

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Camila Soares Furtado Couto

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Baccharis trimera* Less (D.C.) E DE *Origanum vulgare* Linnaeus FRENTE ÀS LINHAGENS CAUSADORAS DE ESPOROTRICOSE

Juiz de Fora

2014

CAMILA SOARES FURTADO COUTO

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Baccharis trimera* Less (D.C.) E DE *Origanum vulgare* Linnaeus FRENTE ÀS LINHAGENS CAUSADORAS DE ESPOROTRICOSE

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração em Produtos Naturais Bioativos, da Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof Dr Marcos Antônio Fernandes Brandão
Co-orientadora: Prof^a Dr^a Nádia Rezende Barbosa Raposo

JUIZ DE FORA

2014

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Couto, Camila Soares Furtado.

Atividade antifúngica dos óleos essenciais de *Baccharis trimera* Less (D.C.) e de *Origanum vulgare* Linnaeus frente às linhagens causadoras de esporotricose / Camila Soares Furtado Couto. -- 2014.

71 p. : il.

Orientador: Marcos Antônio Fernandes Brandão

Coorientadora: Nádia Rezende Barbosa Raposo

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2014.

1. Esporotricose. 2. *Origanum vulgare*. 3. *Baccharis trimera*. 4. Atividade Antifúngica. 5. Produtos Naturais. I. Brandão, Marcos Antônio Fernandes , orient. II. Raposo, Nádia Rezende Barbosa , coorient. III. Título.

CAMILA SOARES FURTADO COUTO

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Baccharis trimera*
Less (D.C.) E DE *Origanum vulgare* Linnaeus FRENTE ÀS LINHAGENS
CAUSADORAS DE ESPOROTRICOSE**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração em Produtos Naturais Bioativos, da Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora para obtenção do título de Mestre.

Aprovado em

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Elizabeth Lemos Chicourel
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof^a Dr^a Rita de Cássia Padula Alves Vieira
Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde de Juiz de Fora

Prof Dr Marcos Antônio Fernandes Brandão
Universidade Federal de Juiz de Fora

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, pela vida, por me guiar e colocar em meu caminho as pessoas e oportunidades certas.

Aos meus pais, Danilo e Érika por serem meus exemplos e pelo incentivo, orgulho, ajuda e imenso amor.

Aos meus irmãos, Danilinho e Bárbara, pelo carinho e amizade.

Ao Marcelo, pelo amor, compreensão e companheirismo.

Aos meus avós pelo exemplo e orgulho que sentem de mim.

Aos amigos do NIQUA, pela ajuda na execução deste trabalho, principalmente ao César, Érika, Francislene, Edilene, Natalia, Annelisa e Fernanda, pelos ensinamentos e experiência em microbiologia.

Aos amigos de mestrado, pelo companheirismo.

Às pesquisadoras Sandra Bosco (UNESP) e Leila Lopes Bezerra (UERJ) por terem cedido as linhagens fúngicas.

Agradeço e dedico este trabalho ao meu orientador Marcos Antônio Fernandes Brandão e à minha co-orientadora Nádia Rezende Barbosa Raposo, por seus ensinamentos, confiança, oportunidade e ajuda na pesquisa e no meu crescimento profissional.

À CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

A esporotricose é uma importante micose subcutânea, que pode afetar seres humanos e animais, cujo principal agente etiológico é o *Sporothrix schenckii*. O tratamento de micoses vem sendo motivo de preocupação, devido à ocorrência de recidivas e surgimento de linhagens resistentes aos antifúngicos convencionais (sintéticos). Desta forma, há uma crescente busca por novos fármacos de origem sintética ou oriundo de fontes naturais eficazes e com novos mecanismos de ação. O objetivo deste trabalho foi identificar os componentes dos óleos essenciais de *Baccharis trimera* e *Origanum vulgare* por meio da cromatografia gasosa, investigar seus potenciais antifúngicos *in vitro* frente a quatro linhagens de *Sporothrix schenckii* e duas de *S. brasiliensis*. A anfotericina B e o cetoconazol foram utilizados como fármacos de referência. Os ensaios antifúngicos foram realizados por meio da triagem microbiológica e estabelecidas as concentrações inibitórias mínimas (CIM) e fungicidas mínimas (CFM) para as substâncias de interesse. A análise cromatográfica do óleo essencial de *B. trimera* demonstrou que o β -pineno (23,4%) foi o componente majoritário e no óleo de *O. vulgare* foi o γ -terpineno (30,5%) . Os valores de CIM e de CFM para o óleo de *B. trimera* e *O. vulgare* foram, respectivamente, 125 $\mu\text{g/mL}$ e 62,5 $\mu\text{g/mL}$ para a linhagem A; 500 $\mu\text{g/mL}$ e 62,5 $\mu\text{g/mL}$ para a linhagem B; 125 $\mu\text{g/mL}$ e 125 $\mu\text{g/mL}$ para o isolado *S. schenckii* ATCC 1099-18; 32,25 $\mu\text{g/mL}$ e 125 $\mu\text{g/mL}$ para o *S. brasiliensis* ATCC 5110; 62,5 $\mu\text{g/mL}$ e 250 $\mu\text{g/mL}$ para *S. brasiliensis* IPEC 17943 e 125 $\mu\text{g/mL}$ e 500 $\mu\text{g/mL}$ para o *S. schenckii* IPEC 15383. A ação dos dois óleos essenciais foi caracterizada como fungicida. Através das imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV), pode ser observado que os óleos essenciais provocam os mesmos tipos de alterações que os fármacos de referência, e em alguns casos em maior intensidade. Os resultados obtidos até o momento revelaram-se promissores e estimulam a continuidade da pesquisa.

Palavras-chave: Esporotricose. *Origanum vulgare*. *Baccharis trimera*. Atividade antifúngica. Produtos Naturais.

ABSTRACT

Sporotrichosis is an important subcutaneous mycosis, that can affect humans and animals, which is the main etiological agent *Sporothrix schenckii*. The treatment of fungal infections has been of concern due to the occurrence of relapses and the emergence of strains resistant to conventional antifungal drugs (synthetic). Thus, there is a growing search for new and effective natural products with novel mechanisms of action. The objective was to identify the components of the essential oils of *Origanum vulgare* and *Baccharis trimera* and investigate their potential antifungal in vitro against four strains of *S. schenckii* and two of *S. brasiliensis*. Amphotericin B and ketoconazole were used as reference drugs. Antifungal assays were performed by means of microbiological screening and established the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) for the substances of interest. The chromatographic analysis of the essential oil of *B. trimera* demonstrated that β - pinene (23.4%) was the major component and in *O. vulgare* oil was the γ - terpinene (30.5%) . The MIC and MFC values for oil *B. trimera* and *O. vulgare* were, respectively, 125 $\mu\text{g/mL}$ and 62.5 $\mu\text{g/mL}$ for strain A; 500 $\mu\text{g/mL}$ and 62.5 $\mu\text{g/mL}$ for strain B; 125 $\mu\text{g/mL}$ e 125 $\mu\text{g/mL}$ for *S. schenckii* ATCC 1099-18; 32.25 $\mu\text{g/mL}$ and 125 $\mu\text{g/mL}$ for strain *S. brasiliensis* ATCC 5110; 62.5 $\mu\text{g/mL}$ and 250 $\mu\text{g/mL}$ for *S. brasiliensis* IPEC 17943; 125 $\mu\text{g/mL}$ and 500 $\mu\text{g/mL}$ for *S. schenckii* IPEC 15383. The action of the essential oil was characterized as a fungicide. Through the images of scanning electron microscopy may be noted that the essential oils cause the same kinds of changes that reference drugs, and in some cases greater intensity. The results obtained so far have shown promise and stimulate continuing research.

Key words: Sporotrichosis. *Origanum vulgare*. *Baccharis trimera*. Antifungal activity.
Natural products.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1:	Fotos de esporotricose humana	18
Figura 2:	Fotos de esporotricose felina	20
Figura 3:	Colônias do <i>Sporothrix schenckii</i>	21
Figura 4:	Micromorfologia <i>Sporothrix Schenckii</i>	22
Figura 5:	Mecanismo de ação dos azóis inibindo a síntese de ergosterol	24
Figura 6:	Foto de <i>Baccharis trimera</i>	29
Figura 7:	Principais constituintes do óleo essencial de carqueja	30
Figura 8:	Foto de <i>Origanum vulgare</i>	31
Figura 9:	Principais constituintes do óleo essencial de orégano	32
Figura 10:	Imagem da colônia de <i>Sporothrix schenckii</i>	36
Figura 11:	Esquema de microcultivo de lâmina em vidro	37
Figura 12:	Imagem da microcultura de <i>Sporothrix schenckii</i>	37
Figura 13:	Perfil cromatográfico do óleo essencial de <i>Baccharis trimera</i>	44
Figura 14:	Perfil cromatográfico do óleo essencial de <i>Origanum vulgare</i>	46
Figura 15:	Triagem microbiológica do fungo <i>Sporotrix schenckii</i>	48
Figura 16:	Imagens de microscopia eletrônica de varredura em filamentos do fungo <i>S. brasiliensis</i>	51
Figura 17:	Imagens de microscopia eletrônica de varredura em filamentos do fungo <i>S. schenckii</i>	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Soluções empregadas na triagem microbiológica	39
Tabela 2:	Composição das soluções estoque dos óleos essenciais avaliados em associação	41
Tabela 3:	Composição das soluções estoques dos controles	41
Tabela 4:	Controles empregados no preparo da microplaca	42
Tabela 5:	Composição química do óleo essencial de <i>Baccharis trimera</i>	45
Tabela 6:	Composição química do óleo essencial de <i>Origanum vulgare</i>	47
Tabela 7:	Suscetibilidade <i>in vitro</i> dos fungos <i>Sporothrix schenckii</i> e <i>Sporothrix brasiliensis</i> frente ao constituinte majoritário dos óleos essenciais de <i>Baccharis trimera</i> , <i>Origanum vulgare</i> e aos fármacos de referência.	49
Tabela 8:	Susceptibilidade <i>in vitro</i> dos fungos <i>Sporothrix schenckii</i> e <i>Sporothrix brasiliensis</i> frente às associações dos óleos essenciais de <i>Baccharis trimera</i> e <i>Origanum vulgare</i>	49
Tabela 9:	Susceptibilidade <i>in vitro</i> dos fungos <i>Sporothrix schenckii</i> e <i>Sporothrix brasiliensis</i> frente aos óleos essenciais de <i>B. trimera</i> e <i>O. vulgare</i>	50

LISTA DE SIGLAS

ABD	Ágar batata dextrose
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASD	Ágar <i>Sabouraud</i> Dextrose
CD	Controle dos Diluentes
CFM	Concentração fungicida mínima
CIM	Concentração inibitória mínima
CG-AR	Cromatografia gasosa de alta resolução
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FID	Detector de ionização de chama
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
mL	Mililitro
MOPS	3-(N-morfolino) propano sulfônico
Nm	Nanômetro
OH ⁻	Hidroxila
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RPMI	Roswell Park Memorial Institut
SE	Solução Estoque
SIAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SIDA	Síndrome da imunodeficiência adquirida
v/v	Volume/volume
µg	Micrograma
µL	Microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1	MICOSES	14
2.2	ESPOROTRICOSE	14
2.2.1	Complexo <i>Sporothrix schenckii</i>	15
2.2.2	Epidemiologia	16
2.2.3	Aspectos clínicos	17
2.2.4	Esporotricose em animais	19
2.2.5	Diagnóstico laboratorial	20
2.2.6	Agente etiológico	21
2.2.7	Tratamento Farmacológico	22
2.2.7.1	Azóis	23
2.2.7.2	Poliênicos	24
2.2.7.3	Agentes químicos clássicos	25
2.3	PRODUTOS NATURAIS PARA O TRATAMENTO DA ESPOROTRICOSE.....	26
2.3.1	Óleos essenciais	27
2.3.2	<i>Baccharis trimera</i> Less (D.C.)	28
2.3.3	<i>Origanum vulgare</i> Linnaeus	30
3	OBJETIVOS	33
3.1	OBJETIVO GERAL	33
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
4	MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1	ÓLEO ESSENCIAL	34
4.1.1	Cromatografia gasosa de alta resolução (CG-AR)	34
4.2	LINHAGENS FÚNGICAS DE INTERESSE	35
4.2.1	Caracterização macroscópica	35
4.2.2	Caracterização microscópica	36
4.3	ATIVIDADE ANTIFÚNGICA	38
4.3.1	Triagem microbiológica	38
4.3.2	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	39
4.3.2.1	Padronização do inóculo	39

4.3.2.2	Preparo das amostras teste	40
4.3.2.3	Montagem das microplacas	41
4.3.3	Determinação da concentração fungicida mínima (CFM)	42
4.4	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	42
5	RESULTADOS	44
5.1	COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS	44
5.2	ATIVIDADE ANTIFÚNGICA	47
5.3	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	50
6	DISCUSSÃO	53
7	CONCLUSÃO	59
	REFERÊNCIAS	60
	ANEXOS	70

1 INTRODUÇÃO

Fungos são seres dispersos no meio ambiente, em vegetais, ar atmosférico, solo e água e, embora sejam estimados em 250 mil espécies, menos de 150 são descritos como patógenos aos seres. São capazes de colonizar o homem e/ou animais e, frente à perda do equilíbrio parasita-hospedeiro, podem causar diversos quadros infecciosos com formas clínicas localizadas ou disseminadas (BRASIL, 2004).

Entre as infecções fúngicas que acometem o ser humano e os animais, tem-se a esporotricose, micose subcutânea causada principalmente pelo fungo *Sporothrix schenckii*. Até recentemente, essa espécie era considerada a única causadora da esporotricose, porém atualmente, foi descoberto o complexo *Sporothrix schenckii*, composto por quatro espécies do gênero *Sporothrix* distintas: *S. schenckii*, *S. brasiliensis*, *S. globosa* e *S. luriei*. Todas têm sido relatadas no Brasil, no entanto *S. brasiliensis* e *S. schenckii* tem maior prevalência no país e são mais virulentas (RODRIGUES *et al.*, 2013).

O complexo *Sporothrix schenckii* é composto por fungos dimórficos e sapróbios na natureza, os quais crescem em solos e vegetações (SIDRIM; ROCHA, 2004). Podem causar infecções em várias espécies, entre elas: cães, gatos, animais silvestres e o próprio homem. Os gatos, entretanto, são considerados os principais transmissores do fungo (NUNES; ESCOSTEGUY, 2005).

Essa doença está atualmente distribuída por todo o mundo, especialmente em zonas tropicais e subtropicais onde, por causa das condições estruturais e climáticas, tem-se um ambiente propício para o desenvolvimento do micro-organismo, constituindo assim, um problema crítico de saúde pública (BARROS *et al.*, 2010; NEVES *et al.*, 2011). A esporotricose apresenta evolução subaguda ou crônica e costuma afetar a pele e os vasos linfáticos próximos ao local da inoculação, caracterizando-se por lesões nodulares que podem supurar ou ulcerar. A causa mais comum de infecção é por traumas sofridos na pele, por onde o fungo é inoculado ou, muito raramente, por inalação. A transmissão secundária aos ossos, articulações e músculos não é frequente em pacientes com imunidade preservada (BARROS *et al.*, 2010; MUNIZ; PASSOS, 2009).

O tratamento dessas infecções micóticas vem sendo motivo de preocupação devido ao grande número de recidivas e crescente aparecimento de linhagens resistentes aos principais antifúngicos empregados na terapêutica clínica. A partir deste contexto, cresce a procura por fármacos provenientes de fontes naturais com ação antifúngica, principalmente pela sua facilidade de acesso, por serem renováveis e de baixo custo (PEREIRA, 2009; VENTUROSO *et al.*, 2011).

Na última década, esse interesse voltou a crescer, acompanhado de um aumento significativo nos investimentos em pesquisa, já que os produtos naturais continuam sendo umas das maiores fontes para a descoberta de novos fármacos com atividade antimicrobiana e antifúngica. Dentro dessa perspectiva, a pesquisa de plantas medicinais é importante, particularmente no que diz respeito ao desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos e à identificação de novas moléculas ou protótipos básicos para geração de novos medicamentos sintéticos (CASTILHO; MURATA; PARDI, 2007).

Vale ressaltar que substâncias oriundas de produtos naturais e os medicamentos derivados dos mesmos, são usados para tratar 87% das doenças, incluindo aquelas causadas por micro-organismos. Além disso, abrangem 33% de todas as novas entidades químicas lançadas no mercado (SILVA, 2008). O emprego desses produtos no mercado farmacêutico se baseia nos seus efeitos farmacológicos e na grande possibilidade de desenvolvimento de novos fármacos (CANESCHI, 2012).

Nesse sentido, o objetivo do presente trabalho foi investigar o potencial antifúngico do óleo essencial de *Baccharis trimera* Less (D.C.) e *Origanum vulgare* Linnaeus frente às principais linhagens causadoras de esporotricose no Brasil, o *S. schenckii* e o *S. brasiliensis*. Com base em uma revisão bibliográfica, a espécie *B. trimera* foi escolhida pelas suas propriedades anti-inflamatórias e pela ação antifúngica contra dermatófitos já relatada por Caneschi (2012). O óleo essencial de *O. vulgare* foi escolhido por possuir ação antifúngica relatada na literatura, incluindo ação contra os fungos do complexo *S. schenckii*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 MICOSES

De acordo com Machado e colaboradores (2008), as micoses são doenças contagiosas provocadas por diversas espécies de fungos, sendo classificadas de acordo com a sua localização no organismo. Podem ser divididas em micoses superficiais, cutâneas, subcutâneas e profundas. As primeiras se localizam nas camadas superficiais da pele e cabelo, e são responsáveis por processos inflamatórios. As micoses cutâneas, ou dermatomicoses, são infecções que envolvem as camadas mais profundas da epiderme e seus tegumentos, como cabelo e unhas. As subcutâneas atingem os tecidos subcutâneos, músculo e fáscia. Por último, as micoses profundas ou sistêmicas que atingem principalmente órgãos internos e vísceras, podendo afetar múltiplos tecidos ou órgãos (ARENAS; MORENO-COUTIÑO; CRIADO *et al.*, 2011; WELSH, 2012).

As infecções podem ser adquiridas por implantação, inoculação direta, ou inalação de esporos de ambientes contaminados. Em pessoas infectadas, apresentações cutâneas primárias podem ser diagnosticadas como tumores cutâneos, devido à longa duração e à inespecificidade de sintomas apresentados. Além disso, a manifestação destas micoses é dependente de fatores do seu hospedeiro, como estado imunológico (SAMALAIA; ABDULLAHI, 2011).

Os sintomas iniciais que levam à suspeita de uma micose comumente são atípicos, vagos e inespecíficos, diminuindo a chance de se estabelecer um diagnóstico clínico correto. Febre baixa, sudorese noturna, perda de peso, cansaço, fadiga, tosse e dor torácica são sintomas comuns (WINN JÚNIOR *et al.*, 2008).

2.2 ESPOROTRICOSE

Dentre as micoses subcutâneas, a objetivada nesse estudo é a esporotricose. Essa micose pode afetar os seres humanos e outros animais, e tem como agentes etiológicos fungos do complexo *Sporothrix schenckii* (STOPIGLIA *et al.*, 2011). A infecção é usualmente adquirida pela inoculação traumática do fungo através da pele. Nela se inclui um grupo heterogêneo de infecções causadas por fungos que se

desenvolvem no local transcutâneo do trauma. A infecção evolui lentamente à medida que o agente etiológico sobrevive e se adapta ao tecido do hospedeiro (QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2003).

Essa infecção é causada por fungos sapróbios que demonstram dimorfismo térmico, sendo assim chamado dimórficos, com uma fase micelial e outra fase de levedura. No meio ambiente, nas temperaturas que variam de 25 °C a 30 °C, o fungo cresce na forma filamentosa, sendo assim considerado sapróbio. Seu crescimento leveduriforme acontece na forma parasitária, em temperaturas que variam entre 30 °C a 37 °C (BARROS; PAES; SCHUBACH, 2011; VERA-CABRERA *et al.*, 2012).

Os fungos sapróbios são capazes de degradar todo tipo de resto orgânico e causam doença nos seres vivos de forma direta ou indireta pelo contato ou ingestão dos metabólitos produzidos por eles. Os fungos sapróbios dimórficos, como no caso do *S. schenckii* modificam sua morfologia de forma a adaptarem-se ao ciclo de vida parasitária no seu hospedeiro (WANKE; TRILLES; LAZÉRA, 2005).

2.2.1 Complexo *Sporothrix schenckii*

Até recentemente, a *S. schenckii* era considerada a única espécie causadora da esporotricose. Atualmente, foi descoberto o complexo *Sporothrix schenckii*, composto por quatro espécies distintas, sendo elas *S. schenckii*, *S. brasiliensis*, *S. globosa* e *S. luriei* (RODRIGUES *et al.*, 2013). As espécies *S. albicans* e *S. mexicana* também já pertenceram a este complexo, porém deixaram de fazer parte do mesmo, por não apresentarem virulência.

A espécie *S. schenckii* passou a ser considerada como um complexo de espécies crípticas com base nos recentes estudos sobre a genômica e nos conceitos modernos da taxonomia polifásica que inclui, além do sequenciamento de ácido desoxirribonucleico (DNA), informações sobre morfologia, nutrição e fisiologia (CRUZ, 2013). As espécies do complexo são de alto potencial patogênico para mamíferos e diferem entre si em sua virulência, distribuição geográfica e sensibilidade à terapia antifúngica. Todas as espécies têm sido relatadas no Brasil, porém *S. brasiliensis* e *S. schenckii* tem maior prevalência no país e são mais virulentas (RODRIGUES *et al.*, 2013).

Em seu estudo, Arrillaga-Moncrief e colaboradores (2009) compararam a virulência das espécies pertencentes ao complexo *Sporothrix schenckii* por meio da indução da esporotricose em ratos. Verificou-se que a espécie mais virulenta foi a *S. brasilienses*, seguida pela *S. schenckii*. Todos os ratos infectados pelas duas espécies morreram, o que não aconteceu com os animais infectados pelas demais.

No Rio de Janeiro, foram analisadas 246 culturas isoladas no período de 1998 a 2008 e, como resultado, reclassificaram 230 delas como *Sporothrix brasiliensis*, 15 como *S. schenckii* e 1 como *S. globosa*. Além disso, o *S. brasiliensis* foi isolado com elevada frequência em gatos nos estados do Rio Grande do Sul e Rio de Janeiro, sugerindo que este animal poderia ser um importante reservatório na epidemiologia da esporotricose (CRUZ, 2013).

2.2.2 Epidemiologia

A esporotricose é a micose subcutânea mais comum na América Latina, principalmente em países como, México, Peru e Colômbia onde são relatados inúmeros casos e indícios de endemidade. A micose apresenta uma distribuição mundial, especialmente em áreas tropicais e subtropicais (BARROS; PAES; SCHUBACH, 2011; CORDEIRO *et al.*, 2011).

A doença tem sido relatada no Brasil desde 1907, especialmente em São Paulo e Rio Grande do Sul, sendo a região sul do país classificada como endêmica (ROSA *et al.*, 2005; CORDEIRO *et al.*, 2011). Durante a última década ocorreu um significativo aumento dos casos clínicos de esporotricose no Brasil, particularmente no estado do Rio de Janeiro, onde vem se manifestando uma epidemia em seres humanos correlacionada com a transmissão por gatos (CRUZ, 2013). Entre 1998 e 2004, a Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) diagnosticou 1.503 gatos, 64 cachorros e 759 humanos com a doença. Dados mais recentes mostram mais de 2.200 casos de esporotricose humana relatados no Rio de Janeiro, o que indica uma epidemia na cidade (BRAVO, 2012).

Desde 1998, o Serviço de Zoonoses e de Pesquisa de Infecções Dermatológicas do Hospital Evandro Chagas - Fiocruz relatam a ocorrência de epidemia de esporotricose no Rio de Janeiro, na forma de uma zoonose envolvendo gatos, cães e seres humanos (SCHUBACH *et al.*, 2001). No entanto, de acordo com

Queiroz-Telles e colaboradores (2003), não há casos na literatura que relatem a transmissão humano/humano.

A infecção é principalmente observada naqueles indivíduos cuja ocupação ou vocação envolve contato com a vegetação e o solo (QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2003). Estes grupos incluem jardineiros, agricultores florestais, veterinários, trabalhadores ao ar livre, e aqueles envolvidos em outras atividades que exponham o trabalhador a materiais contaminados, como madeiras, estercos, rosas, culturas agrícolas e outra vegetação. Por fazerem parte dos grupos ocupacionais de risco, a infecção é mais comum em homens (LA HOZ; BADDLEY, 2012).

A esporotricose não é uma doença de notificação compulsória na maioria dos países e isso pode explicar o motivo de haver pouca informação sobre a incidência da doença e, conseqüentemente, o aumento do número de casos (BARROS; PAES; SCHUBACH, 2011). Segundo o Ministério da saúde (BRASIL, 2011), todos os casos de suspeita de esporotricose são de notificação compulsória e devem ser notificados e registrados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SIAN).

No Brasil a esporotricose é considerada um sério problema de saúde pública, decorrente, principalmente, de situações como a ausência de um programa ou ações de controle da doença em humanos e animais; da falta de unidades de atendimento aos animais e de medicação gratuita para o seu tratamento; do desconhecimento das medidas de controle da doença por parte da população, além da dificuldade multifatorial no tratamento da micose nos gatos (FIOCRUZ, 2012). As áreas endêmicas de esporotricose no Brasil são caracterizadas pela falta de saneamento, moradias precárias e pouco ou nenhum acesso a serviços de saúde; um desafio para o controle e a erradicação da doença (RODRIGUES *et al.*, 2013).

2.2.3 Aspectos clínicos

De forma geral, a doença é limitada à pele e aos tecidos subcutâneos, em que se manifesta como lesões fixas e linfocutâneas, respectivamente, mas pode acometer praticamente qualquer órgão, na forma disseminada (LA HOZ; BADDLEY, 2012).

As apresentações cutâneas localizada e linfática são descritas como as principais manifestações clínicas da doença (CORDEIRO *et al.*, 2011). As diferenças entre as manifestações clínicas podem ser explicadas pela duração da infecção ou o estado imunológico do hospedeiro (VERA-CABRERA *et al.*, 2012).

Em formas cutâneas, a infecção geralmente aparece depois de um pequeno trauma com ruptura da integridade da epiderme. Depois de penetrar através da pele, o fungo se converte na forma de levedura e pode permanecer localizado no tecido subcutâneo ou se estender ao longo dos vasos linfáticos adjacentes, constituindo a forma fixa (Figura 1A) ou a linfocutânea (Figura 1B), respectivamente. Alguns autores consideram a forma mucosa uma variante da forma cutânea. Na mucosa nasal, as lesões muitas vezes envolvem o septo, com produção de secreções sangrentas e desprendimento de crostas (BARROS; PAES; SCHUBACH, 2011; MUNIZ; PASSOS, 2009; SCHUBACH *et al.*, 2005).

As formas extracutâneas são raras e de difícil diagnóstico, embora sejam mais frequentes após o aparecimento da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA). As Figuras 1C e 1D servem como exemplos de esporotricose disseminada. Depois da pele, o tecido ósseo é o mais afetado, seguido de articulações e pulmão (MUNIZ; PASSOS, 2009; SCHUBACH *et al.*, 2005).



Figura 1: Fotos de esporotricose humana. Antebraço acometido pela forma fixa da esporotricose (A), perna acometida pela forma linfocutânea (B), forma cutânea disseminada (C) e radiografia torácica de um paciente com esporotricose pulmonar (D).
Fontes: QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2003; RÓMERO-CABELLO *et al.*, 2011; VERMA *et al.*, 2012.

Devido à diversidade de formas clínicas da esporotricose, existem inúmeras doenças que devem fazer parte do diagnóstico diferencial desta micose. As principais doenças são: leishmaniose, granuloma, tuberculose cutânea e tumores cutâneos. No Brasil, quando se leva em consideração a distribuição das lesões ao longo dos vasos linfáticos, a leishmaniose é o principal diagnóstico diferencial. Um

diagnóstico incerto ou atrasado da esporotricose muitas vezes resulta em um tratamento prejudicado e vagaroso (BARAN; NAKAMURA, 2011; LIU *et al.*, 2012).

Em um estudo retrospectivo publicado por Rosa e colaboradores (2005), a duração dos sintomas antes do atendimento médico variou consideravelmente. Pacientes permaneceram sem diagnóstico durante um período curto como 7 dias ou até mesmo 15 anos. O tempo médio entre o aparecimento da lesão e o diagnóstico foi de 150 dias.

2.2.4 Esporotricose em animais

O potencial zoonótico da esporotricose ocorre quando indivíduos entram em contato direto com animais doentes. Foram descritos casos esporádicos, onde a infecção foi adquirida por mordidas, arranhões ou até mesmo contato com animais como ratos, tatus, gatos e cavalos. O papel dos gatos na transmissão da esporotricose ao homem tem sido enfatizado desde os anos oitenta e alguns surtos domésticos em diferentes áreas geográficas também são descritos (SCHUBACH *et al.*, 2001).

Em relação aos animais de companhia, a esporotricose tem sido frequentemente relatada em gatos, manifestando-se nas formas cutâneas localizada e linfática, e forma disseminada. Nesses animais, as lesões acontecem, na maioria dos casos, na parte distal dos membros (Figura 2A), cabeça (Figura 2B) ou base da cauda. O quadro inicial pode assemelhar-se a feridas devido a brigas, abscessos ou lesões de celulite que não respondem à antibioticoterapia (MARQUES *et al.*, 1993; NOBRE *et al.*, 2002).

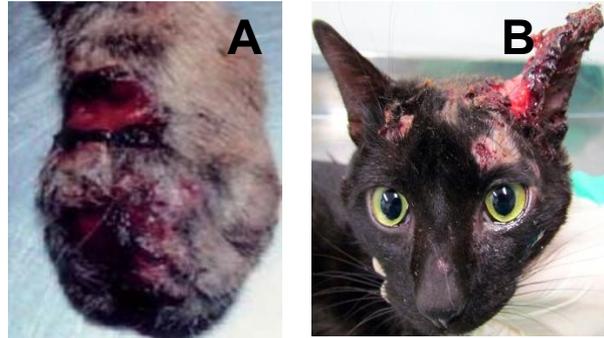


Figura 2: Fotos de esporotricose felina nos membros (A) e na cabeça (B).
Fontes: BRAVO, 2012; RODRIGUES *et al.*, 2013.

As lesões caracterizam-se por formações circulares, elevadas, com alopecia e crostas, em grande número e com ulceração central. No caso de disseminação da doença, podem estar presentes anormalidades oculares, neurológicas e, quando disseminados para órgãos profundos, como pulmões, fígado, trato gastrintestinal, sistema nervoso central, entre outros, pode levar à letargia, prostração, anorexia e hipertermia (MARQUES *et al.*, 1993; MEDLEAU; HNILICA, 2003).

O diagnóstico e o tratamento tardio em gatos podem levar a uma rápida disseminação da doença através dos membros da comunidade. O aumento no número de casos em gatos é seguido por um maior número de casos humanos, que constitui um grave problema de saúde pública (RODRIGUES *et al.*, 2013).

2.2.5 Diagnóstico laboratorial

A esporotricose pode ser diagnosticada através de uma correlação de dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais. Este último tipo inclui, entre outras, análise direta de amostras, tais como de biópsia ou secreção de lesões. No caso de infecções disseminadas, outras amostras como saliva, urina, sangue e líquido cefalorraquidiano podem ser analisadas, dependendo do órgão afetado (BARROS; PAES; SCHUBACH, 2011).

O exame histopatológico é útil para sugerir o diagnóstico, mas os achados geralmente não são específicos e variam com a fase evolutiva. No entanto, o diagnóstico definitivo só é possível se for encontrado os fungos do complexo *S. schenckii* e este achado em cortes histológicos é considerado raro, embora alguns

trabalhos demonstrem em grande número, principalmente em pacientes com esporotricose sistêmica e doença associada à SIDA (MUNIZ; PASSOS, 2009).

A amplificação de fragmentos de DNA por reação em cadeia da polimerase (PCR) para a identificação do agente pode ser realizado e essa técnica é considerada mais rápida. A PCR possui vantagens particulares no diagnóstico dos casos em que apenas uma pequena quantidade de amostras pode ser obtida e a densidade de células fúngicas é muito baixa. O sucesso ou falha da amplificação por PCR depende da especificidade e da sensibilidade dos iniciadores (LIU *et al.*, 2012).

2.2.6 Agente etiológico

Os fungos do complexo *Sporothrix schenckii* crescem adequadamente em meios de ágar de rotina, como ágar *Sabouraud* dextrose (ASD) e ágar batata dextrose (ABD). Em temperatura ambiente, em sua forma filamentosa, as colônias jovens variam da coloração esbranquiçada a acinzentadas e negras. São colônias membranosas e tornam-se ainda mais enrugadas e felpudas com o envelhecimento, como pode ser visualizado na Figura 3A (MITCHELL, 2009; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2006). As colônias cultivadas à temperatura de 37 °C têm características leveduriformes, de cor creme e consistência cremosa (Figura 3B) (XAVIER *et al.*, 2004).

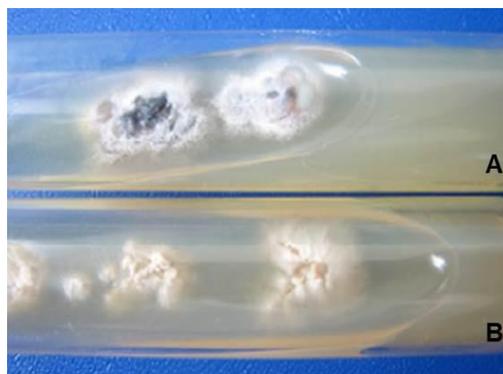


Figura 3: Colônias do *Sporothrix schenckii*. Fase filamentosa(A) e leveduriforme(B).
Fonte: ZHANG *et al.*, 2011.

O fungo produz hifas septadas e ramificadas, bem como pequenos conídios delicadamente agrupados nas extremidades dos conidióforos. Já à temperatura de 35 °C, cresce na forma de pequenas células em brotamento, de forma variável, porém, frequentemente fusiforme, em “forma de charuto” (DELACRÉTAZ; GRIGORIU; DUCEL, 1978; MITCHELL, 2009; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2006). Todas as características podem ser observadas nas Figuras 4A e 4B.

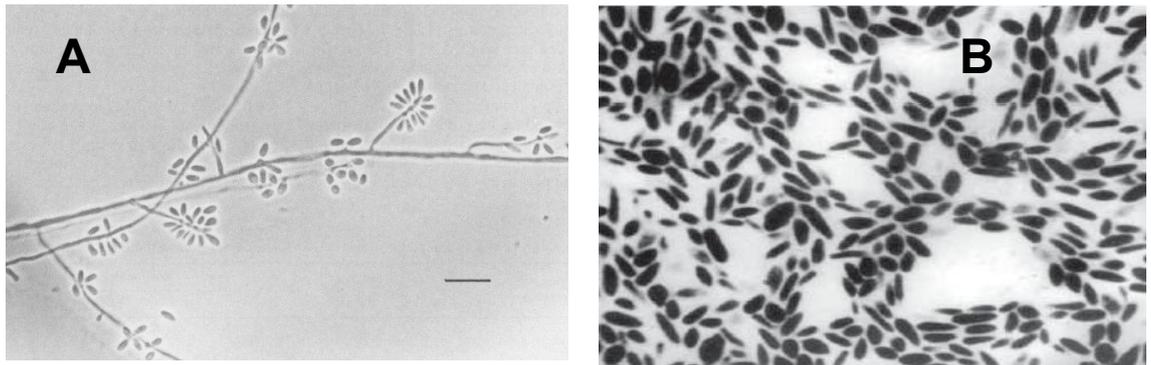


Figura 4: Micromorfologia *Sporothrix schenckii* nas formas filamentosa (A) e leveduriforme (B).
Fonte: DIXON *et al.*, 1991; BRAVO, 2012.

As análises micro e macroscópicas são realizadas como controle de qualidade das linhagens fúngicas, com o objetivo de verificar a pureza das colônias, garantindo assim a ausência de contaminação das mesmas (CANESCHI, 2013).

2.2.7 Tratamento farmacológico

Os fármacos com ação antifúngica exercem ações fungistáticas ou fungicidas e possuem características especiais quanto ao mecanismo de ação, via de administração, ação (micoses superficiais e/ou sistêmicas). Podem ser classificados com base no sítio-alvo e estrutura química, sendo que a maioria atua sobre a membrana celular, como os azóis e poliênicos (NOBRE *et al.*, 2002).

Diversas modalidades de tratamento para esporotricose são descritas, desde a implementação de calor local, quando se tem somente a forma fixa da doença, ao uso da solução saturada de iodeto de potássio e de antifúngicos como itraconazol e cetoconazol, com bons índices de sucesso terapêutico, quando se trata a esporotricose causada pelo *S. schenckii* (CORDEIRO *et al.*, 2011).

Embora a administração oral de solução saturada de iodeto de potássio seja muito eficaz, dificilmente é tolerada por muitos pacientes, por causa de seus efeitos adversos. O tratamento de escolha consiste em itraconazol por via oral ou outros azóis. Na presença de doença sistêmica, administra-se anfotericina B (MITCHELL, 2009).

O tratamento escolhido deve levar em consideração diferentes aspectos do hospedeiro, tais como: (i) estado imune, local de infecção e sua severidade; (ii) aspectos do fungo, como sensibilidade ao tratamento; e (iii) características da droga que incluem dose, farmacocinética, interações, efeitos colaterais, natureza fungistática ou fungicida, entre outros. Um ponto importante a ser considerado é o custo associado ao tratamento, que muitas vezes é determinante para o sucesso do mesmo, uma vez que, usualmente, não é um medicamento de distribuição gratuita pelos órgãos públicos (SANTOS, 2012).

O tempo de tratamento pode ter variações de acordo com a resposta imunológica do pacientes. Geralmente, em pacientes sem imunossupressão, o tratamento dura de três a seis meses, com resolução completa do quadro. Pacientes com imunossupressão podem levar um tempo maior com uma dose mais elevada do antifúngico utilizado (SCHUBACH *et al.*, 2005).

Nos animais, o tratamento representa um problema por causa da necessidade de um tratamento antifúngico regular e prolongado e a dificuldade na administração de medicamentos por via oral aos animais domésticos, como os gatos. Tais fatores podem contribuir para o baixo percentual de cura clínica da esporotricose animal (SCHUBACH, 2004).

2.2.7.1 Azóis

Os fármacos deste grupo apresentam estrutura química e mecanismo de ação semelhante. São divididos em imidazóis, que apresentam dois átomos de nitrogênio no anel azol (cetoconazol, miconazol, entre outros) e os triazóis, aqueles que possuem três átomos de nitrogênio no anel azol (fluconazol, itraconazol e voriconazol) (BENNETT, 2005).

Os azóis são de origem sintética e possuem amplo espectro de ação, agindo na maioria das leveduras e fungos filamentosos. Esses fármacos agem interferindo na biossíntese de ergosterol, um dos principais componentes da membrana celular fúngica, através da quelação do átomo de ferro envolvido no citocromo P-450, impedindo que esse exerça sua ação catalítica. A diminuição da formação do ergosterol eleva o nível de lanosterol e outros esteróides tóxicos que interferem na estrutura da membrana plasmática, tornando-a mais vulnerável. Os azóis também alteram a atividade de várias enzimas ligadas à membrana, tais como aquelas associadas com transporte de nutrientes e síntese de quitina (MANFRINI, 2007). O mecanismo de ação dos azóis pode ser visualizado na Figura 5.

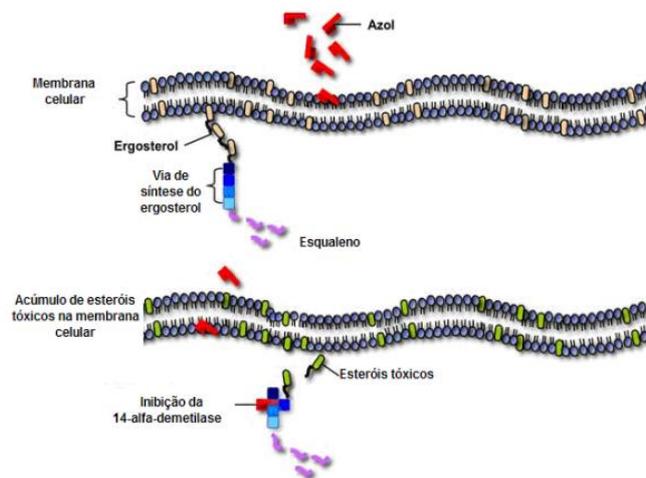


Figura 5: Mecanismo de ação dos azóis inibindo a síntese de ergosterol.
Fonte: MANFRINI, 2007.

O cetoconazol é indicado em uso tópico ou por via oral, tendo amplo potencial terapêutico para o tratamento de infecções micóticas superficiais e sistêmicas. A mesma informação se aplica ao itraconazol, já que este apresenta um largo espectro de ação nos mesmos tipos de micoses (NOBRE *et al.*, 2002).

2.2.7.2 Poliênicos

Os antifúngicos poliênicos incluem três compostos principais: natamicina, nistatina e anfotericina B. Apesar de sua toxicidade, a anfotericina B continua sendo o fármaco de escolha no tratamento de infecções fúngicas sistêmicas, incluindo

aquelas devido a patógenos emergentes e resistentes aos azóis (BENNETT, 2005; PAUW, 2000).

O mecanismo de ação da anfotericina B está relacionado às suas características físico-químicas e à interação do ergosterol presente nas membranas fúngicas. Estudos com adição de esteróis em meios de cultura fúngica mostraram inibição da ação dos fármacos poliênicos, possivelmente por competição com o ergosterol da membrana celular. A interação entre a anfotericina B e a membrana promove formação de poros e conseqüentemente extravasamento dos conteúdos intracelulares, levando à morte celular (BERDICHEVSKI, 2002). O fármaco também interage com o colesterol na membrana celular humana, o que provavelmente confere seus efeitos tóxicos que frequentemente obrigam a interrupção do tratamento. Entretanto, esse fármaco apresenta um amplo espectro de atividade (BENNETT, 2005; PAUW, 2000).

O uso da anfotericina B consiste no tratamento preconizado para as formas mais graves da esporotricose ou quando a terapia não é responsiva. Entretanto, diversos efeitos colaterais estão associados à administração desse fármaco, sendo sua nefrotoxicidade o efeito mais grave observado (SANTOS, 2012).

2.2.7.3 Agentes químicos clássicos

No grupo dos agentes químicos clássicos estão incluídos aqueles medicamentos que apresentam, de maneira geral, espectro reduzido contra fungos, e outros que não são antimicóticos no sentido direto, mas atuam como fungistático de modo indireto ao modificar as condições locais. O iodo é empregado como tintura a 1% em solução alcoólica ou aquosa, sendo um fungicida de amplo espectro, econômico e eficaz, indicado principalmente em dermatofitoses, sendo contra indicado em pele inflamada, por ser irritante. A solução de iodeto de potássio é o tratamento mais adequado para a esporotricose humana, na forma fixa e linfocutânea, mas não se conhece com exatidão o mecanismo de ação (NOBRE *et al.*, 2002).

O iodeto de potássio é uma droga utilizada há mais de 100 anos no tratamento da esporotricose. Seu uso foi primeiramente empregado em 1903, por De Beurmann

e Ramon. Este foi o primeiro composto utilizado na terapia antifúngica, sendo indicado para as formas linfocutânea e cutânea fixa da esporotricose. Ainda hoje não se conhece com exatidão seu mecanismo de ação (NOBRE *et al.*, 2002; SANTOS, 2012).

2.3 PRODUTOS NATURAIS PARA O TRATAMENTO DA ESPOROTRICOSE

Há milhares de anos, diversos compostos naturais são utilizados na medicina popular para o tratamento de muitas doenças. Até meados do século XX, os medicamentos de origem vegetal constituíam a base da terapia medicamentosa (PUPO; GALLO; VIEIRA, 2007). Nos últimos anos, o interesse pelos medicamentos de origem natural voltou a crescer, acompanhado de um aumento significativo nos investimentos em pesquisa, principalmente no Brasil, devido a fatores históricos e à grande biodiversidade do país (CASTILHO; MURATA; PARDI, 2007).

As plantas com propriedades terapêuticas utilizadas no cuidado de saúde tradicional podem ser uma importante fonte de novos compostos biologicamente ativos. Elas aparecem como parte do cuidado tradicional de saúde em muitas partes do mundo ao longo de décadas e tem despertados o interesse de vários pesquisadores (FONTENELLE *et al.*, 2007).

Essa cultura do uso de plantas e de outras fontes naturais com propriedades terapêuticas vem sendo valorizada pela sociedade do mundo inteiro, devido à busca por hábitos de vida mais saudáveis, pelo difícil tratamento de certas doenças e pela resistência microbiana (SOUZA-MOREIRA; SALGADO; PIETRO, 2010).

No tratamento de infecções fúngicas, fatores como toxicidade, eficácia e biodisponibilidade insuficiente dos fármacos antifúngicos já utilizados, tornam necessária a busca de novos compostos para o tratamento de micoses. Dessa forma, as plantas que apresentam substâncias farmacologicamente ativas e seus derivados vêm ganhando espaço na terapêutica contemporânea (PONNUSAMY *et al.*, 2010).

Algumas espécies de plantas já foram estudadas e destacam-se pelo seu potencial para o tratamento de infecções por fungos filamentosos, são elas a *Copaifera langsdorffii* e a *Melaleuca alternifolia* (Caneschi, 2012). Segundo Cleff e

colaboradores (2010), o *Origanum vulgare* possui ação antifúngica contra a levedura *Candida albicans* e o fungo *Sporothrix schenckii*.

2.3.1 Óleos essenciais

Dentro da pesquisa de produtos naturais, destacam-se os óleos essenciais, que são originados do metabolismo secundário das plantas (SOARES, 2008). O metabolismo depende da fisiologia da planta, e pode ser dividido em primário e secundário. O metabolismo primário sempre foi considerado essencial a todas as espécies, e é responsável pelo desenvolvimento e manutenção celular. Participam desses processos substâncias comuns tais como carboidratos, lipídeos, proteínas, clorofila e ácidos nucleicos. Já o metabolismo secundário resulta em produtos comuns entre certos grupos taxonômicos, ou exclusivos para determinada espécie, e oferecem vantagens para a manutenção e desenvolvimento das plantas que os biossintetizam, como a defesa contra patógenos e herbívoros, ação protetora contra exposição ao ultravioleta (UV), atração de polinizadores, entre outros (PROBST, 2012).

Estes compostos são formados por plantas aromáticas e encontrados em suas folhas, resinas, flores, troncos e outros. São armazenados em células secretórias, cavidades, canais, células epidérmicas ou tricomas glandulares. Seus componentes variam desde hidrocarbonetos terpênicos, álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres, éteres, ácidos orgânicos, cumarinas e até mesmo compostos com enxofre (PEREIRA, 2009). Possuem grande aplicação na perfumaria, cosmética, alimentos e como coadjuvantes em medicamentos. São empregados principalmente como aromas, fragrâncias, fixadores de fragrâncias, em composições farmacêuticas e ainda comercializados na sua forma bruta ou beneficiados (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009).

A extração de um óleo essencial pode ser realizada por prensagem, maceração, extração com solventes voláteis ou por meio de destilação por arraste a vapor. Este último método se mostra como o mais eficiente e de menor custo, sendo ainda o mais adequado para a extração de determinadas substâncias de uma planta (GUIMARÃES; OLIVEIRA; ABREU, 2000).

O tipo de extração utilizado pode acarretar variações no perfil químico do óleo essencial, não só em quantidade e concentração, mas também na estereoquímica das moléculas. O produto de extração pode variar em qualidade, quantidade e na composição, de acordo com o clima, estação do ano, composição do solo, parte vegetal, idade e estágio do ciclo vegetativo. Assim, para se obter óleos essenciais de composição constante, a extração deve ser feita sempre sob as mesmas condições (BAKKALI *et al.*, 2008).

O Brasil tem lugar de destaque na produção de óleos essenciais, ao lado da Índia, China e Indonésia, sendo considerados os quatro grandes produtores mundiais. A posição do Brasil deve-se aos óleos de cítricos, subprodutos da indústria de sucos (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009).

Os óleos essenciais possuem composição química complexa e estão relacionados com diversas funções necessárias à sobrevivência vegetal, exercendo papel fundamental na defesa contra micro-organismos. Tem sido estabelecido cientificamente que cerca de 60% dos óleos essenciais possuem propriedades antifúngicas e 35% exibem propriedades antibacterianas (SOARES, 2008). De acordo com Caneschi (2012) óleos essenciais extraídos de algumas espécies de plantas já são conhecidos pela ação contra fungos filamentosos, são eles de *Baccharis trimera*, *Artemisia sieberi*, *Cuminum cyminum*, *Foeniculum vulgare*, *Heracleum persicum*, *Menta spicata*, *Nigella sativa*, *Rosmarinus officinalis*, *Zataria multiflora* e *Ziziphora clinopodioides*.

2.3.2 *Baccharis trimera* Less (D.C.)

Um dos óleos essenciais utilizados nesse estudo foi o de *Baccharis trimera* Less. O gênero *Baccharis*, pertencente à família Asteraceae, é constituído por cerca de 500 espécies. Uma das mais importantes é *Baccharis trimera* (Less.) DC., também denominada *Baccharis genistelloides* var. *trimera* (Less.) Baker, com grande utilização na medicina tradicional e na produção de fitoterápicos (KARAM *et al.*, 2013).

Baccharis trimera Less. (DC.), conhecida popularmente como carqueja ou carqueja amarga, é uma planta que ocorre espontaneamente em terrenos baldios,

podendo ser considerada planta daninha (XAVIER, *et al.*, 2012). É originária da América do Sul, provavelmente dos Andes peruanos, mas pode ser encontrada no Paraguai, Uruguai, Argentina e no Brasil, estendendo-se do Rio Grande do Sul à Bahia (SILVA, 2004).

Essa planta possui porte arbustivo, com altura entre 0,5 e 4,0 metros, bastante ramificada na base e possui caules e ramos verdes com expansões trialadas. As inflorescências são do tipo capítulo, dispostas lateralmente nos ramos, de cor esbranquiçada (Figura 6) (KARAM *et al.*, 2013).



Figura 6: Foto de *Baccharis trimera*.
Fonte: SILVA, 2004.

Nas últimas décadas, espécies do gênero *Baccharis* vêm sendo estudadas devido a sua importância como fonte de novos componentes ativos com possíveis aplicações na indústria química e farmacêutica, por apresentar diversos metabólitos secundários como flavonoides, lactonas diterpênicas, taninos, saponinas e óleo essencial. Este último é composto, principalmente, por carquejol, acetato de carquejila, β -pineno, trans- β -ocimeno, nerolidol e espatulenol (MORAIS; CASTANHA, 2011).

O valor comercial desses óleos parece variar em função do teor de nerolidol e acetato de carquejila, embora seus constituintes majoritários mais constantes sejam o carquejol, β -pineno e o acetato de carquejila (Figura 7) (SILVA, 2004).

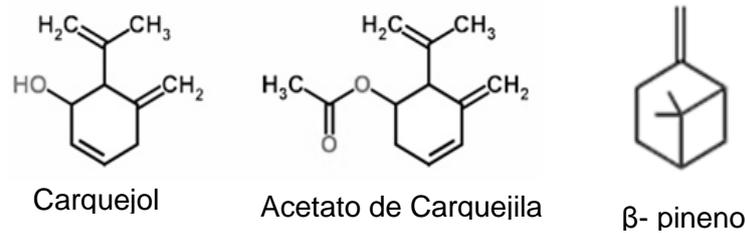


Figura 7: Principais constituintes do óleo essencial de carqueja.
Fonte: DEWICK, 2002.

O carquejol é o álcool originado a partir da redução do éster acetato de carquejila e a maioria dos demais compostos do óleo essencial de *B. trimera* são monoterpenos, tais como o β-pineno, terpineno, limoneno, sabineno, mirceno, entre outros. Esses compostos são formados através de rearranjos na molécula, e todos possuem o mesmo precursor, o mevalonato, que forma o isopreno, unidade estrutural dos terpenos (DEWICK, 2002). Dessa forma, o metabolismo da planta, juntamente com estímulos externos conduzem à formação de determinados constituintes.

A carqueja é largamente utilizada na medicina popular na forma de infusão, devido às propriedades anti-inflamatória, cicatrizante, digestiva (SILVA *et al.*, 2010), diurética, tônica, protetora e estimulante do fígado, antianêmica, antirreumática, entre outras. Na agricultura, é aproveitada pelas propriedades alelopáticas, retardando a velocidade de germinação de sementes, inibindo o crescimento micelial de fungos e de raízes de trigo (SILVA *et al.*, 2013).

2.3.3 *Origanum vulgare* Linnaeus

O outro óleo essencial utilizado para a pesquisa de atividade antifúngica, nesse estudo, foi o de *Origanum vulgare*. O gênero *Origanum* pertence à família Lamiaceae, sendo representado por 23 espécies. A espécie *Origanum vulgare* Linnaeus, conhecida como orégano, é amplamente utilizada na culinária e na medicina popular, e seu óleo essencial apresenta elevada estabilidade, ausência de

contaminação microbiológica e diversidade de componentes químicos (CARMO; LIMA; SOUZA, 2008; CLEFF *et al.*, 2008).

O orégano (Figura 8) tem sido amplamente utilizado nas indústrias agrícola, farmacêutica e cosmética como erva culinária, aromatizantes em produtos alimentares, bebidas alcoólicas e produtos de perfumaria pela sua fragrância (CARMO; LIMA; SOUZA, 2008).

Essa erva é conhecida por possuir inúmeras propriedades terapêuticas como as atividades antioxidante, antibacteriana, antifúngica, antiespasmódica, antisséptica e tônica, sendo aplicado em sistemas de medicina tradicional em muitos países (CARMO; LIMA; SOUZA, 2008; CLEFF *et al.*, 2010).

O orégano é uma erva anual, perene, arbustiva e é nativa da região do Mediterrâneo, Euro-siberiana e regiões Irano-siberianas. As espécies crescem em abundância em encostas pedregosas e áreas de montanha rochosa em uma ampla gama de altitudes (0-400 m) (MITCHELL *et al.*, 2010).



Figura 8: Foto de *Origanum vulgare*.
Fonte: A autora.

Várias espécies do gênero *Origanum* possuem compostos fenólicos como carvacrol e timol (Figura 9) entre seus principais constituintes. Esses dois compostos são isômeros e são originados a partir da mesma rota biossintética. Podem ser identificados outros compostos, como p -cimeno, α -terpineno, α -terpineol, 4-terpinol, e α -pineno, que estão presentes em concentrações mais baixas e também apresentam atividade antimicrobiana (CLEFF *et al.*, 2010). A composição química de produtos de origem vegetal, tais como óleos essenciais e extratos, dependem de vários fatores de ordens climáticas, sazonais, geográficas, período de colheita, além de outros fatores (CORRÊA *et al.*, 2010).

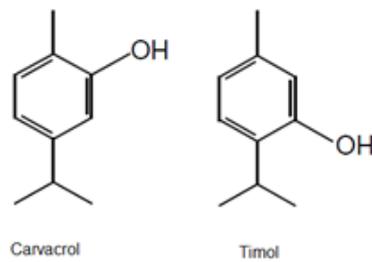


Figura 9: Principais constituintes do óleo essencial de orégano.
Fonte: ARCILA-LOZANO *et al.*, 2004.

Acredita-se então, que cada componente do óleo essencial tem sua própria contribuição no desencadeamento das suas propriedades biológicas (efeito antagônico ou sinérgico) e que a complexidade da mistura dos compostos presentes torna mais difícil a adaptabilidade dos micro-organismos, podendo resultar no menor risco de desenvolvimento de resistência microbiana (SOUZA *et al.*, 2005).

Dessa forma, pesquisadores têm se engajado em estudos com plantas medicinais, levando em consideração aspectos botânicos, etnofarmacológicos, constituintes químicos e atividade biológica, uma vez que são consideradas uma fonte de novos compostos com grande potencial farmacológico.

Entre as várias espécies vegetais, a pesquisa de novas alternativas para o tratamento da esporotricose revela-se promissora e inovadora.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o potencial antifúngico *in vitro* dos óleos essenciais de *Baccharis trimera* Less (D.C.) e *Origanum vulgare* Linnaeus frente às linhagens *S. schenckii* e *S. brasiliensis*, pertencentes ao complexo *S. schenckii*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a composição química dos óleos de *Baccharis trimera* e *Origanum vulgare* por cromatografia gasosa de alta resolução (CG-AR).

Determinar as concentrações inibitória mínima (CIM) e fungicida mínima (CFM) dos óleos essenciais de interesse, isolados e em associações, frente às linhagens de *Sporothrix schenckii* e *S. brasiliensis*.

Documentar, ao microscópio eletrônico de varredura, as alterações nas estruturas morfológicas causadas pelos óleos de interesse e os fármacos de referência nas linhagens fúngicas envolvidas no estudo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ÓLEOS ESSENCIAIS

Foram utilizados óleos essenciais de *Baccharis trimera* e *Origanum vulgare*, lotes BATHI0111 e 660411, respectivamente. Os mesmos foram adquiridos da empresa Laszlo Aromatologia LTDA e obtidos por meio da destilação por arraste a vapor, conforme informado pelo fabricante.

4.1.1 Cromatografia gasosa de alta resolução (CG-AR)

Para a separação, e posterior identificação qualitativa e quantitativa de seus constituintes químicos, os óleos essenciais de carqueja amarga e orégano foram analisados por cromatografia gasosa de alta resolução (CG-AR) no Departamento de Química/Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

As análises foram realizadas, para ambos os óleos essenciais, 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. O volume de injeção foi de 1 µL de amostra. As amostras foram diluídas a 0,5% em clorofórmio. Como gás de arraste foi utilizado o hidrogênio 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. A temperatura utilizada no injetor e no detector foi de 220°C. A coluna utilizada foi HP-BP1 de 30 m de comprimento por 0,25 mm 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).

Além da identificação pelo tempo de retenção, foi também realizado o cálculo do índice de *Kovats*, um índice de retenção que descreve o comportamento de retenção do composto comparativamente ao de uma mistura de alcanos de diferentes números de átomos de carbono. Este índice fornece informação sobre a sequência de eluição do composto e varia em função da fase estacionária e da temperatura (JANZANTTI; FRANCO; WOSIACKI, 2003).

4.2 LINHAGENS FÚNGICAS DE INTERESSE

Para a realização dos ensaios antifúngicos foram empregadas duas linhagens clínicas de *Sporothrix schenckii*, caracterizadas genericamente como A e B, as quais foram gentilmente cedidas pelo Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências de Botucatu da Universidade Estadual de São Paulo (UNESP). Foram também utilizados quatro cepas de *Sporothrix* sp.: *Sporothrix schenckii* ATCC 1099-18, *Sporothrix schenckii* IPEC 15383, *Sporothrix brasiliensis* ATCC 5110 e *Sporothrix brasiliensis* IPEC 17943, cedidas pelo laboratório de Micologia Celular e Proteômica do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ).

Para a conservação dos micro-organismos, foram realizados repiques periódicos, de 30 a 40 dias. As linhagens foram cultivadas em Ágar *Sabouraud* dextrose (ASD) e Ágar Batata dextrose (ABD). Foi realizada também a técnica de armazenamento em médio prazo, na qual as linhagens foram armazenadas em criotubos contendo água destilada estéril, sob temperatura de -20°C. Esta técnica oferece boa segurança para o armazenamento de diversos micro-organismos por períodos de 3 meses a 2 anos (TORTORA; FUNKE; CASE, 2011).

4.2.1 Caracterização macroscópica

A identificação de fungos pela caracterização macroscópica tem, como fundamento, a observação da morfologia da colônia. A análise da colônia visa observar: cor, textura, superfície, pigmento difusível no meio de cultura, e pode ser feita no tubo de ensaio contendo a cultura primária do fungo (BRASIL, 2013). Assim sendo, as linhagens fúngicas foram transferidas para placas de Petri contendo meio de cultura ABD e incubadas a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ por 7 a 10 dias. Após o período de incubação, foram evidenciadas as características macroscópicas das linhagens fúngicas de interesse. Como pode ser visualizado na Figura 10, os fungos do complexo *S. schenckii* apresentaram colônias, em temperatura ambiente, de coloração esbranquiçada, membranosas e enrugadas.



Figura 10: Imagem da colônia de *Sporothrix schenckii*.
Fonte: A autora

4.2.2 Caracterização microscópica

A observação das estruturas microscópicas, tais como: hifa hialina ou demácia, septada ou cenocítica, forma, disposição e formação dos esporos, são suficientes, em geral, para a identificação dos fungos filamentosos. A morfologia microscópica é melhor visualizada com a técnica de microcultivo que preserva a disposição original dos esporos sobre as hifas e mantém íntegras certas estruturas formadoras de esporos, como esporângios e órgãos de reprodução (BRASIL, 2013).

O procedimento consiste no emprego de lâminas de vidro e placa de Petri estéril, um bloco de ágar batata de 1,0 cm² com 4 – 5 mm de altura e um suporte, utilizado com outra lâmina de vidro (Figura 11). Foram semeados fragmentos de fungo nos 4 lados do cubo de ágar e utilizou-se uma lamínula estéril para recobrir o ágar e os fragmentos fúngicos. Para proporcionar um ambiente úmido, foram adicionados 2 mL de água destilada estéril na placa. Todo o sistema foi incubado entre 28± 2°C por 7 a 10 dias, para o desenvolvimento de hifas (BRASIL, 2013; PIMENTEL; FIGURA; AUER, 2010).

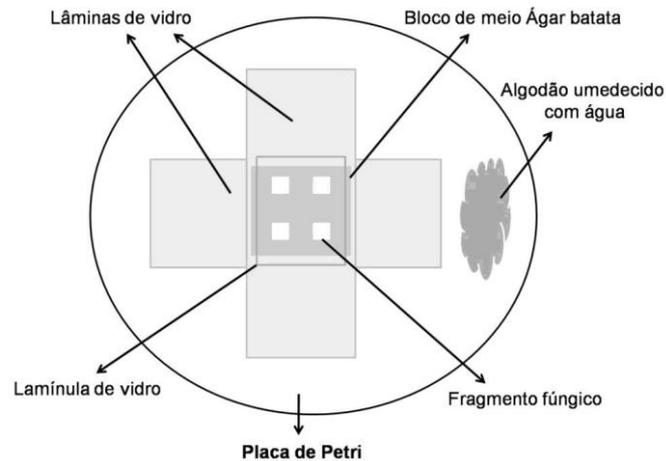


Figura 11: Esquema de microcultivo de lâmina em vidro.
Fonte: CANESCHI, 2013.

Após o período de crescimento fúngico, retirou-se a lamínula na qual estava aderida a parte aérea do fungo. Uma gota do 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 (Figura 12) (BRASIL, 2013; SIDRIM; ROCHA, 2004). Como pode ser visualizado ainda na Figura 12, os fungos do complexo *S. schenckii* produzem hifas septadas e ramificadas, bem como pequenos conídios delicadamente agrupados nas extremidades dos conidióforos, formando estruturas semelhantes às flores de margaridas.

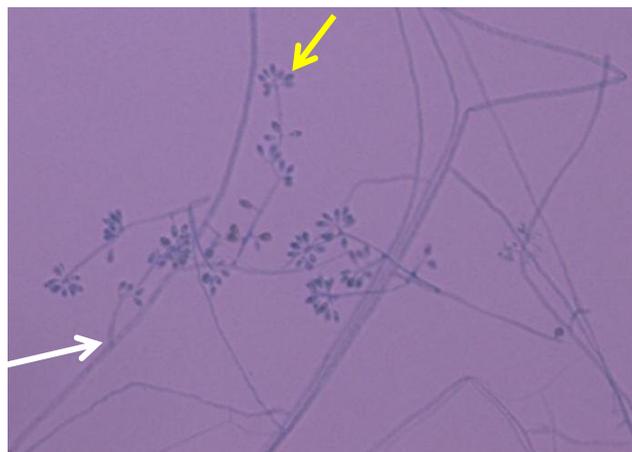


Figura 12: Imagem da microcultura de *Sporothrix schenckii*.
A seta branca indica a presença de hifas septadas e ramificadas e a seta amarela indica a presença dos conídios.

4.3 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

4.3.1 Triagem microbiológica

Para avaliar o potencial antifúngico dos óleos essenciais de *Baccharis trimera* e *Origanum vulgare*, foi realizada a triagem microbiológica, descrita por Souza e colaboradores (2002), utilizando a técnica do fragmento fúngico. As análises foram realizadas em placas estéreis para cultura de células, de fundo chato e com vinte e quatro poços. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

A atividade do óleo essencial de *Baccharis trimera* (carqueja) e de *Origanum vulgare* (orégano) foi avaliada, separadamente, na concentração final de 1.000 µg/mL do constituinte majoritário de cada óleo. Foi primeiramente preparada uma solução-estoque (SE) do óleo essencial, a qual foi calculada de acordo com o ajuste da concentração do constituinte majoritário para 100%. Este foi o β -pineno para o óleo essencial de carqueja e γ -terpineno para o óleo de orégano.

Para o preparo das SEs, foram empregados 84,03 µL de óleo essencial de carqueja, 69,99 µL da solução de *Tween-80/DMSO* PA (1:1, v/v) e 845,97 µL de solução salina 0,9% estéril, perfazendo um total de 1 mL de SE. Para a SE do óleo essencial de orégano, foram utilizados 65,57 µL do referido óleo essencial, 54,62 µL da solução de *Tween-80/DMSO* PA (1:1, v/v) e 879,8 µL de salina 0,9% estéril perfazendo também um total de 1 mL de SE deste óleo essencial.

Também foi preparada uma solução estoque de controle do diluente dos óleos essenciais (CD). Nela continha a maior quantidade de *Tween-80/DMSO* PA (1:1, v/v) utilizada para a solubilização dos óleos (69,99 µL) e salina 0,9% estéril (930,01 µL). Foram testados então, o controle de viabilidade fúngica e o controle do diluente. A Tabela 1 mostra as quantidades das soluções estoque e meio de cultura utilizadas na montagem da placa.

Tabela 1: Soluções empregadas na triagem microbiológica.

	SE Óleo essencial	SE controle diluyente	Meio de cultura ASD	Fragmento Fúngico
Amostra teste (óleo)	100 µL	-	1.900 µL	+
Controle de viabilidade fúngica	-	100 µL	1.900 µL	+
Controle diluyente	-	100 µL	1.900 µL	-

SE: Solução-estoque; (+) Presente; (-) Ausente.

Após a completa homogeneização e solidificação do meio de cultura (ASD), foi acrescentado sobre cada poço, o fragmento de 2 mm de cada linhagem fúngica (SOUZA *et al.*, 2002). Em seguida, a placa foi incubada à temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$ por 7 dias. Após o período de incubação, o crescimento de cada espécie fúngica frente aos óleos essenciais de *Baccharis trimera* e *Origanum vulgare* foi avaliado com o auxílio do microscópio (SMZ800, Nikon, Japão).

Nos poços onde houve crescimento, foi sugerida a ausência de atividade antifúngica para o óleo essencial, na concentração correspondente. A inibição do crescimento pode representar uma possível atividade antifúngica.

4.3.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A determinação da CIM para os óleos essenciais de carqueja e de orégano 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

O primeiro passo para a realização da CIM foi a padronização do inóculo. Para induzir a formação de estruturas de reprodução, as linhagens foram cultivadas em ABD durante 7 dias, à temperatura de 28°C . Posteriormente, foi realizada a lavagem da cultura, com adição de 2 mL de solução salina estéril 0,9% e 20 µL de solução Tween-80/ DMSO PA (1:1, v/v) com o auxílio de uma alça de inoculação estéril. A partir desta primeira lavagem, procederam-se mais três, somente com solução salina

estéril 0,9%. A mistura resultante de conídios ou esporangiósporos e fragmentos de hifas foi removida e transferida para um tubo de ensaio estéril. Quando as partículas mais pesadas se depositaram no fundo, após 3 a 5 minutos, a suspensão homogênea superior foi transferida para um tubo cônico estéril e homogeneizada em um agitador de tubos durante 15 segundos (CLSI, 2008).

A transmitância da suspensão fúngica foi medida no espectrofotômetro (Libra S12, Biochrom, UK), 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 com ácido 3-(N-morfolino)propano sulfônico (MOPS) (CLSI, 2008; STOPIGLIA *et al.*, 2011).

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

4.3.2.2 Preparo das amostras-teste

Foram preparadas soluções-estoque dos óleos de interesse na concentração de 2.000 µg/mL do componente majoritário de cada referido óleo, para a realização da atividade antifúngica. Na solução do óleo essencial de carqueja, foram adicionados 12,6 µL do óleo; 10,49 µL de solução de *Tween* 80/DMSO PA (1:1, v/v) e 1476,9 µL de RPMI 1640. Na solução do óleo de orégano, foram empregados 9,84 µL do mesmo, 8,19 µL de solução de *Tween* 80/DMSO PA (1:1, v/v) e 1.481,9 µL de RPMI 1640.

A partir das soluções de cada óleo, foram preparadas mais sete diluições sucessivas (1:2, v/v) e os valores resultantes foram de 2.000 µg/mL a 15,625 µg/mL.

Os óleos essenciais de carqueja e orégano foram testados isolados (100%) e em associação (25%:75%, 50%:50%, 75%:25%, v/v) Os respectivos volumes utilizados estão demonstrados na Tabela 2. A partir dessas soluções, foram preparadas mais sete diluições sucessivas, assim como feito anteriormente.

Tabela 2: Composição das soluções estoque dos óleos essenciais avaliados em associação.

Proporção de óleo	Óleo de <i>B. trimera</i>	Óleo de <i>O. vulgare</i>	Solução de Tween 80/DMSO PA (1:1, v/v)	RPMI 1640
25%:75%	3,15 µL	7,38 µL	8,77 µL	1.480,7 µL
50%:50%	6,3 µL	4,92 µL	9,35 µL	1.479,43 µL
75%:25%	9,45 µL	2,46 µL	9,92 µL	1.478,17 µL

Foram preparadas também oito soluções-estoque dos fármacos de referência, cetoconazol e anfotericina B, ambos nas concentrações de 32 a 0,0626 µg/mL em meio RPMI-1640 tamponado com MOPS (ALMEIDA *et al.*, 2009; CLSI, 2008). Para a solubilização dos fármacos de referência foi empregado o dimetilsulfóxido (DMSO) PA (CLSI, 2008). Os valores testados variaram de 16 a 0,0313 µL/mL, uma vez que o as soluções-estoque são diluídas na proporção 1:2 (v/v) na microplaca.

As quantidades de fármaco, DMSO e RPMI 1640 utilizados são mostradas na Tabela 3, juntamente com os controles microbiológicos dos diluentes, DMSO e solução de Tween 80/DMSO PA (1:1, v/v). Para o controle do efeito do diluente, foi utilizado o maior valor da solução empregada nas diluições dos óleos essenciais.

Tabela 3: Composição das soluções-estoque dos controles.

	Anfotericina B	Cetoconazol	DMSO	Solução Tween 80/DMSO PA (1:1, v/v)	RPMI 1640
CP 1	48 µg	-	30µL	-	q.s.p.1500µL
CP 2	-	48 µg	30µL	-	q.s.p.1500µL
CD 1	-	-	30µL	-	q.s.p.1500µL
CD 2	-	-	-	10,49µL	q.s.p.1500µL

CP: Controle positivo; CD: Controle do diluente; DMSO: dimetilsulfóxido; (-) Ausência.

4.3.2.3 Montagem das microplacas

No preparo da microplaca para os testes com os óleos essenciais, foram primeiramente adicionados em cada poço, 100 µL do meio de RPMI 1640 inoculado. Posteriormente, 100 µL da emulsão do óleo foram dispensados nas cavidades, de modo que na primeira linha encontrava-se a maior concentração. As concentrações finais testadas foram de 1.000 µL/mL a 7,8 µL/mL.

Para a realização dos testes com os fármacos de referência, procedeu-se da mesma forma supracitada. Os mesmos foram utilizados como controles positivos. Foram realizados também os controles dos diluentes, para comprovar a ausência de sua contaminação e a viabilidade fúngica, e controles negativos. Os respectivos volumes utilizados para o preparo da microplaca de 96 poços se encontram na Tabela 4. Todas as análises foram realizadas em triplicata e o sistema foi incubado por 2 dias a 35°C.

Tabela 4: Controles empregados no preparo da microplaca.

	CD 1*	CD 2*	RPMI**	RPMI***
Controle Diluente 1	100µL	-	100µL	-
Controle Diluente 2	-	100µL	100µL	-
Controle Negativo1	100µL	-	-	100µL
Controle Negativo 2	-	100µL	-	100µL

CD 1*: Solução do Controle microbiológico de DMSO; CD 2*: Solução do Controle microbiológico da solução de Tween 80/DMSO PA (1:1,v/v); (***) Inoculado; (**) Não inoculado.

4.3.3 Determinação da concentração fungicida mínima (CFM)

A CFM é definida como a menor concentração da substância testada na qual a linhagem fúngica não apresenta capacidade de crescimento, quando inoculada em meio sem antifúngicos (RASOOLI; ABYANEH, 2004).

Após a leitura dos resultados da CIM referente aos óleos essenciais e fármacos de referência, alíquotas de 10µL dos poços onde não houve crescimento foram retirados e semeados em placas de 96 poços, juntamente com 200 µL de SDB estéril (MAGAGNIN *et al.*, 2011). O sistema foi incubado por 2 dias à temperatura de 35°C.

Dessa forma, caso o crescimento fúngico ocorra após a diluição da alíquota do meio contendo o agente antifúngico, este é considerado um agente fungistático. Se não houver crescimento fúngico, é considerado fungicida (CANESCHI, 2013).

4.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

As análises morfológicas empregando a MEV foram realizadas com as linhagens *Sporothrix schenckii* ATCC 1099-18 e *Sporothrix brasiliensis* ATCC 5110

expostas ou não aos fármacos de referência e aos óleos essenciais. O protocolo deste ensaio foi realizado de acordo com Santos (2012).

Foi realizada a padronização fúngica da mesma forma descrita para a CIM e, após 3 dias de crescimento em meio RPMI 1640 tamponado com MOPS, as células fúngicas foram expostas às substâncias de interesse. A concentração utilizada foi de 1000 µg/mL do constituinte majoritário dos óleos essenciais de carqueja e orégano, e 16 µg/mL para os fármacos de referência. Após este período, as células foram lavadas em solução salina estéril 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 pós-fixadas por 1 hora em 1% de tetróxido de ósmio contendo 1,25% ferrocianeto de potássio. A seguir, as amostras foram lavadas com água ultrapura e desidratadas em concentrações crescentes de etanol (30% a 100%) em intervalos de 10 minutos para cada concentração. As amostras foram secas pelo método do ponto crítico de CO₂ no equipamento Bal-tec CP030, metalizadas com ouro e observadas em microscópio eletrônico de varredura FEI Quanta 250.

5 RESULTADOS

5.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Foram identificados por meio da CG-AR vinte constituintes químicos na composição do óleo essencial de *B. trimera*, com destaque para o β -pineno e o acetato de carquejila com os maiores percentuais, como pode ser visualizado na Figura 13 e na Tabela 5. Os constituintes do óleo essencial de *O. vulgare* também foram identificados e em sua composição pôde-se detectar dezessete constituintes químicos com destaque para o γ -terpineno, o composto majoritário, seguido pelo carvacrol, como pode ser visualizado na Figura 14 e na Tabela 6. Picos menores que 0,1% não foram considerados durante a análise dos dois óleos de interesse.

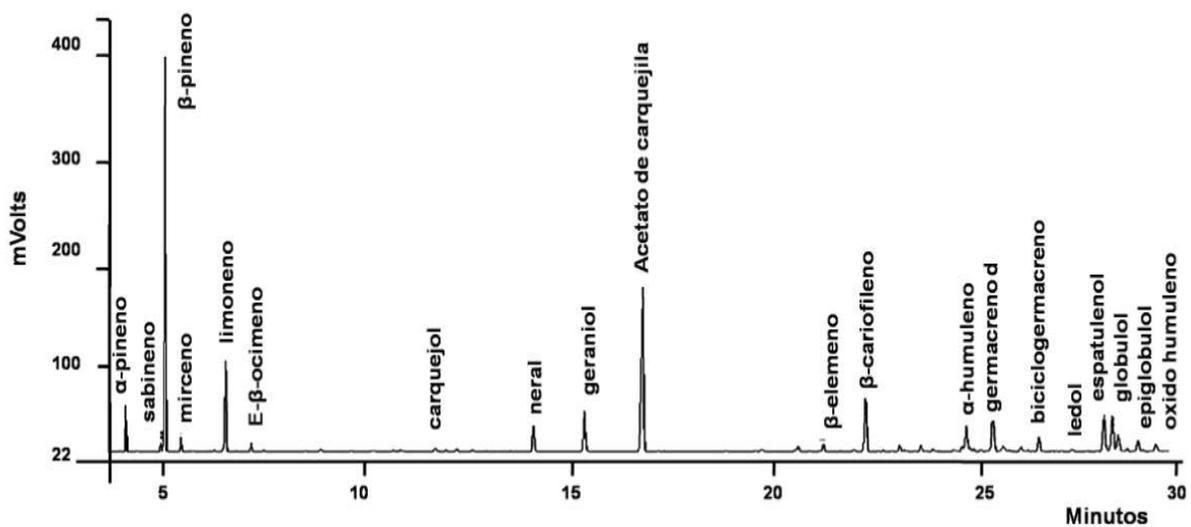


Figura 13: Perfil cromatográfico do óleo essencial de *Baccharis trimera*.

Tabela 5: Composição química do óleo essencial de *Baccharis trimera*.

Pico	Constituintes	%	Índice de retenção de Kovats calculado
1	α -pineno	2,2	928
2	Sabineno	0,5	967
3	β -pineno	23,4	973
4	Mirceno	0,8	986
5	Limoneno	5,9	1021
6	E- β -ocimeno	0,6	1039
7	Carquejol	0,4	1150
8	Neral	2,3	1231
9	Geraniale	4,1	1258
10	acetato de carquejila	19,0	1295
11	β -elemeno	0,8	1388
12	β -cariofileno	6,4	1412
13	α -humuleno	3,1	1477
14	germacreno D	5,0	1494
15	biciclogermacreno	1,6	1523
16	Ledol	4,6	1563
17	Espatuleno	4,4	1569
18	Globulol	2,3	1575
19	Epiglobulol	1,3	1586
20	óxido humuleno	1,0	1596
Total		89,7	

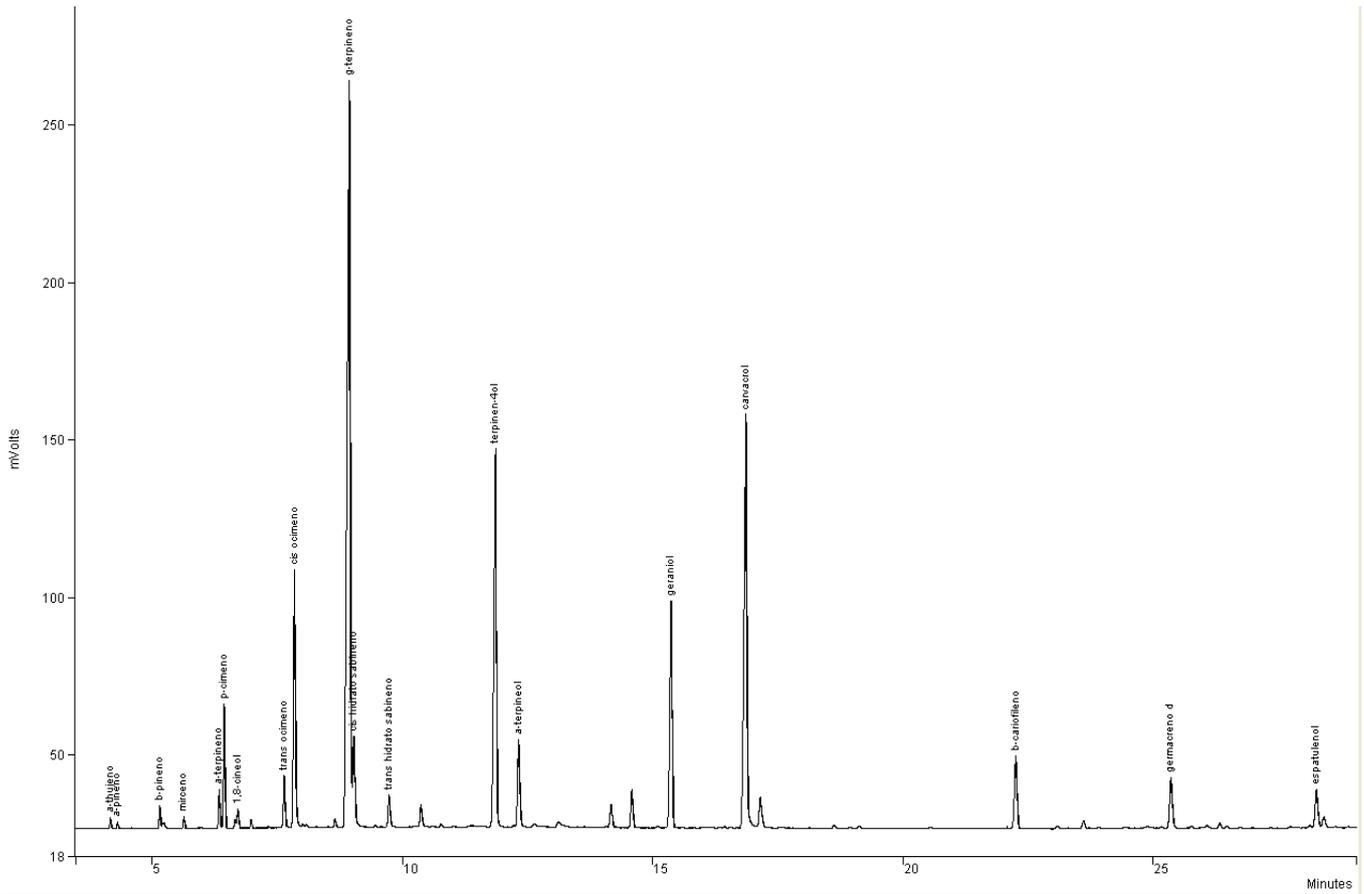


Figura 14: Perfil cromatográfico do óleo essencial de *Origanum vulgare*.

Tabela 6: Composição química do óleo essencial de *Origanum vulgare*.

Pico	Constituintes	%	Índice de retenção de Kovats calculado
1	β -pineno	0,4	973
2	Mirceno	0,2	986
3	α -terpineno	0,8	1017
4	<i>p</i> -cimeno	2,5	1024
5	1,8-cineol	0,5	1031
6	<i>trans</i> -ocimeno	1,3	1049
7	<i>cis</i> -ocimeno	7,0	1056
8	γ -terpineno	30,5	1081
9	<i>c</i> -hidrato sabineno	2,8	1085
10	<i>t</i> -hidrato sabineno	1,0	1101
11	terpinen-4ol	13,0	1158
12	α -terpineol	2,9	1170
13	Geraniol	7,1	1223
14	Carvacrol	15,7	1241
15	β -cariofileno	2,5	1297
16	germacreno d	1,9	1471
17	Espatulanol	1,5	1545
Total		91,6	

5.2 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

Por meio da análise preliminar dos fragmentos fúngicos, as linhagens de interesse não apresentaram crescimento fúngico visível, quando expostas aos óleos de *B. trimera* e *O. vulgare* (Figura 15). Pode-se, então, sugerir uma ação antifúngica dos respectivos óleos essenciais frente a estas linhagens mencionadas.

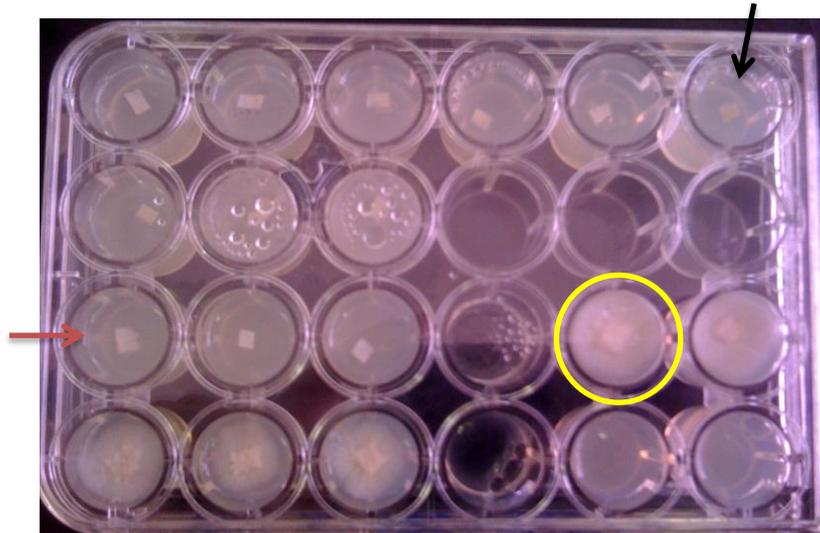


Figura 15: Triagem microbiológica do fungo *Sporothrix schenckii*.

A seta vermelha indica o poço onde se encontrava o óleo essencial de *Baccharis trimera* e a seta preta o de *Origanum vulgare*. A circunferência representa o poço no qual se verificou o crescimento fúngico.

A atividade antifúngica dos óleos essenciais, quando a concentração do constituinte majoritário foi ajustada para 100%, foi avaliada frente às linhagens clínicas de *S. schenckii*, caracterizadas genericamente por A e B, linhagens padrão de *S. schenckii*, ATCC 1099-18 e IPEC 15383, e linhagens padrão de *S. brasiliensis* ATCC 5110 e IPEC 17943. Os valores da CIM se encontram na Tabela 7, e todas as substâncias foram caracterizadas como fungicidas, após a realização da CFM.

Foram realizados também testes de atividade antifúngica dos óleos essenciais de interesse em associação, frente às linhagens fúngicas supracitadas. As associações possuíam concentrações referentes à 25%:75%, 50%:50% e 75%:25%, (carqueja:orégano, v/v). Os valores da CIM e CFM podem ser visualizados na Tabela 8.

Tabela 7: Suscetibilidade *in vitro* dos fungos *Sporothrix schenckii* e *Sporothrix brasiliensis* frente ao constituinte majoritário dos óleos essenciais de *Baccharis trimera*, *Origanum vulgare* e aos fármacos de referência.

Linhagem Fúngica	Óleo essencial de <i>B. trimera</i>		Óleo essencial de <i>O. vulgare</i>		Anfotericina B		Cetoconazol	
	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
<i>S. schenckii A</i>	125,0	125,0	62,5	125,0	2,0	2,0	1,0	4,0
<i>S. schenckii B</i>	500,0	500,0	62,5	125,0	2,0	2,0	1,0	2,0
<i>S. schenckii ATCC 1099-18</i>	125,0	125,0	125,0	125,0	4,0	4,0	2,0	2,0
<i>S. schenckii IPEC 15383</i>	125,0	125,0	500,0	500,0	4,0	4,0	2,0	4,0
<i>S. brasiliensis ATCC 5110</i>	32,25	125,0	125,0	250,0	2,0	2,0	2,0	8,0
<i>S. brasiliensis IPEC 17943</i>	62,5	125,0	250,0	500,0	2,0	2,0	4,0	4,0

CIM: concentração inibitória mínima; CFM: concentração fungicida mínima; resultados expressos como µg/mL.

Tabela 8: Suscetibilidade *in vitro* dos fungos *Sporothrix schenckii* e *Sporothrix brasiliensis* frente às associações dos óleos essenciais de *Baccharis trimera* e *Origanum vulgare*.

Linhagem fúngica	25%:75%		50%:50%		75%:25%	
	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
<i>S. schenckii A</i>	125,0	250,0	62,5	125,0	125,0	125,0
<i>S. schenckii B</i>	125,0	250,0	62,5	125,0	62,5	125,0
<i>S. schenckii ATCC 1099-18</i>	250,0	500,0	125,0	250,0	125,0	125,0
<i>S. schenckii IPEC 15383</i>	250,0	250,0	250,0	250,0	250,0	250,0
<i>S. brasiliensis ATCC 5110</i>	250,0	500,0	125,0	250,0	32,25	125,0
<i>S. brasiliensis IPEC 17943</i>	62,5	62,5	32,25	62,5	62,5	62,5

CIM: concentração inibitória mínima; CFM: concentração fungicida mínima; resultados expressos como µg/mL.

Os resultados expressos na Tabela 7 representam a atividade antifúngica dos óleos essenciais, quando seus constituintes majoritários estavam ajustados a 100% em cada formulação. Para que a concentração inibitória mínima dos óleos essenciais possa ser analisada, esses valores devem ser multiplicados pelo seu fator de correção e divididos pelo valor da densidade do óleo. Dessa forma, a Tabela 9 traz os valores das CIMs dos óleos essenciais, frente aos fungos em estudo. O fator de correção do óleo de carqueja foi de 4,2 e a densidade 0,972 g/cm³, enquanto os valores para o óleo essencial de orégano foram 3,3 e 0,951g/cm³, respectivamente.

Tabela 9: Suscetibilidade *in vitro* dos fungos *Sporothrix schenckii* e *Sporothrix brasiliensis* frente aos óleos essenciais de *Baccharis trimera* e *Origanum vulgare*

Linhagem fúngica	Óleo essencial de <i>B. trimera</i>		Óleo essencial de <i>O. vulgare</i>	
	CIM	CFM	CIM	CFM
<i>S. schenckii</i> A	540,1	504,1	216,8	433,7
<i>S. schenckii</i> B	2160,5	2160,5	216,8	433,7
<i>S. schenckii</i> ATCC 1099-18	540,1	504,1	433,7	433,7
<i>S. schenckii</i> IPEC 15383	540,1	504,1	1735,0	1735,0
<i>S. brasiliensis</i> ATCC 5110	139,35	504,1	433,7	867,5
<i>S. brasiliensis</i> IPEC 17943	270,06	504,1	867,5	1735,0

CIM: concentração inibitória mínima; resultados expressos como $\mu\text{L/mL}$.

5.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

As micrografias eletrônicas das linhagens *S. schenckii* ATCC 1099-18 e *S. brasiliensis* ATCC 5110, expostas ou não aos fármacos de referência e ao óleo essencial, podem ser visualizadas nas Figuras 16 e 17.

As setas das figuras representam as deformidades das células fúngicas, quando as mesmas entraram em contato com as substâncias testadas.

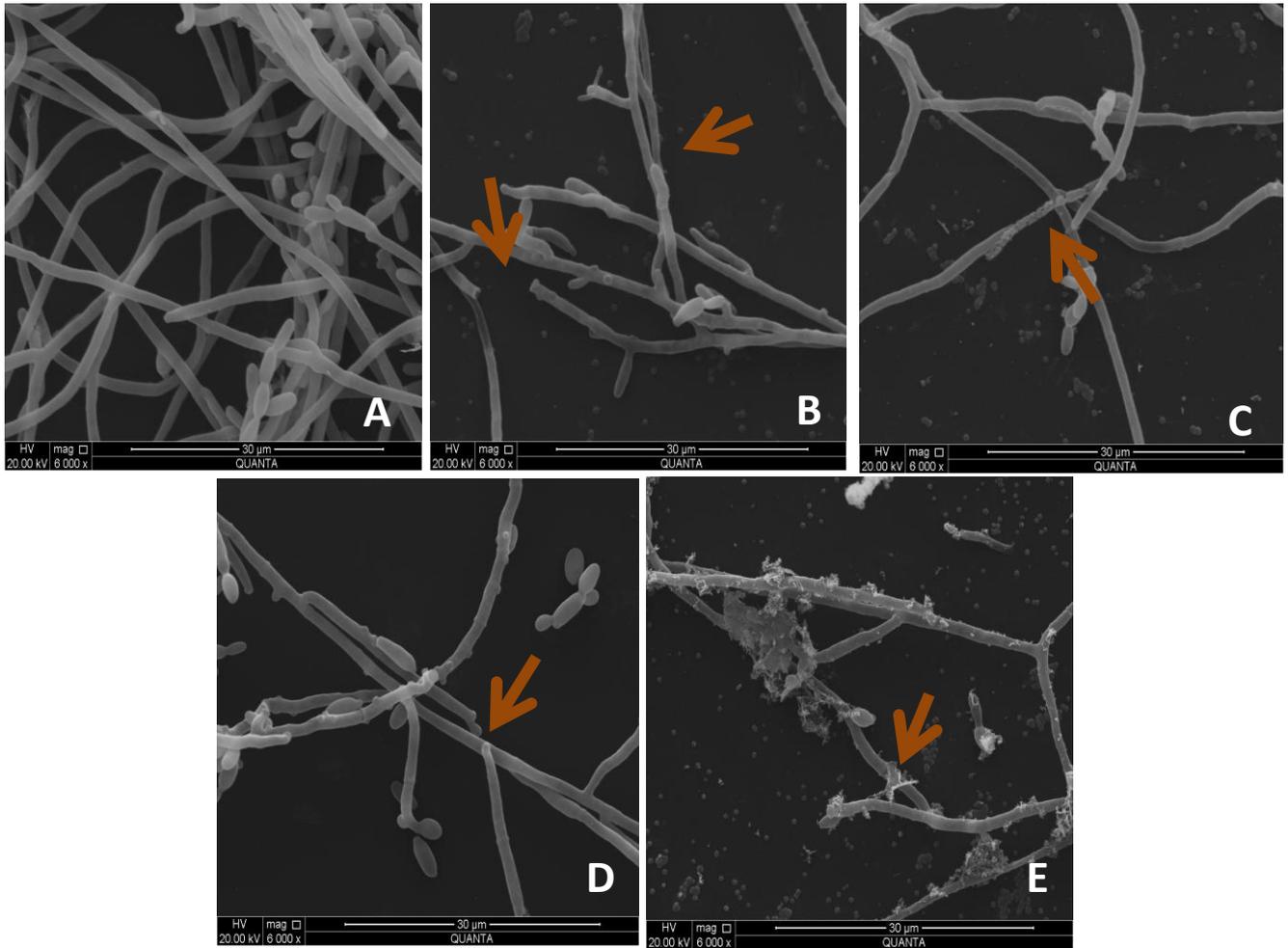


Figura 16: Imagens de microscopia eletrônica de varredura em filamentos do fungo *S. brasiliensis* ATCC 5110 não tratado (A) e tratados com os óleos essenciais de *Baccharis trimera* (B) e *Origanum vulgare* (C), e fármacos de referência Cetoconazol (D) e Anfotericina B (E).

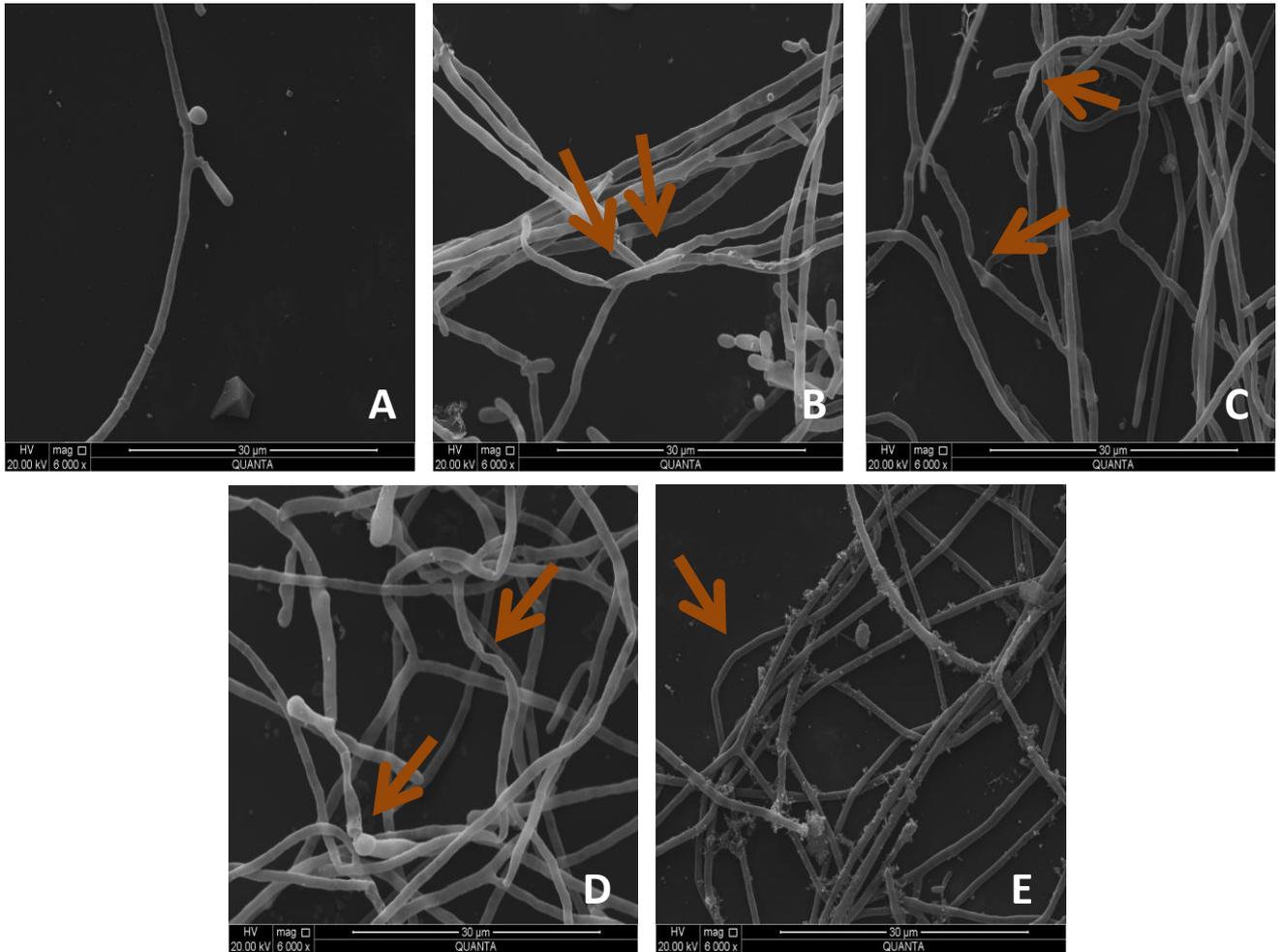


Figura 17: Imagens de microscopia eletrônica de varredura em filamentos do fungo *S. schenckii* ATCC 1099-18 não tratado (A) e tratados com os óleos essenciais de *Baccharis trimera* (B) e *Origanum vulgare* (C), e fármacos de referência Cetoconazol (D) e Anfotericina B (E).

6 DISCUSSÃO

Ao analisar o cromatograma do óleo essencial de *B. trimera* pode-se observar que o composto majoritário foi o β -pineno, apresentando a concentração de 23,4%. Quando se avaliou o perfil cromatográfico do óleo essencial de *O. vulgare*, observou-se o γ -terpineno (30,5%) como componente majoritário. Os compostos supracitados foram assim classificados pois, de acordo com Bakkali e colaboradores (2008), para que um marcador químico seja considerado majoritário, este deve apresentar percentual entre 20 e 70%.

Em um estudo realizado por Simões-Pires e colaboradores (2005) o óleo essencial de *B. trimera* apresentou os constituintes β -pineno, acetato de carquejila e ledol em maior concentração. Como pode ser observado, na Tabela 5 e na Figura 13, os três componentes também foram identificados, sendo que os dois primeiros apareceram em maior quantidade (23,4% e 19%, respectivamente).

Silva e colaboradores (2007) encontraram no óleo essencial de *B. trimera* germacreno D, biciclogermacreno, cariofileno, ledol, globulol e espatulenol, mas não foram encontrados o carquejol, nem o acetato de carquejila. O último é sugerido como o marcador químico do óleo essencial da espécie (MORAIS E CASTANHA, 2011). Neste estudo, o mesmo foi encontrado em uma concentração de 19,0%, representando o segundo componente em maior quantidade na amostra. Tais diferenças entre os constituintes nos diferentes óleos essenciais avaliados podem estar relacionadas aos distintos processos extrativos empregados. Existem também outros fatores, como época de coleta, secagem do material vegetal, clima, solo, que podem proporcionar alterações da composição química de um óleo essencial (CORRÊA *et al.*, 2010).

Como pode ser visualizado na Tabela 6, o óleo essencial de orégano apresentou 17 constituintes detectáveis, porém, os componentes que puderam ser observados em maiores quantidades foram o γ -terpineno (30,5%), carvacrol (15,7%) e 4-terpineol (13%). Cleff e colaboradores (2008) identificaram em seu estudo com o óleo essencial de *O. vulgare* três componentes em maiores concentrações; foram eles o γ -terpineno, 4-terpineol e timol. Souza e colaboradores (2005) encontraram como constituinte majoritário o carvacrol, mas também puderam ser observados compostos como o γ -terpineno e 4-terpineol.

Os principais constituintes do óleo essencial de orégano são o carvacrol, timol, γ -terpineno e *p*-cimeno (ARCILA-LOZANO *et al.*, 2004). Porém, dentre os compostos citados, o timol não foi identificado no óleo essencial utilizado nesta pesquisa. No entanto, a proporção de timol e γ -terpineno no óleo essencial de *O. vulgare* varia durante os meses de florescimento e não florescimento da planta, sendo que o aumento no conteúdo de um dos constituintes é acompanhado de diminuição do outro e vice-versa (RODRIGUES, 2002).

Os compostos γ -terpineno e *p*-cimeno são monoterpenos precursores do carvacrol e timol. Esses dois últimos são fenóis monoterpenóides e isômeros, biossintetizados a partir da mesma rota. Dessa forma, através do metabolismo da planta e de estímulos externos, um composto pode ser produzido em maior quantidade em relação ao outro (DEWICK, 2002). Isso pode justificar, mais uma vez, a ausência do timol no óleo essencial utilizado neste estudo, uma vez que o carvacrol foi o segundo maior componente encontrado na amostra.

Mesmo sendo reconhecidas as propriedades antimicrobianas pertencentes à espécie *Origanum* sp, o mecanismo de ação ainda não está totalmente elucidado. Segundo Lambert e colaboradores (2001), a ação antifúngica ocorre devido à inibição de diferentes enzimas responsáveis pelo metabolismo da planta, principalmente aquelas envolvidas no processo de produção de energia e síntese de componentes. Sugere-se também que a riqueza de compostos fenólicos pode ser responsável por essa intensa atividade antimicrobiana. De fato, os compostos fenólicos são capazes de dissolverem-se dentro da membrana microbiana e desta forma penetrar dentro da célula, onde irá interagir com mecanismos do metabolismo microbiano (SOUZA *et al.*, 2005).

As análises da atividade antifúngica dos óleos essenciais foram realizadas a partir do ajuste das concentrações dos constituintes majoritários à 100%. No entanto, não foram encontradas pesquisas procedidas da mesma forma. Assim, para que os resultados pudessem ser discutidos e comparados com os de outros autores, foram realizados cálculos de conversão, e os valores de CIM dos óleos essenciais podem ser analisados na Tabela 9.

Não foram encontrados na literatura estudos realizados com o óleo essencial de *B. trimera* frente aos fungos do complexo *Sporothrix schenckii*. Apesar disso, Caneschi (2012), Davicino e colaboradores (2007) e Verdi e colaboradores (2005),

pesquisaram o perfil *in vitro* de susceptibilidade de linhagens clínicas de outros fungos filamentosos e, em ambos, o óleo essencial de carqueja demonstrou ação antifúngica.

Cleff e colaboradores (2008) testaram o óleo de *O. vulgare* frente a 7 isolados clínicos de *S. schenckii* e o valor da CIM foi o mesmo para todos os isolados, 250 µL/mL. Ao estabelecer uma comparação com os resultados expostos na Tabela 9, observa-se que somente as linhagens clínicas obtiveram resultados de CIM inferiores aos encontrados por estes autores (216,8 µL/mL). Todas as outras quatro linhagens estudadas apresentaram valores de CIM superiores. Isso pode ser explicado pela composição química do óleo essencial, além das diferenças genéticas e fisiológicas existente entre cada linhagem fúngica.

A classificação da atividade antifúngica de produtos naturais pode ser realizada com base nos valores da CIM. Aquelas inferiores a 100 µL/mL possuem uma ação boa. Entre 100 e 500 µL/mL são classificadas de ação média, e acima de 500 µL/mL, ação fraca (ZAPATA *et al.*, 2010). Pode-se dizer então, que o óleo de *Baccharis trimera* possui uma ação moderada para a espécie *S. brasiliensis* e ação fraca para o *S. schenckii*. O óleo essencial de *Origanum vulgare* possui uma ação antifúngica moderada para três linhagens de *S. schenckii* e uma de *S. brasiliensis*, e ação fraca para uma linhagem de cada espécie estudada. É importante ressaltar que os dois óleos essenciais tiveram ação fungicida frente às seis linhagens estudadas. Isso quer dizer que, os óleos em determinadas concentrações, tiveram a capacidade não só de inibir o crescimento, mas também de matar os fungos.

Os óleos essenciais também foram testados em associações, para que pudesse ser analisado um possível efeito sinérgico. Das três associações realizadas, somente a associação 50%:50% (v/v, carqueja:orégano) apresentou uma diminuição no valor de CIM, frente à linhagem *S. brasiliensis* IPEC 17943. As demais associações não demonstraram melhora no valor da CIM, quando testada com as outras linhagens utilizadas neste estudo.

A avaliação da resistência fúngica aos medicamentos utilizados na terapêutica clínica também é realizada de acordo com os valores de CIM. Aqueles menores ou iguais a 1 µg/mL para anfotericina B e azóis indicam sensibilidade ao agente antifúngico; valores iguais a 2 µg/mL sugerem uma susceptibilidade intermediária; enquanto valores maiores ou iguais a 4 µg/mL indicam resistência (SANTOS, 2012).

A partir dos resultados expostos na Tabela 7, pode ser observado então, que somente duas linhagens apresentaram susceptibilidade aos fármacos. Foram elas as clínicas (A e B), que foram susceptíveis somente ao cetoconazol (CIM= 1,0 µg/mL), sendo que para a anfotericina B, apresentaram susceptibilidade intermediária (CIM = 2,0 µg/mL). É importante ressaltar que as duas linhagens de *S. schenckii*, ATCC 1099-18 e IPEC 15383 foram consideradas resistentes à anfotericina B (CIM = 4,0 µg/mL) e a linhagem *S. brasiliensis* IPEC 17943 foi também resistente ao cetoconazol (CIM = 4,0 µg/mL).

Ao avaliar o perfil *in vitro* de susceptibilidade de três linhagens-padrão do fungo *S. brasiliensis* frente a anfotericina B, Santos (2012) verificou que duas das três linhagens apresentaram resistência ao fármaco, com valores de CIM de 4,0 µg/mL a 16,0 µg/mL. Somente uma linhagem foi considerada sensível (CIM = 1,0 µg/mL).

Quando Alvarado-Ramirez e Torres-Rodriguez (2007) pesquisaram a atividade antifúngica da anfotericina B e do cetoconazol frente à uma linhagem padrão de *S. Schenckii*, encontraram valores de CIM = 1,0 µg/mL para o primeiro e de 0,25 µg/mL para o segundo. É notória a elevação das concentrações inibitórias dos fármacos realizadas neste estudo, quando se trata desse fungo. Esse fato pode indicar maior dificuldade de tratamento da infecção, com indícios de resistência fúngica das linhagens clínicas e padrão aos fármacos citados. No entanto, vale ressaltar que não foram empregadas exatamente os mesmos microorganismos.

As eletromicrografias foram utilizadas para avaliação das alterações morfológicas presentes nas células, quando essas foram expostas aos tratamentos propostos. Nas Figuras 16 A e 17 A, que foram identificadas como controles, podem ser observadas hifas arredondadas, alongadas e conídeos em brotamento.

Quando os isolados foram tratados com o óleo essencial de carqueja (Figuras 16 B e 17 B), foram observadas hifas quebradas, afinadas e partes contorcidas, porém, no tratamento da linhagem *S. brasiliensis* (Figura 16 B), as alterações notadas foram mais pronunciadas. Isso pode ser decorrente ao fato de que a CIM do óleo essencial frente a esse fungo foi menor (32,25 µg/mL).

No tratamento com o óleo essencial de orégano frente ao fungo *S. brasiliensis* (Figura 16 C) constatou-se a presença de hifas finas e em processo de rompimento. Como pode ser observado na Figura 17C, quando o tratamento foi realizado com o

fungo *S. schenckii*, houve um achatamento das hifas, revelando danos à estrutura fúngica, além da presença de células mais finas.

Após serem submetidas ao tratamento com o fármaco de referência cetoconazol, a linhagem *S. brasiliensis* (Figura 16 D) apresentou menos deformidades nas estruturas, quando comparada ao *S. schenckii*. No tratamento desse fungo (Figura 17 D), foram observadas hifas quebradas, com presença de rugosidades e muitas partes contorcidas. Já com o *S. brasiliensis*, notou-se a presença de hifas mais finas e com poucas rugosidades.

Ao analisar a Figura 16 E, nota-se que quando a linhagens de *S. brasiliensis* foi exposta à anfotericina B, houve menos alterações celulares visíveis. Foram identificadas hifas mais finas e com muitas rugosidades, enquanto no tratamento com o fungo *S. schenckii* (Figura 17 E), além dessas alterações, observou-se também muitas células quebradas.

Todas as imagens revelaram que, tanto nos fungos tratados com o óleo de orégano quanto naqueles expostos aos fármacos de referência, houve uma redução no número de estruturas de reprodução aderidas (conídeos). Pode ser observado também que o óleo essencial é capaz de provocar alterações morfológicas nas estruturas fúngicas semelhantes e/ou de maior intensidade que as originadas pelos fármacos de referência.

Quando os fungos *S. brasiliensis* e *S. schenckii*, na forma leveduriforme, foram submetidos à ação de fármacos azóis e anfotericina B puderam ser observadas nas células, alterações em sua largura e comprimento (SANTOS, 2012). Ao analisar as Figuras 16 e 17, verificam-se os mesmos tipos de alterações, o que pode estar relacionado a mudanças na permeabilidade da membrana plasmática. Cox e colaboradores (2000) sugerem que os óleos essenciais sensibilizam a bicamada fosfolipídica da membrana celular do microorganismo, causando um aumento da permeabilidade e perdas de constituintes intracelulares vitais.

Embora os valores de CIM dos óleos essenciais para as linhagens tenham sido maiores que as dos fármacos de referência, o emprego do óleo essencial, por ser uma substância de origem vegetal e ser uma matriz complexa, pode representar um tratamento alternativo para a esporotricose, quer seja como nova opção medicamentosa ou como adjuvante terapêutico. Com o aumento do desenvolvimento de resistência fúngica e o elevado número de reações adversas

(irritações locais, nefrototoxicidade, entre outros) ocasionadas pelo tratamento disponível, como a solução de iodeto de potássio e anfotericina B, o emprego de produtos naturais pode representar uma alternativa para os problemas listados.

Além disso, é importante ressaltar que o óleo essencial de carqueja obteve uma ação moderada quando testado com a linhagem de *S. brasiliensis* IPEC 17943 e, a mesma linhagem apresentou resistência ao cetoconazol, fármaco já utilizado no tratamento da esporotricose. Dessa forma, os resultados obtidos até o momento revelaram-se promissores e estimulam a continuidade da pesquisa.

7. CONCLUSÕES

- Os ensaios *in vitro* com os óleos essenciais demonstraram atividade antifúngica frente às seis linhagens testadas.
- O óleo essencial de *Baccharis trimera* apresentou ação antifúngica considerada moderada para a espécie *S. brasiliensis* e fraca para o *S. schenckii*.
- O óleo essencial de *Origanum vulgare* apresentou uma ação antifúngica considerada moderada para as três linhagens de *S. schenckii* e uma de *S. brasiliensis*, e fraca para uma linhagem de cada espécie estudada.
- Os óleos essenciais tiveram ação fungicida frente às seis linhagens estudadas.
- Os óleos essenciais em associação só demonstraram melhora do valor de CIM frente à linhagem *S. brasiliensis* IPEC 17943, na proporção de 50%:50% (v/v).
- Foi observada, ao microscópio eletrônico de varredura, uma redução no número de conídios quando os fungos foram expostos aos tratamentos com os óleos essenciais, e também com os fármacos de referência.
- Os óleos essenciais foram capazes de provocar alterações morfológicas nas estruturas fúngicas semelhantes e/ou de maior intensidade do que as originadas pelos fármacos de referência.
- A análise conjunta dos dados demonstra o potencial antifúngico dos óleos de orégano e carqueja e estimula a continuação das pesquisa com os mesmos, visando a obtenção de um tratamento alternativo para a esporotricose.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil componets by gas chromatography / mass spectromety**. 4 ed. Illinois: Allured Bussiness Media, 2009. 804p.
- ALMEIDA, L. M. M.; SOUZA, E. A. F.; BIANCHIN, D. B. SVIDZINSKI, T. I. E. Resposta in vitro de fungos agentes de micoses cutâneas frente aos antifúngicos sistêmicos mais utilizados na dermatologia. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, n. 3, p. 249-255, 2009.
- ALVARADO-RAMIREZ, E.; TORRES-RODRIGUEZ, J. M. In vitro susceptibility of *Sporothrix schenckii* to six antifungal agents determined using three different methods. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 51, n. 7, p. 2420-2423, 2007.
- 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 and Microbiology Infection**, v. 15, n. 7, p. 651-655, 2009.
- ARCILA-LOZANO, C. C.; LOARCA-PIÑA, G.; LECONA-URIBE, S.; ELVIRA, G. M. El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v. 54, n.1, p. 100-111, 2004.
- ARENAS, R.; MORENO-COUTIÑO, G.; WELSH, O. Classification of subcutaneous and systemic mycoses. **Clinics in Dermatology**, v. 30, n. 4, p. 369-371, 2012.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.
- BARAN, R.; NAKAMURA, R. **Doenças da unha: do diagnóstico ao tratamento**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. 245p.
- BARROS, M. B. L.; PAES, R. A.; SCHUBACH A. O. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 4, p. 633-654, 2011.
- BARROS, M. B. L.; SCHUBACH, T. P.; COLL, J. O.; GREMIÃO, I.; WANKE, B.; SCHUBACH, A. Esporotricose: a evolucao e os desafios de uma epidemia. **Revista Panamericana de Salud Publica**, v.27, n.6, p. 455-460, 2010.

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

BERDICHEVSKI, R. H. **Nefrotoxicidade associada à anfotericina B em pacientes de baixo risco**. 2002. 71f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas: Nefrologia), Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2002.

BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009.

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

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Detecção e identificação dos fungos de importância médica**. Módulo VIII. 2013. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/>>. Acesso em: 23 abr. 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Orientações sobre vigilância da esporotricose no estado do Rio de Janeiro**. 2011. Disponível em <<http://www.riocomsaude.rj.gov.br/Publico/MostrarArquivo.aspx?C=jpRMYgOCNUI%3D>>. Acesso em: 23 jul. 2013.

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.

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

CARMO, E. S.; LIMA, E. O.; SOUZA, E. L. O potencial de *Origanum vulgare* L. (*Lamiaceae*) de óleo essencial na inibição do crescimento de alguns alimentos relacionadas com *Aspergillus* espécies. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 362-367, 2008.

CASTILHO, A. R.; MURATA, R. M.; PARDI, V. Produtos naturais em odontologia. **Revista Saúde - UNG**, v. 1, n. 1, p. 12-19, 2007.

CLEFF, M. B.; MEINERZ, A. R. M.; SCHUCH, L. F. D.; RODRIGUES, M. R. A.; MEIRELES, M. C. A.; MELLO, J. R. B. Atividade in vitro do óleo essencial de *Origanum vulgare* frente à *Sporothrix Schenckii*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 2, p. 513-516, 2008.

CLEFF, M. B.; MEINERZ, A. R.; XAVIER, M.; SCHUCH, L. F. D.; MEIRELES, M. C. A.; RODRIGUES, M.R.A.; MELLO, J.R.B.. In vitro a atividade de *Origanum vulgare* óleo essencial contra *Candida* espécies. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 116-123, 2010.

CLINICAL AND LABORATORY AND STANDARDS INSTITUTE. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved Standard M38-2A**. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, 2008.

CORDEIRO F. N.; BRUNO C. B.; DE PAULA C.D.R.; MOTA, J. A. C. Ocorrência familiar de esporotricose zoonótica. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 4, p. 121-124, 2011.

CORRÊA, R. M.; PINTO, J. E. B. P.; REIS, E. S.; COSTA, L. C. B.; ALVES, P. B.; NICULAN, E. S.; BRANT, R. S. Adubação orgânica na produção de biomassa de plantas, teor e qualidade de óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L.) em cultivo protegido. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 1, p. 80-89, 2010.

COX, S. D.; MANN, C. M.; MARKHAM, J. L. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **Journal Applied of Microbiology**, v. 88, p. 170-175, 2000.

CRIADO P. R.; DE OLIVEIRA C. B.; DANTAS K. C.; TAKIGUTI, F. A.; BENINI, L. V.; VASCONCELLOS, C. Micoses superficiais e os elementos da resposta imune. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 4, p. 726-731, 2011.

CRUZ, L. C. H. Complexo *Sporothrix schenckii*. Revisão de parte da literatura e considerações sobre o diagnóstico e a epidemiologia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 20, n. 65, p. 08-28, 2013.

DAVICINO, R.; MATTAR, M. A.; CASALI, Y. A.; GRACIELA, S.; MARGARITA, E.; MICALIZZI, B. Antifungal activity of plant extracts used in folk medicine in Argentina. **Revista Peruana de Biología**, v. 14, n. 2, p. 247-251, 2007.

DELACRÉTAZ, J.; GRIGORIU, D.; DUCCEL, G. **Atlas de micologia médica**. São Paulo: Manole, 1978. p. 180.

DEWICK P. M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic approach**. 2 ed. New York: John Wiley & Sons Ltd, 2002. 507p.

DIXON, D. M.; 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.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. **Comunicação e informação**. 2012. Disponível em: <<http://portal.fiocruz.br/pt-br/content/doen%C3%A7a-que-afeta-principalmente-os-gatos-se-torna-end%C3%AAmica-no-rio-de-janeiro>>. Acesso em: 24 jul. 2013.

FONTENELLE, R.O.S.; MORAIS, S.M.; BRITO, E.H.S.; KERNTOPF, M. R.; BRILHANTE, R. S.; CORDEIRO, R. A.; TOMÉ, A. R.; QUEIROZ, M. G.; NASCIMENTO, N. R.; SIDRIM, J. J.; ROCHA, M. F. Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, n. 5, p. 934-940, 2007.

GUIMARÃES, P. I. C.; OLIVEIRA, R. E. C.; ABREU, R. G. Extrairdo óleos essenciais de plantas. **Química Nova**, v. 11, n. 1, p. 45-46, 2000.

JANZANTTI; N. S.; FRANCO, M. R. B.; WOSIACKI, G. Efeito do processamento na composição de voláteis de suco clarificado de maçã Fuji. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 3, p. 523-528, 2003.

KARAM, T. K.; DALPOSSO, L. M.; CASA, D. M.; FREITAS, G. B. L. Carqueja (*Baccharis trimera*): utilização terapêutica e biossíntese. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 2, p. 280-286, 2013.

LA HOZ, R. M.; BADDLEY, J. W. Subcutaneous fungal infections. **Current Infectious Disease Reports**, v. 14, n. 5, p. 530-539, 2012.

LAMBERT, R. J. W.; SKANDAMIS, P. N.; COOT, P. J. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal Applied of Microbiology**. v. 91, n. 3, p. 453-462, 2001.

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.

MACHADO, J. A. C.; ROCHA, J. R.; SANTOS, L. M.; OLIVEIRA, A. C.; ANTÔNIO, N. S.; CANESIN, R.; PEREIRA, R. E. P. Principais agentes etiológicos causadores de micoses cutâneas em equinos. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 6, n. 11, 2008.

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.

MANFRINI R. M. **Síntese de derivados de n-acetilglicosamina e investigação de sua atividade antimicrobiana**. 2007. 149f. Dissertação (Mestrado em Ciências Exatas), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

MARQUES, S. A.; FRANCO, S. R. V. S.; DE CAMARGO, R. M. P.; DIAS, L. D. F.; HADDAD JUNIOR, V.; FABRIS, V. E. Esporotricose do gato doméstico (*Felis catus*): Transmissão humana. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 35, n. 4, p. 327-330, 1993.

MEDLEAU, L., HNILICA, A. K., **Dermatologia de pequenos animais**: Atlas colorido e guia terapêutico. São Paulo: Roca, 2003. 354p.

MITCHELL, T. G. Micologia: Micologia médica. In: BROOKS, G. F.; CARROLL, K. C.; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A. **Microbiologia médica**. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2009. p. 621-659.

MITCHELL, T. C.; STAMFORD, T. L. M.; DE SOUZA E. L.; LIMA, E. O.; CARMO, E. S. *Origanum vulgare* L. óleo essencial como inibidor do potencial toxigênico *Aspergillus*. **Ciência Tecnologia Alimentos**, v. 30, n. 3, p. 755-760, 2010.

MORAIS, L. A. S.; CASTANHA, R. F. Composição química do óleo essencial de duas amostras de carqueja (*Baccharis* sp.) coletadas em Paty do Alferes – Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. esp, p. 628-632, 2011.

MUNIZ, A. S.; PASSOS, J. P. Esporotricose humana: conhecendo e cuidando em enfermagem. **Revista de Enfermagem**, v. 17, n. 2, p. 268-272, 2009.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia médica**. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. 945p.

NEVES R. C. S. M.; CRUZ, F. A. C. S.; LIMA, S. R.; TORRES, M. M.; DUTRA, V.; SOUSA, V. L. F. Retrospectiva das dermatofitoses em cães e gatos atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Mato Grosso, nos anos de 2006 a 2008. **Ciência Rural**, v. 41, n. 8, p.1405-1410, 2011.

NOBRE, M. O.; NASCENTE, P. S.; MEIRELES, M. M.; FERREIRO, L. Drogas antifúngicas para pequenos e grandes animais. **Ciência Rural**, v. 32, n.1, p.175-184, 2002.

NUNES, C. F., ESCOSTEGUY, C. C. Esporotricose humana associada à transmissão por gato doméstico. Relato de caso e revisão de literatura. **Revista de Educação Continuada do Clínico Veterinário de Pequenos Animais**, n. 54, p. 66-68, 2005.

PAUW, B.E. New antifungal agents and preparations. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 16, n. 2, p. 147-150, 2000.

PIMENTEL, I. C.; FIGURA, G.; AUER, C. G. Fungos endofíticos associados a acículas de *Pinus taeda*. **Summa Phytopathologica**, v. 36, n. 1, p. 85-88, 2010.

PEREIRA, F. O. **Atividade antifúngica do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor sobre dermatófitos do gênero *Trichophyton***. 2009. 119f. Dissertação (Mestrado em Veterinária), Universidade Federal de Pernambuco, João Pessoa, 2009.

PONNUSAMY, K.; PETCHIAMMAL, C.; MOHANKUMAR, R.; HOOPER, W. In vitro antifungal activity of indirubin isolated from a South Indian ethnomedicinal plant *Wrightia tinctoria* R. Br. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 132, n. 1, p. 349-354, 2010.

PROBST, I. S. **Atividade antibacteriana de óleos essenciais e avaliação de potencial sinérgico**. 2012. 112f. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada), Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2012.

PUPO, M. T.; GALLO, M. B. C.; VIEIRA, P. C. Biologia química: uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais. **Química Nova**, v. 30, n. 6, p.1446-1455, 2007.

QUEIROZ-TELLES, F.; MCGUINNIS, M. R.; SALKIN, I.; JOHN, R.; GRAYBILL, M. D. Subcutaneous mycoses. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 17, p. 59-85, 2003.

RASOOLI, I.; ABYANEH, M. R. Efeito inibitório de óleos de tomilho sobre o crescimento e produção de aflatoxinas por *Aspergillus parasiticus*. **Food Control**, v. 14, n. 6, p. 479-483, 2004.

RODRIGUES, M. R. A. **Estudo dos óleos essenciais presentes em manjerona e orégano**. 2002. 181 f. Tese (Doutorado em Química), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

RODRIGUES, A. M.; TEIXEIRA, M. 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. **Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 6, p. 2281-2295, 2013.

ROMERO-CABELLO, R.; BONIFAZ, A.; ROMERO-FEREGRINO, R.; SÁNCHEZ, C. J.; LINARES, Y.; ZAVALA, J.T.; ROMERO, L. C.; ROMERO-FEREGRINO, R.; VEJA, J. T. Disseminated sporotrichosis. **BMJ Case Reports**, v. 10, n. 25, p. 1136, 2011.

ROSA, A. C. M.; 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, p. 451-459, 2005.

SAMALAIA, M. O.; ABDULLAHI, K. Cutaneous manifestations of deep mycosis: an experience in a tropical pathology laboratory. **Indian Journal of Dermatology**, v. 56, n. 3, p. 282-286, 2011.

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

SCHUBACH, T. M. P.; SCHUBACH, A. O.; REIS, R. S.; CUZZI-MAYA, T.; BLANCO, T.C.; MONTEIRO, D.F.; BARROS, B.M.; BRUSTEIN, R.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R.M.; FIALHO MONTEIRO, P.C.; WANKE, B. *Sporothrix schenckii* isolated from domestic cats with and without sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil. **Mycopathologia**, v. 153, n. 2, p. 83-86, 2001.

SCHUBACH, T.M. **Estudo clínico, laboratorial e epidemiológico da esporotricose felina na região metropolitana do Rio de Janeiro**. 2004. 66p. Tese (Doutorado em Biologia Parasitária), Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2004.

SCHUBACH, A. O.; BARROS, M. B.L.; SCHUBACH, T. M. P.; FRANCESCONI-DO-VALLE, A.C.; GUTIERREZ-GALHARDO, M.C.; SUED, M.; SALGUEIRO, M.; FIALHO-MONTEIRO, P.C.; REIS, R.S.; MARZOCHI, K.B.; WANKE, B.; CONCEIÇÃO-SILVA, F. Primary conjunctival sporotrichosis: two cases from a zoonotic epidemic in Rio de Janeiro, Brazil. **Cornea Journal**, v. 24, n. 4, p.491-493, 2005.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 388p.

SILVA, D. C. M. N. **Determinação experimental de parâmetros de processo na extração supercrítica de óleo essencial de carqueja (*Baccharis trimera* Less)**. 2004. 130f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

SILVA, F.; PARK, K. J.; MAGALHÃES, P. M.; MARTINS, G. N.; GAMA, E. V. S. Avaliação do teor de óleo essencial de *Baccharis trimera* (Less.) DC. em diferentes embalagens durante o armazenamento. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 1, p. 54-58, 2013.

SILVA, F. G.; NASCIMENTO, V. E.; PINTO, J. E. B. P.; OLIVEIRA, C. B. A.; SANTOS, M. R.; FERRI, P. H. Influência do processamento pós-colheita e armazenamento na composição química da droga vegetal e do óleo essencial de carqueja [*Baccharis trimera* (Less) D.C.] **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 4, p. 436 - 442, 2010.

SILVA, F. G.; OLIVEIRA, C. B. A.; PINTO, J. E. B. P.; NASCIMENTO, V. E.; SANTOS, S. C.; SERAPHIN, J. C.; FERRI, P. H. Seasonal variability in the essential oils of wild and cultivated *Baccharis trimera*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 5, p. 990-997, 2007.

SILVA, F. M. **Potencial antifúngico de extratos de plantas medicinais do cerrado brasileiro**. 2008. 222f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas), Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

SIMÕES-PIRES, C. A.; DEBENEDETTI, S.; SPEGAZZINI, E.; MENTZ, S. A.; MATZENBACHER, N. I.; LIMBERGER, R. P.; HENRIQUES, A. T. Investigation of the essential oil from eight species of *Baccharis* belonging to sect. Caulopterae

(Asteraceae, Astereae): a taxonomic approach. **Plant Systematics and Evolution**, v. 253, n. 4, p. 23-32, 2005.

SOARES, B. V. **Estudo fitoquímico e antifúngico de extratos de plantas contra *Microsporium canis* e *Candida* spp. Isolados de cães**. 2008. 98f. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias). Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2008.

SOUZA, E. L.; STAMFORD, T. L. M.; LIMA, E. O.; TRAJANO, V. N.; BARBOSA FILHO, J. M. Orégano (*Origanum vulgare* L., Lamiaceae): uma especiaria como potencial fonte de compostos antimicrobianos. **Revista Higiene Alimentar**, v. 19, n. 132, p. 40-45, 2005.

SOUZA-MOREIRA, T. M.; SALGADO, H. R. N.; PIETRO, R. C. L. R. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 3, p. 435-440, 2010.

SOUZA, L. K. H.; OLIVEIRA, C. M. A.; FERRI, P. H.; SANTOS, S. C.; OLIVEIRA JUNIOR, J. G.; MIRANDA, A. T. B.; LIÃO, L. M.; SILVA, M. R. R. Antifungal properties of brazilian cerrado plants. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, n. 3, p. 247-249, 2002.

STOPIGLIA, C. D. O.; VIANNA, D. R.; MEIRELLES, G. C.; TEIXEIRA, H.; VON POSER, G. L.; SCROFERNEKER, M. L. Antifungal activity of Pterocaulon species (Asteraceae) against *Sporothrix schenckii*. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 21, n. 3, p.169-172, 2011.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10 ed. Porto Alegre: Artmed, 2011. 964p.

VENTUROSO, L. R.; BACCHI, L. M. A.; GAVASSONI, L.; CONUS, L. A.; PONTIM, B. C. A.; BERGAMIN, A. C. Atividade antifúngica de extratos vegetais sobre o desenvolvimento de fitopatógenos. **Summa Phytopathol**, v. 37, n. 1, p.18-23 , 2011.

VERA-CABRERA, L.; SALINAS-CARMONA, M. C.; WAKSMAN, N.; MESSEGUER-PÉREZ, J.; CANDIANI, J. O.; WELSH, O. Host defenses in subcutaneous mycoses. **Clinics in Dermatology**, v. 30, n. 4, p. 382–388, 2012.

VERDI, L. G.; BRIGHENTE, I. M. C.; PIZZOLATI, M. G. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): Aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Química Nova**, v. 28, p. 85-94, 2005.

VERMA, S.; VERMA, G. K.; SINGH, G.; KANGA, A.; SHANKER, V.; SINGH, D.; GUPTA, P.; MOKTA, K.; SHARMA, V. Sporotrichosis in Sub-Himalayan India. **Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 6, p. 1673-1676, 2012.

WANKE, B.; TRILLES, L.; LAZÉRA, M.S. **Classificação e características gerais dos fungos patogênicos para o homem**. In: COURA, J.R. (Org.). Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. p. 1137- 1142.

WINN JÚNIOR, W.; ALLEN, S.; JANDA, W.; KONEMANN, E.; PROCOP, G.; WOODS, G. **Diagnóstico microbiológico**: texto e atlas colorido. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 1565p.

XAVIER, M. O.; NOBRE, M. O.; SAMPAIO JUNIOR, D. P.; ANTUNES, T. A.; NASCENTE, P. S.; SÓRIA, F. B. A.; MEIRELES, M. C. A. Esporotricose felina com envolvimento humano na cidade de Pelotas, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v. 34, n. 6, p.1961-1963, 2004.

XAVIER, M.V.A.; BRITO, S.S.S.; OLIVEIRA, C.R.F.; MATOS, C. H. C.; PINTO, M. A. D. S. C. Óleo essencial de *Baccharis trimera* (Less.) DC. sobre o potencial fisiológico de sementes de feijão caupi. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n.esp., p. 214-217, 2012.

ZHANG, Z.; LIU, X.; LV, X.; LIN, J. Variation in genotype and higher virulence of a strain of sporothrix schenckii causing disseminated cutaneous sporotrichosis. **Mycopathologia**, v. 172, n. 6, p. 439-446, 2011.

ZAPATA, B.; DURAN, C.; STASHENKO, E.; BETANCUR-GALVIS, L.; MESA-ARANGO, A. N. Actividad antimicótica y citotóxica de aceites esenciales de plantas de la familia *Asteraceae*. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 27, n. 2, p. 101-103, 2010.

ANEXOS

Anexo A- Laudo de Análise do óleo essencial de *Baccharis trimera*.

UFMG

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



CERTIFICADO DE ANÁLISE QUÍMICA

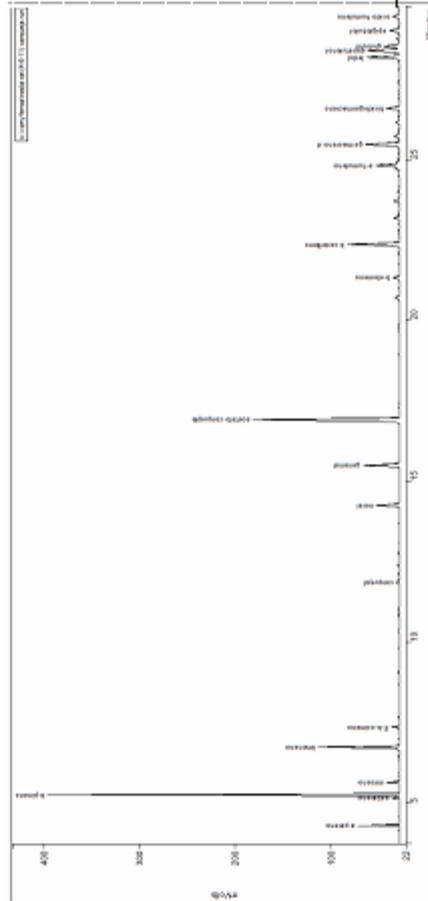
Composição Química:

Solicitante: Profa. Nádia Raposo - UFJF

ÓLEO ESSENCIAL DE CARQUEJEJA AMARGA

Nome comercial: óleo de carquejeja amarga
 Nomenclatura botânica: *Baccharis trimera*
 Lote: BATRIQ111
 Extração: destilação por arraste a vapor
 Parte da planta: folhas

IK	Constituinte	ID	%
928	α-pineno		2,2
967	sabineno		0,5
973	β-pineno		23,4
986	mirreno		0,8
1021	limoneno		5,9
1039	E-β-ocimeno		0,6
1150	carquejalol		0,4
1231	neral		2,3
1258	geraniol		4,1
1295	acetato carquejilla		19,0
1388	β-elemeno		0,8
1412	β-cariofileno		6,4
1477	α-humuleno		3,1
1494	germacreno d		5,0
1523	biciclogermacreno		1,6
1563	ledol		4,6
1569	espatuleno		4,4
1575	globulol		2,3
1586	epiglobulol		1,3
1596	óxido humuleno		1,0



Obs: Picos menores que 0,1% foram excluídos

Método de análise:
 Cromatografia Gasosa de Alta Resolução, Cromatógrafo a Gás HP 6890,
 Coluna: BP1 30m x 0,25mm (HP), Tempo: 60°C (1min), 3°C/min, até 220°C, Injetor: 220°C
 Split: 1/50, Detector FID: 220°C, Volume de injeção: 1 µl (conc 0,5% em clorofórmio)

Dra. Vany Ferraz
 Laboratório de Cromatografia
 Departamento de Química – UFMG
 vanyferraz@ufmg.br
 Belo Horizonte, 13/04/2011

Av. Antônio Carlos, 6527-Campus-Pampulha-Belo Horizonte/MG-Brasil • Cep:31.270-901

Anexo B- Laudo de Análise do óleo essencial de *Origanum vulgare*.

UFMG

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



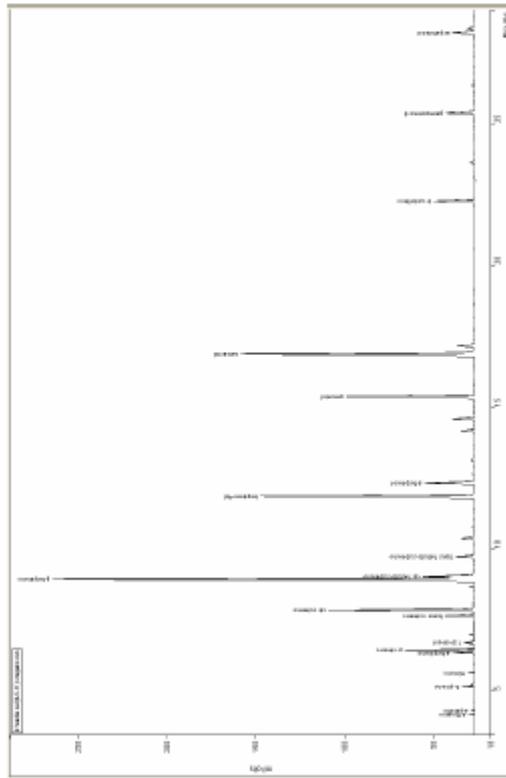
CERTIFICADO DE ANÁLISE QUÍMICA

Solicitante: Nádia Raposo

ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO CO₂-SE

Nome comercial: óleo de orégano
 Nomenclatura botânica: *origanum vulgare*
 Lote: 660-411
 Extração: destilação por arraste a vapor
 Parte da planta: folhas

Composição Química:		
Pico	Constituinte ID	%
1	β-pineno	0,4
2	miroceno	0,2
3	α-terpineno	0,8
4	p-cimeno	2,5
5	1,8-cineol	0,5
6	trans ocimeno	1,3
7	cis ocimeno	7,0
8	γ-terpineno	30,5
9	c-hidrato sabineno	2,8
10	l-hidrato sabineno	1,0
11	terpinen-4ol	13,0
12	α-terpineol	2,9
13	geraniol	7,1
14	carvacrol	15,7
15	β-cariofilen	2,5
16	germacreno d	1,9
17	espatulendiol	1,5



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: 60°C, Injetor: 220°C
 Split: 1/50, Detector FID: 220°C, Volume de injeção: 1 ul (conc 0,5 % em clorofórmio)


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

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