



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CENTRO DE TECNOLOGIA – CTEC
CURSO DE ENGENHARIA QUÍMICA



GUSTAVO VOLNEY MOTA AMARAL

**Estudo da Aplicação de Extratos Pirolenhosos no Diagnóstico e Uso Terapêutico em
Onicomioses**

Maceió-AL

2020

GUSTAVO VOLNEY MOTA AMARAL

**Estudo da Aplicação de Extratos Pirolenhosos no Diagnóstico e Uso Terapêutico em
Onicomioses**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Engenharia Química da Universidade Federal de Alagoas como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. João Inácio Soletti

Maceió-AL

2020

Catlogação na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária: Taciana Sousa dos Santos – CRB-4 – 2062

A485e Amaral, Gustavo Volney Mota.
Estudo da aplicação de extratos pirolenhosos no diagnóstico e uso terapêutico em onicomioses / Gustavo Volney Mota Amaral. – 2020.
43 f. : il. ; figs. ; tabs. color.

Orientador: João Inácio Soletti.
Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Engenharia Química) –
Universidade Federal de Alagoas. Centro de Tecnologia. Maceió, 2020.

Bibliografia: f. 41-43.

1. Onicomiose. 2. Tratamento alternativo. 3. Extrato pirolenhoso. 4. Pirólise. 5. Atividade antimicrobiana. I. Título.

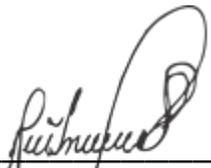
CDU: 616.596: 615.451.1



GUSTAVO VOLNEY MOTA AMARAL

**ESTUDO DA APLICAÇÃO DE EXTRATOS PIROLENHOSOS NO
DIAGNÓSTICO E USO TERAPÊUTICO EM ONICOMICOSSES**

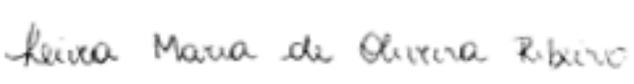
Banca Examinadora



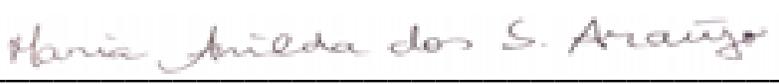
João Inácio Soletti, DSc (orientador)



Mozart Daltro Bispo, DSc (co-orientador)



Lívia Maria de Oliveira Ribeiro, DSc, (CTEC-UFAL)



Maria Anilda dos Santos Araújo, DSc (UNIT- AL)

A Deus, toda a honra e toda a glória, agora e para sempre.
À minha família, que sempre me apoiou e me proveu. Aos meus amigos, sem os quais este caminho teria sido muito mais árduo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, em sua infinita bondade e misericórdia, por tantas graças e bênçãos derramadas sobre a minha vida em todos os âmbitos, mas especialmente pelo dom da inteligência, advindo de Seu Santo Espírito, que me permitiu trilhar esse caminho de formação acadêmica. Também à Virgem Santíssima, que sempre me amparou e intercedeu por mim nos momentos de maior necessidade. Que este Trabalho e todos os meus esforços daqui em diante, decorrentes dos frutos desta conclusão de curso, possam retribuir todo esse amor e servir sempre e unicamente para a maior glória de Deus.

À toda a minha família, em especial aos meus pais, Volney e Luciane, e aos meus irmãos Guilherme e Anne, que sempre estiveram presentes desde a minha infância até a minha maturidade. Agradeço a vocês, que nunca impuseram barreiras nos meus sonhos e sempre me incentivaram, inspiraram e, principalmente, me amaram por quem eu sou. Sou eternamente grato a cada um de vocês e espero que possa retribuir por todo o esforço que fizeram para que eu me tornasse quem sou hoje.

À minha namorada, Christiane, por ter sido a companheira, parceira, amiga e confidente, por ter me dado forças nos momentos de fraqueza, por ter partilhado de alegrias e tristezas e, principalmente, por ter me acolhido em sua vida com tanto zelo e carinho. Saiba que este é apenas o começo de uma grande e linda jornada que trilharemos juntos.

Aos meus padrinhos e madrinhas, Tita, Péu, Mozart e Helton, às minhas afilhadas, Alice e Stephany, às minhas famílias espirituais do EJD, Segue-Me e Eis-Me Aqui, por serem um lembrete constante da presença de Deus em minha vida e me apoiarem em cada decisão importante que tive que tomar.

Aos meus amigos de colégio e da UFAL, em especial aos Patrões, ao pessoal da Parede e aos Sobreviventes, que alegraram minha vida e foram como irmãos e irmãs para mim.

Ao MEJ e, em especial, à PROTEQ e a todos os seus membros, por terem me proporcionado uma vivência profissional diferenciada e única, ao longo da minha graduação.

À Plastec, por ter me acolhido e dado uma oportunidade única de estagiar e aprimorar os meus conhecimentos adquiridos na faculdade.

Aos meus professores da Papaletas, do Santa Madalena Sofia e da UFAL, que contribuíram imensamente para a minha formação pessoal e acadêmica.

Ao pessoal do LASSOP e da Unit, em especial ao Prof. Johnny, ao Mozart, à Prof^a Anilda e aos seus alunos, Mylena e Érico, por terem me dado todo apoio técnico e científico no desenrolar deste Trabalho.

RESUMO

A onicomicose é uma doença que acomete as unhas, causada, principalmente, por fungos dermatófitos – *e.g. Trychophyton mentagrophytes* e *T. rubrum* – e que pode causar inúmeros efeitos fisiológicos, psicossociais e ocupacionais. Esta condição apresenta dificuldades quanto ao seu diagnóstico e tratamento, por conta de características inerentes das unhas, de modo que as pessoas acometidas geralmente precisam se submeter, por um período longo, ao uso de medicações via oral, as quais podem trazer consigo efeitos colaterais indesejados. Diante dessas dificuldades, surge a possibilidade de se utilizar, como alternativa ao tratamento sistêmico padrão, os extratos pirolenhos como medicações de uso tópico no combate às onicomicoses. Estes produtos, obtidos do bio-óleo de pirólise de diversos tipos de biomassa, possuem ação antimicrobiana comprovada, frente a algumas bactérias e fungos, além de já serem bem estabelecidos na agropecuária oriental em diversas outras aplicações. O presente trabalho se prestou a investigar a ação dos extratos pirolenhos de palmáceas frente aos principais microrganismos causadores das onicomicoses, pelos testes de Difusão em Ágar por Poço e de Microdiluição em Caldo, seguindo as diretrizes do *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI). Com isso, foi possível obter resultados qualitativos, pela inibição do crescimento microbiano nas placas de Petri, e quantitativos, pela obtenção da Concentração Inibitória Mínima (MIC) de cada extrato avaliado, comprovando a ação antimicrobiana dos extratos avaliados. Também foi investigada a composição de cada um destes extratos, em busca de correlações entre compostos e potencial antifúngico, segundo a qual foi possível constatar a presença de grupos fenóis, ácidos orgânicos e carbonilas, os quais são derivados da degradação da lignina e são os principais responsáveis por conferir tal atividade antimicrobiana aos extratos.

Palavras-chave: Onicomicose, pirólise, extrato pirolenhoso, concentração inibitória mínima, atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

Onychomycosis is a disease that affects the nails, caused mainly by dermatophyte fungi – *e.g.* *Trychophyton mentagrophytes* and *T. rubrum* – and that can cause numerous physiological, psychosocial and occupational effects. This condition presents difficulties regarding its diagnosis and treatment, due to the inherent characteristics of the nails, so that those affected, generally need to undergo, for a long period, the use of oral medications, which can bring with them unwanted side effects. In view of these difficulties, the possibility arises of using, as an alternative to the standard systemic treatment, pyroligneous extracts as a topical medication to combat onychomycosis. These products, obtained from pyrolysis bio-oil of different types of biomass, have a proven antimicrobial action against some bacteria and fungi, in addition to being well established in eastern agriculture in several other applications. The present work is set to investigate the action of pyroligneous extracts of palm trees against the main microorganisms that cause onychomycosis, by the Disk Susceptibility and the Broth Dilution tests, following the guidelines of the Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI). Thus, it was possible to obtain qualitative results, by observing the inhibition of microbial growth in Petri dishes, and quantitative results, by obtaining the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of each evaluated extract, proving their antimicrobial action. The composition of each of these extracts was also investigated, searching for correlations between compounds and antifungal potential, according to which it was possible to verify the presence of phenolic groups, organic acids and carbonyls, which are derived from the degradation of lignin and are the main responsible for imparting such antimicrobial activity to the extracts.

Key words: Onychomycosis, pyrolysis, pyroligneous extract, minimal inhibitory concentration, antimicrobial activity.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	4
2	OBJETIVOS	5
2.1	Geral	5
2.2	Específicos	5
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
3.1	Onicomicoses	6
3.1.1	Classificação Clínica, Sintomas e Efeitos da Doença	6
3.1.2	Diagnóstico e Tratamento	9
3.2	Pirólise	12
3.2.1	Características Gerais da Pirólise	12
3.2.2	Biomassa	13
3.2.3	Bio-óleo, Extratos Pirolenhosos e Aplicações	15
4	METODOLOGIA	17
4.1	Produção dos Extratos Pirolenhosos	17
4.1.1	Pirólise de Palmáceas	17
4.1.2	Preparo dos Extratos Pirolenhosos para Análise Cromatográfica.....	18
4.1.3	Análise Cromatográfica dos Extratos Pirolenhosos	18
4.2	Teste de Difusão em Ágar por Poço	19
4.2.1	Produção do Meio de Cultura Ágar Dextrose Sabouraud	19
4.2.2	Isolamento e Repicagem dos Microrganismos.....	20
4.3	Teste de Microdiluição em Caldo	23
4.3.1	Produção do Meio de Cultura RPMI-1640	23
4.3.2	Preparo das Soluções dos Extratos Pirolenhosos	23
4.3.3	Avaliação das Concentrões Inibitórias Mínimas (MIC)	24
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	26
5.1	Análise Cromatográfica dos Extratos Pirolenhosos	26
5.2	Testes de Difusão em Ágar por Poço	30
5.3	Testes de Microdiluição m Caldo	34
6	CONCLUSÃO	40
	REFERÊNCIAS	41

1 INTRODUÇÃO

A saúde e o bem-estar são objetos diretos de estudo da Medicina, porém, com o desenvolvimento tecnológico e a intercomunicação com as diversas áreas da ciência, como a Engenharia, é possível alcançar soluções e explorar áreas que, de modo individual, estes segmentos não conseguiriam. Na Dermatologia, por exemplo, as onicomicoses apresentam algumas dificuldades no diagnóstico e tratamento que a Engenharia Química pode ajudar a superar, junto à Biomedicina.

As onicomicoses são doenças acometidas nas unhas pela ação de fungos dermatófitos, não-dermatófitos e leveduriformes, correspondendo a mais de 50% de todas as doenças ungueais e cerca de 30% das dermatofitoses (ZAIAS, 1980). Apesar de não ser fatal e o sintoma principal ser estético, esta condição acarreta uma série de consequências negativas, com efeitos físicos, psicossociais e, inclusive, ocupacionais às pessoas infectadas (SCHER, 1996).

Além disso, as dificuldades no seu diagnóstico e tratamento ocorrem principalmente devido a características inerentes à própria unha ou por questões técnicas nos procedimentos necessários. Com a tecnologia disponível atualmente, os métodos mais utilizados para o diagnóstico dessas doenças são a microscopia direta com hidróxido de potássio (KOH) e a cultura fúngica, enquanto o tratamento mais aplicado é com uso sistêmico de antifúngicos via oral (SALIBA, 2014). Ambos demandam longos períodos para se obter algum resultado, além de que há questões financeiras, diversos efeitos colaterais e resistência dos microrganismos que podem surgir como impeditivos (THOMAS, 2010).

Por outro lado, a utilização de extratos pirolenhosos (EP) na cultura oriental se mostra promissora para solucionar estas dificuldades. Estas substâncias são co-produtos da produção de biocarvão, obtidos pela pirólise da biomassa utilizada; apresentam odor de fumaça e coloração que varia de amarelo claro a marrom; e são formados por uma mistura de mais de 200 componentes químicos – ácidos orgânicos, fenóis, formaldeído, acetona etc. (RAMKAI, 2009). Historicamente, os EP são largamente aplicados há mais de 400 anos na agricultura japonesa, para aceleração do crescimento das plantas, controle de odores e pragas e outras aplicações. A ação antimicrobiana desses compostos já foi reportada por Ramkai (2009), Araújo et al. (2017), entre outros, frente a variadas espécies de microrganismos.

O presente trabalho busca contribuir para ampliar ainda mais a discussão sobre a aplicação destes extratos, no diagnóstico e tratamento das onicomicoses, especificamente, avaliando a ação antifúngica frente a algumas espécies de fungos causadores destas doenças.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a ação antifúngica dos extratos pirolenhosos de palmáceas com o intuito de viabilizar aplicação no diagnóstico e tratamento das onicomicoses.

2.2 Específicos

- Analisar a sensibilidade das espécies de microrganismos causadoras das onicomicoses frente à ação dos extratos pirolenhosos de palmáceas;
- Investigar a existência de seletividade na ação antifúngica dos extratos pirolenhosos, contra os microrganismos analisados;
- Determinar as concentrações inibitórias mínimas (MIC) de cada extrato, através de testes de microdiluição em caldo;
- Investigar as composições dos extratos pirolenhosos estudados e possíveis correlações entre seus componentes e seu potencial antifúngico;

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Onicomicoses

As onicomicoses são doenças ungueais causadas por fungos dermatófitos, não-dermatófitos e leveduriformes, sendo os principais fungos causadores desta condição o *Trichophyton rubrum* e o *Trichophyton mentagrophytes*, ambos dermatófitos – estudos com amostras de unhas infectadas identificaram estas espécies em mais de 90% dos casos (FAERGEMANN, 2003). Além destes, diversos outros microrganismos também causam esta condição, a depender de alguns fatores como geografia, clima e migração, conforme ilustrado Quadro 1. Outros fatores que contribuem para a incidência das onicomicoses são umidade, uso de calçados oclusos, repetidos traumas na unha, predisposição genética e doenças concomitantes, tais como diabetes, deficiências na circulação periférica, infecções pelo HIV e outras formas de imunossupressão (WELSH, 2010).

Quadro 1 – Fungos dermatófitos relatados como causadores de onicomicoses

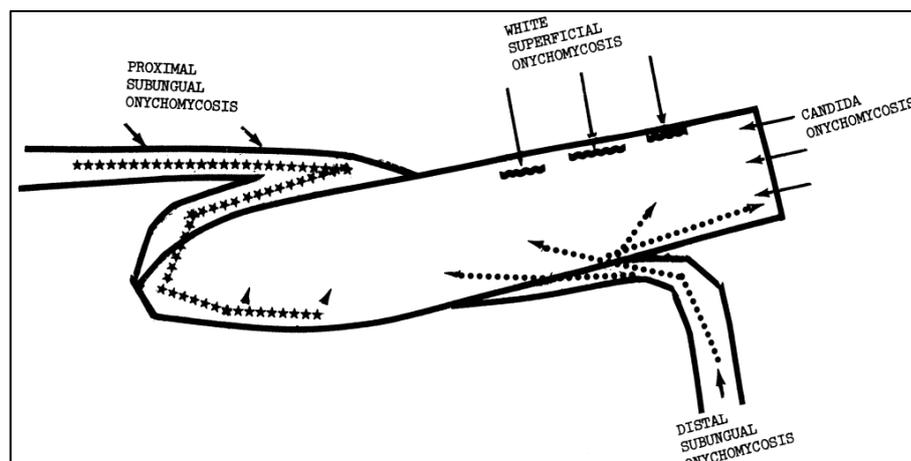
Fungo	Área Geográfica
<i>Trycophyton rubrum</i>	Ao redor do mundo
<i>T. mentagrophytes</i>	Europa e América
<i>T. violaceum</i>	Europa, África e Oriente Próximo
<i>T. schoenleinii</i>	Leste Europeu, Norte da África e Oriente Próximo
<i>T. tonsurans</i>	Ao redor do mundo
<i>T. megninii</i>	Portugal e Espanha
<i>T. concentricum</i>	Raramente relatados (Pacífico Sul, Guatemala, Sul do México)
<i>T. soundance</i>	Raro (África); não estudado
<i>T. gourvillii</i>	Raro (África); não estudado
<i>Epidermophyton floccosum</i>	Ao redor do mundo
<i>Microsporum gypseum</i>	Incomum (ao redor do mundo)
<i>M. audouinii</i>	Raro (Europa, África e América do Norte)
<i>M. canis</i>	Incomum
<i>M. persicolor</i>	Ao redor do mundo

Fonte: ZAIAS, 1980.

3.1.1 Classificação Clínica, Sintomas e Efeitos da Doença

Esta doença é normalmente classificada em quatro principais apresentações clínicas – subungueal distal lateral (OSDL), subungueal proximal (OSP), branca superficial (OBS) e distrófica total (OT) – a depender da maneira na qual a placa da unha é invadida pelo fungo, como está ilustrado na Figura 1.

Figura 1 – Desenho representativo dos pontos de entrada pelos microrganismos causadores de onicomicoses



Fonte: ZAIAS, 1980.

Porém, em estudo mais recente, Hay e Baran sugerem uma revisão destas classificações, modificando o que foi desenvolvido a partir de Zaias, no século XX, concluindo nas tipificações da doença presentes no Quadro 2.

Quadro 2 – Revisão recente da classificação clínica das onicomicoses

Classificação	Sintomas
Subungueal Distal Lateral (DLSO)	Hiperqueratose e uma variedade de discromias, como melanoníquia, onicólise e listras longitudinais nas regiões média ou lateral da placa ungueal
Superficial (SO)	Branca ou preta, irregular ou transversal, originária de baixo da prega proximal e com penetração profunda, invadida pelos fungos a partir da superfície até regiões profundas da placa ungueal
<i>Endonyx</i> (EO)	Combinação da divisão lamelar e descoloração (<i>e.g.</i> manchas leitosas) da placa ungueal, com invasão interna da placa ungueal e sem invasão do leito ungueal
Subungueal Proximal (PSO)	Irregular, com estrias transversais ou longitudinais e secundária à paroníquia (infecção da pele ao redor da unha)
Padrão Misto (MSO)	DLSO + SO; SO + DLSO; SO + PSO; DLSO + PSO
Distrófica Total (TDO)	Pode ocorrer devido a modificações secundárias das outras tipologias em estágios avançados, ou quando associada a doenças com severa imunossupressão (<i>e.g.</i> AIDS) ou em candidoses mucocutâneas crônicas
Onicomicose Secundária	Fungos invadem a placa da unha secundariamente a outras patologias ungueais (<i>e.g.</i> psoríase). Alterações clínicas são dominadas pela morfologia da doença adjacente.

Fonte: HAY & BARAN, 2011.

Além disso, Hay e Baran também apresentam em seus estudos os microrganismos mais comumente associados a cada uma das classificações da onicomicose e da paroníquia, conforme apresentado no Quadro 3.

Quadro 3 – Organismos comumente associados às onicomicoses

Classificação	Organismos comumente associados
DLSO	<i>Tricophyton rubrum</i> , <i>T. mentagrophytes</i> , <i>Epidermophyton floccosum</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Fusarium</i> spp., <i>Scytadilium</i> spp., <i>Scopulariopsis</i> spp.
SO	<i>T. mentagrophytes</i> , <i>T. rubrum</i> , <i>Fusarium</i> spp., <i>Acremonium</i> sp, <i>Scytadilium</i> spp.
<i>Endonyx</i>	<i>T. soudanense</i> , <i>T. violaceum</i>
PSO	<i>T. rubrum</i> , <i>Fusarium</i> spp.
Padrão Misto	<i>T. rubrum</i> , <i>Fusarium</i> spp.
TDO	Dermatófitos em geral (<i>e.g. T. rubrum</i> , <i>T. mentagrophytes</i> etc.), <i>C. albicans</i> , <i>Scytadilium</i> spp.
Paroníquia	- Com onicomicose (geralmente DSO ou PSO): <i>Candida</i> spp., <i>Fusarium</i> sp, <i>Scytadilium</i> spp. - Sem onicomicose: <i>Candida</i> spp., <i>Fusarium</i> spp.

Fonte: HAY & BARAN, 2011.

Independente da sua classificação, essa doença pode representar uma fonte de infecções secundárias, fúngicas ou bacterianas, em outras partes do corpo e a presença de antígenos na placa ungueal pode levar a outras condições clínicas, como asma e sensibilização do trato respiratório, dermatite atópica, urticária e eritema nodoso. Em diabéticos, pode haver a complicação de problemas nos pés, com a formação de úlceras e, conseqüentemente, osteomielite, celulites e, em casos mais extremos, necrose do tecido e amputação da extremidade de membros (THOMAS, 2010).

Apesar de as onicomicoses não representarem risco real à vida humana, as conseqüências que vêm com esta condição vão muito além da estética e da desfiguração da unha, podendo chegar a afetar os pacientes em outros aspectos físicos, psicossociais e ocupacionais. Uma lista de efeitos relacionados às onicomicoses, apresentado por Scher, está apresentada no Quadro 4.

Quadro 4 – Efeitos físicos, psicossociais e ocupacionais relacionados às onicomicoses

Efeitos Fisiológicos	<ul style="list-style-type: none"> - Mobilidade limitada - Pode afetar circulação periférica e desacelerar cicatrização - Exacerba o pé diabético - Pode precipitar tromboflebite e celulite recorrentes - Cria um reservatório fúngico - Pode desencadear urticária, infecções bacterianas, dor e reações dermatofíticas
Efeitos Psicológicos	<ul style="list-style-type: none"> - Embaraço - Autoconsciência - Perda de auto-estima - Perda de confiança - Ansiedade - Depressão
Efeitos Sociais	<ul style="list-style-type: none"> - Relacionamentos prejudicados - Evitar a intimidade - Impressão negativa da aparência física do paciente - Produz medo de contágio
Efeitos Ocupacionais	<ul style="list-style-type: none"> - Destreza e/ou mobilidade limitadas: podem afetar a capacidade do paciente em manusear instrumentos delicados, de atuar em áreas de exacerbação aguda (<i>e.g.</i> salas de procedimentos cirúrgicos) ou com risco de trauma à própria unha

Fonte: SCHER, 1996.

3.1.2 Diagnóstico e Tratamento

Atualmente, a maneira mais aplicada no diagnóstico das onicomicoses corresponde à microscopia direta com hidróxido de potássio e à cultura fúngica, métodos estes que demandam tempo e apresentam dificuldades técnicas mesmo quando aplicados por profissionais experientes, apresentando uma acurácia de 50% a 70% a depender da técnica de coleta e preparo da amostra (SALIBA, 2014).

Além destes, existem outros menos aplicados, como o exame histológico da placa ungueal corada pelo *Periodic Acid-Schiff* (PAS), imuno-histoquímica, dermatoscopia de placa, microscopia confocal, citometria de fluxo, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e reação em cadeia de polimerase (PCR). Estes outros apresentam sensibilidade mais elevada, principalmente quando usados de modo combinado a outros métodos (*e.g.* PAS e cultura fúngica apresentam sensibilidade de 96%), no entanto sua disponibilidade ainda é bastante reduzida (WESTERBERG, 2013). Recentemente, outros métodos vêm sendo estudados, como é o caso da onicoabrasão para auxiliar na coleta de amostras (SALIBA, 2014). A dermatoscopia também vem sendo utilizada, ultimamente, como uma ferramenta de auxílio ao diagnóstico, mas a conclusão é apenas presuntiva, por se basear apenas nas características das alterações ungueais.

A importância do diagnóstico correto dessas doenças se dá por conta de alguns fatores: o tratamento sistêmico de antifúngicos – correspondente à terapia mais comumente aplicada – demanda longos períodos de aplicação e representa altos custos; pode-se desenvolver resistência às drogas e, possivelmente, efeitos colaterais indesejados; possíveis interações com medicamentos usados concomitantemente etc.

Além disso, cerca de 50% dos distúrbios nas unhas que se acredita corresponderem às onicomicoses são, na verdade, outras condições que podem simulá-las e dificultar ainda mais o diagnóstico, como pode ser observado na Figura 2. Em estudo feito por Westerberg e Voyack, em 2013, foram apresentadas algumas dessas condições, tais como a paroníquia crônica; verrugas virais (localizadas nas pregas das unhas e no tecido subungueal); dermatite crônica; líquen plano; psoríase; “distrofia das 20 unhas”; traumas ungueais, causados por calçados ou manipulações em manicures, pedicures etc., ou até mesmo tumores, como os da Doença de Bowen, fibromas e melanomas.

Figura 2 – Comparação entre psoríase (à esquerda) e onicomicose (à direita)



Fonte: SCHER, 1996; WESTERBERG, 2013.

Por outro lado, em relação ao tratamento, a forma mais aplicada às onicomicoses é o sistêmico via oral, que acarreta altos custos e uma longa duração da terapia antifúngica até que a cura seja atingida ou que surjam efeitos colaterais ou resistência à medicação (WELSH, 2010). Além disso, o uso desses medicamentos pode gerar resistência dos microrganismos à droga e até alguns efeitos colaterais. À parte dos tratamentos orais, também existem os tópicos, geralmente aplicados em estágios iniciais da doença ou de modo complementar ao sistêmico. Inclusive, quando as drogas sistêmicas são contraindicadas, o tratamento tópico pode ser aplicado como uma monoterapia, apesar de apresentar eficiência limitada (THOMAS, 2010). Westerberg (2013) também apresenta, em seus estudos, uma relação entre os possíveis efeitos

colaterais, a depender das medicações comumente utilizadas, bem como a respectiva dosagem prescrita, apresentados no Quadro 5.

Quadro 5 – Possíveis efeitos colaterais das medicações utilizadas no tratamento das onicomicoses

Medicação	Dosagem	Possíveis efeitos colaterais
Ciclopirox (solução 8%)	Aplicar 1x ao dia nas unhas afetadas e na parte inferior das unhas (uso tópico)	Eritema periungueal ou da prega proximal, sensação de queimadura ou ardor, mudanças na forma e coloração das unhas, descoloramento e unhas encravadas
Fluconazol	100 a 300 mg/semana via oral, durante 3 a 6 meses (quirodácilios) ou 6 a 12 meses (pododácilios)	Náusea, vômitos, dor abdominal, diarreia, dor de cabeça e erupções cutâneas
Itraconazol	- Intermitente: 200 mg duas vezes ao dia, por 1 semana/mês, durante 2 meses (quirodácilios) ou 3 meses (pododácilios) - Contínua: 200 mg via oral 1x ao dia durante 6 semanas (quirodácilios) ou 12 semanas (pododácilios)	Náusea, vômitos, hipocalcemia, elevação da transaminase e dos níveis de triglicerídeos, erupções cutâneas
Terbinafina	250 mg via oral 1x ao dia durante 6 semanas (quirodácilios) ou 12 semanas (pododácilios)	Perturbações gastroenterais, erupções cutâneas, dor de cabeça

Fonte: WESTERBERG, 2013.

A eficiência destes tratamentos também é apresentada no mesmo estudo, em termos de taxas de cura clínica e micológica, bem como os organismos visados na terapia (Quadro 6).

Quadro 6 – Eficiência dos tratamentos sistêmicos aplicados às onicomicoses em adultos

Medicação	Microrganismos visados	Taxa de cura (%)	
		Clínica	Micológica
Ciclopirox (solução 8%)	<i>Candida</i> spp. e dermatófitos	6 a 9	29 a 36
Fluconazol	<i>Candida</i> spp.	41	48
Itraconazol	<i>Candida</i> spp., dermatófitos, não-dermatófitos e <i>Aspergillus</i> spp.	70	63 (dosagem intermitente) 69 (dosagem contínua)
Terbinafina	Leveduras, dermatófitos e não-dermatófitos	66	76

Fonte: WESTERBERG, 2013.

Também existem métodos de tratamento mecânicos e químico, os quais geralmente são aplicados de modo complementar ao oral. Dentre os mecânicos, são comuns a lixa, aparagem, curetagem e debridamento da unha infectada, os quais costumam tornar a unha mais fina, diminuem a carga fúngica e elevam a taxa de penetração das medicações tópicas, além de

prevenir úlceras e traumas em pacientes com diabetes e promover um melhor resultado estético. A avulsão total ou parcial da unha também é utilizada, porém a primeira não é preferida por facilitar o desenvolvimento do tecido mole distal e a formação de unhas encravadas. Por outro lado, o tratamento químico aplicado é o da avulsão química, semelhante ao debridamento mecânico, porém a pele ao redor da unha geralmente fica irritada após este procedimento (THOMAS, 2010).

Grande parte da dificuldade enfrentada pelos diversos métodos de tratamento citados se dá por características intrínsecas à própria unha, conforme foi relatado em estudo de 2013 realizado por Silva, sobre a inativação dos microrganismos causadores das onicomicoses por terapia fotodinâmica:

O tratamento das onicomicoses representa uma das principais dificuldades terapêuticas encontradas na prática clínica, em razão de algumas particularidades: as unhas são estruturas não-vascularizadas, o que explica a pequena penetração dos medicamentos aplicados por via sistêmica e o crescimento das unhas se faz de maneira lenta (5 a 6 meses nas unhas das mãos e 12 a 18 meses nas unhas dos pés para cobrir todo o leito ungueal). Portanto, as dermatofitoses das unhas dos pés são mais rebeldes ao tratamento que as das mãos e, quando tratados com antifúngicos, crescem 2 mm ao mês (SILVA, 2013, p. 31).

Com isso em vista, os extratos pirolenhosos surgem como produtos com o potencial necessário para ultrapassar as dificuldades existentes no diagnóstico e no tratamento das onicomicoses, através de suas características antifúngicas e possível uso como agente tópico.

3.2 Pirólise

Segundo Speight (2008, p. 274. *apud* BOATENG et al., 2007): “pirólise é um método à média temperatura que produz gás, óleo e carvão a partir de matéria-orgânica que pode ser posteriormente processada em combustíveis úteis ou matéria-prima”. Este processo de transformação consiste na decomposição química de biomassa na ausência de oxigênio, ou quando este é insuficiente para a combustão, resultando em produtos nas fases sólida (*charcoal*, ou carvão residual), líquida (bio-óleo) e gasosa (gases não-condensáveis ricos em hidrocarbonetos), como citado (SPEIGHT, 2008).

3.2.1 Características Gerais da Pirólise

As composições dos produtos obtidos, especialmente da fase líquida, e suas propriedades dependem intimamente da matéria-prima utilizada, do tipo e condições do processo – temperatura, taxa de aquecimento, entre outras – e equipamento empregados, além da eficiência da coleta dos produtos (BRIDGEWATER, 2004). Um exemplo da influência

dessas variáveis foi apresentado por Vieira (2014), com os rendimentos dos produtos na pirólise de lodo de esgoto com duas temperaturas diferentes aplicadas ao processo, como consta no Quadro 7.

Quadro 7 – Rendimentos dos produtos da pirólise de lodo de esgoto

Fase produzida	Rendimento (%)	
	450 °C	550 °C
Fração aquosa	12,7	15,4
Bio-óleo	11,6	11,4
Fração sólida	62,1	58,4
Fração gasosa	13,7	14,8

Fonte: VIEIRA, 2014.

Estes valores confirmam a influência da temperatura principalmente na proporção das fases líquida e sólida, aumentando significativamente a primeira com o aumento da temperatura (SILVA et al., 2012. *apud* VIEIRA, 2014).

Além disso, os constituintes da biomassa são processados em taxas de aquecimento e faixas de temperatura diferentes, bem como por diferentes mecanismos e caminhos: a hemicelulose é decomposta primeiro, a cerca de 200 °C a 260 °C, seguida da celulose, degradada de 240 °C a 350 °C, e, por fim, da lignina, último componente a degradar-se, de 280 °C a 500 °C (DEMIRBAS, 2002; VIEIRA, 2014). Isso mostra a importância da temperatura para o processamento do material, na pirólise, que pode promover a degradação parcial ou total dos componentes.

Portanto, pode-se configurar e desenvolver processos que favoreçam a obtenção dos produtos de maior interesse: temperaturas mais baixas e longos tempos de residência favorecem a produção de material residual carbonáceo (carvão), enquanto temperaturas mais elevadas e longos tempos de residência aumentam a conversão em produtos gasosos; a fase líquida é favorecida em processos com temperaturas mais elevadas e baixos tempos de residência. No que diz respeito à problemática do diagnóstico e tratamento das oncomicoses, dentre os produtos da pirólise, a fase aquosa do bio-óleo é onde se concentra o maior interesse.

3.2.2 Biomassa

Segundo Vieira (2014): “biomassa pode ser definida como toda matéria orgânica, seja de origem animal, vegetal ou microrganismos, suscetível a ser transformada em energia”. Dentro da definição clássica, esses materiais são submetidos a processos de valorização

termoquímica que convertam a matéria bruta original em produtos cuja finalidade seja energética ou a síntese de compostos orgânicos.

Além disso, a biomassa vegetal é essencialmente composta por carbono (C), hidrogênio (H), oxigênio (O), enxofre (S) e nitrogênio (N), além de possuírem umidade (W) e material residual (A), que são constituintes básicos da estrutura de materiais combustíveis (GOMES, 2010. *apud* VIEIRA 2014; BERTON, 2012). As composições em base seca de algumas diferentes biomassas, em termos de porcentagem em massa, estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Composição elementar da biomassa (% em base seca)

Biomassa	C	H	O	N	S	A	Poder Calorífico (mJ/kg)*
Pinus	49,25	5,99	44,36	0,06	0,03	0,3	17,23
Eucalipto	49,00	5,87	43,97	0,30	0,01	0,72	25,00
Casca de arroz	40,96	4,30	35,86	0,40	0,02	18,34	13,15
Bagaço de cana	44,80	5,35	39,55	0,38	0,01	9,79	18,24
Casca de coco	48,23	5,23	33,19	2,98	0,12	10,25	23,55
Sabugo de milho	46,58	5,87	45,46	0,47	0,01	1,40	12,12
Lodo de esgoto	28,00	4,6	23,2	4,9	1,2	-	21,10
Pequi	-	-	-	-	-	-	23,70
R. de algodão	47,05	5,35	40,77	0,65	0,21	5,89	18,26

Fonte: GOMES, 2010. *apud* VIEIRA, 2014.

Em relação à umidade relativa, em termos de valorização termoquímica, é interessante que a biomassa tenha valores o mais baixo possíveis, para evitar que seu potencial calorífico se perca no consumo para evaporação da água contida no próprio material. De um modo geral, pode-se encontrar valores de umidade de 41,27% a 70,20% em espécies de madeira e, ao promover a secagem em equilíbrio com o ar seco, pode-se atingir valores ao redor de 20%, embora os valores desejáveis sejam na faixa de 5% a 10% (BERTON, 2012; RINGER et al., 2006; DERMIBAS, 2005). Para diminuir o teor de água até níveis mais aceitáveis, deve-se proceder com processos de pré-processamento da matéria-prima, tais como moagem, prensagem, secagem, entre outros (FOUST, et al., 2006).

São exemplos de biomassa os vegetais não-lenhosos (sacarídeos, celulósicos, amiláceos, aquáticos), vegetais lenhosos (madeira), resíduos orgânicos (agrícolas, urbanos, industriais) e bioflúidos (óleos vegetais), sendo sua composição avaliada em termos da porcentagem em massa de alguns elementos químicos presentes na estrutura de materiais combustíveis.

3.2.3 Bio-óleo, Extratos Pirolenhosos e Aplicações

O bio-óleo, ou óleo de pirólise, corresponde a um líquido marrom escuro, com odor característico de fumo e rico em compostos oxigenados, oriundos da degradação da biomassa original, sendo os principais componentes: ácidos orgânicos, álcoois, aldeídos, ésteres, cetonas, açúcares, compostos fenólicos e furanos. Em trabalho de Berton (2012), foram apresentadas as classes constituintes dos bio-óleos, conforme representado na Tabela 2.

Tabela 2 – Compostos Identificados nos Bio-Óleos

Classes de Compostos	Faixa de Composição em Massa (%)
Ácidos orgânicos	5 – 10
Aldeídos e hidroxí-aldeídos	5 – 20
Cetonas e hidróxi-cetonas	0 – 10
Anidro-sacaroses	5 – 30
Ligninas Pirolíticas e Fenóis	20 – 30
Hidrocarbonetos	0 – 5
Água	15 – 30

Fonte: OASMAA & PEACOCKE, 2002. *apud* BERTON, 2012.

Este produto é constituído de duas fases: uma orgânica, conhecida como *tar* ou alcatrão, bastante viscosa e insolúvel em água; e outra aquosa, conhecida como extrato ácido, vinagre de madeira, ácido pirolenhoso ou extrato pirolenhoso (PE). Esta, contém os compostos de maior polaridade, como levoglucosano e outras anidro-sacaroses, ácidos orgânicos hidróxi-cetonas, hidróxi-aldeídos, furfural, entre outros, totalizando mais de 200 substâncias químicas individuais (RAMKAI, 2009; BROWN, 2017). A proporção do extrato pirolenhoso na fase líquida depende da composição da biomassa utilizada e sua umidade inicial, além das condições operacionais aplicadas (TOMASINI, 2015; VIEIRA, 2019).

De um modo geral, os bio-óleos podem ser aplicados como combustíveis em queimadores, motores e turbinas ou submetidos ao processo de *upgrading*, para serem convertidos em combustíveis convencionais de transporte ou em outros insumos químicos (BRIDGEWATER, 2004). Por outro lado, os extratos pirolenhosos por si só já são aplicados na medicina oriental há mais de 400 anos e estão bem estabelecidos na agropecuária do Japão e da China desde a década de 1930. Dentre suas aplicações, foram reportadas: a promoção da qualidade do solo contra doenças e pestes nas plantações; a promoção do crescimento das plantas com menor uso de fertilizantes, o que melhora a qualidade sem toxicidade para pessoas e animais; como substituto de um antibiótico convencional (apramicina) na alimentação de porcos, entre outros.

Além disso, estudos mais recentes comprovam o potencial uso desses extratos ácidos, produzidos a partir de diversas biomassas, como antimicrobianos: Ramkai (2009) reportou a ação de extratos de bambu, leucena e eucalipto frente a bactérias e fungos causadores de dermatites; Wei (2010) utilizou extratos de galhos de noqueira contra algumas espécies microbianas (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacterium proteus*, entre outras); Ibrahim et al. (2013) comprovou a eficiência do ácido pirolenhoso de *Rhizophora apiculata* em *Candida albicans* e Araújo et al. (2017) investigaram a ação antibacteriana e antifúngica dos extratos de *Eucalyptus urograndis* e *Mimosa tenuiflora* contra *E. coli*, *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *C. albicans* e *Cryptococcus neoformans*.

4 METODOLOGIA

4.1 Produção dos Extratos Pirolenhosos

A produção dos bio-óleos (Figura 3), foi realizada no Laboratório de Sistemas de Separação e Otimização de Processos – LASSOP – da Universidade Federal de Alagoas (UFAL) utilizando 1,0 kg das seguintes biomassas como matéria-prima: *Cocos nucifera* (coco), *Elaeis guineenses* (dendê), *Syagrus coronata* (ouricuri), *Acrocomia aculeata* (macúba) e *Euterpe oleracea* (açai). A seguir, será descrito como os extratos pirolenhosos foram obtidos a partir dos bio-óleos e as etapas necessárias para realização da análise cromatográfica.

Figura 3 – Exemplos dos bio-óleos produzidos no LASSOP



Fonte: Autor, 2020.

4.1.1 Pirólise de Palmáceas

As biomassas utilizadas foram obtidas de diferentes fontes: o endocarpo do coco foi fornecido pela COPRA Indústria de Alimentos (Maceió-AL); o dendê foi coletado no Condomínio Residencial Aldebaran Beta (Maceió-AL), sendo utilizado apenas seu endocarpo; o açai foi coletado no Centro de Ciências Agrárias (CECA), localizado no município de Rio Largo-AL, do qual foram retiradas as fibras para obtenção do endocarpo; o ouricuri foi cedido pelo CECA e sua polpa foi retirada com uma despulpadora vertical, para obtenção do endocarpo; e a macaúba foi coletada nas dependências do Aeroporto Internacional Zumbi dos

Palmares (Maceió-AL). Os materiais coletados para pirólise foram submetidos à secagem em estufa, a 70 °C, por 24h.

A pirólise foi realizada em uma planta piloto, composta por um reator tubular de aço inoxidável – 51,2 cm de altura, 7,89 cm de diâmetro interno e flange de 19,7 cm – um forno tubular modelo JUNG LT6 2010 de 1 kW de potência e limite de temperatura até 1.000 °C, revestido por uma manta térmica com o objetivo de diminuir as perdas de calor. O reator funciona a vácuo, por uma bomba FANEM. Modelo 089 Cal, numa pressão negativa de 20 kPa. O processo foi configurado para a temperatura de 400 °C, taxa de aquecimento de 10 °C/min e tempo de residência de 2 h.

A fase líquida produzida na pirólise foi obtida por condensação a 5 °C e os extratos pirolenhos foram separados do alcatrão (fase líquida não-aquosa) após sua decantação, pipetando-os diretamente dos recipientes em que estavam armazenados e transferindo-os para um outro recipiente, onde foram isolados para as etapas posteriores.

4.1.2 Preparo dos Extratos Pirolenhos para Análise Cromatográfica

Foram coletadas amostras de 5 mL de cada extrato para realização de extração líquido-líquido com Dicloro Metano (DCM). Cada uma das amostras foi introduzida em um tubo de ensaio, no qual foi realizada a separação por esgotamento, da seguinte maneira: foram adicionados 5 mL do solvente aos tubos de ensaio com cada um dos extratos, seguido por agitação manual para promover o contato entre as duas fases.

Em seguida, a mistura foi deixada em repouso, até o sumiço das bolhas e a respectiva formação de duas fases: uma contendo DCM e os compostos extraídos de interesse, a qual foi reservada em um tubo de ensaio à parte; e outra dos extratos com alguns remanescentes de suas composições, a qual foi submetida a uma nova extração com mais 5 mL de DCM, até a terceira extração.

Por fim, os tubos de ensaio com a solução de DCM e os compostos extraídos foram depositados na capela, para secagem do solvente por evaporação, durante sete dias.

4.1.3 Análise Cromatográfica dos Extratos Pirolenhos

O processo de identificação e caracterização dos extratos foi realizado em um equipamento SHIMADZU, modelo QP2010Plus, utilizando uma coluna DB-5 com comprimento de 60 m, diâmetro de 0,25 mm, *thickness* de 0,25 µL e com um fluxo de 0,8 mL/min. Foi injetada 1 µL da amostra no modo *split* no injetor e a programação de temperatura

do GC iniciou em 40 °C por 2 min, com aquecimento do forno até 280 °C a uma taxa de 4 °C/min, permanecendo a essa temperatura por 5 min.

O processamento de dados foi realizado pelo software GCMS-Solution (SHIMADZU), utilizando a biblioteca NIST-14, com confirmação dos compostos identificados na NIST cuja similaridade foi maior que 80%.

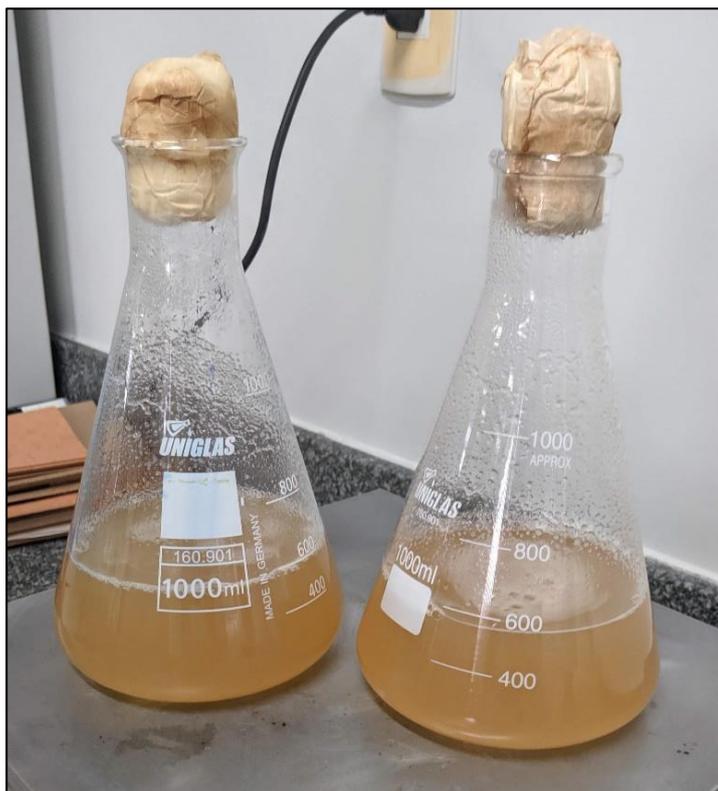
4.2 Teste de Difusão em Ágar por Poço

Na realização dos testes de difusão em ágar por poço, foi necessário obter culturas isoladas dos microrganismos a serem submetidos ao experimento, além de algumas amostras dos extratos pirolenhosos, cuja ação antifúngica foi avaliada, e do preparo de alguns materiais, conforme instruções do *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*, em sua norma M2-A8. Para a realização dos testes de microdiluição em caldo, os procedimentos também foram baseados em instruções do CLSI, nas normas M27-A2 e M38-A. A seguir, cada etapa do presente trabalho será descrita em detalhes.

4.2.1 Produção do Meio de Cultura Ágar Dextrose Sabouraud

O meio de cultura, Ágar Dextrose Sabouraud (KASVI), foi preparado para utilização nos tubos de ensaio, na repicagem dos microrganismos; e nas placas de Petri, para a realização da disco-difusão. O preparo seguiu as instruções do fornecedor, presentes no rótulo de sua embalagem, e consistiu na solubilização de 32,75 g do meio em pó, pesados em balança semianalítica, em 500 mL de água destilada, o que foi feito em duplicata em dois erlenmeyers de 1 L, como registrado na Figura 4.

Figura 4 – Meio de cultura Ágar Dextrose Sabouraud preparado em duplicata



Fonte: Autor, 2020.

Em seguida, a solução foi aquecida com o auxílio de uma chapa aquecedora até se atingir a homogeneidade, com agitação manual e cuidado para não queimar nem ferver a solução, e distribuída nos tubos de ensaio, para repicagem dos microrganismos.

4.2.2 Isolamento e Repicagem dos Microrganismos

As culturas de microrganismos foram fornecidas, por orientação da Prof^a Maria Anilda, em parceria com o Laboratório Médico DILAB, que conseguiu isolar seis espécies de interesse para o presente estudo: *Tricophyton rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans*, *Microsporium gypseum*, *M. canis*, *Fusarium* spp. e *Candida* spp..

Estas espécies foram levadas ao Laboratório de Microbiologia da Universidade Tiradentes (Unit-AL), onde foram repicados em triplicata, utilizando tubos de ensaio com meio de cultura (Ágar Dextrose Sabouraud), e vedados com algodão hidrofóbico, para permitir o bom desenvolvimento das espécies, sem contaminação. Para a inoculação desses tubos de ensaio, foram coletadas amostras do micélio das culturas isoladas, fornecidas pelo DILAB, e feito o estriamento sobre a superfície inclinada do meio, deixando-as se desenvolver por cerca

de 72h. Ao todo, foram preparados 18 (dezoito) tubos de ensaio com meio de cultura, sendo três para cada espécie.

4.2.3 Esterilização dos Materiais

Além disso, também foram preparados tubos de ensaio com 3 mL de água destilada cada, para o posterior uso no preparo das suspensões de microrganismos. Os tubos de ensaio e erlenmeyers com meio de cultura, bem como os tubos de ensaio com água destilada, uma estante plástica com ponteiros de pipetas semiautomáticas e frascos de vidro foram todos levados para autoclavagem, a 118-121 °C por 15 minutos (Figura 5).

Figura 5 – Autoclave utilizado para esterilização dos materiais



Fonte: Autor, 2020.

Após a autoclavagem, com todo o material já esterilizado, o meio de cultura restante nos erlenmeyers foi transferido para as placas de Petri, nas quais foram realizados os testes de sensibilidade com os microrganismos. Foram utilizadas placas de Petri 140x15 mm descartáveis e estéreis, sendo produzidas, ao todo, 21 unidades com meio de cultura.

4.2.4 Preparo dos Extratos Pirolenhosos para Teste de Difusão em Ágar por Poço

Ao todo, foram utilizadas oito amostras de extratos, sendo três de coco (numeração: 1, 2 e 3), uma de dendê (numeração: 4), duas de ouricuri (numeração: 5 e 6), uma de açaí (numeração: 7) e uma de macaúba (numeração: 8). Antes da utilização dos extratos nos testes de difusão em ágar por poço, foi necessário realizar a filtração destes, utilizando filtros de tipo membrana.

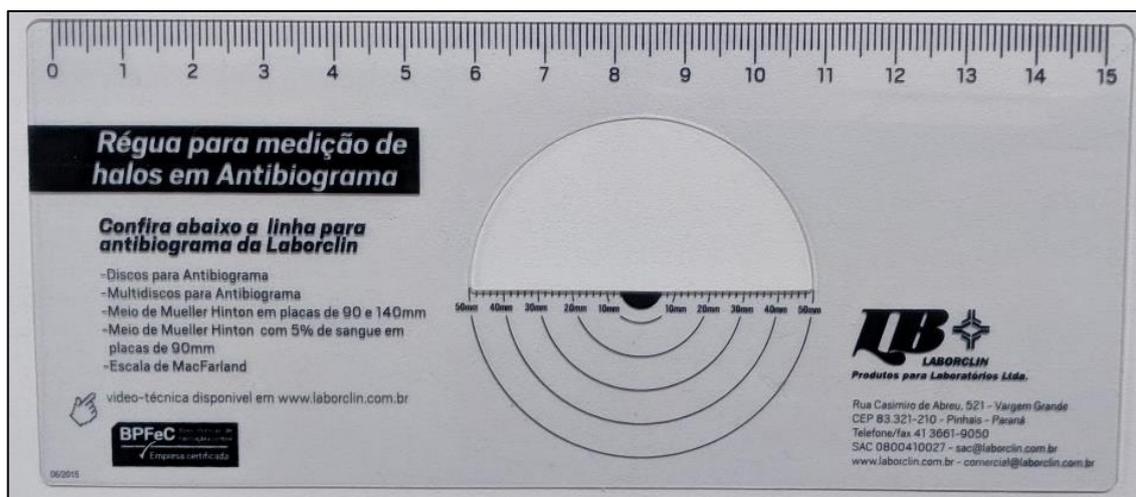
4.2.4 Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos

Com o desenvolvimento das culturas, após cerca de 72h, foram produzidas as soluções de microrganismos e a inoculação das placas de Petri com meio de cultura. Os 3 mL de água destilada de cada tubo de ensaio foram vertidos nos tubos contendo as culturas em desenvolvimento e, com um *swab*, foi feita a raspagem do micélio na superfície do meio para a suspensão dos microrganismos na água. Em seguida, essas suspensões de cada microrganismo foram transferidas de volta para os tubos de ensaio que continham apenas água destilada e agitadas em vórtex, por cerca de 2 minutos.

Com o *swab* utilizado previamente, embebido na suspensão, foi realizado o semeio das placas e, para cobrir a totalidade da superfície de cada uma, foi feito um pequeno despejo do material no centro da placa e o estriamento em três planos, com rotação de 60°. Em seguida, os poços foram perfurados ($\Phi = 6$ mm) com o auxílio de ponteiras, sendo deixado espaço suficiente entre cada um para a medição dos halos de inibição. Ao todo, foram perfurados oito poços para introdução dos extratos, em arranjo circular, e um poço central para servir de controle negativo ao teste. Este procedimento foi realizado em triplicata para cada microrganismo, de modo que cada placa foi semeada com uma espécie, apenas, rotulando-as e enumerando os poços para correta identificação dos microrganismos e extratos utilizados em cada uma.

Para o preenchimento dos poços perfurados nas placas semeadas com microrganismos, foram introduzidas alíquotas de 20 μ L de cada extrato e, em seguida, as placas foram lacradas com fita crepe e deixadas, à temperatura ambiente, para o desenvolvimento dos fungos e avaliação da ação antifúngica dos extratos. A observação das placas foi feita diariamente, por sete dias seguidos, concluindo-se com as medições dos halos de inibição formados em cada placa, realizadas com uma régua apropriada (Figura 6).

Figura 6 – Régua para medição de halos em antibiograma



Fonte: Autor, 2020.

4.3 Teste de Microdiluição em Caldo

4.3.1 Produção do Meio de Cultura RPMI-1640

O meio de cultura, marca Vitrocell Embriolife, foi preparado conforme as instruções do fabricante, pela adição de 1 sachê do meio em pó em água destilada (90% do volume a ser preparado) sob agitação constante. Quando dissolvido todo o material neste volume, foi completado com os 10% restantes de água destilada e realizada a filtração em membranas, utilizando pressão positiva.

4.3.2 Preparo das Soluções dos Extratos Pirolenhosos

Conforme instruções do CLSI, foi necessário preparar as soluções dos antifúngicos a serem testados com concentração no mínimo 100 vezes maior que a concentração final testada nas placas de microdiluição. Para tanto, foram produzidos 2,1 mL de soluções com concentração final de 100 mg/mL de cada extrato, adicionando 210 μ L de Dimetil Sulfóxido (DMSO) e completando o volume com uma solução salina (0,9% NaCl em água destilada). Para o preparo destas soluções, foram utilizados os seguintes volumes de cada extrato:

Tabela 3 – Volumes de cada extrato utilizados no preparo para microdiluições seriadas

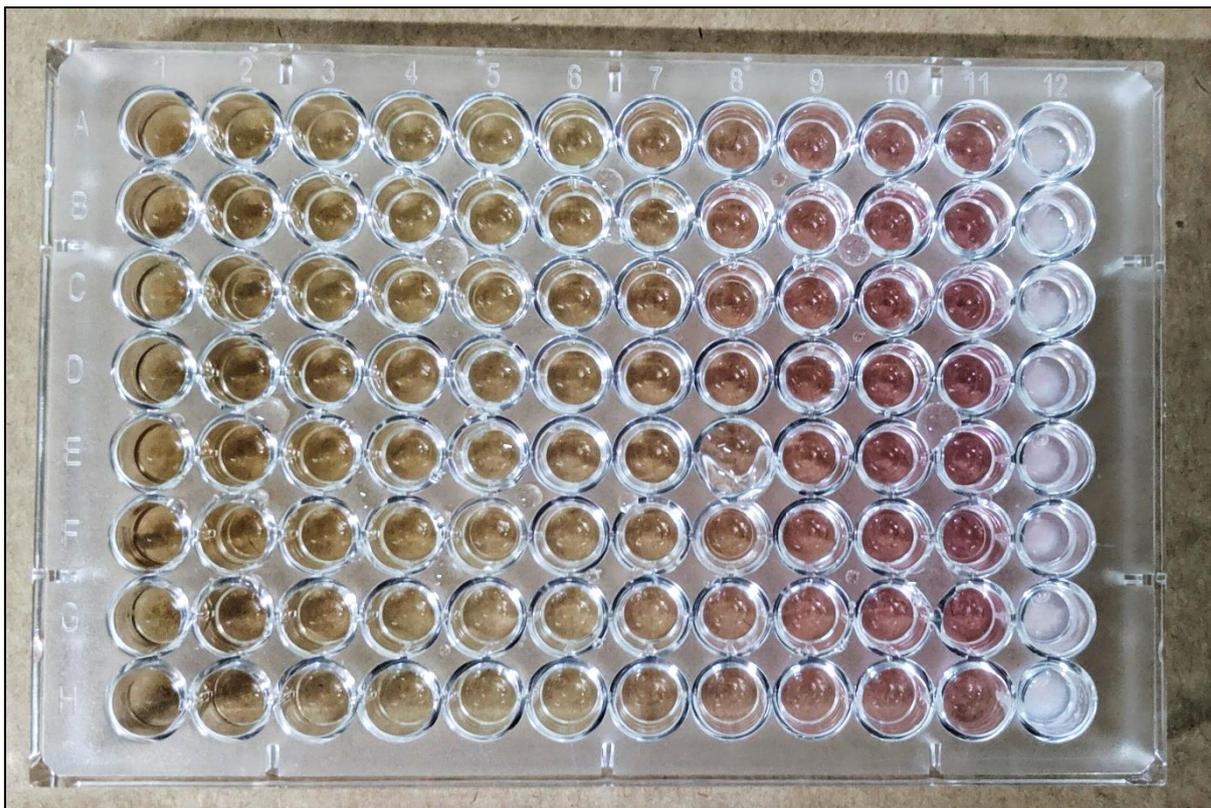
Extrato	Volume (μ L)	Extrato	Volume (μ L)
Coco (1)	190,91 μ L	Ouricuri (5)	190,91 μ L
Coco (2)	210,00 μ L	Ouricuri (6)	210,00 μ L
Coco (3)	233,31 μ L	Açaí (7)	210,00 μ L
Dendê (4)	210,00 μ L	Macaúba (8)	210,00 μ L

Fonte: Autor, 2020.

4.3.3 Avaliação das Concentrões Inibitórias Mínimas (MIC)

Foram utilizadas as mesmas suspensões dos microrganismos que haviam sido utilizadas para os testes de disco-difusão, além das soluções dos extratos e do meio RPMI-1640, como descrito acima. Também foram utilizadas placas de microdiluição (Figura 7), com 96 poços (8 linhas – A a H – e 12 colunas) e pipetas semiautomáticas de 10, 20 e 100 μL .

Figura 7 – Placa de microdiluição



Fonte: Autor, 2020.

Inicialmente, foram introduzidos 100 μL do meio de cultura em cada um dos 96 poços, nas 14 placas necessárias para o desenvolvimento dos testes de microdiluição. Em seguida, foram acrescentados nas primeiras colunas das placas mais 100 μL de cada uma das oito soluções de extrato preparadas, de duas em duas linhas, conforme o Quadro 8.

Quadro 8 – Distribuição dos extratos nas colunas e placas de microdiluição

Linhas:	Nº dos Extratos							
	A	B	C	D	E	F	G	H
Placas ímpares	1	1	2	2	3	3	4	4
Placas pares	5	5	6	6	7	7	8	8

Fonte: Autor, 2020.

Deste modo, cada extrato foi testado em duplicata, nas linhas repetidas, e foi utilizado um par de placas (uma, par e outra, ímpar) para cada espécie de fungo testada, possibilitando a análise da ação de todos os extratos em estudo frente a cada um dos microrganismos de interesse. Em seguida, foram feitas as microdiluições, que consistiram na pipetagem de 100 μL das misturas solução de extrato/meio, presentes na 1ª coluna de cada linha, para a 2ª coluna; este procedimento foi repetido da 2ª coluna para a 3ª coluna e assim sucessivamente, até a 10ª coluna das placas, conforme ilustrado na Figura 8. Dessa forma, as soluções dos extratos, preparadas a 100 mg/mL, foram diluídas de 50 mg/mL, na 1ª coluna, a 0,098 mg/mL, na 10ª coluna de cada placa.

Figura 8 – Microdiluições realizadas para análise da MIC



Fonte: Autor, 2020.

As suspensões dos fungos foram introduzidas em todos os 96 poços de cada uma das 14 placas de microdiluição preparadas, em um volume de 10 μL . Além disso, na 12ª coluna/linha A de cada uma das placas, foi introduzido um antifúngico comercial, o Itraconazol – preparado a 10 mg/mL – para servir de controle negativo ao teste. Este foi diluído na vertical, ao longo da 12ª coluna, de modo que sua concentração nas placas variou de 5 mg/mL a 0,039 mg/mL. A 11ª coluna foi mantida apenas com o meio de cultura e o inóculo, como controle positivo.

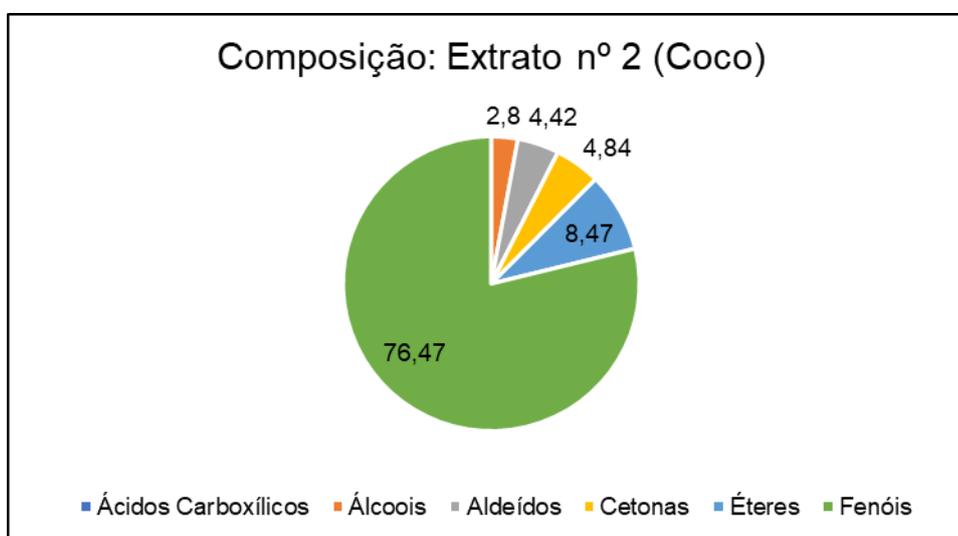
As placas foram isoladas com fita crepe e incubadas a 35 °C por 72 h, sendo retiradas e mantidas à temperatura ambiente após este período para leitura dos resultados, feita pela observação visual do crescimento microbiano nos poços, indicado pela turbidez da amostra. Com isso, a MIC corresponde à menor concentração em que não houve desenvolvimento microbiano, para cada fungo e extrato analisados.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Análise Cromatográfica dos Extratos Pirolenhosos

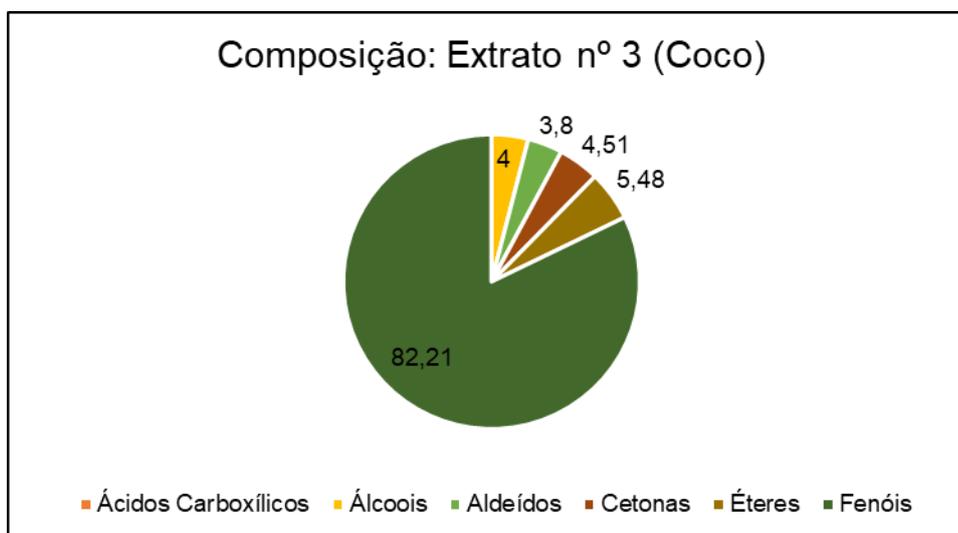
Com os resultados obtidos no software GCMS-Solution, foi possível identificar os compostos com similaridade maior que 80%, em relação à biblioteca NIST-14, os quais estão apresentados nas Figuras X a Y, em termos da área relativa (%). Não foi possível analisar os resultados para os Extratos nº 1 e 8, devido a falhas na injeção das amostras no equipamento.

Figura 9 – Áreas relativas (%) dos grupos de compostos identificados no Extrato nº 2

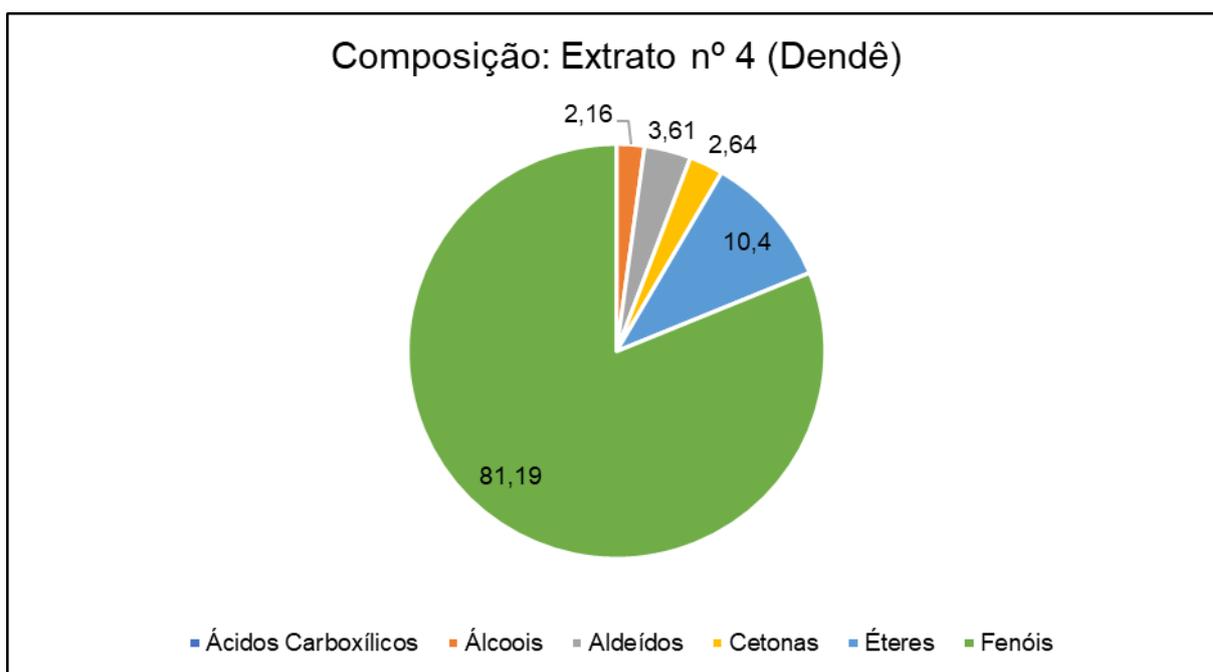


Fonte: Autor, 2020.

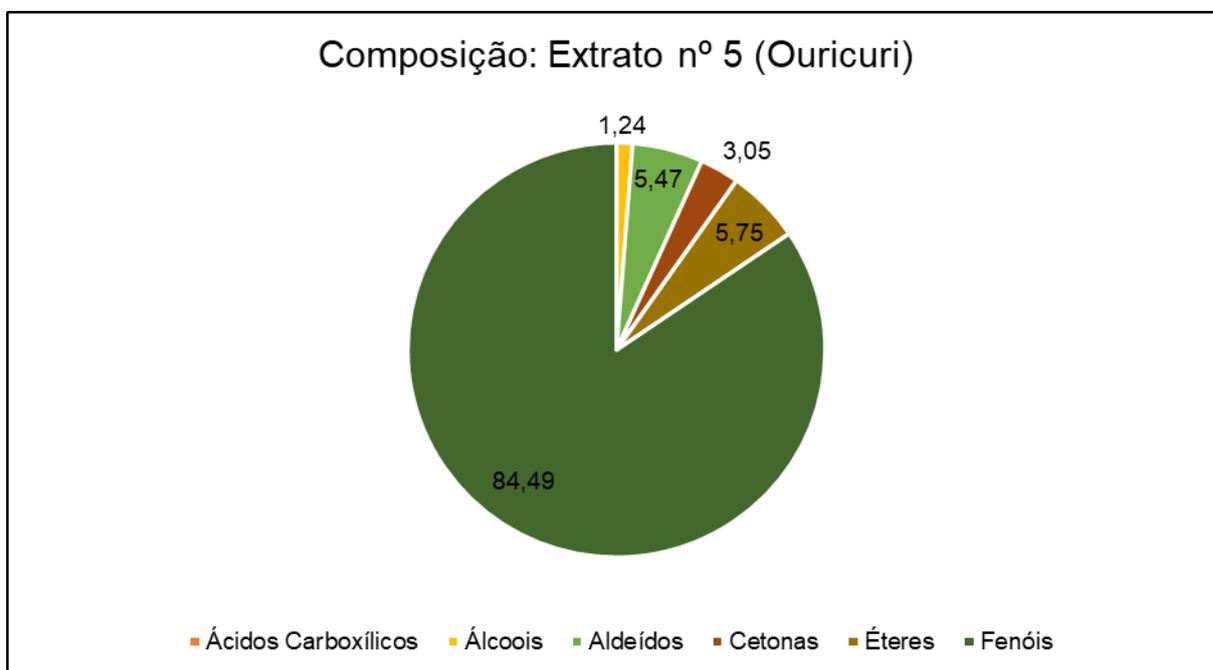
Figura 10 – Áreas relativas (%) dos grupos de compostos identificados no Extrato nº 3



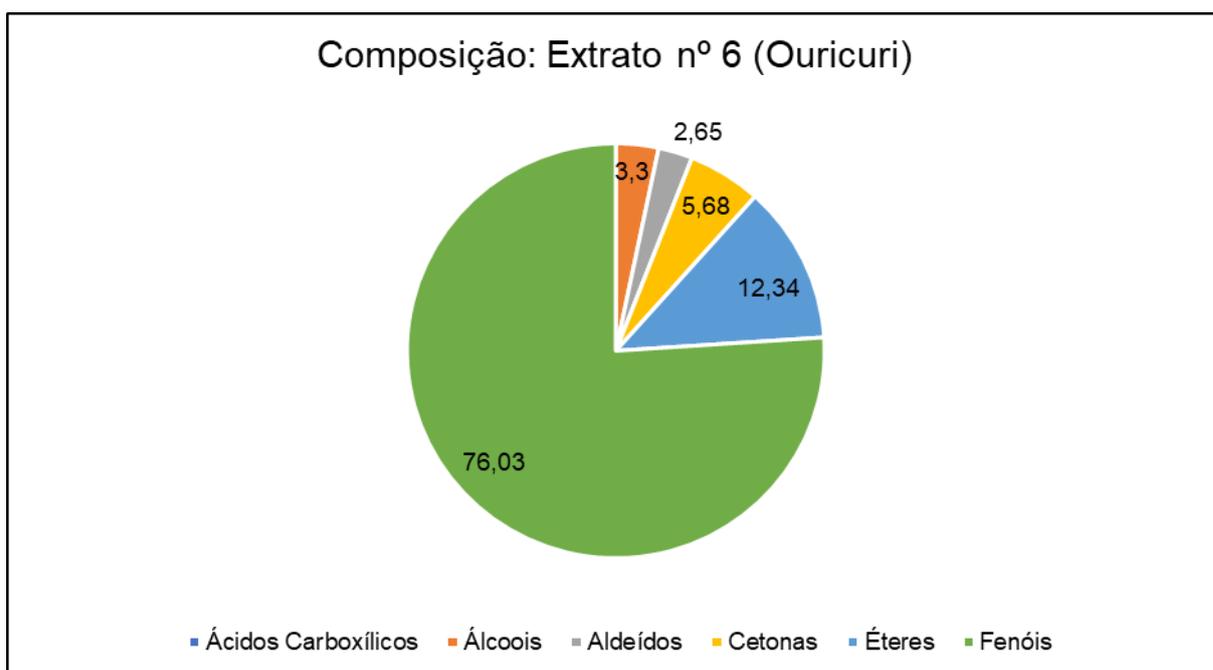
Fonte: Autor, 2020.

Figura 11 – Áreas relativas (%) dos grupos de compostos identificados no Extrato nº 4

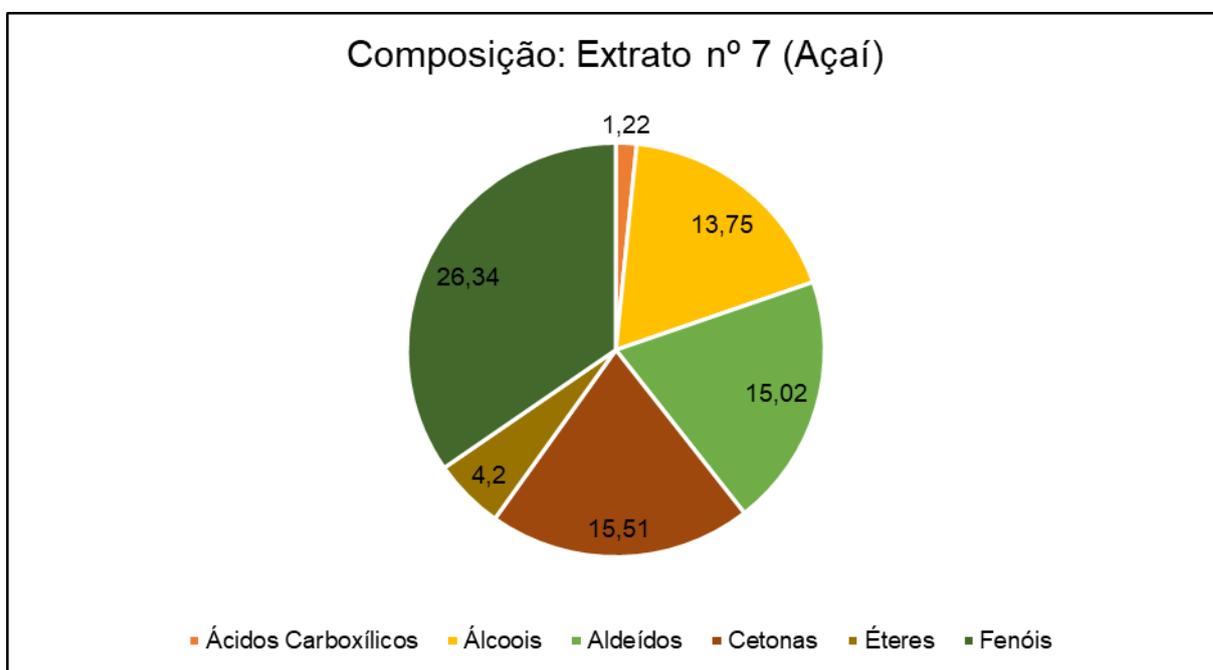
Fonte: Autor, 2020.

Figura 12 – Áreas relativas (%) dos grupos de compostos identificados no Extrato nº 5

Fonte: Autor, 2020.

Figura 13 – Áreas relativas (%) dos grupos de compostos identificados no Extrato nº 6

Fonte: Autor, 2020.

Figura 14 – Áreas relativas (%) dos grupos de compostos identificados no Extrato nº 7

Fonte: Autor, 2020.

Dos compostos identificados, dentre os grupos químicos, estão apresentados no Quadro 9, muitos dos quais são reportados também em estudos por Jahanban-Esfahlan & Amarowicz (2018), Mathew (2015) e Ma *et al* (2011), sobre composição de extratos similares.

Quadro 9 – Compostos identificados por grupos químicos

Grupos Químicos	Compostos Identificados
Ácido Carboxílico	Ácido butanoico, 4-hidróxi-
Álcool	Ciclopentano-1,2-diol; 1,2-Benzenodiol; 1,2-Benzenodiol, 4-metil-
Aldeído	Furfural; 2-Furancarboxaldeído, 5-metil-
Cetona	1,5-Ciclooctadieno, 3-t-butil-; 2-Ciclopenten-1-ona, 2,3-dimetil-; 2-Ciclopenten-1-ona, 2-hidróxi-3-metil-; 2-Ciclopenten-1-ona, 2-metil-; 2-Ciclopenten-1-ona, 3-etil-2-hidróxi-; 2-Ciclopenten-1-ona, 3-metil-
Derivados de Açúcares	D-Allose
Derivados de Furano	2-Acetil-5-metilfurano
Éter	2-Etóxi-4-metilfenol; 1,2,3-Trimetóxi-benzeno; Benzeno, 1,2,3-trimetóxi-5-metil-
Fenol	Fenol; Fenol, 3-metil; Fenol, 4-metil; Fenol, 2-metóxi-; Maltol; Fenol, 2,3-dimetil; Fenol, 2-metóxi-4-metil; Fenol, 4-etil-2-metóxi; Fenol, 2,6-dimetóxi

Fonte: Autor, 2020

Dos 27 compostos identificados neste trabalho, 9 correspondem a fenóis, que corresponderam a áreas relativas de 26,34% (Extrato nº 7) a 82,21% (Extrato nº 3), pela análise de CG. Esse resultado é bastante significativo, pois foi reportado por Himelbloom (2001) que os fenóis, carbonilas e ácidos orgânicos presentes nos extratos pirolenhosos são compostos com atividade antimicrobiana e conferem a este produto seu potencial antifúngico.

A comprovação desse potencial foi relatada por Ma (2001) *et al*, quando foram observadas taxas de inibição de crescimento fúngico de 61,56% a 90,26% – em testes com *Alternaria solani* e *Verticillium dahliae*, respectivamente – devido à ação de ácidos orgânicos extraídos da casca de nozes. Especificamente voltado à ação contra fungos dermatófitos, também foi observada por Ikegami (1998) a propriedade antifúngica específica de alguns compostos fenólicos obtidos em “*Mokusaku-Eki*” – nome popular do PE na Coreia do Sul e Japão. Neste estudo, foi obtida a MIC do 2,6-dimetóxi-fenol correspondente a 150 µg/mL (ou 0,150 mg/mL) contra *Trychophyton mentagrophytes*. Este composto foi identificado em todas as seis amostras analisadas por CG no presente trabalho, com áreas relativas de 3,36% (Extrato nº 7) a 13,56% (Extrato nº 6).

De um modo geral, observa-se que os extratos nº 2, 3, 4, 5 e 6 apresentaram resultados de áreas relativas totais de fenóis com valores de 76,03% a 82,21%, enquanto que apenas o Extrato nº 7 (obtido do açaí) apresentou uma área relativa total desses compostos bastante inferior, correspondente a 26,34%. Por isso, é de se esperar que a ação antifúngica deste último extrato seja um tanto inferior, em relação aos demais, devido à sua baixa composição de fenóis.

5.2 Testes de Difusão em Ágar por Poço

A leitura dos resultados dos testes de disco-difusão, apresentados nas Tabelas 4 a 8, é feita visualmente, pela observação da formação ou não dos halos de inibição em torno dos poços contendo os extratos pirolenhosos, e pela medição do tamanho dos halos formados, para efeitos comparativos. Os resultados apresentados como “N.D.” correspondem aos extratos que não foram utilizados nesta bateria de testes, por estarem indisponíveis no período de execução dos testes, enquanto o código “INC” corresponde a resultados inconclusivos, ou seja, nos quais houve formação de halo mas a medição não foi possível de ser realizada.

Tabela 4 – Resultados observados nos Testes de Difusão em Ágar por Poço com *Trychophyton mentagrophytes*

Extratos:	DIÂMETRO DO HALO (mm)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Repetição 1:	8,0	13,0	N.D.	19,0	N.D.	8,0	6,0	N.D.
Repetição 2:	6,0	16,0	N.D.	27,0	N.D.	8,0	8,0	N.D.
Repetição 3:	Houve contaminação na placa							
DIÂMETRO MÉDIO (mm):	7,0	14,5	N.D.	23,0	N.D.	8,0	7,0	N.D.

Fonte: Autor, 2020.

Tabela 5 – Resultados observados nos Testes de Difusão em Ágar por Poço com *Trychophyton rubrum*

Extratos:	DIÂMETRO DO HALO (mm)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Repetição 1:	29,0	34,0	N.D.	INC	N.D.	28,0	19,0	N.D.
Repetição 2:	24,0	30,0	N.D.	31,0	N.D.	23,0	19,0	N.D.
Repetição 3:	Houve contaminação na placa							
DIÂMETRO MÉDIO (mm):	26,5	32,0	N.D.	31,0	N.D.	25,5	19,0	N.D.

Fonte: Autor, 2020.

Tabela 6 – Resultados observados nos Testes de Difusão em Ágar por Poço com *Microsporium gypseum*

Extratos:	DIÂMETRO DO HALO (mm)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Repetição 1:</i>	17,0	26,0	N.D.	28,0	N.D.	20,0	15,0	N.D.
<i>Repetição 2:</i>	21,0	29,0	N.D.	INC	N.D.	32,0	17,0	N.D.
<i>Repetição 3:</i>	Houve contaminação na placa							
DIÂMETRO MÉDIO (mm):	19,0	27,5	N.D.	28,0	N.D.	26,0	16,0	N.D.

Fonte: Autor, 2020.

Tabela 7 – Resultados observados nos Testes de Difusão em Ágar por Poço com *Candida* spp.

Extratos:	DIÂMETRO DO HALO (mm)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Repetição 1:</i>	14,0	9,0	14,0	13,0	18,0	16,0	8,0	15,0
<i>Repetição 2:</i>	14,0	10,0	15,0	12,0	14,0	13,0	0,0	13,0
<i>Repetição 3:</i>	Houve contaminação na placa							
DIÂMETRO MÉDIO (mm):	14,0	9,5	14,5	12,5	16,0	14,5	4,0	14,5

Fonte: Autor, 2020.

Tabela 8 – Resultados observados nos Testes de Difusão em Ágar por Poço com *Fusarium* spp.

Extratos:	DIÂMETRO DO HALO (mm)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Repetição 1:</i>	19,0	21,0	24,0	19,0	23,0	15,0	14,0	19,0
<i>Repetição 2:</i>	19,0	19,0	24,0	20,0	26,0	14,0	13,0	19,0
<i>Repetição 3:</i>	23,0	22,0	27,0	22,0	27,0	21,0	18,0	24,0
DIÂMETRO MÉDIO (mm):	20,3	20,7	25,0	20,3	25,3	16,7	15,0	20,7

Fonte: Autor, 2020.

Os resultados foram obtidos para cada microrganismo, os quais estavam inoculados individualmente nas placas de Petri, o que tornou possível analisar a sua susceptibilidade frente à ação de cada um dos extratos utilizados, conforme Figura 15.

Figura 15 – Placa de Petri utilizada para teste de disco-difusão com *Fusarium* spp.



Fonte: Autor, 2020.

Por outro lado, as placas inoculadas com *Trychophyton tonsurans* e *Microsporium canis* não tiveram bom desenvolvimento das culturas, diferentemente das outras espécies analisadas, pois os fungos só cresceram nas bordas das placas, conforme Figura 16, não conseguindo se desenvolver bem nas regiões mais centrais e, assim, impossibilitando a correta leitura dos resultados.

Figura 16 – Placa de Petri sem pleno desenvolvimento da cultura inoculada (leitura de resultado inviável)



Fonte: Autor, 2020.

Além disso, houve bastante problema de contaminação nas placas, o que impossibilitou a leitura desejada da susceptibilidade dos fungos selecionados frente à ação dessas amostras de extrato. Porém, algumas observações interessantes puderam ser feitas mesmo com a incidência de contaminação: algumas placas, supostamente contaminadas por *Aspergillus* spp., apresentaram a formação de halos de inibição ao desenvolvimento da espécie contaminante, conforme a Figura 17.

Figura 17 – Placas de Petri com contaminação provável de *Aspergillus* spp. com formação de halos de inibição



Fonte: Autor, 2020.

Esse resultado, mesmo indesejado no âmbito deste trabalho, é um grande indicativo do potencial antimicrobiano dos extratos pirolenhosos, o qual pode ser posteriormente investigado não só em sua ação frente aos fungos dermatófitos causadores de onicomicoses, mas também abrindo o espectro a outras espécies e aplicações.

De um modo geral, pode-se observar que houve formação de halo em todas as placas inoculadas e com todos os extratos testados, o que corrobora a ação antifúngica dos extratos pirolenhosos frente aos dermatófitos causadores de onicomicoses em questão. As medidas dos diâmetros dos halos formados servem para efeitos de comparação qualitativa em uma mesma placa, visto que não é possível garantir as mesmas condições de desenvolvimento microbiano entre placas diferentes. Deste modo, pode-se dizer que, dada uma mesma placa, halos maiores implicam em uma ação antifúngica mais potente e vice-versa, o que está representado no

Quadro 10 com a ordem do potencial antifúngico experimental dos extratos para cada microrganismo.

Quadro 10 – Comparativo qualitativo do potencial antifúngico de cada extrato frente aos fungos testados

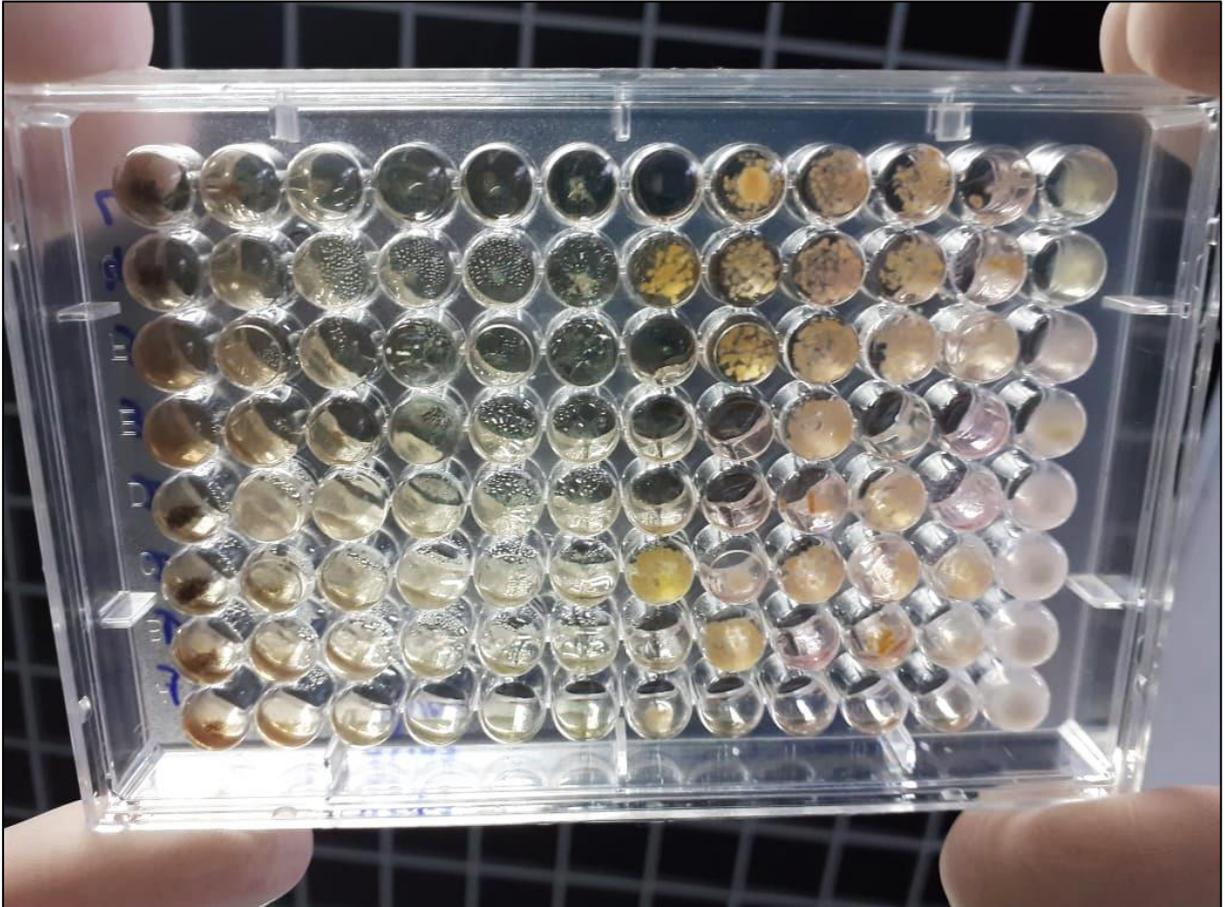
Microrganismo utilizado	Extratos ordenados pelo potencial antifúngico experimental
<i>Trychophyton mentagrophytes</i>	4 > 2 > 6 > 1 = 7
<i>T. rubrum</i>	2 > 4 > 1 > 6 > 7
<i>Microsporum gypseum</i>	4 > 2 > 6 > 1 > 7
<i>Candida</i> spp.	5 > 3 = 6 = 8 > 1 > 4 > 2 > 7
<i>Fusarium</i> spp.	5 > 3 > 2 = 8 > 1 = 4 > 6 > 7

Fonte: Autor, 2020.

De posse destes resultados, é possível observar que, quando testados todos os extratos juntos, os extratos nº 5 e 3º apresentaram halos com maior tamanho, em relação aos demais, seguidos pelos extratos de nº 4, 2 e 6. Outra observação é em relação ao extrato de nº 7, que apresentou o menor diâmetro de halo em todas os testes realizados e, inclusive, chegou a permitir o pleno desenvolvimento de *Candida* spp. em uma das repetições experimentais realizadas, o que pode sugerir uma ação antifúngica muito fraca deste extrato. Essa fraca ação do extrato nº 7 foi prevista pela análise de sua composição, feita por CG e apresentada no tópico 5.1, que apresentou baixa composição de fenóis – aos quais se atribui o potencial antifúngico dos extratos. Porém, para melhor quantificar a ação antifúngica destes, é necessário realizar os testes de microdiluição em caldo com cada um, para determinação de suas respectivas MIC.

5.3 Testes de Microdiluição m Caldo

A leitura dos resultados dos testes de microdiluição é feita visualmente, pela observação do crescimento microbiano nos poços das placas, que é indicado pela turbidez (Figura 18). Como as concentrações dos extratos são decrescentes da 1ª até a 10ª coluna, espera-se que nas primeiras não haja desenvolvimento fúngico, pela ação inibitória dos extratos mais concentrados. Porém, com o extrato diluído o suficiente, sua ação antifúngica deve ser comprometida e, então, as espécies analisadas devem se desenvolver. A concentração do último poço no qual não seja observada turbidez, ou seja, onde não houver desenvolvimento microbiano, corresponde à concentração inibitória mínima (MIC) respectiva ao extrato e fungo em questão.

Figura 18 – Resultados visuais dos testes de microdiluição em caldo

Fonte: Autor, 2020.

Após o tempo determinado para o crescimento dos microrganismos nas placas de microdiluição, foram observados os resultados apresentados nas Tabelas 9 a 13, nos quais “-” corresponde ao não desenvolvimento fúngico e “+”, ao oposto.

Tabela 9 – Resultados observados nos testes de microdiluição em caldo com *Trychophyton mentagrophytes*

Nº do Extrato / Nº da Coluna	1ª	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª	7ª	8ª	9ª	10ª	11ª	12ª
1	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
2	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
3	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
4	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
5	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
6	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
7	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
8	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+

Fonte: Autor, 2020.

Tabela 10 – Resultados observados nos testes de microdiluição em caldo com *Trychophyton rubrum*

Nº do Extrato / Nº da Coluna	1ª	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª	7ª	8ª	9ª	10ª	11ª	12ª
1	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
2	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
3	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
4	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
5	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
6	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
7	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
8	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+

Fonte: Autor, 2020.

Tabela 11 – Resultados observados nos testes de microdiluição em caldo com *Trychophyton tonsurans*

Nº do Extrato / Nº da Coluna	1ª	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª	7ª	8ª	9ª	10ª	11ª	12ª
1	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
2	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
3	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
4	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
5	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
6	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
7	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
8	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+

Fonte: Autor, 2020.

Tabela 12 – Resultados observados nos testes de microdiluição em caldo com *Microsporum gypseum*

Nº do Extrato / Nº da Coluna	1ª	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª	7ª	8ª	9ª	10ª	11ª	12ª
1	Resultados inconclusivos											
2	Resultados inconclusivos											
3	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
4	Resultados inconclusivos											
5	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
6	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
7	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
8	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+

Fonte: Autor, 2020.

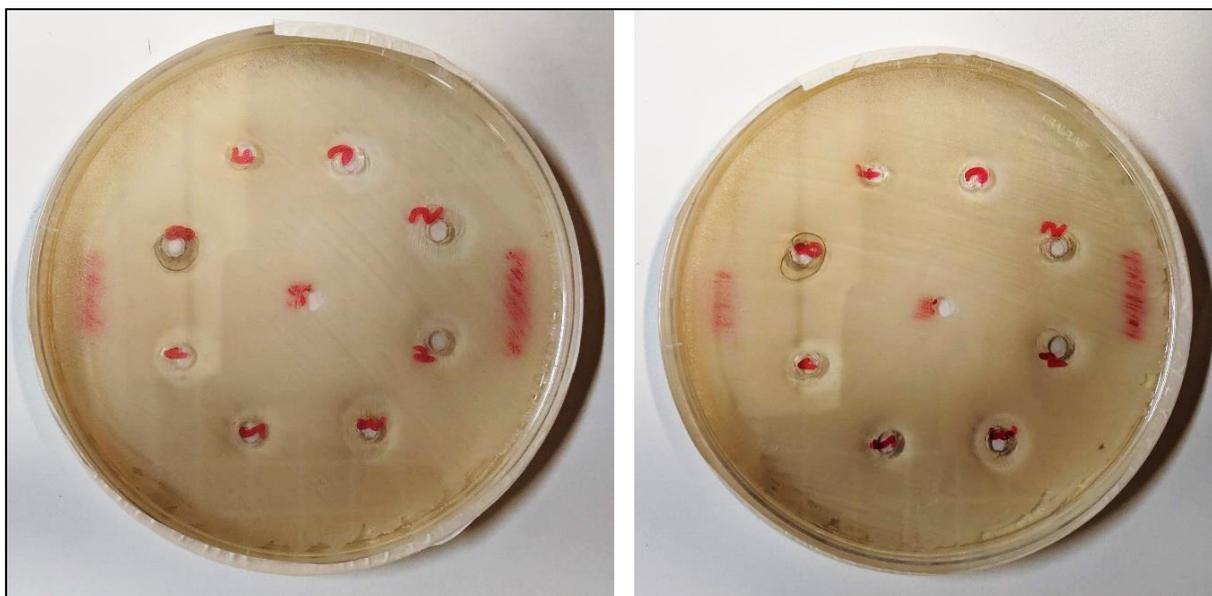
Tabela 13 – Resultados observados nos testes de microdiluição em caldo com *Candida* spp.

Nº do Extrato / Nº da Coluna	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a	6 ^a	7 ^a	8 ^a	9 ^a	10 ^a	11 ^a	12 ^a
1	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Fonte: Autor, 2020.

As placas que foram inoculadas com *Microsporium canis* não apresentaram desenvolvimento da espécie nos poços de controle positivo, onde não foi introduzido extrato nem Itraconazol, não sendo possível concluir o teste de microdiluição em caldo neste caso, apenas. Além disso, em uma das placas com *M. gypseum*, houve inconsistências nos resultados dos extratos 1, 2 e 4, o que tornou inviável a interpretação das observações feitas e, assim, não foi possível determinar a MIC desses extratos. Também não foi possível realizar os testes de microdiluição com *Fusarium* spp., por conta da indisponibilidade desse fungo ao realizar esta etapa do procedimento.

Outra observação que pode ser feita é em relação às placas com *Candida* spp., que apresentou bastante desenvolvimento da espécie nos poços, chegando, inclusive, a não apresentar sensibilidade ao extrato nº 3. Isso, porém, não foi observado nos testes de disco-difusão, nos quais todas as amostras utilizadas dos extratos, inclusive este citado, apresentaram potencial antifúngico pela formação de halos de inibição, como mencionado no tópico 5.2 e representado na Figura 19. Apesar disso, foi possível determinar a MIC de cada extrato contra *Candida* spp. com os resultados obtidos.

Figura 19 – Testes de difusão em ágar por poço realizados com *Candida* spp.

Fonte: Autor, 2020.

Por outro lado, com as espécies de *Trypchoypton mentagrophytes*, *T. rubrum* e *T. tonsurans*, além dos resultados não comprometidos com *Microsporium gypseum*, foi possível observar bem o desenvolvimento microbiano, quando houve, e, com isso, determinar a MIC de cada extrato frente a cada espécie analisada. Os valores obtidos de MIC estão apresentados na Tabela 14, de acordo com as observações experimentais feitas.

Tabela 14 – Concentrações Inibitórias Mínimas de cada extrato frente às espécies de fungos analisadas

Fungos:	MIC (mg/mL) dos extratos pirolenhosos:							
	Nº 1	Nº 2	Nº 3	Nº 4	Nº 5	Nº 6	Nº 7	Nº 8
<i>T. mentagrophytes</i>	1,56	3,12	3,12	6,25	6,25	3,12	6,25	3,12
<i>T. rubrum</i>	1,56	1,56	0,78	1,56	1,56	1,56	3,12	1,56
<i>T. tonsurans</i>	6,25	3,12	3,12	3,12	6,25	6,25	6,25	3,12
<i>M. gypseum</i>	-	-	1,56	-	1,56	3,12	3,12	1,56
<i>Candida</i> spp.	25,0	25,0	-	25,0	25,0	25,0	50,0	25,0

Fonte: Autor, 2020.

De posse desses resultados, pode-se concluir que, de fato, os extratos pirolenhosos analisados neste Trabalho apresentam ação antifúngica satisfatória frente aos fungos utilizados nos testes. Apenas os resultados da MIC dos extratos frente à *Candida* spp. foram um tanto quanto elevados, principalmente em comparação às outras espécies analisadas.

Isso pode ter acontecido por algumas hipóteses: (1) a *Candida* spp. é, de fato, mais resistente que as outras espécies, em relação aos extratos pirolenhosos; ou (2) a suspensão produzida para este fungo, utilizada na microdiluição, pode ter sido preparada em uma

concentração muito alta. O mais provável é que tenha ocorrido a segunda hipótese, pois no preparo das suspensões dos fungos, a de *Candida* spp. sempre possuía uma turbidez mais acentuada que as demais suspensões, fugindo um pouco do que se recomenda na metodologia do CLSI, que seria para manter um padrão de turbidez de 0,5 na escala de McFarland. Porém, como isso não havia sido problema nos testes de difusão em ágar por poço, acreditou-se que não iria prejudicar nos resultados da microdiluição em caldo.

Ademais, todos os extratos apresentaram comportamento bastante satisfatório frente a todas as espécies de fungo analisadas, principalmente contra *Trychophyton rubrum*, cujas MIC's em seis dos oito casos foram de 1,56 mg/mL, chegando até 0,78 mg/mL com o extrato nº 3 – o menor valor de MIC observado nos extratos utilizados neste experimento. Como esta espécie, ao lado do *T. mentagrophytes* são as principais causadoras das onicomicoses, estes resultados são bastante expressivos e corroboram o potencial antifúngico dos extratos pirolenhosos no combate a esta dermatofitose.

6 CONCLUSÃO

Os oito extratos pirolenhosos avaliados neste trabalho apresentaram atividade antifúngica, frente aos fungos causadores de onicomicoses analisados, e se apresentam como um possível agente tópico para o tratamento dessas doenças. Todas as cinco espécies utilizadas nos experimentos, os dermatófitos e os não-dermatófitos, apresentaram sensibilidade nos testes de difusão em ágar por poço e confirmaram o potencial antifúngico dos chamados vinagres de madeira. Estes, submetidos aos testes de microdiluição, tiveram suas MIC's calculadas, sendo os extratos de nº 1, 2 e 3, obtidos do coco, bastante efetivos principalmente contra os *Trychophyton* spp. utilizados, apresentando MIC's de 0,78 mg/mL a 3,12 mg/mL. O potencial antifúngico desses ácidos pirolenhosos é dado pela sua composição de fenóis, ácidos orgânicos e carbonilas, os quais são derivados da degradação da lignina. Portanto, para favorecer a formação de produtos via pirólise com composição potencialmente antimicrobiana, pode-se sugerir a utilização de biomassas com maior conteúdo lignocelulósico, tais como cascas de avelã, de nozes e de azeitona, bem como as fibras do coco (MATHEW, 2015). Para futuros trabalhos, seria recomendada a utilização de ambientes com maior controle contra contaminações, como é o caso de capelas bacteriológicas, o que não foi possível na execução deste trabalho; bem como a análise mais profunda da composição desses extratos, para buscar correlações entre compostos específicos e o potencial antifúngico e, se possível, para tentar isolar o princípio ativo dessa capacidade antimicrobiana e melhorar os extratos pirolenhosos para um possível uso como agentes tópicos contra as onicomicoses.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, E. S. et al.. Antibacterial and antifungal activities of pyroligneous acid from wood of *Eucalyptus urograndis* and *Mimosa tenuiflora*. **Journal of Applied Microbiology**. n. 124, p. 85-96, 2018.

BERTON, R. P. **Análise Teórica Comparativa de Eficiência Energética de Sistemas Integrados para Pirólise Rápida de Biomassa**. Dissertação de Mestrado em Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Campinas-SP, 2012.

BROWN, R. C.; WANG, K. Fast Pyrolysis of Biomass: Advances in Science and Technology. **The Royal Society of Chemistry – Green Chemistry Series**, n. 50, 2017.

CZERNIK, S.; BRIDGEWATER, A. V. Overview of Applications of Biomass Fast Pyrolysis Oil. **Energy & Fuels**. n. 18, p. 590-598, 2004.

DEMIRBAS, A. Potential applications of renewable energy sources, biomass combustion problems in boiler power systems and combustion related environmental issues. **Progress in Energy and Combustion Science**. n. 31, p. 171-192, 2005.

DEMIRBAS, A.; ARIN, G. An Overview of Biomass Pyrolysis. **Energy Sources**. n. 24, p. 471-482, 2002.

FAERGEMANN, J; BARAN, R. Epidemiology, clinical presentation and diagnosis of onychomycosis. **British Journal of Dermatology**. n. 149, p. 1-4, Gothenburg, 2003. Supl. 65.

FOUST, A. S. et al. **Principios de Operaciones Unitarias**. 2. ed. México: Compañía Editorial Nacional, 2006.

HAY, R. J.; BARAN, R. Onychomycosis: A proposed revision of the clinical classification. **American Academy Dermatology Journal**. v. 65, n. 6, p. 1219-1227, 2011.

HIMMELBLOOM, B. H.; VITT, S. M.; CRAPO, C. A. **Inhibition of *Listeria Innocua* and *L. Monocytogenes* in a Laboratory Medium and Cold-Smoked Salmon Containing Liquid Smoke**. Fishery Industrial Technology Center – University of Alaska Fairbanks. Kodiak, 2001.

IBRAHIM, D. et al.. Efficacy of pyroligneous acid from *Rhizophora apiculata* on pathogenic *Candida albicans*. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 3, n. 07, p. 007-013, 2013.

IKEGAMI, F.; SEKINE, T.; FUJII, Y. **Anti-dermatophyte Activity of Phenolic Compounds in “Mokusaku-Eki”**. Faculty of Pharmaceutical Sciences – Chiba University. Tóquio, 1998.

JAHANBAN-ESFAHLAN, A.; AMAROWICZ, R. Walnut (*Juglans regia* L.) shell pyroligneous acid: chemical constituents and functional applications. **The Royal Society of Chemistry**. n. 8, p. 22376–22391, 2018.

MA, X. et al. Isolation and bioactivities of organic acids and phenols from walnut shell pyrolygneous acid. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**. n. 91, p. 338-343, 2011.

MATHEW, S.; ZAKARIA, Z. A. Pyrolygneous acid – the smoky acidic liquid from plant biomass. **Applied Microbiology Biotechnology**. n. 99, p. 611-622, 2015.

RAMKAI, J. **Chemical Determinations, Antimicrobial and Antioxidant Activities of Thai Wood Vinegars**. Tese de Mestrado de Farmácia em Ciências Farmacêuticas, Prince of Songkora University, 2009.

RINGER, M.; PUTSCHE, V.; SCAHILL, J. **Large-Scale Pyrolysis Oil Production: a technology assessment and economic analysis**. Relatório Técnico – National Renewable Energy Laboratory (NREL). U.S. Department of Energy, Colorado, 2006.

SALIBA, A. F. N. et al. O uso da onicoabrasão como método de auxílio na obtenção de amostras para o diagnóstico da onicomiose. **Surgical & Cosmetic Dermatology**. v. 6, n. 1, p. 57-63, 2014.

SCHER, R. K. Onychomycosis: A significant medical disorder. *In*: SYMPOSIUM “ONYCHOMYCOSIS: ISSUES AND OBSERVATIONS”, 1996, Nova Iorque. **Anais [...]**. Nova Iorque: FACP, 1996.

SILVA, A. P. **Inativação dos micro-organismos causadores da onicomiose por terapia fotodinâmica** – estudo *in vitro* e clínico. Dissertação de Mestrado em Ciências, Instituto de Física de São Carlos – Universidade de São Paulo. São Carlos, 2013.

SPEIGHT, J. G. **Synthetic Fuel Handbook: Properties, Process and Performance**. Nova Iorque: Mc Graw Hill, 2008. p. 236-241.

THOMAS, J. et al. Toenail onychomycosis: an important global disease burden. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**. v. 35, p. 497-519, 2010.

TOMASINI, D. **Caracterização dos Produtos Líquidos obtidos por Pirólise de Biomassas Utilizando Técnicas Cromatográficas Bidimensionais Abrangentes**. Tese de Doutorado em Química, Instituto de Química – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2015.

VIEIRA, G. E. G. et al. Biomassa: uma visão dos processos de pirólise. **Revista Liberato**, Novo Haburgo. v. 15, n. 24, p. 105-212, 2014.

VIEIRA, W. T. **Caracterização Cromatográfica e Avaliação da Atividade Antimicrobiana do Extrato Pirolenhoso Obtido a partir de Biomassas Residuais**. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química, Centro de Tecnologia – Universidade Federal de Alagoas. Maceió-AL, 2019.

WEI, Q.; MA, X.; DONG, J. Preparation, chemical constituents and antimicrobial activity of pyrolygneous acids from walnut tree branches. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, n. 87, p. 24-28, 2010.

WELSH, O; VERA-CABRERA, L.; WELSH, E. Onychomycosis. **Clynics in Dermatology**, n. 28, p. 151-159, Elsevier Inc., 2010.

WESTERBERG, D. P.; VOYACK, M. J. Onychomycosis: Current Trends in Diagnosis and Treatment. **American Family Physician**. v. 88, n. 11, p. 763-770C, 2013.

ZAIAS, N. Chapter 8: Onychomycosis. *In*: ZAIAS, N. **The Nail in Health and Disease**. 1. Ed. Miami Beach: MTP Press Limited, 1980. p. 91-113.

TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIDADE DE DISSERTAÇÃO, TESE, TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO, ESPECIALIZAÇÃO OU MEMORIAL ACADÊMICO NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS (RIUFAL)

Na qualidade de titular dos direitos de autor da publicação, autorizo ao Repositório Institucional da Universidade Federal de Alagoas (RIUFAL) a disponibilizar, através do site <http://www.repositorio.ufal.br>, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei n. 9610/98, o texto integral da obra abaixo citada, conforme permissões assinaladas, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção de científica brasileira, a partir desta data.

1 Identificação do material bibliográfico

	Dissertação + Produto Educacional
	Dissertação
	Tese
x	Trabalho de Conclusão de Curso
	Especializações
	Memorial Acadêmico

2 Identificação da Dissertação, Tese, TCC, Especialização ou Memorial Acadêmico

Autor:	Gustavo Volney Mota Amaral		
Lattes			
Lattes Atualizado:	<input checked="" type="checkbox"/> x	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não
Orientador(a):	João Inácio Soletti		
Coorientador(a):	Mozart Daltro Bispo		

Membros da Banca:

1º Membro	João Inácio Soletti
2º Membro	Mozart Daltro Bispo
3º Membro	Livia Maria de Oliveira Ribeiro
4º Membro	Maria Anilda dos Santos Araujo
5º Membro	

Data da Defesa:	21 de maio de 2020
Titulação: Doutor / Mestre em:	

Título da Dissertação, Tese, TCC, Especialização ou Memorial Acadêmico no idioma original:

Estudo da Aplicação de Extratos Pirolenhosos no Diagnóstico e Uso Terapêutico em Onicomicoses
--

Palavras-chave no idioma original:

Onicomicose; extrato pirolenho; bio-óleo

Título da Dissertação, Tese, TCC, Especialização ou Memorial Acadêmico em outro idioma (especifique):

Study in the Application of Pyrolenhosus Extracts in Diagnosis and Therapeutic Use in Onychomycosis

Palavras-chave em outro idioma (especifique):

onicomicose

Programa de Defesa:

Engenharia química

Área de conhecimento - CNPq:

Engenharia química

3 Agência de Fomento:

Não há

4 Informação de acesso ao documento

Liberação para publicação		Total	x	Parcial
---------------------------	--	-------	---	---------

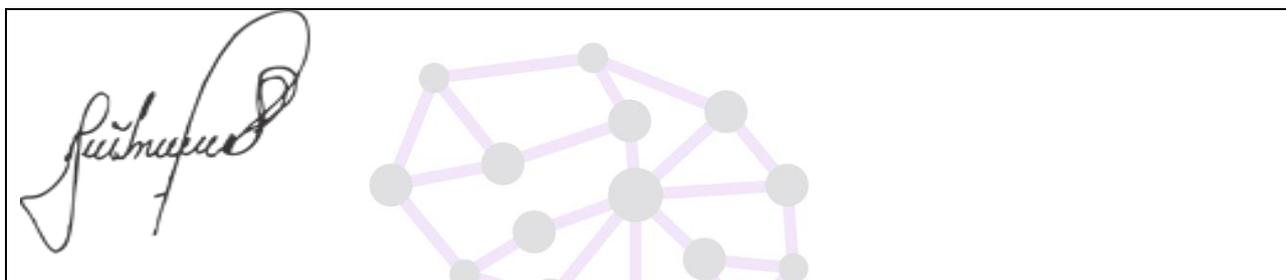
Em caso de liberação parcial, especifique os arquivos restritos:

Produto com pedido de patente

A restrição (parcial ou total) poderá ser mantida por até um ano a partir da data de autorização da publicação. A extensão deste prazo requer justificativa junto ao RIUFAL. O resumo e os metadados (elementos referenciais) ficarão sempre disponibilizados.

5 Endereço do Autor para contato:

Logradouro:	Condominio Aldebaran Beta, quadra T	
Nº:24	Compl.:Jardim petrópolis	CEP:57080-579
Cidade:Maceió	Estado:Alagoas	
Tel.(s):082 -988728002		
E-mail:jsoletti@ctec.ufal.br		
Data:29 de junho de 2020		



Assinatura do Autor

RIUFAL
Repositório Institucional da Ufal