

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE**

Rebeca Mól Lima

**Óleos essenciais como alternativa inovadora para o tratamento da
esporotricose**

**Juiz de Fora
2017**

Rebeca Mól Lima

Óleos essenciais como alternativa inovadora para o tratamento da esporotricose

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Saúde. Área de concentração: Saúde Brasileira.

Orientadora: Prof^a Dr^a Nádia Rezende Barbosa Raposo

Juiz de Fora

2017

Rebeca Mól Lima

Óleos essenciais como alternativa inovadora para o tratamento da esporotricose

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Saúde. Área de concentração: Saúde Brasileira

Aprovada em: ____ de _____ de 2017

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Nádia Rezende Barbosa Raposo (Orientadora)
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Murilo Gomes Oliveira (titular)
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof.^a Dr.^a Francislene Juliana Martins (titular)
Colégio Conexão

Aos meus portos seguros, Lucas,
Luke e Molly.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelas oportunidades concedidas e força para superar todos os obstáculos. Pelo aprendizado, crescimento profissional, e amizades ao longo desses dois anos.

A minha família, em especial à minha mãe Imaculada pelo apoio incondicional em todos os aspectos da minha vida, sendo meu maior exemplo de honestidade, integridade, compaixão e amor. Aos meus irmãos, de sangue e coração, Elga e Bráulio, que mesmo de longe estiveram presentes a cada passo. A minha Vó Ruth, segunda mãe, pelo carinho de sempre. E ao amor da minha vida, Lucas, minha dose de alegria diária, meu porto seguro e minha companhia de todas as horas, cujo amor e dedicação foram os pilares das minhas conquistas.

À professora Dr^a. Nádia Raposo, minha orientadora, exemplo profissional e pessoal, por toda sua dedicação, ensinamentos, amizade e convívio nessa jornada.

Nada disso seria possível sem sua contribuição.

À melhor companheira de laboratório, Jordana, amiga de todas as horas, pelo convívio, experimentos e viagens. Sua contribuição ultrapassa os aspectos acadêmicos. E ao estagiário e amigo, William, por todos os experimentos e conversas. Sua ajuda foi essencial nesse trabalho e na vida.

Aos amigos do Nupics, Hudson, Michele, Priscila, Fran, Alexandre, Hanny e César, pelos ensinamentos e amizade, vocês tornaram nossa caminhada muito mais leve.

Aos membros da banca pela disponibilidade e colaboração.

À CAPES, pela bolsa de mestrado concedida.

E a todos aqueles que de alguma forma torcem por mim e contribuem para cada passo novo.

“O êxito da vida não se mede pelo caminho que você conquistou, mas sim pelas dificuldades que superou no caminho.”

Abraham Lincoln

RESUMO

A esporotricose é uma micose subcutânea de evolução subaguda a crônica capaz de afetar seres humanos e animais. Distribuída mundialmente, possui maior prevalência nas áreas de clima tropical e temperado, sendo a micose subcutânea mais comum na América do Sul. Seus agentes etiológicos são fungos do complexo *Sporothrix schenckii*, saprófitas e dimórficos, encontrados no ambiente. No Brasil, o aumento exponencial dos casos em humanos e animais vem sendo observado nas últimas décadas. Nos arredores do estado do Rio de Janeiro, já é observada uma epidemia de origem zoonótica. Aliado a isso, o tratamento desta micose vem sendo motivo de preocupação. O alto custo e toxicidade dos medicamentos, o tempo prolongado de tratamento, e o surgimento de linhagens resistentes aos fármacos de escolha justificam a demanda crescente pela descoberta de novos fármacos. Neste contexto, o presente estudo tem como objetivo identificar os componentes dos óleos essenciais de *Myrtus communis* L. e *Thymus vulgaris* L., investigar seus potenciais antifúngicos *in vitro* frente às principais linhagens causadoras de esporotricose no Brasil, e determinar a citotoxicidade preliminar dos óleos essenciais. Os óleos essenciais de mirta e tomilho foram obtidos comercialmente. O perfil cromatográfico obtido por CG para os dois óleos indicou elevados valores de monoterpenos, 87,1% para a mirta e 98,8% para o tomilho, tendo como componentes majoritários o 1-8 cineol e o timol, respectivamente. Para a avaliação da atividade antifúngica foram utilizadas as seguintes linhagens fúngicas: *Sporothrix schenckii* ATCC 1099-18, *Sporothrix schenckii* IPEC 15383, *Sporothrix brasiliensis* ATCC 5110 e *Sporothrix brasiliensis* IPEC 17943 e duas linhagens clínicas de *Sporothrix schenckii*, denominadas genericamente como A e B. O óleo essencial de mirta apresentou atividade antifúngica frente a todas as linhagens em concentrações que variaram de 31,25 a 62,5 µg/mL. Foi observada atividade fungicida frente a todas as linhagens em concentrações acima de 62,5 µg/mL. O óleo essencial de tomilho foi capaz de inibir todas as linhagens em concentrações que variaram de 125 a 250 µg/mL. Foi observada atividade fungicida frente a todas as linhagens em concentrações acima de 250 µg/mL. A anfotericina B e o itraconazol foram utilizados como fármacos de referência. Para estes foi observado que somente duas das linhagens estudadas apresentaram susceptibilidade à anfotericina B e ao itraconazol, todas as linhagens estudadas foram consideradas resistentes, com valores de CIM > 16 µg/mL. Estes resultados sugerem indícios de resistência fúngica das linhagens estudadas em relação aos fármacos de referência empregados no tratamento da esporotricose. As microscopias eletrônicas de varredura das linhagens fúngicas revelaram que, tanto nos fungos expostos aos tratamentos experimentais, quanto naqueles expostos aos fármacos de referência, deformidades na estrutura fúngica quando comparadas ao grupo não tratado foram observadas. Em relação aos ensaios de citotoxicidade realizados com queratinócitos humanos (HACAT) pelo método de redução do MTT, os óleos não apresentaram citotoxicidade nas concentrações equivalentes a seus valores de CIM.

Palavras-chave: Esporotricose, ação antifúngica, *Sporothrix schenckii*, *Sporothrix brasiliensis*, *Myrtus communis*, *Thymus vulgaris*.

ABSTRACT

Sporotrichosis is a subcutaneous mycosis with subacute to chronic evolution that can affect humans and animals. Distributed worldwide, it is more prevalent in tropical and temperate climates, being the most common subcutaneous mycosis in South America. Its etiological agents are fungi of the *Sporothrix schenckii* complex, saprophytic and dimorphic, found in the environment. In Brazil, the exponential increase in cases in humans and animals has been observed in recent decades. In the surroundings of the state of Rio de Janeiro, an epidemic of zoonotic origin is already observed. Allied to this, the treatment of this mycosis has been cause of concern. The high cost and toxicity of the drugs, the prolonged treatment time, and the emergence of resistant strains on drugs of choice justify the growing demand for the discovery of new drugs. In this context, the present study aims to identify the components of the essential oils of *Myrtus communis* L. and *Thymus vulgaris* L., to investigate their antifungal potentials in vitro against the main sporotrichosis strains in Brazil, and to determine the preliminary cytotoxicity of essential oils. The essential oils of myrtle and thyme were obtained commercially. The chromatographic profile obtained by GC for the two oils showed high values of monoterperene, 87.1% for myrtle and 98.8% for thyme, with 1-8 cineole and thymol, respectively. The following fungal strains were used: *Sporothrix schenckii* ATCC 1099-18, *Sporothrix schenckii* IPEC 15383, *Sporothrix brasiliensis* ATCC 5110 and *Sporothrix brasiliensis* IPEC 17943 and two clinical strains of *Sporothrix schenckii*, referred as A and B. Myrtle essential oil showed antifungal activity against all strains at concentrations ranging from 31.25 to 62.5 µg / mL. Fungicidal activity against all strains was observed at concentrations above 62.5 µg / mL. Thyme essential oil was able to inhibit all lineages at concentrations ranging from 125 to 250 µg / ml. Fungicidal activity was observed against all strains at concentrations above 250 µg / mL. Amphotericin B and itraconazole were used as standard drugs. For these, it was observed that only two of the studied strains showed susceptibility to amphotericin B and itraconazole, all strains studied were considered resistant, with MIC values > 16 µg / mL. These results suggest evidence of fungal resistance of the lines studied in relation to the reference drugs used in the treatment of sporotrichosis. Scanning electron microscopy of fungal lines revealed that, both in the fungi exposed to the experimental treatments and in those exposed to the reference drugs, deformities in the fungal structure when compared to the untreated group were observed. In relation to the cytotoxicity assays performed with human keratinocytes (HACAT) by the MTT reduction method, the oils did not present cytotoxicity at concentrations equivalent to their MIC values.

Keywords: Sporotrichosis, antifungic activity, *Sporothrix schenckii*, *Sporothrix brasiliensis*, *Myrtus communis*, *Thymus vulgaris*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Prevalência da esporotricose pelo mundo.....	20
Figura 2 – Distribuição global de <i>Sporothrix brasiliensis</i> , <i>Sporothrix globosa</i> , <i>Sporothrix schenckii</i> clado IIa, e <i>Sporothrix schenckii</i> clado IIb.	22
Figura 3 – Análise macroscópica de colônias de fase miceliana e leveduriforme de <i>Sporothrix schenckii</i>	26
Figura 4 – Análise microscópica de fase miceliana e leveduriforme de <i>Sporothrix</i> sp.	27
Figura 5 – Manifestações clínicas observadas em pacientes com esporotricose cutânea fixa e linfocutânea.	33
Figura 6 – Manifestações clínicas observadas em pacientes com esporotricose cutânea disseminada.	34
Figura 7 – Esporotricose felina.	36
Figura 8 – <i>Myrtus communis</i> L.	44
Figura 9 – <i>Thymus vulgaris</i> L.	47
Figura 10 – Macroscopia de colônia de <i>Sporothrix schenckii</i> cultivado em Ágar <i>Sabouraud</i> Dextrose.....	52
Figura 11 – Esquema de microcultivo em lâmina de vidro.	53
Figura 12 – Microscopia óptica de <i>Sporothrix schenckii</i>	53
Figura 13 – Esquema de preparo da diluição seriada a partir da solução estoque do óleo essencial.	56
Figura 14 – Esquema de preparo das soluções estoque de anfotericina B.....	57
Figura 15 – Esquema de preparo da solução estoque de itraconazol.....	57
Figura 16 – Representação esquemática da montagem do ensaio antifúngico em microplaca estéril de 96 poços.	59
Figura 17 – Redução do MTT a formazan.	61
Figura 18 – Representação esquemática da montagem do ensaio na microplaca.....	63
Figura 19 – Perfil cromatográfico do óleo essencial de <i>Myrtus communis</i> L.	64
Figura 20 – Perfil cromatográfico do óleo essencial de <i>Thymus vulgaris</i> L.	67
Figura 21 – Eletromicrografias de <i>S. schenckii</i> ATCC 1099-18 não tratado, expostos aos tratamentos experimentais e ao fármaco de referência.....	81
Figura 22 – Eletromicrografias de <i>S. brasiliensis</i> IPEC 17943 não tratado, expostos aos tratamentos experimentais e ao fármaco de referência.	82

Figura 23 – Viabilidade celular (HaCat) após 48 horas de tratamento com diferentes concentrações das amostras 83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resumo de algumas características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas das espécies filogenéticas do complexo <i>S. schenckii</i>	28
Tabela 2 – Linhagens fúngicas utilizadas	51
Tabela 3 – Faixa de teste das amostras e dos fármacos de referência utilizados no ensaio antifúngico	59
Tabela 4 – Principais constituintes químicos identificados e quantificados no óleo essencial de <i>Myrtus communis</i> L.....	65
Tabela 5 – Principais constituintes químicos identificados e quantificados no óleo essencial de <i>Thymus vulgaris</i> L.....	67
Tabela 6 – Suscetibilidade <i>in vitro</i> das linhagens fúngicas frente aos fármacos de referência itraconazol e anfotericina B.....	70
Tabela 7 – Suscetibilidade <i>in vitro</i> das linhagens fúngicas frente aos óleos essenciais de <i>Myrtus communis</i> L. e <i>Thymus vulgaris</i> L	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	<i>Analysis of variance</i> (do inglês, Análise de Variância)
ABD	Ágar Batata Dextrose
ASD	Ágar <i>Sabouraud</i> dextrose
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CG	Cromatografia gasosa
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i> (do inglês, Instituto de Padrões clínicos e laboratoriais)
DMSO	Dimetilsulfóxido
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
INI	Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas
IPES	Instituto de Pesquisas e Estudos Sociais
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino) propano sulfônico
MTT	brometo de 3-(4,5-dimetilthiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
OMS	Organização Mundial da Saúde
pH	Potencial de Hidrogênio
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SE	Solução estoque
SIDA	Síndrome da imunodeficiência adquirida

LISTA DE SÍMBOLOS

α	alfa
β	beta
\pm	aproximadamente
$>$	maior que
cm	centímetro
mm	milímetro
kDa	kilodalton
mL	mililitro
mg	miliGrama
μg	microGrama
μL	microlitro
M	molar
mM	milimolar
min	minuto
p/v	peso/volume
v/v	volume/volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 ESPOROTRICOSE.....	18
2.1.1 Epidemiologia.....	18
2.1.2 Agente etiológico.....	23
2.1.3 Patogenia	31
2.1.4 Manifestações clínicas.....	32
2.1.4.1 Forma cutânea fixa e linfocutânea	32
2.1.4.2 Forma cutânea disseminada.....	34
2.1.4.3 Forma extra-cutânea.....	34
2.1.4.4 Forma sistêmica.....	35
2.1.5 Esporotricose animal.....	35
2.1.6 Diagnóstico.....	37
2.1.7 Tratamento farmacológico.....	39
2.1.7.1 Iodeto de potássio.....	40
2.1.7.2 Azóis.....	41
2.1.7.3 Anfotericina B.....	42
2.2 PLANTAS MEDICINAS NO SETOR FARMACÊUTICO.....	43
2.3 <i>Myrtus communis</i> L.....	44
2.4 <i>Thymus vulgaris</i> L.....	46
3 OBJETIVOS	49
3.1 GERAL.....	49
3.2 ESPECÍFICOS.....	49
4 MATERIAS E MÉTODOS	50
4.1 ÓLEOS ESSENCIAIS.....	50
4.1.1 Cromatografia gasosa (CG).....	50
4.2 LINHAGENS FÚNGICAS DE INTERESSE.....	50
4.2.1 Caracterização macroscópica.....	51
4.2.2 Caracterização microscópica.....	52
4.3 ENSAIO ANTIFÚNGICO.....	54
4.3.1 Triagem microbiológica.....	54
4.3.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	54

4.3.2.1 Padronização do inóculo fúngico.....	54
4.3.2.2 Preparo das amostras.....	55
4.3.2.3 Preparo das soluções dos fármacos de referência.....	56
4.3.2.4 Preparo das soluções controle.....	58
4.3.2.5 Montagem da microplaca.....	58
4.3.3 Determinação da concentração fungicida mínima (CFM).....	59
4.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	60
4.5 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE.....	61
4.5.1 Cultivo celular.....	62
4.5.2 Preparo das amostras.....	62
4.5.3 Montagem do ensaio na microplaca.....	62
4.5.4 Análise estatística.....	63
5 RESULTADO E DISCUSSÃO.....	64
5.1 PERFIL CROMATOGRÁFICO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS.....	64
5.2 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA.....	69
5.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	79
5.4 CITOTOXICIDADE.....	83
6. CONCLUSÃO.....	86
REFERÊNCIAS.....	88
ANEXOS	

1 INTRODUÇÃO

A esporotricose é uma micose subcutânea de evolução subaguda a crônica e distribuição universal, sendo mais prevalente na América Latina. Seu agente etiológico é o complexo *Sporothrix schenckii*, formado por fungos dimórficos e saprófitas (ALMEIDA, 2008; MAHAJAN, 2014). Esta doença é comumente causada pela inoculação traumática de fungos do complexo *Sporothrix schenckii* no tecido subcutâneo e acomete seres humanos e animais, domésticos e selvagens (FALQUETO, MAIFREDE e RIBEIRO, 2012; SASAKI et al., 2014).

Sua maior prevalência ocorre em regiões de clima temperado e tropical, incluindo América Latina (Brasil, México, Colômbia, Costa Rica, Guatemala e Uruguai), África do Sul, Índia e Japão, sendo a maioria dos casos descritos na América Central e América do Sul (CHAKRABARTI et al., 2015; CRUZ, 2013; RODRIGUES, HOOG e CAMARGO, 2013; ROSSI, ODAGUIRI e LARSSON, 2013; SASAKI et al., 2014).

Até a década de 90, a esporotricose esteve relacionada dentre as ergodermatoses, como uma doença ocupacional, pelo implante traumático do fungo *Sporothrix schenckii* na derme por farpas de madeira e espinhos de plantas (CRUZ, 2013; FURTADO; ARMOND, 1981; KOBAYASHI e YAMAMOTO, 2002). No entanto, nas últimas décadas são crescentes os relatos zoonóticos da micose envolvendo o felino doméstico, expandindo o grupo de risco para pessoas e profissionais envolvidos com esses animais, como veterinários, técnicos de veterinária, cuidadores de animais e proprietários de gatos (BARROS, PAES e SCHUBACH, 2011; CROTHERS et al., 2009; CRUZ, 2013). Recentemente foi reportada sua ocorrência epidêmica no Rio de Janeiro, Brasil, envolvendo a transmissão por gatos infectados (SCHUBACH, BARROS e WANKE, 2008).

Desde os primórdios da humanidade, a utilização de plantas com fins medicinais é um dos métodos terapêuticos mais antigos. Até por volta do século XIX, produtos de origem vegetal constituíram as bases para o tratamento de diferentes doenças (PAULA et al., 2010; RODRIGUES e CARVALHO, 2001; SAMY et al., 2005). A Organização Mundial da Saúde (2011) estimou que 25% dos medicamentos atualmente disponíveis tem origem, direta ou indiretamente, a partir das plantas medicinais ou seu conhecimento tradicional. No caso de certas classes

de produtos farmacêuticos, como medicamentos antitumorais e antimicrobianos, essa porcentagem pode ser maior que 60% (BRASIL, 2012).

Segundo Abad, Ansuategui e Bermejo (2007), nas últimas décadas observa-se não só um aumento na incidência de infecções fúngicas, como também na resistência desses agentes sobre os diferentes medicamentos antifúngicos. A maioria dos antifúngicos existentes apresentam sérios problemas de toxicidade, eficácia e custo; originando alta demanda pelo desenvolvimento de novos agentes mais seletivos e menos tóxicos. Desse modo, as plantas medicinais proveem possibilidades ilimitadas para o desenvolvimento de novos fármacos.

Myrtus communis L. é um arbusto aromático perene pertencente à família *Myrtaceae* citado na medicina popular por suas atividades antissépticas, adstringentes, analgésica e antimicrobiana. Seus usos tradicionais foram validados por diversos artigos científicos que demonstraram suas propriedades antimicrobiana, antifúngica, inseticida, anti-inflamatória, antidiabética e cardiovascular (SUMBUL et al, 2011).

Thymus vulgaris L. é um subarbusto ereto e perene muito aromático pertencente à família *Lamiaceae* utilizado como especiaria e conhecido na medicina popular por seu uso como antisséptico, inseticida e antimicrobiano. Vários estudos comprovaram sua atividade antimicrobiana, antifúngica, larvicida, antioxidante (HOSSEINZADEH et al., 2015).

Neste contexto, o presente trabalho buscou caracterizar fitoquimicamente, avaliar o potencial antifúngico, frente às principais linhagens causadoras de esporotricose no Brasil, e a citotoxicidade preliminar dos óleos essenciais comerciais de *Myrtus communis* L. e *Thymus vulgaris* L..

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ESPOROTRICOSE

A esporotricose é uma infecção de evolução subaguda ou crônica, caracterizada por lesões nodulares dos tecidos cutâneo e subcutâneo, que tendem à supuração e ulceração em humanos e animais, como cães, gatos, roedores, tatus, cavalos, bovinos, macacos e aves. Os agentes etiológicos são fungos do complexo *Sporothrix schenckii*, dimórficos e termotolerantes, que se introduzem nos tecidos orgânicos através de traumatismo ou, raramente, por inalação. Esses fungos são encontrados em vida saprofítica nos vegetais, solo, água contaminada e parasitando alguns animais. A forma clínica mais frequente da micose é a linfática nodular, que se inicia pela inoculação do agente, geralmente nas extremidades (cancro de inoculação), atingindo os gânglios linfáticos (MADRID et al., 2009; NOBRE et al., 2002; SASAKI et al., 2014; SCHUBACH, BARROS e WANKE, 2008).

2.1.1 Epidemiologia

A esporotricose possui distribuição mundial, sendo a micose subcutânea mais comum na América do Sul (BARROS et al., 2004). Pode-se observar áreas de alta prevalência na África do Sul, Índia, Austrália, China, Japão, Estados Unidos e México, sendo as áreas de maior endemicidade localizadas nas regiões mais quentes. A maioria dos casos se concentra nas Américas Central e do Sul. As regiões endêmicas incluem Uruguai, Peru, Colômbia, Venezuela e Brasil. Nas duas últimas décadas, a esporotricose emergiu como maior infecção fúngica, através de mudanças na sua epidemiologia, distribuição, evolução taxonômica e ocorrência de múltiplos surtos (BARROS et al., 2004; CHAKRABARTI et al., 2015; CORDEIRO et al., 2011; RODRIGUES et al., 2013; RODRIGUES, HOOG e CAMARGO, 2013).

A infecção clássica é contraída através da inoculação traumática do fungo na pele pelo contato com uma fonte infectante (farpas, espinhos contaminados), sendo esta a principal forma de transmissão mundial, visto que os fungos do complexo *Sporothrix schenckii* são sapróbios e podem ser encontrados em solos ricos em substâncias orgânicas, vegetais, árvores, água. Porém, a transmissão zoonótica vem sendo relatada em casos isolados ou pequenos surtos, envolvendo

principalmente a mordedura e arranhadura de gatos e tatus infectados, doentes ou subclínicos, os quais podem carrear o fungo em suas unhas, cavidade oral e lesões, ricas em formas leveduriformes. O Brasil, nas últimas décadas, tem observado uma grande epidemia de transmissão zoonótica por gatos na região do Rio de Janeiro; enquanto no Uruguai, muitos casos com esse tipo de transmissão são relatados em caçadores de tatus. Esses animais desempenham papel importante na epidemiologia da doença, podendo servir como fonte de infecção secundária do fungo. Alguns casos de esporotricose pulmonar evidenciam a possível transmissão pela inalação de esporos do fungo, sendo esta forma bem rara (AUNG et al., 2013; BARROS et al., 2004; CRUZ, 2013; LOPES-BEZERRA, SCHUBACH e COSTA, 2006; MADRID et al., 2011; NOBRE et al., 2001; RODRIGUES et al., 2013).

Vários surtos, de proporções variáveis, originados de uma fonte comum são reportados no mundo. O maior surto já registrado ocorreu na década de 40, perto de Johannesburg, na África do Sul, nas minas de ouro, onde em um curto período de 2 anos registraram-se mais de 3.000 casos de esporotricose. Medidas foram tomadas e os casos passaram a ser mais esporádicos (OLIVEIRA, 2014). Na Guatemala foram registrados 53 casos de esporotricose em pescadores, ao longo de três anos, relacionados a feridas envolvendo peixes contaminados (MAYORGA et al., 1978). Na China, em um único surto, relacionado à utilização de espigas de milho contaminadas, para comer e se aquecer no inverno, 15 bebês menores de 10 meses foram infectados (SONG et al., 2011). Nos Estados Unidos, um surto em 15 estados envolveu cerca de 80 indivíduos infectados após contato com um musgo, em um programa de reflorestamento (BRAVO, 2012; CENTER FOR DISEASE CONTROL, 1988; DIXON et al., 1991).

Como a esporotricose, na maior parte do mundo, não é uma doença de notificação obrigatória, sua prevalência ainda é desconhecida. Os dados conhecidos da doença são provenientes, em sua maior parte, de artigos científicos publicados. Na França, muitos casos foram relatados no início do último século, diminuindo os casos nos últimos anos, e sendo de rara ocorrência nos dias atuais (CHAKRABARTI et al., 2015). No Japão, de 1946 a 1982, cerca de 155 casos foram descritos todos os anos, diminuindo essa taxa para 50 casos por anos (FUKUSHIRO, 1984; MOCHIZUKI e ANZAWA, 2011). Já em algumas regiões hiperendêmicas do Peru e México, a ocorrência chega a 48 a 98 casos por 100.000 habitantes e 25 casos por 1.000 habitantes, respectivamente (BONIFAZ et al., 2013; PAPPAS et al., 2000).

No Brasil, a esporotricose foi primeiramente reportada em 1907, quando foi relatada a infecção no homem e em animais (ratos) no estado de São Paulo por Lutz e Splendore; desde então outros casos têm sido descritos, especialmente em São Paulo, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul, sendo a região sul do país classificada como endêmica (CORDEIRO et al., 2011; DA ROSA et al., 2005).

Nos arredores do Rio de Janeiro, não só são descritos muitos casos da doença, como também há um aumento exponencial desse número de caso nas duas últimas décadas (BARROS et al., 2010; SCHUBACH, BARROS e WANKE, 2008). Dados mais recentes da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) descrevem aproximadamente 2.200 casos da doença em humanos e 3.244 em gatos diagnosticados entre 1998 e 2009; em contraste com apenas 13 casos diagnosticados entre 1987 e 1998. Estes dados caracterizam a maior epidemia (animal e humana) já registrada no mundo (BARROS et al., 2010; BRAVO, 2012; CHAKRABATI et al., 2015). Entre 2008 e 2011, mais 2.340 novos casos de esporotricose humana foram confirmados, de acordo com dados do Instituto de Pesquisas e Estudos Sociais (IPES) (SILVA et al.; 2012). Os números de casos estão aumentando continuamente há mais de 17 anos e já somam mais de 5.000 casos registrados no Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI) (GUTIERREZ-GALHARD et al.; 2015). A Figura 1 mostra a prevalência mundial de casos de esporotricose mundial.

Figura 1 – Prevalência da esporotricose pelo mundo.



Fonte: Adaptado de CHAKRABARTI et al., 2015.

A esporotricose pode afetar qualquer pessoa, independente de sexo ou idade. O fator de risco para se contrair a doença baseia-se na exposição a locais ou animais contaminados; sendo assim, hábitos ocupacionais ou recreativos

específicos de uma determinada população podem aumentar o risco (CHAKRABARTI et al., 2015).

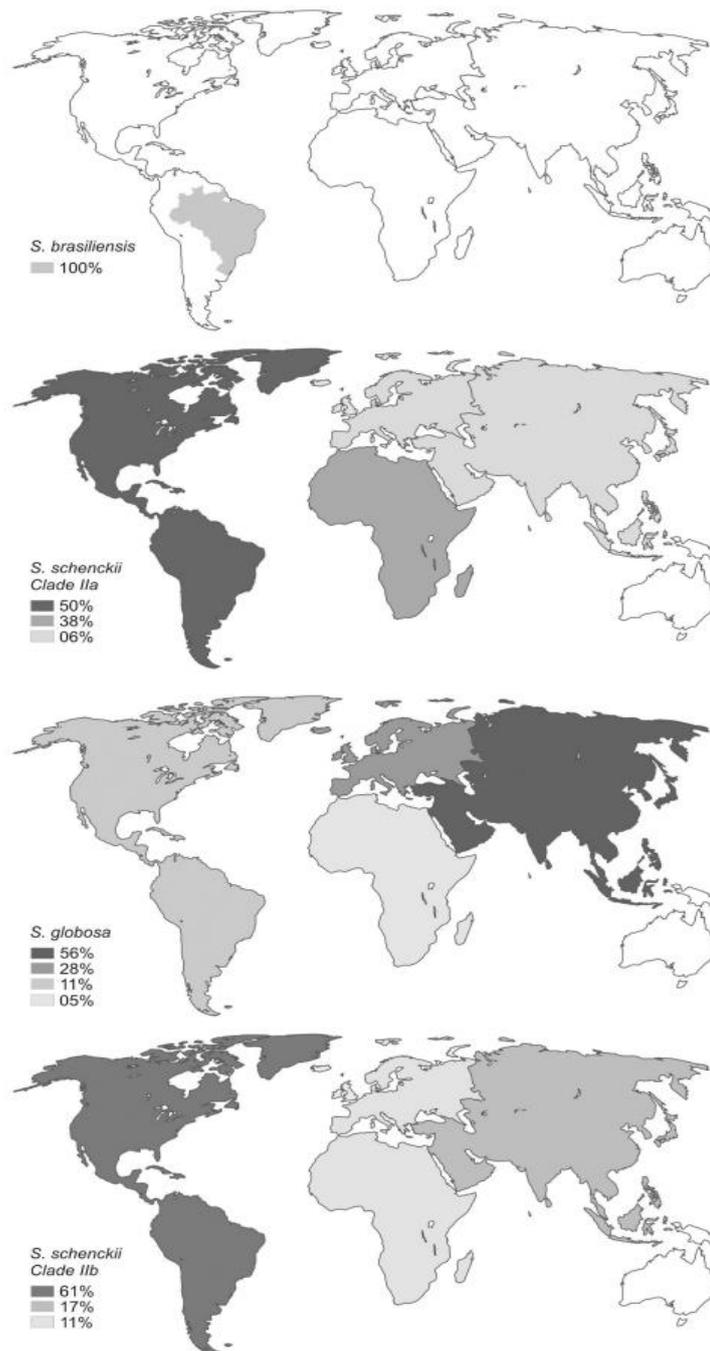
No Uruguai, a esporotricose é observada predominantemente em homens adultos, pela tradição de caçar tatus (RODRIGUES et al., 2014a). No Peru e Andes, o número de crianças acometidas com a doença é três vezes maior do que adultos, devido ao hábito desse nicho populacional brincar em plantações e pisos sujos (LYON et al., 2003; NEYRA et al., 2005). Na Índia e Japão, há uma prevalência maior de casos de esporotricose em mulheres adultas, uma vez que estas estão mais envolvidas com atividades agrícolas (BHUTIA et al., 2011; FUKUSHIRO, 1984). Na África do Sul, a proporção da doença de homens para mulheres é de 3:1, devido à atividade mineradora, ocupação predominantemente masculina (VISMER e HULL, 1997).

A distribuição das espécies do complexo *Sporothrix schenckii* também é variável de acordo com a distribuição geográfica. Marimon e colaboradores (2006, 2007 e 2008b) descreveram seis espécies no complexo baseado na análise da sequência de três proteínas codificadoras e características fenotípicas. Dessas espécies, três apresentavam relevância clínica, juntamente com o *Sporothrix schenckii*, que passou a ser denominado de *Sporothrix schenckii sensu stricto* (*S. brasiliensis*, *S. globosa*, e *S. luriei*) e duas espécies de distribuição ambiental com baixa virulência, *S. mexicana* e *S. albicans* (CHAKRABARTI et al., 2015; MARIMON et al., 2006; MARIMON et al., 2008b).

Sporothrix schenckii sensu stricto está distribuído mundialmente, sendo isolado das Américas, África, Ásia e Europa. Este ainda é dividido em dois clados, o clado IIa é encontrado na América do Sul (Argentina, Bolívia, Colômbia e Peru) e do Norte. E o clado IIb se restringe a América do Sul, particularmente Argentina e Peru (RODRIGUES et al., 2014a). A espécie *S. brasiliensis* é uma espécie emergente restrita ao Brasil e é altamente patogênica para humanos e animais (RODRIGUES et al., 2013). Um estudo recente na China descreveu a presença de esporotricose causada pela espécie *S. globosa* a duas décadas no país. Essa espécie possui também distribuição mundial, sendo isolada na Europa, Estados Unidos, América do Sul e Ásia (YU et al., 2013). Já a espécie *S. luriei* foi descrita em um caso de infecção canina no Brasil (OLIVEIRA et al., 2011), além de infecções humanas na África (AJELLO e KAPLAN, 1969), Itália (ALBERICINI et al., 1989) e Índia (PADHYNE et al., 1992). *S. mexicana* foi encontrada no ambiente da Austrália,

México e Portugal, sendo ocasionalmente citada em infecções com humanos (RODRIGUES, HOOG e CAMARGO, 2013). A Figura 2 elucida o padrão de distribuição global de espécies clinicamente importantes do complexo *Sporothrix schenckii*.

Figura 2 – Distribuição global de *Sporothrix brasiliensis*, *Sporothrix globosa*, *Sporothrix schenckii* clado IIa, e *Sporothrix schenckii* clado IIb.



Fonte: Adaptado de CHAKRABARTI et al., 2015.

2.1.2 Agente etiológico

Por muitos anos, pensava-se que a esporotricose era causada por um agente apenas, sendo este o fungo dimórfico *Sporothrix schenckii*. Porém, estudos com diferentes isolados de *S. schenckii* relataram a existência de variações fenotípicas entre as cepas. Estas variações são evidenciadas não só nas diferentes morfologias de colônias e crescimento em meios de culturas diferentes (GHOSH et al., 2002; MENDOZA et al., 2005), mas também na termotolerância (MARIMON et al., 2007; FERNANDES et al., 2009b), na secreção de proteínas (FERNANDES et al., 2009a), na síntese de melanina (ROMERO-MARTINEZ et al., 2000; ALMEIDA-PAES et al., 2009), na virulência em modelo murino (NOBRE et al., 2005; KONG et al., 2006; BRITO et al., 2007; ARRILLAGA-MONCRIEFF et al., 2009) e na suscetibilidade aos agentes antifúngicos (MARIMON et al., 2008a).

Desde o século passado, existem indícios dessa variação. Smith & Batenburg-Van der Vegte (1985), já propunham a heterogeneidade do gênero *Sporothrix* com base em estudos de microscopia eletrônica evidenciando ao menos três padrões distintos de micrósoros presentes na membrana celular entre os septos. Apesar de diversos relatos comprovarem a diversidade genética e morfológica de isolados clínicos de *Sporothrix schenckii*, a primeira indicação de que a espécie aparentava ser um complexo de espécies distintas foi proposta por Marimon e colaboradores em 2006.

Marimon e colaboradores (2006) analisaram sessenta isolados de *S. schenckii*, agrupando-os em três *clusters* principais: um grupo de isolados europeus, um de brasileiros e outro isolado de países da América Latina e África, e indicaram a possibilidade de existência de mais de uma espécie de fungo causador da esporotricose. Já em 2007, os mesmos autores realizaram outra análise, dessa vez de genótipos e fenótipos, de 127 isolados de várias regiões do mundo, previamente classificados como *S. schenckii*. Nesse novo estudo, foi analisado o perfil de assimilação de açúcares (rafinose e ribitol), diâmetro médio das colônias após crescimento em diversas temperaturas (20, 30, 35 e 37°C em ágar batata dextrose), a morfologia dos conídios e as sequências do gene de calmodulina. Três novas espécies de *S. schenckii* foram propostas, além das já conhecidas como *S. albicans* e *S. schenckii* var. *luriei*, e constataram que bastaria uma análise sequencial do *loci* calmodulina para reconhecer todas as espécies de interesse médico do complexo.

As novas espécies propostas foram *S. brasiliensis*, *S. globosa*, e *S. mexicana*. Em 2008, novas publicações do mesmo grupo propuseram que a espécie conhecida como *S. schenckii* var. *luriei* fosse elevada a espécie *S. luriei* (MARIMON et al., 2006; MARIMON et al., 2007; MARIMON et al., 2008a; MARIMON et al., 2008b).

De Meyer e colaboradores (2008) descreveram mais três novas espécies, não patogênicas, do complexo *Ophiostoma stenoceras-Sporothrix schenckii*, *S. stylites*, *S. humicola*, e *S. lignivora*, sendo, portanto, classificadas como ambientais. As duas primeiras espécies não produzem conídios melanizados e, conseqüentemente, suas colônias não escurecem, enquanto, a espécie *S. lignivora* apresenta conídios distintos que não coincidem em forma e tamanho com os apresentados por outras espécies do complexo (DE MEYER et al., 2008). Madrid e colaboradores (2010a) também descreveram duas novas espécies saprófitas dentro do complexo *Ophiostoma stenoceras-Sporothrix schenckii*, a saber: *S. brunneoviolacea* e *S. dimorphospora*. A espécie *S. brunneoviolacea* caracteriza-se fenotipicamente pela produção de um pigmento violeta-marrom, difuso na cultura *in vitro*. *S. dimorphospora*, entretanto, não apresenta a produção do pigmento característico em cultivos *in vitro*. Em contraste aos resultados obtidos para a cepa tipo de *S. inflata*, as espécies descritas por Madrid e colaboradores (2010a) são capazes de assimilar o açúcar rafinose como única fonte de carbono. Outras espécies, como *S. cyanescens*, têm sido isoladas de amostras de sangue e de pele de pacientes humanos, porém, o estudo de sua patogenicidade concluiu que, embora esses fungos tenham a capacidade de crescer a 37 °C, eles não apresentam virulência (BARROS, PAES e SCHUBACH, 2011).

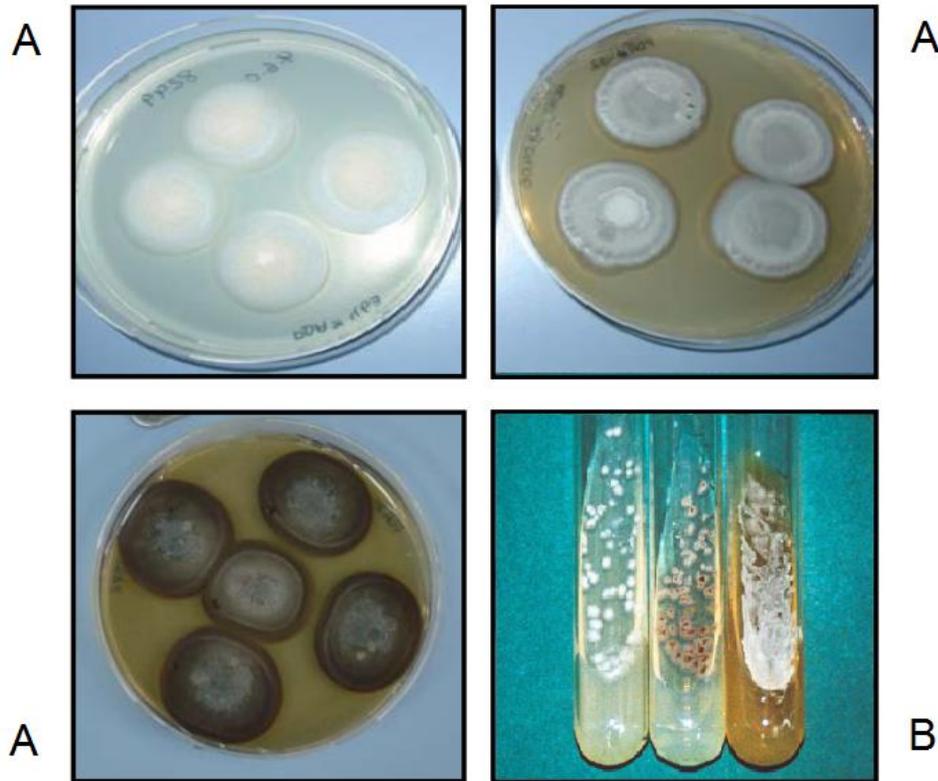
Os fungos do complexo *Sporothrix schenckii* pertencem ao Reino Fungi, filo Ascomycota, classe Pyrenomycetes, ordem Ophiostomatales, família Ophiostomataceae, gênero *Sporothrix*. São todos fungos dimórficos apresentando uma fase filamentosa, de vida saprofítica, encontrada em solo, árvores, vegetações em decomposição, e outra leveduriforme, de vida parasitária, encontrada em humanos e animais. Outra característica marcante das espécies é a termotolerância, *Sporothrix* sp. sobrevivem a temperaturas de 25 °C a 37 °C, com sua inibição de 39-40°C; embora alguns isolados tenham a capacidade de se multiplicar a temperatura de 40-41°C com pouca viabilidade. O meio de cultura utilizado para isolamento desses fungos é geralmente o Ágar *Sabouraud*, acrescido ou não de nutrientes, antibacterianos ou antifúngicos, como a cicloheximida. Outros meios utilizados são o

ágar batata dextrose (ABD) e o ágar infusão cérebro-coração (BARROS, PAES e SCHUBACH, 2011; HOWARD, 1961; LACAZ et al., 2002).

Macroscopicamente, a fase filamentosa pode ser observada como colônia branca a amarelada, de aspecto liso e sedoso, que pode se tornar aveludado, enrugado ou membranoso, às vezes com micélio aéreo, e com frequência, amadurece tornando-se pragueada e escurecida. Seu crescimento se dá rapidamente, quatro a sete dias, em ágar batata dextrose (ABD) ou ágar *Sabouraud* dextrose (ASD), em temperatura de 25 - 27 °C. É possível converter a fase de micélio semeando-a em ágar infusão de cérebro e coração, incubando a 37 °C, por aproximadamente 13 dias. Alguns fatores facilitam essa conversão como: adição de biotina e fraco teor de dióxido de carbono (ALMEIDA, 2008; BRAVO, 2012; BARROS, PAES e SCHUBACH, 2011; LACAZ et al., 2002; LOPEZ-BEZERRA, SCHUBACH e COSTA, 2006).

Na fase leveduriforme, a colônia adota aspecto úmido, cremoso, de coloração branca, sendo alguns isolados castanhos. A coloração enegrecida assumida com frequência pelas duas fases ao atingir a maturidade de crescimento tem sido atribuída à presença da melanina, sendo sua produção afetada por diferentes fatores, como: diferentes concentrações de pH e carboidratos (ALMEIDA-PAES et al., 2009; BARROS, PAES e SCHUBACH, 2011; LACAZ et al., 2002; LOPEZ-BEZERRA, SCHUBACH e COSTA, 2006; MADRID et al., 2010b; ROMERO-MARTINEZ et al., 2000). A Figura 3 mostra diferentes crescimentos da fase de micélio e levedura do fungo *Sporothrix schenckii*.

Figura 3 – Análise macroscópica de colônias de fase miceliana e leveduriforme de *Sporothrix schenckii*.

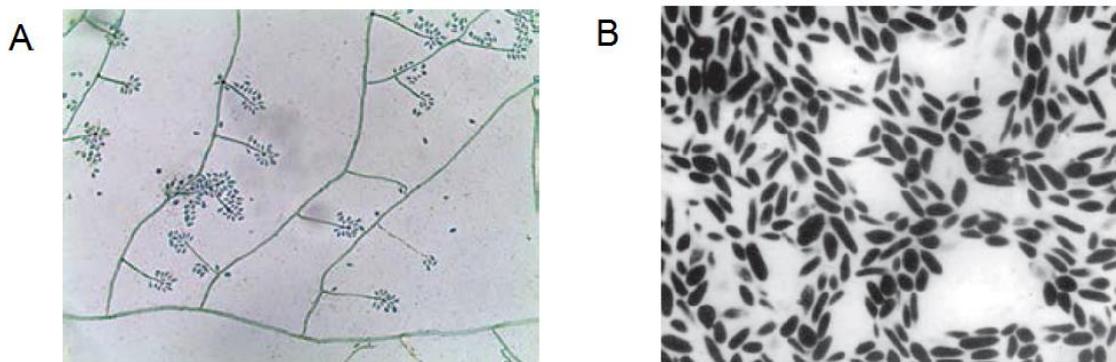


Fonte: Adaptada de BARROS, ALMEIDA-PAES e SCHUBACH, 2011; e MARIMON, 2007.

A: Fase miceliana de *Sporothrix schenckii* cultivado por 15 dias em ágar batata dextrose. B: Fase leveduriforme de *Sporothrix schenckii* cultivada por 4 dias em ágar Sabouraud dextrose.

Microscopicamente, observa-se na fase miceliana, a presença de hifas finas, septadas, ramificadas, medindo de 1-2 μm de diâmetro com conidióforos alongados, finos simpodiais, contendo ápices entumescidos, frutificando conídios hialinos, medindo de 2-4 μm , elípticos ou ovais dispostos em rosetas, aspecto de margarida, que saem em pequenos dentículos. Na forma de levedura, observam-se células pequenas, arredondadas, ovais ou no formato fusiforme, semelhante a um “charuto”, com brotamento simples ou múltiplo (ALMEIDA, 2008; BRAVO, 2012; LACAZ et al., 2002; LOPES-BEZERRA, SCHUBACH e COSTA, 2006; SIDRIM e ROCHA, 2010). A Figura 4 mostra microscopicamente as duas fases do *Sporothrix* sp.

Figura 4 – Análise microscópica de fase miceliana e leveduriforme de *Sporothrix* sp.



Fonte: Adaptada de OLIVEIRA, 2014; e BRAVO, 2012.

A: Fase filamentosa de *Sporothrix* sp. mostrando a presença de hifas septadas com conídios implantados em forma de margarida. B: Fase leveduriforme de *Sporothrix schenckii* mostrando o aspecto fusiforme das células.

Ao contrário da forma macroscópica, que não apresenta diferença entre as espécies do complexo *Sporothrix schenckii*, tendo seu crescimento variável apenas devido ao meio utilizado em seu desenvolvimento; microscopicamente evidenciam-se diferenças, entre os conídios produzidos, de suma importância para realizar a diferenciação dessas espécies (MARIMON et al., 2007). A Tabela 1 resume as características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas mais importantes, as quais juntamente com a análise de DNA e outros achados, levam a identificação das cepas de principal interesse clínico do complexo *Sporothrix schenckii*.

Estudos demonstraram que o dimorfismo, termotolerância, enzimas extracelulares, componentes da parede celular e presença de melanina estejam envolvidos na patogenicidade do *S. schenckii*. Quanto à termotolerância, estudos observaram que isolados incapazes de crescer a temperaturas de 35 e 37 °C estariam associados à forma cutânea da micose, enquanto os mais termotolerantes estariam aptos a se desenvolver nos órgãos internos, desenvolvendo a forma sistêmica da esporotricose (ARECHAVALA et al., 2011; KAUFFMAN, 1999; KONG et al., 2006; TACHIBANA et al., 1999). Brito e colaboradores (2007), ao comparar a virulência de duas cepas clínicas de esporotricose, uma linfocutânea e outra disseminada, observaram maior virulência em murinos da cepa proveniente da forma disseminada da doença.

Tabela 1 – Resumo de algumas características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas das espécies filogenéticas do complexo *S. schenckii*.

Características	Espécies filogenéticas							
	<i>S. brasiliensis</i>	<i>S. schenckii</i>	<i>S. globosa</i>	<i>S. mexicana</i>	<i>S. albicans</i>	<i>S. luriei</i>		
Clado (genótipo)	I	II (IIa e IIb)	III	IV	V	-		
Colônia (mm)	30°C	15-38	23-34	18-40	66-69	62-71	51	
	35°C	10-22	14-30	6-16	10-11	27-29	35-36	
	37°C	5-10	3-9	0	1,5-2,5	2-5,5	21	
	40°C	0	0	0	0	0	0	
Fontes de Carbono	Rafinose	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	
	Sacarose	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	
	Ribitol	Variável	Variável	Variável	Variável	Variável	Positivo	
Conídio	Simpodial	Tamanho (µm)	2-6 x 1-4	3-6 x 1,5-3	2-5 x 1-3	3-5,5 x 2-2,5	-	4-10 x 1-2
		Formato	Obovóide	Obovóide	Obovóide	Obovóide	Obovóide	Obovóide
		Coloração	Hialino a subhialino	Hialino a subhialino	Hialino a subhialino	Hialino a subhialino	Hialino a subhialino	Hialino
	Séssil	Tamanho (µm)	2,5-5 x 2-3	3	2,5-4 x 2-3,5	3-4 x 2-2,5	-	4-10 x 1-2
		Formato	Globoso a subgloboso	Triangulares a cuneiformes	Globoso a subgloboso	Subgloboso, obovóides e elipsóide	Obovóides a elipsóide	Obovóide
		Coloração	Marrom a Marrom escuro	Marrom a Marrom escuro	Marrom a Marrom escuro	Marrom a Marrom escuro	Marrom a Marrom escuro	Hialino
Virulência (modelo murino) OF-1 ratos machos	Alta	Alta	Intermediária	Baixa	Baixa	Não testado		

Fonte: a autora. Informações baseadas nos trabalhos publicados na literatura por: ARRILLAGA-MONCRIEFF et al. (2009); CRUZ (2013); MARIMON (2007); MARIMON et al. (2008a,b); SUMMERBELL (2002).

Em relação à melanina, apesar de macroscopicamente apenas a fase filamentosa do fungo ser melanizada, vários estudos têm demonstrado sua produção tanto na fase filamentosa quanto leveduriforme, *in vitro* e *in vivo*. A produção de melanina ocorre por vias diferentes de acordo com seu local de produção. Nos conídios, sua produção ocorre pela via do 1,8-dihidroxi-naftaleno penta acetato, enquanto a produção nas hifas é obtida utilizando compostos fenólicos como 3,4-dihidroxi-L-fenilalanina (L-DOPA), um substrato encontrado na forma miceliana e leveduriforme (ALMEIDA-PAES et al., 2009; MORRIS-JONES et al., 2002; ROMERO-MARTINEZ et al., 2000; MADRID et al., 2010b). Nos fungos em questão, já foi demonstrado que a presença de melanina confere ao agente proteção celular ao dano físico e químico, importante para sua manutenção no ambiente, provavelmente pelo sequestro de radicais livres e dificuldade na ação dos mecanismos de defesa do hospedeiro (DIXON et al., 1992; MORRIS-JONES et al., 2002; ROMERO-MARTINEZ et al., 2000).

Romero-Martinez e colaboradores (2000) mostraram que a melanização dos conídios aumenta a resistência do *S. schenckii* à fagocitose por macrófagos, burlando o primeiro mecanismo de defesa do hospedeiro e permitindo a partícula infecciosa, conídio, ter maior sucesso na infecção. Barros, Paes e Schubach (2011), citaram maiores habilidades invasivas em cepas isoladas de maior pigmentação quando comparadas com cepas albinas mutantes em modelo experimental de esporotricose com ratos. Mostraram ainda que a infecção causada pela variação com pigmento promoveu a formação de granulomas multifocais, enquanto a outra apresentou um granuloma restrito ao local de inoculação. Outros estudos demonstraram que durante a infecção por *S. schenckii*, os grânulos de melanina interferiam na resposta imune, na ativação do complemento e na ação de agentes antifúngicos (NOSANCHUCK e CASADEVALL, 2003; ROMERO-MARTINEZ et al., 2000).

Outro fator de virulência observado é a capacidade de adesão às células endoteliais e epiteliais, assim como na matriz extracelular. Alguns autores demonstraram *in vitro* a capacidade de interação do patógeno fúngico com células endoteliais humanas, as quais internalizam células de levedura sem ferí-las ou diminuir sua viabilidade, e de atravessar o espaço intercelular, facilitando a penetração na corrente sanguínea e sua conseqüente disseminação via hematológica (FIGUEIREDO et al., 2007).

Tanto os conídios quanto células de levedura do *S. schenckii* são capazes de reconhecer três importantes glicoproteínas da matriz extracelular: fibronectinas, lamininas e colágeno tipo II. Outros estudos demonstraram a presença de integrinas e adesinas capazes de reconhecer a fibronectina humana em vários pontos da molécula, conferindo um fator facilitador para a aderência aos tecidos hospedeiros e disseminação fúngica através do corpo (LIMA et al., 2004; TEIXEIRA et al., 2009). Em 2009, Ruiz-Baca e colaboradores descreveram uma glicoproteína ~70kDa de um isolado de *S. schenckii* e descreveram sua participação na adesão a matriz extracelular da derme.

As enzimas extracelulares produzidas pelo *S. schenckii*, como as proteinases, desempenham importante função na invasão tecidual, provocando a lise do estrato córneo, colágeno tipo I e elastina da pele, permitindo desta forma, o desenvolvimento fúngico. As fosfatases ácidas influenciam na interação da célula leveduriforme com macrófagos, além de atuarem na membrana celular, catalisando e liberando fosfato das fosfoproteínas (ARNOLD et al., 1986; YOSHIKE et al., 1993; HOGAN et al., 1996; LIMA et al., 2001).

Outros fatores de virulência já descritos para fungos do complexo *Sporothrix schenckii* envolvem lipídeos e proteínas. Sgarbi e colaboradores (1997), analisando lipídeos do *S. schenckii*, por espectroscopia, identificaram o peróxido de ergosterol, o qual pode ser convertido em ergosterol em contato com uma enzima extraída do fungo, funcionando como mecanismo de escape de espécies reativas de oxigênio durante a fagocitose. Outros estudos relacionam a composição da parede celular fúngica à patogenicidade do fungo; como alguns estudos *in vivo* onde isolados mais jovens de *S. schenckii* possuíam uma maior concentração de ramnose do que manose, sendo mais patogênicos (FERNANDES et al., 1999; LOPES-BEZZERA; 2011; PREVIATO et al., 1979). A possível explicação para esse efeito seria devido ao peptídeo ramnomanana estimular a mitose de linfócitos, iniciando uma reação tardia, assim como, a produção de anticorpos (FERNANDES et al., 1999; FIGUEIREDO et al., 2004; KAJIWARA et al., 2004). Da Rosa e colaboradores (2009) sugeriram que algumas proteínas secretadas poderiam interferir na resposta imune do hospedeiro, baseando-se na ação proteolítica de um preparado antigênico de *S. schenckii*, fase leveduriforme, sobre diferentes subclasses de imunoglobulinas G humanas. Apesar de encontrarmos algumas informações sobre esses fatores de virulência, os dados existentes ainda são considerados insuficientes.

2.1.3 Patogenia

Após inoculação traumática ou inalação da forma filamentosa dos fungos do complexo *Sporothrix schenckii* pelo organismo, inicia-se a conversão dos conídios em leveduras. Porém, quando a transmissão ocorrer por meio da arranhadura e/ou mordedura de animais infectados, esta etapa não ocorrerá, pois o fungo inoculado já se apresenta na forma parasitária. Entre 24 e 48 horas após a inoculação, as hifas fúngicas desaparecem e, em 13 dias, ocorre a transição completa para a fase leveduriforme. Desse modo, o período de incubação da fase filamentosa varia de uma semana a um mês, enquanto que a infecção por células leveduriformes apresenta uma multiplicação celular imediata (CRUZ, 2013).

Uma vez estabelecida a infecção, há desenvolvimento de lesão cutânea papular ou nodular localizada no(s) ponto(s) de inoculação, podendo evoluir para a cura espontânea. A apresentação e o curso da doença vão depender de fatores, como o estado imunológico do paciente, virulência do inócuo e quantidade de unidades infectantes inoculadas (LARSSON, 2011).

Em hospedeiros sem prévio contato com o agente etiológico, ocorre o envolvimento linfático regional; e naqueles com exposição prévia, não há esse envolvimento, formando uma úlcera cutânea fixa, com reação granulomatosa ao redor. Havendo envolvimento de vasos linfáticos e sanguíneos que drenam o local, ocorre a progressão da infecção para a forma cutânea disseminada, que se caracteriza por múltiplas lesões (gerada também por autoinoculação), podendo ou não evoluir para a forma sistêmica (MEIRELES e NASCENTE, 2009).

A infecção também pode iniciar-se por outros pontos, além do tegumento cutâneo, sobressaindo-se as mucosas, pulmões e mesmo sistema nervoso central. Embora ocasional e esporádica, a infecção por inalação dos conídios fúngicos pode ocorrer, desenvolvendo esporotricose pulmonar, cujos sinais respiratórios se manifestam principalmente por dispneia, secreção nasal e espirros (DA ROSA et al., 2005; MADRID et al., 2011; MONTEIRO et al., 2008; OLIVEIRA, 2014; SCHUBACH et al., 2004).

2.1.4 Manifestações clínicas

Diferentes formas clínicas de esporotricose são relatadas conforme a condição do hospedeiro, a rota de infecção e a virulência do agente (ARRILLAGA-MONCRIEFF et al., 2009; FERNANDES et al., 2013). Classicamente, a esporotricose pode se manifestar de duas formas clínicas diferentes: cutânea (fixa, linfocutânea e disseminada), extra-cutânea (ossos, articulações e pulmão) e sistêmica (MADRID et al., 2007).

2.1.4.1 Forma cutânea fixa e linfocutânea

As formas cutânea fixa e linfocutânea correspondem a 90% de todas as manifestações da doença em humanos e acometem principalmente humanos e cachorros, os quais são mais propensos a desenvolver formas clínicas restritas ao tecido subcutâneo (LOPES-BEZERRA, SCHUBACH e COSTA, 2006; MEINERZ et al., 2007; SCHUBACH et al., 2006; ZAITZ et al., 2010).

A forma cutânea fixa é caracterizada pelo desenvolvimento de lesão única, no local da inoculação do fungo, de morfologia variada (verrucosa, acneiforme e eritematosa) e transitória, embora, no geral, retomam e frequentemente persistem por anos até o tratamento. Essa lesão assume a principal forma de pápula que drena exsudatos sero-sanguinolentos resultando em úlceras e crostas (Figura 5). A multiplicidade dos aspectos dermatológicos demonstra a necessidade de se realizar o diagnóstico diferencial com doenças infecciosas do complexo verrucoso (paracoccidioidomicose, leishmaniose cutânea, cromoblastomicose e as micobacterioses), além de desordens inflamatórias e outras doenças granulomatosas não infecciosas, antes de se firmar o diagnóstico (BARROS, PAES e SCHUBACH, 2011; OLIVEIRA, 2014).

A forma linfocutânea é a de maior prevalência, sendo responsável por cerca de 80% de todos os casos. Seus sintomas costumam aparecer após três semanas da infecção, mas pode demorar até seis meses para ser aparente. Inicialmente se apresenta como lesão única, como na forma fixa, normalmente localizada nos membros inferiores e superiores. Há então um crescimento progressivo dessa lesão, geralmente indolor e formação de novos nódulos subcutâneos, através das vias linfáticas adjacentes ao local de inoculação, os quais frequentemente ulceram ou

fistulam, podendo drenar uma secreção de aspecto purulento. Essa manifestação clínica característica dessa forma de esporotricose é denominada de “linfagite nodular ascendente” (Figura 5). As manifestações clínicas são poucas ou nulas, sendo caracterizadas por dor local e pequenas adenomegalias regionais. O diagnóstico diferencial é feito com Nocardiose subcutânea e Leishmaniose cutânea, no Brasil. Nos Estados Unidos, Europa e Canadá o principal diagnóstico diferencial deve ser feito com micobactérias atípicas, como *Mycobacterium marinum*, rinoscleroma, granuloma inguinal, nocardiose, tularemia e histoplasiose (CORDEIRO et al., 2011; DE MIRANDA et al., 2009; OLIVEIRA, 2014).

Figura 5 – Manifestações clínicas observadas em pacientes com esporotricose cutânea fixa e linfocutânea.



Fonte: MARIMON, 2007.

A, B e C: Esporotricose cutânea fixa. D, E e F: Esporotricose linfocutânea.

2.1.4.2 Forma cutânea disseminada

A forma cutânea disseminada tem reduzida ocorrência em humanos, porém é a mais comum em felinos. Em humanos, tem sua ocorrência associada à imunodepressão, como a síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), alcoolismo, idade avançada, diabetes, uso prolongado de corticoides e, frequentemente, as formas extra-cutânea ou sistêmica. Pode ocorrer por auto-inoculação, disseminação hematológica ou linfática, em pacientes acometidos pela forma cutânea fixa. A esporotricose cutânea disseminada se caracteriza por lesões cutâneas múltiplas, em locais não contínuos, sem envolvimento extracutâneo, podendo levar ao comprometimento sistêmico (Figura 6). Comum em pacientes com SIDA, essa forma da doença pode se associar ao acometimento meníngeo e presença de úlceras cutâneas atípicas com escassa reação inflamatória ao redor das lesões (CARVALHO et al., 2002; SIDRIM e ROCHA, 2010; STALKUP, BELL e ROSEN, 2002).

Figura 6 – Manifestações clínicas observadas em pacientes com esporotricose cutânea disseminada.



Fonte: SIDRIM e ROCHA, 2004.

2.1.4.3 Forma extra-cutânea

A forma extra-cutânea da esporotricose, também chamada de invasiva, é rara e pode acometer qualquer tecido ou órgão. Está ligada principalmente a pacientes debilitados imunologicamente, especialmente em pacientes com vírus da imunodeficiência humana positivo ou recebendo terapias prolongadas com

antimicrobianos, corticoides e quimioterápicos. Pode ser contraída pela inalação de esporos ou por disseminação hematogênica decorrente de uma inoculação profunda na pele. Nessa forma, os envoltimentos mais comuns são o osteoarticular e pulmonar, porém há também relatos envolvendo comprometimento ocular, hepático, gastrointestinal, entre outros. A sintomatologia da forma osteoarticular se assemelha muito a da artrite, como dor, inflamação, limitação de movimento; enquanto a pulmonar assemelha a da tuberculose, envolvendo sintomas como bronquite, pneumonite, mal-estar geral, febre e tosse (ALMEIDA, 2008; APPENZELLER et al., 2005; HARDMAN et al., 2005; OLIVEIRA, 2014; RAMOS-E-SILVA et al., 2007).

2.1.4.4 Forma sistêmica

A forma sistêmica da doença é rara e está ligada a pacientes imunodeprimidos. Atinge múltiplos tecidos e órgãos concomitantemente, acometendo principalmente olhos e nariz. As formas viscerais, apesar de raras, são agressivas, com evolução grave e prognóstico desfavorável, podendo levar a óbito (MEINERZ et al., 2008; ZAITZ et al., 2010).

2.1.5 Esporotricose animal

Com a mudança no perfil epidemiológico da doença, os vetores animais passam a ter grande importância na disseminação da esporotricose, sendo essencial conhecer não só seus hábitos, mas também como a doença se manifesta nesse nicho. O potencial zoonótico da esporotricose ocorre quando indivíduos entram em contato direto com animais infectados, por arranhadura ou mordedura. No Brasil, o papel dos gatos domésticos como transmissores tem sido relatado, principalmente na região do Rio de Janeiro, onde ocorre o maior surto de esporotricose de origem zoonótica já relatado (CHAKRABARTI et al., 2015; SCHUBACH et al., 2002; SCHUBACH e SCHUBACH, 2000).

A esporotricose também é relatada em cães no Brasil, porém na maioria dos casos observados foi relatado o contato do cão com um felino infectado, sugerindo a participação felina na transmissão. Além disso, não há registro de transmissão zoonótica a partir de cães infectados (SCHUBACH et al., 2006).

No Brasil, os gatos domésticos se tornaram os vetores mais propícios e eficientes, principalmente machos, não castrados e de livre acesso a rua, devido a seus hábitos de esconder-se em plantas, rebolcar o solo, cavar buracos, cobrir seus dejetos com terra, marcar territórios com as unhas em cascas de árvores e arranharem-se entre si em lutas ou brincadeiras. Além disso, estudos demonstraram a presença do agente etiológico não só em suas lesões, mas também em sua cavidade oral e unhas (CROTHERS et al., 2009; CRUZ, 2013; NAKAMURA et al., 1996; ROSSI, ODAGUIRI e LARSSON, 2013; SCHUBACH et al., 2001; SCHUBACH et al., 2004; SCHUBACH e SCHUBACH, 2000).

As lesões cutâneas encontradas em gatos com esporotricose caracterizam-se inicialmente por nódulos subcutâneos que evoluem para alopecia, ulceração e drenam exsudato purulento, levando, com o ressecamento, à formação de crostas. Na maioria dos casos, estas lesões estão localizadas região cefálica, principalmente no plano nasal e pavilhões auriculares, sendo frequente a ocorrência de três ou mais lesões (Figura 7). O quadro clínico observado na esporotricose felina é variável, sendo descritas infecções subclínicas, lesões únicas, disseminadas e formas sistêmicas fatais. Em felinos, o comprometimento sistêmico é frequente (LARSSON, 2005; SCHUBACH et al., 2003; SCHUBACH et al., 2004).

Figura 7 – Esporotricose felina.



Fonte: Adaptado de RODRIGUES et al., 2013.

2.1.6 Diagnóstico

A suspeita clínica é essencial no diagnóstico da esporotricose, para isso uma anamnese detalhada e bem conduzida mostra-se fundamental. No diagnóstico presuntivo dessa micose deve se juntar os dados da anamnese, epidemiologia, manifestações clínicas e exames complementares. Para o definitivo, se faz necessário o cultivo de exsudatos, tecidos ou aspirados de lesões, com o sucessivo isolamento e identificação do fungo, considerando a dificuldade de visualização direta do microrganismo nessas amostras. O padrão ouro de diagnóstico da esporotricose é a cultura; porém métodos sorológicos, histopatológicos, e moleculares tem sido recentemente adotados como ferramentas auxiliares na detecção (BARROS, PAES e SCHUBACH, 2011; CRUZ, 2013; LARSSON, 2011; MAHLBERGH et al., 2009).

O exame direto das amostras coletadas geralmente é feito tratando o material coletado com uma solução de hidróxido de potássio a 10% e observando ao microscópio células leveduriformas características na forma de “charutos” ou ovaladas e arredondadas. A visualização das células nesse exame nem sempre é possível em exsudato humano e animal, devido à pequena quantidade do agente fúngico presente; com exceção dos felinos, os quais possuem grande número de células leveduriformes nas lesões. Esse exame não é conclusivo para o diagnóstico de esporotricose, pela baixa incidência de células características nas amostras, e sua confusão com células de *Histoplasma capsulatum* e *Candida glabrata*, dando um resultado falso positivo (MEIRELES e NASCENTE, 2009; PEREIRA et al., 2011; SCHUBACH et al., 2002).

A cultura é o método de detecção definitivo para a esporotricose, havendo limitações apenas em formas da doença onde a coleta do material é dificultada, como na esporotricose osteoarticular. Nesse método, os espécimes clínicos são espalhados em ágar *Sabouraud* com adição de cloranfenicol acrescido de cicloheximida, podendo também ser cultivado em ágar batata e ágar infusão cérebro-coração. O cultivo deve ser realizado em duplicata, incubando as amostras por até três semanas, a 25 e 37 °C, para confirmação do dimorfismo do agente e caracterização macro e micromorfológica das colônias. De 5 a 7 dias já se pode observar o crescimento da fase filamentosa (ALMEIDA, 2008; BARROS, PAES e SCHUBACH, 2011; LACAZ et al., 2002; OLIVEIRA, 2014; SIDRIM e ROCHA, 2010).

O exame histopatológico é outro teste auxiliar no diagnóstico da esporotricose, sendo que os tecidos afetados corados pelas técnicas histoquímicas de hematoxilina-eosina, ácido periódico de Schiff e metenamina argêntica de Gomori permitem evidenciar a forma leveduriforme do *S. schenckii*. Deve-se observar corpos asteroides, uma forma do corpo “enjaular” o parasito, na zona periférica do granuloma, porém esse método não é usado como rotina num laboratório de micologia, já que achados histopatológicos são inespecíficos, pois o organismo não é facilmente visualizado. Reações teciduais também podem ser observadas como inflamação supurativa e granulomatosa da derme e tecido subcutâneo, frequentemente acompanhada de micro abscessos e fibrose (ALMEIDA, 2008; OLIVEIRA, 2014; SIDRIM e ROCHA, 2010).

Testes sorológicos não são realizados na rotina de clínicas veterinárias, somente para diagnóstico em humanos (MEIRELES & NASCENTE, 2009; TABOADA, 2004), os mais empregados são reações de fixação de complemento, imunodifusão, imunofluorescência indireta e o teste de soroaglutinação, a técnica mais sensível e de fácil execução, útil para monitorar a resposta ao tratamento e na detecção de esporotricose extracutânea. O teste cutâneo da esporotriquina, um antígeno cutâneo do fungo para injeção intradérmica, detecta hipersensibilidade tardia, reagindo positivamente com cerca de 90% dos casos confirmados de esporotricose; porém é um teste apenas de exclusão da doença, pois reage positivamente em infecções recentes e antigas (ALMEIDA, 2008; RESENDE e FRANCO, 2001; LARSSON, 2011).

A reação em cadeia da polimerase pode também ser utilizada diretamente a partir de amostras teciduais biopsiadas de pacientes felinos, caninos ou humanos, tomando por base o gene da quitina sintetase para os quais foram desenvolvidos *primers* de oligonucleotídicos. Essa técnica possui vantagens particulares no diagnóstico em casos onde apenas alíquotas são obtidas da amostra, dependendo seu sucesso da especificidade e sensibilidade dos iniciadores. Entretanto, ainda não se utilizam frequentemente métodos baseados em detecção molecular para o diagnóstico da esporotricose e, certamente, ainda há muito que se fazer para torná-los mais simples e baratos (CRUZ, 2013; KANO et al., 2001; LIU et al., 2012).

2.1.7 Tratamento farmacológico

O número de substâncias químicas existentes com ação antifúngica é restrito quando comparado ao número de fármacos antibacterianos disponíveis (NOBRE et al., 2002; GOMES et al., 2012). Além disso, este tipo de tratamento se mostra muito mais difícil e limitado, devido à proximidade estrutural da célula fúngica com células do hospedeiro, resultando em medicamentos antifúngicos de estreita faixa terapêutica e com elevada toxicidade (PAPPAS et al., 2000; ROMANI, FRANCESCO e PUCETTI, 2007).

Para o tratamento da esporotricose faz-se necessário, primeiramente, o reconhecimento da extensão da infecção e a identificação de fatores que predis põem o hospedeiro à gravidade da doença. A escolha dos antifúngicos adequados no tratamento baseia-se na condição clínica do indivíduo, na dimensão das lesões cutâneas, na avaliação das interações medicamentosas, nos efeitos adversos e no envolvimento sistêmico (CORDEIRO et al., 2011). A dificuldade no tratamento pode ser atribuída a fatores como: diagnóstico tardio, baixo arsenal terapêutico, longa duração do tratamento e desistência da terapia pelos pacientes (GOMES et al., 2012).

Diversas modalidades de tratamento são descritas para a esporotricose, variando desde a implementação de calor local, para a forma fixa da doença, até a utilização de fármacos. Existem vários antifúngicos que podem ser utilizados no tratamento da esporotricose, dentre eles, o iodeto de potássio, a anfotericina B, o itraconazol e a terbinafina. A solução saturada de iodo possui baixo custo e elevada eficácia nas formas mais comuns da doença, porém devido a seus elevados efeitos adversos, o itraconazol via oral tem sido o fármaco de escolha para o tratamento da esporotricose (MAHAJAN et al., 2005; NOBRE et al., 2002; PEREIRA et al., 2009).

O tempo de tratamento geralmente é bem extenso, durando geralmente de três a seis meses em pacientes sem imunossupressão, pois nestes pacientes pode-se levar um tempo bem maior e utilizar doses mais elevadas para conseguir a cura (SCHUBACH et al., 2005).

O tratamento da esporotricose em casos de gravidez é muito importante, porém a maioria dos medicamentos possui contraindicação nesse caso, como o iodeto de potássio e o itraconazol. Na forma cutânea da doença é bastante aconselhável a termoterapia, ou seja, a aplicação de calor (42 - 43 °C) no local da

lesão através de uma bolsa de água quente, fonte de infravermelho ou outro método semelhante até a completa cicatrização. A anfotericina B pode ser usada após a 12 semanas de gestação, porém essa medicação deve ser reservada para casos de forma pulmonar ou disseminada da doença (BARROS, PAES e SCHUBACH, 2011; LOPES-BEZERRA, SCHUBACH e COSTA, 2006; KAUFFMAN et al., 2007).

Segundo Silva e colaboradores (2012), no caso do tratamento da esporotricose felina, a administração de medicamentos é considerada um desafio, pois diferentemente dos seres humanos, a maioria das substâncias antifúngicas utilizadas apresentam efeitos tóxicos, a duração do tratamento é longa e a administração por via oral é difícil, devido à possibilidade de ocorrência de arranhaduras e/ou mordeduras por parte do felino. Para o tratamento desse animal, tem-se o itraconazol como fármaco de escolha, devido a sua eficácia e baixa intolerância, tendo que manter o tratamento por no mínimo um mês após a cura.

Entretanto, os fármacos utilizados atualmente no tratamento da esporotricose não satisfazem completamente as necessidades médicas humana e veterinária, devido, principalmente aos problemas relacionados a espectro de ação, potência, segurança e propriedades farmacocinéticas dos antifúngicos disponíveis. Além disso, são observadas falhas terapêuticas ocasionadas pela dificuldade de administração do fármaco, longo tempo de tratamento, custo elevado dos medicamentos e abandono de terapia devido à remissão espontânea da doença. Essas falhas, juntamente com a restrita opção de fármacos, tornam o tratamento da esporotricose difícil e contribuem para a permanência do agente etiológico no ambiente e o desenvolvimento de resistência. Assim, fármacos alternativos de menor toxicidade e maior eficácia se mostram necessários (BARROS et al., 2010; CRUZ et al., 2013; HEIDRICH et al., 2011; KOHLER et al., 2004; MADRID et al., 2007; MEINERZ et al., 2007; SILVA et al., 2012).

2.1.7.1 Iodeto de potássio

Desde o início do século XX, a solução saturada de iodeto de potássio é usada no tratamento da esporotricose, com taxas de sucesso terapêutico variando entre 80 e 100%. Além disso, o baixo custo financeiro colocou este composto na posição de fármaco mais utilizado nos casos de esporotricose. O iodeto de potássio é um fungicida de amplo espectro, indicado principalmente em dermatofitoses, que

apresenta melhora efetiva em pacientes humanos frente às formas cutânea e linfocutânea da esporotricose. Em casos de esporotricose cutânea disseminada, extra-cutânea ou sistêmica não se observa a mesma eficácia, não sendo recomendado seu uso (CORDEIRO et al., 2011; BARROS; PAES e SCHUBACH, 2011; KAUFFMAN et al., 2007).

O exato mecanismo de ação do iodeto de potássio permanece desconhecido. Alguns estudos sugerem que o iodeto de potássio gera aumento da proteólise agindo sobre os granulomas, enquanto outros autores afirmam que este sal pode promover aumento da fagocitose (BARROS, PAES e SCHUBACH, 2011).

Em medicina veterinária, tem seu uso gradativamente descontinuado devido aos frequentes efeitos tóxicos que acometem principalmente os felinos. Essa espécie mostrou-se extremamente sensível ao uso de preparados contendo iodo, podendo ser observado em alguns casos sinais de iodismo, os quais incluem vômitos, anorexia, hipotermia e colapso cardiovascular. Em alguns casos, o quadro clínico do felino foi agravado podendo levar a óbito do animal.

Essa solução também não é recomendada para uso em grávidas, pois está associado a hipotireoidismo neonatal, tireomegalia, obstrução respiratória fetal e parto demorado. Devido aos efeitos adversos relacionados aos iodetos, seu uso vem sendo substituído por fármacos mais efetivos e seguros como cetoconazol e itraconazol (COSTA, R., et al., 2011; WELSH, 2003).

2.1.7.2 Azóis

Os azóis são fármacos de origem sintética e possuem amplo espectro de ação, agindo na maioria das leveduras e dos fungos filamentosos. Todos os componentes desse grupo possuem estrutura química e mecanismo de ação semelhante. Atuam alterando a membrana plasmática fúngica, por agirem na biossíntese e incorporação do ergosterol, gerando alterações na sua fluidez e permeabilidade celular, impedindo o crescimento fúngico (BENNETT, 2005; NOBRE et al., 2002; RANG et al., 2008)

Nos últimos anos, o itraconazol foi classificado como fármaco de primeira escolha para o tratamento das formas cutânea e linfocutânea da esporotricose em pacientes imunocomprometidos, os quais apresentaram formas clínicas mais extensas e com acometimento sistêmico. Estudos demonstraram sua eficácia, *in vitro* e *in vivo*, em pacientes com esporotricose cutânea, linfocutânea e extra-

cutânea; bem como em animais, principalmente felinos. Sua maior especificidade pelas enzimas do citocromo P-450 dos fungos é a principal vantagem para seu uso, juntamente com a ausência de efeitos sobre o mecanismo de andrógenos e cortisol, pois diminui drasticamente os efeitos adversos comparados aos outros medicamentos (CRUZ, 2013; KAUFFMAN et al., 2007; SILVA et al., 2012)

As vantagens relacionadas a este fármaco levaram a sua intensa utilização, sendo, atualmente, um dos antifúngicos mais utilizados nas clínicas médicas humana e veterinária. Apesar de ser um fármaco com reduzida toxicidade, alguns efeitos adversos foram descritos, como anorexia, hipocalcemia, náuseas, vômitos, hipertensão e cefaleia; e seu uso não é aconselhado para grávidas (BARROS, PAES e SCHUBACH, 2011; MEINERZ et al., 2007).

Devido ao seu uso indiscriminado, têm sido observados frequentes relatos de isolados fúngicos resistentes com consequentes falhas terapêuticas e remissão de sintomas das enfermidades micóticas (SILVEIRA et al., 2009; MEINERZ et al., 2007). Isolados clínicos de *S. schenckii* de gatos do Rio de Janeiro, sugeriram resistência ao itraconazol, com altos valores das concentrações inibitórias mínimas (CIM) em comparação aos de seres humanos estudados e aos da literatura (KOHLENER et al., 2004).

2.1.7.3 Anfotericina B

A anfotericina B é um antibiótico macrolídeo poliênico produzido naturalmente pelo actinomiceto *Streptomyces nodosus*, o qual vem sendo utilizado desde o final dos anos 50 e em 1965, foi o primeiro agente antifúngico aprovado pelo *Food and Drug Administration*. Seu mecanismo de ação ocorre pela interação com o ergosterol da membrana fúngica, formando poros e alterando a permeabilidade da célula fúngica. Esses poros permitem o escape de constituintes citoplasmáticos, causando desequilíbrio eletrolítico e homeostático. Essa ação impede o crescimento fúngico e leva a morte celular (GRAY et al., 2012; RANG et al., 2008).

Apesar de este medicamento possuir elevada toxicidade, por apresentar alta afinidade por moléculas de colesterol, agindo nas células do paciente; a anfotericina B se mantém como fármaco de escolha no tratamento das formas extra-cutânea e sistêmica da esporotricose. É também o fármaco de escolha na gravidez, podendo ser usado a partir de 12 semanas de gestação. Seus efeitos adversos incluem febre,

calafrios, tremores, náuseas e vômitos, dor de cabeça, entre outros. Em animais, apesar de pouco elucidado, seu uso não se associou à melhora terapêutica em felinos, não sendo recomendado (BUSTAMANTE e CAMPOS, 2004; COSTA, R., et al., 2011; FILLIPIN e SOUZA, 2006).

2.2 PLANTAS MEDICINAIS NO SETOR FARMACÊUTICO

Desde milhares de anos antes de Cristo, o uso de plantas medicinais como tratamentos alternativos para diversas doenças é uma prática comum da população. Segundo Dutra e colaboradores (2016), o interesse pelos produtos derivados da fauna e flora tem crescido significativamente no mundo todo, principalmente nos países desenvolvidos, sendo estimado que cerca de 30% dos medicamentos utilizados nas terapias modernas sejam derivados de fontes naturais.

As potencialidades de uso das plantas medicinais encontram-se longe de estarem esgotadas, afirmação endossada pelos novos paradigmas de desenvolvimento social e econômico baseados nos recursos renováveis. Das 250 mil diferentes espécies de plantas, somente 1% está sendo utilizado como matéria-prima vegetal, o que demonstra o enorme potencial de expansão deste mercado (ASSIS et al., 2015).

O Brasil é o país com maior biodiversidade total do mundo. Sua grande extensão territorial permite o desenvolvimento de diferentes biomas como a Floresta Amazônica, Mata Atlântica, Cerrado e Caatinga, caracterizando diferentes fontes para obtenção de compostos naturais ativos para diferentes enfermidades (ASSIS et al., 2015; BIAVATTI et al., 2007; DUTRA et al., 2016; SAMY et al., 2005).

Apesar de rica biodiversidade, o potencial de uso ainda é pouco explorado, existindo relatos de investigação de apenas 0,4% da flora. Além disso, o Brasil importa quase 100% das matérias-primas para produção de medicamentos fitoterápicos, sendo apenas uma pequena parte dos fitoterápicos registrados na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) oriunda de espécies nativas (ADAME, JACCOUD e COBRA, 2005; BRASIL, 2012).

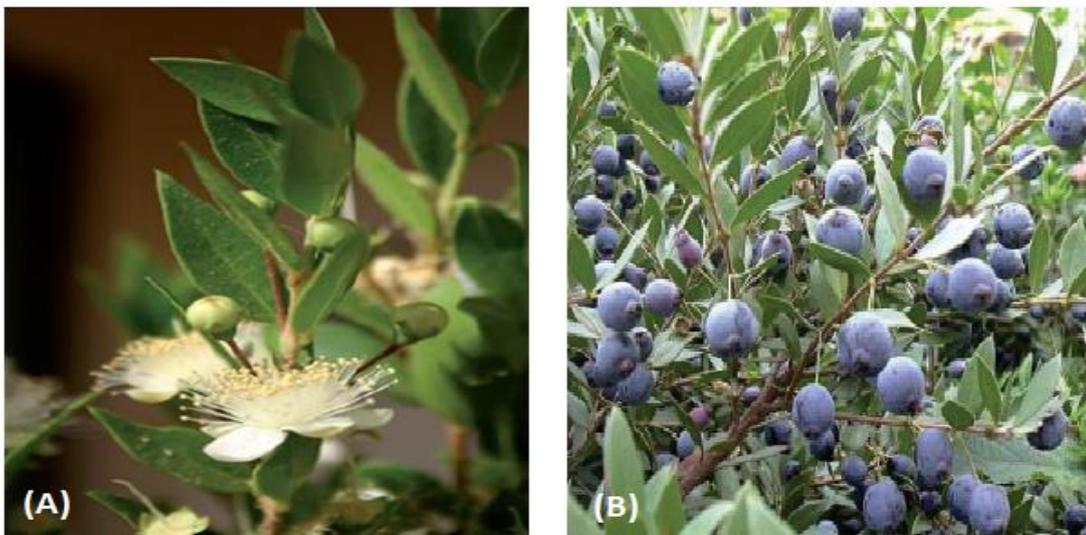
Nesse contexto, deve-se incentivar a exploração da flora nacional para busca de novos medicamentos, visto que os produtos naturais podem fornecer oportunidades ilimitadas com sua vasta diversidade química.

2.3 *Myrtus communis* L.

A família *Myrtaceae* compreende 140 gêneros e mais de 3.500 espécies de árvores e arbustos distribuídos em regiões tropicais e subtropicais da Austrália, Ásia e Américas. Apresenta grande potencial econômico, sendo suas espécies usadas para alimentação (goiabeira, jabuticabeira e pitanga), ornamentação (“murta” e “érica”) e como medicação (“eucalipto” usado no tratamento da gripe, congestão nasal e sinusite). No Brasil, existem 23 gêneros e cerca de 1.000 espécies (CONCEIÇÃO e ARAGÃO, 2010; DONATO e DE MORRETES, 2007; MORAIS, CONCEIÇÃO e NASCIMENTO, 2014).

Myrtus communis L. é uma planta da família *Myrtaceae* conhecida popularmente por “murta-comum” ou “mirta”. É arbustiva, com caule ereto e pequenas folhas opostas e, em determinadas épocas do ano, floresce apresentando flores alvas, regulares e hermafroditas, as quais exalam um aroma característico. Possui também frutos que são bagas globulosas, azuladas, com cálice mais ou menos espesso na parte terminal. Essa planta procedente da região do mediterrâneo tem preferência por locais secos, e pode ser encontrada em diversas regiões do Brasil. É amplamente utilizada em parques, jardins e vias públicas (DE AZEREDO, RODRIGUES e CASSINO, 2004; BRAVO, 1998; SALVAGNANI et al., 2008). Na figura 8 pode-se observar a estrutura da planta, suas flores e frutos.

Figura 8 – *Myrtus communis* L.



Fonte: Adaptado de ÖZKAN e GÜRAY, 2009; e SUMBUL et al., 2011. A: flores. B: frutos.

A composição de seu extrato pode variar dependendo da parte da planta utilizada e o modo de extração, mas no geral é rico em compostos fenólicos, como ácidos fenólicos, taninos e flavonoides. Já seu óleo essencial, descrito por diversos autores, possui compostos que podem se classificar em três classes principais: terpenos, terpenoides e fenilpropanoides (ALEKSIC e KNEZEVIC, 2014).

A mirta vem sendo utilizada desde tempos antigos como tempero, remédio e cosmético. Özkan e Güray (2009) citam diversas indicações medicinais tradicionais da mirta. Em textos médicos egípcios seu uso foi verificado como remédio para distúrbios urinários, dores, azia, inchaço e expectorante. Na Grécia, seu uso era em forma de pasta aplicada no colo do útero como contraceptivo. Em Roma, seu uso ia desde a confecção de vinhos a remédio para constipação. E na Turquia era utilizada contra queixas respiratórias e até picadas venenosas de aranha e escorpião.

Segundo Zomorodian e colaboradores (2013), diferentes partes dessa espécie vegetal são utilizadas nas indústrias cosmética e alimentícia como flavorizante para carnes e molhos. Na Itália, seus frutos são usados na medicina popular para tratar várias infecções como diarreia e disenteria; e suas folhas como agente antisséptico e anti-inflamatório, bem como enxaguante bucal no tratamento da candidíase (GORTZI et al., 2008).

Na medicina tradicional, a infusão e decocção das folhas e frutos da mirta são usadas oralmente para o tratamento de dores de estômago, hipoglicemia, tosse, constipação, falta de apetite (SERCE et al., 2010). Também é muito utilizada como antisséptico e anti-inflamatório, características estas atribuídas a presença de floroglucinol em seu óleo essencial, bem como de polifenóis, como os flavonóides (BRAVO, 1998; YOSHIMURA et al., 2008).

No Sul do Brasil, suas folhas são utilizadas tradicionalmente como medicamento para problemas estomacais (SALVAGNANI et al., 2008). De suas folhas é extraído um aromático óleo essencial com ações antifúngica, antimicrobiana e antioxidante conhecidas (MOHAMMADI et al., 2008; RASOOLI et al., 2002; SALVAGNINI et al., 2008; YADEGARINIA et al., 2006). Vários compostos vêm sendo isolados de suas folhas, óleo essencial e frutos (MONTORO et al., 2006).

Propriedades antifúngicas foram observadas contra *Aspergillus* (MOHAMMADI et al., 2008) e *Trichomonas vaginalis* (MAHDI, GANY e SHARIEF, 2006). Seu potencial antimicrobiano para preparações brutas é descrito em estudos *in vitro* contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*,

Proteus vulgaris, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella aerogenes*, *Salmonella* e *Shigella* (ALEM et al., 2008).

Mansouri e colaboradores (2001) demonstraram a ação do extrato metanólico de mirta de inibir o crescimento bacteriano contra *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, e *Pseudomonas aeruginosa*. Já seu óleo essencial foi descrito contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* (YADEGARINIA, et al., 2006), e *Mycobacterium tuberculosis* (ZANETTI et al., 2010).

2.4 *Thymus vulgaris* L.

A família Lamiaceae compreende mais de 200 gêneros e cerca de 7.000 espécies de ervas aromáticas, arbusto ou árvores distribuídas em todo o mundo, sendo o maior centro de dispersão a região do mediterrâneo. Essa família apresenta grande importância medicinal e condimentar. Muitas de suas espécies são plantas produtoras de óleos essenciais, sendo utilizadas como flores ornamentais ou condimento, destacando-se as espécies: *Mentha piperita* L., *Origanum vulgare* L., entre outras (NAGHIBI et al., 2005; PORTE e GODOY, 2001)

O óleo essencial do gênero *Thymus* é amplamente usado como agente antisséptico, contra dores de garganta, tosse e bronquite em muitas preparações farmacêuticas e aromatizante para vários produtos alimentares (CORTICCHIATO et al., 1998; FIGUEIREDO et al., 2008)

Thymus vulgaris L. é uma planta da família Lamiaceae originária da Europa e cultivada no sul e sudeste do Brasil. Conhecida popularmente como tomilho e tomilho comum, e possui propriedades medicinais, aromáticas e condimentares. Suas folhas e botões florais são amplamente utilizados na medicina popular. Seu odor é aromático e o sabor ligeiramente amargo, se assemelhando a cânfora. Essa planta é um subarbusto perene, ereto, ramificado, muito aromático, que cresce até 50 cm de altura, com ramos levemente cobertos de pelos brancos e de folhas simples, pequenas, escuras e ovais, com comprimento entre 6 -12 mm. Suas flores são brancas ou roxas. Seu crescimento não demanda muitas exigências, preferindo regiões secas, áridas, expostas ao sol, com solos arenosos e calcários

(FIGUEIREDO et al., 2008; NAHGIBI et al., 2005; NASCIMENTO et al., 2000). A Figura 9 mostra espécie vegetal.

Figura 9 – *Thymus vulgaris* L.



Fonte: FAYAD et al., 2013.

Tanto o extrato da folha do tomilho, quanto seu óleo essencial são compostos por uma mistura de monoterpenos, sendo os principais componentes o timol e seu isômero fenólico carvacrol. Esses compostos possuem ações antioxidantes, antimicrobianas, antiespasmódica e expectorante comprovadas na literatura. Podem ser encontrados terpenoides, flavonoides e ácidos fenólicos também em seu óleo essencial (CALÓ, VISIONE e MARABINI, 2015; FACHINI-QUEIROZ et al., 2012).

Na medicina popular, a infusão das flores ou da planta seca é usada internamente como tônico, estomáquico e antiespasmódico, e externamente como antisséptico e parasiticida. O pó da planta seca foi usado contra hemorragia nasal e em uma mistura com mel contra tosse forte. A infusão da planta inteira foi relatada como indutor do sono, o chá para dor de cabeça e banhos como estimulantes uterino durante o parto (FIGUEIREDO et al., 2008; NAGHIBI et al., 2005).

Como inseticida, inúmeros trabalhos relataram o efeito do tomilho e seus constituintes em diversas espécies de insetos, bem como a redução no desenvolvimento e ovoposição de lagartas *Spodoptera littoralis*, e controle de larvas

de *Lucila sericata* (FARAG et al., 1994; MORSY et al., 1998; ISMAN et al., 2001; TSOUKATOU et al., 2001).

O extrato bruto aquoso dessa espécie foi testado *in vitro* frente a *Alternaria alternata*, *Colletotrichum Graminicola*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii* apresentando ação fungitóxica sobre os crescimentos miceliais desses fungos (TAGAMI et al., 2009). Já o extrato obtido por hidro destilação das folhas apresentou efeito protetor *in vitro* contra danos celulares causados por raios ultravioleta A e B, com ação antioxidante e redutor de radicais livres, o que sugere possível proteção ao dano direto do DNA (CALÓ, VISIONE e MARABINI, 2015).

O óleo essencial do tomilho possui atividades antimicrobianas: ação sobre o crescimento dos fungos *Penicillium digitatum*, e *Shigella* sp e sobre o crescimento de *Salmonella* e *Ataphylococcus*. Atividades carminativa e expectorante também são citadas, principalmente pela presença do timol e carvacrol em sua composição (BAGAMBOULA et al., 2004; DAFERA et al., 2000; KALEMBA e KUNICKA, 2003; SHABNUM e WAGAY, 2011).

Em outro estudo o crescimento dos dermatófitos: *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum gypseum*, *Microsporum canis* e *Epidermophyton floccosum* foi completamente inibido (GUERRA-BOONE et al., 2015).

Contra *A. fumigatus* e *T. rubrum*, o óleo essencial não só inibiu o crescimento micelial, como apresentou atividades antiproteínase. Nesse mesmo estudo foi verificada também uma ação sinérgica ao associar o citado óleo com o fluconazol, inferindo possível terapia combinada para casos onde o fármaco não se mostra efetivo (KHAN, AHMAD e CAMEOTRA, 2014).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar o potencial antifúngico, frente às principais linhagens causadoras de esporotricose no Brasil, e a citotoxicidade preliminar, dos óleos essenciais de *Myrtus communis* L. e *Thymus vulgaris* L.

3.2 ESPECÍFICOS

Avaliar a composição química dos óleos essenciais de *Myrtus communis* L. e *Thymus vulgaris* L. por meio de cromatografia gasosa.

Avaliar a atividade antifúngica, estabelecer a concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) dos óleos essenciais extraídos das folhas de *Myrtus communis* L. e *Thymus vulgaris* L. frente às principais linhagens de fungos causadoras de esporotricose no Brasil, cepas padrões e clínicas.

Avaliar por microscopia eletrônica de varredura (MEV), as principais alterações morfológicas nas estruturas fúngicas, ocasionadas pelos óleos essenciais e fármacos de referência, tendo como base de comparação a célula fúngica que não foi exposta a nenhuma substância antifúngica.

Avaliar a citotoxicidade preliminar dos óleos essenciais de *Myrtus communis* L. e *Thymus vulgaris* L. frente a linhagem de queratinócitos humanos (HaCaT).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ÓLEOS ESSENCIAIS

Neste estudo foram utilizados óleos essenciais de mirta (*Myrtus communis* L.) (quimiotipo cineol) e tomilho branco (*Thymus vulgaris* L.), lotes MURTACIN05 e THYVUL20014, respectivamente. Os mesmos foram adquiridos comercialmente através da empresa Laszlo® Aromatologia Ltda e obtidos por meio do método de hidrodestilação, destilação por arraste a vapor, conforme informado pelo fabricante.

4.1.1 Cromatografia gasosa (CG)

Os óleos essenciais de mirta e tomilho foram encaminhados para o Departamento de Química/Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais onde foram analisados por cromatografia gasosa (CG). Esta análise permitiu a separação e posterior identificação, quantitativa e qualitativa, dos constituintes químicos de cada óleo essencial.

Para ambos os óleos essenciais, as análises foram realizadas em cromatógrafo a gás de alta resolução (HP-5890) equipado com detector de ionização de chama e módulo de injeção com razão de divisão (*split*) de 1/50. As amostras foram diluídas a 0,5% em clorofórmio, e o volume de injeção foi de 1 µL de amostra. O hidrogênio foi utilizado como gás de arraste a uma vazão de 2 mL/min. A programação da temperatura do forno foi de uma isoterma inicial de 1 minuto a 60°C, seguida da taxa de 3°C/min até atingir a temperatura de 220°C. Tanto no injetor quanto no detector, a temperatura utilizada foi de 220°C. Utilizou-se a coluna HP-BP1 de 30 mm de comprimento por 0,25mm de diâmetro interno. A identificação dos picos foi feita por cálculo de tempo de retenção, com padrões de hidrocarbonetos lineares de C₁₀ a C₁₈ e dados da literatura (ADAMS, 2009).

4.2 LINHAGENS FÚNGICAS DE INTERESSE

Para realizar os ensaios antifúngicos deste estudo foram utilizadas quatro linhagens padrão e duas clínicas de fungos do complexo *Sporothrix schenckii*.

As linhagens clínicas de *Sporothrix schenckii* utilizadas foram gentilmente cedidas pelo departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências de Botucatu da Universidade Estadual de São Paulo, e, para caráter de identificação, denominadas genericamente como A e B. Já as linhagens padrão de *Sporothrix* sp.: *Sporothrix schenckii* ATCC 1099-18, *Sporothrix schenckii* IPEC 15383, *Sporothrix brasiliensis* ATCC 5110 e *Sporothrix brasiliensis* IPEC 17943; foram cedidas gentilmente pelo laboratório de Micologia Celular e Proteômica do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da Universidade Estadual do Rio de Janeiro. Todas as linhagens utilizadas neste estudo estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2 – Linhagens fúngicas utilizadas.

Linhagem Fúngica	Tipo de linhagem
<i>S. schenckii</i> A	clínica
<i>S. schenckii</i> B	clínica
<i>S. schenckii</i> ATCC 1099-18	padrão
<i>S. schenckii</i> IPEC 15383	padrão
<i>S. brasiliensis</i> ATCC 5110	padrão
<i>S. brasiliensis</i> IPEC 17943	padrão

Para conservação e manutenção dos microrganismos, as linhagens foram cultivadas em Ágar *Sabouraud* Dextrose (ADS) e Ágar Batata Dextrose (ABD). Repiques periódicos e sucessivos, de 30 a 40 dias, eram realizados a fim de manter as cepas sempre viáveis. As linhagens fúngicas também foram armazenadas segundo a técnica de conservação em médio prazo, na qual os microrganismos são armazenados em criotubos contendo água destilada estéril, sob temperatura de -20°C, e são repostos a cada seis meses. Segundo Torotor, Funke e Case (2011), esta técnica oferece boa segurança para o armazenamento de diversos microrganismos por períodos de três meses até dois anos.

4.2.1 Caracterização Macroscópica

Segundo Brasil (2013), a identificação das linhagens fúngicas pela caracterização macroscópica tem como fundamento a observação da morfologia da

colônia. Essa análise visa observar: cor, textura, pigmento difusível no meio de cultura, e pode ser feita em placa de Petri contendo a cultura primária do fungo.

Para esse ensaio, as linhagens fúngicas foram transferidas para placas de Petri contendo meio de cultura *Ágar Sabouraud Dextrose* e incubadas a $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 7 a 10 dias. Período no qual os microrganismos já cresceram o suficiente nas placas para evidenciar suas características macroscópicas.

Após esse período, os fungos do complexo *S. schenckii* apresentaram colônias de coloração esbranquiçada, membranosas e enrugadas, como observado na Figura 10.

Figura 10 – Macroscopia de colônia de *Sporothrix schenckii* cultivado em *Ágar Sabouraud Dextrose*.



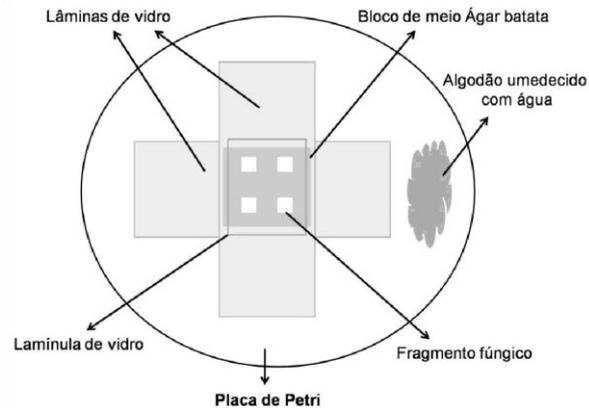
4.2.2 Caracterização Microscópica

Para a identificação dos fungos filamentosos, a observação de estruturas microscópicas como: hifa hialina ou demácia, septada ou cenocítica, forma, disposição e formação dos esporos; no geral, já é suficiente. Segundo Brasil (2013), a técnica de microcultivo preserva a disposição original dos esporos sobre as hifas e mantém íntegras certas estruturas formadoras de esporos, como esporângios e órgãos de reprodução; sendo a morfologia microscópica melhor visualizada.

Na caracterização microscópica, a técnica de microcultivo foi realizada com base com no protocolo descrito por Kern e Blevins (1999). O procedimento consiste no emprego de um bloco de *Ágar Batata Dextrose* de $1,0\text{ cm}^2$ com 4 – 5 mm de altura sobre lâminas de vidro, dispostas em cruz no interior de uma placa de Petri estéril, onde foram semeados fragmentos de fungo nos 4 lados do cubo de ágar (Figura 11). Uma lamínula estéril foi utilizada para cobrir o ágar semeado. A fim de

proporcionar um ambiente úmido, um algodão umedecido com 2 mL de água destilada estéril foi adicionado a placa. Todo sistema foi incubado em estufa a temperatura de 28 ± 2 °C por 7 a 10 dias, para o desenvolvimento de hifas.

Figura 11 – Esquema de microcultivo em lâmina de vidro.



Fonte: CANESCHI, 2013.

Após o período de crescimento descrito, a parte aérea do fungo fica aderida a lamínula, a qual é retirada e levada para análise. Uma gota de corante lactofenol azul de algodão foi acrescentada sobre uma lâmina, onde foi apoiada a lamínula. Com o auxílio do microscópio óptico (Eclipse-E200, Nikon, Japão), foi possível observar as estruturas de reprodução (conídios, conidióforos) e de ornamentação (hifas), as mesmas ampliadas em 40 vezes.

Após este período, observaram-se as estruturas de reprodução (conídios, conidióforos) e de ornamentação (hifas) (Figura 12).

Figura 12 – Microscopia optica de *Sporothrix schenckii*.



Aumento de 40x. Seta preta indica a presença de hifas septadas, e seta vermelha presença dos conídios.

4.3 ENSAIO ANTIFÚNGICO

O ensaio antifúngico compreende a triagem microbiológica, a determinação da concentração inibitória mínima e a determinação da concentração fungistática mínima. Neste ensaio é determinado não só a ação de cada amostra, fungicida ou fungistática, como também a quantidade necessária para exercê-la.

4.3.1 Triagem microbiológica

A triagem microbiológica foi realizada pela técnica de microdiluição em caldo, como descrita pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* CLSI (2008), para determinação da concentração inibitória mínima (CIM), utilizando apenas a maior concentração das amostras, para avaliar o potencial antifúngico dos óleos essenciais de *Myrtus communis* L. e *Thymus vulgaris* L. As análises foram realizadas em placas estéreis de 96 poços, de fundo chato. Todas as análises foram feitas em triplicata.

A atividade do óleo essencial extraído das folhas de mirra (*Myrtus communis* L.) e tomilho branco (*Thymus vulgaris* L.) foi avaliada, separadamente, na concentração final de 1000 µg/mL do constituinte majoritário de cada óleo. A solução de cada amostra foi incubada com o inóculo padronizado de cada linhagem fúngica a 28 ± 2 °C por 4 dias. Após este período foi visualmente observada a presença/ausência de crescimento fúngico, indicando susceptibilidade ou não das linhagens fúngicas aos óleos testados.

4.3.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A determinação da CIM foi realizada conforme o protocolo M38-A2 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (2008). Foram utilizadas placas estéreis de 96 poços e de fundo chato. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.3.2.1 Padronização do inóculo fúngico

O primeiro passo para a determinação da CIM foi a padronização do inóculo fúngico, de modo a ajustar a densidade de células da solução fúngica em

aproximadamente $0,4 \times 10^4$ a 5×10^4 UFC/mL, faixa na qual, segundo a recomendação do CLSI (2008), os dados mais reprodutíveis são fornecidos.

As linhagens fúngicas foram cultivadas em Ágar Sabouraud Dextrose (SDA) durante sete dias, à temperatura de 28°C, em placas estéreis de doze poços com fundo chato, para induzir a formação de estruturas de reprodução. Após o crescimento, foi realizada a lavagem da cultura, em um dos poços da placa, com 2 mL de solução salina estéril 0,9% (p/v) e 20 µL de solução DMSO / Tween-80 1:1 (v/v). Essa etapa deve ser repetida por mais duas vezes apenas com salina estéril 0,9% (p/v), realizando-se três lavagens no total.

A suspensão resultante de conídios e fragmentos de hifas foi transferida para um tubo de ensaio estéril. Quando as partículas mais pesadas se depositaram no fundo, após 3 a 5 minutos, a parte superior da suspensão foi transferida para um tubo cônico estéril e homogeneizada em um agitador de tubos durante 15 segundos.

Para fazer a leitura da suspensão fúngica foi utilizado o espectrofotômetro (Libra S12, Biochrom, UK). A transmitância da solução foi medida e ajustada na faixa de 80 a 82%, empregando o comprimento de onda fixo de 530 nm. Posteriormente, esta suspensão foi diluída na proporção de 1: 50 (v/v) em meio RPMI-1640 tamponado (pH = 7,0) com ácido 3-(N-morfolino) propano sulfônico (MOPS) obtendo-se a densidade desejada de $0,4 \times 10^4$ a 5×10^4 UFC/mL.

A suspensão final preparada foi empregada para a determinação da CIM, por meio da transferência de uma alíquota de 100 µL desta suspensão para a microplaca. Todas as suspensões descritas foram utilizadas logo após o preparo das mesmas.

4.3.2.2 Preparo das amostras

Para cada amostra foi preparada uma solução estoque (SE) na concentração de 2.000 µg/mL do componente majoritário de cada óleo de interesse. Essa concentração garante o teste das amostras na concentração inicial de 1.000 µg/mL, uma vez que na placa serão adicionados 100 µL da suspensão fúngica padronizada diluindo-a.

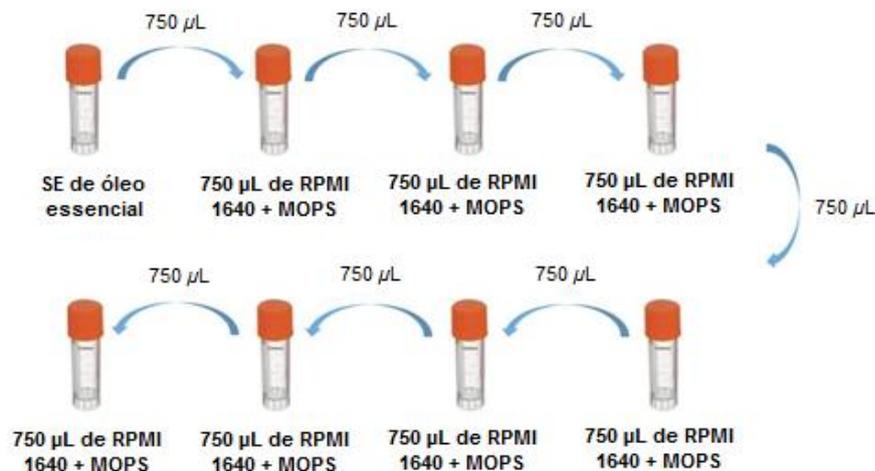
O componente majoritário do óleo essencial de *Myrtus communis* L. foi o 1,8-cineol, sendo assim, sua SE foi ajustada para concentração de 2.000 µg/mL de

1,8-cineol. Enquanto a SE do óleo essencial de *Thymus vulgaris* L. foi ajustada para 2.000 µg/mL de timol, o componente majoritário dessa amostra.

No preparo da solução estoque do óleo essencial de mirra foram adicionados 12,39 µL de óleo; 10,32 µL de solução de DMSO/*Tween* 80 1:1 (v/v) e 1.477,3 µL de RPMI 1640. Na solução estoque do óleo essencial de tomilho branco, foram empregados 4,33 µL do mesmo, 3,6 µL de solução de DMSO/*Tween* 80 1:1 (v/v) e 1.492,07 µL de RPMI 1640.

A partir das soluções estoque, foram preparadas diluições sucessivas (1:2) v/v em meio de cultura RPMI 1640 mais ácido 3-(N-Morpholino)propanesulfônico (MOPS) conforme demonstrado na figura 13. As concentrações testadas foram de 7,81 µg/mL a 1.000 µg/mL para os óleos essenciais.

Figura 13 – Esquema de preparo da diluição seriada a partir da solução estoque do óleo essencial.



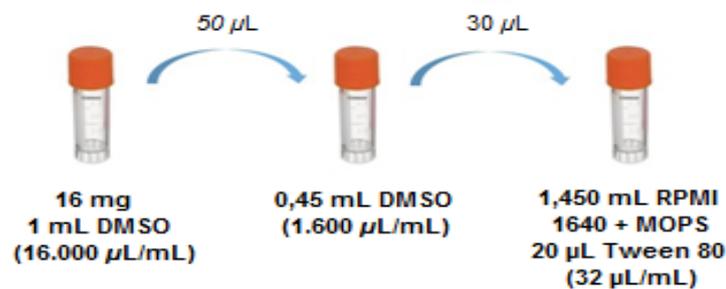
4.3.2.3 Preparo das soluções dos fármacos de referência

Os fármacos de referência testados foram: anfotericina B e itraconazol. Estes foram testados na faixa de concentração preconizada pelo CLSI (2008), excetuando-se o Itraconazol, testado em concentrações maiores do que as recomendadas.

Para o ensaio com a anfotericina B, foi feita uma SE, pesando-se 16 mg do fármaco e dissolvendo-se em 1 mL de DMSO. Uma alíquota de 50 µL dessa solução

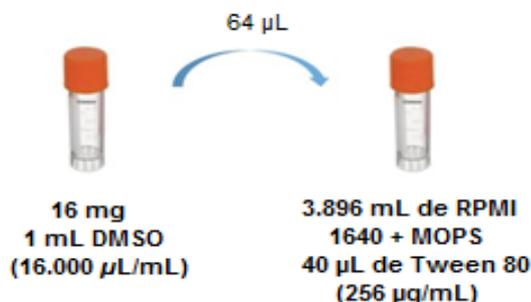
foi então dissolvida em 0,45 mL de DMSO. Novamente uma alíquota de 30 μL foi dissolvida em 1,450 mL de RPMI 1640 e 20 μL de Tween 80, para auxiliar na solubilização do fármaco, resultando numa solução estoque de concentração 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$, conforme representado na Figura 14. A partir desta solução estoque final, foram preparadas diluições sucessivas 1:2 (v/v). As concentrações finais testadas na microplaca foram de 0,0313 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Figura 14 – Esquema de preparo das soluções estoque de anfotericina B.



Para o preparo da solução do fármaco de referência itraconazol, pesou-se 16 mg e solubilizou-se em 1 mL de DMSO. Dessa solução foi retirada uma alíquota de 64 μL e transferida para um Falcon, onde adicionou-se 3,896 mL de RPMI 1640 mais MOPS e 40 μL de *Tween* 80, para auxiliar na solubilização do fármaco, obtendo-se uma solução estoque na concentração de 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$, conforme representado na Figura 15. A partir dessa solução estoque, foram preparadas diluições sucessivas 1:2 (v/v). As concentrações finais testadas na microplaca foram de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Figura 15 – Esquema de preparo da solução estoque de itraconazol.



4.3.2.4 Preparo das soluções controle

Foram preparadas três soluções controles. A primeira foi o controle dos diluentes, neste caso DMSO e *Tween* 80, com o intuito de verificar se os diluentes possuem ação antifúngica sobre as linhagens fúngicas analisadas, podendo gerar um resultado falso positivo no teste. Para tal, foi feita uma solução adicionando-se a maior quantidade de DMSO/*Tween* 80 1:1 (v/v) utilizada na solubilização das amostras/fármacos de referência em quantidade suficiente de RPMI 1640 + MOPS para um volume final de 1.500 μ L. Esse controle foi feito em triplicata e incubado por quatro dias a 28 °C \pm 2 °C (Figura 16). Neste caso, deveria haver crescimento fúngico após esse período comprovando a não interferência dos diluentes no crescimento do microrganismo.

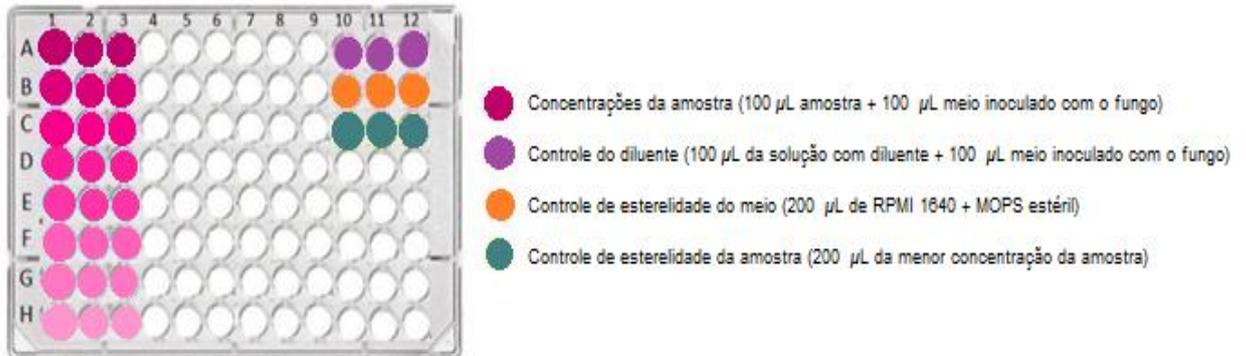
O segundo controle foi para verificar a esterilidade do meio de cultura utilizado. Para isso, 200 μ L de RPMI 1640 + MOPS foi adicionado aos poços em triplicata e incubado por quatro dias a 28°C \pm 2°C (Figura 16). Neste caso, não deveria haver crescimento fúngico, garantindo-se assim, a esterilidade do meio utilizado.

O terceiro controle tinha como objetivo comprovar a esterilidade da amostra, evitando resultados falsos negativos. Para tal, 200 μ L da menor concentração de cada amostra foi incubado em triplicata por quatro dias a 28 °C \pm 2 °C (Figura 16). Neste caso, também não deveria haver crescimento fúngico.

4.3.2.5 Montagem da microplaca

No preparo da microplaca foram adicionados em cada poço, 100 μ L do meio RPMI 1640 + MOPS inoculado com o fungo e 100 μ L das soluções das amostras em triplicata e para cada concentração (Figura 16). A microplaca foi incubada a 28 °C \pm 2 °C por quatro dias.

Figura 16 – Representação esquemática da montagem do ensaio antifúngico em microplaca estéril de 96 poços.



Após este período, foi realizada a interpretação do teste verificando em quais poços o fungo cresceu. A menor concentração da amostra em que não houve crescimento fúngico foi considerada o valor da CIM. As faixas de teste para as amostras e fármacos de referência encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3 – Faixa de teste das amostras e dos fármacos de referência utilizados no ensaio antifúngico.

Amostra	Faixa de teste (μ g/mL)
óleo essencial de <i>Myrtus communis</i> L.	7,81 a 1,000
óleo essencial de <i>Thymus vulgaris</i> L.	7,81 a 1,000
anfotericina B	0,0313 a 16
itraconazol	1 a 16

4.3.3 Determinação da concentração fungicida mínima (CFM)

Após a leitura dos resultados da CIM, pode-se calcular a CFM. A CFM é definida como a menor concentração da substância na qual a linhagem fúngica não apresenta capacidade de crescimento, quando inoculada em meio sem antifúngicos (RASOOLI e ABYANEH, 2004).

Para isso, alíquotas de 10 µL dos poços em que não apresentaram crescimento fúngico, foram retirados e semeados em placas de 96 poços, juntamente com 200 µL de caldo *Saboraud* dextrose estéril. O sistema foi incubado por 3 dias à temperatura de 35°C.

Dessa forma, caso ocorra crescimento fúngico após a diluição da alíquota do meio contendo o agente antifúngico, este é considerado um agente fungistático. Se não houver crescimento fúngico, é considerado um agente fungicida, sendo essa amostra capaz de matar o microrganismo e não só impedir seu crescimento (CANESCHI, 2013; MAGAGNIN et al., 2011).

4.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

As análises morfológicas empregando microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram realizadas no Museu Nacional da Universidade Federal do Rio de Janeiro, baseando-se em metodologia descrita por Santos (2012). Para o ensaio, foram escolhidas duas linhagens representativas do complexo *Sporothrix schenckii*, uma cepa padrão de *Sporothrix schenckii* e outra de *Sporothrix brasiliensis*. As seguintes linhagens fúngicas foram utilizadas: *Sporothrix schenckii* ATCC 1099-18, *Sporothrix brasiliensis* IPEC 17943. As linhagens foram expostas ao fármaco de referência, anfotericina B, e aos tratamentos experimentais, óleos essenciais de *Myrtus communis* e *Thymus vulgaris*, na concentração de duas vezes a CIM. O itraconazol não foi analisado devido à evidência de resistência a este fármaco observada nos resultados da atividade antifúngica.

A padronização fúngica foi realizada da mesma forma como a descrita para a CIM e, após sete dias de incubação a 28 °C ± 2 °C em meio RPMI 1640 tamponado com MOPS, as células fúngicas foram expostas às substâncias de interesse durante sete dias a 28°C ± 2°C.

Após este período, as células fúngicas expostas as substâncias de interesse foram acondicionadas em *ependorfs*, lavadas por três vezes com solução de tampão fosfato (pH = 7.4) e fixadas em solução de glutaraldeído a 2,5%, formaldeído 4% e tampão de cacodilato 0,1 M e pH = 7,2 durante 24 horas sob refrigeração (4°C). Após a fixação, as células foram transferidas para lamínulas de vidro, tratadas

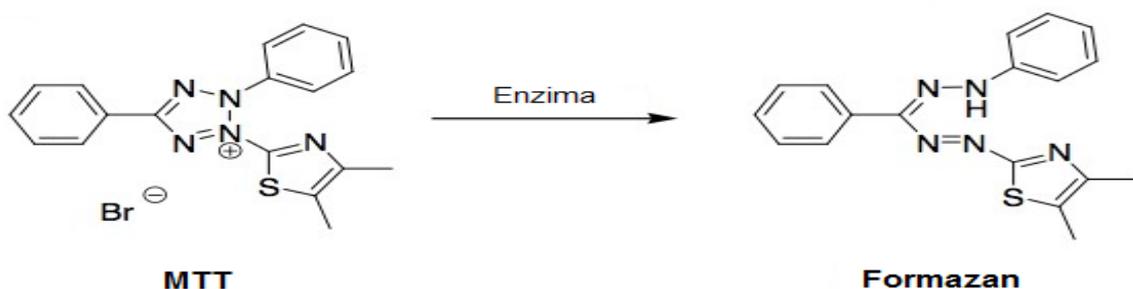
com polilisina, e pós-fixadas por 30 minutos em 1% de tetróxido de ósmio contendo 1,25% ferrocianeto de potássio.

Em seguida, as amostras foram lavadas com tampão fosfato (pH 7,2) e desidratadas em concentrações crescentes de etanol (7,5%, 15%, 30%, 50%, 70%, 95%, 100%) em intervalos de 15 minutos para cada concentração. Decorrido este procedimento, foi realizada a secagem em equipamento de ponto crítico (Leica EM-CPD030) e a metalização com ouro, no aparelho BALZERS UNION FL-9496. As amostras foram avaliadas no microscópio eletrônico de varredura (JEOL, modelo 6390L).

4.5 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE

Os ensaios de viabilidade celular foram realizados no laboratório de cultura de células do Núcleo de Pesquisa e Inovação em Ciências da Saúde, na Universidade Federal de Juiz de Fora. Utilizando a metodologia descrita por Mosmann (1983) com adaptações, a viabilidade das células foi avaliada realizando o ensaio do sal brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT). Este ensaio baseia-se na medida do dano induzido pelas amostras analisadas no metabolismo celular de glicídeos, através da avaliação da atividade de enzimas desidrogenases mitocondriais. A viabilidade mitocondrial, e conseqüentemente, a viabilidade celular, é quantificada pela redução do MTT (um sal de coloração amarela e solúvel em água) a formazan (sal de coloração arroxeadada e insolúvel em água) pela atividade das enzimas. Dessa forma, a redução do MTT a formazan, será diretamente proporcional à atividade mitocondrial e a viabilidade celular.

Figura 17 – Redução do MTT a formazan.



4.5.1 Cultivo celular

Para a realização do ensaio de viabilidade celular foi utilizada a linhagem de queratinócitos humanos (HaCaT), a qual foi cultivada em monocamada aderente em meio de cultivo DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e ácido [4-(2-hidróxietil)]-1piperazinaetanosulfônico (HEPES) 10 mM. As células cultivadas foram mantidas a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de dióxido de carbono e pH 7,4. A cada 2-3 dias, as células foram subcultivadas através da remoção de 90% do sobrenadante, o qual foi substituído por meio de cultura.

4.5.2 Preparo das amostras

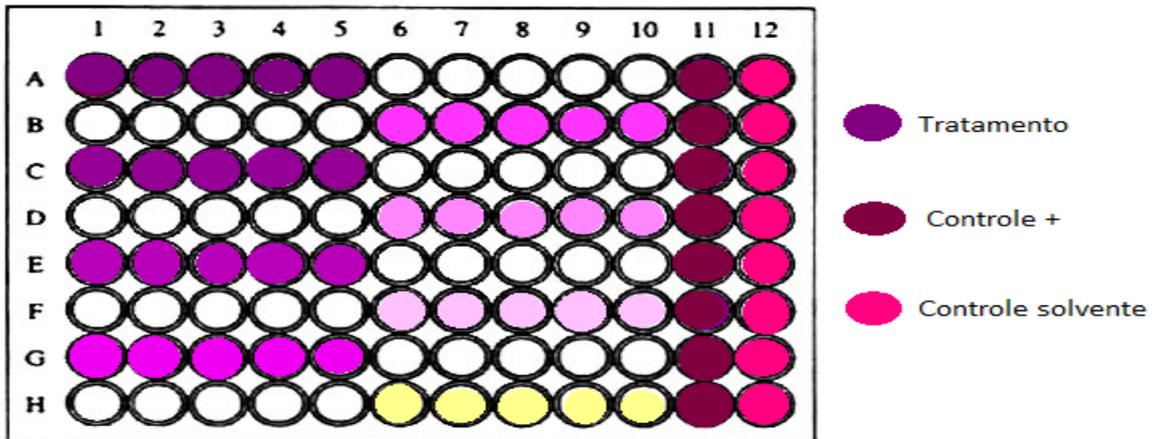
Foram preparadas soluções dos óleos essenciais nas concentrações de 3,91 µg/mL a 2000 µg/mL, em meio de cultivo DMEM, utilizando 1% de DMSO para auxiliar na solubilização.

4.5.3 Montagem do ensaio na microplaca

Os queratinócitos humanos (HaCaT) foram semeados em placas de 96 poços a uma densidade de $5 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$, em 100 µL de meio por poço, conforme Figura 18. Após 24 h de incubação, o meio de cultura foi substituído por um novo meio juntamente com a substância testada. As placas foram incubadas a 37 °C em 5% de CO₂ durante 24 h. Foi realizado o controle sob as mesmas condições, mas sem adicionar a substância teste.

Após 24 horas de tratamento, o meio foi removido, e um total de 90 mL de meio DMEM e 10 µL de MTT (mg/mL) foram adicionados seguindo-se a incubação durante 3 horas a 37 °C. O precipitado de formazan foi então dissolvido em DMSO e a absorbância foi medida a 570 nm, utilizando-se um leitor de microplacas.

Figura 18 – Representação esquemática da montagem do ensaio na microplaca.



Calculou-se a média das absorvâncias em todas as concentrações da amostra, grupo controle e branco. Posteriormente, subtraiu-se a média das absorvâncias da amostra pela média das absorvâncias do branco. O valor obtido pela subtração da média das absorvâncias do grupo controle pela média da absorvância dos brancos foi considerado com 100% de viabilidade celular. A viabilidade celular das amostras testadas foi determinada pela equação 1 a seguir:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{\text{Absorvância grupo de tratamento}}{\text{Absorvância do grupo controle}} \times 100$$

4.5.4 Análise estatística

Dados de viabilidade celular foram expressos como a média \pm desvio padrão da média. A porcentagem de viabilidade em comparação com poços do controle (a densidade de células não tratadas foi definida como 100% de viabilidade) foi calculada a partir das curvas de concentração-resposta por análise de regressão linear. Os dados de cada ensaio foram analisados estatisticamente por ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni. As diferenças entre o controle e as amostras foram consideradas significativas quando o valor de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PERFIL CROMATOGRÁFICO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Foram identificados por meio da CG 10 constituintes químicos na composição do óleo essencial de *Myrtus communis* L. Destacou-se o composto 1,8-cineol com os maiores percentuais como pode ser observado na Figura 19 e Tabela 4.

Figura 19 – Perfil cromatográfico do óleo essencial de *Myrtus communis* L.

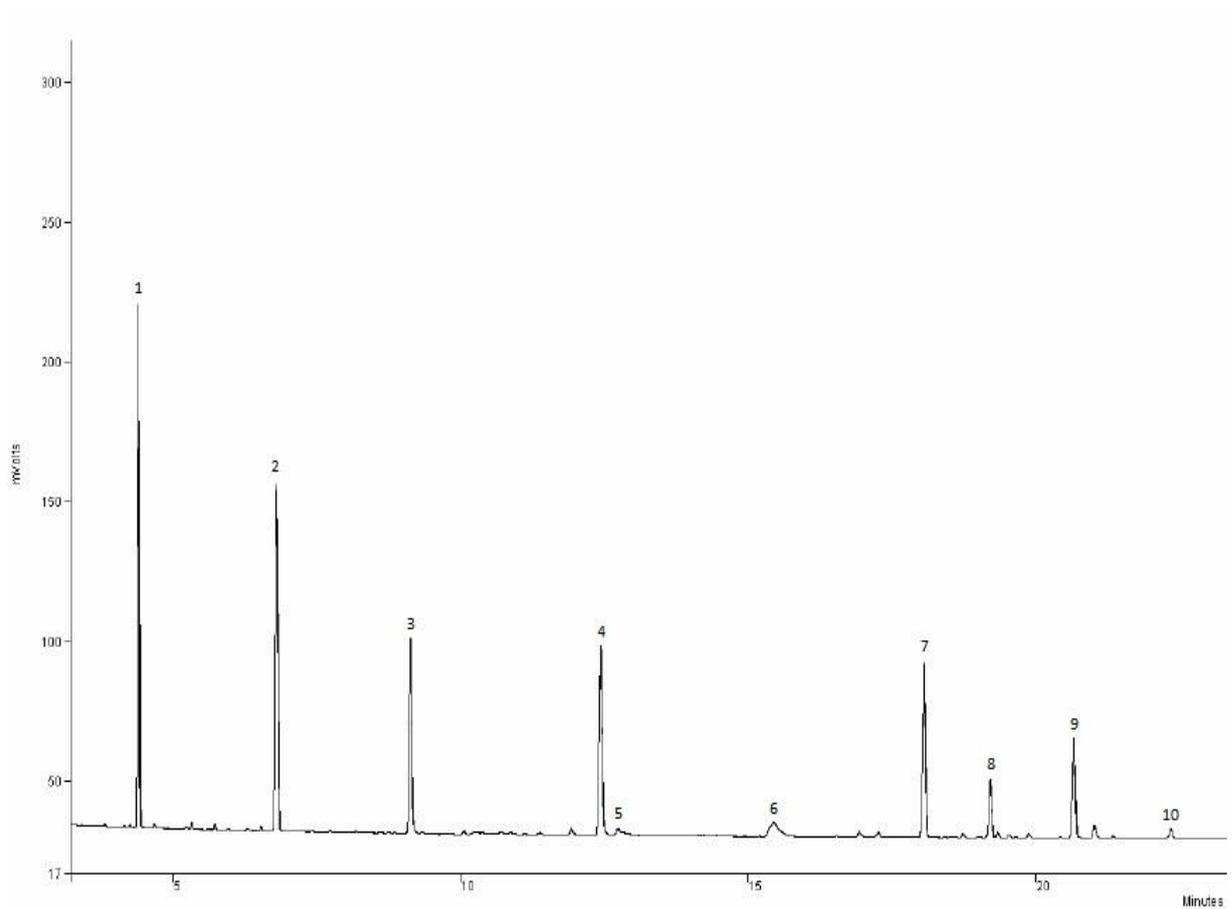


Tabela 4 – Principais constituintes químicos identificados e quantificados no óleo essencial de *Myrtus communis* L.

Pico cromatográfico	Constituintes químicos	Porcentagem %
1	α -pineno	18,3
2	1,8-cineol	24,2
3	linalool	11,5
4	α -terpineol	13,2
5	mirtenol	1,0
6	geraniol	2,8
7	acetato mirtenila	12,1
8	acetato terpinila	4,0
9	metil eugenol	7,0
10	β -cariofileno	0,7

A análise por CG do óleo essencial de *Myrtus communis* L. permitiu a identificação de 10 constituintes, perfazendo um total de 94,8% de constituintes identificados, sendo excluídos picos menores de 0,1%. Destes, 87,1% eram monoterpenos: α -pineno, α -terpineno, 1,8-cineol, acetato mirtenila, acetato terpinila, geraniol, linalol, mirtenol; 7% eram fenilpropanóis: metil eugenol; e 0,7% eram sesquiterpenos: β -cariofileno.

Alguns estudos mostraram que o óleo essencial de mirta é composto de três grupos de metabólitos secundários: monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides, corroborando com os achados desse estudo (DE LAURENTS et al., 2005; FARAH et al., 2006).

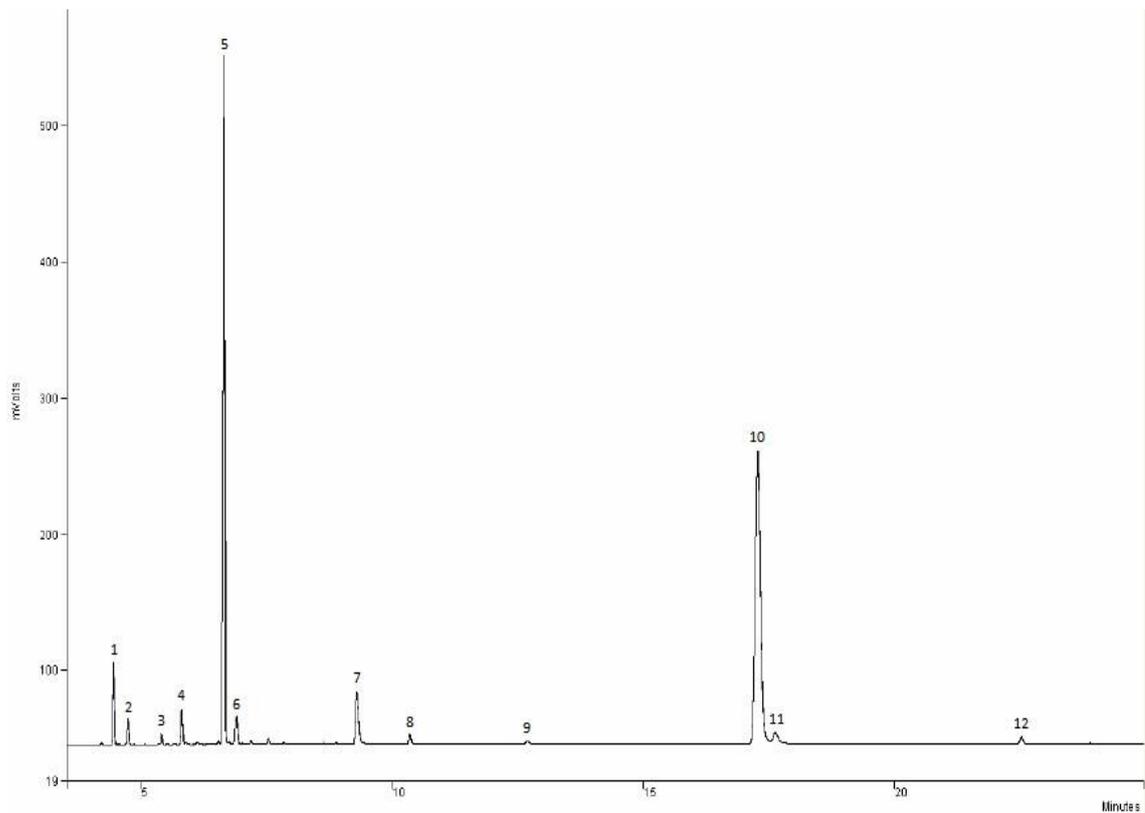
Sumbul e colaboradores (2011) em um artigo de revisão descreveram os possíveis constituintes químicos do óleo essencial de *Myrtus communis*, variando sua porcentagem de acordo com a parte da planta utilizada na extração do óleo. São eles: 1,8-cineol, α -pineno, α -terpineno, α -terpineol, acetato de α -terpinil, acetato de mirtenil, acetato de neril, β -cariofileno, β -cimeno, β -pineno, butirato de isobutil, *cis*-carveol, felandreno, geraniol, limoneno, linalol, metil-benzoato, metilbutirato, metil-eugenol, metil-geranato, mirceno, sabineno, terpineol, *trans*-carveol e mirtenol.

Em um estudo realizado por Nabavizadeh e colaboradores (2014) foram analisados os constituintes químicos e a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Myrtus communis* extraído das folhas de plantas coletadas no Irã. Quanto à composição química do óleo essencial de mirta, os autores obtiveram o 1,8-cineol como composto majoritário, em uma concentração de 28,62%, seguido do α -pineno (17,8%); assim como exposto nesse trabalho.

Outros autores também apresentaram o 1,8-cineol como constituinte de maior percentual no óleo essencial de mirta, como: Aidi Wannes, Mhamdi e Marzouk (2007) que analisaram a composição dos óleos essenciais de duas variedades de *Myrtus communis* do norte da Túnisa; Bouzouita e colaboradores (2003) os quais testaram a atividade antimicrobiana de óleo essencial de plantas aromáticas da Tunísia; Farah e colaboradores (2006) que analisaram o efeito da destilação fracionada na composição química de *Moroccan mirta*; e Yadegarinia e colaboradores (2006) os quais avaliaram atividades bioquímicas do óleo essencial de *Myrtus communis* e *Menta piperita* L. iranianas.

Outros estudos indicaram o α -pineno como componente majoritário na composição do óleo essencial de mirta (MESSAOUD et al., 2005; RASOOLI et al., 2002), e alguns o acetato de mirtenila (GARDELIA et al., 2008; JERKOVIC, RADONIC e BORNIC, 2002), demonstrando que outros fatores além da genética da espécie pode interferir na composição dos seus constituintes.

Foram identificados por meio da CG 12 constituintes químicos na composição do óleo essencial de *Thymus vulgaris* L. Destacou-se o composto timol com os maiores percentuais, como pode ser observado na Figura 20 e Tabela 5.

Figura 20 – Perfil cromatográfico do óleo essencial de *Thymus vulgaris* L.Tabela 5– Principais constituintes químicos identificados e quantificados no óleo essencial de *Thymus vulgaris* L.

Pico cromatográfico	Constituintes químicos	Porcentagem %
1	α -pineno	3,0
2	canfeno	1,0
3	β -pineno	0,5
4	mirreno	1,6
5	<i>p</i> -cimeno	37,2
6	1,8-cineol	2,2
7	linaloon	4,7
8	canfora	0,6
9	α -terpineol	0,3
10	timol	45,6
11	carvacrol	2,1
12	β -cariofileno	0,6

A análise por CG do óleo essencial de *Thymus communis* L. permitiu a identificação de 12 constituintes, perfazendo um total de 99,4% de constituintes identificados, sendo excluídos picos menores de 0,1%. Destes, 98,8% eram monoterpenos: α -pineno, α -terpinenol, β -pineno, *p*-cimeno, 1,8-cineol, canfeno, canfora, carvacrol, linalol, mirceno, timol; e 0,6% eram sesquiterpenos: β -cariofileno

Mancini e colaboradores (2015) analisaram a composição química, atividade antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial de cinco amostras diferentes de *Thymus vulgaris* de áreas distintas do Sul da Itália. Neste estudo, os óleos foram obtidos por hidrodestilação das partes aéreas e o composto predominante em todas as amostras analisadas foi o timol (46,2-67,5%), seguido pelo carvacrol (5,7-7,3%). O total de compostos encontrados variou em cada amostra, de 44 constituintes até 82, sendo identificados ao todo 134 constituintes diferentes.

Outros estudos também evidenciaram o timol como constituinte majoritário dos óleos essenciais de tomilho, como: García-Risco e colaboradores (2011) que avaliaram a composição química do óleo de *Thymus vulgaris* obtido por extração com fluido supercrítico em diferentes condições identificando 17 compostos diferentes; Dawidowicz e colaboradores (2008), os quais analisaram a composição química das folhas de *Thymus vulgaris* pela técnica de micro extração em fase sólida, encontrando 18 compostos e sendo o majoritário o timol (48,5%), seguido do *p*-cimeno (14,7%); e Ozcan e Chalchat (2004), na Turquia, que identificaram 30 compostos ao extrair o óleo essencial de *Thymus vulgaris* por hidrodestilação das partes aéreas. Todos esses achados corroboram com os resultados apresentados neste estudo.

Assim como no caso da mirta, outros estudos indicaram outros compostos como componente majoritário na composição do óleo essencial de tomilho, como o carvacrol (EL-NEKEETY et al., 2011), *p*-cimeno (BARANAUSKEINÉ et al., 2005) e o 1,8-cineol (GUILLÉN; MANZANOS, 1998; JORDÁN et al., 2006), reforçando a interferência de fatores externos, como ambiente de crescimento da planta e técnica de extração do óleo na composição dos seus constituintes.

Sabe-se que os constituintes químicos de uma planta são determinados geneticamente, apresentando características distintas entre órgãos e estágios de crescimento, porém fatores externos podem causar variações significativas.

Segundo Simões e colaboradores (2004), os óleos essenciais podem apresentar diferentes composições de acordo com as condições climáticas, estágio

de desenvolvimento da planta e localização da estrutura secretora. Variações ambientais onde a planta se desenvolve como composição do solo, umidade relativa do ar, temperatura, regime de chuvas, duração total de exposição ao sol e regime de ventos interferem de forma direta, principalmente nas espécies em que as estruturas histológicas de estocagem encontram-se na superfície.

A sazonalidade é outro importante fator a ser considerado, pois ao longo de um ano podem ocorrer flutuações na pluviosidade, na incidência de radiação solar, nas temperaturas. Hudaib e colaboradores (2002) avaliaram a composição do óleo essencial extraído de amostras de *Thymus vulgaris*, obtido por hidrodestilação, de partes aéreas de plantas jovens (2 anos) e antigas (5 anos) em diferentes períodos. Os resultados mostraram que em plantas jovens um maior teor de fenóis foi observado no período de colheita de junho/julho em contraste com os meses de novembro/dezembro; enquanto o maior teor de monoterpenos foi o contrário. Já nas análises com plantas antigas, não houve variação nos teores de acordo com a sazonalidade.

5.2 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

Por meio da triagem antifúngica foi possível observar a ausência de crescimento nos poços referentes aos óleos de *Myrtus communis* L. e *Thymus vulgaris* L. (1000 µg/mL em relação ao teor de 1,8-cineol e timol, respectivamente) para todas as linhagens de *Sporothrix brasiliensis* e *Sporothrix schenckii* analisadas. Podendo inferir que os óleos analisados possuem ação antifúngica frente à seis linhagens de fungos do complexo *Sporothrix schenckii*.

As concentrações inibitórias mínimas (CIM) e fungicidas mínimas (CFM) dos fármacos de referência, anfotericina B e itraconazol, frente às principais linhagens causadoras de esporotricose no Brasil, encontram-se na Tabela 6. Os resultados foram expressos em µg/mL de amostra.

Tabela 6. Suscetibilidade *in vitro* das linhagens fúngicas frente aos fármacos de referência itraconazol e anfotericina B.

Linhagem Fúngica	Itraconazol ($\mu\text{g/mL}$)		Anfotericina B ($\mu\text{g/mL}$)	
	CIM	CFM	CIM	CFM
<i>S. schenckii A</i>	> 16	-	1,0	1,0
<i>S. schenckii B</i>	> 16	-	2,0	2,0
<i>S. schenckii ATCC 1099-18</i>	> 16	-	2,0	2,0
<i>S. schenckii IPEC 15383</i>	> 16	-	1,0	1,0
<i>S. brasiliensis ATCC 5110</i>	> 16	-	2,0	2,0
<i>S. brasiliensis IPEC 17943</i>	> 16	-	2,0	2,0

CIM: concentração inibitória mínima; CFM: concentração fungicida mínima

Segundo o CLSI (2008), para fungos filamentosos os valores de CIM para a anfotericina B se agrupam entre 0,5 – 2,0 $\mu\text{g/mL}$, sendo que valores superiores a 2 $\mu\text{g/mL}$ têm sido associadas com fracasso dos tratamentos. Já para o itraconazol, os valores de CIM variam de 0,0313 – 16 $\mu\text{g/mL}$, sendo que valores superiores a 8 $\mu\text{g/mL}$ estão associados com resistência clínica. Assim, a avaliação da suscetibilidade fúngica pode ser realizada com base nos valores de CIM. Aqueles menores ou iguais a 1 $\mu\text{g/mL}$ para anfotericina B e azóis indicam sensibilidade ao agente antifúngico; valores maiores do que 2 $\mu\text{g/mL}$ tem sido associado ao fracasso dos tratamentos; enquanto valores maiores ou iguais a 4 $\mu\text{g/mL}$ indicam resistência das linhagens fúngicas (CLSI, 2008; SANTOS, 2012).

Desse modo, podemos observar a partir dos resultados expostos na Tabela 6 que houve sensibilidade à anfotericina B apenas para duas linhagens estudadas (*S. schenckii A* e *S. schenckii IPEC 15383*). As linhagens de *Sporothrix brasiliensis* apresentaram maiores valores de CIM para esse fármaco, uma vez que esse genótipo é considerado de alta virulência, sendo reportado como agente causador dos mais severos casos de esporotricose registrados no Brasil nos últimos anos (ISHIDA et al., 2014).

Santos (2012), ao avaliar a susceptibilidade à anfotericina B de três linhagens padrão de *Sporothrix brasiliensis* verificou sensibilidade ao fármaco em apenas uma linhagem (CIM = 1 µg/mL), enquanto as outras duas linhagens apresentaram valores de CIM de 4 µg/mL e 16 µg/mL, caracterizando possível resistência e ineficácia de tratamento.

Apesar da anfotericina B ainda ser eficiente no tratamento da esporotricose, novos estudos vem apresentando uma reduzida susceptibilidade *in vitro*, o que é alarmante. Borba-Santos e colaboradores (2015) avaliaram a susceptibilidade *in vitro* à anfotericina B, azóis e terbinafina de linhagens de *Sporothrix brasiliensis* isolados nos anos anteriores a 2004 contra isolados obtidos de 2011 a 2012. Neste estudo, os valores de CIM foram geralmente superiores para os isolados mais recentes quando comparados com isolados antigos para a fase micelial, para todos os fármacos.

Além disso, a anfotericina B apresenta muitos efeitos adversos, como náuseas, vômitos, cefaleia, febre, e alta toxicidade renal, hematológica e hepática; limitando seu uso. Para o tratamento de animais doentes, essa toxicidade é aumentada até em baixas doses, levando muitas vezes ao óbito (FALCI e PASQUALOTTO, 2015; PEREIRA et al., 2009).

Para o itraconazol, podemos observar na Tabela 6 que nenhuma das linhagens analisadas foi sensível ao fármaco, caracterizando resistência ao mesmo. Apesar de ser o fármaco de escolha para o tratamento da esporotricose, alguns estudos vêm relatando casos de resistência a este fármaco, principalmente em cepas originárias de animais, tendo que ser associado a outro fármaco para a sua eficácia (GUTERRES et al., 2014; KANAFANI e PERFECT, 2008).

Em um estudo realizado por Waller e colaboradores (2016a) os efeitos de quatro óleos essenciais e o itraconazol foram comparados frente a linhagens de *Sporothrix brasiliensis* e *Sporothrix schenckii* de diferentes origens. Os valores de CIM encontrados para o itraconazol variaram de 0,5 µg/mL a > 16 µg/mL, sendo as linhagens provenientes de gatos as mais virulentas.

Em um estudo realizado por Giordani e colaboradores (2014), foi avaliada a susceptibilidade de sete isolados de *Sporothrix brasiliensis*, provenientes de casos clínicos, felinos e canino, frente ao itraconazol e extratos hidroalcoólicos de Aroeira-mansa e Lanceta. Para o itraconazol, de acordo com os valores de CIM apenas uma

linhagem avaliada apresentou sensibilidade (CIM = 0,5 µg/mL), todas as linhagens restantes apresentaram resistência ao fármaco (CIM = 8 µg/mL à > 64 µg/mL).

Rodrigues e colaboradores (2014b) avaliaram a diversidade genética e susceptibilidade aos antifúngicos frente a diversas linhagens de *S. brasiliensis*, *S. schenckii*, *S. globosa* e *S. mexicana*, 68 isolados no total, adquiridos de fontes humanas, animais e ambientais. Para os valores de CIM do itraconazol foram observados valores entre 0,25 – 4 µg/mL para os isolados de *S. brasiliensis*, 0,25 - > 16 µg/mL para *S. schenckii*, 0,5 - > 16 µg/mL para *S. globosa*, e > 64 µg/mL para os isolados de *S. mexicana*.

Já Silveira e colaboradores (2009), analisaram a susceptibilidade a alguns fármacos de referência de isolados de *Sporothrix schenckii* de diferentes países, 36 do Peru, 15 da Venezuela, 6 do Brasil, 3 do Uruguai e 2 da Espanha. Para o itraconazol os valores de CIM encontrados variaram entre 0,25 – 2 µg/mL para todos os isolados exceto os dos Uruguai, onde valores de CIM de 0,03 – 16 µg/mL demonstraram a possível resistência.

Apesar dos antifúngicos utilizados no tratamento da esporotricose ainda serem efetivos, muitos estudos *in vitro* vem demonstrando o aparecimento de cepas de *Sporothrix* spp. resistentes (MARIMON et al., 2008a; MEINERZ et al., 2007; RODRIGUES et al., 2013; STOPIGLIA et al., 2014). Esses achados sugeriram um início de resistência para os fármacos de escolha, reforçando a necessidade de buscar novos medicamentos antifúngicos mais efetivos e menos tóxicos para o tratamento desta doença.

Recentemente, há um crescente interesse no uso de produtos naturais devido a sua ampla disponibilidade, efeitos adversos e toxicidade reduzidos, e melhor biodegradabilidade comparado com os fármacos disponíveis (KALEMBA e KUNICKA, 2003).

As concentrações inibitórias mínimas (CIM) e fungicidas mínimas (CFM) do óleo essencial de *Myrtus communis* L. e óleo essencial de *Thymus vulgaris* L. frente às principais linhagens causadoras de esporotricose no Brasil, encontram-se na Tabela 7.

Tabela 7 – Susceptibilidade *in vitro* das linhagens fúngicas frente aos óleos essenciais de *Myrtus communis* L. e *Thymus vulgaris* L.

Linhagem fúngica	Óleo essencial de <i>Myrtus communis</i> (µg/mL)		Óleo essencial de <i>Thymus vulgaris</i> (µg/mL)	
	CIM	CFM	CIM	CFM
<i>S. schenckii</i> A	62,5	125	125	125
<i>S. schenckii</i> B	31,25	125	250	500
<i>S. schenckii</i> ATCC 1099-18	62,5	125	125	250
<i>S. schenckii</i> IPEC 15383	62,5	62,5	125	250
<i>S. brasiliensis</i> ATCC 5110	62,5	125	125	250
<i>S. brasiliensis</i> IPEC 17943	31,25	62,5	125	250

CIM: concentração inibitória mínima; CFM: concentração fungicida mínima

O atual cenário dos antifúngicos no mundo representa um problema importante a ser sanado. Não só a toxicidade, mas o constante aumento na resistência a esses fármacos torna imprescindível a busca por novas terapias. Nesse contexto, inserem-se os produtos de origem natural. Porém, não há um padrão para se classificar as atividades dos produtos naturais, devido a sua complexidade e diversidade química, o que torna difícil estabelecer relações de efetividade em relação aos fármacos existentes.

Santos e colaboradores (2008) analisaram a atividade antimicrobiana do óleo de Copaíba brasileiro de diferentes espécies de *Copaifera genus* frente a bactérias Gram positivas e Gram negativas, além de leveduras e fungos filamentosos. Para definir a atividade antifúngica aos fungos filamentosos, utilizou-se o método de microdiluição em caldo baseado no protocolo M38-A do CLSI. Neste estudo, os autores propõem um parâmetro de classificação para a atividade antimicrobiana de óleos essenciais com base nos valores de CIM. Assim, uma boa atividade é observada em valores de CIM até 100 µg/mL, com CIMs de 100 – 500 µg/mL a atividade é considerada moderada, de 500 – 1000 µg/mL fraca, e acima de 1000 µg/mL há inatividade da amostra.

Segundo esse parâmetro, observa-se na Tabela 7 que a atividade antifúngica do óleo essencial de *Myrtus communis* L. foi considerada boa para todas as linhagens apresentadas (CIM variando entre 31,25 µg/mL e 62,5 µg/mL),

enquanto o óleo essencial de *Thymus vulgaris* L. apresentou uma atividade moderada (CIM variando de 125 µg/mL a 250 µg/mL).

Quanto à capacidade fungicida das amostras, os valores de CFM no geral foram superiores aos valores de CIM, demonstrando uma ação fungistática nestes valores. As duas exceções foram para a linhagem *S. brasiliensis* ATCC 5110 para o óleo essencial de *Myrtus communis* L. e *S. schenckii* A para o óleo essencial de *Thymus vulgaris* L., as quais apresentam ação fungicida já nos valores de CIM.

As propriedades farmacológicas do óleo essencial de *Myrtus communis* L. vem sendo amplamente estudadas na literatura, porém sua composição varia muito, gerando diferentes resultados, sendo o 1,8-cineol um dos compostos principais.

Berka-Zougali e colaboradores (2012) inferiram que a composição do óleo essencial varia de acordo não só com as estações, localização geográfica, e parte da planta utilizada; mas também devido ao método de extração. Neste mesmo estudo, dois óleos essenciais de *Myrtus communis* L. obtidos por diferentes processos de extração foram avaliados frente 12 microrganismos. Os dois óleos apresentaram boa atividade antimicrobiana sobre: bactérias Gram positivas (*B. subtilis*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*), bactérias Gram negativas (*K. pneumoniae*, *E. coli*, *S. enterica*, *E. cloacae*, *P. aeruginosa*), levedura (*C. albicans*), e fungos (*A. flavus*, *A. ochraceus* e *F. culmorum*). Porém, o óleo obtido pelo método de extração por micro-ondas, livre de solventes, apresentou CIM inferior para todos os microrganismos testados (CIM = 10 - 30 µL/mL) comparados ao óleo extraído por hidrodestilação (CIM = 20 - 50 µL/mL), apenas os resultados para levedura foram equivalentes (CIM = 50 µL/mL).

Outros estudos também avaliaram a atividade antimicrobiana deste óleo, como Mansouri e colaboradores (2001) que demonstraram atividade frente a bactérias Gram positivas (*S. aureus*, *M. luteus*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. agalactiae* e *L. monocytogenes*) e Gram negativas (*E. coli*, *P. vulgaris*, *P. aeruginosa* e *C. jejuni*); Akin e colaboradores (2010) os quais demonstraram atividade frente às bactérias *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. durans*, *L. monocytogenes*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. typhi*; e Salvagnini e colaboradores (2008) que mostraram atividade frente à *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *B. subtilis* e *S. marcescens*.

Curini e colaboradores (2003) avaliaram o potencial antifúngico do óleo de *Myrtus communis* L. frente ao fungo *Rhizoctonia solani* Kuhn observaram uma inibição de 60 % do seu crescimento na dose de 1600 ppm. Ainda, uma análise

microscópica dos achados foi realizada revelando alterações morfológicas das hifas do fungo. Mohammadi e colaboradores (2008) demonstraram atividade antifúngica deste óleo essencial frente a vários isolados clínicos de *Aspergillus* spp. por meio da técnica de micro diluição em caldo.

Outros estudos demonstraram também atividade antifúngica deste óleo. Yadegarinia e colaboradores (2006) avaliaram a atividade do óleo essencial frente à *E. coli*, *S. aureus* e *C. albicans* (CIM = 2 - 4 µL/mL). Já Cannas e colaboradores (2013) mostraram a atividade antifúngica deste óleo frente a cinco linhagens de *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, e *C. parapsilosis*) com CIMs variando de 0,5 - 4 µg/mL.

A comparação entre esses dados se torna difícil pela variação da composição química de cada óleo essencial; porém observa-se que maiores proporções de polifenóis e monoterpenos oxigenados, e as posições de seus radicais, podem ser responsáveis pelas atividades antimicrobianas (AKIN et al., 2010).

O composto 1,8-cineol, também conhecido como eucaliptol, pode ser encontrado como componente majoritário dos óleos essenciais de vários gêneros de espécies vegetais como: *Eucalyptus* (~75%), *Rosemary* (~40%), *Psidium* (40-60%), entre outros (SANTOS e RAO, 2000). Em alguns estudos, o eucaliptol foi descrito como o responsável pelas atividades farmacológicas avaliadas. Juergens e colaboradores (2004) demonstraram a capacidade anti-inflamatória do composto, sendo forte inibidor de TNF- α e IL-1 β . Já Estanislau e colaboradores (2001) concluíram que o composto foi responsável pela atividade antisséptica dos óleos essenciais de *Eucalyptus myrcocorys* e *Eucalyptus globulus*. Relato semelhante foi feito por Pereira e colaboradores (2004) para justificar a atividade antibacteriana da *Salvia officinalis*.

O eucaliptol sozinho também foi avaliado em vários estudos. Zanetti e colaboradores (2010) mostraram significativa atividade antimicrobiana contra cepas de *M. tuberculosis* frente ao eucaliptol e outros compostos isolados (CIM = 2 - > 16 v/v). Já Randrianarivelo e colaboradores (2009) demonstraram potente ação antibacteriana (CIM = 0,18 – 5,88 mg/ml). Porém, seu mecanismo de ação continua desconhecido.

Em um estudo realizado por Waller e colaboradores (2016a), os efeitos de dois óleos essenciais de *Rosmarinus officinalis* Linn. foram comparados frente a

linhagens de *Sporothrix brasiliensis* e *Sporothrix schenckii* de diferentes origens. Os óleos essenciais obtidos comercialmente e extraídos por destilação de arraste de vapor foram analisados por cromatografia gasosa, obtendo-se cromatogramas extremamente parecidos, onde o componente majoritário foi o 1,8-cineol. Essa semelhança se refletiu nos valores de CIM encontrados ($CIM_{50} \leq 2,25$ mg/mL a 18 mg/mL), os quais apresentaram potenciais similares, demonstrando o possível papel antifúngico do composto 1,8-cineol.

Já em um estudo realizado por Vilela e colaboradores (2009), analisando a atividade do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* Labill. e seu componente majoritário 1,8-cineol, foi verificado maior potencial antifúngico frente a duas linhagens de *Aspergillus* sp. para o óleo essencial. Os menores valores de CIM encontrados para o eucaliptol indicam que este composto não é o único com capacidade antifúngica, e indicou possível sinergismo no óleo entre mais de um composto agindo para a inibição fúngica.

As propriedades farmacológicas do óleo essencial de *Thymus vulgaris* L. vem sendo amplamente estudado na literatura, sendo o timol e o carvacrol dois compostos principais encontrados nessa espécie vegetal.

Mancini e colaboradores (2015) estudaram a composição química, e atividades antimicrobiana e antioxidante de cinco óleos essenciais de *Thymus vulgaris* L. Neste estudo, 134 compostos foram encontrados, principalmente compostos fenólicos, e todos os óleos analisados apresentaram o timol como componente majoritário. Os óleos apresentaram atividade antimicrobiana frente à *Bacillus cereus* e *Bacillus subtilis* (CIM = 12,5 a 100 µg/mL), *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* (CIM = 6,25 a >100 µg/mL), *Streptococcus faecalis* (CIM = 25 a 100 µg/mL), *Escherichia coli* (CIM = 25 a 100 µg/mL), *Klebsiela pneumoniae* (CIM = 50 a > 100 µg/mL), *Proteus vulgaris* (CIM = 50 a 100 µg/mL), *Pseudomonas aeruginosa* (CIM = 100 a >100 µg/mL), e *Salmonella typhi* Ty2 (CIM = 50 a 100 µg/mL).

Outros estudos também avaliaram a atividade antimicrobiana deste óleo, como Dorman e Deans (2000) que o testaram frente a 25 bactérias, mostrando atividade inibitória maior para bactérias Gram negativas; Viuda-Martos e colaboradores (2008), os quais relataram atividade antimicrobiana do óleo frente à *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus carnosus*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus*, *Enterobacter gergoviae* e *Enterobacter amnigenus*; Pozzatti e

colaboradores (2010) mostraram a capacidade de o óleo inibir o crescimento de *Candida albicans* e *Candida dubliniensis*; e Millezi e colaboradores (2012) os quais o estudaram frente à *Salmonella enteridis* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Estudos têm mostrado que compostos fenólicos e terpenóides possuem capacidade de inibir o crescimento de diversos microrganismos. Porém, a associação de dois ou mais compostos em quantidades adequadas podem apresentar melhor atividade frente a microrganismos mais resistentes. Além disso, o sinergismo entre os constituintes presentes no óleo essencial deve ser considerado (BURT, 2004; KALEMBA e KUNICKA, 2003).

A atividade biológica do óleo essencial de tomilho está relacionada com o timol e o carvacrol, seus principais constituintes. O timol tem demonstrado efeitos antibacterianos, antifúngicos e anti-helmínticos, enquanto o carvacrol tem sido estudado por seus efeitos bactericidas. As atividades antifúngicas, pesticidas e antibacterianas do óleo essencial de tomilho foram demonstradas por diversos estudos (BAGAMBOULA et al., 2004; CENTENO et al., 2010; DAFERA et al., 2000; NOVACOSK e TORRES, 2006; SOKOVIÆ et al., 2009).

Em um estudo realizado por Horne e colaboradores (2001) 73 óleos essenciais foram testados quanto a sua capacidade antibacteriana frente a cepa de *Streptococcus pneumoniae* R36A. Os óleos com maior ação bactericida foram os óleos de orégano, tomilho e jacarandá, capazes de causar danos brutos à membrana, levando a completa lise das células bacterianas. Estes são ricos em timol, carvacrol, citronellol e geraniol, mostrando uma possível correlação entre esta atividade e estes compostos.

O composto timol possui atividade antimicrobiana já conhecida, podendo agir isolado ou em sinergismo com outros compostos. Esta capacidade se dá pela sua estrutura fenólica, capaz de interagir com as membranas dos microrganismos (AHMAD et al., 2010; HELANDER et al., 1998). A capacidade antifúngica do timol se dá devido a sua habilidade de alterar a morfologia das hifas, causando sua agregação, que resulta na diminuição do diâmetro das hifas e lise de suas paredes (NUMPAQUE et al., 2011). Em adição o composto é lipofílico, permitindo sua interação com a membrana celular das células fúngicas, alterando sua permeabilidade e permitindo a perda de macromoléculas (SEGVIC et al., 2007).

Em um estudo realizado por Romero e colaboradores (2009), o óleo essencial de *Thymus vulgaris* L. foi avaliado quanto a sua capacidade antifúngica

frente a *Corynespora cassiicola*, *Erwinia psidii*, *Sclerotinia minor*, *Colletotrichum musae*, *Fusarium moniliforme*, *Myrothecium verrucaria*. Os valores encontrados mostraram um expressivo efeito frente aos microrganismos testados (CIM = 5-200 µL/mL). Os autores atribuíram esse potencial à presença de timol e carvacrol e explicaram sua ação pela degeneração das hifas, causando a liberação do conteúdo celular. Ainda justificaram o potencial antimicrobiano pelos fato dos compostos se ligarem aos grupos amina e hidroxilamina de proteínas presentes nas membranas das bactérias alterando sua permeabilidade.

Waller e colaboradores (2016a) compararam os potenciais antifúngicos frente a linhagens de *Sporothrix brasiliensis* e *Sporothrix schenckii* de diferentes origens e a composição de dois óleos de *Origanum vulgare*, um obtido comercialmente e outro por destilação por arraste de vapor. Os cromatogramas gerados pela análise cromatográfica apresentaram compostos semelhantes, mas em concentrações diferentes, sendo o componente majoritário do óleo comercial o carvacrol enquanto o do extraído o timol. Ao observar os valores de CIM do estudo é possível notar que ambas as amostras possuíam atividade antifúngica, porém o óleo extraído, rico em timol, mostrou valores de CIM significativamente menores (CIM₅₀ ≤ 2,25 mg/mL a 9 mg/mL); demonstrando maior potencial antifúngico do timol perante o carvacrol (CIM₅₀ ≤ 2,25 mg/mL a 36 mg/mL). Neste caso é possível inferir também a importância das posições dos radicais nos compostos uma vez que essas duas moléculas são isômeros.

A maioria dos óleos essenciais possui algum grau de atividade antimicrobiana. Segundo Gilles e colaboradores (2010) essa atividade é atribuída à ação das substâncias presentes em sua composição como os compostos fenólicos, monoterpenos e terpenóides, uma vez que estes compostos isolados apresentam diferentes propriedades farmacológicas (COMBRINCK et al., 2011; DAN et al., 2010; HUSSAIN et al., 2010; PEREIRA et al., 2011). Acredita-se que o mecanismo de ação dos monoterpenos esteja ligado a efeitos tóxicos na estrutura e função da membrana celular (OLIVEIRA et al., 2011; SEIXAS et al., 2011).

Além dos polifenóis, a lipofilicidade também pode agir como agente permeador causando dano nas membranas celulares (ALEKSIC e KNEZEVIC, 2014). Costa e colaboradores (2011) inferiu que a hidrofobicidade do óleo permite sua interação com os lipídeos da membrana celular alterando sua permeabilidade ao observar alterações morfológicas nas hifas de *R. solani* tratadas com o óleo

essencial de cravo-da-india (COSTA, A., et al., 2011). Já Rasooli e colaboradores (2006) observaram danos á membrana celular do fungo *A. niger* quando analisada por meio de microscopia eletrônica de varredura após exposição a óleos essenciais de *Thymus eriocalyx* e *T. x-parlock*.

Waller e colaboradores (2016b) realizaram um levantamento bibliográfico com base em artigos científicos, de 1986 a 2015, sobre a atividade antifúngica *in vitro* e *in vivo* de óleo essências e extratos de plantas frente fungos do complexo *Sporothrix schenckii*. Foram encontradas 141 espécies de plantas com essa atividade reafirmando que produtos naturais podem ser fontes de novas moléculas promissoras para o controle e tratamento da esporotricose. Neste estudo, os autores também chamam atenção para o aumento do número de casos de esporotricose e o alarmante aumento de linhagens resistentes ao tratamento convencional caracterizando a urgência na busca por terapias alternativas.

5.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Foram obtidas eletromicrografias de varredura das linhagens fúngicas *S. schenckii* ATCC 1099-18 e *S. brasiliensis* IPEC 17943 não expostas a qualquer tipo de tratamento (grupo não tratado) e expostas aos óleos essenciais (mirta e tomilho) e ao fármaco de referência (anfotericina B). Essas estão representadas nas Figuras 21 e 22.

Nos grupos de fungos não tratados, as hifas apresentadas tem caráter regular, com superfícies lisas e alongadas. Seus conídeos também apresentam superfície alongada e regular. Achados estes bem diferentes, comparando-se aos fungos que sofreram tratamento com o fármaco de referência e as substâncias de interesse. Muitas deformidades em sua estrutura foram observadas como fissuras, quebras de hifas, conídeos contorcidos, hifas finas e extravasamento celular.

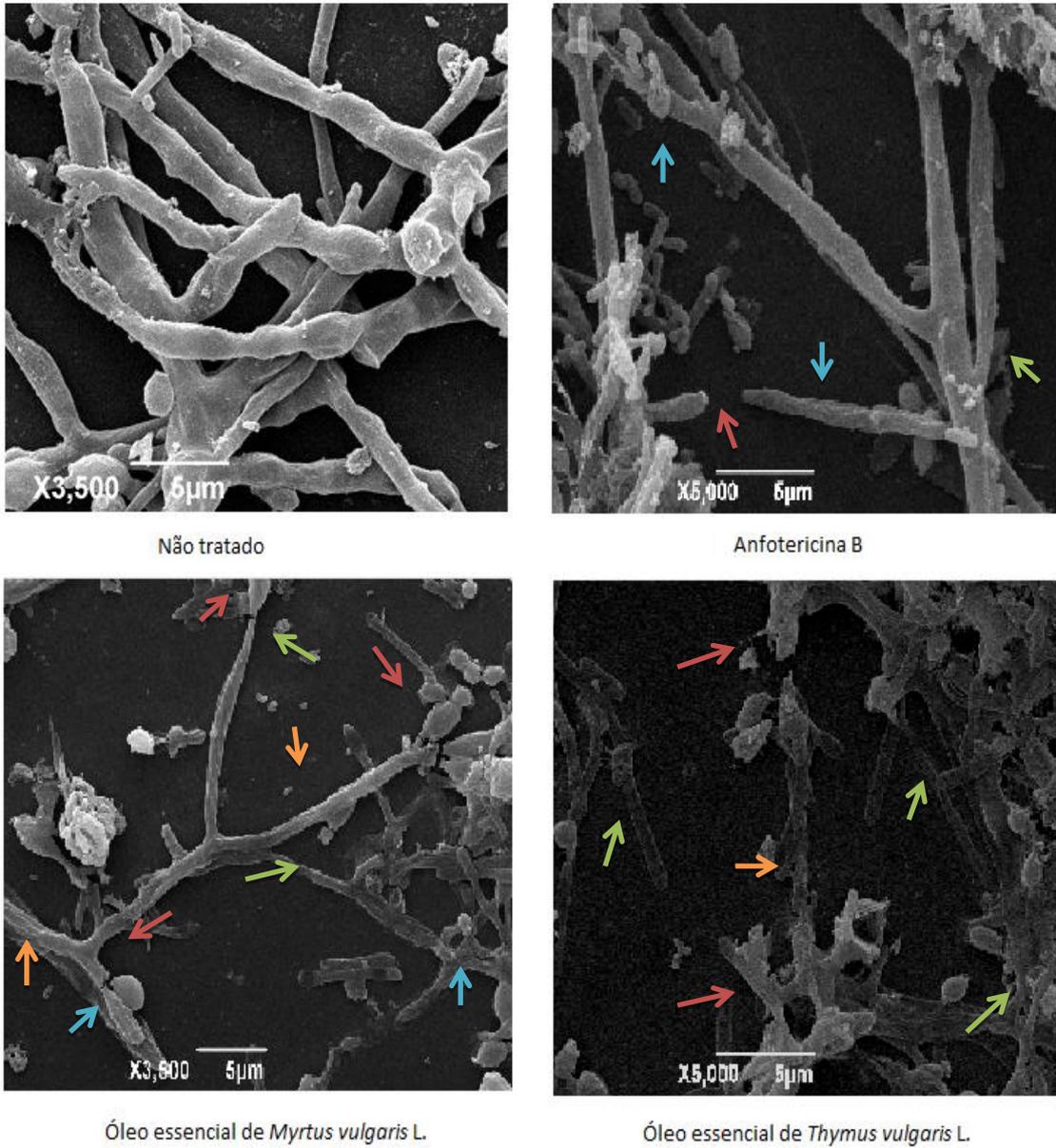
Quando o *S. brasiliensis* foi tratado com o óleo essencial de mirta, foram observadas hifas quebradas, afinadas, e partes contorcidas. É possível ver um conídeo contorcido na imagem. Já no tratamento da linhagem *S. schenckii* com o mesmo óleo essencial, as alterações foram bem parecidas, podendo ser observadas hifas quebradas e finas, com presença de rugosidades, partes contorcidas e aglomerados de hifas.

No tratamento com o óleo essencial de tomilho frente ao fungo *S. brasiliensis* constatou-se alterações morfológicas com presença de hifas quebradas, e hifas contorcidas. Já em relação ao tratamento do *S. schenckii* com o mesmo óleo as alterações morfológicas foram mais pronunciadas, podendo ser observadas hifas finas ao longo de toda a imagem, com contorções e quebras.

Ao analisar as linhagens de *S. brasiliensis* e *S. schenckii* que foram expostas à anfotericina B, pode-se observar hifas quebradas e finas e presença de rugosidades nas hifas e principalmente nos conídeos.

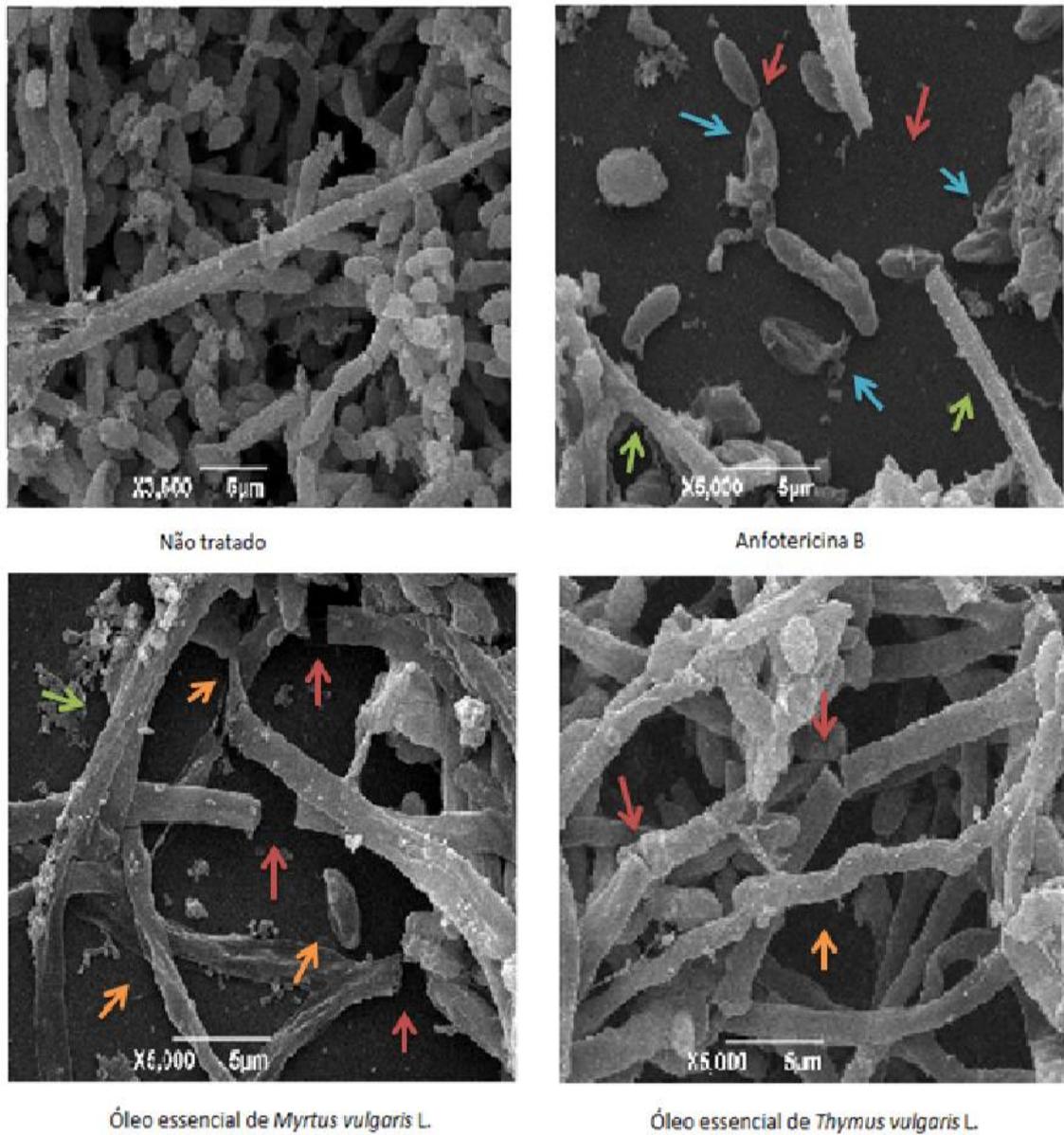
Todas as imagens revelaram que, tanto nos fungos expostos aos tratamentos experimentais, quanto naqueles expostos ao fármaco de referência, houve semelhantes alterações morfológicas nas estruturas fúngicas e uma redução no número de estruturas de reprodução aderidas (conídeos).

Figura 21 – Eletromicrografias de *S. schenckii* ATCC 1099-18 não tratado, expostos aos tratamentos experimentais e ao fármaco de referência.



Setas: Vermelha: hifa quebrada, Verde: hifa fina, Laranja: hifa contorcida, Azul: rugosidades.

Figura 22 – Eletromicrografias de *S. brasiliensis* IPEC 17943 não tratado, expostos aos tratamentos experimentais e ao fármaco de referência.



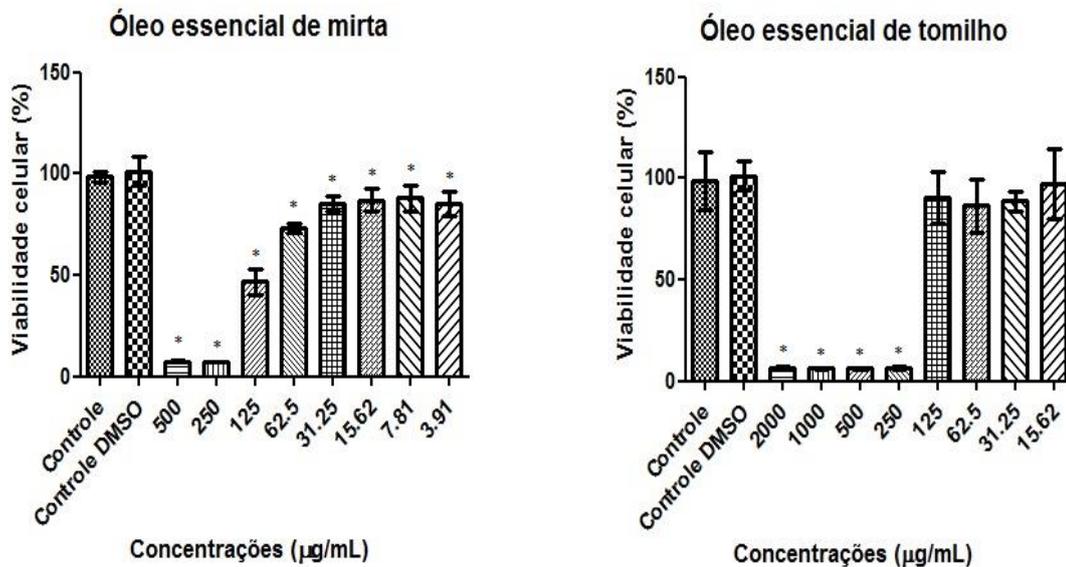
Setas: Vermelha: hifa quebrada, Verde: hifa fina, Laranja: hifa contorcida, Azul: rugosidades.

5.4 CITOTOXICIDADE

Segundo Martins e colaboradores (2013), a avaliação da citotoxicidade é importante porque permite compreender o mecanismo biológico que produz o efeito citotóxico e o mecanismo de ação de diferentes substâncias durante a sua interação com os tecidos. Porém, a utilização de culturas de células em monocamadas não é fisiológica e não reproduz a real arquitetura do tecido vivo em que as células subjacentes poderiam reparar as agressões sofridas. Desta forma, a presença de um efeito citotóxico *in vitro* não garante que o material é tóxico quando *aplicado in vivo*. Limitando assim o teste. Por outro lado, a ausência de um efeito citotóxico garante uma boa resposta clínica. Os resultados da viabilidade celular frente à queratinócitos humanos (HaCaT) está demonstrado na Figura 23.

O solvente utilizado para todas as amostras não interferiu na viabilidade celular uma vez que não apresentou diferença significativa em relação ao controle.

Figura 23 – Viabilidade celular de queratinócitos (HaCaT) expostos aos diferentes tratamentos.



* resultado estatisticamente significativo em relação ao controle pelo teste ANOVA seguida do pós teste de Bonferroni ($p < 0,05$).

Avaliando a viabilidade celular do óleo essencial de mirta perante os queratinócitos, apenas as concentrações acima de 125 µg/mL foram consideradas citotóxicas, nas demais concentrações foi observada uma redução da viabilidade celular sem ser tóxico para as células, inclusive nos valores encontrados para CIM. Todas as concentrações foram estatisticamente significantes ($p < 0.05$).

Os efeitos citotóxicos do óleo essencial de *Myrtus communis* L. foi avaliado por Mahmoudvand e colaboradores (2015) usando uma linhagem murina de macrófagos (J774A.1) pelo método de MTT *in vitro*. Os resultados mostraram não haver toxicidade significativa para essas células, mas concluíram que o óleo essencial apresentava maior citotoxicidade quando comparado ao extrato etanólico da mesma espécie vegetal.

Bouzabata e colaboradores (2013) avaliaram a citotoxicidade do óleo essencial de *Myrtus nivelli* Batt. & Trab. frente a queratinócitos (HaCaT). Essa espécie também possui o 1,8-cineol como componente majoritário do óleo essencial e apresentou citotoxicidade em concentrações maiores que 2.5 µL/mL.

Hrubik e colaboradores (2012) avaliaram a citotoxicidade de frações do extrato de *Myrtus communis* L. frente a duas linhagens de células humanas de câncer de mama (MCF 7 e MDA-MB-231) pelo método do MTT. Efeitos citotóxicos foram observados para todas as frações nessas células, sendo os resultados dependentes da dose.

Para o óleo essencial de tomilho, a viabilidade celular foi reduzida nas concentrações acima de 125 µg/mL, sendo estas extremamente tóxicas. Abaixo desses valores não foi observada diferença estatisticamente significativa em relação ao controle. Os valores de CIM para esse óleo são no geral 125 µg/mL, porém para uma linhagem clínica de *Sporothrix schenckii* foi observada a CIM = 250 µg/mL, valor este citotóxico.

Miladi e colaboradores (2013) avaliaram a citotoxicidade pelo método do MTT em células epiteliais humanas de adenocarcinoma de pulmão (A549) frente os óleos essenciais de *Rosmarinus officinalis* L. e *Thymus vulgaris* L. Após 72 horas o estudo revelou IC₅₀ de 10,50 ± 0,01 µg/mL para o óleo de tomilho.

Zu e colaboradores (2010) avaliaram a citotoxicidade de dez óleos essenciais (menta, gengibre, limão, toranja, jasmin, lavanda, camomila, tomilho, rosa e canela) identificando o óleo essencial de tomilho como o mais efetivo contra três

linhagens celulares: PC3 – células de carcinoma de próstata humano, A549 – células epiteliais de carcinoma de pulmão, e MCF7 – células de câncer de mama.

Esses achados demonstram a necessidade de realizar mais estudos dose-dependentes e dos componentes majoritários dos óleos em questão em outras linhagens celulares e ensaios de ecotoxicidade.

6 CONCLUSÃO

O perfil cromatográfico do óleo essencial de *Myrtus communis* L. utilizado neste estudo permitiu a identificação de 10 constituintes, perfazendo um total de 94,8% de constituintes identificados, apresentando como componente majoritário o 1,8-cineol (24,2%). Destes, 87,1% eram monoterpenos: α -pineno, α -terpineno, 1,8-cineol, acetato mirtenila, acetato terpinila, geraniol, linalol, mirtenol; 7% eram fenilpropanóis: metil eugenol; e 0,7% eram sesquiterpenos: β -cariofileno.

A análise por CG do óleo essencial de *Thymus communis* L. utilizado neste estudo permitiu a identificação de 12 constituintes, perfazendo um total de 99,4% de constituintes identificados, apresentando como componente majoritário o timol (45,6%). Destes, 98,8% eram monoterpenos: α -pineno, α -terpinenol, β -pineno, p-cimeno, 1,8-cineol, canfeno, cânfora, carvacrol, linalol, mirceno, timol; e 0,6% eram sesquiterpenos: β -cariofileno.

O óleo essencial de *Myrtus communis* L. apresentou atividade antifúngica frente a todas as linhagens testadas em concentrações que variaram de 31,25 $\mu\text{g/mL}$ a 62,5 $\mu\text{g/mL}$. Foi observada atividade fungicida frente a todas as linhagens em concentrações acima de 62,5 $\mu\text{g/mL}$. O óleo essencial de *Thymus vulgaris* L. foi capaz de inibir o crescimento de todas as linhagens testadas em concentrações que variaram de 125 $\mu\text{g/mL}$ a 250 $\mu\text{g/mL}$. Foi observada atividade fungicida frente a todas as linhagens em concentrações acima de 250 $\mu\text{g/mL}$. Podemos concluir que o óleo essencial de *Thymus vulgaris* L. apresentou valores maiores que o óleo essencial de *Myrtus communis* L., sendo este mais efetivo em inibir o crescimento das linhagens de fungos causadoras de esporotricose utilizadas neste estudo.

Foi observado que somente duas das linhagens estudadas (*S. schenckii* A e *S. schenckii* IPEC 15383) apresentaram susceptibilidade à anfotericina B. Em relação ao itraconazol, todas as linhagens estudadas foram consideradas resistentes, com valores de CIM > 16 $\mu\text{g/mL}$. Estes resultados sugerem indícios de resistência fúngica das linhagens estudadas nas condições experimentais em relação aos fármacos de referência empregados no tratamento da esporotricose e ainda, reforçam a necessidade de busca de novos medicamentos antifúngicos para o tratamento desta micose subcutânea.

As eletromicrografias das linhagens fúngicas *S. schenckii* ATCC 1099-18 e *S. brasiliensis* IPEC 17943 revelaram que, tanto nos fungos expostos aos

tratamentos experimentais, quanto naqueles exposto ao fármaco de referência, pode-se observar deformidades na estrutura fúngica (fissuras e quebras de hifas, hifas e conídeos contorcidos, hifas finas e extravasamento celular), quando comparadas ao grupo não tratado.

Em relação aos ensaios de citotoxicidade realizados com queratinócitos humanos (HaCaT) pelo método de redução do MTT, o óleo de mirta não apresentou citotoxicidade nas concentrações correspondentes a seus valores de CIM. Apenas o óleo de tomilho foi citotóxico na sua CIM frente a uma linhagem clínica de *Sporothrix schenckii*.

REFERÊNCIAS

- ABAD, M. J.; ANSUATEGUI, M.; BERMEJO, P. Active antifungal substances from natural source. **ARKIVOC**, v. 2007, n. 7, p. 116-145, 2007.
- ADAME, A.; JACCOUD, C. V.; COBRA, E. A. Biodiversidade, biopirataria e aspectos da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. 2005. Disponível em: http://www.publicadireito.com.br/conpedi/manaus/arquivos/anais/manaus/propried_intelectua_l_alcione_adame_e_outros.pdf. Acesso em 08/06/2016.
- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil componets by gas chromatography / mass spectromety**. 4^a Ed. Illinois: Allured Bussiness Media, 2009.
- AHMAD, A.; KHAN, A.; YOUSUF, S.; KHAN, L. A.; MANZOOR, N. Proton translocating ATPase mediated fungicidal activity of eugenol and thymol. **Fitoterapia**, v. 81, n. 8, p. 1157-1162, 2010.
- AIDI WANNES, W.; MHAMDI, B.; MARZOUK, B. Essential oil composition of two *Myrtus communis* L. varieties grown in North Tunisia. **Italian Journal Biochemistry**, v. 56, n. 2, p. 180-186, 2007.
- AJELLO, L.; KAPLAN, W. A new variant of *Sporothrix schenckii*. **Mykosen**, v. 12, n. 11, p. 633-644, 1969.
- AKIN, M.; AKTUMSEK, A.; NOSTRO, A. Antibacterial activity and composition of the essential oils of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. and *Myrtus communis* L. growing in Northern Cyprus. **African Journal Biotechnology**, v. 9, n. 4, p. 531-535, 2010.
- ALBERICI, F.; PATIES, C. T.; LOMBARDI, G.; AJELLO, L.; KAUFMAN, L.; CHANDLER, F. *Sporothrix schenckii* var *luriei* as the cause of sporotrichosis in Italy. **European Journal Epidemiology**, v. 5, n. 2, p. 173-177, 1989.
- ALEKSIC, V.; KNEZEVIC, P. Antimicrobial and antioxidative activity of extracts and essential oils of *Myrtus communis* L. **Microbiological Research**, v. 169, n. 4, p. 240-254, 2014.
- ALEM, G.; MEKONNEN, Y.; TIRUNEH, M.; MULU, A. *In vitro* antibacterial activity of crude preparation of myrtle (*Myrtus communis*) on common human pathogens. **Ethiopian Medical Journal**, v. 46, n. 1, p. 63-69, 2008.
- ALMEIDA S. R. **Micologia**. 6^a Ed. Rio de janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
- ALMEIDA-PAES, R.; FRASES, S.; MONTEIRO, P. C. F.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M.; NOSANCHUK, J. N. Growth conditions influence melanization of Brazilian clinical *Sporothrix schenckii* isolates. **Microbes and Infection**, v. 11, n. 5, p. 554-562, 2009.
- APPENZELLER, S.; AMARAL, T. N.; AMSTALDEN, E. M.; BERTOLO, M. B.; NETO, J. F.; SAMARA, A. M.; FERNANDES, S. R. *Sporothrix schenckii* infection presented as monoarthritis: report of two cases and review of the literature. **Clinical Rheumatology**, v. 25, n. 6, p. 926-928, 2005.
- ARECHAVALA, A. T. O.; MAIOLO, E.; MUJICA, M. T.; FERNANADEZ, M.; NEGRONI, R. Esporotricosis Diseminada, Con Compromiso Cutáneo y Visceral. **Revista de Patologia Tropical**, v. 40, n. 1, p. 73 - 84, 2011.

ARNOLD, W. N.; MANN, L. C.; SAKAI, K. H.; GARRISON, R. G.; COLEMAN, P. D. Acid phosphatases of *Sporothrix schenckii*. **Journal of General Microbiology**, v. 132; n. 12, p. 3421-3432, 1986.

ARRILLAGA-MONCRIEFF, I.; CAPILLA, J.; MAYAYO, E.; MARIMON, R.; MARINÉ, M.; GENÉ, J.; CANO, J.; GUARRO, J. Different virulence levels of the species of *Sporothrix* in a murine model. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, n. 7, p. 651-655, 2009.

ASSIS, M. A.; MORELLI, A. V.; PIMENTA, F. Research groups and their scientific literature on medicinal plants: an exploratory study in the state of Rio de Janeiro. **Revista Fitos**, v. 9, n. 1, p. 1-72, 2015.

AUNG, A. K.; TEH, B. M.; MCGRATH, C.; THOMPSON, P. J. Pulmonary sporotrichosis: case series and systematic analysis of literature on clinico-radiological patterns and management outcomes. **Medical Mycology**, v. 51, n. 5, p. 534-544, 2013.

BAGAMBOULA, C.F.; UYTTENDAELE, M.; DEBEVERE, J. Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. **Food Microbiology**, v. 21, n. 1, p.33-42, 2004.

BARROS, M. B.; SCHUBACH, A. O., DO VALLE, A. C., GALHARDO, M. C. G.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.; SCHUBACH, T. M. P.; REIS, R. S.; WANKE, B.; MARZOCHI, B. F., CONCEIÇÃO, M. J. Cat-transmitted sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil: description of a series of cases. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 4, p. 529-535, 2004.

BARROS, M. B.; PAES, R. A.; SCHUBACH, A. O. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 4, p. 633-654, 2011.

BARROS, M. B.; SCHUBACH, T. P.; COLL, J. O.; GREMIÃO, I. D.; WANKE, B.; SCHUBACH, A. Sporotrichosis: development and challenges of an epidemic. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 27, n. 6, p. 455-460, 2010.

BENNETT, J. E. **Antimicrobianos: Agentes antifúngicos**. In GOODMAN & GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 10ª Ed. New York: Mc Graw Hill, 2005. Cap. 49, p. 971-984.

BERKA-ZOUGALI, B.; FERHAT, M. A.; HASSANI, A.; CHEMAT, F.; ALLAF, K. S. Comparative study of essential oils extracted from Algerian *Myrtus communis* L. leaves using microwaves and hydrodistillation. *International Journal Molecular Sciences*, v. 13, n.4, p. 4673-4695, 2012.

BHUTIA, P.Y.; GURUNG, S.; YEGNESWARAN, P. P.; PRADHAN, J.; PRADHAN, U.; PEGGY, T.; PRADHAN, P. K.; BHUTIA, C. D. A case series and review of sporotrichosis in Sikkim. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 5, n. 8, p. 603-608, 2011.

BIAVATTI, M.W.; MARENSI, V.; LEITE, S.N.; REIS, A. Ethnopharmacognostic survey on botanical compendia for potential cosmeceutic species from Atlantic Forest. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 4, p. 640-653, 2007.

BONIFAZ, A.; ARAIZA, J.; PEREZ-MEJIA, A.; OCHOA, L. A.; TORIELLO, C. Intradermal test with sporotrichin in a community in the Sierra Norte de Puebla. **Dermatologia Revista Mexicana**, v. 57, p. 428-432, 2013.

BORBA-SANTOS, L. P.; RODRIGUES, A. M.; GAGINI, T. B.; FERNANDES, G. F.; CASTRO, R.; CAMARGO, Z. P.; NUCCI, M.; LOPES-BEZERRA, L. M.; ISHIDA, K.;

ROZENTAL, S. Susceptibility of *Sporothrix brasiliensis* isolates to amphotericin B, azoles, and terbinafine. **Medical Mycology**, v. 53, n. 2, p. 178-188, 2015.

BOUZABATA, A.; BAZZALI, O.; CABRAL, C.; GONÇALVES, M. J.; CRUZ, M. T.; BIGHELLI, A.; CAVALEIRO, C.; CASANOVA, J.; SALGUEIRO, L.; TOMI, F. New compounds, chemical composition, antifungal activity and cytotoxicity of the essential oil from *Myrtus nivellei* Batt. & Trab, an endemic species of Central Sahara. **Journal of Ethnopharmacology**. V. 149, n. 3, p. 613-620, 2013.

BOUZOUITA, N.; KACHOURI, F.; HAMDY, M.; CHAABOUNI, M.M. Antimicrobial activity of essential oils from Tunisian aromatic plants. **Flavor and Fragrance Journal**, v. 18, n. 5, p. 380-283, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica**. Brasília: MS; 2012. (Série A. Normas e Manuais Técnicos, Cadernos de Atenção Básica, n. 31).

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Manual de microbiologia clínica para o controle de infecção em serviços de saúde. 2004. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_microbiologia_completo.pdf>. Acesso em: 5 mai. 2013.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.

BRAVO, T. C. New observations on the epidemiology of sporotrichosis and *Sporothrix schenckii* complex. **Revista Latinoamericana de Patologia Clínica**, v. 59, n. 2, p. 88-100, 2012.

BRITO, M.M.S.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.; MORGADO, F.N.; RAIBOLT, P.S.; SCHUBACH, A.; SCHUBACH, T.P.; SCHÄFFER, G.M.V.; BORBA, C.M. Comparison of virulence of different *Sporothrix schenckii* clinical isolates using experimental murine model. **Medical Mycology**, v. 45, n. 8, p. 721-729, 2007.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, p.223-253, 2004.

BUSTAMANTE, B.; CAMPOS, P. E. Sporotrichosis: a forgotten disease in the drug research. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 2, n. 1, p. 85-94, 2004.

CALÒ, R.; VISIONE, C. M.; MARABINI, L. Thymol and *Thymus Vulgaris* L. activity against UVA- and UVB-induced damage in NCTC 2544 cell line. **Mutation Research**, v. 791, p. 30-37, 2015.

CANESCHI, C. A. **Potencial antifúngico do óleo essencial de *Baccharis trimera* Less (D.C.)**. 2013. 85f. Dissertação de Mestrado (ProGrama de Pós-Graduação em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2013.

CANNAS, S.; MOLICOTTI, P.; RUGGERI, M.; CUBEDDU, M.; SANGUINETTI, M.; MARONGIU, B.; ZANETTI, S. Antimycotic activity of *Myrtus communis* L. towards *Candida* spp. from clinical isolates. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 7, n. 3, p. 295-298, 2013.

CARVALHO, M. T. M.; CASTRO, A. P.; BABY, C.; WERNER, B.; NETO, J. F.; QUEIROZ-TELLES, F. Disseminated cutaneous sporotrichosis in a patient with AIDS: report of a case. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 6, p. 655–659, 2002.

CENTENO, S.; CALVO, M. A.; ADELANTADO, C.; FIGUERO, S. Antifungal activity of extracts of *Rosmarinus officinalis* and *Thymus vulgaris* against *Aspergillus flavus* and *A. ochraceus*. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 13, p. 452-455, 2010.

CENTER DISEASE CONTROL. Multistate outbreak of *sporotrichosis* in seedling handlers. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 37, n. 42, p. 652-653, 1988.

CHAKRABARTI, A.; BONIFAZ, A.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; MOCHIZUKI, T.; LI, S. Global epidemiology of sporotrichosis. **Medical Mycology**, v. 53, p. 3-14, 2015.

CLINICAL AND LABORATORY AND STANDARDS INSTITUTE. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved Standard M38-A2**. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, 2008.

COMBRINCK, S.; REGNIER, T.; KAMATOU, G.P.P. In vitro activity of eighteen essential oils and some major components against common postharvest fungal pathogens of fruit. **Industrial Crops and Products**, v.33, n. 2, p.344-349, 2011.

CONCEIÇÃO, G. M.; ARAGÃO, J. G. Diversidade e importância econômica das Myrtaceae do Cerrado. Parque Estadual do Mirador. Maranhão. **Scientia Plena**, v. 6, n. 7, p. 1-8, 2010.

CORDEIRO, F. N.; PAULA, C. D. R.; BRUNO, C. B.; MOTTA, J. O. C. Orientação familiar de esporotricose zoonótica. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 86, n. 4, p. 121-124, 2011.

CORTICCHIATO, M.; TOMI, F.; BERNARDINI, A. F.; CASANOVA, J. Composition and infraspecific variability of essential oil from *Thymus herba barona* Lois. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 26, p. 915-932, 1998.

COSTA, A. R. T.; AMARAL, M. F. Z. J.; MARTINS, P. M.; PAULA, J. A. M.; FIUZA, T. S.; RESVENZOL, L. M. F.; PAULA, J. R.; BARA, M. T. F. Ação do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M. Perry sobre as hifas de alguns fungos fitopatogênicos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.13, n.2, p. 240-245, 2011.

COSTA, R.; BERNARDES-ENGEMANN, A. R.; AZULAY-ABULAFIA, L.; BENVENUTO, F.; NEVES, M. L. P.; LOPES-BEZERRA, L. M. Esporotricose na gestação: relato de cinco casos numa epidemia zoonótica no Rio de Janeiro, Brasil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 5, p. 995-998, 2011.

CROTHERS, L. S.; WHITE, S. D.; IHRKE, P. J.; AFFOLTER, V. K. Sporotrichosis: a retrospective evaluation of 23 cases seen in northern California (1987-2007). **Veterinary Dermatology**, v. 20, n. 4, p. 249-259, 2009.

CRUZ, L. C. H. Complexo *Sporothrix schenckii*. Revisão de parte da literatura e considerações sobre o diagnóstico e a epidemiologia. **Veterinária e Zootecnia**, v. 20 (Edição Comemorativa), p. 8-28, 2013.

CURINI, M.; BIANCHI, A.; EPIFANO, F.; BRUNI, R.; TORTA, L.; ZAMBONELLI, A. Composition and *in vitro* antifungal activity of essential oils of *Erigeron canadensis* and *Myrtus communis* from France. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 39, n. 2, p. 191–194, 2003.

DAFERA, D.J.; ZIOGAS, B.N.; POLISSIOU, M.G. GC-MS Analysis of Essential Oils from Some Greek Aromatic Plant and Their Fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. **The Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 6, p. 2576-2581, 2000.

DAN, Y.; LIU, H. Y.; GAO, W. W.; CHEN, S. L. Activities of essential oils from *Asarum heterotropoides* var. *mandshuricum* against five phytopathogens. **Crop Protection**. v. 29, p. 295-299, 2010.

DAWIDOWICZ, A., L.; RADO, E.; WIANOWSKA, D.; MARDAROWICZ, M.; GAWDZIK, J. Application of PLE for the determination of essential oil components from *Thymus vulgaris* L. *Talanta*, v. 76, n. 4, p. 878-884, 2008.

DA ROSA, A. C.; SCROFERNEKER, M. L.; VETTORATO, R.; GERVINI, R. L.; VETTORATO, G.; WEBER, A. Epidemiology of *sporotrichosis*: a study of 304 cases in Brazil. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 52, n. 3 Pt 1, p. 451-459, 2005.

DA ROSA, D; GEZUELA, E.; CALEGARI, L.; GONI, F. Excretion-secretion products and proteases from live *Sporothrix schenckii* yeast phase. Immunological detection and cleavage of human IgG. **Revista Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 51, n. 1, p. 1-7, 2009.

DE AZEREDO, E. H.; RODRIGUES, W. C.; CASSINO, P. C. R. Ocorrência de *Selenaspidus articulatus* (Morgan) (Hemiptera, Diaspididae) e do predador *Pentilia egena* (Mulsant) (Coleoptera, Coccinellidae) em *Myrtus communis* L. (Myrtaceae), em Pinheiral, RJ. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 48, n. 4, p. 569-576, 2004.

DE LAURENTIS, N.; ROSATO, A.; GALLO, L.; LEONE, L.; MILILO, M. A. Chemical composition and antimicrobial activity of *Myrtus communis*. **Rivista Italiana EPPOS**, v. 39, p. 3-8, 2005.

DE MEYER, E. M.; DE BEER, Z. W.; SUMMERBELL, R. C.; MOHARRAM, A. M.; DE HOOG, G. S.; VISMER, H. F.; WINGFIELD, M. J. Taxonomy and phylogeny of new woodand soil-inhabiting *Sporothrix* species in the *Ophiostoma stenoceras* *Sporothrix schenckii* complex. **Mycologia**, v. 100, n. 4, p. 647-661, 2008.

DE MIRANDA, L. H.; QUINTELLA, L. P.; DOS SANTOS, I. B. et al. Histopathology of canine *Sporotrichosis*: a comparative serological study of 86 cases from Rio de Janeiro. **Mycopathologia**, v. 169, n. 2, p. 79-87, 2009.

DIXON, D.; SALKIN, I. F.; DUNCAN, R. A.; HURD, N. J.; HAINES, J. H.; KEMNA M. E.; COLES, F. B. Isolation and characterization of *Sporothrix schenckii* from clinical and environmental sources associated with the largest U.S. epidemic of *sporotrichosis*. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 29, n. 6, p. 1106-1113, 1991.

DONATO, A. M.; DE MORRETES, B. L. Anatomia foliar de *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) proveniente de áreas de restinga e de floresta. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 17, n. 3, p. 426-443, 2007.

DORMAN, H.J.D., DEANS, S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 308-316, 2000.

- DUTRA, R. C.; CAMPOS, M. M.; SANTOS, A. R.; CALIXTO, J. B. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v. 112, p. 4-29, 2016.
- EL-NEKEETY, A. A.; MOHAMED, S. R.; HATHOUT, A. S.; HASSAN, N. S.; ALY, S. E.; ABDEL-WAHAB, M. A. Antioxidant properties of *Thymus vulgaris* oil against aflatoxin-induced oxidative stress in male rats. **Toxicol**, v. 57, n. 7-8, p. 984–991, 2011.
- ESTANISLAU, A. A.; BARROS, F. A. S.; PEÑA, A. P.; SANTOS, S. C.; FERRI, P. H.; PAULA, J. R. Composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de cinco espécies de *Eucalyptus* cultivadas em Goiás. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 11, n. 2, p. 95-100, 2001.
- FACHINI-QUEIROZ, F. C.; KUMMER, R.; ESTEVÃO-SILVA, C. F.; CARVALHO, M. D. B.; CUNHA, J. M.; GRESPAN, R.; BERSANI-AMADO, C. A.; CUMAN K. N. Effects of Thymol and Carvacrol, Constituents of *Thymus vulgaris* L. Essential Oil, on the Inflammatory Response. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v, 2012, Article ID 657026, 10 pages, 2012. doi:10.1155/2012/657026
- FALCI, D. R.; PASQUALOTTO, A. C. Anfotericina B: uma revisão sobre suas diferentes formulações, efeitos adversos e toxicidade. **Clinical & Biomedical Research**. V. 35, n. 2, p. 65-82, 2015.
- FALQUETO, A.; MAIFREDE, S. B.; RIBEIRO, M. A. Unusual clinical presentation of sporotrichosis in three members of one family. **Int J Dermatol**, v. 51, p. 434-438, 2012.
- FARAG, R. S.; ABD-EL-AZIZ, O.; ABD-EL-MOEIN, N. M.; MOHAMED, S. M. Insecticidal activity of thyme and clove essential oils and their basic compounds on cotton leaf worm (*Spodoptera littoralis*). **Bulletin of Faculty of Agriculture, University of Cairo**, v. 45, n. 1, p. 207-230, 1994.
- FARAH, A.; AFIFI, A.; FECHTAL, M.; CHHEN, A.; SATRANI, B.; TALBI, M.; CHAOUCH, A. Fractional distillation effect on the chemical composition of Moroccan myrtle (*Myrtus communis* L.) essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**. v. 21, n. 2, p. 351-354, 2006.
- FAYAD, N. K.; AL-OBAIDI, O. H. S.; AL-NOOR, T. H.; EZZAT, M. O. Water and alcohol extraction of Thyme plant (*Thymus vulgaris*) and activity study against bacteria, tumors and used as anti-oxidant in margarine manufacture. **Innovative Systems Design and Engineering**, v. 4, n. 1, p. 41-51, 2013.
- FERNANDES, K. S.; MATHEWS, H. L.; BEZERRA, L. Differences in virulence of *Sporothrix schenckii* conidia related to culture conditions and cell-wall components. **Journal Medical Microbiology**, v. 48, n. 2, p. 195-203, 1999.
- FERNANDES, G. F.; AMARAL, C. C.; SASAKI, A. A.; MARTINEZ-GODOY, P.; CAMARGO, Z. P. Heterogeneity of proteins expressed by Brazilian *Sporothrix schenckii* isolates. **Medical Mycology**, v. 47, n. 8, p. 855-861, 2009a.
- FERNANDES, G. F.; SANTOS, P. O.; AMARAL, C. C.; SASAKI, A. A.; GODOY-MARTINEZ, P.; CAMARGO, Z. P. Characteristics of 151 Brazilian *Sporothrix schenckii* isolates from 5 different geographic regions of Brazil: A forgotten and re-emergent pathogen. **The Open Mycology Journal**. v. 3, n. 1, p. 48-58, 2009b.
- FERNANDES, G. F.; DOS SANTOS, P. O.; RODRIGUES, A. M. et al. Characterization of virulence profile, protein secretion and immunogenicity of different *Sporothrix schenckii*

- sensu stricto* isolates compared with *S. globosa* and *S. brasiliensis* species. **Virulence**, v. 4, n. 3, p. 241-249, 2013.
- FIGUEIREDO, C. C.; LIMA, O. C.; CARVALHO, L.; LOPES-BEZERRA, L. M.; MORANDI, V. The in vitro interaction of *Sporothrix schenckii* with human endothelial cells is modulated by cytokines and involves endothelial surface molecules. **Microbial Pathogenesis**, v. 36, n. 4, p. 177–188, 2004.
- FIGUEIREDO, C. C., DECCACHE, P. M.; LOPES-BEZERRA, L. M.; MORANDI, V. 2007. TGF-beta1 induces transendothelial migration of the pathogenic fungus *Sporothrix schenckii* by a paracellular route involving extracellular matrix proteins. **Microbiology**, v. 153, n. 9, p. 2910–2921, 2007.
- FIGUEIREDO, A. C.; BARROSO, J. G.; PEDRO, L. G.; SALGUEIRO, L.; MIGUEL, M. G.; FALEIRO, M. L. Portuguese *Thymbra* and *Thymus* species volatiles: chemical composition and biological activities. **Current Pharmaceutical Design**, v. 14, n. 29, p. 3120-3140, 2008.
- FILIPPIN, F.; SOUZA, L. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v.42, n. 2, p. 167-194, 2006.
- FUKUSHIRO, R. Epidemiology and ecology of *sporotrichosis* in Japan. **Zentralblatt für Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene**, v. 257, n. 2, p. 228–233, 1984.
- FURTADO, T.; ARMOND, S. Esporotricose ocupacional e familiar, **Medicina Cutânea Ibero-Latino-Americana**, v. 9, n. 3, p. 207-210, 1981.
- GARCÍA-RISCO, M. R.; VICENTE, G.; REGLERO, G.; FORNARI, T. Fractionation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) by supercritical fluid extraction and chromatography. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 55, n. 3, p. 949-954, 2011.
- GARDELIA, C.; VASSILIKIA, P.; ATHANASIOSA, M.; KIBOURISA, T.; KOMAITIS, M. Essential oil composition of *Pistacia lentiscus* L. and *Myrtus communis* L.: Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts, **Food Chemistry**, v. 107, n.3, p. 1120-1130, 2008.
- GHOSH, A.; MAITY, P. K.; HEMASHETTAR, B. M.; SHARMA, V. K.; CHAKRABARTIL. Physiological characters of *Sporothrix schenckii* isolates. **Mycoses**. v.45, n. 11-12, p. 449–454, 2002.
- GILLES, M.; ZHAO, J.; AN, M.; AGBOOLA, S. Chemical composition and antimicrobial properties of essential oils of three Australian *Eucalyptus* species. **Food Chemistry**. v.119, n. 2, p.731-737, 2010.
- GIORDANI, C.; GUTERRES, K. A.; MATOS, C. B.; SILVA, C. C.; FARIA, R. O.; CLEFF, M. B. Ação dos extratos hidroalcoólicos de aroeira-mansa e lanceta frente a isolados de *Sporothrix brasiliensis*, **XVI Encontro de Pós-Graduação UFPel**, 2014.
- GOMES, A. R.; MADRID, I. M.; MATOS, C. B.; TELLES, A. J.; WALLER, S. B.; NOBRE, M. O.; MEIRELES, M. C. A. Dermatopatias Fúngicas: aspectos clínicos, diagnósticos e terapêuticos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 6, n. 4, p. 272-284, 2012.
- GORTZI, O.; LALAS, S.; CHINO, I.; TSAKNIS, J. Reevaluation of bioactivity and antioxidant activity of *Myrtus communis* extract before and after encapsulation in liposomes. **European Food Research and Technology**, v. 226, n.3, p.583–590, 2008.

- GRAY, K. C.; PALACIOS, D. S.; DAILEY, I.; ENDO, M. M.; UNO, B. E.; WILCOCK, B. C.; BURKE, M. D. Amphotericin primarily kills yeast by simply binding ergosterol, **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 7, 2234-2239, 2012.
- GUERRA-BOONE, L.; ALVAREZ-ROMÁN, R.; ALVAREZ-ROMÁN, R.; SALAZAR-ARANDA, R.; TORRES-CIRIO, A.; RIVAS-GALINDO V. M.; DE-TORRES N.W.; GONZÁLEZ G.; PÉREZ-LÓPEZ, L.A. Antimicrobial and antioxidante activities and chemical characterization of essential oils of *Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*, and *Origanum majorana* from northeastern México. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 28, n. 1, p. 363-369, 2015.
- GUILLÉN, M. D.; MANZANOS, M. J. Study of the composition of the different parts of a Spanish *Thymes vulgaris* L. Plant. **Food Chemistry**, v. 63, n. 3, p. 373-383, 1998.
- GUTERRES, K. A.; MATOS, C. B.; OSÓRIO, L. G.; SCHUCH, I. D.; CLEFF, M. B. The use of (1-3) β -glucan along with itraconazole against canine refractory *sporotrichosis*. **Mycopathologia**, v.177, n.3-4, p.217-221, 2014.
- GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; FREITAS, D. F. S.; VALLE, A. C. F.; ALMEIDA-PAES, R.; OLIVEIRA, M. M. E.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M. Epidemiological aspects of sporotrichosis epidemic in Brazil. **Current Fungal Infection Reports**, v. 9, n. 4, p. 238-245, 2015.
- HARDMAN, S.; STEPHNSON, I.; JENKINS, D. R.; WISELKA, M. J.; JOHNSON, E.M. Disseminated *Sporothrix schenckii* in a patient with AIDS. **Journal of Infection**, v. 51, n. 3, p. e73-e77, 2005.
- HEIDRICH, D.; STOPIGLIA, C. D. O.; SENTER, L.; VETORATTO, G.; VALENTE, P.; SCROFERNEKER, M. L.;. Successful treatment of terbinafine in a case of sporotrichosis. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. V. 86(Supl1), n. 4, p.182-185, 2011.
- HELANDER, I. M.; ALAKOMI, H. L.; LATVA-KALA, K.; MATTILA-SANDHOLM, T.; POL, I.; SMID, E. J.; GORRIS, L. G. M.; VON WRIGHT, A. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 9, p. 3590-3595, 1998.
- HOGAN, L. H.; KLEIN, B. S.; LEVITZ, S. M. Virulence factors of medically important fungi. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 9, n. 4, p. 469-488, 1996.
- HORNE, D. S.; HOLM, M.; OBERG, C.; CHAO, S.; YOUNG, D. G. Antimicrobial effects of essential oils on *Streptococcus pneumoniae*. **Journal of Essential Oil Research**, v. 13, n. 5, p. 387-392, 2001.
- HOSSEINZADEH, S.; JAFARIKUKHDAN, A.; HOSSEINI, A.; ARMAND, R. The application of medicinal plants in tradicional and modern medicine: a review of *Thymus vulgaris*. **International Journal of Clinical Medicine**, v. 6, n. 9, p. 635-642, 2015.
- HOWARD, D. H. Dimorphism of *Sporothrix schenckii*. **Journal of Bacteriology**. v. 81, n. 3, p. 464-469, 1961.
- HRUBIK, J. D.; KAISAREVIC, S. N.; GLISIC, B. D.; JOVIM, E. D.; MIMICA-DUKIC, N. M.; KOVACEVIC, R. Z. Myrtus communis and Eucalyptus camaldulensis cytotoxicity on breast cancer cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.123, p. 65-73, 2012.

- HUDAIB, M.; SPERONI, E.; PIETRA, A.M.D.; CAVRINI, V. CG/EM evaluation of thyme (*Thymus Vulgaris* L.) oil composition and variations during the vegetative cycle. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.29, n. 4, p. 691–700, 2002.
- HUSSAIN, A.; ANWAR, F.; NIGAM, P. S.; ASHRAF, M.; GILANI, A. H. Seasonal variation in content, chemical composition and antimicrobial and cytotoxic activities of essential oils from four *Mentha* species. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, n. 11, p. 1827-1836, 2010.
- ISHIDA, K.; CASTRO, R. A.; SANTOS, L. P. B.; QUINTELLA, L. P.; LOPES-BEZERRA, L. M.; ROZENTAL, S. Amphotericin B, alone or followed by itraconazole therapy, is effective in the control of experimental disseminated *sporotrichosis* by *Sporothrix brasiliensis*, **Medical Mycology**, v. 53, n. 1, p. 34-41, 2015.
- ISMAN, M. B.; WAN, A. J.; PASSREITER, C. M. Insecticidal activity of essential oils to the tobacco cutworm, *Spodoptera litura*. **Fitoterapia**, v. 72, n. 1, p. 65-68, 2001.
- JERKOVIC, I.; RADONIC, A.; BORCIC, I. Comparative study of leaf fruit and flower essential oil of creation *Myrtus communis* (L.) during a one-year vegetative cycle. **Journal of Essential Oil Research**, v. 14, n. 1, p. 266-270, 2002.
- JORDÁN, M. J.; MARTÍNEZ, R. M.; GOODNER, K. L.; BALDWIN, E. A.; SOTOMAYOR, J. A. Seasonal variation of *Thymus hyemalis* Lange and Spanish *Thymus vulgaris* L. essential oils composition. **Industrial Crops and Products**, v. 24, n. 3, p. 253–263, 2006.
- JUERGENS, U. R.; ENGELEN, T.; RACKÉ, K.; STOBER, M.; GILLISSEN, A.; VETTER, H. Inhibitory activity of 1,8-cineol (eucalyptol) on cytokine production in cultured human lymphocytes and monocytes. *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics*, v. 17, n. 5, p. 281-287, 2004.
- KAJIWARA, H.; SAITO, M.; OHGA, S.; UENOTSUCHI, T.; YOSHIDA, S. Impaired host defense against *Sporothrix schenckii* in mice with chronic granulomatous disease. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 9, p. 5073-5079, 2004.
- KALEMBA, D.; KUNICKA, A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. **Current Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 10, p. 813–829, 2003.
- KANAFANI, Z. A.; PERFECT, J. R. Resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. **Clinical Infectious Diseases**. V. 46, n. 1, p. 120-128, 2008.
- KANO, R.; NAKAMURA, Y.; WATANABE, S.; TSUJIMOTO, H.; HASEGAWA, A. Identification of *Sporothrix schenckii* based on sequences of the chitin synthase 1 gene. **Mycoses**, v. 44, n. 7-8, p. 261-265, 2001.
- KAUFFMAN, C. A. *Sporotrichosis*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 29, n. 2, p. 231-236, 1999.
- KAUFFMAN, C. A.; BUSTAMANTE, B.; CHAPMAN, S. W.; PAPPAS, P. G. Clinical Practice Guidelines for the Management of *Sporotrichosis*: Update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 45, n. 10, p. 1255–1265, 2007.
- KERN, M. E.; BLEVINS, K. S. **Micologia Médica**. 2. ed. São Paulo: Editora Premier, 1999. 256 p.

- KHAN, M. S. A.; AHMAD, I.; CAMEOTRA, S. S. Carum copticum and Thymus vulgaris oils inhibit virulence in *Trichophyton rubrum* and *Aspergillus* spp, **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 523-531, 2014.
- KOBAYASHI, M.; YAMAMOTO, O. *Sporotrichosis* in farmers. **Journal of UOEH**, v. 24, n. 2, p. 219-224, 2002.
- KOHLER, L. M.; MONTEIRO, P. C. F.; HAHN, R. C.; HAMDAN, J. S. In Vitro Susceptibilities of Isolates of *Sporothrix schenckii* to Itraconazole and Terbinafine, **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 9, p. 4319-4320, 2004.
- KONG, X., XIAO, T., LIN, J., WANG, Y. & CHEN, H. D. Relationships among genotypes, virulence and clinical forms of *Sporothrix schenckii* infection. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 12, n. 11, p. 1077-1081, 2006.
- LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N. T. Tratado de Micologia Médica. **Sarvier**, V. 44, n. 5, 2002.
- LARSSON, C. E. *Esporotricosis y criptococosis*. In: CONGRESO MUNDIAL WSAVA, 30.; MEMÓRIAS DO CONGRESSO MUNDIAL, 2005, México. **Proceedings**, v. 1. p. 61-69, 2005.
- LARSSON, C. E. Esporotricose. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 48, n. 3, p. 250-259, 2011.
- LIMA, O. C.; FIGUEIREDO, C. C.; PREVIATO, J. O.; MEDONÇA-PREVIATO, L.; MORANDI, M.; LOPEZ-BEZERRA, L. M. Involvement of fungal cell wall components in adhesion of *Sporothrix schenckii* to human fibronectin. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 11, p. 6874–6880, 2001.
- LIMA, O. C.; BOUCHARA, J. P.; RENIER, G.; MAROT-LEBLOND, A.; CHABASSE, D.; LOPEZ-BEZERRA, L. M. Immunofluorescence and flow cytometry analysis of fibronectin and laminin binding to *Sporothrix schenckii* yeast cells and conidia. **Microbial Pathogenesis**, v. 37, n. 3, p. 131–140, 2004.
- LIU, X.; ZHANG, Z.; HOU, B.; WANG, D.; SUN, T.; LI, F.; WANG, H.; HAN, S. Rapid identification of *Sporothrix schenckii* in biopsy tissue by PCR. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 20, n. 27, p. 1491-1497, 2012.
- LOPES-BEZERRA, L.M. *Sporothrix schenckii* cell wall peptidorhamnomannans. **Front Microbiol.**, v.2. p, 243, 2011.
- LOPES-BEZERRA, L.M.; SCHUBACH, A; COSTA, R.O. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis, **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.78, n.2, p.293- 308, 2006.
- LUTZ, A.; SPLENDORE, A. Sobre uma micose observada em homens e ratos (Contribuição para o conhecimento das assim chamadas esporotricoses). **Revista de Medicina**, v. 10, n. 21, p. 443-450, 1907.
- LYON, G.M.; ZURITA, S.; CASQUERO, J., et al. Population-based surveillance and a case-control study of risk factors for endemic lymphocutaneous *sporotrichosis* in Peru. **Clinical Infectious Diseases**, v. 36, n. 1, p. 34-39, 2003.

- MADRID, I. M.; XAVIER, M. O.; MATTEI, A. S.; CARAPETO, L. P.; ANTUNES, T. A.; SANTOS JR, R.; NOBRE, M. O.; MEIRELES, M. C. A. Esporotricose óssea e cutânea em um canino. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 44, n. 6, p. 441-443, 2007.
- MADRID, H.; CANO, J.; GENÉ, J.; BONIFAZ, A.; TORIELLO, C.; GUARRO, J. *Sporothrix globosa*, a pathogenic fungus with widespread geographical distribution. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 26, n. 3, p. 218–222, 2009.
- MADRID, H.; GENÉ, J.; CANO, J.; SILVEIRA, C.; GUARRO, J. *Sporothrix brunneoviolacea* and *Sporothrix dimorphospora*, two new members of the *Ophiostoma stenoceras-Sporothrix schenckii* complex. **Mycologia**, v. 102, n. 5, p. 1193-1203, 2010a.
- MADRID, I. M.; XAVIER, M. O.; MATTEI, A. S.; FERNANDES, C. G.; GUIM, T. N.; SANTIN, R.; SCHUCH, L. F. D.; NOBRE, M. O.; MEIRELES, M. C. A. Role of melanin in the pathogenesis of cutaneous *sporotrichosis*. **Microbes and Infection**, v. 12, n. 2, p. 162-165, 2010b.
- MADRID, I. M.; MATTEI, A. S.; FERNANDES, C. G.; NOBRE, M. O.; MEIRELES, M. C. A. Epidemiological Findings and Laboratory Evaluation of *Sporotrichosis*: A Description of 103 Cases in Cats and Dogs in Southern Brazil. **Mycopathologia**, v. 173, n. 4, p. 265-273, 2011.
- MAGAGNIN, C. M.; STOPIGLIA, C. D. O.; VIEIRA, F. J.; LAMB, F. M.; STOPIGLIA, C. D. E.; HEIDRICH, D.; VETORATO, G.; SCROFERNEKER, M. L. Perfil de suscetibilidade a antifúngicos de dermatófitos isolados de pacientes com insuficiência renal crônica. **Anais Brasileiros Dermatologia**, v. 86, n. 4, p. 694-701, 2011.
- MAHAJAN, V. K. Sporotrichosis: na overview and therapeutic options. **Dermatological Research Practice**, v. 2014, Article ID 272376, 13 pages.
<http://dx.doi.org/10.1155/2014/272376>
- MAHAJAN, V. K.; SHARMA, N. L.; SHARMA, R. C.; GUPTA, M. L.; GARG, G.; KANGA, K. Cutaneous sporotrichosis in Himachal Pradesh, India. **Mycoses**, v. 48, n. 1, p. 25-31, 2005.
- MAHDI, N. K.; GANY, Z. H.; SHARIEF, M. Alternative drugs against *Trichomonas vaginalis*, **Eastern Mediterranean Health Journal**, v. 12, n. 5, p. 679-684, 2006
- MAHAJAN, V. K.; SHARMA, N. L.; SHARMA, C.; GUPTA, M. L.; GARG, G.; KANGA, A. K. Cutaneous *sporotrichosis* in Himachal Pradesh. **Mycoses**, v. 48, n. 1, p. 25-31, 2005.
- MAHLBERG, M. J.; PATEL, R.; ROSENMAN, K. et al. Fixed cutaneous *Sporotrichosis*. **Dermatology Online Journal**, v. 15, n. 8, p. 5, 2009.
- MANCINI E.; SENATORE, F.; DEL MONTE, D.; DE MARTINO, L.; GRULOVA, D.; SCOGNAMIGLIO, M.; SNOUSSI, M.; DE FEO, V. Studies on Chemical Composition, Antimicrobial and Antioxidant Activities of Five *Thymus vulgaris* L. Essential Oils. **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 12016-12028, 2015.
- MAHMOUDVAND, H.; EZZATKHAH, F.; SHARIFIFAR, F.; SHARIFI, T.; DEZAKI, E. S. Antileishmanial and Cytotoxic effects of essential oil and methanolic extract of *Myrtus communis* L. **Korean Journal of Parasitology**, v. 53, n. 1, 2015.
- MANCINI, E.; SENATORE, F.; DEL MONTE, D.; DE MARTINO, L.; GRULOVA, D.; SCOGNAMIGLIO, M.; SNOUSSI, M.; DE FEO, V. Studies on Chemical Composition Antimicrobial and Antioxidant Activities of Five *Thymus vulgaris* L. Essential Oils. **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 12016-12028, 2015.

- MANSOURI, S.; FOROUMADI, A.; GHANEIE, T.; NAJAR, A. G. Antibacterial activity of the crude extracts and fractionated constituents of *Myrtus communis*. **Pharmaceutical Biology**, v. 39, n. 5, p. 399–401, 2001.
- MARIMON, R.; GENE, J.; CANO, J., et al. Molecular phylogeny of *Sporothrix schenckii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 9, p. 3251–3256, 2006.
- MARIMON, R.; CANO, J.; GENÉ, J.; SUTTON, D. A.; KAWASAKI, M.; GUARRO, J. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 10, p. 3198–3206, 2007.
- MARIMON, R.; SERENA, C.; GENÉ, J.; CANO, J.; GUARRO, J. In vitro antifungal susceptibilities of five species of *Sporothrix*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 2, p. 732-734, 2008a.
- MARIMON, R.; GENE, J.; CANO, J.; GUARRO, J. *Sporothrix luriei*: a rare fungus from clinical origin. **Medical Mycology**, v. 46, n. 6, p. 621–625, 2008b.
- MARTINS, V. J. M.; LINS, R. X.; BERLINCK, T. C. A.; FIDEL, R. A. S. Cytotoxicity of root canal sealers on endothelial cell cultures. **Braz Dent J**, v. 24, n. 1, p. 15-20, 2013.
- MAYORGA, R.; CACERES, A.; TORIELLO, C.; GUTIERREZ, G.; ALVAREZ, O.; RAMIREZ, M. E.; MARIAT, E. An endemic area of sporotrichosis in Guatemala. **Sabouraudia**, v. 16, n. 3, p. 185–198, 1978.
- MEINERZ, A.R.M.; NASCENTE, P. S.; SCHUCH, L. F. D.; CLEFF, M. B.; SANTIN, R.; BRUM, C. S. Suscetibilidade in vitro de isolados de *Sporothrix schenckii* frente à terbinafina e itraconazol. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 1, p. 60-62, 2007.
- MEINERZ, A. R. M.; XAVIER, M. O.; CLEFF, M. B; MADRID, I. M.; NOBRE, M. O.; MEIRELES, M. C. A.; MELLO, J. R. B. Efficacy of terbinafine and itraconazole on a experimental model of systemic sporotrichosis, **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 4, p. 734-737, 2008.
- MEIRELES, M.C.A.; NASCENTE, P.S. **Micologia Veterinária**. Pelotas: Editora Universitária UFPel, 2009.
- MENDOZA, M., HUNG, M. B., DÍAZ, A. M., ZAMBRANO, E. A.; DÍAZ, E.; ALBORNOZ, M. C. Growth kinetics and morphology of *Sporothrix schenckii* in diverse culture media. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 15, n. 3, p. 127-135, 2005.
- MESSAOUD, C., ZAOUALI, Y., BEN SALAH, A., KHOUDJA, M.L. AND BOUSSAID, M. *Myrtus communis* in Tunisia: Variability of the essential oil composition in natural populations. **Flavor Fragr. J.**, 20: 577-582, 2005.
- MONTORO, P.; TUBEROSO, C. I.; PIACENTE, S.; PERRONE, A.; DE FEO, V.; CABRAS, P.; PIZZA, C. Stability and antioxidante activity of polyphenols in extracts of *Myrtus communis* L. berries used for the preparation of myrtle liqueur. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 41, n. 5, p. 1614-1619, 2006.
- MILADI, H.; SLAMA, R. B.; MILI, D.; ZOUARI, S.; BAKHOUF, A.; AMMAR, E. Essential oil of *Thymus vulgaris* L. and *Rosmarinus officinalis* L.: Gas chromatography-mass spectrometry analysis, cytotoxicity and antioxidant properties and antibacterial activities against foodborne pathogens. **Natural Science**, v. 5, n. 6, p. 729-739, 2013.

MILLEZI, A.F; CAIXETA, D.S; ROSSONI, D.F.; CARDOSO, M.G.; PICCOLI, R.H. In vitro antimicrobial properties of plant essential oils *Thymus vulgaris*, *Cymbopogon citratus* and *Laurus nobilis* against five important foodborne pathogens. **Ciênc. Tecnol. Aliment**, v.32, n.1, p. 167-172, 2012.

MOCHIZUKI, T.; ANZAWA, K. Deep mycosis in Japan. In: EUN, H. C.; KIM, S. C.; LEE, W. S. Aging and skin diseases. **Special book of the 22nd World Congress of Dermatology**, Seoul, Korea: Medrang Inc, 2011.

MOHAMMADI, R.; ESFAHANI, S. H. M.; SHADZI, S.; MOATTAR, F. Antifungal activity of *Myrtus communis* L. essential oil against clinical isolates of *Aspergillus*. **Journal of Isfahan Medical School**, v. 26, n. 89, p. 105-111, 2008.

MOHAMMADI, R.; MIRHENDI, S. H.; SHADZI, S.; MOATTAR, F. Antifungal activity of *Myrtus communis* L. essential oil against clinical isolates of *Aspergillus*. **J. Isfahan Med. Sch.**, v. 26, p. 105-111, 2008.

MONTEIRO, H. R. B.; TANENO, J. C.; NEVES, M. F. Esporotricose em felinos domésticos. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 6, n. 10, 2008.

MORAIS, L. M. F.; CONCEIÇÃO, G. M.; NASCIMENTO, J. M. Família *Myrtaceae*: análise morfológica e distribuição geográfica de uma coleção botânica. **Agrarian Academy**, v. 1, n. 1, p. 317-346, 2014.

MORRIS-JONES, R. *Sporotrichosis*. **Clinical Dermatology**, v. 27, p. 427-431, 2002.

MORSY, T. A.; SHOUKRY, A.; MAZYAD, S. A.; MAKLED, K. M. The effect of the volatile oils of *Chenopodium ambrosoides* and *Thymus vulgaris* against the larvae of *Lucilia sericata* (Meigen). **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, v. 28, n. 2, p. 503-510, 1998.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

NABAVIZADEH, M.; ABBASZADEGAN, A.; GHOLAMI, A.; SHEIKHIANI, R.; SHOKOUHI, M.; SHAMS, M. S.; GHASEMI, Y. Chemical constituent and antimicrobial effect of essential oil from *Myrtus communis* leaves on microorganisms involved in persistent endodontic infection compared to two common endodontic irrigants: An *in vitro* study. **Journal of Conservative Dentistry**, v. 17, n. 5, p. 449-453, 2014.

NAGHIBI, F.; MOSADDEGH, M.; MOTAMED, S. M.; GHORBANI, A. *Labiatae* Family in folk Medicine in Iran: from Ethnobotany to pharmacology. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 2, p. 63-79, 2005.

NAKAMURA, Y.; SATO, H.; WATANABE, S.; TAKAHASHI, H.; KOIDE, K.; HASEGAWA, A. *Sporothrix schenckii* isolated from a cat in Japan. **Mycosis**, v. 39, n. 3-4, p. 125-128, 1996.

NASCIMENTO, G. G. F; LOCATELLI, J.; FREITAS, P. C.; Silva, G. L. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 21, n. 4, p. 247-256, 2000.

NEYRA, E.; FONTEYNE, P. A.; SWINNE, D., et al. Epidemiology of human *sporotrichosis* investigated by amplified fragment length polymorphism. **J. Clin. Microbiol**, v. 43, p. 1348-1352, 2005.

NOBRE, M. O.; CASTRO, A. P.; CAETANO, D.; SOUZA, L. L.; MEIRELES, M. C. A.; FERREIRO, L. Recurrence of *sporotrichosis* in cats with zoonotic involvement. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 18, p. 137-140, 2001.

NOBRE, M. O.; MEIRELES, M. C.; CAETANO, D. T.; FAÉ, F.; CORDERO, M.; MEIRELES, R. M.; APPELT, C.; FERREIRO, L. Esporotricose zoonótica na região sul do Rio Grande do Sul (Brasil) e revisão da literatura brasileira, **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, v. 9, n. 1, p. 36-41, 2002.

NOBRE, M. O.; ANTUNES, T. A.; FARIA, R. O.; CLEFF, M. B.; FERNANDES, C. G.; MUSCHNER, A. C.; MEIRELES, M. C. A.; FERREIRO, L. Differences in virulence between isolates of feline *sporotrichosis*. **Mycopathologia**, v. 160, n. 1, p. 43-49, 2005.

NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A. The contribution of melanin to microbial pathogenesis. **Cell Microbiology**, v. 5, p. 203-223, 2003.

NOVACOSK, R.; TORRES, R. S. A. Atividade antimicrobiana sinérgica entre óleos essenciais de lavanda (*Lavandula officinalis*), melaleuca (*Melaleuca alternifolia*), cedro (*Juniperus irginiana*), tomilho (*Thymus vulgaris*) e cravo (*Eugenia caryophyllata*). **Revista Analytica**, v. 21, p. 36-39, 2006.

NUMPAQUE, M. A.; OVIEDO, L. A.; GIL, J. H.; GARCIA, C. M.; DURANGO, D. L. Thymol and carvacrol: biotransformation and antifungal activity against the plant pathogenic fungi *Colletotrichum acutatum* and *Botryodiplodia theobromae*. **Tropical Plant Pathology**, v. 36, n. 1, p. 3-13, 2011.

OLIVEIRA, D. C.; LOPES, P.G.; SPADER, T. B., et al. Antifungal susceptibilities of *Sporothrix albicans*, *S. brasiliensis*, and *S. luriei* of the *S. schenckii* complex identified in Brazil. **J Clin Microbiol.**, v. 49, p. 3047–3049, 2011.

OLIVEIRA, J. C. **Tópicos em micologia médica**. 4ª edição. Rio de Janeiro, 2014.

ÖZCAN, M.; CHALCHAT, J. Aroma profile of *Thymus vulgaris* L. growing wild in Turkey. **Bulg. J. Plant Physiol.**, v. 30, n. 3-4, p. 68-73, 2004.

ÖZKAN, A. M. G.; GÜRAY, C. G. A Mediterranean: *Myrtus communis* L. (Myrtle). **Plants and Culture: seeds of the cultural heritage of Europe**, p. 159-168, 2009.

PADHYE, A. A.; KAUFMAN, L.; DURRY, E., et al. Fatal pulmonary *sporotrichosis* caused by *Sporothrix schenckii* var. *luriei* in India. **J Clin Microbiol.**, v. 30, p.2492–2494, 1992.

PAPPAS, P. G.; TELLEZ, I.; DEEP, A. E., et al. *Sporotrichosis* in Peru: description of an area of hyperendemicity. **Clin Infect Dis**, v. 30, p. 65–70, 2000.

PAULA, J. A. M.; REIS, J. B.; FERREIRA, L. H. M.; MENEZES, A. C. S.; PAULA, J. R. Gênero *Pimenta*: aspectos botânicos, composição química e potencial farmacológico. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 3, p. 363-379, 2010.

PEREIRA, R. S.; SUMITA, T. C.; FURLAN, M. R.; JORGE, A. O. C.; UENO, M. Atividade antibacteriana de óleos essenciais em cepas isoladas de infecção urinária. **Rev. Saúde Pública**, v. 38, n. 2, p. 326-328, 2004.

PEREIRA, S. A.; SCHUBACH, T. M. P.; GREMIÃO, I. D. F.; DA SILVA, D. T.; FIGUEIREDO, F. B.; DE ASSIS, N. V.; PASSOS, S. R. L. Aspectos terapêuticos da esporotricose felina. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 37, n. 4, p. 311-321, 2009.

PEREIRA, S. A.; MENEZES, R. C.; GREMIÃO, I. D. F.; JÉSSICA, N. S.; HONSE, C. O.; FIGUEIREDO, F. B., SILVA, D. T.; KITADA, A. A. B.; REIS, E. G.; SCHUBACH, T. M. P. Sensitivity of cytopathological examination in the diagnosis of feline *sporotrichosis*. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 13, n. 220, 2011.

PORTE, A.; GODOY, R. L. O. Alecrim (*Rosmarinus Officinalis* L.): Propriedades Antimicrobiana e Química do Óleo Essencial. **Boletim CEPPA**, V. 19, n. 2, p. 193-210, 2001.

POZZATTI, P; LORETO, E.S; LOPES, P.G.M. Comparison of the susceptibilities of clinical isolates of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to essential oils. **Mycoses**, v.53, p.12-15, 2010.

PREVIATO, J. O.; GORIN, P. A. J.; HASKINS, R. H.; TRAVASSOS, L. R. Soluble and insoluble glucans from different cell types of *Sporothrix schenckii*. **Experimental Mycology**, v. 3, p. 92-105, 1979.

RAMOS-E-SILVA, M.; VASCONCELOS, C.; CARNEIRO, S.; CESTARI, T. *Sporotrichosis*. **Clinics in Dermatology**, v. 25, n. 2, p. 181- 187, 2007.

RANDRIANARIVELO, R.; SARTER, S.; ODOUX, E.; BRAT, P.; LEBRUN, M.; ROMESTAND, B.; MENUT, C.; ADRIANOELISO, H. S. RAHERIMANDIMBY, M.; DANTHU, P. Composition and antimicrobial activity of essential oils of *Cinnamosma fragrans*. **Food Chem**, v.114, p. 680–684, 2009.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. **Rang & Dale Pharmacology** (6th ed.). Fármacos antifúngicos. Churchill livingstone: Elsevier, 2007.

RASOOLI, I.; MOOSAVI, M. L.; REZAEI, M. E.; JAIMAND, K. Susceptibility of microorganisms to *Myrtus communis* L. essential oil and its chemical composition. **J. Agric. Sci. Technol**, v. 4, p. 127-133, 2002.

RASOOLI, I.; ABYANEH, M. R. Inhibition effects of Thyme oils on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. **Food Control**, v. 15, n. 6, p. 479-483, 2004.

RASOOLI, I.; REZAEI, M. B.; ALLAMEH, A. Growth inhibition and morphological alterations of *Aspergillus niger* by essential oils from *Thymus eriocalyx* and *Thymus x-porlock*. **Food Control**, v. 17, p. 359-364, 2006.

RIPPON, J. *Sporotrichosis*. **J Vet Inter Med.**, v. 7, p. 44-5, 1988.

RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. Plantas medicinais no domínio dos cerrados. **Lavras: UFLA**, v. 180, 2001.

RODRIGUES, A. M.; TEIXEIRAM. M.; HOOG, G. S.; SCHUBACH, T. M. P.; PEREIRA S. A.; FERNANDES, G. F.; BEZERRA, L. M. L.; FELIPE, M. S.; CAMARGO, Z. P. Phylogenetic analysis reveals a high prevalence of *Sporothrix brasiliensis* in feline sporotrichosis outbreaks. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 6, p. 1-14, 2013.

RODRIGUES, A. M.; HOOG, G. S.; CAMARGO, Z. C. Emergence of pathogenicity in the *Sporothrix schenckii* complex. **Medical Mycology**, v. 51, p. 405-412, 2013.

RODRIGUES, A. M.; BAGAGLI, E.; CAMARGO, Z. P.; BOSCO, S. M.; G. *Sporothrix schenckii sensu stricto* isolated from soil in an armadillo's burrow. **Mycopathologia**, v. 177, p. 199–206, 2014a.

RODRIGUES, A. M.; DE HOOG, G. S.; PIRES, D. C.; BRILHANTE, R. S. N.; SIDRIM, J. J. C.; GADELHA, M. F.; COLOMBO, A. L.; CAMARGO, Z. P. Genetic diversity and antifungal susceptibility profiles in causative agents of *sporotrichosis*. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, p. 219, 2014b.

ROMANI, L.; FRANCESCO, B.; PUCETTI, P. Fungi, dendritic cells and receptors: a host perspective of fungal virulence. **Trends in Microbiology**, v.10, p.508-514, 2002

ROMERO, A.L.; SPECIAN, V.; OLIVEIRA, R.C.; DINIZ, S.S.S. Atividade do óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) contra fungos fitopatogênicos. **UNOPAR Cient. Ciênc. Biol. Saúde**, v. 11, p. 15-8, 2009.

ROMERO-MARTINEZ, R., WHEELER, M., GUERRERO-PLATA, A., RICO, G. & TORRES-GUERRERO, H. Biosynthesis and functions of melanin in *Sporothrix schenckii*. **Infection and Immunity**. 68(6): 3696-3703, 2000.

ROSSI, C. N. ; ODAGUIRI, J. ; LARSSON, C. E. Clinical and epidemiological characterization of sporotrichosis in dogs and cats (São Paulo, Brazil). **Ciências Agrárias**, 34 (6): 3889-3896, 2013.

RUIZ-BACA, E., et al. 2009. Isolation and some properties of a glycoprotein of 70 kDa (Gp70) from the cell wall of *Sporothrix schenckii* involved in fungal adherence to dermal extracellular matrix. **Med. Mycol.** 47:185–196.

SALVAGNINI, L.E., OLIVEIRA, J.R.S., DOS SANTOS, L.E., MOREIRA, R.R.D. AND PIETRO, R.C.L.R. Evaluation of the antibacterial activity of *Myrtus communis* L. (Myrtaceae) leaves. *Rev. Bras. Farmacogn.*, v. 18, p. 241-244, 2008.

SAMY, J.; SUGUMARAM, M.; LEE, K. **Herbs of Malaysia**. Ed. K.M. Wong, Pub. Times Editions - Marshall Cavendish, 2005.

SANTOS, A. O.; UEDA-NAKAMURA, T.; FILHO, B. P. D.; JUNIOR, V. F. V.; PINTO, A. C.; NAKAMURA, C. V. Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. **Mem Inst Oswaldo Cruz**,v. 103, n. 3, p. 277-281, 2008

SANTOS, L. P. B. **Avaliação de compostos com potencial antifúngico em *Sporothrix schenckii* e *Sporothrix brasiliensis***. 2012. 141f. Dissertação de Mestrado [(ProGrampa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Biofísica)]. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

SANTOS, F. A.; RAO, V. S. N. Antiinflammatory and antinociceptive effects of 1,8-cineole a terpenoid oxide presente in many plant essential oils. **Phytotherapy Research**, v. 14, p. 240-244, 2000.

SASAKI, A. A.; FERNANDES, G. F.; RODRIGUES, A. M.; LIMA, F. M.; MARINI, M. M.; FEITOSA, L. S.; TEIXEIRA, M. M.; FELIPE, M. S. S.; SILVEIRA, J. F.; CAMARGO, Z. P. Chromosomal Polymorphism in the *Sporothrix schenckii* Complex. **PLOS ONE**, v. 9, n. 1, 2014.

SCHUBACH, T. M.; SCHUBACH, A. O. Esporotricose em cães e gatos-revisão. **Rev Clín Vet.** v. 29, n. 5, p. 21-24, 2000.

SCHUBACH, T.; VALLE, A.; GUTIERREZ-GALHARDO, M.; MONTEIRO, P.; REIS, R.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R.; MARZOCHI, K.; SCHUBACH, A. Isolation of *Sporothrix schenckii* from the nails of domestic cats (*Felis catus*). **Medical Mycology**, v. 39, p. 147-149, 2001.

SCHUBACH, T. M. P.; SCHUBACH, A. O.; REIS, R. S.; CUZZIMAYA, T.; BLANCO, T.C.; MONTEIRO, D. F.; BARROS, B. M.; BRUSTEIN, R.; ZANCOPE-LOIVEIRA, R. M.; MONTEIRO, F. P. C.; WANKE, B. *Sporothrix schenckii* isolated from domestic cats with and without sporotrichosis in Rio de Janeiro. **Mycopathologia**, v. 153, n. 2, p. 83-86, 2002.

SCHUBACH, T. M. P., SCHUBACH, A. O., CUZZI-MAYA, T.; OKAMOTO, T.; REIS, R. S.; MONTEIRO, P. C. F.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; WANKE, B. Pathology of sporotrichosis in 10 cats in Rio de Janeiro. **Vet Rec**, v. 152, n. 6, p. 172-175, 2003.

SCHUBACH, T. M.; SCHUBACH, A.; OKAMOTO, T.; BARROS, M. B.; FIGUEIREDO, F. B.; CUZZI, T.; FIALHO-MONTEIRO, P. C.; REIS, R. S.; PEREZ, M. A.; WANKE, B. Evaluation of an epidemic of sporotrichosis in cats: 347 cases (1998–2001). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 224, n. 10, p. 1623–1629, 2004.

SCHUBACH, A.; SCHUBACH, T. M. P.; BARROS, M. B. L.; WANKE, B. Cat-transmitted sporotrichosis, Rio de Janeiro, Brazil. **Emerg Infect Dis**, v. 11, n. 2, p. 1952-1954, 2005.

SCHUBACH, T. M.; SCHUBACH, A. O.; OKAMOTO, T.; BARROS, M. B.; FIGUEIREDO, F. B.; CUZZI, T.; PEREIRA, S. A.; DOS SANTOS, I. B.; ALMEIDA-PAES, R. D.; LEME, L. R. P.; WANKE, B. Canine sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: clinical presentation, laboratory diagnosis and therapeutic response in 44 cases (1998-2003). **Medical Mycology**, v. 44, n. 1, p. 87-92, 2006.

SCHUBACH, A.; BARROS, M. B.; WANKE, B. Epidemic sporotrichosis. **Curr Opin Infect Dis**, v. 21, n. 2, p. 129-133, 2008.

SEGVIC KLARIC M, KOSALEC I, MASTELIC J, PIECKOVA E, PEPELJNAK S Antifungal activity of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil and thymol against moulds from damp dwellings. **Lett. Appl. Microbiol.** v. 44, n. 1, p. 36-42, 2007.

SEIXAS, P.T.L; CASTRO, H.C; SANTOS, G.R; CARDOSO, D.P. Controle fitopatológico do *Fusarium subglutinans* pelo óleo essencial do capim-citronela (*Cymbopogon nardus* L.) e do composto citronelal. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais.** v.13, p.513-517, 2011.

SERCE S, ERCISLI S, SENGUL M, GUNDUZ K, ORHAN E. Antioxidant activities and fatty acid composition of wild grown myrtle (*Myrtus communis* L.) fruits. **Pharmacogn Mag**, v. 6, p. 9-12, 2010.

SHABNUM, S.; WAGAY, M. G. Essential oil composition of *Thymus vulgaris* L. and their uses. **J Res Dev**, v. 11, p. 83–94, 2011.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G.; **Micologia médica à luz de autores contemporâneos.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 17: 177-188, 2010.

SILVA, D. T.; MENEZES, R. C.; GREMIÃO, I. D. F.; SCHUBACH, T. M. P.; BOECHAT, J. S.; PEREIRA, S. A. Esporotricose zoonótica: procedimentos de biossegurança. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 40, n. 4, p. 1067, 2012.

SILVEIRA, C.P.; JOSEP M. TORRES-RODRIGUEZ, J.M.; ALVARADO-RAMÍREZ, E.; GONZALO, F.M. MICs and minimum fungicidal concentrations of amphotericin B, itraconazole, posaconazole and terbinafine in *Sporothrix schenckii*. **Journal of Medical Microbiology**. v. 58, p. 1607–1610, 2009.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre, RS: Ed. Da UFSC, 2004.

SGARBI, D. B., ET AL. Isolation of ergosterol peroxide and its reversion to ergosterol in the pathogenic fungus *Sporothrix schenckii*. **Mycopathologia** v. 139, p. 9–14, 1997.

SMITH, M. Th.; BATENBURG-VAN DER VEGTE, W. H. Ultrastructure of septa in *Blastobotrys* and *Sporothrix*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 51, p. 121-128, 1985.

SOKOVIÆ, M. D.; VUKOJEVIÆ, J.; MARIN, P. D.; BRKIÆ, D.; VAJS, V.; VAN GRIENSVEN, L. J. L. D. Chemical composition of essential oils of thymus and mentha species and their antifungal activities. **Molecules**, v. 14, p. 238-249, 2009.

SONG Y, YAO L, ZHONG SX et al. Infant sporotrichosis in northeast China: a report of 15 cases. **Int J Dermatol** 2011; 50:522–529.

STALKUP, J. R.; BELL, K.; ROSEN, T. Disseminated cutaneous sporotrichosis treated with itraconazole. **Cutis**. v. 69, n. 5, p. 371–374, 2002.

STOPIGLIA, C.D.O.; MAGAGNIN, C.M.; CASTRILLÓN, M.R.; MENDES, S.D.C.; HEIDRICH, D.; VALENTE, P.; SCROFERNEKER, M.L. Antifungal susceptibilities and identification of species of the *Sporothrix schenckii* complex isolated in Brazil. **Med. Mycol.**, v.52, p.56-64, 2014.

SUMBUL, S.; AHMAD, M. A.; ASIF, M.; AKHTAR, M. *Myrtus communis* Linn. – A review. **Indian Journal of Natural Products and Resources**, v. 2, n. 4, p. 395-402, 2011.

SUMMERBELL, R. Ascomycetes: Aspergillus, Fusarium, Sporothrix, Piedraia, and their relatives. In: HOWARD, D. H. (Ed.) **Pathogenic Fungi in Humans and Animals**. 2 Ed. Marcel Dekker, New York, 2002.

TABOADA, J. Micoses sistêmicas. In: ETTINGER, S. J., FELDMAN, E. C. Ed. **Tratado de medicina interna veterinária: doenças do cão e do gato**. 5ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 478-503.

TACHIBANA, T.; MATSUYAMA, T.; MITSUYAMA, M. Involvement of CD4+ T cells and macrophages in acquired protection against infection with *Sporothrix schenckii* in mice. **Medical Mycology**, v.37, p.397-404, 1999.

TAGAMI, O. K.; GASPAR, M. D. G.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; CRUZ, M. E. S.; ITAKO, A. T.; JÚNIOR, J. B. T.; MORAES, L. M.; STANGARLIN, J. R. Fungitoxidade de *Bidens pilosa*, *Thymus vulgaris*, *Lippia alba* e *Rosmarinus officinalis* no desenvolvimento in vitro de fungos fitopatogênicos. **Ciências Agrárias**, v. 30, n. 2, p. 285-294, 2009.

TEIXEIRA, P. A.; CASTRO, R. A.; NASCIMESNTO, R. C.; TRONCHIN, G.; TORRES, A. P.; LAZÉRA, M.; ALMEIDA, S. R.; BOUCHARA, J. P; LOUREIRO, C. V.; PENHA, C. V. ; LOPES-BEZERRA, L. M. Cell surface expression of adhesins for fibronectin correlates with virulence in *Sporothrix schenckii*. **Microbiology** , v. 155, n. (Pt 11), p. 3730– 3738, 2009.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10 ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

TSOUKATOU, M.; TSITSIMPIKOU, C.; VAGIAS, C.; ROUSSIS, V. Chemical intra-Mediterranean variation and insecticidal activity of *Crithmum maritimum*. **Z Naturforsch C.**, v, 56, n. 3-4, p. 211-215, 2001.

VILELA, G. R.; ALMEIDA, G. S.; D'ARCE, M. A. B. R.; MORAES, M. H. D.; BRITO, J. O.; SILVA, M. F. G. F.; SILVA, S. C.; PIEDADE, S. M. S.; GLORIA, E. M. Activity of essential oil and its major compound, 1,8-cineole, from *Eucalyptus globulus* Labill., against the storage fungi *Aspergillus flavus* Link and *Aspergillus parasiticus* Speare. **Journal of Stored Products Research**, v. 45, n. 2, p. 108-111, 2009.

VISMER, H. F.; HULL, P. R. Prevalence, epidemiology and geographical distribution of *Sporothrix schenckii* infections in Gauteng, South Africa. **Mycopathologia**, v. 137, p. 143, 1997.

VIUDA-MARTOS, M.; RUIZ-NAVAJAS, Y.; FÉRNANDEZ-LÓPEZ, J.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J. A. Antibacterial activity of different essential oils obtained from spices widely used in Mediterranean diet. **Int. J. Food Sci. Technol**, v.43, p.526–531, 2008.

WALLER, D. B.; MADRID, I. M.; CLEFF, M. B.; SANTIN, R.; FREITAG, R. A.; MEIRELES, M. C. A.; MELLO, J. R. B. Effects of essential oils of *Rosmarinus officinalis* Linn. and *Origanum vulgare* Linn. from different origins on *Sporothrix brasiliensis* and *Sporothrix schenckii* complex. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 68, n. 4, p. 991-999, 2016a.

WALLER, D. B.; MADRID, I. M.; FARIA, R. O.; CLEFF, M. B.; MELLO, J. R. B.; MEIRELES, M. C. A. Anti-*Sporothrix* spp. activity of medicinal plants. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences** v. 52, n. 2, p. 221-238, 2016b.

WELSH. R.D. Sporotrichosis. **J Am Vet Med Assoc**, v. 223, n. 8, p. 1123-1126, 2003.

YADEGARINIA, D.; GACHKAR, L., REZAEI, M. B., TAGHIZADEH, M., ASTANEH, S.A.; RASOOLI, I. Biochemical activities of Iranian *Mentha piperita* L. and *Myrtus communis* L. essential oils. **Phytochemistry**, v. 67, n. 12, p. 1249-1255, 2006.

YOSHIKE, T.; PENG-CHENG, L.; KOMATSUZAKI, H.; OGAWA, H. Antibody raised against extracellular proteinases of *Sporothrix schenckii* inoculated hairless mice. **Mycopathologia**, v.123, p. 69-73, 1993.

YOSHIMURA, M.; AMAKURA, Y.; TOKUHARA, M.; YOSHIDA T. Polyphenolic compounds isolated from the leaves of *Myrtus communis*. **J NAT MED**, v. 62, n. 3, p. 366-368, 2008.

YU, X.; WAN, Z.; ZHANG, Z.; LI, F.; LI, R.; LIU, X. Phenotypic and molecular identification of *Sporothrix* isolates of clinical origin in Northeast China. **Mycopathologia** v. 176, n. 1-2, p. 67–74, 2013.

ZAITZ, C.; CAMPBELL, I.; MARQUES, S.A.; RUIZ, L.R.B.; FRAMIL, V.M.S. **Compêndio de Micologia Médica**. 2ª Ed.. Rio de Janeiro: Editora Guanabara – Koogan, 2010.

ZANETTI, S.; CANNAS, S.; MOLICOTTI, P.; BUA, A.; CUBEDDU, M.; PORCEDDA, S.; MARONGIU, B.; SECHI, L. A. Evaluation of the antimicrobial properties of the essential oil of *Myrtus communis* L. against clinical strains of *Mycobacterium* spp. **Interdisc Perspect Infect**, v. 2010, Article ID 931530, 3 pages, 2010. doi:10.1155/2010/931530.

ZOMORODIAN, K.; MOEIN, M.; LORI, Z. G.; GHASEMI, Y.; RAHIMI, M. J.; BANDEGANI, A.; PAKSHIR, K.; BAZARGANI, A.; MIRZAMOHAMMADI, S.; ABBASI, N. Chemical composition and antimicrobial activities of the essential oil from *myrtus communis* leaves. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 16, n. 1, p. 76-84, 2013.

ZU, Y.; YU, H.; LIANG, L.; FU, Y.; EFFERTG, T.; LIU, X.; WU, N. Activities of ten essential oils towards *Propionibacterium acnes* and PC-3, A-549 and MCF-7 cancer cells. **Molecules**, v. 15, n. 5, p. 3200-3210, 2010.



Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Exatas
Departamento de Química / Colegiado de Extensão
Telefax : (31) 3409-5724 – e-mail: núcleo@qui.ufmg.br

UFMG

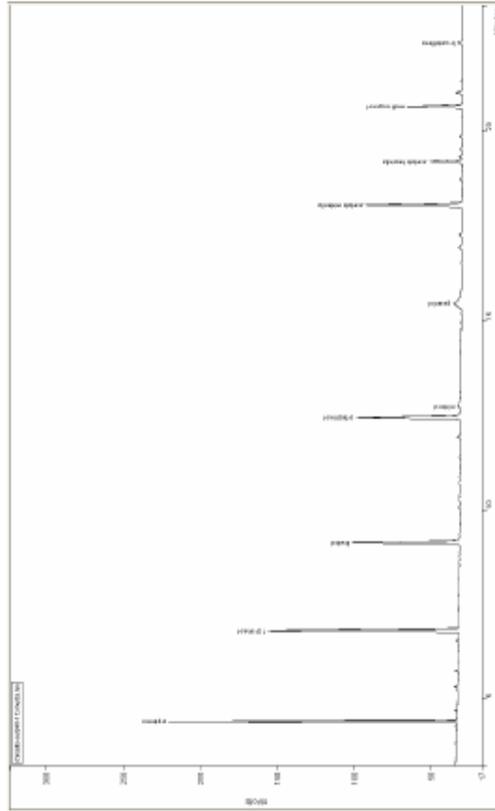
CERTIFICADO DE ANÁLISE QUÍMICA

Solicitante: Nádia Raposo

ÓLEO ESSENCIAL DE MURTA

Nome comercial: óleo de murta
Nomenclatura botânica: myrtus communis
Lote: MURTACINDS
Extração: destilação por arraste a vapor
Parte da planta: folhas

Composição Química:		
Pico	Constituinte ID	%
1	α -pineno	18,3
2	1,8-cineol	24,2
3	linalool	11,5
4	α -terpineol	13,2
5	mirtenol	1,0
6	geraniol	2,8
7	acetato mirtenila	12,1
8	acetato terpinila	4,0
9	metil eugenol	7,0
10	β -cariofileno	0,7



Vany Ferraz
Dra. Vany Ferraz
Laboratório de Cromatografia
Departamento de Química – UFMG
vanyferraz@ufmg.br
Belo Horizonte, 12/04/2011

Obs: Picos menores que 0,1% foram excluídos

Método de análise:
Cromatografia Gasosa de Alta Resolução. Cromatógrafo a Gás HP 5890.
Coluna: BP1 30m x 0,25mm (HP). Temp.: Coluna: 80°C (1min), 3°C/min, até 220°C. Injetor: 220°C
Split: 1/50. Detetador FID: 220°C. Volume de injeção: 1 μ l (conc 0,5 % em clorofórmio)

Av. Antônio Carlos, 6627 – Campus – Pampulha – Belo Horizonte/MG-Brasil - Cep: 31.270-901



Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Exatas
Departamento de Química / Colégio de Extensão
Telefax : (31) 3409-5724 – e-mail: nucleo@qui.ufmg.br

UFMG

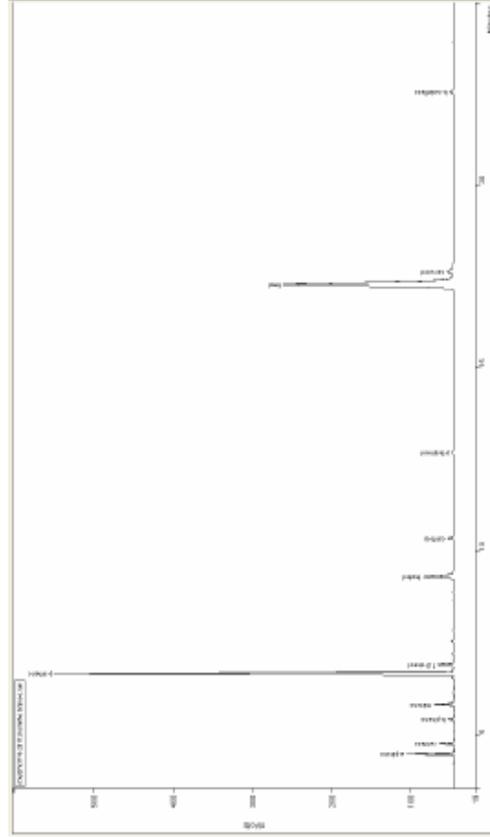
CERTIFICADO DE ANÁLISE QUÍMICA

Solicitante: Profa. Dra. Nádia Rezende Barbosa Raposo – Universidade Federal de Juiz de Fora

Composição Química:

ÓLEO ESSENCIAL DE TOMILHO BRANCO

Nome comercial: óleo de tomilho branco
Nomenclatura botânica: thymus vulgaris
Lote: THYVUL 20014
Extração: destilação por arraste a vapor
Parte da planta: erva



Vany Ferraz
Dra. Vany Ferraz
Laboratório de Cromatografia
Departamento de Química – UFMG
vanyferraz@ufmg.br
Belo Horizonte, 23/08/2011

Método de análise:
Cromatografia Gasosa de Alta Resolução. Cromatógrafo a Gás HP 5890.
Coluna: BP1, 30m x 0,25mm (HP). Temp.: Coluna: 60°C (1min), 3°C/min, até 220°C. Injetor: 220°C
Split: 1:50. Detector FID: 220°C. Volume de injeção: 1 ul (conc 0,5 % em clorofórmio)

Obs: Picos menores que 0,1% foram excluídos

Pico	Constituinte ID	%
1	α -pineno	3,0
2	canfeno	1,0
3	β -pineno	0,5
4	mirceno	1,6
5	p-cimeno	37,2
6	1,8-cineol	2,2
7	linalool	4,7
8	canfora	0,6
9	α -terpineol	0,3
10	timol	45,6
11	carvacrol	2,1
12	β -cariofileno	0,6

Av. Antônio Carlos, 6627 – Campus – Pampulha – Belo Horizonte/MG-Brasil - Cep: 31.270-901