaman, M.; Khan, MohdA. (2023). **Recent drug development and treatments for fungal infections.** Braz J Microbiol. doi:10.1007/s42770-023-00999-z.

Russo, G.; Toutous Trelu, L.; Fontao, L.; Ninet, B. (2023) **Towards an Early Clinical and Biological Resistance Detection in Dermatophytosis: About 2 Cases of Trichophyton indotineae.** J. Fungi. 9, 733. doi:10.3390/jof9070733.

Sabadin, C.S.; Benvegnú, S.A.; da Fontoura, M.M.; Saggini, L.M.; Tomimori, J.; Fischman, O. (2011). **Onychomycosis and tinea pedis in athletes from the State of Rio Grande Do Sul (Brazil): a cross-sectional study.** Mycopathologia. 171(3):183-189. doi:10.1007/s11046-010-9360-z.

Santamarta, S.; Aldavero, A.C.; Rojo, M.A. (2023). **Essential oil of Cymbopogon martini, source of geraniol, as a potential antibacterial agent against Bacillus subtilis, a pathogen of the bakery industry.** F1000Res. 10:1027. doi:10.12688/f1000research.54196.2.

Scott, J.A.; Untereiner, W.A. (2004). **Determination of keratin degradation by fungi using keratin azure.** Med Mycol. 2004;42(3):239-246. doi:10.1080/13693780310001644680.

Shams-Ghahfarokhi, M.; Shokoohamiri, M.R.; Amirrajab, N.; Moghadasi, B.; ghajari, A.; Zeini, F.; Sadeghi, G.; Razzaghi-Abyaneh, M. (2006). **In vitro antifungal activities of Allium cepa, Allium sativum and ketoconazole against some pathogenic yeasts and dermatophytes.** Fitoterapia. 77(4):321-323. doi:10.1016/j.fitote.2006.03.014.

Silva, C.S. da, Neufeld, P.M.; Gouvêa, E.H.; Abreu, P.A. (2019). **Etiologia e epidemiologia da tinea capitis: relato de série de casos e revisão da literatura.** Rev bras anal clin. 9-16.

Silva, F.; Ferreira, S.; Duarte, A.; Mendonça, D.I.; Domingues, F.C. (2011). **Antifungal activity of Coriandrum sativum essential oil, its mode of action against Candida species and potential synergism with amphotericin B.** Phytomedicine. 19(1):42-47. doi:10.1016/j.phymed.2011.06.033.

Silva, L.; Sousa, J.; Toscano, C.; Viana, I. (2022). **Deep dermatophytosis caused by Trichophyton rubrum in immunocompromised patients.** An Bras Dermatol. 97(2):223-227. doi:10.1016/j.abd.2021.05.014.

Ministério da Saúde. Situação Epidemiológica Accessed August 5, 2023. <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/m/micoses-endemicas/situacao-epidemiologica>.

Teixeira, M.L.; Silveira, D.; Oliveira, F.; Vieira, L.C.; Aragão, T.V.; Sousa, D.P. et al. (2013). **Linalool nanoemulsion presents antitumor activity in a human cancer model.** Journal of Biomedical Nanotechnology. doi:10.1166/jbn.2013.1497.

Tirado-Sánchez, A.; González, G.M.; Bonifaz, A. (2020). **Endemic mycoses: epidemiology and diagnostic strategies. Expert Review of Anti-infective Therapy.** 18(11):1105-1117. doi:10.1080/14787210.2020.1792774.

Vishnu, S.; Kumawat, T.K.; Sharma, A.; Seth, R.; Chandra, S. (2015) **Dermatophytes: Diagnosis of dermatophytosis and its treatment**. African Journal of Microbiology Research, v. 9, n. 19, p. 1286–1293.

Wang, J.J.; Swaisgood, H.E.; Shih, J.C. (2003). **Bioimmobilization of keratinase using Bacillus subtilis and Escherichia coli systems**. Biotechnol Bioeng. 81(4):421-429. doi:10.1002/bit.10485.

Weitzman, I.; Summerbell, R. (1995). **The Dermatophytes**. Clinical microbiology reviews. 8:240-259. doi:10.1128/CMR.8.2.240.

Welsh, O.; Vera, R.; Torres, L.; Romero, N.; Lozano, E.; Chaves, C.; Restrepo, S. & Celis, A. (2010). **Isolation and identification of keratinophilic fungi and related keratinolytic fungi in some soils from Colombia**. Mycopathologia, 169(3), 155-63. doi:10.1007/s11046-009-9256-y.

Zaghloul, T.I.; Embaby, A.M.; Elmahdy, A.R. (2011). **Biodegradation of chicken feathers waste directed by Bacillus subtilis recombinant cells: Scaling up in a laboratory scale fermentor**. Bioresource Technology. 102(3):2387-2393. doi:10.1016/j.biortech.2010.10.106.

Zhang, M., Jiang, L., Li, F., Xu, Y., Lv, S., and Wang, B. (2019). **Simultaneous dermatophytosis and keratomycosis caused by Trichophyton interdigitale infection: a case report and literature review**. BMC Infect. Dis. 19:983. doi:10.1186/s12879-019-4612-0.

Zhou, X.; Zeng, M.; Huang, F.; Qin, G.; Song, Z.; Liu, F. (2023) **The potential role of plant secondary metabolites on antifungal and immunomodulatory effect**. Appl Microbiol Biotechnol. 107(14):4471-4492. doi:10.1007/s00253-023-12601-5.