



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS (UFAL)  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS (ICF)  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS (PPGCF)



RAFAEL ALEIXO DOS SANTOS SILVA

**Avaliação farmacognóstica e da atividade antifúngica dos frutos secos de  
*Illicium verum* Hook. f. (Schisandraceae)**

Maceió - AL

2021

RAFAEL ALEIXO DOS SANTOS SILVA

**Avaliação farmacognóstica e da atividade antifúngica dos frutos secos de  
*Illicium verum* Hook. f. (Schisandraceae)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Linha de pesquisa: Avaliação biológica de substâncias bioativas e medicamentos.

Orientador: Prof. Dr. Irinaldo Diniz B. Júnior.

Co-orientadora: Profa. Dra. Sâmia A. Souza da Silva.

Maceió - AL

2021

**Catálogo na Fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

S586a Silva, Rafael Aleixo dos Santos.

Avaliação farmacognóstica e da atividade antifúngica dos frutos secos de *Illicium verum* Hook. f. (Schisandraceae) / Rafael Aleixo dos Santos Silva. – 2021.  
101 f. : il. color.

Orientador: Irinaldo Diniz B. Júnior.

Coorientadora: Sâmia A. Souza da Silva.

Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Farmacêuticas. Maceió, 2021.

Bibliografia: f. 87-99.

Apêndices: f. 100-101.

1. *Illicium verum*. 2. Essências e óleos essenciais. 3. Controle de qualidade. 4. Dermatofitos. I. Título.

CDU: 615.282

## Folha de aprovação

AUTOR: RAFAEL ALEIXO DOS SANTOS SILVA

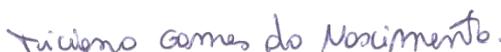
### **Avaliação farmacognóstica e da atividade antifúngica dos frutos secos de *Illicium verum* Hook. f. (Schisandraceae)**

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 11 de outubro de 2021.

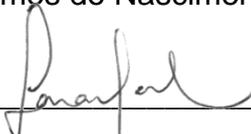


\_\_\_\_\_  
Professor Doutor Irinaldo Diniz Basílio Júnior, UFAL (Orientador).

#### **Banca Examinadora:**



\_\_\_\_\_  
Professor Doutor Ticiano Gomes do Nascimento, UFAL (Examinador interno).



\_\_\_\_\_  
Professora Doutora Lara Mendes de Almeida, USP (Examinadora externa).

*A minha mãe, **Maria José Aleixo dos Santos** por todo o amor e incentivo e para todos os pesquisadores que tiveram suas pesquisas interrompidas ou morreram em decorrência da COVID-19.*

[DEDICO].

## AGRADECIMENTOS

Quero expressar meus sinceros agradecimentos a todas as pessoas que estiveram ao meu lado em todos os momentos da minha jornada. Seja dando-me palavras de afeto, apoio, me auxiliando em vários momentos e me passando conhecimentos, além de dividir e compartilhar experiências dentro e fora da universidade.

A palavra agradecer, tem os significados de “mostrar ou manifestar gratidão” ou de “compensar de maneira equivalente, retribuir”. Nesse sentido, sou muito grato a todas as lições que aprendi nesta parte da minha vida, ao qual os professores foram pessoas e situações que me ajudaram a melhorar minha percepção e meu senso crítico.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a minha mãe, **Maria José Aleixo dos Santos**, por todo o amor, o carinho e nunca ter deixado de acreditar e confiar em mim e na minha capacidade, sem nunca ter me cobrado por isso, sempre acreditando que a qualificação profissional é algo de suma importância em qualquer formação e por sempre me encorajar. Mãe, a esse e todos os títulos que eu tiver em vida, serão dedicados a você. Obrigado por ser a melhor mãe do mundo que eu poderia ter. Te amo pra sempre.

A minha família, em especial aos meus irmãos, **Márcio, Marcel, Valdir e Micheline**, meu primo-irmão, **Pedro Aleixo**, minhas tias **Marileide, Aparecida Aleixo e Lúcia Rodrigues**, e a minha querida prima **Isabela Calumby**, por todo o apoio moral e suporte que eles me deram até chegar aqui. E que meus sobrinhos **Daniel, Daniela, Lucas, Sofia e Giovanna** vejam em mim um exemplo de que eles também são capazes de serem tudo o que eles quiserem ser com esforço, estudo e dedicação. Tio Rafa ama vocês.

A **Universidade Federal de Alagoas (UFAL)**, por ter me permitido a dádiva de crescer como pessoa e intelectualmente, me proporcionando dentro de suas paredes experiências incríveis. A UFAL é assim como tantas outras instituições públicas nacionais, um local de referência e excelência na moldagem e capacitação pessoal gerando profissionais treinados para atender a todas as demandas da sociedade e

mesmo com tantos ataques externos, continua firme e forte, fazendo o que faz de melhor: educação e ciência.

A Professora Dr<sup>a</sup> **Sâmia Andrícia Souza Silva**, responsável pelo laboratório de farmacognosia (LabGnosia) do curso de farmácia da UFAL, por ter me recebido em seu laboratório, me treinado e pelas longas conversas de cunho profissional e pessoal desde 2016, quando ingressei como IC. Professora, obrigado por ter me apresentado esse universo tão lindo da farmacognosia, ao anis-estrelado e dos óleos essenciais.

Ao Professor Dr. **Irinaldo Diniz Basílio Júnior**, por ter aceitado me orientar no mestrado e por ter aberto as portas do Laboratório de Tecnologia de Controle de Qualidade de Medicamentos (LabTCoM) para mim. Também quero deixar expresso a toda a cordialidade, além da confiança que sempre teve comigo em durante toda a minha trajetória no mestrado.

A Professora Dr<sup>a</sup> **Graziela Cury Guapo**, responsável pelo departamento de Anatomia e Morfologia Vegetal (ICBS/UFAL) por ter me auxiliado com os cortes microscópicos dos frutos secos de anis-estrelado, além de, em todos os momentos, se mostrar sempre prestativa e gentil comigo, ao compartilhar comigo um pouco do seu conhecimento. Saiba que seus esforços também fazem parte do coração deste trabalho. Muito obrigado.

A Professora Dr<sup>a</sup>. **Maria Anilda dos Santos Araújo**, por ter cedido as amostras clínicas utilizadas neste trabalho, pela simplicidade e generosidade que teve comigo em todas as vezes em que nos encontramos. Anilda, se este trabalho pode ser concretizado, é porque você foi uma das peças-chave para que isso pudesse acontecer. Muito obrigado também, além do aceite, as suas contribuições no presente trabalho no exame de qualificação. Toda a minha gratidão.

A Professora Dr<sup>a</sup> **Lara Mendes de Almeida**, pelo acolhimento, afeto e generosidade que sempre demonstrou por mim, durante sua jornada como professora visitante na UFAL e que tive a honra de conhecer, além do seu aceite em participar da banca da defesa e por suas valiosas contribuições. Sua simplicidade guarda a grandiosidade que existe em você.

Ao Professor Dr. **Ticiano Gomes do Nascimento**. Tenho uma lembrança vívida de, no primeiro dia ao retomar as atividades do mestrado, me encontrar com

ele no laboratório e ao falar-lhe “*Professor, tou voltando as atividades do mestrado hoje*”, ele me responder: “*você nunca deixou o mestrado, Rafael*”. Obrigado por ser um exemplo de pesquisador e pessoa, sempre pensando nos seus alunos e ademais, pelo aceite a ser avaliador da banca e por suas contribuições.

Quero fazer uma menção a todas as pessoas da minha turma de mestrado que estiveram comigo no período pré-pandêmico, pelos momentos de alegria e descontração proporcionados, em especial a: **Teresa de Lisieux (Tetê)**, **Robert Alves (Rob)**, **Arthur Borges (Tutu)**, **Mailde Liodorio (Nega)**, **Camila Rocha**, **Suzanne Vieira (Susu)**, **Raphael Cavalcante (Boy)**, **Fernanda Calheiros**, **Jennifer McLaine** e a agregada, **Andressa Assunção (Dessa)**, a quem construí uma amizade muito linda.

Ao amigo de humanas, **Paulo Oliveira**, pelas conversas sobre a pós-graduação, sempre ilustrando com ótimos exemplos e, por meio de suas palavras, me acolher nos momentos de desânimo.

Ao estudante **Orlando Francisco da Silva Moura** do Laboratório de Síntese e Aplicação de Semioquímicos do Instituto Federal de Alagoas (IFAL), que me auxiliou na análise cromatográfica do óleo essencial de anis-estrelado, além das explicações adicionais sobre o método.

A funcionária de serviços gerais, **Veridiana Silva**, que esteve presente em vários momentos, proporcionando conversas sobre o dia-a-dia, sempre com muita disposição e risadas, além da prontidão em me ajudar, quando necessário.

A **Cantídio F. de Lima Filho**, técnico do laboratório de Controle de Análise e Qualidade de Alimentos, por ter me auxiliado na esterilização das vidrarias necessárias para a execução dos experimentos, além da generosidade e simplicidade em me explicar alguns dos procedimentos de rotina do laboratório e que apesar das poucas, conversas muito produtivas.

Aos doutorandos: **Valcilaine T. Barbosa (Val)** e **Antônio Thomás da Silva (Thomás)**, por terem me ajudado direta e indiretamente no meu trabalho, me auxiliando com a leitura das placas quando não podia ir a UFAL, além das conversas amistosas e divertidas em laboratório, atenuando o clima atual. Sucesso para vocês.

Ao colega de turma e amigo, **Rodrigo José Nunes Calumby**, por ter me ajudado a executar os testes microbiológicos, me ensinado a execução de algumas das práticas rotineiras em um laboratório de microbiologia, além de outras coisas inerentes ao assunto com toda sua expertise, além da valiosa amizade. Rodrigo, você conhece a minha história e tem acompanhado a minha trajetória junto comigo dentro da universidade. Por essas e outras razões, só tenho a dizer que sou muito galardoado em ter você na minha vida. Você é uma das pessoas mais inteligentes e brilhantes que eu conheço no que faz. E apesar das brincadeiras por causa da sua idade (risos), sempre te enxerguei como um exemplo de sensatez, sabedoria e coerência. Te desejo todo o sucesso do mundo, amigo. Você tem e terá sempre toda a minha gratidão e admiração. Torço por você sempre. Obrigado!

E por fim, a **Deus e a Nossa Senhora** por estarem sempre comigo e terem acreditado em mim, quando algumas vezes eu nem mais acreditava. E meu grande e profundo respeito a **Ogum e a Iansã** que representam a força e a dualidade que existem dentro de mim.

*“Antes de julgar a minha vida ou o meu caráter, calce os meus sapatos e percorra o caminho que eu percorri, viva as minhas tristezas, as minhas dúvidas e as minhas alegrias. Percorra os anos que eu percorri, tropece onde eu tropecei e levante-se assim como eu fiz”*

**Clarice Lispector (1920-1977).**

## RESUMO

*Illicium verum* Hook f. (Schisandraceae), conhecido como anis-estrelado, é uma espécie nativa da Ásia comercializada mundialmente. A droga vegetal (DV), constituída pelos frutos secos, é empregada na medicina popular e na indústria farmacêutica. No seu óleo essencial, encontra-se o anetol, componente majoritário, ao qual são referidas as atividades farmacológicas. As micoses cutâneas são manifestações clínicas causadas por um grupo de fungos denominados de dermatófitos que afetam humanos e animais. Apesar das várias opções terapêuticas, os efeitos colaterais e resistência aos antifúngicos são um problema para o tratamento, necessitando, assim, da pesquisa por novos agentes antifúngicos. Apesar de seu vasto uso em fitoterapia e comercial, são escassos os estudos que tratam da análise farmacognóstica de *I. verum*, como os de sua atividade sobre dermatófitos. Assim, o objetivo deste trabalho foi o de fazer o controle de qualidade dos frutos secos de *I. verum* e avaliar a capacidade antimicótica do óleo essencial (OEIV) sobre dermatófitos. Para o método, foi adquirida uma amostra de anis-estrelado em ervanária na cidade de Maceió/AL, sendo o controle de qualidade da DV realizado de acordo com a Farmacopeia Brasileira 6ª edição (2019), sendo realizados: identificação botânica (macro- e microscopia), determinação da matéria estranha, cinzas totais, teor e perfil químico de voláteis. Os testes de pureza foram realizados em triplicata e expressos pela média e desvio padrão ( $M \pm DP$ ). Para a atividade antifúngica foram tomadas seis amostras clínicas de dermatófitos: *Microsporum canis* (1), *Trichophyton rubrum* (1), *Trichophyton tonsurans* (1) e *Trichophyton mentagrophytes* (3). A pesquisa consistiu pelo teste de microdiluição em caldo, cujas concentrações do OEIV foram de 10.000  $\mu\text{g/mL}$  a 78,1 $\mu\text{g/mL}$ , sendo os resultados expressos pela Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a partir desta, a da Concentração Fungicida Mínima (CFM). A análise de identidade mostrou que as amostras atenderam aos parâmetros macroscópicos da DV. No entanto, a microscopia apontou diferenças morfológicas dos frutos que não amadureceram, indicando neles, ausência de estruturas especializadas para armazenamento do óleo. O teor de matéria estranha (1,6% $\pm$ 0,32) e de cinzas totais (3,0% $\pm$ 0,10) estavam de acordo com a monografia da espécie. O percentual do marcador químico anetol estava de acordo com a monografia (>99%), no entanto, o teor de voláteis se apresentou abaixo do esperado (6,25% p/v). A CIM/CFM para as amostras foram de 10.000 a 78,1 $\mu\text{g/mL}$  (CIM) e 10.000 a 625  $\pm$   $\mu\text{g/mL}$  (CFM). Os resultados dessa pesquisa evidenciam que a DV atendeu aos requisitos de qualidade propostos pela farmacopeia e ratificam o potencial e a atividade do OEIV nos fungos devido ao anetol.

**Palavras-chave:** *Illicium verum*; óleo essencial; controle de qualidade; dermatófitos.

## ABSTRACT

*Illicium verum* Hook f. (Schisandraceae), known as star anise, is a native specie to Asia marketed worldwide. The herbal drug (HD), consisting of dried fruit, is used in folk medicine and the pharmaceutical industry. In its essential oil is the anethole, the major component, to which pharmacological activities are mentioned. Cutaneous mycoses are clinical manifestations caused by a group of fungi called dermatophytes that affect humans and animals. Despite the various therapeutic options, the side effects and the resistance to antifungals are a problem for treatment, thus requiring the search for new antifungal agents. Despite its extensive use in phytotherapy and commercial, there are few studies dealing with pharmacognostic analysis of *I. verum*, like those of his activity on dermatophytes. Thus, the aim of this work was to make the quality control of dried fruits of *I. verum* and evaluate the antimycotic capacity of essential oil (IVEO) on dermatophytes. For the method, a sample of star anise was acquired in a herbal shop of the city of Maceió/AL and the quality control of HD was done according to the Brazilian Pharmacopoeia 6th edition (2019), being performed: botanical identification (macro- and microscopy), determination of foreign matter, total ash, yield and chemical profile of volatiles. Purity tests were performed in triplicate and expressed by mean and standard deviation ( $M \pm SD$ ). For antifungal activity, six clinical samples of dermatophytes were taken: *Microsporum canis* (1), *Trichophyton rubrum* (1), *Trichophyton tonsurans* (1), *Trichophyton mentagrophytes* (3). The search consisted by microdilution in broth, whose concentrations of IVEO were from 10,000  $\mu\text{g/mL}$  to 78.1  $\mu\text{g/mL}$  and the results were expressed by the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and from this, that of the Minimum Fungicidal Concentration (MFC). The identity analysis showed that the samples met the macroscopic parameters of the HD. However, microscopy showed morphological differences in fruits that did not mature, indicating in them, absence of specialized structures for oil storage. The foreign matter yield ( $1.6\% \pm 0.32$ ) and total ash ( $3.0\% \pm 0.10$ ) were in accordance with the monograph of the specie. The percentage of the chemical marker anethole was in accordance with the monograph ( $>99\%$ ), however, the volatile yield was below the expected (6.25% w/v). The MIC/MFC for the samples were from 10,000 to 78.1  $\mu\text{g/mL}$  (MIC) and 10,000 to  $625 \pm \mu\text{g/mL}$  (MFC). The results of this search show that HD met the quality requirements proposed by the pharmacopoeia and ratifies the potential and activity of IVEO in fungi due to anethole.

**Keywords:** *Illicium verum*; essential oil; quality control; dermatophyte fungi.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01 - Biossíntese de terpenos no citoplasma e plastídios vegetais.....	29
Figura 02 - Biossíntese de fenilpropanoides a partir do aminoácido fenilalanina.....	30
Figura 03 - Aspectos botânicos de <i>I. verum</i> .....	34
Figura 04 - Componentes voláteis descritos para o óleo essencial de <i>I. verum</i> .....	35
Figura 05 - Esquema representando o processo infeccioso causado por dermatófitos.....	39
Figura 06 - Aspectos morfológicos de algumas espécies causadoras de dermatofitoses .....	41
Figura 07 - Formas clínicas de dermatofitoses.....	45
Figura 08 - Formas clínicas de dermatofitoses.....	45
Figura 09 - Tinea capitis.....	46
Figura 10 - Estruturas químicas dos principais antifúngicos sintéticos utilizados no tratamento de dermatofitoses.....	50
Figura 11 - Representação da técnica de microcultivo para fungos filamentosos.....	61
Figura 12 - Representação esquemática do teste de difusão em ágar.....	62
Figura 13 - Representação esquemática do teste de microdiluição em caldo para determinação da CIM do OEIV sobre fungos filamentosos.....	64
Figura 14 - Aspectos macroscópicos de amostra de <i>I. verum</i> comercializada em Maceió/AL.....	66
Figura 15 - Aspectos microscópicos de amostra de <i>I. verum</i> comercializada em Maceió/AL.....	68
Figura 16 - Testes histoquímicos feitos em amostra de <i>I. verum</i> comercializada em Maceió.....	69
Figura 17 - Matéria estranha encontrada em amostra de <i>I. verum</i> comercializada em Maceió.....	70
Figura 18 - Aspecto visual do óleo essencial extraído de amostra de <i>I. verum</i> comercializada em Maceió/AL.....	72

<b>Figura 19 - Análise da composição química do óleo essencial extraído de amostra de <i>I. verum</i> comercializada em Maceió/AL por GC-MS.....</b>	<b>73</b>
<b>Figura 20 - Aspectos macroscópicos de amostras clínicas de dermatófitos isoladas.....</b>	<b>77</b>
<b>Figura 21 - Aspectos microscópicos da amostra DF01.....</b>	<b>78</b>
<b>Figura 22 - Aspectos microscópicos da amostra DF02.....</b>	<b>78</b>
<b>Figura 23 - Aspectos microscópicos da amostra DF03.....</b>	<b>78</b>
<b>Figura 24 - Aspectos microscópicos da amostra DF04.....</b>	<b>79</b>
<b>Figura 25 - Aspectos microscópicos da amostra DF05.....</b>	<b>79</b>
<b>Figura 26 - Aspectos microscópicos da amostra DF06.....</b>	<b>79</b>
<b>Figura 27 - Halos de inibição formados pelo OEIV <i>in natura</i> pelo teste de difusão ágar na amostra DF05.....</b>	<b>80</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 01 -</b>	<b>Informações referentes a procedência das amostras clínicas de dermatófitos utilizadas neste estudo.....</b>	<b>59</b>
<b>Tabela 02 -</b>	<b>Medida do tamanho dos folículos e dos frutos de amostra de <i>I. verum</i> comercializada em Maceió/AL (n=10).....</b>	<b>65</b>
<b>Tabela 03 -</b>	<b>Composição química do óleo essencial extraído de amostra de <i>I. verum</i> comercializada em Maceió/AL por GC-MS.....</b>	<b>73</b>
<b>Tabela 04 -</b>	<b>Médias das zonas de inibições do OEIV <i>in natura</i> sobre isolados clínicos de dermatófitos.....</b>	<b>80</b>
<b>Tabela 05 -</b>	<b>Concentrações inibitórias e fungicidas mínimas do óleo essencial de amostra de <i>I. verum</i> e do controle positivo sobre isolados clínicos de dermatófitos.....</b>	<b>82</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AL	Alagoas.
% p/p	percentual peso/peso.
%v/p	percentual volume/peso.
®	Marca registrada
°C	Escala Celsius.
µm	micrometro
ATCC	<i>American Type Culture Collection.</i>
C	Carbono.
cap.	Capítulo.
CCD	Cromatografia em Camada Delgada.
CFM	Concentração Fungicida Mínima.
CG	Cromatografia gasosa.
CIM	Concentração Inibitória Mínima.
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute.</i>
CTC	Cetoconazol.
CZ	Cinzas.
DMSO	Dimetilsulfóxido.
FB 6ª ed.	Farmacopeia brasileira sexta edição.
g/cm <sup>3</sup>	grama por centímetro cúbico.
GABA	Ácido gama-aminobutírico.
GC-MS	<i>Gas Chromatography Mass Spectrometry</i> / Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas.
GM	Gabinete do Ministro.
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> / Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.
HSV-2	Vírus da Herpes Simples tipo 2.
IC <sub>50</sub>	Concentração inibitória que reduz a 50%.
ICF	Instituto de Ciências Farmacêuticas.
ID <sub>50</sub>	dose infecciosa que reduz a 50%.
KC <sub>50</sub>	Concentração “Knockdown” que reduz a 50%.
M	Molar.

<i>m/z</i>	relação massa/carga.
MCA	Medicina Complementar Alternativa
ME	Matéria estranha.
Min.	Minuto
mL	mililitros.
mm	milímetro.
MS	Ministério da Saúde.
MTC	Medicina Tradicional Chinesa.
MTT	Brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio.
<i>n</i>	várias unidades.
OE	Óleo essencial.
OEIV	Óleo Essencial de <i>Illicium verum</i> .
OH	Radical hidroxila.
OMe	Grupo metoxi.
OMS	Organização Mundial de Saúde.
PA	Padrão analítico.
pH	potencial hidrogeniônico.
PNPMF	Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos.
QSAR	<i>Quantitative Structure-activity relationship</i> .
qsp	quantidades suficientes para.
RC-37	Linhagem de células de primatas não humanas.
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
sp.	espécie.
spp.	espécies (plural).
SUS	Sistema Único de Saúde.
syn.	sinomínia científica.
UFAL	Universidade Federal de Alagoas.
UFC	Unidades Formadoras de Colônia.
UNIT	Centro Universitário Tiradentes.
var.	variedade.

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\mu$	micro.
$\alpha$	alfa.
$\beta$	beta.
$\delta$	delta.
+	mais.
%	porcentagem.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	21
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	24
<b>2.1 Fitoterapia</b> .....	24
2.1.1 Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF).....	25
2.1.2 Controle de qualidade de drogas vegetais.....	26
<b>2.2 Óleos Essenciais</b> .....	28
2.2.1 Terpenos.....	28
2.2.2 Fenilpropanoides.....	30
<b>2.3 Família Schinsandraceae</b> .....	31
2.3.1 <i>Illicium verum</i> Hook f. ....	31
2.3.1.1 Histórico e usos.....	31
2.3.1.2 Classificação e aspectos botânicos.....	32
2.3.1.3 Componentes do óleo essencial de <i>I. verum</i> .....	34
2.3.1.4 Atividades farmacológicas do óleo essencial de <i>I. verum</i> .....	35
2.3.1.4.1 Anti-inflamatória.....	35
2.3.1.4.2 Antibacteriana.....	36
2.3.1.4.3 Inseticida.....	36
2.3.1.4.4 Fumegante.....	36
2.3.1.4.5 Anticâncer.....	37
2.3.1.4.6 Antiviral.....	37
2.3.1.5 Toxicidade.....	37
<b>2.4 Dermatofitoses</b> .....	38
2.4.1 Agentes etiológicos.....	38
2.4.2 Epidemiologia.....	42
2.4.2.1 No mundo.....	42
2.4.2.2 No Brasil.....	43
2.4.3 Formas clínicas.....	44
2.4.4 Fármacos utilizados no tratamento.....	46
2.4.4.1 Derivados azólicos.....	47
2.4.4.2 Alilaminas.....	47
2.2.4.3 Ciclohexanos fenólicos.....	48

2.2.4.4 Outros medicamentos sintéticos.....	48
2.4.5 Mecanismos de resistência.....	49
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>51</b>
<b>3.1 Geral.....</b>	<b>51</b>
<b>3.2 Específicos.....</b>	<b>51</b>
<b>4 MATERIAL.....</b>	<b>52</b>
<b>4.1 Amostra vegetal.....</b>	<b>52</b>
<b>4.2 Amostras fúngicas.....</b>	<b>52</b>
<b>4.3 Material geral de laboratório.....</b>	<b>52</b>
<b>4.4 Equipamentos.....</b>	<b>53</b>
<b>4.5 Reagentes e solventes.....</b>	<b>53</b>
<b>4.6 Meios de cultura.....</b>	<b>54</b>
<b>5 MÉTODOS.....</b>	<b>55</b>
<b>5.1 Controle de qualidade da droga vegetal.....</b>	<b>55</b>
5.1.2 Obtenção da amostra e locais de desenvolvimento dos testes.....	55
5.1.3 Quarteamento da amostra.....	55
5.1.4 Análise macroscópica.....	55
5.1.5 Análise microscópica.....	55
5.1.5.1 Testes histoquímicos.....	56
5.1.6 Determinação de Matéria Estranha.....	56
5.1.7 Determinação do Teor de Cinzas.....	57
5.1.8 Extração do óleo essencial.....	57
5.1.8.1 Caracterização físico-química do óleo essencial de <i>I. verum</i> .....	58
5.1.8.2 Cromatografia do óleo essencial de <i>I. verum</i> .....	58
<b>5.2 Testes microbiológicos.....</b>	<b>58</b>
5.2.1 Obtenção das amostras e local de realização dos testes.....	58
5.2.2 Reativação das amostras.....	59
5.2.3 Revisão taxonômica das amostras.....	59
5.2.3.1 Características macroscópicas.....	60
5.2.3.2 Características microscópicas.....	60
5.2.6 Preparo do inóculo fúngico.....	61
5.2.7 Difusão em ágar.....	62
5.2.8 Microdiluição em caldo .....	62

5.2.8.1 Preparo do meio de cultura.....	62
5.2.8.2 Preparo do óleo essencial e antifúngicos.....	63
5.2.8.3 Determinação da CIM.....	63
5.2.8.4 Determinação da CFM.....	64
<b>6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>65</b>
<b>6.1 Análise macroscópica.....</b>	<b>65</b>
<b>6.2 Análise microscópica.....</b>	<b>67</b>
<b>6.3 Testes histoquímicos.....</b>	<b>69</b>
<b>6.4 Determinação de Matéria Estranha.....</b>	<b>70</b>
<b>6.5 Determinação de Cinzas Totais.....</b>	<b>71</b>
<b>6.6 Extração do óleo essencial.....</b>	<b>71</b>
<b>6.7 Caracterização físico-química do óleo essencial <i>I. verum</i>.....</b>	<b>72</b>
<b>6.8 Cromatografia do óleo essencial de <i>I. verum</i>.....</b>	<b>73</b>
<b>6.9 Caracterização das amostras fúngicas.....</b>	<b>75</b>
6.9.1 Macroscopia e microscopia.....	75
<b>6.10 Teste de difusão em ágar (técnica <i>pour plate</i>) .....</b>	<b>80</b>
<b>6.11 Determinação da CIM e CFM.....</b>	<b>82</b>
<b>7 CONCLUSÕES.....</b>	<b>86</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>87</b>
<b>APÊNDICE A – Modo de preparo para elaboração dos meios de cultura fúngico.....</b>	<b>100</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A fitoterapia é uma prática que utiliza medicamentos elaborados a partir de plantas medicinais. Trata-se de uma das terapias mais antigas de autocuidado a saúde humana, que vem auxiliando o homem por meio de preparações vegetais (SAAD et al., 2018). Com o desenvolvimento da indústria farmacêutica, é possível obter, a partir de extratos vegetais ou seus derivados, por diferentes tecnologias, os medicamentos fitoterápicos. Mesmo com tantos avanços, o uso das plantas medicinais ainda é recorrente, seja *in natura* ou na forma de droga vegetal, sendo nesta última, a planta medicinal que foi submetida ao processo de secagem ou estabilização (BRASIL, 2014).

Para o uso seguro de drogas vegetais, o controle de qualidade apresenta-se como etapa importante para sua garantia e conformidade. Os métodos devem levar em consideração a confirmação da identidade botânica, a avaliação organoléptica, avaliação da pureza do material, presença de xenobióticos, carga microbiana e ademais testes fitoquímicos (NIKAM et al., 2012; KUMARI; KOTECHA, 2016). A elucidação do perfil fitoquímico, obtido por um *screening* ou triagem é de suma importância, uma vez que por este é possível estabelecer uma relação da planta ou derivado vegetal com sua atividade biológica já descrita ou inédita (BRAGA, 2009).

Dentre as várias espécies referidas em fitoterapia tem-se o *Illicium verum*, popularmente conhecido no Brasil como anis-estrelado. Trata-se de um pequeno fruto seco, exótico, que tem origem no continente asiático. Em várias partes do mundo, como no Brasil, é utilizado não só para tratamento de dispepsias e distúrbios gastrointestinais de baixa gravidade, mas também como condimento alimentar por seu sabor doce e extremamente agradável. Na indústria farmacêutica, por exemplo, o anis-estrelado apresenta bastante relevância, pois ele é a principal fonte de ácido chiquímico, molécula precursora para a produção do Tamiflu®, um dos medicamentos de referência para o tratamento da gripe *influenza* dos tipos A e B (SILVA et al., 2020).

Os óleos essenciais, produto do metabolismo secundário, tem uma composição química bastante complexa, podendo chegar, em média, a 200 componentes diferentes. Entretanto, os óleos voláteis contêm componentes majoritários, isto é, que se encontram em maior concentração e ao qual são creditadas, em sua maioria, suas atividades (HEINZMANN; SPITZER; SIMÕES, 2017). No caso do anis-estrelado, o

componente majoritário é o *trans*-anetol, que representa mais de 80% do óleo, ao qual são atribuídas atividades antioxidante, anti-inflamatória, antiviral, antimicrobiana, etc. (DZAMIC et al., 2009; SILVA et al., 2020).

Com relação às dermatofitoses, estas podem ser definidas como manifestações clínicas ocasionadas por fungos responsáveis por micoses cutâneas (filamentosos e leveduras). Tratando-se de agentes dermatófitos, sua transmissão pode ocorrer de diferentes maneiras, podendo ser de forma direta, de homem para homem, do animal para o homem e da terra para homem ou de forma indireta, no caso de material contaminado com escamas de pele infectadas por cogumelos. Sua incidência é comum em países de clima quente e úmido (SBD, 2017). As espécies de fungos causadoras de dermatofitoses de importância clínica distribuem-se em quatro gêneros: *Microsporum* spp., *Trichophyton* spp., *Epidermophyton* sp. (SILVA et al., 2018) e *Nanizzia* spp. (HOOG et al., 2016).

As espécies penetram no extrato córneo invadindo os pelos, unhas e camada córnea da pele, alimentando-se da queratina produzida pelo corpo do hospedeiro, causando diferentes sinais e sintomas clínicos apresentados na forma de lesões brandas, descamativas ou eritematosas e reações inflamatórias (LANA et al., 2016) que implicam em várias manifestações clínicas: tinea corporis (corpo), tinea pedis (pés), ungueal ou onicomiose, tinea cruris (membros inferiores), tinea capitis (cabeça), e outras (SBD, 2017). Estima-se que 30-70% dos adultos sejam hospedeiros naturais de fungos dermatófitos e que sua incidência se torne mais expressiva com sua taxa de desenvolvimento. De modo geral, estes microrganismos possuem perfil de distribuição cosmopolita, sendo, portanto, encontrados em várias partes do mundo (PERES et al., 2010).

Ainda que existam várias opções terapêuticas disponíveis no mercado para o tratamento da dermatofitose, ofertadas nas mais diversas formulações e apresentações tanto por via sistêmica quanto tópica, alguns dos problemas relacionados ao sucesso do tratamento estão relacionados a: efeitos adversos dos antifúngicos, descontinuação no tratamento e a resistência fúngica, levando ao surgimento de cepas mais resistentes (LANA et al., 2016; SBD, 2017) e consequentemente, à ineficácia do tratamento, sendo necessária a pesquisa de novos agentes antifúngicos, principalmente aqueles de origem natural, como extratos oriundos de plantas.

Apesar de ser uma droga vegetal bastante conhecida e comercializada em várias partes do mundo, no Brasil, são poucos os estudos disponíveis na literatura sobre a qualidade dos frutos secos de *I. verum*, assim como, aqueles que relatam a ação do seu óleo essencial sobre fungos dermatófitos, sendo necessária então, uma pesquisa mais aprofundada, buscando contribuir não só do ponto de vista do controle de qualidade de amostras vendidas como “anis-estrelado” no Brasil, como o da avaliação da atividade biológica do óleo essencial do qual tornam-se os principais objetos da presente pesquisa.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Fitoterapia

Fitoterapia é definida pela utilização de plantas com propriedades medicinais em suas diferentes formas farmacêuticas sem o uso de substâncias ativas isoladas para o tratamento de doenças. Tanto a fitoterapia quanto o uso de plantas medicinais constituem a medicina tradicional, pois englobam um conjunto de saberes populares nos seus diversos usuários e praticantes, principalmente pela tradição passada de geração em geração, sendo uma forma extremamente eficaz e alternativa no atendimento primário a saúde, pois pode complementar o tratamento padrão, sobretudo para a população mais carente (BRANDELLI, 2017, p. 125). Sabe-se que cerca 85% da população de países menos desenvolvidos utilizam plantas medicinais ou extratos (BRANDELLI, 2017, p. 98).

A Medicina Tradicional e Medicina Complementar e Alternativa (MT/MCA), junto com seus produtos, principalmente as plantas medicinais, tem se tornado o alvo de políticas públicas nacionais e internacionais, incentivada pela Organização Mundial de Saúde (OMS), a partir do intitulado: “Programa de Medicina Tradicional” na década de 70. A OMS recomenda que tanto as políticas nacionais como a regulamentação para os produtos vindos das práticas tradicionais contemplem entre outros, os conceitos de medicina tradicional e complementar/alternativa (BRASIL, 2012).

A Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Brasil foi aprovada através da portaria GM/MS nº 971 em maio de 2006. Entretanto, o reconhecimento mundial só se deu no mês seguinte, durante uma das várias reuniões realizadas pela OMS voltadas para o aperfeiçoamento da medicina tradicional, ocorrida em Genebra, na Suíça entre 12 a 14 junho de 2006, sob o tema “Integração da medicina tradicional nos sistemas nacionais de saúde”. Nela, o Brasil passou a fazer oficialmente parte do grupo de países que possuem políticas no âmbito da MT/MCA, com a aprovação da PNPIC junto ao SUS (BRASIL, 2012), respaldado pelas diretrizes da OMS (BRASIL, 2020).

A PNPIC reúne diretrizes e ações para a inserção de serviços e produtos relacionados à Medicina Tradicional Chinesa (MTC), como a acupuntura, homeopatia, fitoterapia e outras. Também delega responsabilidades dos órgãos federais, estaduais e municipais. Entre seus objetivos, estão: contribuir para o aumento da resolubilidade

do SUS; ampliar o acesso às práticas integrativas e complementares; garantir qualidade, eficácia, eficiência e segurança no uso das práticas integrativas e complementares; promover a racionalização das ações de saúde; estimular o uso de alternativas inovadoras e socialmente contributivas ao desenvolvimento sustentável de comunidades (BRANDELLI, 2017, p. 130).

Considerando então a atenção básica e os serviços de média e alta complexidade, existem atualmente 9.350 estabelecimentos de saúde no país oferecendo 56% dos atendimentos individuais e coletivos em PNPIC nos municípios, compondo os 8.239 (19%) dos estabelecimentos na atenção básica que ofertam PICs, em 3.173 municípios e em 100% das capitais, sendo maior na atenção básica, com 78% de cobertura, elevando o país a um *status* de referência no cenário mundial, contando atualmente com 29 práticas (BRASIL, 2020).

#### 2.1.1 Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF)

A política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos foi criada por meio do decreto nº 5.813, em 22 de junho de 2006, estabelecendo diretrizes, bem como execução de medidas que visam a garantia do acesso seguro de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil, além do desenvolvimento tecnológico e de inovação, fortalecimento das cadeias e arranjos produtivos e uso sustentável da biodiversidade brasileira, além do complexo produtivo da saúde (BRASIL, 2006).

Entre as diretrizes da PNPMF destacam-se aqui (BRASIL, 2006; OLIVEIRA; ROPKE, 2016):

- O incentivo, a formação e capacitação de recursos no desenvolvimento de pesquisas, tecnologias e inovação de plantas medicinais e fitoterápicos;
- O fomento à pesquisa, desenvolvimento tecnológico e inovação com base na biodiversidade brasileira, abrangendo espécies nativas e exóticas adaptadas, priorizando as necessidades epidemiológicas da população;
- Promoção ao contato entre o setor público e iniciativa privada, universidades e centros de pesquisa e organizações não governamentais na área de plantas medicinais e desenvolvimento de fitoterápicos;

- Garantir e promover a segurança, eficácia e qualidade no acesso de plantas medicinais e fitoterápicos;
- Estimular a produção de fitoterápicos em escala industrial.

A PNPMF tem como premissas o respeito aos princípios de segurança e eficácia na saúde pública e a conciliação de desenvolvimento socioeconômico e conservação ambiental, tanto no âmbito local como nacional, que abrange o uso das plantas medicinais desde o uso caseiro até a fabricação de medicamentos industrializados. Os fitoterápicos constituem importante fonte de inovação em saúde, chamando a atenção de empresas privadas e motivo de competitividade no complexo produtivo de saúde, que impõe o fortalecimento da base produtiva local (inclusive a agricultura e desenvolvimento agrário) pela concorrência na indústria nacional (BRASIL, 2006; BRANDELLI, 2017, p. 131).

### 2.1.2 Controle de qualidade de drogas vegetais

Sendo a planta um ser vivo, em sua composição existem várias substâncias ativas do seu metabolismo secundário denominadas de fitocomplexo, responsáveis por efeitos terapêuticos. Estas podem variar de acordo com as modificações no ambiente onde se desenvolve, tais como: clima, cultivo, aclimatação, local e hora da colheita (ROCHA, 2009). Estes fatores podem influenciar de forma acentuada o teor de princípios ativos, sendo necessária deste modo a avaliação do controle de qualidade (ou análise farmacognóstica) do material vegetal, para garantir ao consumidor que faz o uso popular de determinada planta de que estará usufruindo dos seus benefícios, como o teor ideal de princípio(s) ativo(s) responsáveis pela atividade farmacológica esperada e que esteja livre de impurezas ou contaminantes que possam causar alguma lástima à sua saúde.

A Farmacopeia Brasileira é o compêndio nacional e oficial que trata na sua mais recente edição, a 6ª, publicada em 2019, entre outras seções, monografias de plantas medicinais. Cabe salientar, que grande parte destas monografias não são de plantas nativas. A farmacopeia brasileira, similar a outras farmacopeias elenca ensaios de controle de qualidade, como os testes para identificação botânica (macro- e microscopia), pureza (teor de matéria estranha e cinzas), quantificação de óleos essenciais para drogas vegetais aromáticas, teor de contaminantes (metais pesados,

aflatoxinas) e por contaminação microbiana, além dos testes para identificação de marcadores químicos e sua quantificação por métodos cromatográficos, como a CCD e GC ou HPLC (KUMARI; KOTTECHA, 2016).

Os testes supracitados ajudam a inferir alguns dos principais problemas relacionados à qualidade de drogas vegetais (ROCHA, 2009):

- **Adulteração:** A droga utilizada não é a descrita na literatura, mas sim uma falsificação (quando há a inclusão grosseira da matéria-prima, em que uma espécie vegetal morfológicamente similar é trocada por outra), uma substituição (venda ou dispensação de planta diferente da referida, muitas vezes por espécies do mesmo gênero ou com a mesma finalidade de uso) ou um caso de sofisticação (adição de substâncias sintéticas em plantas medicinais ou a fitoterápicos de substâncias sintéticas ou naturais aos dos seus marcadores químicos respectivos a suas espécies que se encontram com baixo teor destes na sua composição).

- **Quantidade de substâncias estranhas superior à permitida,** quando a droga vegetal contém em seu lote outras partes diferentes da especificada ou de outras, que entretanto, não possuem relação com a atividade terapêutica, além de outras impurezas: como pedras, areias, insetos, etc.

- **A pureza,** que pode ser medida pelas cinzas resultantes da queima do material vegetal pode ser fisiológica, componentes minerais da própria planta e não-fisiológica (matéria estranha). O teor de cinzas superior ao permitido indica cinza não fisiológica, como areia e terra, denotando o mau tratamento na etapa da colheita, secagem e armazenagem.

- **A contaminação microbiológica** também é um grave problema relacionado à qualidade de drogas vegetais. Sabe-se que vários microrganismos são patógenos e por isto, podem causar uma série de doenças ou graves quadros de infecção ao consumidor, que se refletem as etapas plantio, colheita e processamento do material.

- **A quantidade de pesticidas** encontrado em drogas vegetais é outro agravante. A presença de pesticidas clorados, organofosforados, inseticidas e herbicidas, fungicidas ditiocarbamatos e outros que contaminam as plantas, causam danos severos ao material vegetal. O mesmo se vale pela **contaminação por metais pesados**, associado ao uso de plantas in natura ou drogas vegetais contaminadas por metais pesados a exemplo de chumbo, mercúrio e cádmio que foram cultivadas

em locais próximos a indústrias químicas ou de garimpos e, que são despejados nos rios ou lagoas próximos a elas.

- **E o teor de componentes ativos inferior ao mínimo permitido**, responsável principalmente pela ineficácia terapêutica, obrigando ao consumidor a consumir maior quantidade de droga vegetal ou de fitoterápico acima do especificado para obter algum efeito. Assim, um baixo teor de ativos, implica em baixa biodisponibilidade.

## 2.2 Óleos Essenciais

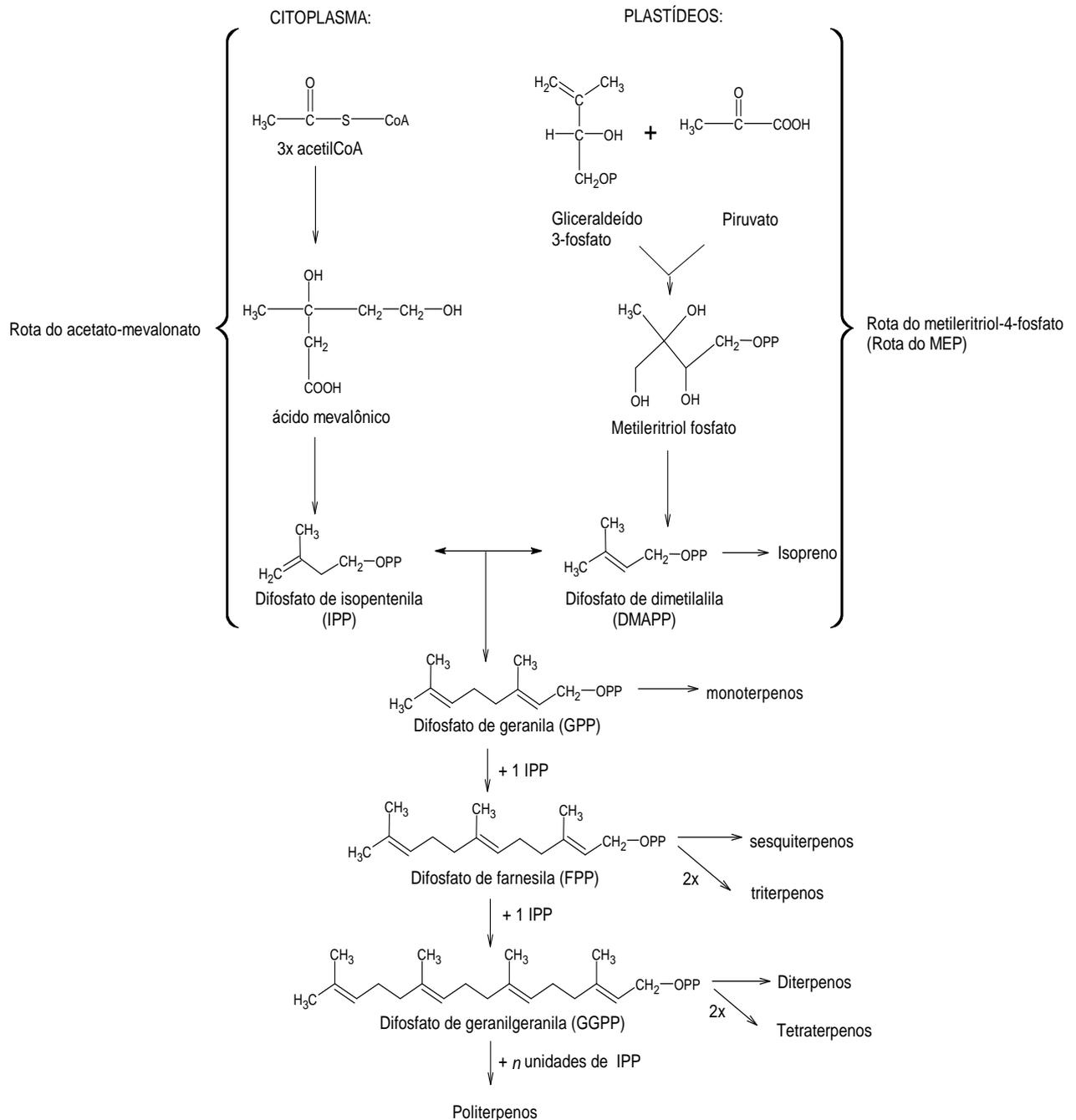
Óleos essenciais, chamados também de óleos voláteis ou óleos etéreos são misturas complexas de compostos voláteis, compostos por fenilpropanoides e terpenos, produtos do metabolismo secundário das plantas, distribuídos em plantas conhecidas como aromáticas, devido seu odor característico (BAKKALI et al., 2008; HEINZMANN; SPITZER; SIMÕES, 2016; DHIFI et al., 2016). Geralmente são líquidos a temperatura ambiente e possuem densidade menor que a da água (DHIFI et al., 2016), o que permite sua separação por alguns dos métodos clássicos de separação, como hidrodestilação, arraste a vapor d'água e prensagem a frio. Os óleos podem apresentar atividade antioxidante, anti-inflamatória, antibacteriana, antifúngica, antiviral, dentre outras (RAUT; KARUPPAYIL, 2014; DHIFI et al., 2016).

### 2.2.1 Terpenos

Constituem uma variedade de substâncias químicas, derivadas do 2-metilbutadieno, também chamado de isopreno. Esta molécula, após ligação com radicais fosfato, produz duas unidades de C-5 basais, o difosfato de isopentenila (IPP) e o difosfato de dimetilalila (DMAPP), a partir dos quais os demais terpenoides são sintetizados. Estes dois sofrerão reações químicas de condensação, originando primariamente hidrocarbonetos acíclicos, que se conformam de diferentes maneiras sobre a superfície de enzimas, de modo a preencher os pré-requisitos espaciais para sua ciclização, dando origem as diferentes classes de terpenoides: os mono- (10 C), sesqui- (15 C), diter- (20 C), tri- (30 C), tetra- (40 C) e politerpenos ( $n$  C), em quantidades de carbono (C) que são sempre múltiplos de cinco na sua estrutura. Existem duas rotas distintas para a formação de terpenoides, a rota do ácido

mevalônico, que ocorre no citoplasma e a rota do 2-C-metileritriol-4-fosfato ou MEP, nos plastídeos (**Figura 01**). Ambas as rotas não são isoladas; pode haver trocas de precursores entre elas (HEINZMANN, SPITZER; SIMÕES, 2017).

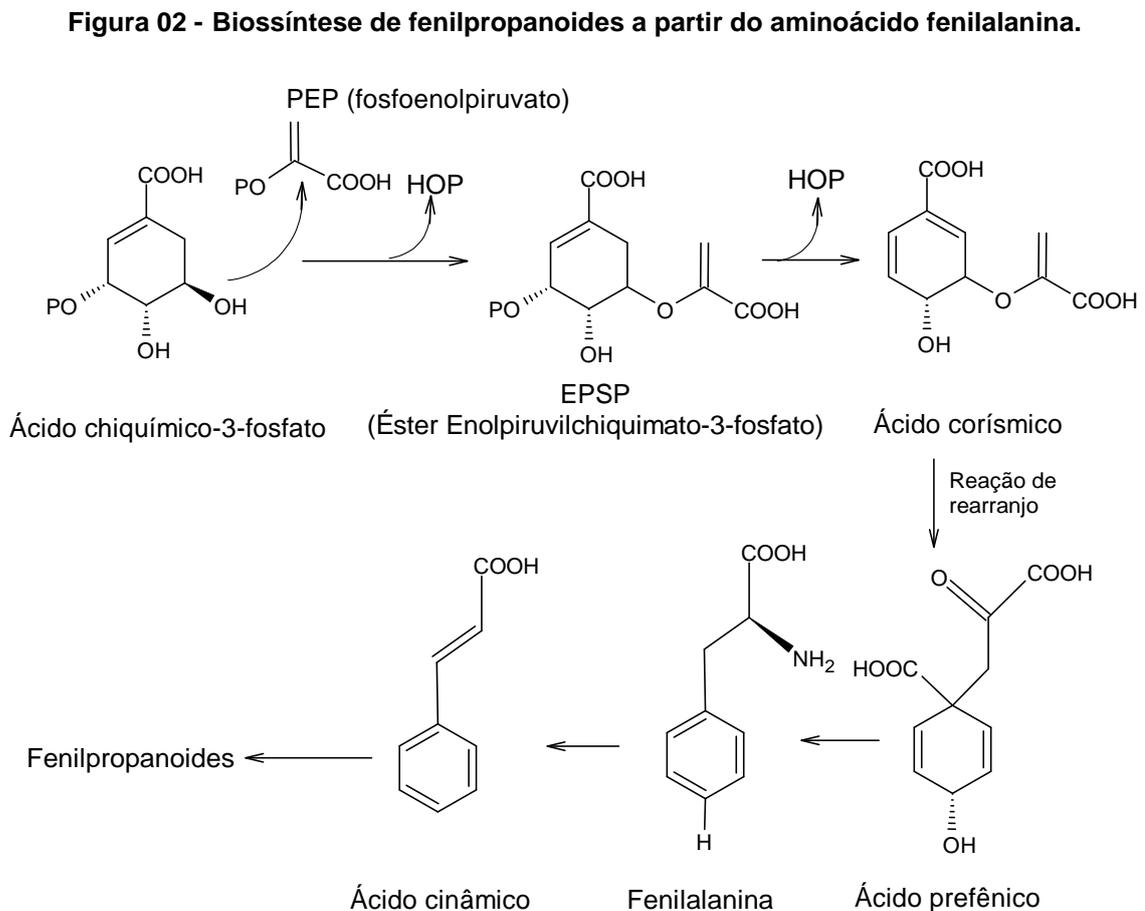
**Figura 01 - Biossíntese de terpenos no citoplasma e nos plastídios vegetais.**



Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

### 2.2.2 Fenilpropanoides

São compostos aromáticos que se caracterizam por possuírem na sua estrutura química uma cadeia lateral propila unida ao anel benzeno (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>) (SARKER; NAHAR, 2016; DENG; LU, 2017), derivada direta do aminoácido fenilalanina (SARKER; NAHAR, 2016). Com recorrência, os fenilpropanoides naturais contêm substituintes oxigenados (-OH, -OMe ou -metilenodioxí) no anel benzeno. Exemplos clássicos são o eugenol, ácido caféico e o ácido cumárico. São de distribuição profusa em vegetais superiores, especialmente nas plantas que produzem óleos essenciais das famílias Apiaceae, Lamiaceae, Lauraceae, Myrtaceae e Rutaceae. A biossíntese destes metabólitos segue a via do ácido chiquímico e o precursor imediato do ácido cinâmico é a fenilalanina (**Figura 02**). Outros fenilpropanoides e compostos fenólicos como cumarinas, flavonoides e lignanas, também derivam do ácido cinâmico (SARKER; NAHAR, 2016).



Fonte: adaptado de Leite (2009).

## 2.3 Família Schisandraceae

A família Schisandraceae atualmente é composta por três gêneros e cerca de 90 espécies de plantas, sendo esta família pertencente a ordem superior Austrobaileyale. A família é caracterizada por conter plantas lenhosas de clima sub- e tropical, com flores simétricas. Botanicamente, a família possui características de antigos grupos de gimnospermas, como madeira com vasos primitivos para condução de água (ENCYCLOPEDIA BRITANNICA, 2021).

Os gêneros *Schisandra* e *Kadsura* que contam atualmente com 25 e 22 espécies, respectivamente, são descritas como trepadeiras, cujas flores masculinas e femininas são separadas, comumente encontradas em plantas de também sexo individualizado. Os frutos de ambos os gêneros possuem de 1-5 sementes cada. As espécies da família são cultivadas como plantas ornamentais, a exemplo da ovideira da magnólia (*Schisandra chinensis* (Turc.) Baill.), que contém flores brancas ou rosadas perfumadas e frutos atrativos e a videira kadsura (*Kadsura japonica* (L.) Dunal), com cachos de frutas cor escarlate (ENCYCLOPEDIA BRITANNICA, 2021).

O gênero *Illicium* spp., anteriormente agrupado à antiga família Illiciaceae (KIM et al., 2009; ENCYCLOPEDIA BRITANNICA, 2021) e depois para Magnoliaceae, é composta atualmente por 42 espécies de arbustos e árvores, com folhas perenes, folhas aromáticas e flores bissexuais. A parte feminina da flor tem de 7 a 15 carpelos (estrutura vegetal portadora dos óvulos), geralmente em uma única espiral. Quando madura, a flor gera um fruto lenhoso, em forma de anel com vários folículos que remetem a forma de vagem, onde cada um se abre para liberar uma única semente (ENCYCLOPEDIA BRITANNICA, 2021).

### 2.3.1 *Illicium verum* Hook f.

#### 2.3.1.1 Histórico e usos

Originária do sul da China e do Vietnã, o *I. verum* leva o nome de “anis-estrelado” devido ao formato dos seus frutos secos que remetem a uma estrela. Possui um vasto uso como planta medicinal em países asiáticos, especialmente na China (WANG et al., 2011). Diferentes formulações são feitas a partir da droga vegetal, tais como pós. A farmacopeia chinesa, na edição de 2010, descreveu entre as

recomendações de uso do anis-estrelado para alívio da dor e do resfriado comum. No tratamento de sintomas de baixa gravidade, ele também é referido para cólica abdominal. O infuso, também é recomendado como agente calmante e também sedativo. Já o óleo essencial, derivado da droga, foi mencionado para tratamento de dores de estômago em quantidades de 0,06-06 mL/dia (WANG et al., 2011).

O anis-estrelado também consta no sistema médico tradicional indiano – o Ayurveda, no combate a dispepsia, flatulências, colônalgia espasmódica, disenteria, tosse, asma, artrite reumatoide, paralisia facial e etc. (PATRA et al., 2020). Nos Estados Unidos e México, é usado no tratamento de cólicas em bebês e dores no estômago (WANG et al., 2011). No Brasil, é usado como agente carminativo ou em outras desordens do Trato Gastrointestinal (TGI).

Além do uso na medicina tradicional chinesa, os frutos secos de anis-estrelado são empregados como especiaria na cozinha. No Vietnã e na China, por exemplo, ele é utilizado no preparo de carnes. O seu pó pode ser misturado com o de outras quatro especiarias: canela, cravo, erva-doce e pimenta-de-sichuan para o preparo de diversos alimentos (PATRA et al., 2020). O anis-estrelado e o óleo fazem também parte da composição de bebidas, com função aromatizante, em refrigerantes, chás de ervas, conhaque, licores com sabor de anis, etc. Em produtos alimentícios como gomas de mascar, na confeitaria, na elaboração de pudins, tortas e compotas, devido ao seu sabor extremamente adocicado (LIM, 2013).

### 2.3.1.2 Classificação e aspectos botânicos

Reino: Plantae

Divisão: Tracheophyta

Classe: Magnoliopsida

Subclasse: Magnoliidae Novák ex Takht.

Ordem: Austrobaileyanae Doweld ex MW Chase & Reveal

Família: Schisandraceae Blume

Gênero: *Illicium* L.

Espécie: *Illicium verum* Hook f.

Sinonímia: *Illicium san-ki* Perr.

Nomes populares: Anis da China, Anis da Sibéria, Anis estrelado, Anis Estrelado, Badiana, Funcho da China (LIM, 2012).

*I. verum* é uma árvore de porte médio, perene, que cresce em torno de 6-15 m de altura (**Figura 03-A**). Com casca branca acinzentada (LIM, 2013), que conta com troncos planos e lisos (PATRA et al., 2020). Seus ramos tendem a ser glabros, esverdeados, nos espécimes jovens e com o envelhecimento vão se tornando acinzentados. As folhas se dispõem geralmente ao final dos seus galhos, peciolados, curtos e avermelhados nas folhas mais jovens. As folhas de anis-estrelado possuem lâmina simples, de cor verde brilhante, glabras, coriáceas, lanceoladas ou oblongo-lanceoladas, nas dimensões de 6-12 cm x 2,5-4 cm de comprimento, cujo ápice é agudo. Com relação às flores, são descritas como axilares, bissexuais, regulares e solitárias, de 1-1,7 cm de diâmetro, de coloração rosa esbranquiçado ou amarelo esverdeado. Os lóbulos do perianto (7-12) e estames (11-20) estão dispostos em espiral e os carpelos geralmente em número de 8, estão também neste formato. A planta começa a frutificar a partir dos 6 anos de vida, continuando nesse estado até seus 100 anos (WILSON, 2016). O fruto (**Figura 03-B e 03-C**), de acordo com a Farmacopeia brasileira 6 ed. (BRASIL, 2019), é descrito da seguinte forma:

“Múltiplo, composto de sete ou oito folículos, algumas vezes até 11, dispostos horizontalmente em forma de estrela, ao redor de um eixo central denominado columela. Os folículos têm de 1 a 2 cm de comprimento, coloração castanho-acinzentada e são desigualmente desenvolvidos, lenhosos, careniformes, achatados lateralmente, terminando em ápice obtuso e curvo. A face externa, lateral e inferior de cada folículo é espessa e rugosa e o bordo superior, chamado de sutura ventral, é aberto em dois lábios delgados e lisos de cada lado da fenda da deiscência carpelar, deixando ver sua face interna lisa e brilhante, de coloração castanho-amarelada; as faces laterais externas e rugosas apresentam, perto da base, uma parte mais lisa, clara e semielíptica, pela qual os carpelos estão em contato entre si. Cada folículo possui uma única semente oval, castanho-avermelhada ou castanho amarelada, dura e brilhante, truncada na base, onde se distinguem o hilo e a micrópila próximos um do outro. A semente apresenta tegumento frágil e endosperma oleoso, que circunda um pequeno embrião” (BRASIL, 2019, p. 62).

**Figura 03 - Aspectos botânicos de *I. verum*. 03-A: Árvore jovem de anis-estrelado. 03-B: detalhe do fruto seco de anis-estrelado evidenciando as suas sementes. 03-C: Frutos secos (com hastes) de anis-estrelado.**



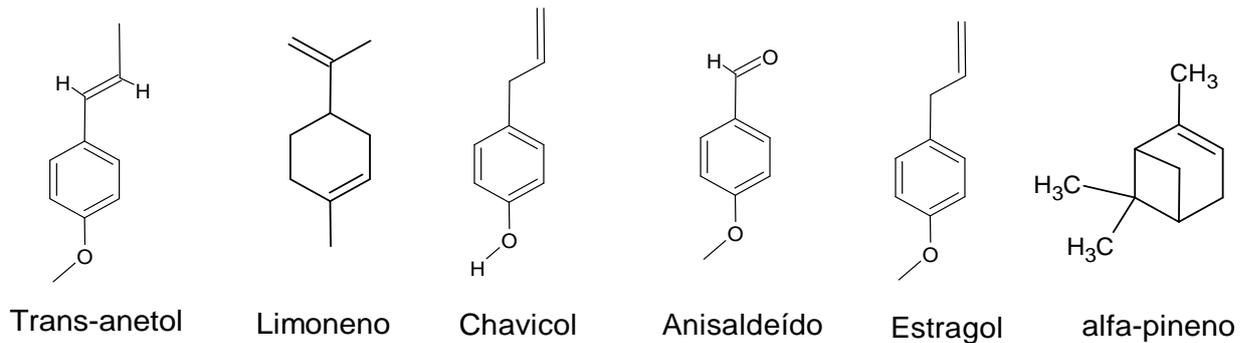
**Fonte:** 03-A; LIM, 2012. 03-B: <[www.plantsoftheworldonline.org](http://www.plantsoftheworldonline.org)>. Acesso em: 2 ago. 2021 e 03-C: <[www.plantsoftheworldonline.org](http://www.plantsoftheworldonline.org)>. Acesso em: 2 ago. 2021

### 2.3.1.3 Componentes do óleo essencial de *I. verum*

O óleo essencial, contido no fruto, é de constituição complexa, que varia entre 2,5-3,5% no material vegetal fresco e 8-9% do material seco (BOOTA et al., 2018). O componente majoritário do óleo essencial é o anetol ou *trans*-anetol, responsável por caracterizar o odor do funcho (*Foeniculum vulgare* Mill.) e da erva-doce (*Pimpinella anisum* L.) ambos da família Apiaceae, da anis murta “anise myrtle” (*Syzygium anisatum* (Vickery) Craven e Biffin) das Myrtaceae, do alcaçuz (*Glycyrrhiza glabra* L.) das Fabaceae e nas flores de magnólia (*Magnolia* L.) das Magnoliaceae, e que no caso do anis-estrelado, é encontrado em concentrações que correspondem a mais de 90% do óleo essencial (MARINOV; VALCHEVA-KUZMANOVA, 2015), sendo que esta quantidade, assim como o de outros componentes do óleo podem variar de acordo com a região onde é ele cultivado, condições de cultivo, período de colheita, armazenamento (GOBBO-NETO; LOPES, 2007) ou do método de extração escolhido, por exemplo. Na figura abaixo (**Figura 04**), está representada a estrutura química do

anetol e de outros componentes do óleo essencial de anis-estrelado já descritos na literatura (WANG et al., 2011).

**Figura 04 - Componentes voláteis descritos para o óleo essencial de *I. verum*.**



**Fonte:** Elaborada pelo autor (2021).

#### 2.3.1.4 Atividades farmacológicas do óleo essencial de *I. verum*

A natureza lipofílica dos óleos essenciais permite que estes penetrem a membrana celular e alcancem o interior das células (ASIF et al, 2016). Assim, algumas das atividades relacionadas ao óleo essencial de anis-estrelado já documentadas pela literatura são descritas a seguir.

##### 2.3.1.4.1 Anti-inflamatória

Além de investigar as propriedades antibacterianas e antioxidantes do óleo essencial de anis-estrelado contra *Acinetobacter baumannii*, Luís e colaboradores (2019), verificaram que o óleo de anis-estrelado também possuía propriedades anti-inflamatórias. Dado que o processo de desnaturação de proteínas está envolvido entre as causas de inflamação, o óleo, que teve um IC<sub>50</sub> de 12,03%, se mostrou mais efetivo ao controle, o ácido acetilsalicílico (IC<sub>50</sub> =79,50%). Sabe-se que o anetol, possui grande potencial anti-inflamatório, seja por ação inibitória na produção ou liberação de prostaglandinas/óxido nítrico ou de citocinas pró-inflamatórias, como já descrito anteriormente (DOMICIANO et al., 2013; MORADI et al., 2014).

#### 2.3.1.4.2 Antibacteriana

Ebani e colaboradores (2018) avaliaram a ação do óleo essencial de anis-estrelado em cepas multirresistentes de *Escherichia coli* e *Enterococcus* sp. isolados de animais domésticos, observando a atividade moderada do óleo essencial em *E. coli*, cujas Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) estavam compreendidas numa escala de 0,152 a 2,445 mg/mL. Para as cepas de *Enterococcus*, nenhuma atividade fora observada. Em outro estudo, foi notada a atividade do óleo essencial de anis-estrelado em *Helicobacter pylori*, bactéria gram-negativa encontrada na mucosa gástrica apresentando CIM de 294,7 - 589,4 µg/mL e Concentração Bactericida Mínima (CBM) de 589,4 - 1.178,8 µg/mL (WESELER et al., 2005).

#### 2.3.1.4.3 Inseticida

De acordo com Voris e colaboradores (2018), o óleo também apresentou propriedades larvicidas sobre o *Aedes aegypti*, vetor responsável pela transmissão de doenças infecciosas como dengue, zica e febre amarela. A mortalidade adulta foi observada após 1 h de exposição dos mosquitos ante o óleo de anis-estrelado após 1 *knockdown* (KC<sub>50</sub>, ação rápida do agente testado que causa paralisia instantânea e morte nos insetos testados) biológico e 24 h de exposição, com o maior potencial estabelecido pelo cujo KC<sub>50</sub>= 7,3 µg mg fêmea<sup>-1</sup>, LC<sub>50</sub>=10,3 µg mg/ fêmea<sup>-1</sup> e IC<sub>50</sub>=4800 µg/mL, sendo considerado pelos autores o agente mais tóxico para insetos e o mais seguro para humanos, se comparado aos óleos de *Pimenta dioica* (L.) Merr (Myrtaceae) e *Myristica fragrans* Houtt (Myristicaceae) também usados no experimento, abrindo a possibilidade da elaboração de bioinseticidas naturais e seguros para humanos no controle destes vetores.

#### 2.3.1.4.4 Antifúngica

A atividade antifúngica do óleo essencial de anis-estrelado foi testada contra uma infecção por *Aspergillus flavus*, *in vitro* tendo uma CIM e CFM de 2,0 e 4,0 µL/mL, respectivamente, embasadas pelo forte efeito inibitório no desenvolvimento micelial e sobre os esporos de *A. flavus*, além da evidenciada redução sobre o peso do micélio seco e na ação redutora sobre a formação das aflatoxinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> (AFB<sub>1</sub> e AFB<sub>2</sub>), com uma inibição completa quando a concentração do óleo estava em 3,6 µL/mL. *In vivo*,

a atividade também foi confirmada em concentrações de 6,0 µg/mL, mostrando eficácia como agente antifúngico natural na preservação de sementes de lótus (*Nelumbo nucifera* Gaertn, Nelumbonaceae) (LI et al., 2020).

#### 2.3.1.4.5 Anticâncer

As propriedades citotóxicas em câncer de cólon foram avaliadas utilizando o óleo essencial de *I. verum* por ensaio MTT (ensaio colorimétrico que avalia proliferação celular), além de testes de migração *in vitro*, invasão de matrigel e formação de colônias metastáticas, utilizando três concentrações (25, 50 e 90 µg/mL). O estudo evidenciou que nas linhagens testadas, o óleo apresentou a maior citotoxicidade sobre o HCT-116 (linhagem de células tumorais do câncer de cólon), com valores de concentração inibitória, IC<sub>50</sub> de 50±1,19 µg/mL, além de alterações morfológicas nucleares, redução no potencial da membrana mitocondrial e de um efeito inibitório dose-dependente da migração celular nas células tratadas com o óleo, justificando como mecanismo de ação, o possível efeito de indução da apoptose e de inibição da formação de novas lesões do processo metastático (ASIF et al., 2016).

#### 2.3.1.4.6 Antiviral

O óleo de anis-estrelado apresentou um IC<sub>50</sub>=0,016% contra o vírus do herpes humano simples tipo 2 (HSV-2) *in vitro*, em células RC-37, pelo método de redução de placa, indicando que óleo agiu sobre o HSV-2, antes da sua adsorção, e, que de acordo com os autores, dado pela sua interação com o envelope viral (KOCH et al., 2008).

#### 2.3.1.5 Toxicidade

A presente espécie consumida como produto alimentício e para fins medicinais em fitoterapia pode ser confundida com outras espécies do gênero como *I. lanceolatum* A. C. Smith ou *I. anisatum* Linn (syn.: *I. religiosum* Siebet-Zucc), o anis-estrelado japonês. Esta última, contém na sua composição lactonas sesquiterpênicas como a anisatina, neoanisatina e pseudoanisatinas, (MINODIER et al., 2003; WANG et al., 2011) neurotoxinas que atuam como antagonistas não competitivos dos

receptores GABA (PERRET et al., 2011). Em estudo de Minodier e colaboradores (2003), na França, foram relatados 2 casos de aparente intoxicação por bebês após consumirem chás de anis-estrelado. Uma investigação morfológica, em um dos casos, apontou a adulteração do chá por *I. anisatum*.

Apesar disto, a toxicidade de drogas vegetais consideradas seguras para consumo, está estritamente ligada a alguns aspectos como: propriedades tóxicas da própria espécie, identificação botânica incorreta, utilização de outra parte da planta que não seja o seu farmacógeno, armazenamento inadequado, contaminação das plantas por produtos químicos nocivos, adulteração do produto, ausência ou rotulagem incorreta (GARCÍA-CORTEZ; FÉRNANDEZ-CASTAÑER, 2013). Outros fatores que podem influenciar na segurança do produto são: a dose ou quantidade utilizada, tempo de consumo e idade do paciente, em especial gestantes, crianças e lactentes.

Em relação ao anis-estrelado, o composto ao qual é relacionado a maioria das suas atividades bioativas, o *trans*-anetol, o documento oficial – relatório TRS 891-JECFA 51/18 aprovado pelo Comitê Misto FAO/OMS de Peritos em Aditivos Alimentares (*The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives - JECFA*), feito em 1998, e ainda ativo, expressa que o composto não oferece riscos à saúde humana em doses diárias de até 2mg/kg se usado como aromatizante alimentar (DESTRO, 2019), o conselho da Europa (1970), o listou aceitável em doses de até 1,5 mg/kg (MARINOV; VALCHEVA-KUZMANOVA, 2015). Em quantidades maiores, o anetol é ligeiramente tóxico e atua como agente irritante. A superdosagem do *trans*-anetol, em quantidades de 1-5 mL, o associou a diversos efeitos como náuseas, convulsões e edema pulmonar (MARINOV; VALCHEVA-KUZMANOVA, 2015).

## 2.4 Dermatofitoses

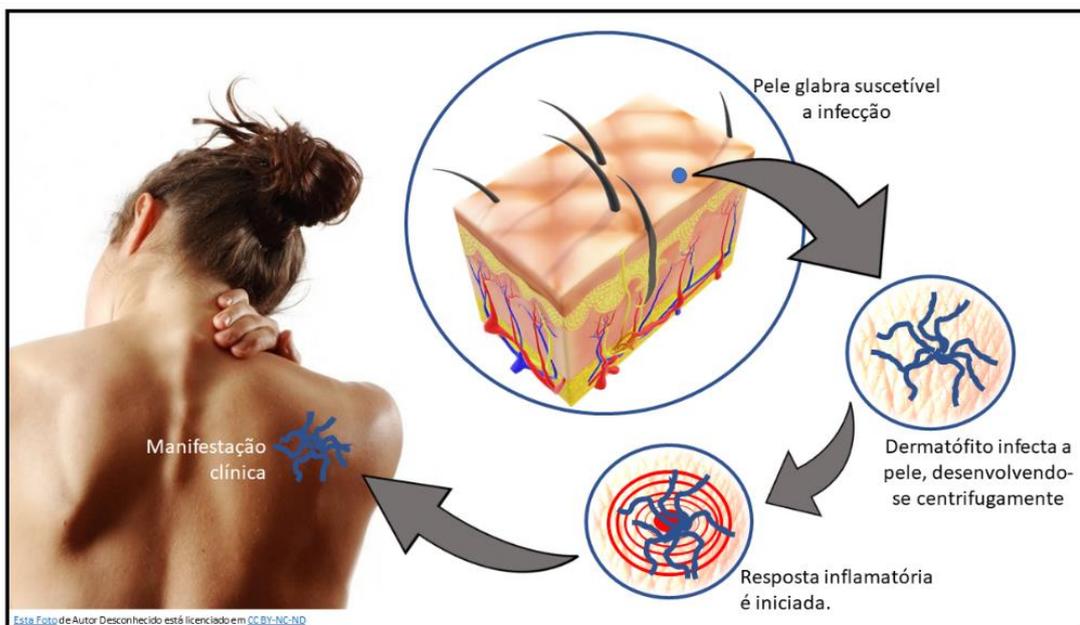
### 2.4.1 Agentes etiológicos

Os dermatófitos, da família Arthrodermataceae, são fungos filamentosos, hialinos, septados, queratinofílicos e queratinolíticos, ou seja, alimentam-se e decompõem a queratina do hospedeiro, iniciando um processo inflamatório (**Figura 05**). Assim, elas possuem um forte elo por estruturas altamente queratinizadas como

pele, cabelo e unhas, sendo que a infecção causada por esses fungos, está ligada intrinsecamente a sujeição a queratina. As espécies deste grupo distribuem-se em sete gêneros: *Arthroderma* spp., *Microsporum* spp., *Paraphyton* spp., *Epidermophyton* spp., *Nanizzia* spp., *Trichophyton* spp. e *Lophophyton* spp. sendo as de maior interesse clínico (**Figura 06**) os gêneros *Microsporum* spp., *Trichophyton* spp., *Nanizzia* spp. e *Epidermophyton* sp. reclassificados mais recentemente de acordo com suas características filogenéticas (HOOG et al., 2016). Assume-se então, que as espécies mais prevalentes sejam *Microsporum canis* (Bodin, 1902), *Nannizzia gypsea* (Bodin). Guiart, Grigorakis (1928) (syn. *M. gypseum*), *Trichophyton mentagrophytes* (Robin) Blachard (1896), *T. rubrum* (Castellani) Sabouraud 1911 e *T. tonsurans* (Malmsten, 1845).

Os dermatófitos ainda podem ser classificados de acordo com seu hábitat, em antropofílicos, zoofílicos e geofílicos. Sendo antropofílicas aquelas espécies que parasitam o homem, zoofílicas, as que são comuns de animais geralmente domesticados e geofílicas, quando se desenvolvem às custas de queratina oriunda do solo. Independente do hábitat, todos são cosmopolitas, apesar da incidência de determinadas espécies em lugares específicos do mundo (PERES et al., 2010).

**Figura 05 - Esquema representando o processo infeccioso causado por dermatófitos.**



**Fonte:** elaborada pelo autor (2021)

*M. canis*, um dos principais agentes causadores de dermatofitoses, está relacionado a 15% das infecções em humanos (LANA et al., 2016). Cães e gatos são reconhecidos como hospedeiros naturais. O *M. canis* pode se reproduzir assexuadamente por meio de processo mitótico e os propágulos que se originam da reprodução assexuada, denominadas de conídios, variam de acordo com sua localização. Durante o processo infeccioso, as hifas fragmentam-se para produzir artroconídeos (PASQUETTI et al., 2017).

Em meios de cultura, a macroscopia revela colônias planas, que se estendem por toda a placa, de cor branca e creme, cuja superfície é densa, algodonosa e que podem apresentar ranhuras radiais. O reverso possui cor amarelo-brilhante ou amarronzado, podendo ocorrer cepas não pigmentadas (PINTO et al., 2019). Os macroconídios são fusiformes e microconídios unicelulares (PASQUETTI et al., 2017).

Em outra espécie, a *Nanizzia gypsea* (syn. *M. gypseum*), a colônia possui um aspecto pulverulento, com halos cuja franja esbranquiçada se distribui em sentido radial e cerne eminente. Também se nota uma pigmentação de branca a amarelada no anverso e canela ao revés. A microscopia revela macroconídios elipsoides, com paredes finas, possuindo em torno de seis septos (DIAS et al., 2017). Apesar de infecções não serem tão incisivas em humanos, se comparadas a *M. canis*, a contaminação se dá principalmente pelo contato de humanos com animais domésticos ou que tenham contato direto com o solo (NARDONI et al., 2013).

*T. mentagrophytes*, de ocorrência humana e animal, causa infecções de média a intensa reação inflamatória, sendo presente em diversos animais, como coelhos, cavalos, porcos e galinhas. A onicomicose ungueal é causada principalmente por *T. mentagrophytes* (PATIÑO-HERRERA et al., 2018). Dermatofitos do complexo *T. mentagrophytes* são particularmente difíceis de identificar devido às suas características morfológicas (GNAT et al., 2019). No geral, considera-se que *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes*, em ágar Sabouraud, apresenta textura pulverulenta, sem relevos evidentes, formando círculos concêntricos e produzindo pigmentação do branco-amarelado ao castanho-avermelhado e reverso castanho. Já *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*, reclassificada atualmente como *T. interdigitale* (HOOG et al., 2016), apresenta uma textura veludosa ou algodonosa, de pigmentação branco-amarelada e revés com coloração mais branda entre o castanho e avermelhado (SIDRIM et al., 2003). Espécies do gênero raramente apresentam macroconídios, e quando apresentam, são caracterizados como de parede lisa e



## 2.4.2 Epidemiologia

### 2.4.2.1 No mundo

As dermatofitoses são infecções de ocorrência mundial, cuja prevalência estende-se em países de clima tropical e subtropical (LANA et al., 2016). Os dermatófitos atingem cerca de 25% da população mundial e estima-se que entre 30-70% sejam portadores assintomáticos dos agentes causadores. Assim, fungos dermatófitos apresentam um perfil cosmopolita de extensão, encontrado em várias regiões do mundo, variando regionalmente com relação à frequência de determinadas espécies, com as condições geoclimáticas e sociais servindo de interface para sua distribuição. Fatores climáticos, práticas sociais e migração populacional também podem afetar a sua epidemiologia, assim como cuidados impróprios na higiene, doenças de base como *diabetes mellitus* e quadros de imunodeficiência (PERES et al., 2010).

Hayette & Sacheli (2015), ao realizar um levantamento epidemiológico do quadro de infecções por dermatófitos pelo mundo, relataram que:

- **Na Europa:** *T. rubrum* foi o dermatófito mais isolado no Reino Unido em 2005. Na Alemanha, infecções por *T. rubrum* foram responsáveis por 91% das onicomicoses e na Eslováquia no período de 1994-1999 por 81,61% de todos os dermatófitos isolados. Na Grécia, *T. rubrum* também mostra percentual expressivo nas infecções 48% entre 1997-2003, seguido de *M. canis* com 17,9%. *E. floccosum* também apareceu envolvida em 6% das infecções. Na Itália, *M. canis* representa o patógeno mais isolado com 88,9% das infecções no período de 2002-2004 em Roma.
- **Na América:** nos Estados Unidos, *T. rubrum* foi o patógeno mais prevalente, numa incidência ascendente de 32-47% entre 1999-2002. No México, no período de 1996-2006, mostrou *T. rubrum* (71,2%) como principal agente, seguido por *T. tonsurans* (6,9%), *T. mentagrophytes* (5,5%), *M. canis* (4,5%) e *E. floccosum* (1,9%).
- **Na África:** a prevalência depende da região. *T. soudanense* (52,78%) seguido por *T. rubrum* (30,94%) e *M. canis* (4,89%), em Senegal no período de 2007-2011 e *T. violaceum*, no sudeste e sudoeste da Etiópia, África oriental.
- **Na Ásia:** no Japão em 2006, a tinea pedis foi apontada como a principal forma clínica, seguida por tinea unguium. *T. rubrum* foi constatada como a espécie mais isolada, entre as infecções dermatofíticas, exceto nos casos de tinea capitis, além de

um ligeiro aumento das infecções por *M. canis*. Em duas regiões da Índia, infecções por *T. rubrum* foram as mais evidentes (total de 91,7%), seguida de *T. mentagrophytes* (total de 53,8%), sendo tinea corporis e capitis as manifestações mais frequentes.

#### 2.4.2.2 No Brasil

Por aqui, o cenário assemelha-se a outras regiões do mundo. Heidrich (2013) em estudo de dermatofitoses na região metropolitana na região Sul por 16 anos, constatou que dos 9.048 resultados positivos para infecções por dermatófitos, *T. rubrum* ocorreu em 59,6% dos casos, seguido de *T. interdigitale* (34%), *M. canis* (2,6%), *E. floccosum* (1,5%), sendo a tinea unguium a mais prevalente com 48,5% seguida da tinea pedis (33,1%) e tinea corporis (6,8%).

Em Belém do Pará, o perfil etioepidemiológico de dermatofitoses foi avaliado por Silveira-Gomes e colaboradores (2013). Durante o período de 2005-2006, 66 dos 494 pacientes avaliados testaram positivo para dermatofitose, sendo *T. mentagrophytes*, seguida de *T. rubrum* os agentes mais comuns, responsáveis por tinea capitis, enquanto que *T. rubrum* para tinea corporis, tinea cruris e tinea pedis. Em Manaus (Amazonas), 32 de 202 indivíduos com resultado positivo para dermatofitoses, *T. rubrum* foi também foi o mais frequente, em 46,9% dos casos seguido por de *T. tonsurans* e *M. canis* (15,6% cada) no período de junho de 2015 a junho de 2016 conforme Barroso (2017).

Em Goiânia, capital de Goiás, de janeiro a dezembro de 1999, de 1.955 de amostras suspeitas de dermatofitose, analisadas pelo laboratório de micologia do instituto de patologia tropical e saúde pública da Universidade Federal de Goiás, 445 (22,85%) isolados foram cepas de dermatófitos, sendo o *T. rubrum* (49,4%), *T. mentagrophytes* (30,8%) e *M. canis* (12,6%) os mais detectados (COSTA et al., 2002).

Em São Paulo, no período de 1992-2002, dados de Chimelli e colaboradores (2002), mostram o *T. rubrum* como principal agente responsável por dermatofitoses com 48,7% dos casos, seguido por *M. canis* com 20,9%, ligada a tinea corporis (31,9%), tinea capitis (27,5%) e tinea unguium e tinea cruris, com 14,8% e 13,9% das manifestações clínicas.

Em estudo publicado por Silva e colaboradores (2017), a etiologia de dermatofitoses em pacientes atendidos no laboratório de Micologia médica no centro

de Biociências da Universidade federal de Pernambuco no período de 2014-2017, constatou que de 2.893 exames suspeitos para dermatofitose, 268 (20,1%) foram confirmatórios, sendo o gênero *Trichophyton* isolado em 252 amostras e *Microsporum* em 9 e *Epidermophyton* em 7 amostras, com *T. rubrum* sido o patógeno mais encontrado.

Em Alagoas, dados mais recentes mostram a frequência de *T. rubrum* como maior agente causador de dermatofitoses em um laboratório localizado na capital do estado, Maceió, com 50,77% dos casos, seguida de *T. mentagrophytes*, com 19,69% sendo espécies do gênero também as mais isoladas, ocupando 90,67% de um total de 1.697 amostras clínicas analisadas. Ainda de acordo com o local da infecção, a mais acometida foi a pele (51,3%), unha (37,92%) e couro cabeludo (10,88%) (FERRO et al., 2020).

#### 2.4.3 Formas clínicas

Uma mesma espécie pode estar relacionada a diferentes formas clínicas, com quadros clínicos bem individualizados (SBD, 2017).

Assim, as principais formas clínicas (AZULAY; AZULAY; ABULAFIA-AZULAY, 2015) ligadas a dermatofitoses são:

- Dermatofitose do corpo (tinea corporis):

Mostra-se como lesões eritematoescamosas, circinadas, isoladas ou confluentes, tendo a lesão um aspecto concêntrico na maioria dos casos. Na grande maioria dos casos há a predominância de vesícula, e, até mesmo, pústula; em outras o dano é em placa eritematoescamosa e evidencia uma evolução lenta, sendo observada a presença de prurido. No corpo, situa-se principalmente nos braços, face e pescoço (**Figura 07-A**).

- Dermatofitose marginada (tinea cruris):

Assim como a anterior, trata-se de uma lesão eritematoescamosa, como início na prega inguinal. Ela alastra-se sobre a coxa, com destaque na borda. Pode chegar ao períneo e se espalhar para as nádegas, região do pubis e pelo baixo-ventre. Esta forma não possui afinidade pela pele da bolsa escrotal, denotando a alta especificidade da dos dermatofitoses nos seus locais de infecção (**Figura 07-B**).

- Dermatofitose dos pés (tinea pedis):

Esta pode ser a *aguda* (eczematoide), marcada pela presença de vesículas em geral planares e digitais, sendo bastantes pruriginosa, a *intertrínosa*, localizada nas pregas interpododáctilas, apresentando fissuras e maceração e a forma *crônica*, caracterizada pela formação de lesões descamativas pouco pruriginosas ao cobrir toda a região plantar (**Figura 08-A**).

- Dermatofitose ungueal (tinea unguium) ou onicomicose:

Lesões destrutivas e esfarinhentas das unhas, iniciando pelas bordas livres de cor branco-amarelada são a principal característica desta forma. De caráter crônico, compromete uma ou várias unhas dos pés, com menor incidência nas mãos (**Figura 08-B**).

- Dermatofitose do couro cabelo (tinea capitis):

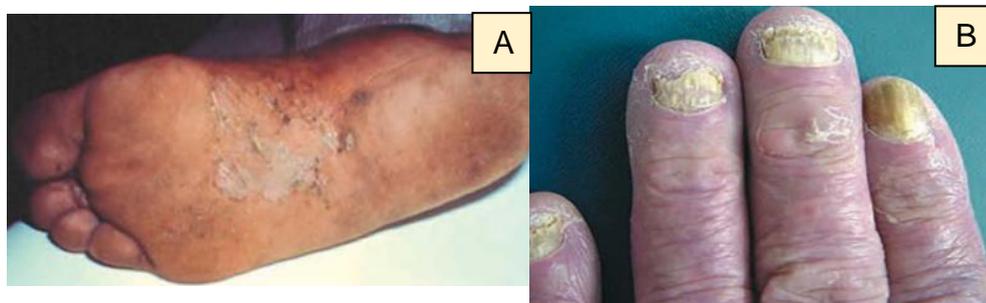
Atinge os cabelos, podendo ocorrer eritematoesmacoses do couro cabeludo. As lesões capilares são próximas à pele, levando a regiões de tonsura (**Figura 09-A e B**).

**Figura 07 - Formas clínicas de dermatofitoses. 07-A: Tinea corporis. 07-B: tinea cruris.**



**Fonte: 07-A:** AZULAY, AZULAY, ABULAFIA-AZULAY (2015, p. 496). **07-B:** <http://www.alergiarespiratoria.com.br/arquivos/154.pdf>. Acesso em 03 fev. 2021.

**Figura 08 - Formas clínicas de dermatofitoses. 08-A: Tinea pedis 08-B: onicomicose.**



**Fonte:** AZULAY, AZULAY, ABULAFIA-AZULAY (2015, p. 497 e 502, respectivamente).

**Figura 09 - Tinea capitis.**



**Fonte:** AZULAY, AZULAY, ABULAFIA-AZULAY (2015. p. 498).

Um resumo sobre os agentes etiológicos, ambientes naturais e formas clínicas relacionadas foram agrupadas no quadro abaixo:

**Quadro 01.** Resumo apresentando os principais agentes etiológicos de dermatofitoses associados as suas formas clínicas.

Gênero (n° espécies)	Espécie de maior interesse clínico	Hábitat	Forma clínica
<i>Trichophyton spp.</i> (16)	<i>T. mentagrophytes</i>	Antropofílico	Tinea pedis, corporis e onicomicose.
	<i>T. tonsurans</i>	Antropofílico	Tinea capitis, corporis, pedis e onicomicose.
	<i>T. rubrum</i>	Antropofílico	Tinea corporis, barbae, cruris, pedis e onicomicose.
<i>Microsporum spp.</i> (3)	<i>M. canis</i>	Zoofílico	Tinea capitis e corporis.
<i>Nannizia sp.</i> (9)	<i>N. gypsea</i>	Geofílico	Tinea capitis, corporis e cruris.
<i>Epidermophyton sp.</i> (1)	<i>E. floccosum</i>	Antropofílico	Tinea pedis e onicomicose.

**Fonte:** elaborado pelo autor (2021).

#### 2.4.4 Fármacos utilizados no tratamento

Dentre os principais medicamentos antifúngicos utilizados na terapêutica, três grupos se destacam no tratamento de dermatofitoses: os derivados azólicos, alilaminas e os ciclohexanos fenólicos.

#### 2.4.4.1 Derivados azólicos

A introdução deste novo grupo da classe de antifúngicos mostrou ser um grande passo no tratamento de micoses, tanto nas cutâneas quanto nas sistêmicas. O grupo classifica-se em imidazóis e triazóis (CONSTANT; CONSTANT, 2013).

Os antifúngicos imidazóis são representados pelo Clotrimazol, Miconazol, Isoconazol, Tioconazol, Oxiconazol e Cetoconazol (**Figura 10**). De todos os citados, apenas o cetoconazol é utilizado tanto por via oral como tópica. Isto se dá à pequena absorção oral e rápida metabolização hepática que os demais imidazóis apresentam, possibilitando apenas a sua apresentação em creme. O cetoconazol, é absorvido por via oral e dada sua baixa lipofilicidade, retém maior concentração nos tecidos, possibilitando então, seu uso por esta via. Já os triazóis, apesar de estruturalmente relacionados com imidazóis, são comumente usados para infecções fúngicas sistêmicas, devida sua melhor absorção via oral, amplo espectro de atuação, metabolização mais lenta e menor interferência sobre a síntese esteróica humana (CONSTANT; CONSTANT, 2013). Na clínica, os principais representantes do grupo são o Itraconazol e o Fluconazol (**Figura 10**), disponíveis em cápsulas e em solução.

Os azólicos são quimicamente caracterizados por conter na sua estrutura dois de átomos de nitrogênio (imidazólicos) ou três de nitrogênio (triazólicos). Agem atuando sobre a enzimas do citocromo P450 dos fungos, bloqueando a síntese do ergosterol, através da inativação da enzima C-14- $\alpha$ -desmetilase. Devido à falta de ergosterol, os esteróis tóxicos intermediários (lanosterol) se acumulam, a permeabilidade da membrana fúngica aumenta e o desenvolvimento do fungo é interrompido (GREGORÍ VALDÉS, 2005; MARTINEZ, 2006). Também é proposto alteração destes fármacos na síntese de lipídeos e inativação de enzimas do processo oxidativo dos fungos (MARTINEZ, 2006).

#### 2.4.4.2 Alilaminas

A principal representante do grupo é a terbinafina (**Figura 10**). Ao contrário dos derivados azólicos, possui efeito fungicida. Está disponível para administração oral e tópica e é eficaz contra dermatófitos tanto em *in vitro* como *in vivo* (DAVIS; BALFOUR, 1995; SUCCI; OROFINO-COSTA, 2010). A droga, desenvolvida em 1979, é altamente

lipofílica e é metabolizada pelo fígado. Possui pouca afinidade pelo citocromo P450 (<5%). Assim como outros antimicóticos, a terbinafina inibe a biossíntese de ergosterol da célula fúngica, entretanto, age um passo antes da síntese propriamente dita, inibindo o triterpeno esqualeno, precursor do ergosterol, pelo bloqueio da enzima esqualeno epoxidase. Sua inibição resulta no aumento intracelular deste triterpeno, rompendo a membrana do fungo, justificando seu efeito fungicida (SUCCI, OROFINO-COSTA, 2012). Sua estrutura química apresenta uma tripla ligação e uma ramificação da cadeia lateral alquilo adjacente, além do grupo butilacetileno (SPRENGER, 2019).

#### 2.4.4.3 Ciclohexanos fenólicos

A griseofulvina (**Figura 10**), foi inicialmente isolada em 1939 em culturas de *Penicillium griseofulvum* Dierckx por Oxford e colaboradores (CONSTANT; CONSTANT; 2013; PETERSEN et al., 2014). Como não apresentava efeito sobre bactérias, foi deixada de lado até 1958, quando então foi notada sua ação sobre fungos dermatófitos. No entanto, não possui ação sobre micoses sistêmicas. Após sua administração via oral, o fármaco se distribui por todo o corpo, se concentrando em maior quantidade na epiderme e em outros tecidos queratinizados (cabelo e unhas). Ao ingerir sua principal fonte nutricional, a queratina, o fungo carrega também o fármaco que atua sobre o seu metabolismo, interrompendo seu crescimento (CONSTANT; CONSTANT, 2013). Seu mecanismo de ação não é totalmente elucidado, embora a explicação mais difundida ao seu efeito seja sobre sua ação no processo de divisão celular fúngico, interferindo na mitose ou na síntese do ácido nucleico (PETERSEN et al., 2014). Quimicamente, é um composto aromático derivado do benzofurano e que apresenta baixa solubilidade em água (CROTHERS et al., 2005).

#### 2.4.4.4 Outros medicamentos sintéticos

Além do tratamento clássico, outras drogas antifúngicas são também aplicadas no tratamento de dermatofitoses. A exemplo tem-se a Ciclopirox olamina (**Figura 10**) e a butenafina (**Figura 10**). A ciclopirox olamina, é um agente antifúngico derivado da hidroxipiridona, cujos efeitos não estão relacionados aos derivados imidazólicos comuns e a outros agentes antifúngicos.

O mecanismo de ação da ciclopirox olamina se dá pela quelação de íons catiônicos de metais polivalentes, resultando na inibição das enzimas metal-dependente, responsáveis pela degradação de peróxidos tóxicos na célula dos fungos, (GUPTA; FLECKMAN; BARAN, 2000; JONES, 2005) pela inibição da síntese de DNA e RNA, pelo bloqueio da captação de precursores de macromoléculas ou da absorção de íons como potássio e fosfato (COUTO, 2016). Possui atividade tanto fungistática como fungicida. Em estudo comparativo, *in vitro*, foi evidenciado que o creme e a loção a 1%, mostraram boa atividade fungicida em *T. mentagrophytes* em relação a outros agentes antimicóticos (ABRAMS; HÄNEL; HOEHLER, 1991). No Brasil, está disponível nas formas de creme dermatológico, creme vaginal, xampu, esmalte e solução tópica (LACY et al., 2009).

A butenafina, é uma derivada da benzilamina que inibe a síntese do ergosterol a nível do esqualeno. Seu uso clínico é limitado ao uso tópico de infecções dermatofíticas superficiais (ESPINEL-INGROFF, 2009) em cremes a 1% (GEHRKE; BONIFAZ, 2007). Seu espectro de ação abrange *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* e *M. canis*, cuja ação pode ser fungistática ou fungicida, a depender da sua concentração (GEHRKE; BONIFAZ, 2007).

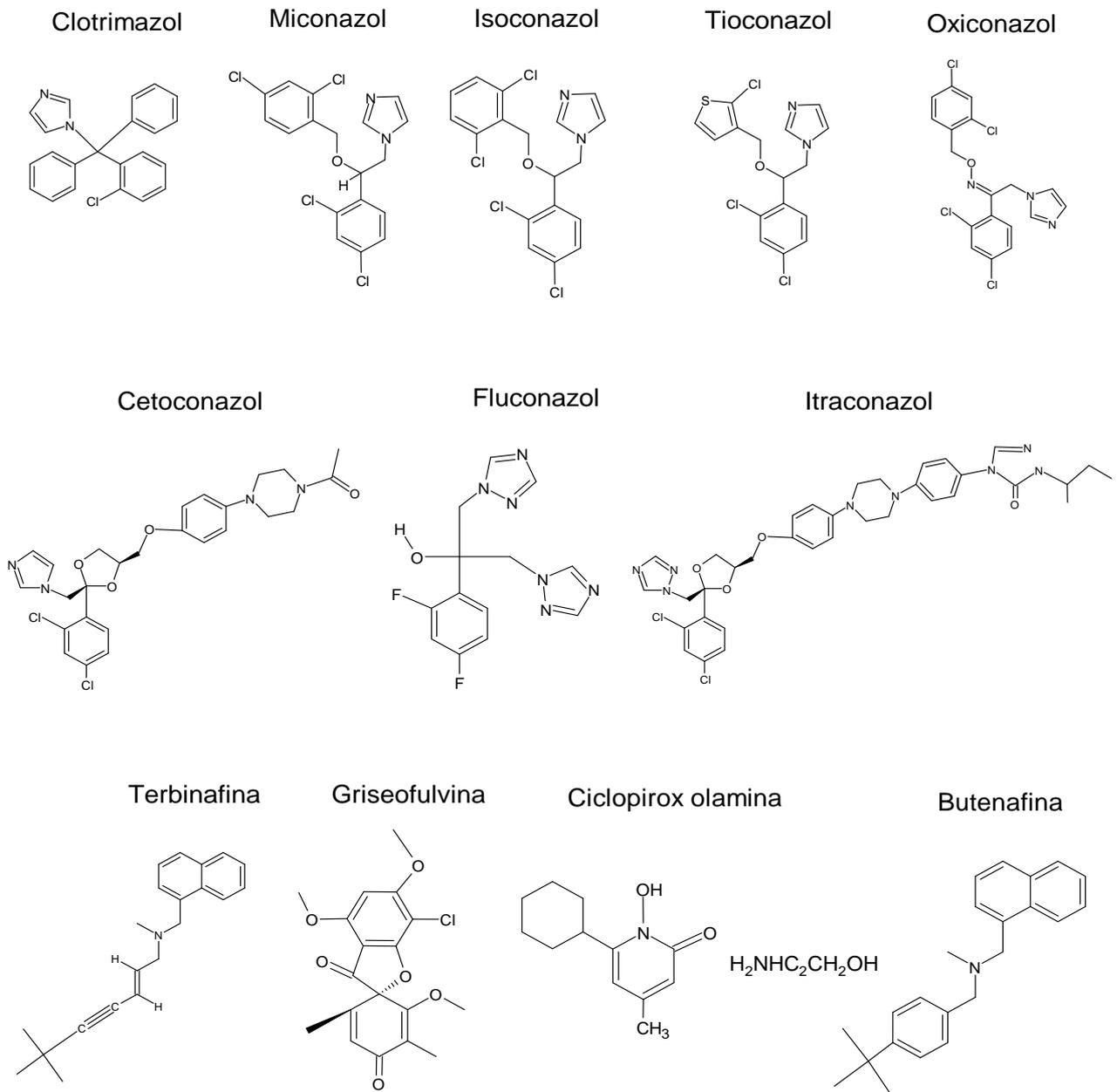
#### 2.4.5 Mecanismos de resistência

Apesar da variabilidade de opções oferecidas para tratamento de dermatofitoses, os fungos, assim como as bactérias, podem desenvolver alguns mecanismos de resistência, que dificultam o manejo da doença. Mesmo com a farmacoterapia padrão agir por diferentes mecanismos e vias de administração, os alvos celulares são limitados devido à semelhança entre a célula eucariótica fúngica e humana. As falhas associadas à terapêutica têm origem geral na descontinuação da terapia, aos efeitos colaterais/adversos de alguns antifúngicos e a resistência dermatofítica (LANA et al., 2016).

Em recente trabalho, foram propostos os seguintes mecanismos de resistência a fungos dermatófitos: *exposição a drogas, resposta ao estresse e adaptação, efluxo de drogas, desintoxicação de drogas, modulação transcricional dos genes de quinase, proteínas de choque térmico em fungos, mutações que afetam os genes alvo das drogas, além de elementos estruturais que influenciam a resistência aos*

*medicamentos*. Deste modo, justifica-se o desenvolvimento de novas drogas (fármacos ou fitofármacos), que apresentem segurança e eficácia, e, que no caso dos produtos naturais, chama a atenção devido à grande diversidade de substâncias ativas que podem ser usadas diretamente ou como precursoras de outras na elaboração de novos fármacos antifúngicos, podendo ser combinados com o tratamento padrão, representando novas alternativas ao tratamento (MARTINEZ-ROSSI et al., 2018).

**Figura 10 - Estruturas químicas dos principais antifúngicos sintéticos utilizados no tratamento de dermatofitoses.**



Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Geral:

- Avaliar o controle de qualidade dos frutos secos e da atividade antifúngica do óleo essencial de *Illicium verum* Hook f. “anis-estrelado” sobre isolados clínicos de fungos dermatófitos.

#### 3.2 Específicos:

- Caracterizar a identidade botânica dos frutos secos de *I. verum* por macroscopia e microscopia;
- Mensurar a pureza dos frutos secos de *I. verum* através do teor de matéria estranha e cinzas;
- Extrair o óleo essencial de *I. verum* por hidrodestilação;
- Identificar e quantificar os componentes do óleo essencial de *I. verum* por GC-MS).
- Determinar a CIM do óleo essencial de *I. verum* sobre isolados clínicos de dermatófitos pelo teste de microdiluição em caldo e da Concentração Fungicida Mínima, CFM, a partir da CIM.

## **4 MATERIAL**

### **4.1 Amostra vegetal**

1.000 g de frutos secos de anis-estrelado

### **4.2 Amostras fúngicas**

6 amostras clínicas isoladas de dermatofitoses

### **4.3 Material geral de laboratório**

Aparelho de Clevenger (hidrodestilador) graduação de 5 mL.

Almofariz e pistilo

Balões de vidro (fundo redondo) de 2000 mL

Béquers de 50 mL

Cadinhos de porcelana 20 mL

Chapa aquecedora

Condensador para hidrodestilador

Dessecador

Erlenmeyers de 100 mL

Frasco de vidro âmbar de 100 mL.

Funil de vidro

Garras

Lâminas de barbear descartáveis

Lâminas e lamínulas para microscopia

Lente de aumento

Manta aquecedora para balão de 2000 mL

Membranas millipore 0,22 µm

Micropipetas e ponteiros estéreis e descartáveis de 10, 200, 1.000 e 20.000 µL

Microplacas para microtitulação, fundo "U" descartáveis e estéreis (KASVI)

Papeis de filtro

Pêra

Pinças e espátulas

Pipeta volumétrica de 2 mL

Placas de petri de vidro

Placas de petri descartáveis e estéreis 90x15 mm (FIRSTLAB)

Provetas de 10 mL

Suporte universal

Tubos de ensaio 16x160 mm

Tubos *falcon* descartáveis e estéreis de 15 mL

*Vials* de vidro de 2 mL

#### 4.4 Equipamentos

Autoclave Quimis modelo 6290-22

Agitador vórtex

Balança analítica SHIMADZU® modelo AUY220

Capela para microbiologia JS Research 1200SB

Centrífuga KASVI modelo KK-085C

Cromatógrafo a gás SHIMADZU® modelo GCMS-QP2010S

Espectrofotômetro ThermoScientific (modelo Genesys 180)

Estufa Quimis modelo Q316M2

Fonte termocriostática digital MICROQUÍMICA® (modelo MQTBC99-20) para condensador

Forno mufla Spence® scientific modelo TCM77

Geladeira Brastemp *frost free* modelo BRM32ABBNA

Microscópio eletrônico StudLab

Moinho multiuso Tecnal modelo TE/6314

Paquímetro Mitutoyo®

#### 4.5 Reagentes e solventes

Água destilada

Azul de Alcian

Cloreto de Sódio, NaCl

Cloreto Férrico

Dimetilsulfóxido, DMSO (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO, P.A (Dinâmica)

Éter etílico, P.A (Synth)

Glicerina

Lactofenol azul algodão (NewProv)

Reagente de Nadi

Safranina

Solução de Black

Solução de Sudan IV

Sulfato de sódio anidro  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (Quimibras)

Tween 80 (Inlab)

Vermelho de rutênio

#### **4.6 Meios de cultura**

Ágar lactrimel

Ágar Sabouraud Dextrose

Ágar Sabouraud Dextrose-Cloranfenicol (Plast Labor)

Ágar Batata Dextrose

Caldo glicosado

Caldo RPMI-1640 (VitorCell/Embriolife)

## **5 MÉTODOS**

### **5.1 Controle de qualidade da droga vegetal**

#### 5.1.2 Obtenção da amostra e locais de desenvolvimento dos testes

1000 g da amostra de frutos secos de anis-estrelado foram obtidos em ervanaria da cidade de Maceió/AL em fevereiro de 2020. Os ensaios relativos ao controle de qualidade da droga vegetal foram realizados no Laboratório de Farmacognosia do ICF-UFAL. Os cortes e testes histológicos para microscopia, no Laboratório de Anatomia e Morfologia Vegetal do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (ICBS-UFAL) e a análise da composição do óleo essencial no Laboratório de Análise Química Instrumental do Instituto Federal de Alagoas (IFAL).

#### 5.1.3 Quarteamento da amostra

Realizou-se o processo, distribuindo-se a amostra de forma homogênea sobre superfície limpa, sendo em seguida, feita sua divisão em quatro partes iguais. Duas diagonais foram selecionadas para retirar as alíquotas dos testes de matéria estranha e cinzas. As outras duas, para extração do OE e alguns espécimes dos frutos para avaliação macro- e microscópica. O excedente foi reunido às diagonais selecionadas para a extração do OE.

#### 5.1.4 Análise macroscópica

Foram tomadas as dimensões dos folículos e tamanho do fruto inteiro em paquímetro com precisão de 0,02 mm, a partir de 10 frutos da amostra. Estes também foram avaliados quanto as suas características organolépticas como cor, odor e textura.

#### 5.1.5 Análise microscópica

Espécimes do fruto foram fervidos em água por um período de 120-150 min. Após este tempo foram feitos os cortes (secções) a mão livre na diagonal e longitudinal com auxílio de lâmina cortante. O material seccionado foi corado com solução de aquosa de Safranina e azul de Alcian na proporção de 1:9 e montadas em lâminas

semipermeantes com glicerina a 40%, compactadas entre lâmina e lamínula. Os cortes então foram levados ao microscópio ótico (microscopia de luz), e então, visualizados em diferentes objetivas, sendo em sequência fotodocumentados. Os marcadores morfoanatômicos foram comparados ao da monografia da droga.

#### 5.1.5.1 Testes histoquímicos

Para detecção de possíveis compostos presentes no material vegetal ao microscópio, os cortes foram corados com os seguintes reagentes:

- **Sudan IV e Black b** (PEARSE, 1972): para lipídios totais, sendo positivo após a formação de cor alaranjada (Sudan IV) e negro azulado (Sudan black B), após 15 min. de aplicação em temperatura ambiente, com os cortes mantidos em recipiente fechado e posteriormente lavado com água estéril.

- **Reagente de Nadi** (DAVID; CARDE, 1964): para óleos essenciais (terpenos). A presença seria confirmatória mediante a formação de coloração azul, após sua aplicação, observado após 1h da adição do reagente aos cortes ao abrigo da luz e posteriormente lavados com solução tampão de fosfato de sódio 0,1 M, pH a 7,2 por 2 min.

- **Vermelho de rutênio** (JOHANSEN, 1940): para a detecção de carboidratos. A presença comprobatória de pectina é revelada mediante a coloração rósea após a aplicação do reagente a 0,001% por 10 minutos, seguida de lavagem rápida em água estéril.

- **Cloreto férrico** (JOHANSEN, 1940): para compostos fenólicos. Os cortes após a aplicação do reagente, foram deixados em repouso por um período de 15 min. e depois lavados rapidamente em água. Sendo indicativo para compostos fenólicos a coloração das estruturas em azul escuro.

- **Cloreto de zinco iodado** (STRASBURGER, 1911): para amido. O reagente foi aplicado nos cortes e deixado em descanso por 5 minutos. Após a lavagem com água, foi observada a mudança de coloração para roxo (positivo).

#### 5.1.6 Determinação de Matéria Estranha

10 g da amostra foram tomados para determinação do material estranho, sendo considerados como contaminantes, partes da droga não especificadas pela sua

monografia e impurezas. O material estranho foi observado sob luz ambiente, com auxílio de lupa e pesado, sendo o teor determinado a partir do seu peso inicial, não podendo ultrapassar o máximo de 2,0% (p/p). O ensaio foi feito em triplicata e o resultado obtido expresso pela média e desvio padrão ( $M \pm DP$ ).

#### 5.1.7 Determinação do Teor de Cinzas

3 g do pó da droga pulverizada foram transferidos para cadinho de porcelana previamente calcinado a 550°C e pesado, sendo em seguida, a amostra levada a forno mufla e submetida a um limiar de aquecimento compreendido em: 200 °C/30 min, 400 °C/ 60 min e 600 °C/ 90 min. Após a queima do material vegetal, a amostra foi arrefecida em dessecador. Caso a queima não fosse completa (cinzas escuras), foram adicionados 2 mL de água destilada e o cadinho levado a chapa aquecedora para eliminação da água residual, sendo em seguida novamente levado à estufa por 600°C/1h até peso constante. O teor de cinzas foi calculado em relação ao peso inicial droga seca ao ar e considerado aceitável desde que não ultrapassasse 6,0% p/p, sendo o ensaio feito em triplicata e o resultado obtido expresso pela média e desvio padrão ( $M \pm DP$ ).

#### 5.1.8 Extração do óleo essencial

Aproximadamente 800 g da droga foram pulverizados para a hidrodestilação, sendo feitas 4 extrações de 200 g cada, em balão de fundo redondo de 2 L, usando 1 L de água estéril como líquido extrator por um período de 120 minutos/extração. Após a extração, as alíquotas de óleo de cada extração foram reunidas e misturadas com sulfato de sódio anidro para eliminação da água residual da extração (PANDIYAN; MATHEW; MUNUSAMY, 2019), sendo o conteúdo filtrado transferido diretamente para frasco de vidro âmbar, que foi mantido sob refrigeração até o momento de uso. O rendimento da extração foi calculado com base no volume final de óleo extraído a partir do peso inicial de droga vegetal (%v/p).

#### 5.1.8.1 Caracterização físico-química do óleo essencial de *I. verum*

Após extração do óleo, foram analisados os seguintes parâmetros: densidade e caracteres organolépticos. Para o primeiro, fora tomada uma alíquota de 1 mL (1000 µL) de óleo desferidos para proveta de 10 mL previamente tarada em balança analítica. A densidade foi definida pela razão massa (m)/ volume (v) a partir da massa pesada em g/cm<sup>3</sup> a temperatura ambiente. As análises sensoriais corresponderam as percepções quanto a cor, cheiro e textura do óleo.

#### 5.1.8.2 Cromatografia do óleo essencial de *I. verum*

A identificação dos componentes voláteis do óleo essencial de *I. verum*, foi feita por GC-MS, equipado com coluna do tipo capilar ZB-5HT 15 m x 0,32 mm de diâmetro x 0,10 µm de espessura. A amostra do óleo será submetida as seguintes condições analíticas: temperatura do injetor e do detector: 220 e 300°C, respectivamente; temperatura do forno programada de uma isoterma inicial a 60°C com aumento de 3°C por minuto até a temperatura de 300°C; gás carreador: hélio em injeção constante de 3,69 mL/min; volume de injeção: 1 µL de amostra a uma concentração de 30 µg/mL diluída em éter; taxa de *split* 30.0. O modo de ionização escolhido foi ionização eletrônica (70 eV). A identificação dos componentes do óleo foi obtida a partir com os espectros de massa de substâncias já conhecidas na literatura disponíveis na Wiley 299. A quantidade relativa de cada composto foi calculada pela razão da área de cada pico no cromatograma.

## 5.2 Testes microbiológicos

### 5.2.1 Obtenção das amostras e local de realização dos testes

Os isolados clínicos de dermatófitos utilizadas neste estudo foram gentilmente cedidas pela professora Dr<sup>a</sup> Maria Anilda dos Santos Araújo, do departamento de Microbiologia da UNIT/AL (**Tabela 01**). O cultivo dos fungos e realização da atividade antifúngica do óleo essencial de anis-estrelado foram executados no Laboratório de Pesquisa em Tratamento de Feridas (LPTF), situado na Escola de Enfermagem (EENF) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL).

**Tabela 01 - Informações referentes a procedência das amostras clínicas de dermatófitos utilizadas neste estudo.**

<b>Amostra</b> <b>[isolado</b> <b>fúngico]</b>	<b>Espécie</b>	<b>Área do corpo</b>	<b>Espécime clínico</b>
DF01	<i>M. canis</i>	SI	SI
DF02	<i>T. rubrum</i>	Pé esquerdo	Unha
DF03	<i>T. tonsurans</i>	Planta do pé direito	Escamas epidérmicas.
DF04	<i>T. mentagrophytes</i>	Pé esquerdo	Unha
DF05	<i>T. mentagrophytes</i>	SI	SI
DF06	<i>T. mentagrophytes</i>	SI	SI

**SI:** Sem identificação.

**Fonte:** Elaborada pelo autor (2021).

### 5.2.2 Reativação das amostras

Para reativação, os isolados fúngicos foram semeados em caldo glicosado. Após crescimento, foi efetuado repique para tubos de ensaio contendo ágar Sabouraud dextrose. Passado o período de desenvolvimento, as amostras foram semeadas em tubos de ágar Sabouraud dextrose + cloranfenicol, para obtenção de colônias puras. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente ( $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) até o surgimento de colônias isoladas.

### 5.2.3 Revisão taxonômica das amostras

Após confirmação da pureza, as amostras foram semeadas. Cada amostra foi repicada, em duplicata, para tubos de vidro contendo ágar Sabouraud dextrose a 2% e mantidas à temperatura ambiente ( $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), por 30 dias. Transcorrido esse período, aspectos macroscópicos e microscópicos foram observados e confrontados com os descritos em literatura especializada para a confirmação das espécies.

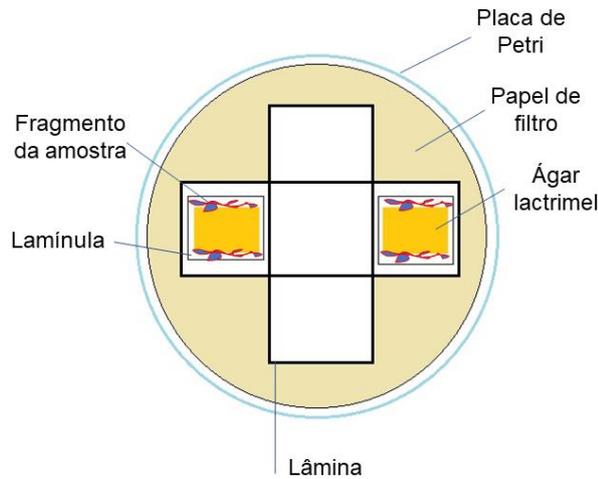
### 5.2.3.1 Características macroscópicas

Foram observadas características como anverso e reverso, textura, cor e pigmento das colônias, conforme descrito por Hoog et al. (2000); Lacaz et al. (2001) e Sidrim et al. (2003).

### 5.2.3.2 Características microscópicas

Para observação de estruturas vegetativas e reprodutivas, foram realizados microcultivos em meio ágar lactrimel, utilizando-se a técnica de Ridell (Lacaz et al., 2001). Para a realização do microcultivo, foram usadas quatro lâminas: três com função de sustentação para a quarta lâmina. Nesta última, foram aplicados dois pequenos cubos do meio em cada extremidade (**Figura 11**). Nas laterais dos blocos de ágar-lactrimel, foram inseridos, com auxílio de alça estéril, fragmentos das amostras recuperadas e acima destas, lamínulas de vidro. Todo o aparato foi elaborado sobre placas de Petri de vidro com papel de filtro ao fundo, umidificado com água estéril, para manter um ambiente propício para o desenvolvimento fúngico. As placas foram incubadas à temperatura ambiente a  $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  por cerca de 15 dias. Decorrido este tempo, a lamínula foi removida com uma pinça estéril, e em seguida, foi montada em nova lâmina para microscopia com duas gotas do corante lactofenol azul algodão previamente colocadas. As lâminas foram levadas ao microscópio óptico com aumento de 40x e os registros, depois de fotodocumentados, comparados com a literatura. Foram analisados o tipo de micélio, macroconídios (alongadas, clavadas, dilatadas, sésseis ou pedúnculos curtos), microconídios e formação de clamidósporo, seguindo os critérios adotados por Hoog et al. (2000), Sidrim; Meireles; Oliveira; Diógenes (2003), Lacaz et al. (2002), e Zaitz et al. (2010).

**Figura 11 - Representação da técnica de microcultivo para fungos filamentosos.**



**Fonte:** Elaborada pelo autor (2021).

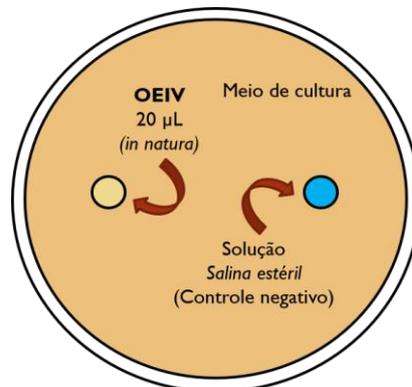
#### 5.2.6 Preparo do inóculo fúngico

Os dermatófitos foram subcultivados em tubos de ensaio contendo ágar batata dextrose e incubados a temperatura ambiente ( $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) por 10 dias, para atingirem um crescimento satisfatório. Transcorrido o período de incubação, as colônias foram cobertas com 5 mL de solução salina suplementada com Tween-80 a 1% e, em seguida, as culturas foram cuidadosamente esfregadas com auxílio de uma alça de platina para permitir a retirada de microconídios. Posteriormente, as suspensões produzidas foram transferidas com uma pipeta para um tubo estéril e homogêneas em vórtex por 15 segundos. Após agitação, cada suspensão teve sua turbidez ajustada com auxílio de um espectrofotômetro, até a absorbância estar compreendida numa faixa entre 0,08 e 0,13 em um comprimento de onda de 625 nm, equivalente a um tubo 0,5 na escala McFarland, o que corresponde a uma concentração de  $2 \times 10^6$  a  $5 \times 10^6$  microconídios/mL. Para a microdiluição em caldo, a suspensão foi diluída em 1:10 com salina estéril para obter um inóculo com concentração final entre  $2 \times 10^5$  a  $5 \times 10^5$  UFC/ mL, de acordo com o método “E.Def 11.0” para fungos dermatófitos (ARENDRUP et al., 2021).

### 5.2.7 Difusão em ágar

O método de difusão em ágar foi realizada através da técnica “*pour plate*”, conforme descrito por Reis (2011). Em placas de Petri estéreis, foram aplicados 2 mL das suspensões fúngicas padronizadas (0,5 de Mcfarland) e 20 mL de ágar Sabouraud dextrose fundido à uma temperatura entre 40 e 50°C, sendo em seguida, o sistema foi homogeneizado. Após solidificação do meio, foram realizadas duas perfurações utilizando-se ponteiras estéreis, onde foram aplicados 20 µL do OEIV puro (*in natura*) em uma cavidade e 20 µL de solução salina estéril (controle negativo) na outra. Depois desta etapa, as placas contendo os fungos dermatófitos foram armazenadas a 28°C ± 2°C por um período de sete dias em estufa microbiológica. Decorrido o período de incubação, os halos de inibição tiveram seus diâmetros (mm) medidos com auxílio de paquímetro pelo fundo da placa. A análise foi feita em duplicata para todas as amostras (**Figura 12**).

**Figura 12 - Representação esquemática do teste de difusão em ágar.**



**Fonte:** Elaborada pelo autor (2021).

### 5.2.8 Microdiluição em caldo

#### 5.2.8.1 Preparo do meio de cultura

Para o preparo do caldo RPMI, foram pesados 10,4 g do pó e em seguida, diluídos para 1000 mL de água de estéril em béquer autoclavado. Durante a transferência para novo béquer estéril, o meio foi sendo esterilizado em membrana millipore de 0,22 µm. Tanto o preparo quanto a esterilização do meio de cultivo foram realizados no momento do uso.

#### 5.2.8.2 Preparo do óleo essencial e antifúngicos

Inicialmente, pesou-se 0,1 g (100.000 µg) do OEIV em balança analítica. Em seguida, o óleo foi transferido para um tubo Falcon e misturado com 20 µL de Tween-80 (agente emulsificante), 100 µL DMSO e caldo RPMI em quantidades suficientes para 5 mL. A mistura resultante foi agitada numa velocidade de 3000 rpm por um período de 30 segundos em centrifuga, obtendo-se uma concentração final de 20.000 µg/mL.

O fármaco escolhido como controle positivo dos fungos filamentosos foi uma amostra comercial de cetoconazol. Para o preparo do CTC, o pó do fármaco, 200 mg (200.000 µg), foi triturado em almofariz e pistilo e depois diluído em 10 mL de DMSO, obtendo-se a concentração de 20.000 µg/mL (solução estoque). A partir desta, retirou-se um volume de 8 µL, completando-se o volume com caldo RPMI para 5 mL, chegando à concentração final de 32 µg/mL. As diluições de óleo e fármaco foram preparadas no momento do uso.

#### 5.2.8.3 Determinação da CIM

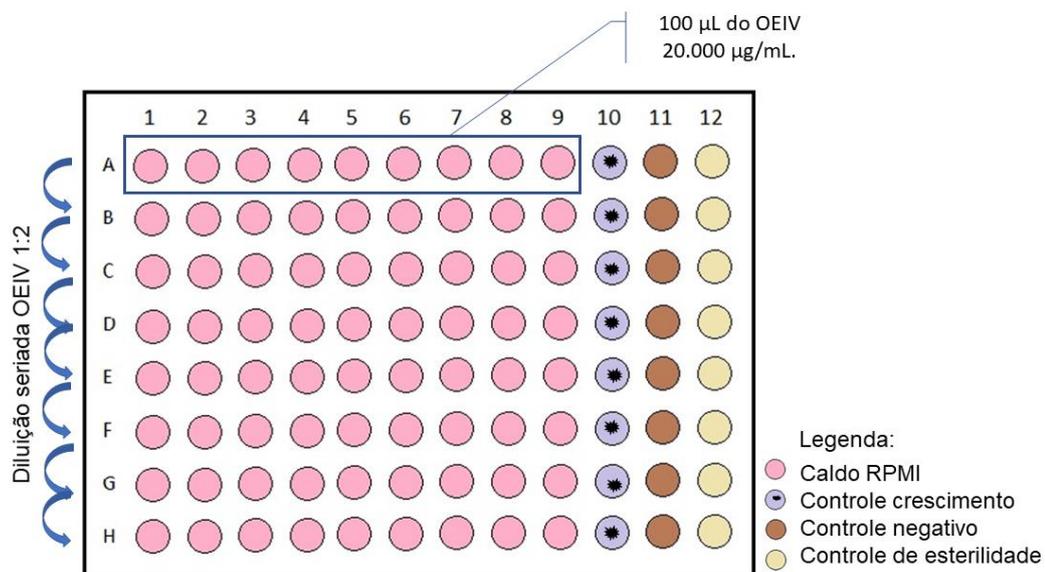
Em cada poço da placa foram adicionados 100 µL de caldo RPMI. Em seguida, 100 µL do OEIV 20.000 µg/mL foram aplicados nos poços da primeira linha da placa. Por fim, em cada poço foi aplicado 10 µL (dermatófitos) de inóculo fúngico, exceto naqueles em que foi feito o controle de esterilidade. Como as concentrações do OEIV e antifúngicos foram diluídas em série na razão de 1:2, tem-se que as concentrações do óleo testadas foram de 10.000 µg/mL, 5.000 µg/mL, 2.500 µg/mL, 1.250 µg/mL, 625 µg/mL, 312,5 µg/mL, 156,2 µg/mL, 78,1 µg/mL e para os antifúngicos de 16 µg/mL, 8 µg/mL, 4 µg/mL, 2 µg/mL, 1 µg/mL, 0,5 µg/mL, 0,25 µg/mL, 0,125 µg/mL, 0,0625 µg/mL, 0,0312 µg/mL, 0,0156 µg/mL e 0,0078 µg/mL. Os testes foram feitos em triplicata por amostra tanto para o OEIV quanto para o controle positivo.

Os controles do teste foram realizados em novas microplacas de microtitulação. Para o controle da viabilidade fúngica, foram colocados em cada cavidade da microplaca 100 µL do caldo RPMI e 10 µL do inóculo fúngico de cada amostra. No controle negativo, foram empregados caldo RPMI, Tween 80 e DMSO nas mesmas proporções empregadas para diluição do OEIV e inóculo. Já para o controle de esterilidade, foram colocados apenas 100 µL de caldo RPMI. Os controles

foram feitos em triplicata para cada amostra. A figura a seguir (**figura 13**), faz uma representação geral da realização do teste.

Após a aplicação, as microplacas e controles para os fungos filamentosos foram incubadas à temperatura ambiente ( $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) por um período de sete dias. A CIM foi definida como a menor concentração do OE ou do antifúngico capaz de inibir o crescimento do microrganismo.

**Figura 13 - Representação esquemática do teste de microdiluição em caldo para determinação da CIM do OEIV sobre fungos filamentosos.**



Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

#### 5.2.8.4 Determinação CFM

Para determinação da CFM do OEIV e CTC foram retiradas alíquotas em torno de 10 µL a partir dos poços em que não foi observado crescimento fúngico e transferidos cuidadosamente para nova microplaca contendo 100 µL de caldo RPMI, incubada em estufa a  $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 7 dias. A CFM foi considerada como a menor concentração em que não foi observado desenvolvimento do novo inóculo, dada ausência de turvação no meio, feita em triplicata por amostra.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Análise macroscópica

Os 10 frutos tomados para análise apresentaram número de folículos iguais a 8 (nº f.= 8), apresentando médias no comprimento folicular de 1,0-1,5 cm (FB 6ª ed.: 1-2 cm) e diâmetros de 2,5 a 3,4 cm (**Tabela 02**). A farmacopeia diferencia a espécie do principal adulterante (*Illicium anisatum* L.), por este apresentar folículos menores e mais ovalados, entretanto, a mesma não especifica o tamanho médio de seus folículos.

**Tabela 02 - Medida do tamanho dos folículos e dos frutos de amostra de *I. verum* comercializada em Maceió/AL (n=10).**

Fruto	nf	Tamanho folículo (cm)								Mf	DP	TF
		1	2	3	4	5	6	7	8			
I	8	0,8	1,2	1,4	1,3	1,3	1,3	1,2	1,2	1,2	0,18	3,0
II	8	1,0	1,2	1,1	0,9	1,3	1,0	0,9	1,3	1,1	0,16	2,5
III	8	1,0	1,5	1,4	1,4	1,4	1,5	1,5	0,9	1,3	0,24	3,4
IV	8	1,0	1,4	1,3	1,3	1,3	1,1	1,3	1,1	1,2	0,14	2,7
V	8	1,3	1,1	0,7	0,9	1,2	1,2	1,2	0,9	1,1	0,21	3,0
VI	8	1,0	1,6	1,7	1,7	1,7	1,6	1,5	1,2	1,5	0,26	3,2
VII	8	1,4	1,1	1,2	0,8	0,8	1,2	0,9	0,9	1,0	0,22	3,0
VIII	8	1,6	1,6	1,6	1,4	1,2	1,4	1,5	1,3	1,5	0,15	3,3
IX	8	0,9	1,2	1,0	1,2	1,3	1,0	1,0	1,3	1,1	0,16	2,6
X	8	1,4	1,2	1,3	1,2	1,5	1,2	1,0	1,0	1,2	0,18	3,3

**Legenda:** nf. = nº de folículos; DP= Desvio Padrão; Mf= Média folicular; TF= Tamanho do fruto.

**Fonte:** Elaborada pelo autor (2021).

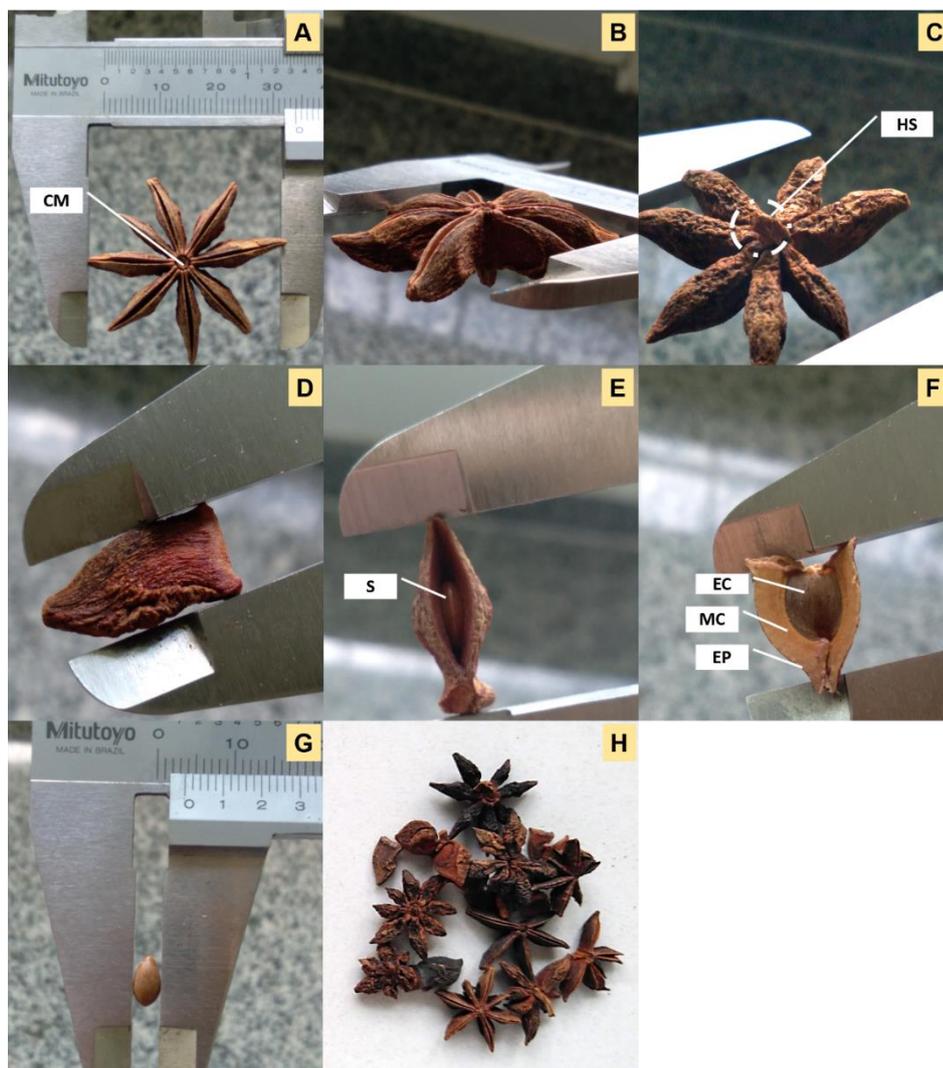
Cada folículo se conecta a uma região central, a columela (**Figura 14-A**), dando ao fruto o formato característico de estrela, conforme o nome popular sugere. Outras características macroscópicas relevantes, tais como o aspecto lenhoso, o que remete a tecidos vegetais mais duros, como madeira, forma careniforme, achatados lateralmente (**Figura 14-B e D**) também foram observados. Em suas extremidades, os folículos encerram-se em um ápice de forma arredondada ou também um pouco pontiaguda. Em cada folículo foi notada ora a presença ou ausência de sementes, sendo que estas eram de cor castanho-amarelada (**Figura 14-E e G**) e que se tratando de um material extremamente duro e oleoso, encontravam-se bem fixadas ao fundo de cada folículo ou eram facilmente removidas ao toque. Nos frutos em que houve a

formação de semente, observou-se a presença das três camadas correspondentes ao pericarpo: a mais externa, epicarpo, a intermediária, mesocarpo e camada de revestimento da semente, o endocarpo (**Figura 14-F**).

A cor dos frutos esteve em conformidade com a monografia: cor castanho-avermelhada, cujo aspecto sentido ao toque fora rugoso e de odor fortemente anisado. A amostra apresentou grande diversidade morfológica (**Figura 14-H**).

Portanto, a análise macroscópica demonstrou que a amostra estava de acordo com o padrão descrito pela farmacopeia.

**Figura 14 - Aspectos macroscópicos de amostra de *I. verum* comercializada em Maceió/AL. 14-A: Vista frontal do fruto. 14-B: Visão lateral do fruto. 14-C: Visão posterior do fruto. 14-D: Visão da região de compressão lateral. 14-E: Visão frontal do folículo. 14-F: Visão interna do folículo evidenciando suas camadas. 14-G: Visão da semente. 14-H: Espécimes de amostra de *I. verum*.**



**Legenda:** CM: Columela; HS: Pedúnculo; S: Semente; EC: Endocarpo; MC: Mesocarpo; EP: Epicarpo. **Fotos:** Autor (2021).

## 6.2 Análise microscópica

Os cortes transversais dos frutos mostraram que os folículos eram constituídos por epicarpo, mesocarpo e endocarpo (**Figura 15-A**). O epicarpo, composto por células contendo substância marrom-amarelada; o mesocarpo, constituído por células parenquimáticas, esclereídes e cavidades. O endocarpo é constituído por fibras alongadas transversalmente.

A comparação do material vegetal com a monografia apontou algumas semelhanças e diferenças na estrutura tecidual vegetal dos frutos de *I. verum*. Os cortes transversais feitos no folículo revelaram, no epicarpo, células poligonais, de coloração marrom e pouco espessas, conforme a monografia padrão. No mesocarpo foi reparada a presença de várias cavidades oleíferas, as quais a monografia da droga refere como espaços intercelulares em toda a extensão do mesocarpo.

As esclereídes, alongadas, cuja função é de sustentação, esteve presente no mesocarpo (**Figura 15-B**). Estes diferenciam-se do *I. anisatum* por serem, neste último, arredondadas. Na região mais profunda do mesocarpo, foi notada uma camada de células semelhante à do epicarpo. As últimas camadas de células do mesocarpo tornavam-se mais espessas, indo ao marrom escuro à medida que estavam mais próximas do endocarpo, conforme a farmacopeia. O endocarpo por sua vez, mostrou-se formado por células alongadas radialmente e paliçadas, caracterizadas, aqui, por conterem estruturas prismáticas semelhantes ao que a farmacopeia descreve como cristais de oxalato de cálcio (**Figura 15-C**).

Outro corte transversal ao fruto exibiu um canal para o feixe vascular, tecido que percorre a planta, cuja função é levar água e outros nutrientes por todo o material vegetal. Segundo a farmacopeia, os feixes vasculares apresentam-se no folículo no sentido axial. No entanto, o corte desvelou que os feixes, vindos da columela, na verdade apresentaram-se nos folículos no sentido radial (**Figura 15-D e E**).

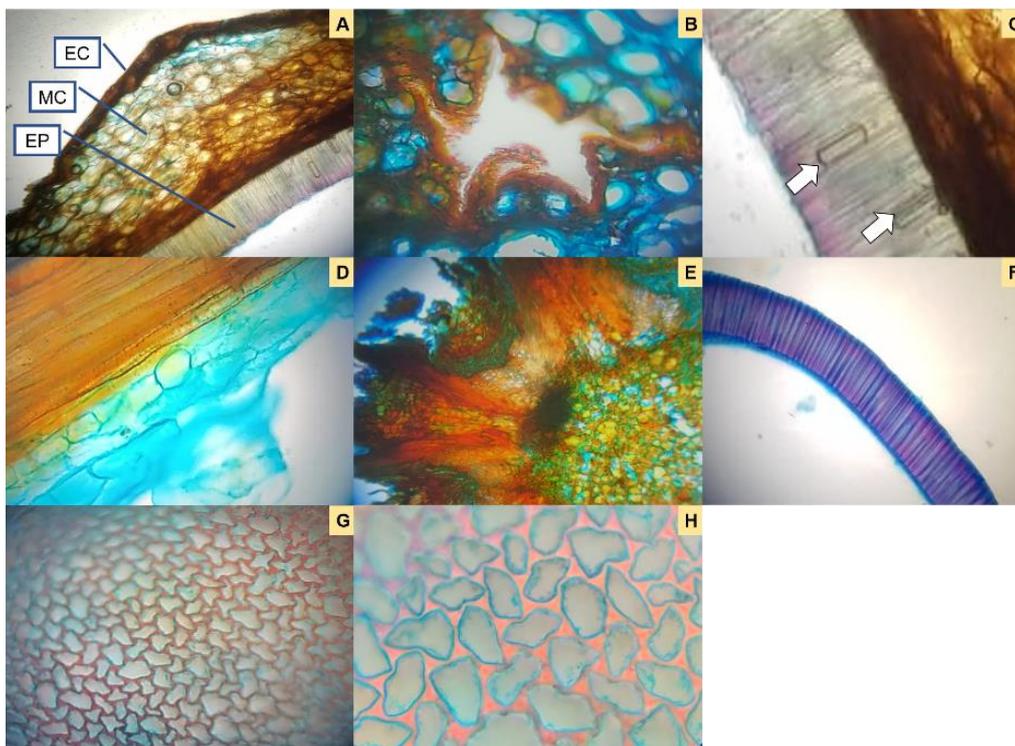
Outro dado relevante, é quanto à formação das camadas do pericarpo. Conforme relatado anteriormente, estas camadas podem ser observadas a olho nu e microscopicamente, estas podiam ser diferenciadas em folículos em que houve a formação das três camadas do pericarpo (situação 1) e de folículos em que não houve essa formação (situação 2), sendo que esta última não é descrita pela farmacopeia

(Figura 15-F, G e H). Este dado é importante para o controle de qualidade da referida droga vegetal, o que pode ser útil na sua caracterização.

O estudo de Macrini (2011) realizou apenas a análise macroscópica de duas amostras de anis-estrelado comercializadas em Diadema, sugerindo que os caracteres morfoanatômicos e ensaios fitoquímicos são suficientes para diferenciação por espécies adulterantes. Entretanto, ressalta-se aqui que a microscopia é o padrão ouro para a identificação inequívoca de qualquer espécie botânica, uma vez que, diferentes espécies do mesmo gênero podem assumir características macroscópicas semelhantes, o que pode gerar implicações graves para o consumidor, como riscos a sua saúde ao fazer consumo de droga vegetal diferente da referida para tratamento de determinada doença ou sintomatologia, causando outros sinais e sintomas.

Os dados obtidos pela microscopia mostraram ser de extrema relevância para a caracterização botânica da espécie, uma vez que não foram encontrados outros trabalhos na literatura nacional - à exceção da própria farmacopeia - que as descrevesse afim de comparação.

**Figura 15 - Aspectos microscópicos de amostra de *I. verum* comercializada em Maceió/AL. Cortes transversais: 15-A: pericarpo do fruto. 15-B: Esclereíde. 15-C: Células do endocarpo, com destaque para cristais de oxalato de cálcio. 15-D: Feixes vasculares. 15-E: região da columela; 15-F: Pericarpo que não formou camadas. 15-G,H: Células de preenchimento de pericarpo que não se desenvolveu.**



**Legenda:** EC; Epicarpo; MS: Mesocarpo; EP: Endocarpo

**Fonte:** Autor (2021).

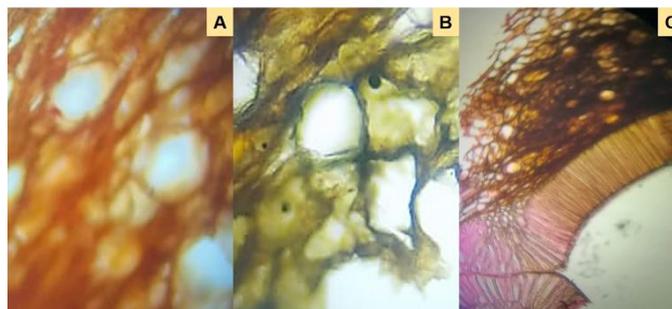
### 6.3 Testes histoquímicos

O teste para lipídeos totais foi confirmatório para os reagentes Sudan IV e black B, apresentando coloração alaranjada (**Figura 16-A**) e negro-azulada (**Figura 16-B**). A principal função de lipídeos nas plantas é a de reserva de energia para sobrevivência do vegetal, uma vez que esta classe de compostos provém da glicose produzida pela fotossíntese e defesa contra herbivoria. O corante permitiu deixar mais evidenciada a presença de cavidades, que levam a acreditar neste estudo, que se tratam de espaços dedicados ao armazenamento do óleo essencial, uma vez que, se encontram em grande quantidade no mesocarpo. Essas estruturas especializadas também estão envolvidas na estocagem de outros componentes do metabolismo secundário das plantas, como alcaloides e compostos fenólicos (VENTRELLA, VIEIRA, 2009).

O teste para o vermelho de rutênio foi positivo para a presença de pectina na amostra (**Figura 16-C**). A coloração característica se concentrou na camada do endocarpo do fruto. A pectina é uma macromolécula, um heteropolissacarídeo que contém resíduos de ácido galacturônico. Nos vegetais, possui função na adesão celular, firmando as células durante seu processo de crescimento e amadurecimento (PAIVA; LIMA; PAIXÃO, 2009). Como fibra solúvel, tem importante função na digestão, ajudando a hidratar o material fecal, facilitando sua eliminação, atuando como um laxante natural (ZANIN, 2020).

O reagente de Nadi, corante para terpenos, não apresentou coloração azul nos cortes, atestando a ausência deste grupo de compostos na amostra. Os testes para cloreto férrico e para cloreto de zinco iodado, assim como Nadi, também não acusaram a presença de compostos fenólicos e de amido na amostra.

**Figura 16 - Testes histoquímicos feitos em amostra de *I. verum* comercializada em Maceió. 16-A: Sudan IV. 16-B: black B. 16-C: vermelho de rutênio.**



Fotos: Autor (2021).

#### 6.4 Determinação de Matéria Estranha

O teor de matéria estranha da amostra esteve de acordo com o limite máximo de 2,0% (p/p) conforme a farmacopeia, sendo os valores de cada alíquota de 2,0%, 1,5% e 1,4% e média de  $1,6\% \pm 0,32$ . As principais ME encontradas se referiam ao item “a” preconizado pela farmacopeia: “partes do organismo ou organismos dos quais a droga deriva, excetuados aqueles incluídos na definição e descrição da droga”. Nesse item, se enquadraram as hastes do fruto seco (**Figura 17**), que por não manter relação com a atividade terapêutica da espécie é considerada como matéria estranha, uma vez que, a farmacopeia refere como droga vegetal apenas o fruto.

Em trabalho feito por Silva e colaboradores (2018), avaliando a qualidade de frutos secos de *I. verum* no nordeste brasileiro os teores médios de ME das quatro amostras avaliadas estiveram dentro do limite preconizado cujos teores variaram de  $0,33\% \pm 0,28$  a  $1,87\% \pm 0,84$ . Em Duarte (2009), a avaliação destes teores em amostras de anis-estrelado comercializadas no Distrito Federal, o teor de matéria estranha de 2 das 18 amostras (11%), não esteve em conformidade com a farmacopeia. Esse problema em relação a matéria estranha está relacionado a condições pós-colheita, denotando falta de cuidado na separação das partes não inerentes a droga durante o envasamento.

**Figura 17 - Matéria estranha encontrada em amostra de *I. verum* comercializada em Maceió.**



**Foto:** Autor (2021).

## 6.5 Determinação de Cinzas Totais

O teor de cinza após a incineração do pó de amostra de anis-estrelado teve teores por alíquota de 3,0%, 2,9% e 3,1% e teor médio de  $3,0\% \pm 0,10$  (% p/p), dentro do limite proposto pela farmacopeia. Vários materiais inorgânicos podem estar associados a contaminação da amostra, como: terra, caso o fruto tenha sido colhido diretamente do chão, pedras de tamanho reduzido, areia que pode ter se acumulado após a coleta ou no local de armazenamento de venda. O teor de cinzas indica que a droga não foi submetida a um processo adequado de limpeza durante seu processamento.

Tobias e colaboradores (2007), em execução do controle de qualidade de drogas vegetais de farmácias de manipulação em Maringá (PR), descrevem que de 96 amostras entre drogas vegetais e extratos secos 26 foram reprovadas, dos quais 15,4% pelo alto teor de matéria estranha ou cinzas, uma vez que farmácias de manipulação trabalham na maior parte com drogas pulverizadas, impossibilitando a averiguação de contaminantes a olho nu. O excesso deste material também não possui finalidade terapêutica. Logo, pode também ofertar riscos ao consumidor.

## 6.6 Extração do óleo essencial

A partir de 800 g da amostra foi obtida a captação de 50 mL de óleo essencial de anis-estrelado por hidrodestilação, cujo rendimento da extração foi de 6,25% (v/p). A farmacopeia brasileira prediz um valor mínimo de 7,0% (% v/p) de voláteis a partir de 20 g droga vegetal, o que corresponde em volume a 1,4 mL de óleo. Com base nesse cálculo, o volume teórico de voláteis esperado para extração deveria ser de 56 mL. O que poderia justificar esta variação no rendimento teórico *versus* rendimento real seria: tempo de extração, a utilização do aparelho de Clevenger em um sistema aberto, que permite que voláteis se percam durante o processo e/ou decréscimo na quantidade de voláteis da amostra antes dela ser adquirida.

Silva e colaboradores (2018), obtiveram rendimentos médios de 2,91%, 5,50%, 5,38% e 6,08% (%v/p) de óleo essencial de anis-estrelado, a partir de alíquotas de 20 g de droga/amostra, justificando que o baixo teor pudesse estar relacionado a condições inadequadas de armazenamento, visto que em feiras livres ou em

estabelecimentos comerciais sem controle de temperatura, que podem acarretar a perda de constituintes voláteis.

Existe a possibilidade de que os frutos que não desenvolveram as camadas do pericarpo não possuam óleo essencial ou o tenha em baixa quantidade, o que pode ser considerado como fator de influência no rendimento. No entanto, são necessários outros estudos que confirmem essa suposição.

### 6.7 Caracterização físico-química do óleo essencial de *I. verum*

O óleo (**Figura 18**) a temperatura ambiente apresentou-se como um líquido límpido, incolor, pouco viscoso que, sob refrigeração, assume forma sólida, devido ao baixo ponto de solidificação do anetol (<21°C), formando cristais. Em temperatura ambiente (25-30°C), os cristais tornaram-se mais evidentes à medida que o óleo retornava a forma líquida. O óleo possui odor anisado (característico do anetol), agradável e fresco. A densidade do óleo foi de 0,99 g/cm<sup>3</sup> (28±2°C), semelhante a densidade descrita para o anetol que é de 0,98 g/cm<sup>3</sup> (PUBCHEM, 2021) e inferior à da água (1,00 g/cm<sup>3</sup>).

**Figura 18 - Aspecto visual do óleo essencial extraído da amostra de *I. verum* comercializada em Maceió/AL.**

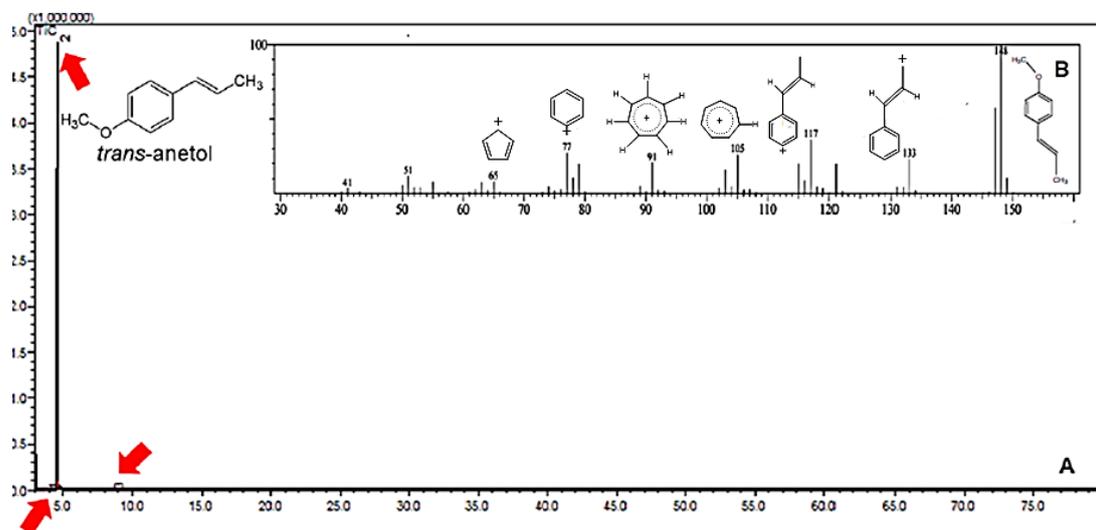


**Foto:** Autor (2021).

## 6.8 Cromatografia do óleo essencial de *I. verum*

A análise cromatográfica (**Figura 19**) do óleo essencial obtido da amostra indicou a presença de 3 constituintes: o anetol, betaistina e 3-Metilbenzotiofeno sendo o anetol o constituinte majoritário e os outros dois apresentados apenas como ruídos na linha de base no cromatograma. Maiores informações estão na tabela (**Tabela 03**).

**Figura 19 - Análise da composição química do óleo essencial extraído de amostra de *I. verum* comercializada em Maceió/AL por GC-MS. 19-A: Cromatograma; 19-B: razão  $m/z$  do componente identificado como anetol.**



Fonte: GC-MS, adaptada pelo autor (2021).

**Tabela 03 - Composição química do óleo essencial extraído de amostra de *I. verum* comercializada em Maceió/AL por GC-MS.**

Pico	Tempo de retenção (min)	Área (%)	Composto
1	3,808	0,07	Betaistina
2	4,573	99,90	Anetol
3	8,433	0,03	3- Metilbenzotiofeno
<b>Total</b>	-	100	3

Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

Conforme esperado, o anetol foi o principal componente do óleo essencial de anis-estrelado, estando em conformidade com a farmacopeia e estudos anteriores. A FB 6<sup>a</sup> ed., sugere um teor mínimo de 80% de anetol presente nos frutos. Nos resultados obtidos, o anetol ocupa praticamente toda a composição do óleo essencial.

A cromatografia ainda, ratificou a veracidade da amostra, uma vez que no adulterante, *I. anisatum* o teor de anetol não ultrapassa 3% (WANG et al., 2011) e da ausência de outros componentes como o metileugenol, metoximetileugenol, safrol, comuns a mesma espécie (COOK; HOWARD, 1966). Outros compostos de interesse como o limoneno, anisaldeído, estragol e  $\alpha$ -pineno não foram detectados. A ausência desses compostos também foi descrita por Destro (2019), em que foram observados apenas componentes como o estragol, o D-limoneno e feniculina.

O primeiro pico do cromatograma, referente à betaistina, trata-se de uma aminoalquilpiridina, substituída por um grupo 2-(metilamino) etil na posição 2. Não foram encontrados outros trabalhos na literatura que fizessem menção a presença deste composto no óleo essencial de anis-estrelado. A betaistina sintética é um composto utilizado na indústria farmacêutica na forma de sal para o tratamento de labirintite, uma vez que, como agente vasodilatador, melhora a sua microcirculação do labirinto, uma estrutura interna do ouvido responsável pelo equilíbrio (PUBCHEM, 2021). O detector do cromatograma pode tê-lo associado a outro composto cujo padrão *m/z* seja similar a este.

O pico de número 3, referiu-se ao 3-metilbenzotiofeno, um composto organossulfurado, composto caracterizado como poluente orgânico pode estar presente em combustíveis fósseis como carvão mineral, petróleo e gás natural. Por outro lado, compostos organossulfurados também fazem parte da composição de algumas espécies de famílias botânicas, tais como Amaryllidaceae, que são responsáveis por suas atividades bioativas e terapêuticas, a exemplo do *Allium sativum*, L. (Amaryllidaceae), o alho, cujo óleo essencial, rico em alicina, composto organossulfurado que possui forte ação hipotensora, reduzindo a pressão arterial (SAAD; LÉDA; SÁ; SEIXLACK, 2018). Entretanto, acredita-se que sua presença no cromatograma, tenha a mesma explicação que a do pico 1.

Com relação à literatura, em estudo feito por Gholivand e colaboradores (2009), foram separados e identificados 49 compostos presentes no óleo essencial de anis-estrelado, tendo como principais componentes o *trans*-anetol (81,40%), limoneno (6,0%), chavicol (2,10%) e anisaldeído (1,81%). Em outro experimento executado por Nam e colaboradores em 2017, foram identificados 14 compostos, com o *trans*-anetol assumindo 92,43% da composição total do óleo.

Dados da literatura reportam o  $\alpha$ -pineno (0,7-0,70%),  $\beta$ -mirceno (0,04-0,10%),  $\alpha$ -felandreno (0,24%),  $\delta$ -3-careno (0,21-0,46%), *para*-cimeno (0,20%), limoneno (2-4,34%), 1,8-cineol “eucaliptol” (0,40-0,47%),  $\alpha$ -terpineol (0,14%), 4-alilanisole “estragol” (0,38-2,0%), *para*-anisaldeído (1,84%),  $\alpha$ -copaeno (0,04-0,16%),  $\beta$ -cariofileno (0,20%), *trans*- $\alpha$ -bermagoteno (0,33-0,55%),  $\beta$ -bisaboleno (0,08-0,19%), 1-(3-metil-2-butenoxi)-4-(1-propenil)-benzeno (0,53-0,77%), 1-butanol (0,45%) e 4-metoxi-benzaldeído (0,39-0,80%) e o *trans*-anetol (89,19-91,32%) (NAM et al., 2017; LI et al., 2020) e *cis*-anetol (0,29%) (LI et al., 2020) da composição total, sendo então notada uma grande constância a composição do óleo essencial de *I. verum*.

Tem-se que a variação entre os componentes e até ausência destes no óleo essencial, possa estar relacionado ao período do ano (sazonalidade) que a espécie fora cultivada, o horário do dia em que foi feita a coleta (ritmo circadiano), tipo do solo e índice pluviométrico, pois são processos que influenciam no teor de metabólitos secundários (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). O processo de estabilização e/ou secagem, deve também ser considerado, visto que drogas aromáticas devem ser secas naturalmente à sombra em temperaturas amenas. O local de armazenamento no local de venda, deve estar em ambiente com controle de temperatura e ao abrigo da luz. Todos esses aspectos levam à perda de constituintes químicos, principalmente aos terpenos de menor peso molecular (mono- e sesquiterpenos), dada sua alta capacidade de volatilização.

## 6.9 Caracterização das amostras fúngicas

### 6.9.1 Macroscopia e Microscopia

Amostra DF01 (*M. canis*): Macroscopia; colônia de textura cotonosa, superfície pregueada. Cor bege e reverso alaranjado com algumas ranhuras (**Figura 20**). Microscopia: muitos macroconídios fusiformes (forma de folha ou naveta), afilados nas pontas, com paredes espessas contendo em média 6-9 células. Raros microconídios. Presença de hifas hialinas septadas, algumas com núcleo (1 por célula), com micélio abundante (**Figura 21**).

Amostra DF02 (*T. rubrum*): Macroscopia; colônia de textura cotonosa, superfície apiculada. Cor branca e reverso marrom-escuro (**Figura 20**). Microscopia: extenso emaranhado de hifas hialinas e microconídios em forma de pequenos balões

ligados por pedúnculos às hifas, que poderiam estar dispostas em cachos simples e charutoides (septados, 3-4 células). Raros macroconídios (**Figura 22**).

Amostra DF03 (*T. tonsurans*): Macroscopia; colônia de textura cotonosa, superfície sulcada. Cor branca e reverso amarelo claro (**Figura 20**). Microscopia: Presença de clamidósporos catenulados. Grande quantidade de microconídios em forma de gota. Poucos microconídios em formato de charutoide e de lápis (**Figura 23**).

Amostra DF04 (*T. mentagrophytes*): Macroscopia; colônia de textura algodonosa, superfície plana. Cor branca e reverso amarelo (**Figura 20**). Microscopia: hifas hialinas. Hifas em formato de espiral ou gavinha ausentes. Presença de microconídios globosos e em formato de baqueta e septados (**Figura 24**).

Amostra DF05 (*T. mentagrophytes*): Macroscopia; Colônia de textura pulverulenta, superfície umbilicada, bordo. Cor branco e reverso marrom (**Figura 20**). Microscopia: microconídios globosos e em formato de pequenas gotas. Hifas em aglomerados densos e em gavinhas. Muitos clamidósporos (**Figura 25**).

Amostra DF06 (*T. mentagrophytes*): Macroscopia; Colônia de textura pulverulenta, superfície cerebriforme. Cor branca e reverso vermelho sangue (**Figura 20**). Microscopia: Aglomerado de microconídios. Raros macroconídios em formato charutoide e em formato de lápis. Numerosos microconídios em formato piriforme e hifas cenocíticas (**Figura 26**).

Macroscopicamente, a caracterização de uma colônia tem como intuito ajudar a elucidar determinada espécie fúngica. Isto nada mais é do que fazer um apanhado de características subjetivas, de caráter fenotípico relacionadas a determinada espécie. Alterações na forma estão ligadas a uma tentativa de adaptação do fungo aos meios biótico e abiótico onde a colônia está inserida. Não é incomum que características clássicas não se manifestem e levem à conclusão equivocada de outra espécie que não tenha nenhuma relação com os achados (SIDRIM; BRILHANTE; ROCHA, 2003). Com base nisso, a leitura microscópica tornou-se essencial para a confirmação das espécies abordadas neste estudo, uma vez que se tornou bastante arbitrária distingui-las apenas utilizando um único aspecto.

A macroscopia para a amostra DF01, *M. canis*, apresentou caracteres já descritos para a espécie, como o aspecto pregueado da superfície e coloração laranja intenso no reverso da colônia e ranhuras. Ao microscópio, diferencia-se de *N. gypsea* por esta última conter pouco micélio delgado. O formato dos macroconídios também é bastante distinto; em *N. gypseum* eles possuem o formato elipsoide, cujas

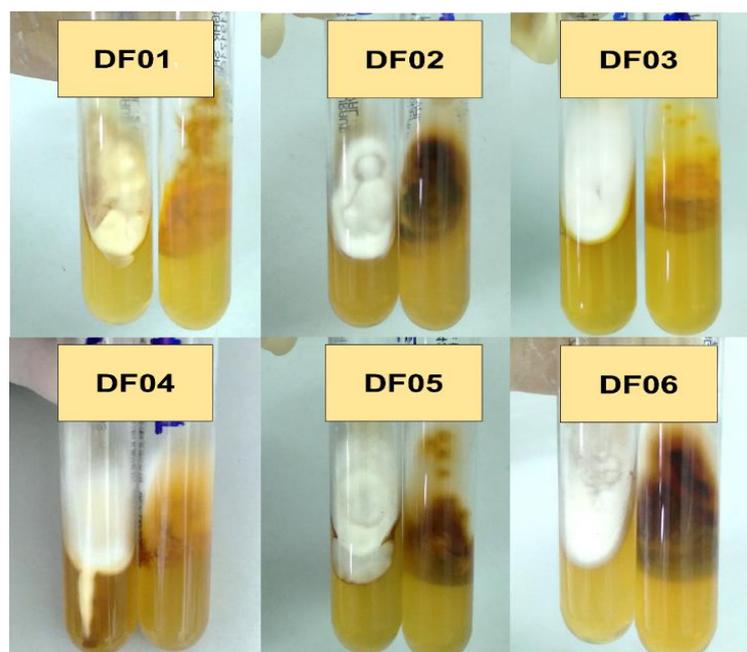
extremidades são ligeiramente arredondadas, com numerosos microconídios (FUENTEFRIA et al., 2019)

De acordo com os resultados apresentados, a avaliação dos aspectos microanatômicos permitiu auxiliar a identificação das amostras. Entretanto, ressalta-se que este grupo de fungos também apresenta aspectos semelhantes entre si nesta dimensão, principalmente para espécies do gênero *Trichophyton* spp. A exemplo, tem-se as amostras DF02 e DF03, que exibiram caracteres microscópicos comuns, como as hifas e microconídios em forma de gota, sendo que em *T. rubrum*, estes são ligeiramente alongados, dando a estes o aspecto de balão.

Ainda de acordo com os resultados, foi observada variação microscópica entre isolados de uma mesma espécie. As amostras DF04 e DF05, evidenciaram características clássicas para *T. mentagrophytes*. A amostra DF06, apresentou características que de acordo com Sidrim et al. (2003) e Bonifaz (2012), são similares a *T. interdigitale*, incluso o pigmento do reverso da colônia observado na análise. Essa última característica citada é descrita principalmente para *T. rubrum*, que aqui mostrou coloração diferente.

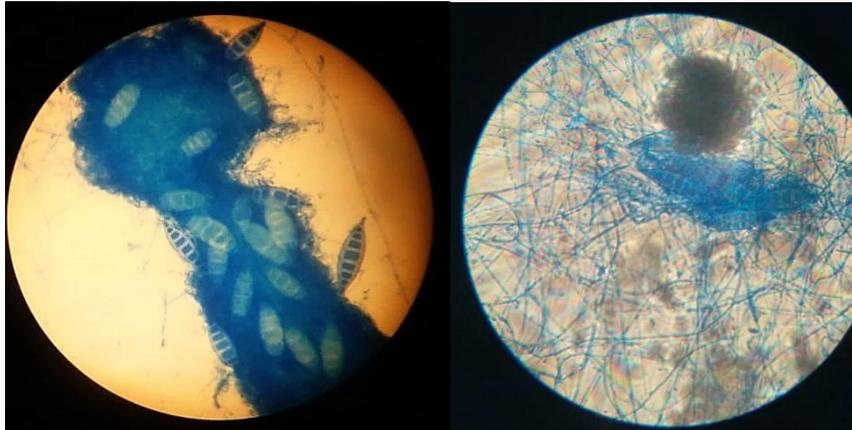
Outros fatores que também podem influenciar as características macro- e microscópicas destes microrganismos, além do polimorfismo já citado, são o meio de crescimento escolhido para o cultivo e o estágio de desenvolvimento da colônia.

**Figura 20 - Aspectos macroscópicos de amostras clínicas de dermatófitos isoladas.**



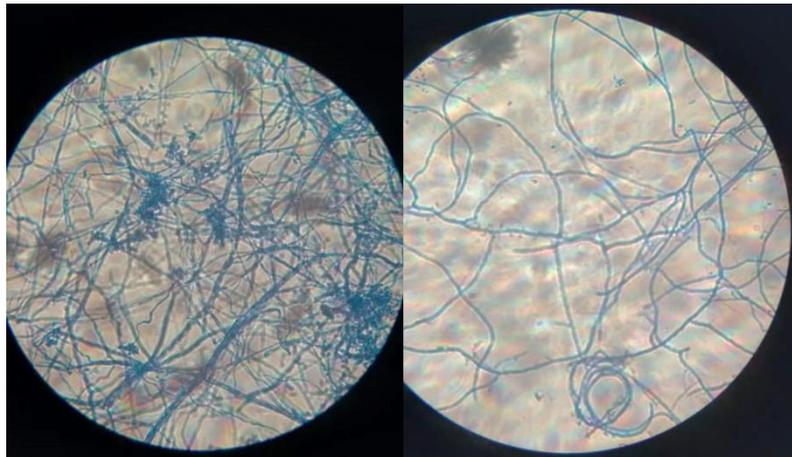
**Fotos:** Autor (2021).

**Figura 21 - Aspectos microscópicos da amostra DF01.**



**Fotos:** Autor (2021).

**Figura 22 - Aspectos microscópicos da amostra DF02.**



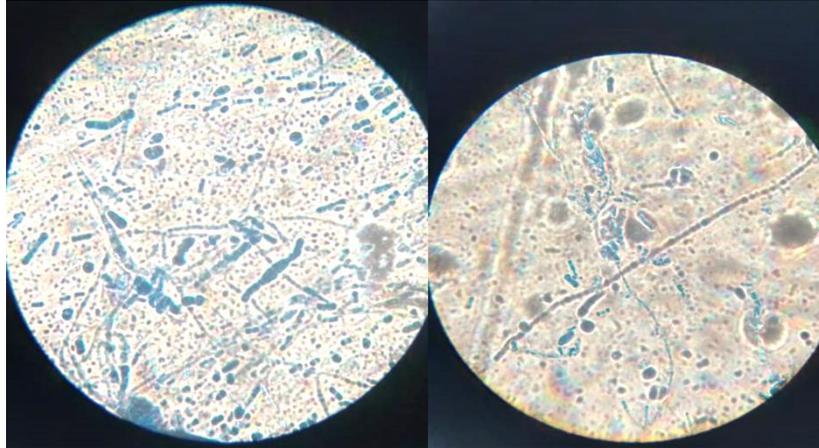
**Fotos:** Autor (2021).

**Figura 23 - Aspectos microscópicos da amostra DF03.**



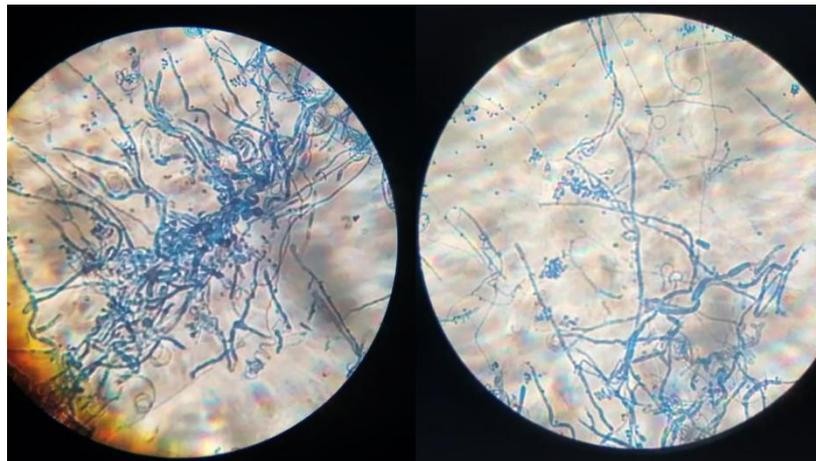
**Fotos:** Autor (2021).

**Figura 24 - Aspectos microscópicos da amostra DF04.**



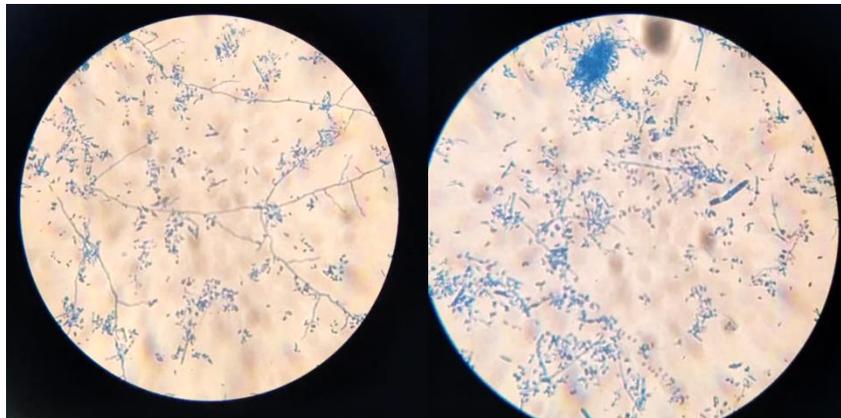
**Fotos:** Autor (2021).

**Figura 25 - Aspectos microscópicos da amostra DF05.**



**Fotos:** Autor (2021).

**Figura 26 - Aspectos microscópicos da amostra DF06.**



**Fotos:** Autor (2021).

### 6.10 Teste de difusão em ágar (técnica *pour plate*)

Os resultados estão expressos na tabela a seguir (**Tabela 04**):

**Tabela 04 - Médias das zonas de inibições do OEIV *in natura* sobre isolados clínicos de dermatófitos.**

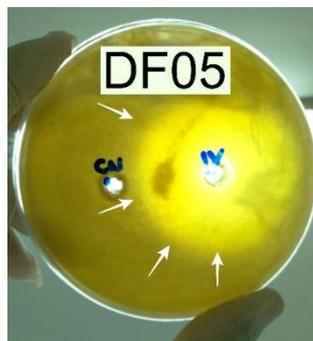
Amostra	Zona de inibição* (mm)
DF01	30,0
DF02	31,5
DF03	35,5
DF04	30,0
DF05	52,5
DF06	13,0

**Legenda:** média de duas medições\*

**Fonte:** Elaborada pelo autor (2021).

De acordo com os resultados, a média dos halos de inibição para os fungos filamentosos foi de 32,1 mm. A amostra DF05 foi a mais sensível do teste, cujo valor de média foi de 52,5 mm (**Figura 27**) e a menor, DF06 com 13,0 mm.

**Figura 27 - Halo de inibição formados pelo OEIV *in natura* pelo teste de difusão ágar sobre amostra DF05. As setas indicam a região do halo formado.**



**Legenda:** CN: controle negativo/ IV: *Illicium verum*.

**Foto:** Autor (2021).

Para Pereira (2009), os valores médios da zona de inibição para amostras de *T. mentagrophytes* e *T. rubrum* foi de 25 mm de diâmetro, dada atividade do OE de *Cymbopogon winterianus*. Em Reis (2011), observou-se que o óleo essencial de *Rosa*

*alba* produziu halos de inibição em todos os ATCCs de amostras padrão, tal como se segue: *M. nanum* (29,80 mm), *T. mentagrophytes* (29,80mm), *T. rubrum* (24,40mm), *T. tonsurans* (21,85 mm).

Mais recentemente Parrish e colaboradores (2020), fizeram um estudo mais abrangente, em que testaram 65 óleos essenciais e misturas em 16 amostras de cepas e isolados clínicos dos gêneros *Trichophyton* spp. e *Microsporum* spp. por meio do teste de difusão em disco com alterações. Os óleos mais potentes que mostraram inibição completa após uma única exposição ao longo do teste (21 dias), foram os óleos de cássia, coentro, orégano, tomilho e canela. Para tais óleos, a inibição total foi observada para os dois gêneros, espécies e cepas testadas. Já os OEs de litsea, rosa e murta-limão demonstraram inibição completa de todo o crescimento, inicialmente para todos os gêneros, espécies e cepas testadas, ressurgindo ao 21º dia do período de incubação nas margens extremas das placas de ágar para algumas espécies com zonas médias de inibição consideradas muito grandes, variando de 79,4 mm para rosa a 74,8 e 74,1 mm para litsea e murta-limão, respectivamente. Com relação à sensibilidade fúngica por gênero, espécies de *Microsporum* spp. foram as que mostraram maior susceptibilidade aos óleos, com 28,6% das zonas de inibição com 80 mm contra 20,1% das cepas do gênero *Trichophyton* spp.

O teste de difusão em ágar é uma análise qualitativa e que serve para estimar a susceptibilidade de um microrganismo a partir de quantidade conhecida de uma determinada droga ou extrato, avaliando a sua capacidade de inibição. Essa triagem preliminar possui grande aplicação principalmente em produtos naturais, pois a partir da aferição dos seus resultados, pode-se então, dar sequência a avaliações mais aprofundadas acerca de outras informações importantes do produto ao qual se está testando, a exemplo da obtenção da CIM (PEREIRA, 2009).

Os resultados obtidos com o OEIV *in natura* mostram que ele foi eficaz na inibição do crescimento dos dermatófitos. Isto confirmou que o anetol, constituinte preponderante do OEIV, possui ação antifúngica. Ademais, não foram encontrados até o momento na literatura, testes de difusão em ágar do OEIV em fungos dermatófitos para melhor efeito comparativo. Assim, os dados apresentados contribuem para o conhecimento das propriedades do referido óleo neste grupo de microrganismos.

### 6.11 Determinação da CIM e CFM

Os resultados da microdiluição em caldo (CIM e CFM), do óleo essencial de *I. verum* e do controle positivo, estão representados na tabela 05:

**Tabela 05 - Concentrações inibitórias e fungicidas mínimas do óleo essencial de amostra de *I. verum* e do controle positivo sobre isolados clínicos de dermatófitos.**

Substâncias testadas ( $\mu\text{g/mL}$ )		Amostra					
		DF01	DF02	DF03	DF04	DF05	DF06
OEIV	CIM	2.500	NI	5.000	2.500	78,1	10.000
	CFM	2.500	NI	5.000	2.500	625	10.000
CTC	CIM	4	4	4	4	4	8
	CFM	4	4	4	4	4	8

**Legenda:** NI = Não Inibiu; CTC= Cetoconazol.

**Fonte:** Elaborada pelo autor (2021).

De acordo com os dados da tabela acima, observou-se que o óleo apresentou atividade em cinco das seis amostras de dermatófitos avaliadas. Sendo a concentração inibitória mínima mais alta de 10.000  $\mu\text{g/mL}$  para a amostra DF06 e menor de 78,1  $\mu\text{g/mL}$  para outra amostra DF05. As amostras de DF01, DF03 e DF04, tiveram concentrações inibitórias mínimas de 2.500  $\mu\text{g/mL}$ , 5.000  $\mu\text{g/mL}$  e 2.500  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Já as CFM, mantiveram-se iguais às concentrações de CIM, à exceção da amostra DF05 que foi de 625  $\mu\text{g/mL}$ . Os controles positivos, de crescimento e o de esterilidade estiveram conforme o esperado para todas as amostras.

Poucos estudos encontrados na literatura descrevem a atividade antifúngica do óleo essencial de *I. verum* em dermatófitos. A atividade do óleo essencial anisestrelado e do seu componente majoritário, o anetol, foram comparadas *in vitro* por Nardoni e colaboradores (2015a). O óleo essencial, testado em *M. canis*, *M. gypseum*, *T. mentagrophytes*, *T. terrestre* e *T. erinacei* apresentou CIM/CFM de 3%/7,5% 1%/2% 2%/2,5% 1,5%/5% e 3,5%/5% respectivamente, enquanto que o *trans*-anetol mostrou CIM/CFM respectivo de 1%/5%, 1%/>10%, 2,5%/>10%, 2,5%/>10% e 2,5%/>10%,

inferior a atividade do óleo de *Foeniculum vulgare* (escalas de CIM de 0,25-3% e CFM de 1,5-3%), que assim como o *I. verum*, tem como componente majoritário o *trans*-anetol. Ambos mostraram atividade superior ao do óleo de *Cinnamomum zeylanicum* Blume “canela-da-índia” (Lauraceae) (escalas de CIM de 4,5-7,5% e CFM de 5->10%), cujos principais componentes são o eugenol e o isoeugenol, dois fenilpropenos.

Em contrapartida, também em Nardoni e colaboradores (2015b), a testagem sobre um isolado de *M. canis* mostrou que o OEIV apresentou melhor atividade tanto inibitória quanto fungicida se comparado ao óleo de *F. vulgare* que foi de 2% (CIM) e 2,5% (CFM), contra CIM/CFM de 2,5%/3% de *F. vulgare*). Uma comparação também feita com o anetol, mostrou que o óleo possuiu melhor ação fungicida, uma vez que o anetol teve uma CFM de 5%. Já Mugnaini e colaboradores (2012) avaliaram a atividade antimicótica do óleo em onze isolados de *M. canis* em gatos. Os resultados mostrados confirmaram a atividade do OEIV em 10 de 11 isolados, com concentrações inibitórias de 1-5% e fungicidas 2,5-7,5% e um ID<sub>50</sub> de 1,75%.

Pereira (2009), testou a atividade antifúngica do óleo essencial das folhas *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor “Citronela” sobre dermatófitos do gênero *Trichophyton*. A composição química do óleo feita por GC-MS, mostrou 18 componentes do óleo, sendo os principais o citronelal, geraniol e citronelol. A CIM para as cepas testadas foi 312 µg/mL e CFM de 2.500 µg/mL para 92% das amostras testadas. Sabe-se que, monoterpénoides como o citronelal, geraniol e citronelol possuem propriedades antimicrobiana, incluso antifúngicas, ratificadas pelo autor.

Em estudo de Dzamic e colaboradores (2009), o óleo essencial de anis-estrelado e o de *Eugenia caryophyllata* Thunb “cravo-da-índia” (Myrtaceae), foram testados em cepas de dezenove fungos, incluso *T. mentagrophytes* e na levedura *C. albicans*. O óleo essencial de anis-estrelado apresentou CIM/CFM de 5µLmL<sup>-1</sup>/10µLmL<sup>-1</sup> contra 0,5 µLmL<sup>-1</sup>/0,5 µL/mL<sup>-1</sup> do óleo de cravo, para *T. mentagrophytes*. Para *C. albicans*, a CIM/CFM do OEIV foi de 5 µLmL<sup>-1</sup>/5 µLmL<sup>-1</sup> e para *E. caryophyllata* de 0,5 µLmL<sup>-1</sup>/1 µLmL<sup>-1</sup>. Para espécies do gênero *Aspergillus spp.*, o OEIV apresentou atividade inibitória na escala de 10-20 µL/mL e fungicida de 15-25 µL/mL.

O óleo essencial de *Pimenta pseudocaryophyllus* “craveiro”, apontou CIM de 250 µg/mL sobre ATCC de *T. mentagrophytes*, *M. canis* e *M. gypseum* e CFM de 1000, 250 e 1000 µg/mL, respectivamente, conforme Baptista (2015), sendo estes

valores superiores se comparados com o marcador químico do óleo, o eugenol, que tiveram CIM de 31,25 µg/mL-125 µg/mL e CFM de 62,5 µg/mL-125 µg/mL. A autora ainda justifica essa discrepância da substância isolada *versus* óleo, devido ao antagonismo dos componentes do próprio óleo, uma vez que o mesmo teve o teor de eugenol ajustado para 100%, ressaltando a partir daí, a necessidade de outros constituintes químicos para a atividade. Destaca-se que o eugenol assim como o anetol, trata-se de um fenilpropanoide, que apresenta um grupo hidroxila na sua estrutura, conferindo-lhe várias atividades como por exemplo, antioxidante, antibacteriana e anti-inflamatória.

Para o controle positivo, cetoconazol, este encontrou-se na faixa de CIM/CFM de 4 µg/mL para 83,3% das amostras. A amostra DF06 mostrou inibição pelo fármaco em doses maiores (8 µg/mL), o que correspondeu a 16,7%. Em Pereira (2009), 11 das 16 amostras de *T. rubrum* (68,75%), apresentaram CIM e CFM 156 e 2.500 µg/mL; tal qual para 5 das 8 amostras de *T. mentagrophytes* (62,5%) tiveram as mesmas concentrações. Já para Baptista (2015), a uma linhagem de *T. mentagrophytes* teve CIM/CFM de 2,00 µg/mL e para *M. canis* de 0,06 e 0,12 µg/mL, respectivamente.

Em Magagnin e colaboradores (2011) as médias geométricas da CFM do cetoconazol, fluconazol e itraconazol demonstraram altas doses desses antifúngicos para se alcançar o efeito fungistático. O mesmo estudo ainda aponta a dificuldade na terapêutica de pacientes imunocomprometidos, pois no total de casos avaliados, 53,8% tiveram resistência para cetoconazol, 100% para fluconazol e 42,3% para o Itraconazol. Todos esses fatores de susceptibilidade antimicrobiana tem uma relação intrínseca entre microrganismo x hospedeiro x fármaco, dadas as características peculiares a cada um.

Óleos essenciais cujo perfil químico é mais diversificado apresentam melhor atividade do que outros em que alguns componentes estejam ausentes ou em menor quantidade. Estudos como o de Kurita & Koike (1983) e de López et al. (2004) sugerem que a atividade antifúngica de um OE aumenta neste sentido: hidrocarbonetos<ésteres<cetonas<aldeídos<álcoois<fenóis, o que corrobora com o estudo de Pizzolitto et al. (2020), no qual a atividade de óleos essenciais em *Fusarium verticillioides*, foi mais evidenciada em óleos que continham maior quantidade de compostos fenólicos e outros grupos oxigenados, como sesquiterpenoides,

compostos cíclicos/bicíclicos e aldeídos, fundamentada através da sua relação estrutura-atividade (QSAR).

A atividade antifúngica do óleo essencial de anis-estrelado é relacionada aqui com o anetol, corroborando com resultados prévios existentes na literatura. Entretanto, vale ressaltar que a CIM - faixa de 10.000-78,1 $\mu$ g/mL - pode ter sido influenciada pela ausência de outros componentes majoritários do óleo essencial, e, que por efeito sinérgico, poderiam melhorar a ação do anetol. Isso também justificaria a ausência do efeito antimicótico na amostra DF02, sendo essa capacidade de inibição observada apenas pelo teste de difusão com o óleo concentrado. Sendo assim, destaca-se o quão é fundamental a presença de outros componentes nos óleos essenciais, tal qual no OEIV como: mono- e sesquiterpenoides além de outros derivados fenilpropanoídicos oxigenados já mencionados aqui anteriormente (**Figura 04**).

## 7 CONCLUSÕES

Os resultados desta pesquisa deixam uma contribuição para o controle de qualidade de drogas vegetais, uma vez que, são poucos os estudos sobre este tema aplicados a amostras comercializadas como “anis-estrelado” no Brasil. A amostra atendeu aos critérios macroscópicos e de pureza especificados pela farmacopeia brasileira. Os dados microscópicos foram essenciais para a validação botânica dos frutos secos de *I. verum*, sugerindo que esta seja a primeira relatada na literatura nacional, o que poderá servir como material de apoio para estudos futuros com a espécie. O óleo apresentou um elevado grau de pureza, devido a mais de 99% da composição química corresponder a uma única substância, o anetol.

No que se refere a atividade antifúngica do óleo frente aos microrganismos avaliados, o OEIV mostrou possuir tais propriedades, como já corroborado, devido ao anetol. Entretanto, a atividade inibitória do óleo sobre o desenvolvimento fúngico à altas concentrações apuradas pelo teste de microdiluição foi justificada pela ausência de outros componentes já descritos para o óleo e que aqui não foram evidenciados pela análise cromatográfica. Isto ressalta a importância de outras substâncias para o incremento da atividade biológica em extratos vegetais.

## REFERÊNCIAS

- ABRAMS, B. B.; HÄNEL, H. H.; HOEHLER, T. Ciclopirox olamine: A hydroxypyridone antifungal agent. **Clin Dermatol**, United States, v. 9, n. 4, p. 471-7, Oct./Dec. 1991. DOI 10.1016/0738-081X(91)90075-V. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0738-081X\(91\)90075-V](https://doi.org/10.1016/0738-081X(91)90075-V). Acesso em: 11 jul. 2020.
- ANSARI, S.; AHMADI, B.; NOROUZI, M.; ANSARI, Z.; AFSARIAN, M. H.; LOTFALI, E. et al. *Epidermophyton floccosum*: nucleotide sequence analysis and antifungal susceptibility testing of 40 clinical isolates. **J Med Microbiol**, England, v.68, n. 11, p.1655-63, Oct. 2019. DOI 10.1099/jmm.0.001074. Disponível em: [https://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/jmm/68/11/1655\\_jmm001074.pdf?expires=1626916165&id=id&accname=guest&checksum=24370B6F783461F766565F716BAF9EC5](https://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/jmm/68/11/1655_jmm001074.pdf?expires=1626916165&id=id&accname=guest&checksum=24370B6F783461F766565F716BAF9EC5). Acesso em: 21 jul. 2021.
- ARAÚJO A. B. C.; DIAS, A. J. S.; FREITAS, R. L. S.; NUNES, A. R.; SILVA, G. A.; SANTOS, D. C. Prospecção química e avaliação da atividade biológica da própolis de Salinópolis, Pará. **Rev Virtual Quim**, Brasil, v 12, n. 2, p. 492-9, abr. 2020. Disponível em: <http://static.sites.s bq.org.br/rvq.s bq.org.br/pdf/v12n2a18.pdf>. Acesso em: 24 abr. 2021.
- ARENDRUP; M. C. KAHLMETER, G.; GUINEA, J.; MELETIADIS, J.; EUCAST. How to: perform antifungal susceptibility testing of microconidiaforming dermatophytes following the new reference EUCAST method E.Def 11.0, exemplified by *Trichophyton*. **Clin Microbiol Infect**, England, v. 27, n. 1, p. 55-60, 2021. DOI 10.1016/j.cmi.2020.08.042. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.08.042>. Acesso em: 11 jul. 2021.
- ASIF, M.; YEHYA, A. H. S.; AL-MANSOUB, M. A.; REVADIGAR, V.; EZZAT, M. O.; AHAMED, M. B. K. et al. Anticancer attributes of *Illicium verum* essential oils against colon cancer. **S Afr J Bot**, South Africa, v. 103, p. 156-61, Mar. 2016. DOI 10.1016/j.sajb.2015.08.017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2015.08.017>. Acesso em: 9 jun. 2020.
- AZULAY, R. D.; AZULAY, D. R.; ABULAFIA-AZULAY, L. (Org.). **Dermatologia**. 6. ed. Rio de Janeiro, 2015. 1156 p.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food Chem Toxicol**, England, v. 46, n. 2, Feb. 2008, p. 446-475. DOI 10.1016/j.indcrop.2014.05.055. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.05.055>. Acesso em: 7 Jul. 2020.
- BAPTISTA, E. B. **Estudo de estabilidade e eficácia de formulação tópica fitoterápica para tratamento de dermatofitose animal**. 2015. 171 f. Tese (Doutorado em Saúde) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, 2015. Disponível em: <https://repositorio.ufjf.br/jspui/bitstream/ufjf/1123/1/edilenebolutaribaptista.pdf>. Acesso em: 9 de jul. 2021.
- BARROSO, L. C. **Perfil etio-epidemiológico das dermatofitoses em pessoas atendidas em um Serviço Público de Micologia de Manaus/AM e investigação das possíveis fontes de infecção**. 2017. 84 f. Dissertação (Mestrado em Saúde

Pública), Instituto Leônidas e Maria Deane, Fundação Oswaldo Cruz, Manaus, 2017. Disponível em:

<https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/iciict/26559/2/Disserta%C3%A7%C3%A3o%20Layssa%20Barroso.pdf>. Acesso em: 8 dez. 2020.

BOOTAM, T.; REHMAN, R.; MUSHTAQ, A.; KAZERROONI, E. G. Star Anise: A review on benefits, biological activities and potential uses. **IJCBS**, v.14, p. 110-14, 2018. Disponível em: <http://www.iscientific.org/wp-content/uploads/2019/10/13-IJCBS-18-14-13-1.pdf>. Acesso em: 6 Jun 2020.

BONIFAZ, A. Dermatofitosis. *In*: BONIFAZ, A. **Micologia médica básica**. 4. ed. México D. F.: McGraw-Hill Interamericana, 2012. cap. 7, p. 93-134.

BRAGA, F. C. Pesquisa Fitoquímica. *In*: LEITE, J. P. V. **Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas**. São Paulo: Editora Atheneu. 2009. cap. 4, p. 99-118.

BRANDELLI, C. L. C. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. *In*: MONTEIRO, S. C.; BRANDELLI, C. L. C. **Farmacobotânica: aspectos teóricos e aplicação**. Porto Alegre: Artmed, 2017. cap. 11, p. 125-34.

\_\_\_\_\_. Introdução a fitoterapia: conceitos e definições. *In*: MONTEIRO, S. C.; BRANDELLI, C. L. C. **Farmacobotânica: aspectos teóricos e aplicação**. Porto Alegre: Artmed, 2017. cap. 9, p. 97-107.

BRASIL. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Farmacopeia Brasileira, volumes 1 e 2. 6ª Ed. Brasília: ANVISA, 2019.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. **Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos** Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 60 p. Disponível em: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica\\_nacional\\_fitoterapicos.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_nacional_fitoterapicos.pdf). Acesso em: 15 jun. 2020.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. **Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na atenção básica**. Brasília: Ministério da Saúde, 2012. (Série A. Normas e Manuais Técnicos) (Cadernos de Atenção Básica; n. 31). 156 p. Disponível em: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/praticas\\_integrativas\\_complementares\\_plantas\\_medicinais\\_cab31.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/praticas_integrativas_complementares_plantas_medicinais_cab31.pdf). Acesso em: 06 fev. 2021.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Práticas Integrativas e Complementares (PICS): quais são e para que servem. Disponível em: <https://saude.gov.br/saude-de-a-z/praticas-integrativas-e-complementares>. Acesso em: 15 de jun. 2020.

\_\_\_\_\_. **Resolução da Diretoria Colegiada nº 26, de 13 de maio de 2014**. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. Diário Oficial da União: seção 1, Brasília, DF, ano: 2014, n. 90, p. 52-61. Disponível em: [https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/rdc0026\\_13\\_05\\_2014.pdf](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/rdc0026_13_05_2014.pdf). Acesso em: 03 set. 2021.

CHIMELLI, P. A. V.; SOFIATTI, A. de A.; NUNES, R. S.; MARTINS, J. E. da C. Agentes de dermatofitoses na cidade de São Paulo de 1992-2002. **Rer Inst Med. Trop S Paulo**, São Paulo, v. 45, n. 5, p. 259-63, out. 2003. DOI 10.1590/S0036-

46652003000500004. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0036-46652003000500004>. Acesso em: 9 ago. 2021

CONSTANT, J. M. C.; CONSTANT, A. B. L. (org.). **Antibióticos e quimioterápicos antimicrobianos**. Maceió: EDUFAL, 2013. 450 p.

COOK, W. B.; HOWARD, A. S. The essential oil of *Illicium anisatum* Linn. **Can J Chem**, Canada, v. 44, n. 21, p. 2461-64, nov. 1966. DOI 10.1139/v66-371. Disponível em: <https://doi.org/10.1139/v66-371>. Acesso em: 13 abr. 2021.

COSTA, M.; PASSOS, X. S.; SOUZA, L. K. H.; MIRANDA, A. T. B.; LEMOS, J. A.; JÚNIOR, J. G. O. et al. Epidemiologia e etiologia das dermatofitoses em Goiânia, GO, Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop**, Uberaba, v. 35, n. 1, p. 19-22, Fev. 2002. DOI 10.1590/S0037-86822002000100004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822002000100004>. Acesso em: 1 fev. 2021.

COUTO, F. M. M. **Fungemia e ação antifúngica e antitumoral de isoflavonas da soja e hidroxipiridonas**. 2016. 104 f. Tese (Doutorado em Micologia Aplicada) – Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2016. Disponível em: <https://repositorio.ufpe.br/bitstream/123456789/17710/1/TESEcouto%2CFMMBIBLIOTECA.pdf>. Acesso em: 12 jul. 2020.

CROTHERS, M.; ZHOU, Z. RICARDO, N. M. P. S.; YANG, Z.; TABOADA, P.; CHAIBUNDIT, C. et al. Solubilisation in aqueous micellar solutions of block copoly(oxyalkylene)s. **Int J Pharm**, Netherlands, v. 293, n. 1-2, p. 91-100, Apr. 2005. DOI 10.1016/j.ijpharm.2004.12.005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.12.005>. Acesso em: 10 jul. 2020.

DAVID, R.; CARDE, J.P. Coloration différentielle des inclusions lipidiques et terpeniques des pseudophylles du pin maritime au moyen du reactif Nadi. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences**, Paris, v. 258, p. 1338-40, 1964.

DAVIS, R.; BALFOUR, J. A. Terbinafine. A pharmaco-economic evaluation of its use in superficial fungal infections. **Pharmacoeconomics**, New Zealand v. 8, n. 3, p. 253-69, Sep. 1995. DOI 10.2165/00019053-199508030-00008. Disponível em: <https://doi.org/10.2165/00019053-199508030-00008>. Acesso em: 10 jul. 2020.

DENG, Y.; LU, S. Biosynthesis and regulation of phenylpropanoids in plants, **Crit Rev Plant Sci**, United States, v. 36, n. 4, p. 257-90, Dec. 2017 DOI 10.1080/07352689.2017.1402852. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/07352689.2017.1402852>. Acesso em: 4 jul. 2020.

DESTRO, B. G. I. **Extração de óleo essencial de anis-estrelado (*Illicium verum*) e imobilização em microcápsula para liberação guiada**. 2019. 146 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2019. Disponível em: <https://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/63257/R%20-%20T%20-%20BARBARA%20GOMES%20IAREMA%20DESTRO.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 10 jun. 2020.

DHIFI, W.; BELLILI, S.; JAZI, S.; BAHLOUL, N.; MNIF, W. Essential oils' chemical characterization and investigation of some biological activities: a critical review. **Medicines**, Switzerland, v. 3, n. 4, p. 1-16, Sept. 2016. DOI

doi.org/10.3390/medicines3040025. Disponível em:

<https://doi.org/10.3390/medicines3040025>. Acesso em: 7 jul. 2021.

DIAS, T. P.; WALLER, S. B.; SILVA, A. L.; SERRA, E. F., MARTINS, O. A.; GOMES, A. R. et al. *Microsporium gypseum* como agente etiológico dermatofitose em felino (*Felis catus*). **Science And Animal Health**, Brasil, v. 5, n. 3, p. 251-9, dez. 2017.

DOI 10.15210/sah.v5i3.11324. Disponível em:

<https://doi.org/10.15210/sah.v5i3.11324>. Acesso em 21 abr. 2021.

DOMICIANO, T. P.; DALALIO, M. M. O.; SILVA, E. L.; RITTER, A. M. V.; ESTEVÃO-SILVA, C. F.; RAMOS, F. S. et al. Inhibitory effect of anethole in nonimmune acute inflammation. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, Germany, v. 386, n. 4, p. 331-38, Apr. 2013. DOI 10.1007/s00210-012-0820-5. Disponível em:

<https://doi.org/10.1007/s00210-012-0820-5>. Acesso em: 19 jul. 2020.

<https://doi.org/10.1007/s00210-012-0820-5>. Acesso em: 19 jul. 2020.

DUARTE, A. B. N. **Avaliação da qualidade de amostras de *Illicium verum hook.***

**f. comercializadas na região do Distrito Federal.** *In*: Anuário da Produção de

Iniciação Científica Discente, Vol. XII, Valinhos. nº. 14, 2009, p. 17-31. Disponível

em: <https://repositorio.pgsskroton.com/bitstream/123456789/1086/1/artigo%202.pdf>.

Acesso em: 9 jul. 2021.

DZAMIC, A.; SOKOVIC, M.; RISTIC, M. S.; GRIJIC-JOVANOVIC, S.; VUKOJEVIC, J.;

MARIN, P. F. Chemical composition and antifungal activity of *Illicium verum* and

*Eugenia caryophyllata* essential oils. **Chem Nat Compd**, United States, v. 45, n. 2, p.

259-61, Jul. 2009. DOI 10.1007/s10600-009-9283-4. Disponível em:

<https://doi.org/10.1007/s10600-009-9283-4>. Acesso em: 17 jul 2020.

EBANI, V. V.; NARDONI, S.; BERTELLONI, F.; PISTELO, L. MANCIANTI, F.

Antimicrobial activity of five essential oils against bacteria and fungi responsible for

urinary tract infections. **Molecules**,

Germany, v. 23, n. 7, p. 1-12, Jul. 2018. DOI 10.3390/molecules23071668.

Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules23071668>. Acesso em: 8 jun. 2020.

ESPINEL-INGROFF, A. Antifungal agents. *In*: SHCAECTHER, M. **Encyclopedia of**

**microbiology**. 3rd ed. Amsterdam: Elsevier, Acad. Press., 2009. p. 205-22. DOI

10.1016/B978-012373944-5.00331-X. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/B978-](https://doi.org/10.1016/B978-012373944-5.00331-X)

[012373944-5.00331-X](https://doi.org/10.1016/B978-012373944-5.00331-X). Acesso em: 11 jul. 2020.

FARINA, C.; FAZII, P.; IMBERTI, G.; LOMBARDI, G.; PASSERA, M.; ANDREONI, S.

*Trichophyton violaceum* and *T. soudanense*: re-emerging pathogens in Italy, 2005-

2013. **New Microbiol**, Italy, v. 38, n. 3, p. 409-15, Jul. 2015. Disponível

em:<https://core.ac.uk/download/pdf/54011854.pdf> Acesso em: 02 fev. 2020.

FERRO, L.O.; SOUZA, A. K. P.; RODRIGUES, D. K. B.; SILVA, J. R. M.; SILVA, K.

W. L da; FREITAS, L. W. S. de. et al. *Trichophyton rubrum* como principal agente

etiológico de dermatofitoses em um laboratório de Maceió – AL. **Braz J Hea Rev**,

Curitiba, v. 3, n. 5, p. 13198-207, set/out. 2020. DOI 10.34119/bjhrv3n5-149

Disponível em: <https://doi.org/10.34119/bjhrv3n5-149>. Acesso em: 1 fev. 2021.

FUENTEFRÍA, A. M.; LANA, D. F. D.; SCARTON, J.; OLIVEIRA, O. L. M.;

PAGNUSSAT, V. **Atlas de micologia médica**. Porto Alegre: Editora letra1, 2019.

104 p.

- GARCÍA-CORTÉS M.; FERNÁNDEZ-CASTAÑER, A. Hepatotoxicidade por productos de herboristería. **Rev Esp Enferm Dig**, Madrid, v. 105, n. 7, p. 433, 2013. Disponível em: <http://scielo.isciii.es/pdf/diges/v105n7/infopaciente.pdf>. Acesso em: 11 jun 2020.
- GAT, S.; NOWAKIEWICZ, A.; ŁAGOWSKI, D.; TROŚCIAŃCZYK, A.; ZIĘBA, P. Multiple-strain *Trichophyton mentagrophytes* infection in a silver fox (*Vulpes vulpes*) from a breeding farm. **Med Mycol**, England, v. 57, n. 2, p. 171–80, Feb. 2019. DOI 10.1093/mmy/myy011. Disponível em: <https://academic.oup.com/mmy/article/57/2/171/4925228>. Acesso em: 01 fev. 2021.
- GEHRKE, I. L.; BONIFAZ, A. Butenafina. Revisión. **Dermatología CMQ**, México v. 5, n. 4, p. 211-17, Oct./Dec. 2007. Disponível em: <https://www.medigraphic.com/pdfs/cosmetica/dcm-2007/dcm074f.pdf>. Acesso em: 11 jul. 2020.
- GHOLIVAND, M. B.; RAHIMI-NASRABADI, M.; CHALABI, H. Determination of essential oil components of star anise (*Illicium verum*) using simultaneous hydrodistillation-static headspace liquid-phase microextraction-gas chromatography mass spectrometry. **Anal Lett**, United States of America, v. 42, n. 10, p. 1382–97, Jun. 2009. DOI 10.1080/00032710902961081. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/00032710902961081>. Acesso em: 6 jun. 2020.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Quím Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 374-81, Abr. 2007. DOI 10.1590/S0100-40422007000200026. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000200026>. Acesso em: 5 jun 2020.
- GREGORÍ VALDES, B. S. Estructura y actividad de los antifúngicos. **Rev Cubana Farm**, Habana, v. 39, n. 2, p. 1-15, May./Ago. 2005. Disponível em: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0034-75152005000200012&script=sci\\_arttext&tlng=en](http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0034-75152005000200012&script=sci_arttext&tlng=en). Acesso em: 11 jul. 2020.
- GUPTA, A. K.; FLECKMAN, P.; BARAN, R. Ciclopirox nail lacquer topical solution 8% in the treatment of toenail onychomycosis. **J Am Acad Dermatol**, United States, v. 43, p. s70-s80, Oct. 2000. Suppl. 4. DOI 10.1067/mjd.2000.109071. Disponível em: <https://doi.org/10.1067/mjd.2000.109071>. Acesso em: 12 jul. 2020.
- HAYETTE, M. P.; SACHELI, R. Dermatophytosis, Trends in Epidemiology and Diagnostic Approach. **Curr Fungal Infect Rep**, United States, v. 9, p. 164-79, Aug. 2015. DOI 10.1007/s12281-015-0231-4. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12281-015-0231-4>. Acesso em: 1 fev. 2021.
- HEIDRICH, D. **Dermatofitoses: estudo de 16 anos na região metropolitana no Sul do Brasil**. 2013. 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013. Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/143784/000874802.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 1 fev. 2021.
- HEINZMANN, B. M.; SPITZER, V.; SIMÕES, C. M. O. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; MELLO, J. C. P. et al. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2017. cap. 12, p. 167-84.

HOOG, G. S.; DUKIK, K.; MONOD, M.; PACKEU, A.; STUBBE, D.; HENDRICKX, M. et al. Toward a novel multilocus phylogenetic taxonomy for the dermatophytes.

**Mycopathologia,**

Netherlands, v. 182, n. 1-2, p. 5-31, Oct. 2016. DOI 10.1007/s11046-016-0073-9.

Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11046-016-0073-9>. Acesso em: 25 jul. 2021.

HOOG, G.S.; GUARRO, J.; FIGUERAS, M.J.; GENE, J. **Atlas of Clinical Fungi**, 2th ed. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2000. 1126 p.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: Mc Graw - Hill Book Co Inc., 1940. 423p.

JONES, E. D. Onychomycosis: Current treatment options.

**J Am Acad Nurse Pract**, United States, v. 15, n. 4, p. 165-69, May 2005. DOI

10.1111/j.1745-7599.2003.tb00258.x. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1745-7599.2003.tb00258.x>. Acesso em: 12 jul. 2020.

KIM, J.-Y.; KIM, S.-S.; OH, T.-H., BAIK, J. S.; SONG, G.; LEE, N. H. et al. Chemical composition, antioxidant, anti-elastase, and anti-inflammatory activities of *Illicium anisatum* essential oil. **Acta Pharm**, v.59, n.3, p. 289-300, Sep. 2009. DOI 10.2478/v10007-009-0022-y. Disponível em: <https://doi.org/10.2478/v10007-009-0022-y>. Acesso em: 5 jun 2020.

KOCH, C.; REICHLING, J.; SCHNEELE, J.; SCHNITZLER, P.. Inhibitory effect of essential oils against herpes simplex virus type 2. **Phytomedicine**, Germany, v.15, n.1-2, p.71-8, Jan. 2008. DOI 10.1016 / j.phymed.2007.09.003. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2007.09.003>. Acesso em: 9 jun. 2020.

KUMARI, R.; KOTTECHA, M. A review on the standardization of herbal medicines. **International Journal of Pharma Sciences and Research**. India, v.7, n.2, p. 97-105, Feb., 2016. Disponível em:

[https://www.researchgate.net/publication/298426911\\_A\\_review\\_on\\_the\\_Standardization\\_of\\_herbal\\_medicines](https://www.researchgate.net/publication/298426911_A_review_on_the_Standardization_of_herbal_medicines). Acesso em: 17 abr. 2021.

KURITA, N.; KOIKE, S. Synergistic antimicrobial effect of ethanol, sodium chloride, acetic acid and essential oil components. **Agric Biol Chem**, Japan, v. 47, n. 1, p.67-75, 1983. DOI 10.1080/00021369.1983.10865580. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/00021369.1983.10865580>. Acesso em: 5 jul. 2021.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N.T. **Tratado de Micologia Médica**, 9 ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 1104 p.

LACY, C. F.; ARMSTRONG, L. L.; GOLDMAN, M. P.; LANCE, L. L. **Medicamentos Lexi-Comp Manola uma fonte abrangente para médicos e profissionais da saúde**. Barueri: Manole, 2009. 1713 p.

LANA, D. F. D., BATISTA, B. G.; ALVES, S. H., FUENTEFRIA, A. M. Dermatofitoses: agentes etiológicos, formas clínicas, terapêutica e novas perspectivas de tratamento. **Clin Biomed Res.**, Porto Alegre, v. 36, n. 4, p.230-41, 2016. DOI 10.4322/2357-9730.68880. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.4322/2357-9730.68880>. Acesso em: 8 jul. 2020. v.36, n.4, p. 230-41, 2016.

LI, Y.; WANG, Y.; KONG, W.; YANG, S.; LUO, J.; YANG, M. et al. *Illicium verum* essential oil, a potential natural fumigant in preservation of lotus seeds from fungal contamination. **Food Chem Toxicol**, England, v. 141, n. 111347, Jul. 2020, p.

1-44. DOI 10.1016/j.fct.2020.111347. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111347>. Acesso em: 5 Jun 2020.

LIM, T. K. *Illicium verum*. In: LIM, T. K. **Edible medicinal and non-medicinal plants**. Dordrecht: Springer, 2013. chap. 26, p. 151-60. DOI 10.1007/978-94-007-5628-1\_27. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-94-007-5628-1\\_27](https://doi.org/10.1007/978-94-007-5628-1_27). Acesso em 02 ago. 2020.

LÓPEZ, A. G.; THEUMER, M. G.; ZYGADLO, J. A.; RUBINSTEIN, H. R. Aromatic plants essential oils activity on *Fusarium verticillioides* Fumonisin B1 production corn grain. **Mycopathologia**, Netherlands, v. 158, n. 3, p. 343-9, Oct. 2004. DOI 10.1007/s11046-005-3969-3. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11046-005-3969-3>. Acesso em: 5 jul. 2021.

LUÍS, A.; SOUSA, S.; WACKERLIG, J.; DOBUSCH, D.; DUARTE, A. P.; PEREIRA, L. et al. Star anise (*Illicium verum* Hook. f.) essential oil: Antioxidant properties and antibacterial activity against *Acinetobacter baumannii*. **Flavour Fragr J**, England, v. 34, n. 4, p. 260-70, Apr. 2019. DOI [doi.org/10.1002/ffj.3498](https://doi.org/10.1002/ffj.3498). Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ffj.3498>. Acesso em: 19 jul. 2020.

MACRINI, T. **Análise farmacognóstica de amostras de drogas vegetais psicoativas comercializadas em Diadema**. 2011. 123f. Dissertação (Mestrado em Fármaco e Medicamentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011. Disponível em:

[https://teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9138/tde-10092012-](https://teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9138/tde-10092012-140219/publico/Mestrado_Thiago_Macrini.pdf)

[140219/publico/Mestrado\\_Thiago\\_Macrini.pdf](https://teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9138/tde-10092012-140219/publico/Mestrado_Thiago_Macrini.pdf). Acesso em: 04 jul. 2021.

MAGAGNIN, C. M.; STOPIGLIA, C.D.O.; VIEIRA, F. J.; HEIDRICH, D.; MACHADO, M.; VETORATTO, G. et al. Perfil de suscetibilidade a antifúngicos de dermatófitos isolados de pacientes com insuficiência renal crônica. **An Bras Dermatologia**, Brasil, n. 4, v. 86, p. 694-701, ago, 2011. DOI 10.1590/S0365-05962011000400011. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0365-05962011000400011>. Acesso em: 09 jul. 2021.

MARINOV, V.; VALCHEVA-KUZMANOVA, S. Review on the pharmacological activities of anethole. **Scr Sci Pharm**, Bulgária, v. 2, n. 2, p. 14-9, 2015. DOI 10.14748/ssp.v2i2.1141. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14748/ssp.v2i2.1141>. Acesso em: 10 jun 2020.

MARTINEZ, R. Atualização no uso de agentes antifúngicos. **J Bras Pneumol**, São Paulo, v. 32, n. 5, p. 449-60, Out. 2006. DOI 10.1590/S1806-37132006000500013. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1806-37132006000500013>. Acesso em: 11 jul. 2020.

MARTINEZ-ROSSI, N. M.; BITENCOURT, T. A.; PERES, N. T. A.; LANG, E. A. S.; GOMES, E. V.; QUARESEMIN, N. R. et al. Dermatophyte resistance to antifungal drugs: mechanisms and prospectus. **Front Microbiol**, Switzerland, v. 9, n. 1108, p. 1-18, May 2018. DOI 10.3389/fmicb.2018.01108. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.01108/full>. Acesso em: 16 jul. 2020.

MINODIER, P., POMMIER, P., MOULÈNE, E.; RETORNAZ, K.; PROST, N.; DEHARO, L. Intoxication aiguë par la badiane chez le nourrisson. **Arch Pediatr**, France, v. 10, n. 7, p. 619-21, Jul. 2003. DOI 10.1016/S0929-693X(03)00274-4.

Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0929-693X\(03\)00274-4](https://doi.org/10.1016/S0929-693X(03)00274-4). Acesso em: 11 jun. 2020.

MORADI, J.; ABBASIPOUR, F.; ZARINGHALAM, J.; MALEKI, B.; ZIAEE, N.; KHODADOUSTAN, A. et al. Anethole, a medicinal plant compound, decreases the production of pro-inflammatory TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in a rat model of LPS-induced periodontitis. **Iran J Pharm Res**, Iran, v. 13, n. 4, p. 1319-25, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4232798/>. Acesso em: 19 jul. 2020.

MUGNAINI, L.; NARDONI, S.; PINTO, L.; PISTELLI, L.; LEONARDI, M.; PISSERI, F. et al. *In vitro* and *in vivo* antifungal activity of some essential oils against feline isolates of *Microsporum canis*. **J Mycol Med.**, v. 22, n. 2, p.179-84, jun,2012. DOI 10.1016/j.mycmed.2012.04.003. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2012.04.003>. Acesso em: 17 jul. 2020.

NAM, P., LIEN, P., HOA, T.; HOUNG, C. M.; THIEN, D. et al. Microwave assisted soxhlet extraction of essential oil from vietnamese star anise fruits (*Illicium verum* Hook. f.) and their chemical composition. **Emir J Food Agric**, United Arab Emirates, v. 29, n. 2, Jan. 2017, p. 131-37. DOI 10.9755/ejfa.2016-05-559. Disponível em: <https://doi.org/10.9755/ejfa.2016-05-559>. Acesso em: 5 Jun 2020.

NARDONI, S.; GIOVANELLI, S.; PISTELLI, L.; MUGNAINI, L.; PROFILI, G.; PISSERI, L. et al. *In vitro* activity of twenty commercially available, plant-derived essential oils against selected dermatophyte species. **Nat Prod Commun**, United States, v. 10, n. 8, p. 1473-78, Aug. 2015a. DOI 10.1177/1934578X1501000840. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/1934578X1501000840>. Acesso em: 17 jul. 2020.

NARDONI, S.; MUGNAINI, L.; PAPINI, R.; FIASCHI, M.; MANCIANTI, F. Canine and feline dermatophytosis due to *Microsporum gypseum*: a retrospective study of clinical data and therapy outcome with griseofulvin. **J Mycol Med**, France, v. 23, n. 3, p. 164-67, jul 2013. DOI 10.1016/j.mycmed.2013.05.005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mycmed.2013.05.005>. Acesso em: 21 abr. 2021.

NARDONI, S.; TORTORANO, A.; MUGNAINI, L.; PROFILI, G.; PISTELLI, L.; GIOVANELLI, S. et al. Susceptibility of *Microsporum canis* arthrospores to a mixture of chemically defined essential oils: a perspective for environmental decontamination. **Z Naturforsch CJ Biosci**, Germany, v. 70, n.1-2, p. 15-24, Jan. 2015b. DOI 10.1515 / znc-2014-4105. Disponível em: <https://doi.org/10.1515/znc-2014-4105>. Acesso em: 17 jul. 2020.

NIKAM, P. H.; KAREPARAMBAN, J.; JADHAV, A.; KADAM, V. Future trends ins standardization of herbal drugs. **J Appl Pharm Sci**, India, v. 2, n. 6, p. 38-44, 2012. DOI 10.7324/JAPS.2012.2631. Disponível em: <https://doi.org/10.7324/JAPS.2012.2631>. Acesso em: 17 abr. 2021.

OLIVEIRA, A. C. D.; ROPKE, C. D. Os dez anos da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) e os principais entraves da cadeia produtiva de extratos vegetais e medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Rev Fitos**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 2, p.185-98, Abr./Jun. 2016. DOI 10.5935/2446-4775.20160015. Disponível em: <https://doi.org/10.5935/2446-4775.20160015>. Acesso em: 17 jun. 2020.

PAIVA, E. P.; LIMA, M. S.; PAIXÃO, J. A. Pectina: propriedades químicas e importância sobre a estrutura da parede celular de frutos durante o processo de

maturação. **Rev Iberoam Polímeros**, Mexico, v. 10, n. 4, p. 196-211, jun. 2009.

Disponível em:

[https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4660150/mod\\_resource/content/1/Paiva2009%20Polimeros%20da%20parede%20celular\\_%20import%C3%A2ncia.pdf#:~:text=Pectinas%20s%C3%A3o%20hidrocol%C3%B3ides%20naturais%20presentes,firmeza%20e%20resist%C3%A2ncia%20mec%C3%A2nica%20do](https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4660150/mod_resource/content/1/Paiva2009%20Polimeros%20da%20parede%20celular_%20import%C3%A2ncia.pdf#:~:text=Pectinas%20s%C3%A3o%20hidrocol%C3%B3ides%20naturais%20presentes,firmeza%20e%20resist%C3%A2ncia%20mec%C3%A2nica%20do). Acesso em: 13 abr. 2021.

PANDIYAN, G. N.; MATHEW, N.; MUNUSAMY, S. Larvicidal activity of selected essential oil in synergized combinations against *Aedes aegypti*. **Ecotoxicol Environ. Saf**, v.15, n.174, p. 549-56, Jun. 2019.

PARRISH, N.; FISHER, S. L.; GARTLING, A.; CRAIG, D.; BOIRE, N. KHUVIS, J. et al. Activity of various essential oils against clinical dermatophytes of *Microsporum* and *Trichophyton*. **Front Cell Infect Microbiol**, Switzerland, v. 10, n. 545913, p. 1-11, Oct. 2020. DOI 10.3389/fcimb.2020.545913. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2020.545913/full>. Acesso em: 15 jul. 2021.

PASQUETTI, M.; MIN, A. R. M.; SCACCHETTI, S.; DOGLIERO, A.; PEANO, A. Infection by *Microsporum canis* in Paediatric Patients: A Veterinary Perspective. **Vet Sci**, Switzerland, Sept. 2017, v. 4, n. 3, p.1-6. DOI 10.3390/vetsci4030046. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.3390/vetsci4030046>. Acesso em: 1 de fev. 2021.

PATIÑO-HERRERA, R. CATARINO-CENTENO, R.; ROBLES-MARTÍNEZ, M.; ZARATE, M. G. M.; FLORES-ARRIAGA, J. C.; PÉREZ, E. Antimycotic activity of zinc oxide decorated with silver nanoparticles against *Trichophyton mentagrophytes*. **Powder Technol**, Switzerland, v. 237, p. 381-91, Mar. 2018. DOI 10.1016/j.powtec.2018.01.004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2018.01.004>. Acesso em: 01 fev. 2021.

PATRA, J. K.; DAS, G.; BOSE, S; BANERJEE, S.; VISHNUPRASAD, C. N.; RODRIGUEZ-TORRES, M. P. et al. Star anise (*Illicium verum*): Chemical compounds, antiviral properties, and clinical relevance. **Phytother Res**, England, v. 34, n. 6, p. 1248-67, Jun. 2020. DOI 10.1002/ptr.6614. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ptr.6614>. Acesso em: 12 jun. 2020.

PEARSE, A.G.E **'Histochemistry: theoretical and applied**. 3rd, v. 2. (Baltimore: The Williams & Wilkins Company), 1972. 768 p.

PEREIRA, F. O. **Atividade antifúngica do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor sobre dermatófitos do gênero *Trichophyton***. 2009. 117f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais Sintéticos Bioativos) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, 2009. Disponível em: <https://repositorio.ufpb.br/jspui/bitstream/tede/6758/1/arquivototal.pdf>. Acesso em: 09 ago. 2021.

PERES, N. T. A.; MARANHÃO, F. C. A.; ROSSI, A.; MARTINEZ-ROSSI, M. Dermatófitos: interação patógeno-hospedeiro e resistência a antifúngicos. **An Bras Dermatol**, Brasil, v. 85, n. 5, p. 657-67, Oct. 2010. DOI 10.1590/S0365-05962010000500009. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0365-05962010000500009>. Acesso em: 1 fev. 2021.

- PERRET, C.; TABIN, R.; MARCOZ, J.-P.; CHESEAU, J.-J. Malaise du nourrisson pensez à une intoxication à l'anis étoilé. **Arch Pediatr**, France, v. 18, n. 7, p. 750–53, Jul. 2011. DOI 10.1016/j.arcped.2011.03.024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.arcped.2011.03.024>. Acesso em: 10 jun. 2020.
- PETERSEN, A. B.; RØNNEST, M. H.; LARSEN, T. O.; CLAUSEN, M. H. The chemistry of Griseofulvin. **Chem Rev**, United States, v. 114, n. 24, p. 12088-107, Dec. 2014. DOI 10.1021/cr400368e. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/cr400368e>. Acesso em: 10 jul. 2020.
- PINTO, P. N.; RODRIGUES, M. P.; BISCOTO, G. L.; SALVATO, L. A.; DIAS, R. R. Z. (Atlas de Micologia Médica Veterinária). **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia/CRMV-MG 94 ed.**, 2019. 109 p. Disponível em: [https://vet.ufmg.br/ARQUIVOS/FCK/cteletronico%2094\(1\).pdf](https://vet.ufmg.br/ARQUIVOS/FCK/cteletronico%2094(1).pdf). Acesso em: 01 fev. 2021.
- PIZZOLITTO, R. P.; JACQUAT, A. G.; USSEGLIO, V.; ACHIMÓN, F.; CUELLO, A. E.; ZYGADLO, J. A. et al. Quantitative-structure-activity relationship study to predict the antifungal activity of essential oils against *Fusarium verticillioides*. **Food Control**, England, v. 108, n. 106836, p. 1-8, Feb. 2020. DOI 10.1016/j.foodcont.2019.106836. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106836>. Acesso em: 05 jul. 2021.
- PUBCHEM. Betahistine. (2021). Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2366>. Acesso em: 13 abr. 2021.
- \_\_\_\_\_. Anethole. (2021). Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Anethole>. Acesso em: 9 jul. 2021.
- RAUT, J. S.; KARUPPAYIL, S. M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Ind Crops Prod**, Netherlands, v. 62, p. 250-64, Dec. 2014. DOI 10.1016/j.indcrop.2014.05.055. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.05.055>. Acesso em: 7 jul. 2020.
- RINALDI, M. G. Dermatophytosis: epidemiological and microbiological update. **J Am Acad Dermatol**. United States, n. 43, 5 Suppl, S120-4, Nov. 2000. DOI 10.1067/mjd.2000.110378. Disponível em: <https://doi.org/10.1067/mjd.2000.110378>. Acesso em: 23 jul. 2021.
- REIS, O. H. B. **Ação antifúngica do óleo essencial de *Rosa alba* L.** 2011. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade José do Rosário Vellano, Alfenas, 2011. Disponível em: <http://tede2.unifenas.br:8080/jspui/bitstream/jspui/122/1/OswaldoHenriqueBarolliReis-Dissertacao.pdf>. Acesso em: 12 jul. 2021.
- ROCHA, L. M. Controle de qualidade de drogas vegetais e fitoterápicos. *In*: LEITE, J. P. V. **Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas**. São Paulo: Editora Atheneu. 2009. cap. 9, p. 253-76.
- SAAD, G. A.; LÉDA, P. H. O.; SÁ, I. M. et al. Histórico da Fitoterapia. *In*: SAAD, G. A.; LÉDA, P. H. O.; SÁ, I. M. et al. **Fitoterapia contemporânea: tradição e ciência na prática clínica**. Rio de Janeiro: Editora Koogan, 2018. cap. 1, p. 1-6.

\_\_\_\_\_. Monografia de Plantas Medicinais. *In*: SAAD, G. A.; LÉDA, P. H. O.; SÁ, I. M. et al. **Fitoterapia contemporânea: tradição e ciência na prática clínica**. Rio de Janeiro: Editora Koogan, 2018. cap. 7, p. 99-418.

SAMPAIO, S. A. P.; RIVITTI, E. A. **Dermatologia**. 2. ed. São Paulo: Artes Médicas, 2001, 1156 p.

SARKER, S. D.; NAHAR, L. **Química para estudantes de farmácia: química geral, orgânica e de produtos naturais**. Tradução: Cláudia L. C. de Araújo. [Reimpr.]. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016. 326 p.

SCHISANDRACEAE (Plant family). *In*: ENCYCLOPEDIA BRITANNICA. **Base de dados**. 2021. Disponível em: <https://www.britannica.com/plant/Schisandraceae>. Acesso em: 10 jun 2021.

SIDRIM, J. J. C.; MEIRELES, T. E. F.; OLIVEIRA, L. M. P.; DIÓGENES, M. J. N. Aspectos clínico-laboratoriais das dermatofitoses. *In*: SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica a luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. cap. 14, p. 135-61.

SIDRIM, J. J. C.; BRILHANTE, R. S. N.; ROCHA, M. F. G. Aspectos gerais de fungos filamentosos e dimórficos na apresentação filamentosa. *In*: SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica a luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. cap. 8, p. 83-8.

SILVA, K. A.; GOMES, B. S.; MAGALHAES, O. C. S.; FILHO, A. M. L. Etiologia das dermatofitoses diagnosticadas em pacientes atendidos no Laboratório de Micologia Médica no Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco, entre 2014-2017. **Rev Bras An Clin**, Brasil, v. 50, n. 1, p. 33-7, 2018. DOI 10.21877/2448-3877.201700619. Disponível em: <http://www.rbac.org.br/artigos/etiologia-das-dermatofitoses-diagnosticadas-em-pacientes-atendidos-no-laboratorio-de-micologia-medica-no-centro-de-biociencias-da-universidade-federal-de-pernambuco-entre-2014-2017/>. Acesso em: 1 fev. 2021.

SILVA, R. A. S.; CALUMBY, R. J. N.; SANTOS, I. K. S.; SILVA, S. A. S.; NACIMENTO, T. G.; ALMEIDA, L. M. et al. Prospecção tecnológica do potencial antibacteriano e antifúngico do anis-estrelado (*Illicium verum* Hook f.). **Revista Humanidades & Inovação**, Brasil, v. 7, n. 4, p. 328-38, Mar. 2020. Disponível em: <https://revista.unitins.br/index.php/humanidadeseinovacao/article/view/1849/1455>. Acesso em: 13 jun. 2021.

SILVA, R. A. S.; NASCIMENTO, T. G.; SILVA, S. A. S. **Avaliação da identidade e qualidade de frutos secos de *Illicium verum* (anis-estrelado) comercializados no nordeste brasileiro**. *In*: 70<sup>a</sup> Reunião Anual da SBPC, 2018, Maceió. Anais/Resumos da 70<sup>a</sup> Reunião Anual da SBPC, 2018. Disponível em: [http://www.sbpnet.org.br/livro/70ra/trabalhos/resumos/1788\\_145ff50a0d2a17feac3f5db3ad16650ab.pdf](http://www.sbpnet.org.br/livro/70ra/trabalhos/resumos/1788_145ff50a0d2a17feac3f5db3ad16650ab.pdf). Acesso em 15 jul. 2021.

SILVEIRA-GOMES, F.; OLIVEIRA, E. F. de; NEPOMUCENO, L. B.; PIMENTEL, R. F.; MARQUES-DA-SILVA, S. H.; MESQUITA-DA-COSTA, M. Dermatophytosis diagnosed at the Evandro Chagas Institute, Pará, Brazil. **Brazil J. Microbiol.**, Brasil, v. 44, n. 22, p. 443-6, 2013. DOI 10.1590/S1517-83822013005000049. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1517-83822013005000049>. Acesso em: 09 ago. 2021.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DERMATOLOGIA (SBD). Dermatofitoses (2017). Disponível em: <https://www.sbd.org.br/dermatologia/unhas/doencas-e-problemas/dermatofitose/91/>. Acesso em: 30 maio 2019.

SPRENGER, A. B. **Pulsoterapia trimestral de terbinafina para o tratamento de onicomicoses**. 2019. 91 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2019. Disponível em: <https://www.prppg.ufpr.br/signa/visitante/trabalhoConclusaoWS?idpessoal=69186&idprograma=40001016012P1&anobase=2019&idtc=42>. Acesso em: 10 jul. 2020.

STEVIĆ, T.; BERIĆ, T.; ŠAVIKIN, K.; SOKOVIĆ, M.; GOĐEVAC, D.; DIMKIĆ, I. et al. Antifungal activity of selected essential oils against fungi isolated from medicinal plant. **Ind Crops Prod.**, Netherlands, v.55, n.1, p. 116-122, 2016. DOI 10.1016/j.indcrop.2014.02.011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.02.011>. Acesso em 1 set. 2021.

STRASBURGER, E. Kernteilungsbilder bei der Erbse. **Flora oder Allgemeine Botanische Zeitung**, v.102, p. 1-23, 1911.

SUCCI, I. B.; OROFINO-COSTA, R. **Uso da terbinafina oral no tratamento da Tinea unguium dos pododáctilos administrada de forma intermitente**. In: Ministério da Saúde - Brasil (Org.). Prêmio Nacional de Incentivo à Promoção do Uso Racional de Medicamentos. 2010. Disponível em: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/premio\\_medica/2010/mencoes/trabalho\\_completo\\_isabella\\_brasil\\_succi.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/premio_medica/2010/mencoes/trabalho_completo_isabella_brasil_succi.pdf). Acesso em 10 jul. 2020.

TOBIAS, M. L.; OLIVEIRA, F.; OLIVEIRA, K. P.; MARQUES, L. C. Controle de qualidade de drogas vegetais de farmácias de manipulação de Maringá (Paraná-Brasil), **Revista Eletrônica de Farmácia**, Brasil, v. 4, n.1, p. 95-103, 2007. DOI 10.5216/ref.v4i1.2126. Disponível em: <https://doi.org/10.5216/ref.v4i1.2126>. Acesso: 13 abr. 2021.

VALANDRO, M. A.; PASCON, J. P. E.; MISTIERI, M. L. A.; LUBECK, I. Dermatophytosis due to *Microsporum nanum* infection in a canine. **Semina: Ciênc Agrár**, Londrina, v. 38, n. 1, p. 317-20, jan./fev. 2017. DOI: 10.5433/1679-0359.2017v38n1p317. Disponível em: <http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/22424/20559>. Acesso em: 01 fev. 2021.

VENTRELLA, M. C.; VIEIRA, M. F. Tópicos de botânica no estudo de plantas medicinais. In: LEITE, J. P. V. **Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas**. São Paulo: Editora Atheneu, 2009. cap. 2, p. 21-46.

VORIS, D. G. R.; DIAS, L. S.; LIMA, J. A.; LIMA, K.S. C.; LIMA, J. B. P.; LIMA, A. L. S. Evaluation of larvicidal, adulticidal, and anticholinesterase activities of essential oils of *Illicium verum* Hook. f., *Pimenta dioica* (L.) Merr., and *Myristica fragrans* houtt. against Zika virus vectors. **Environ Sci Pollut Res Int**, Germany, v. 25, n.23, p. 22541-51, Aug. 2018. DOI 10.1007/s11356-018-2362-y. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2362-y>. Acesso em: 8 jun. 2020.

WANG, G.-W.; HU, W.-T.; HUANG, B.-K.; QIN, L.-P. *Illicium verum*: A review on its botany, traditional use, chemistry and pharmacology. **J Ethnopharmacol**, Ireland. v. 136, n. 1, p. 10-20, Jun. 2011. DOI 10.1016/j.jep.2011.04.051. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.04.051>. Acesso em: 12 jun. 2020.

WEI, L.; HUA, R.; LI, M.; YUANG, Y.; LI, S.; HE, Y. et al. Chemical composition and biological activity of star anise *Illicium verum* extracts against maize weevil, *Sitophilus zeamais* adults. **J Insect Sci**, United States, v. 14, n. 1, p. 1-13, Jun. 2014. DOI 10.1093/jis/14.1.80. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jis/14.1.80>. Acesso em: 6 jun 2020.

WESELER, A.; GEISS, H. K.; SALLER, R.; REICHLING, J. A novel colorimetric broth microdilution method to determine the minimum inhibitory concentration (mic) of antibiotics and essential oils against *Helicobacter pylori*. **Pharmazie**, Germany, v. 60, n. 7, p. 498-502, 2005. Disponível em:

[https://www.researchgate.net/profile/Antje\\_Weseler/publication/7683718\\_A\\_novel\\_colorimetric\\_broth\\_microdilution\\_method\\_to\\_determine\\_the\\_minimum\\_inhibitor\\_concentration\\_MIC\\_of\\_antibiotics\\_and\\_essential\\_oils\\_against\\_Helicobacter\\_pylori/links/0c96051dec957c9efc000000/A-novel-colorimetric-broth-microdilution-method-to-determine-the-minimum-inhibitor-concentration-MIC-of-antibiotics-and-essential-oils-against-Helicobacter-pylori.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Antje_Weseler/publication/7683718_A_novel_colorimetric_broth_microdilution_method_to_determine_the_minimum_inhibitor_concentration_MIC_of_antibiotics_and_essential_oils_against_Helicobacter_pylori/links/0c96051dec957c9efc000000/A-novel-colorimetric-broth-microdilution-method-to-determine-the-minimum-inhibitor-concentration-MIC-of-antibiotics-and-essential-oils-against-Helicobacter-pylori.pdf). Acesso em: 8 jun. 2020.

ZAITS, C.; CAMPBELL, I.; MARQUES, S.A.; RUIZ, L.R.B.; FRAMIL, V.M. S. **Compêndio de Micologia Médica**, 2 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 2010. 460 p.

ZANIN, T. Pectina: o que é para que serve e como preparar em casa. (2020). Disponível em: <https://www.tuasaude.com/pectinas/>. Acesso em 13 abr. 2021.

**APÊNDICE A** – Modo de preparo para elaboração dos meios de cultura fúngico.**Ágar Sabouraud-Cloranfenicol**

Dextrose.....	20 g
Peptona.....	10 g
Ágar.....	20 g
Cloranfenicol.....	0,05g
Água destilada q.s.p.....	1000mL

**Caldo Glicosado**

Dextrose.....	40g
Peptona.....	5g
Extrato de carne.....	3g
Cloreto de sódio.....	5g
Água destilada q.s.p.....	1000mL

**Ágar lactrimel**

Leite em pó.....	20 g
Mel.....	10 g
Farinha de trigo.....	20 g
Ágar.....	15 g
Água destilada q.s.p.....	1000mL

**Ágar Batata Dextrose**

Infusão de amido de batata.....	4 g
Dextrose.....	20 g
Ágar.....	15 g
Água destilada q.s.p.....	1000mL