

“From Bedside to Bench and Back Again”: Análise Exploratória do Papel dos Óleos Essenciais como Potencial Tratamento da Queratite Fúngica

From Bedside to Bench and Back Again: Exploratory Analysis of the Role of Essential Oils as Potential Treatment of Fungal Keratitis

 Celso Costa ¹, Elijah Akegbe ³, João Pinheiro Costa ⁵, Dolores Pinheiro ¹¹, Nuno Mesquita ⁹, Célia Cabral ^{2,6,9,10}, Anália Carmo ¹², Rui Tomé ¹², Elisa Julião Campos ^{2,3,6,7,8}, Esmeralda Costa ¹⁻³, João Gil ¹⁻⁴, Andreia Rosa ¹⁻⁴, Maria João Quadrado ¹⁻⁴

¹ Department of Ophthalmology, Unidade Local de Saúde de Coimbra, Coimbra, Portugal

² Clinical Academic Center of Coimbra (CACC), Coimbra, Portugal

³ Faculty of Medicine of the University of Coimbra (FMUC), Coimbra, Portugal

⁴ Unidade de Oftalmologia de Coimbra (UOC), Coimbra, Portugal

⁵ Department of Ophthalmology, Unidade Local de Saúde de São João, Porto, Portugal

⁶ University of Coimbra, Center for Innovative Biomedicine and Biotechnology (CiBB), Coimbra, Portugal

⁷ University of Coimbra, Centre for Chemical Engineering and Renewable Resources for Sustainability (CERES), Department of Chemical Engineering, Faculty of Sciences and Technology, Coimbra, Portugal

⁸ University of Coimbra, Center for Neuroscience and Cell Biology (CNC-UC), Coimbra, Portugal

⁹ University of Coimbra, Centre for Functional Ecology (CFE), Department of Life Sciences, Faculty of Sciences and Technology, Coimbra, Portugal

¹⁰ University of Coimbra, Coimbra Institute for Clinical and Biomedical Research (iCBR), Faculty of Medicine, Coimbra, Portugal

¹¹ Department of Clinical Pathology, Unidade Local de Saúde de São João, Porto, Portugal

¹² Department of Microbiology, Unidade Local de Saúde de Coimbra, Coimbra, Portugal

Recebido/Received: 2024-10-14 | Aceite/Accepted: 2025-01-27 | Published online/Publicado online: 2025-02-14 | Published/Publicado: 2025-09-29

© Author(s) (or their employer(s)) and Oftalmologia 2025. Re-use permitted under CC BY-NC. No commercial re-use.

© Autor (es) (ou seu (s) empregador (es)) e Oftalmologia 2025. Reutilização permitida de acordo com CC BY-NC. Nenhuma reutilização comercial.

DOI: <https://doi.org/10.48560/rspo.38196>

RESUMO

INTRODUÇÃO: O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia antifúngica de óleos essenciais (OE) extraídos de plantas medicinais: *Lavandula pedunculata* (Mill.) Cav. (nativa do Vale do Côa, Portugal) e *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf, contra agentes da queratite fúngica (QF).

MÉTODOS: Foram colhidas amostras de córnea de doentes com suspeita de queratite infecciosa na ULS Coimbra (Coimbra) e na ULS São João (Porto). Os isolamentos fúngicos confirmados foram caracterizados. Foi avaliada a sua suscetibilidade aos OEs em diversas concentrações, pelo método de disco-difusão em fase sólida, determinando as suas propriedades inibitórias e fungicidas. Os diâmetros da zona de inibição (IZD) em redor dos discos foram registados aos 3^o, 5^o, 7^o, 10^o e 14^o dias de incubação.

RESULTADOS: Catorze amostras positivas foram obtidas em 6 meses. Observou-se um predomínio de *Candida* spp. O OE de *Cymbopogon citratus* demonstrou uma atividade antifúngica excecional, com inibição completa de *Aspergillus fumigatus* e *Scedosporium apiospermum* em todas as concentrações, mantendo IZDs máximos durante os 14 dias. Contra *Candida* spp., o IZD para *Cymbopogon citratus* aumentou ao longo do tempo, à concentração de 100%, tendo evoluído de 68 mm (ao 3^o dia) para 81,7 mm (ao 14^o dia), no caso de *Candida albicans*, e de 51,7 mm para 71,3 mm, no caso de *Candida parapsilosis*. O OE de *Lavandula pedunculata* apresentou elevada atividade

contra *Aspergillus fumigatus* e *Scedosporium apiospermum*, no início da incubação, diminuindo os IZDs ao longo do tempo, independente da concentração do OE. A sua eficácia contra *Candida* spp. mostrou baixa atividade, sendo variável ao longo do tempo e da concentração.

CONCLUSÃO: Os OEs de *Cymbopogon citratus* e *Lavandula pedunculata* constituem alternativos agentes antifúngicos, fornecendo bases para o desenvolvimento de novos tratamentos. A eficácia notável de OE de *Cymbopogon citratus* contra vários agentes favorece a sua utilização na prática clínica, enquanto o OE de *Lavandula pedunculata* requer mais estudos esclarecedores do seu potencial antifúngico. Otimizar as concentrações de OE e a duração da exposição é crucial para maximizar a sua eficácia. São necessários mais estudos para compreender o papel dos OEs no microambiente corneano e o seu contributo para o desenvolvimento de novos fármacos.

PALAVRAS-CHAVE: Antifúngicos; Óleos Voláteis; Queratite/tratamento.

ABSTRACT

INTRODUCTION: This study aimed to evaluate the antifungal efficacy of essential oils (EOs) extracted from medicinal plants, one native in Côa Valley (Portugal): *Lavandula pedunculata* (Mill.) Cav. and another not-native: *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf, against fungal keratitis (FK) pathogens.

METHODS: Corneal specimens were collected from patients suspected of having infectious keratitis from Unidade Local de Saúde de Coimbra (Coimbra) and Unidade Local de Saúde de São João (Porto). The confirmed fungal isolates were then identified and characterized. In addition to testing the sensitivity to conventional antifungals, the susceptibility to the selected EOs was also assessed at various concentrations, through *in vitro* solid-phase disk diffusion assays, determining their inhibitory and fungicidal properties. The inhibition zone diameters (IZD) formed around the paper discs were recorded on the 3rd, 5th, 7th, 10th and 14th day of incubation.

RESULTS: Fourteen positive samples were obtained in 6 months. A predominance of *Candida* spp. was noted. *Cymbopogon citratus* demonstrated exceptional antifungal activity, with complete inhibition of *Aspergillus fumigatus* and *Scedosporium apiospermum* across all concentrations, maintaining maximum IZDs throughout the study period. Against *Candida* species, the IZD for *Cymbopogon citratus* increased over time, with the 100% concentration achieving an IZD from 68 mm on day 3 to 81.7 mm by day 14 for *Candida albicans* and from 51.7 mm to 71.3 mm for *Candida parapsilosis*. *Lavandula pedunculata* EO displayed initial high activity against *Aspergillus fumigatus*, with a decrease in IZDs over time for lower concentrations. Its effectiveness against *Scedosporium apiospermum* and *Candida* species demonstrated concentration and time-dependent variability.

CONCLUSION: *Cymbopogon citratus* and *Lavandula pedunculata* EOs may be potent antifungal agents against FK pathogens, providing a basis for the development of new antifungal treatments. The remarkable efficacy of *Cymbopogon citratus* against a range of fungal pathogens supports its use in clinical practice, while *Lavandula pedunculata* requires further studies to clarify its antimicrobial potential. Optimizing EOs concentrations and exposure duration seems to be important to maximize antifungal efficacy. Further research is needed to understand the role of these EOs in the corneal *milieu* and contribute to the development of new drugs.

KEYWORDS: Antifungal Agents; Keratitis/therapy; Oils, Volatile.

INTRODUÇÃO

A prevalência da queratite fúngica (QF) tem mostrado uma tendência crescente,¹ estimando-se que atualmente possa constituir até 50% das queratites infecciosas.^{2,3} Se não tratada adequadamente, a QF pode induzir *melting* e perfuração corneanas, leucomas densos e endoftalmite. O diagnóstico e tratamento precoces são essenciais para prevenir

complicações devastadoras e mitigar o *burden* socioeconómico substancial.

Os atrasos no diagnóstico são comuns, sendo provocados por culturas demoradas e, por vezes, negativas. O correto diagnóstico laboratorial é crucial para permitir a realização de testes de suscetibilidade aos antifúngicos. As amostras colhidas para avaliação microbiológica incluem, principalmente, a raspagem do infiltrado corneano. Os métodos conven-

cionais de diagnóstico incluem o exame direto por coloração da amostra e a sua cultura. Os métodos moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), estão a ganhar popularidade, pois permitem um diagnóstico rápido e preciso,⁴ levando à identificação exata das espécies envolvidas.

O tratamento é desafiador devido à rápida progressão, à baixa penetração dos agentes antifúngicos na córnea, à resistência emergente aos antifúngicos convencionais, à etiologia complexa e às complicações relacionadas com a doença e o seu tratamento. A abordagem envolve tratamento tópico e sistémico.⁵ O voriconazol é um agente antifúngico de amplo espectro do grupo dos triazóis, utilizado tanto topicamente como sistemicamente para o tratamento de uma vasta gama de leveduras e fungos filamentosos. A anfotericina B é um agente antifúngico poliénico utilizado topicamente e sistemicamente para o tratamento de fungos leveduriformes.⁵ A terapêutica sistémica (ex.: voriconazol, itraconazol, anfotericina B) é usada nos casos com má resposta ao tratamento tópico. Quando o tratamento médico é insuficiente ou na presença de complicações graves (como perfuração da córnea ou endoftalmite), são necessários procedimentos cirúrgicos.⁶

Os avanços recentes no tratamento da QF têm-se concentrado na otimização de terapêuticas já existentes e na exploração de abordagens terapêuticas inovadoras, enquadrando-se aqui os óleos essenciais (OEs). Os OEs são misturas complexas de compostos voláteis derivados de extratos concentrados de plantas. São quimicamente constituídos por monoterpenos, sesquiterpenos, álcoois, terpenos, fenois, aldeídos e outros constituintes bioativos. Cada OE possui uma composição química única, que influencia o seu espectro de atividades biológicas.^{7,8} A composição química de um OE pode variar dentro da mesma planta e/ou entre diferentes plantas (Tabela suplementar 1).

Os OEs podem exibir atividade antimicrobiana,^{7,8} já demonstrada com o OE de lavanda,⁹ de folha de canela¹⁰ e de eucalipto.¹¹ Essa atividade antimicrobiana parece ocorrer através da disrupção da membrana plasmática, com perda do conteúdo celular, e da disfunção mitocondrial, originando a morte celular.¹² Os OEs podem, assim, contornar os mecanismos de resistência comuns, inibir biofilmes e ter efeitos sinérgicos.¹³ Para o presente estudo, dois OEs – *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf e *Lavandula pedunculata* (Mill.) Cav – foram selecionados com base nas suas características específicas e atividade antimicrobiana apurada em estudos anteriores, que demonstraram eficácia fungicida e fungistática contra várias espécies fúngicas.

O OE de *Cymbopogon citratus* é reconhecido pelas suas propriedades antimicrobianas de amplo espectro. O principal componente, geranial, destabiliza a membrana celular de fungos e bactérias, levando à morte celular.^{14,15} O OE de *Lavandula pedunculata* é nativo do Vale do Côa, tendo sido documentadas propriedades antifúngicas contra dermatófitos e leveduras.¹⁶ Ambos são seguros e bem tolerados quando usados topicamente ou em aromaterapia, o que os torna adequados para fins terapêuticos, com toxicidade relativamente baixa em comparação com os agentes antifúngicos sintéticos.¹⁷

O principal objetivo deste estudo é investigar a eficácia antifúngica dos OEs extraídos de plantas medicinais, contra alguns dos principais agentes etiológicos da QF em Portugal.

MATERIAL E MÉTODOS

COLHEITA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS OCULARES

Após exame oftalmológico em doentes com suspeita de queratite infecciosa nos dois centros envolvidos no estudo - ULS São João e ULS Coimbra - foram colhidas amostras corneanas, incluindo raspagens, exsudados e botão corneano, sob condições estéreis, entre maio e setembro de 2023.

Uma parte de cada amostra adquirida foi cuidadosamente colocada numa lâmina de vidro estéril para análise microscópica imediata, enquanto a parte restante foi enviada para o laboratório de microbiologia de cada hospital, onde foi inoculada em placas de agar *sabouraud* dextrose suplementado com cloranfenicol.

Para a microscopia direta, foi aplicada à amostra na lâmina de vidro uma preparação de hidróxido de potássio e branco de calcoflúor. As placas inoculadas foram incubadas a uma temperatura constante de 25°C durante duas semanas, sendo inspecionadas diariamente para deteção de proliferação fúngica.

As culturas positivas para fungos foram enviadas para o Centro de Inovação em Biomedicina e Biotecnologia (CiBB) – Universidade de Coimbra (UC), e para o Laboratório de Micologia e Biodeterioração do Centro de Ecologia Funcional (CFE, UC), sediado no Departamento de Ciências da Vida da Faculdade de Ciências e Tecnologia da UC, para posterior identificação e testes de sensibilidade.

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS FUNGOS

Isolamento do microorganismo

O processo de isolamento e identificação dos fungos ocorreu no CFE e envolveu um meio de cultura agar batata dextrose, que foi utilizado para a cultura das amostras, sob condições ótimas de isolamento e temperatura.

As colónias fúngicas em crescimento foram observadas detalhadamente, nomeadamente em termos de cor, textura e aparência geral, bem como analisadas microscopicamente para identificação de detalhes estruturais.

Extração de DNA e Identificação molecular

A partir das culturas axénicas, o DNA foi extraído com um *kit* específico (REExtract-N.Amp PCR Kit) e a identificação molecular foi realizada por PCR, através da amplificação de uma região específica (região ITS-rDNA), utilizando o par de *primers* universais para fungos (ITS1-F e ITS4).

A análise de similaridade foi realizada utilizando o NCBI BLAST, a base de dados de nucleótidos do National Center of Biotechnology Information.¹⁸ A identificação das

espécies foi confirmada por uma análise macroscópica e microscópica detalhada das características taxonómicas.

AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS COMUNS

A suscetibilidade antifúngica *in vitro* para os agentes anti-fúngicos itraconazol (ITR), voriconazol (VOR), posaconazol (POS), fluconazol (FLU) e anfotericina B (AmB) foi compilada a partir da base de dados de micologia da Universidade de Adelaide, Austrália.¹⁹

Os testes de suscetibilidade aos OEs foram conduzidos em estrita conformidade com as diretrizes do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), especificamente os documentos M27-A3/M44-A2 para leveduras^{20,21} e o M38-A2 para fungos filamentosos,^{20,21} que são as referências para o teste de suscetibilidade antifúngica *in vitro* e enunciam o procedimento padrão para a realização de testes de diluição de suscetibilidade antifúngica.

As concentrações inibitórias mínimas (CIMs) foram determinadas para cada combinação de fungo e agente antifúngico, seguindo os métodos padronizados pelo CLSI. A CIM é definida como a menor concentração de antifúngico que inibe significativamente o crescimento do fungo *in vitro*, e a sua interpretação é baseada nos *cut-offs* do CLSI, que categorizam a suscetibilidade dos fungos aos agentes antifúngicos como suscetível (S), intermediária (I) ou resistente (R).

AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA ANTIFÚNGICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Extração dos óleos essenciais

A extração dos OE das plantas medicinais foi realizada no CiBB através de hidrodestilação, utilizando um aparelho de tipo *cleveenger*.²²

As plantas foram previamente secas e trituradas. Posteriormente, foram colocadas num balão de fundo redondo, ao qual foi adicionada água destilada, sendo este colocado numa manta de aquecimento. Os OEs foram separados do destilado aquoso, imediatamente transferidos para frascos de vidro âmbar, e armazenados adequadamente. Posteriormente, os OEs foram caracterizados quimicamente utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS).

Avaliação da eficácia antifúngica

A avaliação da eficácia antifúngica dos OEs contra *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Scedosporium apiospermum* e *Aspergillus fumigatus* foi realizada através da metodologia de disco-difusão em agar. Estes fungos foram selecionados com base na sua relevância clínica e na sua proeminência como principais agentes etiológicos de QF.

Os OEs foram preparados em quatro concentrações - 25%, 50%, 75% e 100% - diluindo-os em dimetilsulfóxido (DMSO). Os discos de papel estéreis, com 8 mm de diâmetro, foram impregnados com cada OE nas diferentes concentrações, e

colocados individualmente no centro de placas de Petri com meio de cultura, seguindo-se incubação sob condições ótimas ao crescimento dos microrganismos. O diâmetro da zona de inibição (IZD) formada ao redor dos discos de papel foi medido ao 3º, 5º, 7º, 10º e 14º dias de incubação, para avaliar a atividade antifúngica. Esta medição foi repetida duas vezes, e toda a experiência foi realizada em triplicado, sendo que o valor do IZD foi expresso como a média dos 3 valores. Discos de papel impregnados com DMSO sem OEs foram usados como controlos positivos, enquanto discos sem DMSO nem OEs foram usados como controlos negativos.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores obtidos a partir das medições das zonas de inibição foram registados e inseridos numa folha de cálculo do Microsoft Excel; a comparação estatística da eficácia de ambos os OEs foi realizada com o programa IBM SPSS Statistics 26. A eficácia de ambos os OEs foi analisada e comparada estatisticamente através do teste *one-way ANOVA* e as diferenças entre as médias dos diâmetros das zonas de inibição foram avaliadas através do teste de Tukey. Foi considerado um α de 0,05, para diferenças estatisticamente significativas.

RESULTADOS

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS FUNGOS

A fase de recolha de amostras foi conduzida de forma sistemática ao longo de um período de 5 meses. Foram colhidas 14 amostras de QF. A Fig. 1 representa a distribuição e prevalência das espécies identificadas.

Foi encontrada uma predominância de *Candida* spp. na nossa amostra, sendo também identificados *Beauveria bassiana*, *Scedosporium apiospermum* e *Aspergillus* spp. *Epilobium nigrum*, *Dicyma olivacea* e *Penicillium tealii*, raramente associados a infeções oculares, sugerindo um espectro mais amplo de fungos em Portugal do que o anteriormente considerado, o que pode ter implicações na gestão da QF.

Cinco doentes tinham previamente realizado queratoplastia penetrante, tendo nestes doentes sido isolada *Candida* spp. em 4 e *Beauveria bassiana* em 1.

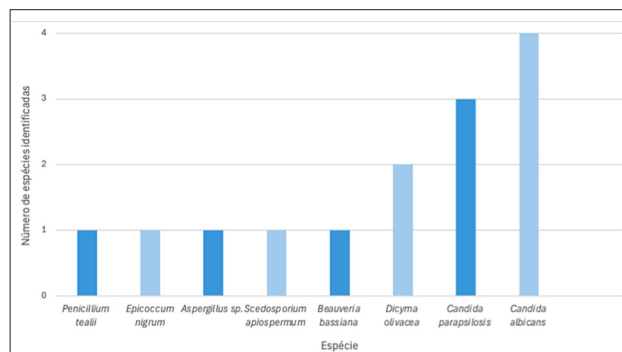


Figura 1. Distribuição das espécies identificadas nas amostras fúngicas isoladas.

A Tabela suplementar 2 apresenta as percentagens de similaridade das sequências de DNA dos agentes isolados, quando comparadas com as do NCBI. As percentagens de similaridade foram, em geral, muito elevadas (97,90-100,00%), confirmando a fiabilidade da técnica de identificação usada.

SUSCETIBILIDADE DOS FUNGOS AOS AGENTES ANTIFÚNGICOS COMERCIAIS

De acordo com a base de dados de micologia da Universidade de Adelaide, Austrália,¹⁹ *Candida albicans* apresenta um amplo espectro de sensibilidade aos antifúngi-

cos selecionados. Notavelmente, o VOR tem um valor de CIM $\leq 0,016$ $\mu\text{g/mL}$, dentro do intervalo de suscetibilidade. A AmB tem uma CIM de 0,5 $\mu\text{g/mL}$, indicando suscetibilidade com um *cut-off* de 2 $\mu\text{g/mL}$. *Candida parapsilosis* tem atualmente sensibilidade moderada aos antifúngicos, com o VOR e o POS a mostrarem CIMs de 0,03 $\mu\text{g/mL}$ e 0,06 $\mu\text{g/mL}$, respetivamente. A CIM da AmB de 1 $\mu\text{g/mL}$ sugere uma suscetibilidade limítrofe, com o *cut-off* para suscetibilidade estabelecido em 2 $\mu\text{g/mL}$. *Beauveria bassiana* e *Scedosporium apiospermum* exibem perfis variados de suscetibilidade, sublinhando o desafio no tratamento de infeções causadas por estes fungos. Para *Aspergillus fumigatus*,

Tabela 1. Perfil de suscetibilidade dos microrganismos isolados aos antifúngicos comuns.

| Fungo | Antifúngico | CIM ($\mu\text{g/mL}$) | Cut-off CLSI | |
|---------------------------------|-------------|--------------------------|--------------|-------------|
| | | | S | R |
| <i>Candida albicans</i> | ITR | 0,060 | ND | ND |
| | VOR | $\leq 0,016$ | $\leq 0,12$ | $\geq 1,00$ |
| | POS | 0,03 | ND | ND |
| | FLU | 0,50 | $\leq 2,00$ | $\geq 8,00$ |
| | AmB | 0,50 | 2,00 | 4,00 |
| <i>Candida parapsilosis</i> | ITR | 0,13 | ND | ND |
| | VOR | 0,03 | $\leq 0,12$ | $\geq 1,00$ |
| | POS | 0,06 | 0,25 | 0,50 |
| | FLU | 1,00 | $\leq 2,00$ | $\geq 8,00$ |
| | AmB | 1,00 | 2,00 | 4,00 |
| <i>Beauveria bassiana</i> | ITR | 0,03 | ND | ND |
| | VOR | 0,25 | ND | ND |
| | POS | 0,20 | ND | ND |
| | FLU | 4,00 | ND | ND |
| | AmB | 0,50 | ND | ND |
| <i>Scedosporium apiospermum</i> | ITR | 0,50 | ND | ND |
| | VOR | 0,25 | ND | ND |
| | POS | 0,50 | ND | ND |
| | FLU | 0,25 | ND | ND |
| | AmB | 2,00 | ND | ND |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> | ITR | 0,50 | 1,00 | 2,00 |
| | VOR | 0,25 | $\leq 0,50$ | $\geq 2,00$ |
| | POS | 0,25 | ND | ND |
| | FLU | 0,50 | ND | ND |
| | AmB | 1,00 | 2,00 | 4,00 |
| <i>Epicoccum nigrum</i> | ITR | - | ND | ND |
| | VOR | - | ND | ND |
| | POS | - | ND | ND |
| | FLU | - | ND | ND |
| | AmB | - | ND | ND |
| <i>Dicyma olivacea</i> | ITR | - | ND | ND |
| | VOR | - | ND | ND |
| | POS | - | ND | ND |
| | FLU | - | ND | ND |
| | AmB | - | ND | ND |
| <i>Penicillium tealii</i> | ITR | 0,50 | ND | ND |
| | VOR | 1,00 | ND | ND |
| | POS | 0,50 | ND | ND |
| | FLU | 0,50 | ND | ND |
| | AmB | 2,00 | ND | ND |

R, resistente; S, suscetível; ND: não definido. "-" indica que não existem CIM para a combinação agente antifúngico-fungo na literatura. ITR, itraconazol; VOR, voriconazol; POS, posaconazol; FLU, fluconazol, e AmB, anfotericina B; CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute; CIM: concentração inibitória mínima. Se o valor da CIM for inferior ao valor indicado na coluna "sensível", considera-se que o fungo é sensível ao antifúngico em causa. Se o valor da CIM for superior ao valor indicado na coluna "resistente", considera-se que o fungo é resistente ao antifúngico em causa.

Adaptado de *Fungal descriptions and antifungal susceptibility*¹⁹

observa-se uma clara suscetibilidade ao ITR e ao VOR, com valores de CIM de 0,5 µg/mL e 0,25 µg/mL, respetivamente.

COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

A análise da composição química revelou constituintes *major* - fenchona, cineol e cânfora no caso de LP, e geranial e neral no caso de CC, bem como vários constituintes *minor*. A [Tabela suplementar 3](#) mostra a composição química completa.

ENSAIO DE FASE SÓLIDA NA AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA ANTIFÚNGICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

A [Tabela 2](#) apresenta os IZDs dos OEs contra os agentes fúngicos selecionados, observados ao longo de 14 dias. A [Tabela 2A](#) refere-se ao OE de *Cymbopogon citratus* e a [Tabela 2B](#) ao OE de *Lavandula pedunculata*.

Tabela 2. Atividade antifúngica dos óleos essenciais contra fungos selecionados de queratite fúngica em diferentes concentrações (acima: *Cymbopogon citratus*; abaixo: *Lavandula pedunculata*).

Tabela 2A. Atividade antifúngica do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* contra fungos seleccionados de queratite fúngica em diferentes concentrações.

| Fungo | Dia | Diâmetro da Zona de Inibição (mm) | | | |
|---------------------------------|-----|-----------------------------------|------|------|------|
| | | 25% | 50% | 75% | 100% |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> | 3 | 90,0 | 90,0 | 90,0 | 90,0 |
| | 5 | 90,0 | 90,0 | 90,0 | 90,0 |
| | 7 | 90,0 | 90,0 | 90,0 | 90,0 |
| | 10 | 90,0 | 90,0 | 90,0 | 90,0 |
| | 14 | 90,0 | 90,0 | 90,0 | 90,0 |
| <i>Scedosporium apiospermum</i> | 3 | 90,0 | 90,0 | 90,0 | 90,0 |
| | 5 | 90,0 | 90,0 | 90,0 | 90,0 |
| | 7 | 90,0 | 90,0 | 90,0 | 90,0 |
| | 10 | 90,0 | 90,0 | 90,0 | 90,0 |
| | 14 | 90,0 | 90,0 | 90,0 | 90,0 |
| <i>Candida albicans</i> | 3 | 45,0 | 61,7 | 58,0 | 68,0 |
| | 5 | 50,7 | 64,3 | 63,0 | 71,6 |
| | 7 | 54,0 | 67,7 | 65,3 | 75,0 |
| | 10 | 55,0 | 69,3 | 68,7 | 77,7 |
| | 14 | 47,0 | 74,3 | 72,0 | 81,7 |
| <i>Candida parapsilosis</i> | 3 | 34,0 | 36,7 | 45,3 | 51,7 |
| | 5 | 39,3 | 41,7 | 48,3 | 56,7 |
| | 7 | 40,0 | 42,3 | 51,0 | 58,3 |
| | 10 | 42,3 | 45,0 | 52,0 | 60,7 |
| | 14 | 36,0 | 38,7 | 57,0 | 71,3 |

Tabela 2B. Atividade antifúngica do óleo essencial de *Lavandula Pedunculata* contra fungos seleccionados de queratite fúngica em diferentes concentrações.

| Fungo | Dia | Diâmetro da Zona de Inibição (mm) | | | |
|---------------------------------|-----|-----------------------------------|-------|------|------|
| | | 25% | 50% | 75% | 100% |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> | 3 | 90,0 | 90,0 | 90,0 | 90,0 |
| | 5 | 19,0 | 21,7 | 90,0 | 90,0 |
| | 7 | 16,7 | 20,7 | 40,0 | 54,7 |
| | 10 | 16,7 | 20,7 | 40,0 | 55,0 |
| | 14 | 16,0 | 20,7 | 35,7 | 46,0 |
| <i>Scedosporium apiospermum</i> | 3 | 90,0 | 90,0 | 90,0 | 90,0 |
| | 5 | 11,0 | 32,0 | 50,7 | 90,0 |
| | 7 | 11,7 | 21,0 | 29,0 | 41,0 |
| | 10 | 11,7 | 19,7 | 28,3 | 41,0 |
| | 14 | 11,7 | 19,7 | 26,7 | 37,3 |
| <i>Candida albicans</i> | 3 | 15,7 | 16,7 | 48,0 | 45,3 |
| | 5 | 17,0 | 19,7 | 31,7 | 30,3 |
| | 7 | 16,3 | 22,7 | 27,3 | 26,3 |
| | 10 | 16,3 | 18,3 | 26,7 | 26,3 |
| | 14 | 16,3 | 18,3 | 26,7 | 26,3 |
| <i>Candida parapsilosis</i> | 3 | 17,7 | 14,3 | 22,7 | 27,3 |
| | 5 | 18,7 | 15,0 | 17,0 | 21,7 |
| | 7 | 15,7 | 12,67 | 16,0 | 21,3 |
| | 10 | 15,0 | 11,7 | 15,3 | 21,3 |
| | 14 | 15,0 | 12,0 | 16,0 | 21,0 |

CYMBOPOGON CITRATUS

Relativamente ao OE de *Cymbopogon citratus*, as espécies *Aspergillus fumigatus* e *Scedosporium apiospermum* mostram-se altamente suscetíveis à atividade antifúngica deste OE. Houve uma inibição completa do crescimento fúngico em todas as concentrações, com zonas de inibição consistentemente a medir 90 mm (o diâmetro das placas de ágar) do 3º ao 14º dia (Fig. 2A).

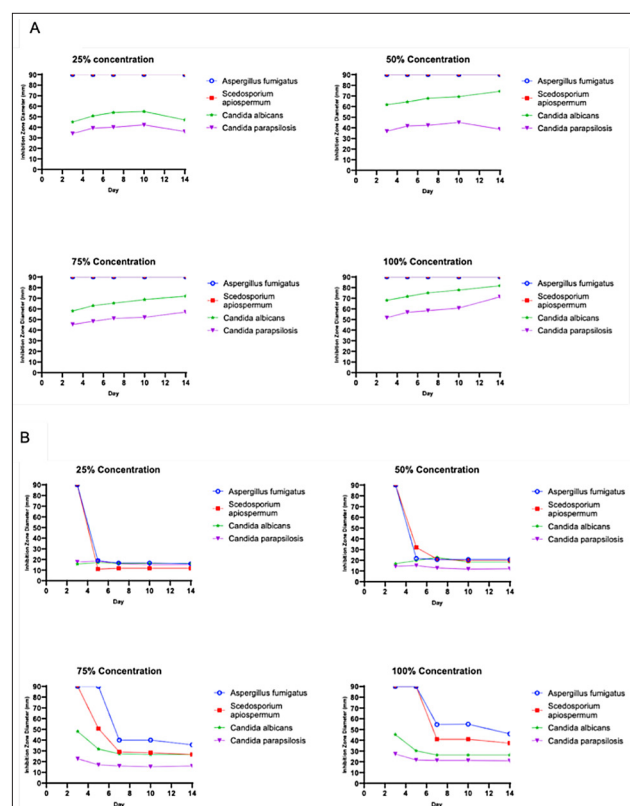


Figura 2. Atividade antifúngica dos óleos essenciais em diferentes concentrações ao longo de um período de 14 dias.

A: *Cymbopogon citratus*. B: *Lavandula pedunculata*. Cada ponto representa a média de 3 medições efetuadas.

Em contraste, o efeito antifúngico contra *Candida albicans* e *Candida parapsilosis* variou de acordo com a concentração e ao longo do tempo. Contra *Candida albicans*, o IZD aumentou com o tempo em todas as concentrações, mostrando efeito antifúngico progressivo. A concentração mais alta (100%) exibiu uma atividade antifúngica crescente com o tempo, com um IZD de 68 mm, ao 3º dia, a atingir 81,7 mm, ao 14º dia. A concentração de 50% também mostrou eficácia notável, com um IZD de 61,7 mm, ao 3º dia, que aumentou para 74,3 mm, ao 14º dia. As concentrações mais baixas apresentaram menor atividade antifúngica inicialmente, mas demonstraram um aumento consistente na eficácia ao longo do tempo. Para *Candida parapsilosis*, a atividade antifúngica foi menos pronunciada. Na concentração de 25%, o IZD variou de 34 mm, ao 3º dia, para 36 mm, ao 14º dia, indicando um

efeito antifúngico relativamente estável, mas mais modesto. A concentração de 100% mostrou um efeito mais significativo, com um IZD de 51,7 mm, ao 3º dia, a aumentar para 71,3 mm, ao 14º dia. A concentração de 75% mostrou um aumento gradual na atividade antifúngica, começando em 45,3 mm, ao 3º dia, e atingindo 57 mm, ao 14º dia.

A inibição completa e consistente observada para *Aspergillus fumigatus* e *Scedosporium apiospermum* sugere que o OE de *Cymbopogon citratus* é altamente eficaz contra estes fungos, independentemente da concentração. A resposta variável observada contra *Candida* spp. destaca uma suscetibilidade diferencial das leveduras ao OE, com concentrações mais altas geralmente a exibir maior atividade (Fig. 3). Além disso, o efeito progressivo ao longo do tempo sugere que a exposição contínua a concentrações mais altas pode ser necessária para otimização do efeito.

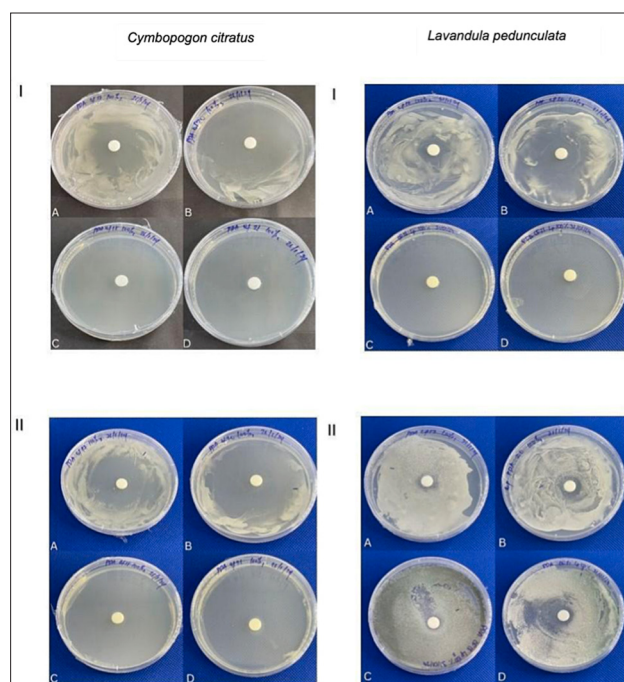


Figura 3. Variação do diâmetro da zona de inibição entre os organismos na presença de concentração de 100% de OE, observada ao 3º dia (I) e 14º dia (II) de incubação. À esquerda: *Cymbopogon citratus*. À direita: *Lavandula pedunculata*.

A: *Candida parapsilosis*; B: *Candida albicans*; C: *Scedosporium apiospermum*; D: *Aspergillus fumigatus*.

LAVANDULA PEDUNCULATA

Relativamente ao OE de *Lavandula pedunculata*, a resposta inicial de *Aspergillus fumigatus* a todas as concentrações do OE foi excepcionalmente alta (90 mm), com uma inibição completa do crescimento fúngico observada em todas as concentrações ao 3º dia. Foi observada uma redução significativa da atividade antifúngica ao longo do tempo para as concentrações mais baixas (25% e 50%), com os IZDs a diminuir para 16 mm e 20,7 mm, ao 14º dia, respetivamente.

te. Por outro lado, as concentrações de 75% e 100% mostraram uma eficácia sustentada, embora tenha sido notada uma diminuição no IZD, particularmente na concentração de 100%, de 90 mm para 46 mm, ao 14º dia (Figura 2B).

Scedosporium apiospermum apresentou uma suscetibilidade inicial alta semelhante em todas as concentrações do OE, com inibição completa do crescimento fúngico ao 3º dia. Ao longo do tempo, observou-se um declínio na eficácia, especialmente para concentrações mais baixas, com o IZD da concentração de 25% a diminuir para 11,7 mm, e o de 50% para 19,7 mm, ao 14º dia. A concentração mais alta manteve uma eficácia maior, mas também mostrou uma redução no IZD ao 14º dia, para 37,3 mm (Fig. 3).

Contra *Candida albicans*, a atividade antifúngica foi moderada em todas as concentrações, com a maior atividade observada nas concentrações de 75% e 100% inicialmente. A eficácia diminuiu ao longo do tempo, com o IZD para a concentração de 75% a reduzir para 26,7 mm ao 14º dia, e a concentração de 100% para 26,3 mm.

Candida parapsilosis demonstrou a menor suscetibilidade, com os IZDs iniciais a variar de 14,3 mm a 27,3 mm entre as concentrações. A eficácia geral permaneceu baixa ao longo do tempo.

Este OE possui uma elevada atividade antifúngica inicial contra fungos filamentosos em todas as concentrações, que diminui significativamente ao longo do tempo, especialmente nas concentrações mais baixas. A eficácia contra leveduras foi moderada e mostrou um declínio geral/estabilização ao longo do tempo, destacando assim a importância da concentração e da duração da exposição.

A eficácia de ambos os óleos essenciais foi analisada e comparada estatisticamente através do teste *one-way* ANOVA, originando um valor de *F* de 126,54 e *p*<0,001, o que sugere fortemente que há uma diferença significativa na eficácia dos óleos essenciais em inibir o crescimento dos fungos considerados (Fig. 4).

Através do teste de diferença significativa honesta de Tukey, a diferença nas médias dos diâmetros das zonas de inibição dos OEs foi de -39,9075 mm, com um *p*=0,001, confirmando assim a diferença estatisticamente significativa nos diâmetros entre OEs, e consequentemente a diferença na eficácia, a favor de CC.

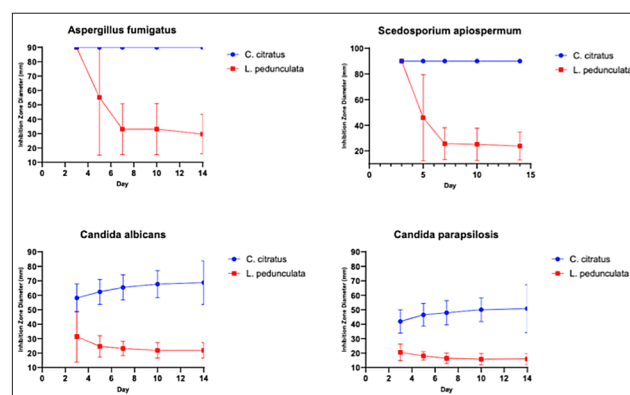


Figura 4. Diâmetro médio da zona de inibição dos óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* e *Lavandula pedunculata* ao longo de diferentes dias e concentrações.

DISCUSSÃO

Neste estudo, debruçamo-nos sobre os potenciais efeitos terapêuticos dos OEs na QF, aproveitando o seu histórico uso medicinal e as suas propriedades antimicrobianas documentadas, como alternativas promissoras às terapêuticas antifúngicas atuais. Esta abordagem é particularmente relevante face ao aumento da resistência antimicrobiana, uma ameaça à saúde global.

Na nossa amostra, as leveduras predominaram sobre os fungos filamentosos, contrariamente à literatura atual, onde os fungos filamentosos parecem predominar em geral, exceto nos casos pós-queratoplastia.^{23,24} Isto destaca a diversidade de agentes etiológicos em Portugal.

Relativamente a estudos anteriores, foi demonstrado que o OE de camomila é eficaz contra *Aspergillus niger*,²⁵ e o óleo essencial de *C. zeylanicum* mostrou uma forte atividade contra *Fusarium*, bem como uma inibição incrementada do crescimento fúngico quando associado à natamicina.¹⁰ O eugenol, o principal componente do óleo de cravo, reduziu a gravidade da queratite fúngica em ratos, a infiltração de células inflamatórias, a expressão de citocinas pró-inflamatórias e a carga fúngica.²⁶

A eficácia superior e sustentada do OE de *Cymbopogon citratus* contra um amplo espectro de fungos sublinha o seu potencial como um agente antifúngico altamente eficaz, particularmente contra fungos filamentosos, que são frequentemente mais difíceis de tratar devido às suas estruturas complexas e mecanismos de resistência. O efeito antifúngico progressivo observado contra *Candida albicans* sugere que este OE também pode exercer um efeito inibidor a longo prazo sobre o crescimento fúngico, simplificando os regimes de tratamento e reduzindo a necessidade de intervenções específicas para cada fungo. Por outro lado, os resultados obtidos com o OE de *Lavandula pedunculata* destacam o papel crítico da concentração e da duração da exposição na obtenção e manutenção da eficácia antifúngica. A atividade inicial potente do OE de *Lavandula pedunculata* e a redução observada na eficácia ao longo do tempo tornam este OE adequado para terapêuticas combinadas, intervenções de curto prazo e terapêuticas dirigidas.

Uma inferência significativa dos nossos resultados é a ação multialvo potencial dos OEs, desestabilizando as membranas celulares, inibindo a germinação de esporos e interferindo no metabolismo fúngico, apresentando vantagens significativas em relação aos antifúngicos convencionais, que muitas vezes têm um único alvo celular, tornando-os suscetíveis à resistência.^{12,13}

O presente estudo é inovador e altamente relevante, considerando o *burden* económico da QF, que é frequentemente mais pronunciado que o da queratite bacteriana.²⁷ De facto, os custos associados à queratite microbiana são, em geral, elevados,²⁸ especialmente quando fúngica, que resulta nos maiores custos totais.²⁹ Além disso, os medicamentos antifúngicos exibiram grandes aumentos de preço ajustados pela inflação nos últimos 20 anos,³⁰ pelo que tratamentos alternativos mais baratos e eficazes devem ser implementados. Acreditamos que os OEs podem constituir um tratamento

com uma boa relação custo-eficácia e, adicionalmente, podem promover a conservação da biodiversidade destes repositórios de compostos bioativos. Outro foco importante a considerar será o método de extração.³¹ A extração mais comumente realizada é por maceração convencional com solventes não-verdes provenientes de recursos não-renováveis, que têm um impacto ambiental.³² Métodos de extração baseados na química verde têm emergido como uma alternativa ao método convencional, ao reduzir solventes perigosos e limitar o custo da eliminação de resíduos de solventes.³³ Neste sentido, é necessário um esforço global e abordagens multidisciplinares, nomeadamente etnobotânica, fitoquímica, microbiologia, farmacologia e medicina, para explorar todas as potencialidades oferecidas pelos produtos naturais perante os desafios contemporâneos da saúde.

Os OEs não devem ser vistos como agentes terapêuticos isolados, mas sim como adjuvantes e sinérgicos. Encontram-se em desenvolvimento outras áreas que podem constituir-se como aliados dos OEs no tratamento da QF.³⁴ A cloroheixidina, um agente antisséptico, tem sido usada com eficácia em vários ensaios clínicos,³⁵⁻³⁷ demonstrando ser eficaz na fase de "esterilização" inicial; no entanto, o tratamento prolongado pode atrasar a reepitelização, pelo que uma concentração reduzida ou uma menor frequência de administração após a dose de carga inicial pode levar a melhores resultados.³⁸ O uso tópico de iodopovidona a 5% foi relatado como eficaz para a QF resistente ao voriconazol,³⁹ sendo usada no nosso departamento como terapêutica de resgate. Relativamente a nanopartículas, etossomas encapsulados com verde de indocianina e anfotericina B foram criados na tentativa de alcançar uma terapêutica fototérmica combinada para a QF, tendo exibido efeitos antifúngicos sinérgicos e sustentados.⁴⁰ Transportadores lipídicos nanoestruturados carregados com itraconazol também foram testados para administração oral, com menos efeitos

secundários locais e maior liberação do fármaco.⁴¹ Uma lente de contacto híbrida terapêutica à base de hidrogel com voriconazol⁴² e um protótipo de lente de contacto com econazol⁴³ foram apontados como promissores. O *cross-linking* foi também considerado um tratamento com atividade antimicrobiana, ação anti-inflamatória e indução de maior resistência corneana à degradação enzimática.⁴⁴ No entanto, apesar de alguns estudos terem demonstrado uma utilidade como terapêutica adjuvante,⁴⁵⁻⁴⁷ um estudo randomizado e controlado (o ensaio *Cross-Linking Assisted Infection Reduction Trial*), concluiu que o *cross-linking* não oferece vantagem adicional e pode levar a piores outcomes visuais.⁴⁸

As limitações do nosso estudo estão relacionadas com a falta de compreensão dos mecanismos celulares subjacentes aos efeitos antifúngicos de cada componente dos OEs, bem como a sua potencial toxicidade. Estudos futuros devem incluir avaliações toxicológicas e ensaios clínicos para estabelecer normas de segurança e dosagem, possibilitando a extrapolação segura destes resultados para a prática clínica. Pretendemos também incluir outros centros hospitalares do país, para melhor caracterizar a etiologia das infeções fúngicas à escala nacional e a sua resposta aos OE, já que estes são dados fortemente influenciados pela geografia.

Os nossos resultados fornecem dados promissores sobre o potencial dos OEs como tratamentos eficazes para a QF. Contribuímos assim para o conhecimento crescente sobre o potencial antifúngico destes produtos naturais, abrindo caminho para tratamentos mais eficazes e seguros. Na medida em que continuamos a enfrentar o flagelo da resistência antimicrobiana, este trabalho oferece esperança, ilustrando como o mundo natural pode melhorar a saúde humana. A integração da medicina tradicional com os avanços da medicina moderna oferece soluções para o estabelecimento sólido de tratamentos inovadores, eficazes e acessíveis para a QF.

Tabela suplementar 1. Breve sumário dos Óleos Essenciais comuns originários de plantas e os seus compostos ativos.

| Nome científico | Óleo essencial | Compostos ativos |
|-------------------------------|-----------------|--|
| <i>Lavandula angustifolia</i> | Lavender | Linalool, linalyl acetate, terpinen-4-ol, β -ocimene, camphor |
| <i>Mentha piperita</i> | Peppermint | Menthol, menthone, menthyl acetate, 1,8-cineole, limonene |
| <i>Melaleuca alternifolia</i> | Tea Tree | Terpinen-4-ol, γ -terpinene, α -terpinene, 1,8-cineole, p-cymene |
| <i>Eucalyptus globulus</i> | Eucalyptus | 1,8-cineole, α -pinene, limonene, α -terpineol, globulol |
| <i>Citrus limon</i> | Lemon | Limonene, β -pinene, γ -terpinene, α -pinene, sabinene |
| <i>Boswellia carterii</i> | Frankincense | α -pinene, limonene, α -thujene, β -pinene, myrcene |
| <i>Rosmarinus officinalis</i> | Rosemary | α -pinene, camphor, 1,8-cineole, β -pinene, borneol |
| <i>Matricaria chamomilla</i> | Chamomile | α -bisabolol, chamazulene, apigenin, luteolin, quercetin |
| <i>Cananga odorata</i> | Ylang-Ylang | Linalool, geranyl acetate, caryophyllene, p-cresyl methyl ether, methyl benzoate |
| <i>Citrus bergamia</i> | Bergamot | Linalool, linalyl acetate, limonene, γ -terpinene, β -pinene |
| <i>Salvia sclarea</i> | Clary Sage | Linalyl acetate, linalool, α -terpineol, geranyl acetate, sclareol |
| <i>Pelargonium graveolens</i> | Geranium | Citronellol, geraniol, linalool, menthone, citronellyl formate |
| <i>Cupressus sempervirens</i> | Cypress | α -pinene, carene, limonene, terpinolene, sabinene |
| <i>Juniperus communis</i> | Juniper Berry | α -pinene, sabinene, myrcene, limonene, β -pinene |
| <i>Santalum album</i> | Sandalwood | α -santalol, β -santalol, epi- β -santalol, α -trans-bergamotol, β -trans-bergamotol |
| <i>Pogostemon cablin</i> | Patchouli | Patchoulol, α -bulnesene, α -guaiene, α -patchoulene, seychellene |
| <i>Vetiveria zizanioides</i> | Vetiver | Khusimol, isovalencenol, α -vetivone, β -vetivone, vetiselinol |
| <i>Anthemis nobilis</i> | Roman Chamomile | α -bisabolol, chamazulene, apigenin, luteolin, quercetin |
| <i>Zingiber officinale</i> | Ginger | α -zingiberene, β -sesquiphellandrene, ar-curcumenene, β -bisabolene, β -sesquiphellandrene |

Tabela suplementar 2. Sumário dos fungos isolados e respetiva análise de similaridade.

| Referência do isolado | Espécie fúngica | Similaridade NCBI BLAST® (%) |
|-----------------------|---------------------------------|------------------------------|
| 0,012 | <i>Candida albicans</i> | 99,81 |
| 0,013 | <i>Candida parapsilosis</i> | 100,00 |
| 0,014 | <i>Beauveria bassiana</i> | 99,82 |
| 0,015 | <i>Candida parapsilosis</i> | 100,00 |
| 0,016 | <i>Candida albicans</i> | 100,00 |
| 0,017 | <i>Candida parapsilosis</i> | 100,00 |
| 0,018 | <i>Scedosporium apiospermum</i> | 100,00 |
| 0,019 | <i>Candida albicans</i> | 99,81 |
| 0,020 | <i>Candida albicans</i> | 99,81 |
| 0,021 | <i>Aspergillus sp.</i> | 97,90 |
| 0,03A | <i>Epicoccum nigrum</i> | 99,81 |
| 0,04A | <i>Dicyma olivacea</i> | 99,63 |
| 0,04B | <i>Dicyma olivacea</i> | 99,81 |
| 0,03B | <i>Penicillium tealii</i> | 99,57 |

Tabela suplementar 3. Composição química de *Lavandula pedunculata* e *Cymbopogon citratus* por percentagem e respetivos índices de retenção (RI).

| Composto | RI | Composição (%) | |
|------------------|------|------------------------------|----------------------------|
| | | <i>Lavandula pedunculata</i> | <i>Cymbopogon citratus</i> |
| α -pinene | 1116 | 0,2 | - |
| 1,8-cineole | 1215 | 12 | - |
| Fenchone | 1400 | 49,5 | - |
| Linalool | 1542 | 2,4 | 0,7 |
| Camphor | 1514 | 15 | - |
| Cis-verbenol | 1645 | 0,2 | - |
| Trans-verbenol | 1669 | 2 | - |
| Borneol | 1692 | 0,3 | - |
| Myrtenal | 1621 | 0,8 | - |
| 8-cadinol | 2218 | 0,2 | - |
| β -Myrcene | 988 | - | 11 |
| Neral | 1238 | - | 34,6 |
| Geraniol | 1253 | - | 1,9 |
| Geranial | 1267 | - | 48,1 |

"-" indica que determinado composto não foi detetado ou não se aplica ao óleo essencial em questão.

AGRADECIMENTOS / ACKNOWLEDGMENTS

Os autores agradecem à Sociedade Portuguesa de Oftalmologia (SPO) o financiamento deste projeto através da Bolsa de Apoio para Investigação Clínica em 2022.

DECLARAÇÃO DE CONTRIBUIÇÃO / CONTRIBUTORSHIP STATEMENT

CC e EA: Responsáveis pela colheita de dados e amostras, apresentação dos resultados e redação do manuscrito.

CC, JPC, AR, EC, JG, MJQ: Responsáveis pela orientação

clínica dos doentes e colheita de amostras.

AR e EJC: Conceção, desenho do estudo, revisão do manuscrito, supervisão do projeto e contribuição com expertise para a sua conclusão.

DP, NM, CCa, AC, RT, EJC: Gestão de dados laboratoriais. Todos os autores leram e aprovaram o manuscrito final.

CC and EA: Responsible for collecting data and samples, presenting the results and writing the manuscript.

CC, JPC, AR, EC, JG, MJQ: Responsible for clinical guidance of patients and sample collection.

AR and EJC: Conception, design of the study, review of the manuscript, supervision of the project and contribution of expertise to its completion.

DP, NM, CCa, AC, RT, EJC: Laboratory data management. All authors: read and approved the final manuscript.

RESPONSABILIDADES ÉTICAS

Conflitos de Interesse: Os autores declaram a inexistência de conflitos de interesse na realização do presente trabalho.

Fontes de Financiamento: Projeto financiado pela Sociedade Portuguesa de Oftalmologia (SPO), através de uma Bolsa de Apoio para Investigação Clínica em 2022.

Confidencialidade dos Dados: Os autores declaram ter seguido os protocolos da sua instituição acerca da publicação dos dados de doentes.

Proteção de Pessoas e Animais: Os autores declaram que os procedimentos seguidos estavam de acordo com os regulamentos estabelecidos pela Comissão de Ética responsável e de acordo com a Declaração de Helsínquia revista em 2024 e da Associação Médica Mundial.

Proveniência e Revisão por Pares: Não comissionado; revisão externa por pares.

ETHICAL DISCLOSURES

Conflicts of Interest: The authors have no conflicts of interest to declare.

Financing Support: Project funded by the Portuguese Society of Ophthalmology (SPO), through a Grant for Clinical Research in 2022.

Confidentiality of Data: The authors declare that they have followed the protocols of their work center on the publication of patient data.

Protection of Human and Animal Subjects: The authors declare that the procedures followed were in accordance with the regulations of the relevant clinical research ethics committee and those of the Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki as revised in 2024).

Provenance and Peer Review: Not commissioned; externally peer-reviewed.

REFERENCES

- Acharya Y, Acharya B, Karki P. Fungal keratitis: study of increasing trend and common determinants. *Nepal J Epidemiol*. 2017;7: 685–93.
- Xie L, Zhong W, Shi W, Sun S. Spectrum of fungal keratitis in north China. *Ophthalmology*. 2006;113: 1943–1948.
- Gopinathan U, Ramakrishna T, Willcox M, Rao CM, Balasubramanian D, Kulkarni A, et al. Enzymatic, clinical and histologic evaluation of corneal tissues in experimental fungal keratitis in rabbits. *Exp Eye Res*. 2001;72: 433–42.
- Ferrer C, Alió JL. Evaluation of molecular diagnosis in fungal keratitis. Ten years of experience. *J Ophthalmic Inflamm Infect*. 2011;1: 15–22.
- Awad R, Ghaith AA, Awad K, Mamdouh Saad M, Elmassry AA. Fungal keratitis: Diagnosis, management, and recent advances. *Clin Ophthalmol*. 2024;18: 85–106. doi: 10.2147/OPTH.S447138
- Deshmukh R, Stevenson L, Vajpayee R. Management of corneal perforations: An update. *Indian J Ophthalmol*. 2020;68: 7. doi: 10.4103/ijo.IJO_1151_19.
- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils—a review. *Food Chem Toxicol*. 2008;46: 446–75.
- Ramsey JT, Shropshire BC, Nagy TR, Chambers KD, Li Y, Korach KS. Essential oils and health. *Yale J Biol Med*. 2020;93: 291–305.
- Kajjari S, Joshi RS, Hugar SM, Gokhale N, Meharwade P, Uppin C. The effects of lavender essential oil and its clinical implications in dentistry: a review. *Int J Clin Pediatr Dent*. 2022;15: 385–8. doi: 10.5005/jp-journals-10005-2378.
- Homa M, Fekete IP, Böszörményi A, Singh YRB, Selvam KP, Shobana CS, et al. Antifungal effect of essential oils against *Fusarium keratitis* isolates. *Planta Med*. 2015;81: 1277–1284.
- Tyagi AK, Malik A. Antimicrobial potential and chemical composition of *Eucalyptus globulus* oil in liquid and vapour phase against food spoilage microorganisms. *Food Chem*. 2011;126: 228–235.
- Kumar P, Mishra S, Kumar A, Sharma AK. Antifungal efficacy of plant essential oils against stored grain fungi of *Fusarium* spp. *J Food Sci Technol*. 2016;53: 3725–3734.
- Zuzarte M, Salgueiro L. Essential oils in respiratory mycosis: A review. *Molecules*. 2022;27: 4140. doi: 10.3390/molecules27134140.
- Pattnaik S, Subramanyam VR, Kole C. Antibacterial and antifungal activity of ten essential oils in vitro. *Microbios*. 1996;86: 237–46.
- Marouf RS, Mbarga JAM, Ermolaev AV, Podoprigrora IV, Smirnova IP, Yashina NV, et al. Antibacterial Activity of Medicinal Plants against Uropathogenic *Escherichia coli*. *J Pharm Bioallied Sci*. 2022;14: 1–12. doi: 10.4103/jpbs.jpbs_124_21.
- Cavanagh HMA, Wilkinson JM. Biological activities of lavender essential oil. *Phytother Res*. 2002;16: 301–308.
- Cox-Georgian D, Ramadoss N, Dona C, Basu C. Therapeutic and medicinal uses of terpenes. *Medicinal Plants*. 2019; 333–359.
- BLAST: Basic Local Alignment Search Tool. Bethesda: National Center Biotechnology Information; 2024.
- Fungal descriptions and antifungal susceptibility. In: *Mycology* | University of Adelaide [Internet]. [cited 29 Sep 2024]. Available: <https://www.adelaide.edu.au/mycology/fungal-descriptions-and-antifungal-susceptibility>
- CLSI. Performance standards for antifungal susceptibility testing of yeasts. *CLSI supplement M60*. 2017.
- Rex JH. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi: approved standard. (No Title). 2008. [cited 29 Sep 2024] Available: <https://cir.nii.ac.jp/crid/1130000793857084928>
- Shah G, Shri R, Panchal V, Sharma N, Singh B, Mann AS. Scientific basis for the therapeutic use of *Cymbopogon citratus*, stapf (Lemon grass). *J Adv Pharm Technol Res*. 2011;2: 3–8.
- Ahmadikia K, Aghaei Gharehbolagh S, Fallah B, Naeimi Es-hkaleti M, Malekifar P, Rahsepar S, et al. Distribution, prevalence, and causative agents of fungal keratitis: A systematic review and meta-analysis (1990 to 2020). *Front Cell Infect Microbiol*. 2021;11: 698780. doi: 10.3389/fcimb.2021.698780.
- Soleimani M, Izadi A, Khodavaisy S, Dos Santos CO, Tehupeiory-Kooreman MC, Ghazvini RD, et al. Fungal keratitis in Iran: Risk factors, clinical features, and mycological profile. *Front Cell Infect Microbiol*. 2023;13: 1094182. doi: 10.3389/fcimb.2023.1094182.
- El-Badry AS, Ali SS. Essential Oils: A Promising Remedy against Fungal and Bacterial Human Keratitis. 2015;II: 403–431.
- Yu B, Li C, Gu L, Zhang L, Wang Q, Zhang Y, et al. Eugenol protects against *Aspergillus fumigatus* keratitis by inhibiting inflammatory response and reducing fungal load. *Eur J Pharmacol*. 2022;924: 174955. doi: 10.1016/j.ejphar.2022.174955.
- Radhakrishnan N, Pathak N, Subramanian KR, Das DR, Nin-

- gombam R, Khaitan I, et al. Comparative study on costs incurred for treatment of patients with bacterial and fungal keratitis - A retrospective analysis. *Indian J Ophthalmol*. 2022;70: 1191–5. doi: 10.4103/ijo.IJO_2176_21.
28. Ashfaq H, Maganti N, Ballouz D, Feng Y, Woodward MA. Procedures, visits, and procedure costs in the management of microbial keratitis. *Cornea*. 2021;40: 472–6. doi: 10.1097/ICO.0000000000002534.
29. Chantra S, Jittreprasert S, Chotcomwongse P, Amornpetcharasathaporn A. Estimated direct and indirect health care costs of severe infectious keratitis by cultured organisms in Thailand: An 8-year retrospective study. *PLoS One*. 2023;18: e0288442. doi: 10.1371/journal.pone.0288442.
30. Thomas CM, Shae W, Koestler D, DeFor T, Bahr NC, Alpern JD. Antifungal drug price increases in the United States, 2000–2019. *Mycoses*. 2022;65: 859–65. doi: 10.1111/myc.13486.
31. Vilas-Boas AA, Gómez-García R, Machado M, Nunes C, Ribeiro S, Nunes J, et al. Lavandula pedunculata polyphenol-rich extracts obtained by conventional, MAE and UAE methods: Exploring the bioactive potential and safety for use as a medicine plant as food and nutraceutical ingredient. *Foods*. 2023;12: 4462.
32. Alara OR, Abdurahman NH, Ukaegbu CI. Extraction of phenolic compounds: A review. *Curr Res Food Sci*. 2021;4: 200–214.
33. Castiello C, Junghanns P, Mergel A, Jacob C, Ducho C, Valente S, et al. GreenMedChem: the challenge in the next decade toward eco-friendly compounds and processes in drug design. *Green Chem*. 2023;25: 2109–69.
34. Ghenciu LA, Faur AC, Bolintineanu SL, Salavat MC, Maghiari AL. Recent advances in diagnosis and treatment approaches in fungal keratitis: A narrative review. *Microorganisms*. 2024;12. doi:10.3390/microorganisms12010161
35. Martin MJ, Rahman MR, Johnson GJ, Srinivasan M, Clayton YM. Mycotic keratitis: susceptibility to antiseptic agents. *Int Ophthalmol*. 1995;19: 299–302.
36. Hoffman JJ, Yadav R, Sanyam SD, Chaudhary P, Roshan A, Singh SK, et al. Topical chlorhexidine 0.2% versus topical natamycin 5% for the treatment of fungal keratitis in Nepal: A randomized controlled noninferiority trial. *Ophthalmology*. 2022;129: 530–41. doi: 10.1016/j.ophtha.2021.12.004.
37. Hoffman JJ, Yadav R, Das Sanyam S, Chaudhary P, Roshan A, Singh SK, et al. Topical chlorhexidine 0.2% versus topical natamycin 5% for fungal keratitis in Nepal: rationale and design of a randomised controlled non-inferiority trial. *BMJ Open*. 2020;10: e038066. doi: 10.1136/bmjopen-2020-038066.
38. Hoffman JJ, Arunga S, Mohamed Ahmed AHA, Hu VH, Burton MJ. Management of filamentous fungal keratitis: A pragmatic approach. *J Fungi*. 2022;8: 1067.
39. Ramachandirane B, Chandrika YM, Najeeb S. Successful management of fungal keratitis caused by multidrug-resistant *Cladosporium* species using povidone-iodine. *Cornea*. 2024;43: 125–8. doi: 10.1097/ICO.0000000000003390.
40. Sushma MV, Sankaranarayanan SA, Bantal V, Pemmaraju DB, Rengan AK. Ethosomal nanoformulations for combinational photothermal therapy of fungal keratitis. *Adv Ther*. 2023; 2200331.
41. Nakarani M, Misra AK, Patel JK, Vaghani SS. Itraconazole nanosuspension for oral delivery: Formulation, characterization and in vitro comparison with marketed formulation. *Daru*. 2010;18: 84–90.
42. Huang J-F, Zhong J, Chen G-P, Lin Z-T, Deng Y, Liu Y-L, et al. A hydrogel-based hybrid theranostic contact lens for fungal keratitis. *ACS Nano*. 2016;10: 6464–73.
43. Ciolino JB, Hudson SP, Mobbs AN, Hoare TR, Iwata NG, Fink GR, et al. A prototype antifungal contact lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52: 6286–91.
44. Hung JH, Lee CN, Hsu HW, Ng I-S, Wu CJ, Yu CK, et al. Recent advances in photodynamic therapy against fungal keratitis. *Pharmaceutics*. 2021;13: 2011. doi: 10.3390/pharmaceutics13122011.
45. González Castellanos JC, Osaba M, Reviglio V, Canchi MT, Arrigone MC, Reviglio VE. Early treatment of bilateral fungal keratitis with corneal cross-linking as adjuvant therapy. *Oxf Med Case Rep*. 2020;2020: omaa032.
46. Mikropoulos DG, Kymionis GD, Voulgari N, Kaisari E, Nikolakopoulos KA, Katsanos A, et al. Intraoperative photoactivated chromophore for infectious keratitis-corneal cross-linking (PACK-CXL) during penetrating keratoplasty for the management of fungal keratitis in an immunocompromised patient. *Ophthalmol Ther*. 2019;8: 491–5. doi: 10.1007/s40123-019-0196-4.
47. Jeyalatha Mani V, Parthasarathy D, Padmanabhan P, Narayanan N, Lakshmiopathy M, Pachayappan SK, et al. Therapeutic effect of corneal crosslinking on fungal keratitis: Efficacy of corneal collagen crosslinking as an adjuvant therapy for fungal keratitis in a tertiary eye hospital in south India. *Ocul Immunol Inflamm*. 2021;29: 1648–55.
48. Prajna NV, Radhakrishnan N, Lalitha P, Austin A, Ray KJ, Keenan JD, et al. Cross-linking-assisted infection reduction: A randomized clinical trial evaluating the effect of adjuvant cross-linking on outcomes in fungal keratitis. *Ophthalmology*. 2020;127: 159–66. doi: 10.1016/j.ophtha.2019.08.029.



**Corresponding Author/
Autor Correspondente:**

Celso Costa

Departamento de Oftalmologia,
Unidade Local de Saúde de Coimbra
Praceta Professor Mota Pinto
3000-075 Coimbra, Portugal
E-mail: celsomiguelcosta@hotmail.com



ORCID: 0000-0002-7111-1002