



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

NATALYA FECHINE SILVA

**ESTRATÉGIAS DE ESTOCAGEM DE *Sporothrix* spp. E ANÁLISE DA
SENSIBILIDADE DAS CEPAS ANTE AOS DERIVADOS TERPÊNICOS
FARNESOL E TERPINEN-4-OL *IN VITRO***

FORTALEZA/CE

2014

NATALYA FECHINE SILVA

**ESTRATÉGIAS DE ESTOCAGEM DE *Sporothrix* spp. E ANÁLISE DA
SENSIBILIDADE DAS CEPAS ANTE AOS DERIVADOS TERPÊNICOS
FARNESOL E TERPINEN-4-OL *IN VITRO***

Dissertação submetida ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Médicas, da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante.

Co-orientador: Prof. Dr. José Júlio Costa Sidrim – UFC

FORTALEZA/CE

2014

NATALYA FECHINE SILVA

**ESTRATÉGIAS DE ESTOCAGEM DE *Sporothrix* spp. E ANÁLISE DA
SENSIBILIDADE DAS CEPAS ANTE AOS DERIVADOS TERPÊNICOS
FARNESOL E TERPINEN-4-OL *IN VITRO***

Dissertação submetida ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Médicas, da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Aprovada em:

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha
Universidade Estadual do Ceará

Profa. Dra. Tereza de Jesus Pinheiro Gomes Bandeira
Faculdade Christus

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, ao meu esposo Antônio Juscelino, aos meus pais Socorro Fechine e José Ueides e aos meus irmãos que sempre me incentivaram na busca dos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela conclusão de mais uma fase de minha vida, por estar sempre ao meu lado, guiando, dando saúde e iluminando meus passos.

À banca examinadora, por ter aceitado participar da avaliação deste trabalho.

Ao Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM), da Universidade Federal do Ceará.

De modo especial, à prof^a Dr^a Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante, pelo constante apoio na execução deste trabalho. Obrigada pela orientação, amizade, confiança e incentivos constantes.

Ao Prof. Dr. José Júlio Costa Sidrim, pelos ensinamentos e pela oportunidade de trabalhar no Centro Especializado em Micologia Médica.

Ao Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha, por sua imensa dedicação e orientação na correção dos artigos científicos.

À Profa Dra. Rossana de Aguiar Cordeiro, pelo incentivo, esclarecimento de dúvidas e ensinamentos transmitidos.

À Profa Dra. Tereza Bandeira pela transmissão de seus conhecimentos para melhor entendimento dos trabalhos no CEMM, pelos seus gestos de carinho e incentivos.

Ao prof. Dr. André Jalles Monteiro, pelo estudo estatístico realizado neste trabalho.

Ao prof. Dr. Zoilo Pires de Camargo, por ceder as cepas de *Sporothrix* spp. para realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas (PPGCM), da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Ceará.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPQ, pelo apoio financeiro.

As secretárias do programa de pós-graduação em Ciências Médicas, Ivone Mary Fontenele de Sousa e Rita de Cássia de Almeida Antunes, por tudo que fizeram por mim.

A todos os companheiros do CEMM, pelo aprendizado e pelos momentos de descontração. Em especial, à Érica Pacheco Caetano, que me ensinou no início dos experimentos e pela

amizade e carinho que cativamos uma pela outra, à Rita Amanda Chaves de Lima, pelas correções dos trabalhos, pelas caronas oportunas, pelo carinho que teve por mim esse tempo todo, à Angela Donato Maia Malaquias, à Francisca Jakelyne de Farias Marques, que me ensinaram nos experimentos e nas correções dos trabalhos, sempre se fizeram presentes nos momentos de alegrias e tristezas e não mediram esforços para me ajudar na conclusão do meu mestrado. À Dra. Silviane Praciano Bandeira por ter me ajudado na leitura da contagem dos conídios e à Giovanna Riello Barbosa por ter me auxiliado nos testes de sensibilidade e à Débora Castelo Branco pela troca de conhecimentos e esclarecimentos de dúvidas em relação às correções dos trabalhos. Devo parte dessa vitória a vocês.

Aos técnicos do CEMM Terezinha de Jesus Santos Rodrigues e Daniel Texeira de Lima por todo o auxílio durante a realização deste trabalho.

Ao meu esposo Antônio Juscelino que acompanhou todo o trajeto do meu mestrado, sempre me dando o apoio necessário. Suas vitórias também me inspiraram e seu amor deixou a minha vida mais bela.

Aos meus pais José Ueides Silva e Maria do Socorro Fachine Silva, por serem sempre o alicerce da minha vida. Pela educação, carinho e toda a dedicação que tiveram por mim.

Aos meus queridos irmãos, José Ueides Fachine Júnior, Paulo Henrique Fachine Silva e Ana Carolina Fachine Silva que sempre estiveram ao meu lado. Obrigada pela confiança, amizade e pelas conquistas alcançadas até hoje.

*Nas grandes batalhas da vida,
o primeiro passo para vitória é o desejo de vencer.*

Mahatma Gandhi

RESUMO

A esporotricose é uma micose subcutânea que acomete humanos e animais, causada pelos fungos dimórficos do gênero *Sporothrix*. A estocagem de tais micro-organismos em coleções de culturas se faz necessária para o monitoramento das cepas de *Sporothrix* spp. ao longo dos anos. Apesar da existência de terapias antifúngicas eficazes contra esta doença, a busca por novas drogas para o tratamento se faz necessária. Compostos como farnesol e terpinen-4-ol foram testados frente a leveduras e fungos filamentosos e têm demonstrado um amplo espectro antifúngico. Desta maneira, o presente trabalho teve por objetivo buscar novas estratégias de preservação do patrimônio biológico e genético de espécies do gênero *Sporothrix*, avaliar a atividade inibitória *in vitro* de farnesol e terpinen-4-ol frente a cepas de *Sporothrix* spp., bem como avaliar os mecanismos de ação desses compostos. Em relação à estocagem foram utilizadas 20 cepas de *Sporothrix* spp. nas seguintes condições: em solução salina (NaCl a 0,9%) à 4 °C, glicerol 10% acrescido de lactose 10% e glicerol 10% acrescido de sacarose 10% mantidas nas temperaturas de -20 °C e -80 °C, estocadas nos intervalos de tempo de 3, 6 e 9 meses. A viabilidade das cepas foi avaliada através dos aspectos macro e micromorfológicos. Para tanto, as amostras foram repicadas em ágar batata e, após sete dias de incubação a 28 °C foram avaliados quanto à textura e pigmentação das cepas. Para a análise micromorfológica foi feita a contagem de conídios, tendo como referência os seguintes intervalos de 0-10, 10-50, 50-100 e >150 conídios. Para a análise da atividade inibitória dos compostos foram utilizadas 40 cepas de *Sporothrix* spp. na fase filamentosa. O estudo foi desenvolvido utilizando ensaio de microdiluição em caldo, descrito no documento M38-A2, padronizado pelo CLSI. Para a investigação do mecanismo de ação das drogas em relação à permeabilidade da membrana celular, foram utilizadas 16 cepas de *Sporothrix* spp. e realizadas leituras em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de $\lambda = 260$ nm, com intuito de verificar a quantidade de ácido nucleico e $\lambda = 280$ nm, com intuito de verificar a quantidade de proteína liberada no meio. As cepas de *Sporothrix* spp. apresentaram viabilidade de 100% para o crescimento em ágar batata em todas as condições de estoque testadas, enquanto que em relação à contagem de conídios os métodos de estoque que apresentaram melhor resultado foram a solução salina a 4°C, glicerol acrescido de lactose e glicerol acrescido de sacarose mantidos a -20°C. Os derivados terpênicos farnesol e terpinen-4-ol inibiram todos os isolados de *Sporothrix* spp. testados com valores de CIM variando de 0,015 a 1,0 μ M para o farnesol (média geométrica de 0,09) e de 0,57 a 9,27 mM para terpinen-4-ol (média geométrica de 2,35). Os valores CFM variaram entre de 0,125 a 4,0 μ M e de 1,15 a 37,1 mM para farnesol e terpinen-4-ol, respectivamente. Farnesol foi o composto mais ativo para as todas as cepas de *Sporothrix*. Não houve perda significativa de material intracelular após tratamento das células fúngicas com concentrações de CIM e CIM/2 dos terpenos testados quando comparados com as correspondentes amostras não tratadas. Dessa forma, foi possível observar que os terpenos não apresentaram capacidade de lise frente às células de *Sporothrix*, o que sugere que seu principal mecanismo de ação não está relacionado com danos irreversíveis na estrutura da membrana celular. Assim, novos estudos são necessários para melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na atividade antifúngica dos terpenos avaliados.

Palavras-chave: *Sporothrix* spp., estocagem, teste de sensibilidade, farnesol, terpinen-4-ol e mecanismo de ação.

ABSTRACT

Sporotrichosis is a subcutaneous mycosis that affects humans and animals caused by the dimorphic fungi of the genus *Sporothrix*. The storage of such microorganisms in culture collections is necessary to monitor the strains of *Sporothrix* spp. over the years. Despite the existence of effective antifungal therapies against this disease the search for new drugs for the treatment is necessary. Compounds such as farnesol and terpinen-4-ol have been tested against yeasts and filamentous fungi and have shown a broad antifungal spectrum. Thus, the present study aimed to seek new strategies for the preservation of biological and genetic patrimony of the genus *Sporothrix*, evaluate the *in vitro* inhibitory activity of farnesol and terpinen-4-ol against strains of *Sporothrix* spp., as well as evaluating the mechanisms of action of these compounds. Regarding the storage, 20 *Sporothrix* spp. strains were used and stocked under the following conditions: saline (0.9% NaCl) at 4 °C, 10% glycerol plus 10% lactose and 10% glycerol plus 10% sucrose maintained at -20 °C and -80 °C, stocked in intervals of 3, 6 and 9 months. The viability of the strains was evaluated by the macro and micromorphological aspects. For this purpose, the samples were subcultured in potato agar for seven days at 28 °C and evaluated for texture and pigmentation of the strains. For the micromorphological analysis, conidia count was performed using the ranges of 0-10, 10-50, 50-100 and >150 conidia as reference ranges. 40 *Sporothrix* spp. strains in the filamentous phase were used for the analysis of the inhibitory activity of the terpenes. The study was conducted using broth microdilution assay, described in M38-A2 document, standardized by CLSI. 16 *Sporothrix* spp. strains were used for the investigation of the mechanism of action of the terpenes in relation to the cell membrane permeability and readings were performed in a spectrophotometer at a wavelength of $\lambda=260$ nm, in order to verify the amount of nucleic acid and at $\lambda=280$ nm, in order to verify the amount of protein released into the medium. *Sporothrix* spp. strains showed 100% viability for growth on potato agar in all stock conditions tested, while in relation to the conidia count the stock methods that showed better results were saline at 4 °C, glycerol plus lactose and glycerol plus sucrose kept at -20 °C. The terpenes farnesol and terpinen-4-ol inhibited all *Sporothrix* spp. isolates tested with MIC values ranging from 0.015 to 1.0 mM for farnesol (geometric mean of 0.09) and 0.57 to 9.27 mM for terpinen-4-ol (geometric mean of 2.35). CFM values ranged between 0.125 to 4.0 mM and 1.15 to 37.1 mM for farnesol and terpinen-4-ol, respectively. Farnesol was the most active compound for all *Sporothrix* strains. There was no significant loss of intracellular material after treatment of fungal cells with concentrations of MIC and MIC/2 of terpenes tested when compared to the corresponding untreated samples. Therefore, it was observed that the terpenes showed no ability to lyse the *Sporothrix* cells, suggesting that its main mechanism of action is not associated with irreversible damage to the cell membrane structure. Thus, further studies are needed to better understand the mechanisms involved in the antifungal activity of the terpenes evaluated.

Keywords: *Sporothrix* spp., storage, susceptibility test, farnesol, terpinen-4-ol, mechanism of action.

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1- <i>Sporothrix schenckii</i> na fase filamentosa.....	17
Figura 2 - <i>Sporothrix schenckii</i> na fase leveduriforme.....	17
Figura 3 - Distribuição geográfica, por país, da produção científica sobre esporotricose no século XXI de acordo com o tipo de publicação.....	19
Figura 4 - A. Fórmula estrutural do composto farnesol; B. Fórmula estrutural do composto terpinen-4-ol.....	29
Figura 5 - A. Microscopia de <i>Sporothrix</i> spp.; B. Macroscopia de <i>Sporothrix</i> spp.; C Pigmentação enegrecida de <i>Sporothrix</i> spp., após estocagem em salina à 4 °C, e Glicerol + Lactose e Glicerol + Sacarose ambos à -20 °C, nos períodos de 6 e 9 meses; D e E. Contagem dos conídios utilizando a microscopia de fluorescência.....	38
Figura 6 - Representação dos resultados do teste da membrana.....	40

LISTA DE TABELAS

	Pag.
Tabela 1 - Média da contagem dos conídios antes e depois da estocagem de <i>Sporothrix</i> spp.....	38
Tabela 2 - Parâmetros de sensibilidade das cepas de <i>Sporothrix</i> spp. na fase filamentosa.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS	<i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>
AMB	Anfotericina B
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CEMM	Centro Especializado em Micologia Médica
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
F-OH	Farnesol
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
IPEC	Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas
ITC	Itraconazol
ITIS	<i>Integrated Taxonomic Information System</i>
MOPS	Ácido 3-[N-morfolino] propanosulfônico
NB-2	Nível de biossegurança 2
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
T-OH	Terpinen-4-ol
THS	Timerosal
UFC	Universidade Federal do Ceará
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo
WFCC	<i>World Federation of Culture Collections</i>

SUMÁRIO

	Pag.
1 REVISÃO DE LITERATURA.....	14
1.1 Esporotricose.....	14
1.1.1 Aspectos Históricos.....	14
1.1.2 Agente Etiológico.....	15
1.1.2.1 Taxonomia.....	15
1.1.2.2 Morfologia.....	16
1.1.2.3 Aspectos Ecológicos.....	18
1.1.3 Epidemiologia.....	19
1.1.4 Patogenia, Aspectos Clínicos e Diagnóstico.....	20
1.1.5 Tratamento.....	23
1.2 Preservação de micro-organismos.....	25
1.3 Farnesol e Terpinen-4-ol.....	27
2 PERGUNTAS DE PARTIDA.....	31
3 HIPÓTESES.....	31
4 OBJETIVOS.....	32
4.1 Objetivo Geral.....	32
4.2 Objetivos Específicos.....	32
5 MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
5.1 Micro-organismos.....	33
5.2 Verificação da viabilidade de <i>Sporothrix</i> spp. para os diferentes métodos de armazenamento.....	33
5.3 Agentes antimicrobianos.....	34
5.4 Preparo dos inóculos para teste de sensibilidade antifúngica.....	35
5.5 Testes de Sensibilidade <i>in vitro</i>	35
5.6 Avaliação da influência de terpenos na perda do material de absorção nas leituras de 260 e 280nm.....	35
6 RESULTADOS.....	37
6.1 Estocagem das cepas de <i>Sporothrix</i> spp. na fase filamentosa.....	37
6.2 Atividade antifúngica dos compostos farnesol e terpinen-4-ol das cepas de	

	<i>Sporothrix</i> spp.....	39
6.3	Efeito dos compostos farnesol e terpinen-4-ol frente as cepas de <i>Sporothrix</i> spp. para verificar a permeabilidade da membrana celular.....	39
7	DISCUSSÃO.....	41
8	CONCLUSÕES.....	45
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46
	APÊNDICE.....	57
	PUBLICAÇÕES.....	60

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Esporotricose

1.1.1 Aspectos Históricos

O primeiro caso humano de esporotricose foi descrito por Benjamin Robinson Schenck, em 1896. O isolamento do agente etiológico foi realizado nos Estados Unidos a partir de um paciente de 36 anos de idade, do sexo masculino, que apresentava lesões na mão e no braço direito. No momento, o micologista Erwin Smith classificou o micro-organismo como pertencente ao gênero *Sporotrichum* (SCHENCK, 1898). O segundo caso foi relatado no ano de 1900, por Hektoen e Perkins, também nos Estados Unidos, envolvendo um garoto que desenvolvera lesão no dedo após ter sido ferido com um martelo, lesão esta que regrediu espontaneamente. Após o isolamento do fungo, verificaram que se tratava do mesmo micro-organismo descrito anteriormente por Schenck e o nomearam como *Sporothrix schenckii*, sua denominação atual (HEKTOEN; PERKINS, 1900). Em 1961, Howard descreve a natureza dimórfica do ciclo biológico do patógeno (LOPES-BEZERRA; SCHUBACH; COSTA, 2006). No ano seguinte, Carmichael reconheceu as diferenças entre os conídios dos membros do gênero *Sporotrichum* e isolados dos casos de esporotricose, classificando o fungo definitivamente dentro do gênero *Sporothrix* (CARMICHAEL, 1962).

Desde então, a esporotricose vem se manifestando em vários países, sob a forma de surtos epidêmicos. Na década de 40, acometeu cerca de 3.000 mineiros que trabalhavam na mina de ouro de Witwatersrand na África do Sul. Uma epidemia em Wisconsin (EUA), nos anos 90, acometeu principalmente jardineiros que se infectaram com palha contaminada com *Sporothrix* sp., que envolvia sementes de coníferas comercializadas e enviadas pelo correio a diversos estados daquele país (ROSSER, 2008). Alguns anos atrás, a esporotricose era uma doença comum na França, que declinou depois de duas décadas. Atualmente estes relatórios na Europa são raros e isolados. Em 2008 e 2009 dois casos de esporotricose foram relatados, um na região sul da Itália (CRISEO et al., 2008) e o outro na França (MAGAND et al., 2009).

No Brasil, o primeiro caso de esporotricose foi noticiado, em 1907, por Lutz e Splendore, onde descobriram que era possível o cultivo *in vitro* deste fungo sob a forma de levedura (LUTZ; SPLENDORE, 1907). Splendore relatou a detecção de corpos asteróides em torno de células de levedura de *Sporothrix*, uma observação que se mostrou útil para o

diagnóstico da esporotricose em exames histológicos (BARROS; PAES; SCHUBACH, 2011).

No século XX, a esporotricose alcançou níveis epidêmicos no estado do Rio de Janeiro, acometendo pessoas e um grande número de animais, especialmente gatos. Foram observados aproximadamente 2.200 casos diagnosticados em humanos e 3.244 casos em gatos, entre 1998 e dezembro de 2009 (BARROS et al., 2010). Atualmente, a ocorrência de esporotricose em animais, especialmente gatos, e sua transmissão para humanos têm sido descritas em diversos países como EUA, Japão, Índia, México, Brasil, Uruguai e Peru. Contudo, em nenhum lugar a doença assumiu proporções epidêmicas, envolvendo pessoas e gatos, como no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. (BARROS et al., 2010).

Na região Nordeste do Brasil poucos casos de esporotricose foram descritos. O primeiro relato ocorreu na cidade de Mossoró-RN, onde uma cadela, de três anos de idade, foi encontrada apresentando lesões cutâneas crônicas. O animal era alojado em um quintal com areia, plantas e felinos peridomiciliados. O exame citológico evidenciou estruturas, no citoplasma de macrófagos, sugestivas de *S. schenckii*. O isolamento do fungo em cultura confirmou o diagnóstico de esporotricose (FILGUEIRA, 2009). O segundo caso no Nordeste do país foi observado no município de Itaporanga-PB, acometendo um gato, macho, de raça Siamesa, que apresentou aumento de volume nasal, de caráter crônico. A análise histopatológica demonstrou a presença de estruturas compatíveis com *Sporothrix schenckii* (NUNES et al., 2011).

1.1.2 Agente Etiológico

1.1.2.1 Taxonomia

Até 2006, a espécie *Sporothrix schenckii* era considerada o único agente etiológico da esporotricose humana (ARRILLAGA-MONCRIEFF et al., 2009). Contudo, Marimon et al. (2006) mostraram por meio de análises moleculares que *S. schenckii* trata-se de um complexo de espécies filogenéticas diferentes, fortemente relacionadas. Tais estudos revelaram que a estrutura populacional do complexo *S. schenckii* é formada por pelo menos seis espécies que apresentam prevalências diferentes quanto à sua distribuição geográfica (MARIMON et al., 2006). Atualmente as espécies do complexo *S. schenckii* estão classificadas como pertencentes ao Reino Fungi, a Divisão Ascomycota, Classe Sordariomycetes, Ordem

Ophiostomatales, Família Ophiostomatacea e gênero *Sporothrix* (GUARRO; GENÉ; STCHIGEL, 1999).

As novas espécies do complexo *S. schenckii* descobertas por Marimom et al. (2007) foram denominadas *S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. mexicana*, *S. albicans* e *S. luriei* como base em análise *multilocus* da sequência gênica da calmodulina, em testes fenotípicos, além de numerosos testes nutricionais. De Meyer et al. (2008) descreveram mais três novas espécies, *S. stylites*, *S. humicola*, e *S. lignivora*, as quais não causam infecções, sendo portanto classificadas como ambientais. As duas primeiras espécies não produzem conídios melanizados e, conseqüentemente, suas colônias não escurecem. Enquanto, a espécie *S. lignivora* apresenta conídios distintos que não coincidem em forma e tamanho com os apresentados por outras espécies do complexo (DE MEYER et al., 2008). Outras espécies, como *S. cyanescens*, têm sido isoladas de amostras de sangue e de pele de pacientes humanos, porém, o estudo de sua patogenicidade concluiu que, embora esses fungos tenham a capacidade de crescer a 37° C, eles não apresentam virulência (BARROS; PAES; SCHUBACH, 2011).

1.1.2.2 Morfologia

O complexo *S. schenckii* é constituído por fungos dimórficos térmicos (RODRIGUES; HOOG; CAMARGO, 2013; GILABERTE et al., 2014), que na natureza ou em cultura a 25 °C apresentam-se na forma filamentosa, mas quando parasitam os tecidos de um hospedeiro ou em meios de cultura apropriados a 37 °C iniciam um novo ciclo biológico, sofrem mudanças morfológicas e passam a apresentar a forma leveduriforme (MADRID et al. 2011a).

Na fase filamentosa, em meio ágar batata-dextrose exibem colônias que variam da cor branca ao creme, de textura coriácea, com superfície rugosa. Posteriormente, as colônias podem desenvolver a coloração castanha escura a negra (LACAZ; PORTO; MARTINS, 1991; LOPES-BEZERRA; SCHUBACH; COSTA, 2006). A coloração escurecida das colônias surge a partir da produção da melanina, fator importante de patogenicidade do fungo. Vale ressaltar que algumas cepas apresentam a capacidade de formar colônias escuras desde o início do crescimento (ALMEIDA-PAES et al., 2009). Microscopicamente, revelam hifas hialinas, septadas, ramificadas e muito delicadas, medindo de 1,5 a 2,0 µm de espessura. Os conídios, que podem medir de 2,0 a 6,0 µm, encontram-se agrupados na extremidade do conidióforo, assemelhando-se a uma flor de margarida (MARQUES-EVANGELISTA, 2010).

Também podem apresentar conídios pigmentados, com paredes celulares grossas, que variam em número, os quais determinam a intensidade da cor escurecida da colônia (NOBRE et al., 2008). (Figura 1)

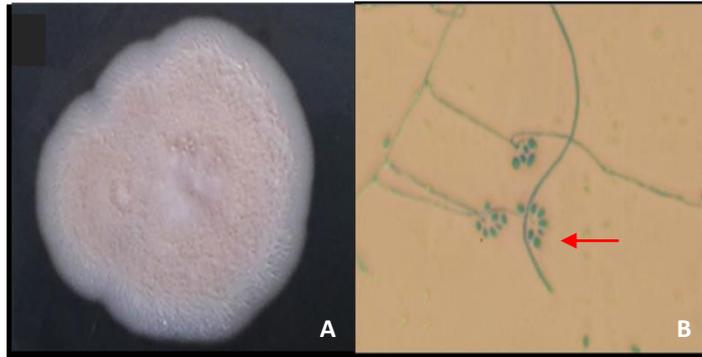


Figura 1. *Sporothrix* spp. na fase filamentosa. A. Macromorfologia em ágar batata que exhibe colônias de cor branca, com aspecto membranoso; B. Micromorfologia em lactofenol azul-algodão mostrando hifas e conídios nas extremidades assemelhando-se à flor margarida. Fonte: CEMM, 2014.

Na fase leveduriforme, em ágar BHI as colônias apresentam aspecto cremoso, com coloração variando de branco a creme, com superfície irregular (TRILLES et al., 2005; MADRID et al., 2010; BARROS; PAES; SCHUBACH, 2011). Microscopicamente, as leveduras exibem gemulação única e variam de forma e tamanho, podendo ser ovais ou redondas, com 2,0 a 6,0 μm de diâmetro, ou em formato de charuto, medindo 2x3 a 3x10 μm (MARQUES-EVANGELISTA, 2010). Apesar das colônias na forma leveduriforme não apresentarem grande variações de cor entre cepas, sendo sempre de coloração creme, já foi demonstrado que estas apresentam uma fina camada de melanina nas células leveduriformes (MORRIS-JONES et al., 2003). (Figura 2)



Figura 2. *Sporothrix* spp. na fase leveduriforme. A. Macromorfologia em ágar BHI que exhibe colônias de cor branca, com superfície irregular; B. Micromorfologia em lactofenol azul-algodão com leveduras apresentando células redondas. Fonte: A - BARROS, 2011 e B - CEMM, 2013.

A conversão da fase filamentosa para fase leveduriforme pode ser obtida por meio de semeadura em meios de cultura enriquecidos, tais como, ágar BHI suplementado com sangue de carneiro e/ou glicose e incubação a temperaturas em torno de 37 °C (MARIMON et al., 2007). Apesar do fator determinante para a conversão morfológica ser considerado a temperatura, outros fatores como aeração, tensão de CO₂, pH, fonte de carbono, presença de cátions bivalentes, dentre outros, também exercem influência na transição entre fases (LOPES-BEZERRA; SCHUBACH; COSTA, 2006). As diferentes faixas de pH dos meios de cultivo podem influenciar as taxas de crescimento de ambas as fases, em geral, *Sporothrix* spp. suportam uma faixa de pH entre 3,0 a 8,5 na fase leveduriforme e entre 3,0 a 11,5 na fase filamentosa. Vale citar, que a forma leveduriforme apresenta maior osmotolerância (30%) quando comparada a forma miceliana (20%) (BARROS; PAES; SCHUBACH, 2011).

1.1.2.3 Aspectos Ecológicos

Os fungos do complexo *S. schenkii* são saprófitas e geofílicos, associados a fontes ambientais como solo e plantas em decomposição (MEHTA et al., 2007). A presença de matéria orgânica no solo é fundamental para o desenvolvimento do micélio. Condições ambientais como, solo abundante em celulose, pH entre 3,5 e 9,4, temperaturas em torno de 31 °C e umidade relativa não inferior a 92% são apropriadas para o desenvolvimento destes fungos (BARROS; PAES; SCHUBACH, 2011).

Sporothrix spp. podem acometer o homem e uma grande variedade de animais, sendo os felinos os mais frequentemente infectados pelo agente. Há relatos de infecções em mamíferos, aves e artrópodes que carregam o micro-organismo (abelhas, pulgas, formigas) e eventualmente, inclusive, podem servir de fonte de infecção ao homem e outros animais (LARSSON, 2011).

A infecção ocorre devido à inoculação acidental ou traumática do fungo na pele, por espinhos ou material vegetal o que, provavelmente, justifica a maior frequência da enfermidade em jardineiros, agricultores, floristas, manipuladores de sementes, mineiros, trabalhadores de alvenaria, bem como, tratadores de animais, profissionais veterinários que são vítimas ocasionais de arranhaduras e mordeduras, ou ainda, laboratoristas de microbiologia, sendo considerada, portanto, uma micose ocupacional (MORRIS-JONES, 2002; LOPES-BEZERRA; SCHUBACH; COSTA, 2006; LARSSON, 2011; CARRADA, 2012).

1.1.3 Epidemiologia

A epidemiologia da esporotricose é influenciada por diversos fatores, dentre os quais estão os fatores biológicos, como a virulência do fungo e a resistência do hospedeiro; os fatores ecológicos do ambiente; e por fim, fatores sócio-econômicos como, meio social, condições sanitárias, profissão, hábitos profiláticos e migrações populacionais (RODRIGUES, 2010). Apesar dos casos de esporotricose serem descritos nos cinco continentes, a doença apresenta maior prevalência nas zonas tropicais e temperadas. As principais áreas de endemicidade estão localizadas no Japão, Índia, México, Brasil, Uruguai e Peru (BARROS; PAES; SCHUBACH, 2011). É prevalente nos EUA, mas tem maior importância epidemiológica nas Américas Central e do Sul, especialmente no México (região central) e no Brasil. (LARSSON, 2011; BARROS; PAES; SCHUBACH, 2011). (Figura 3)

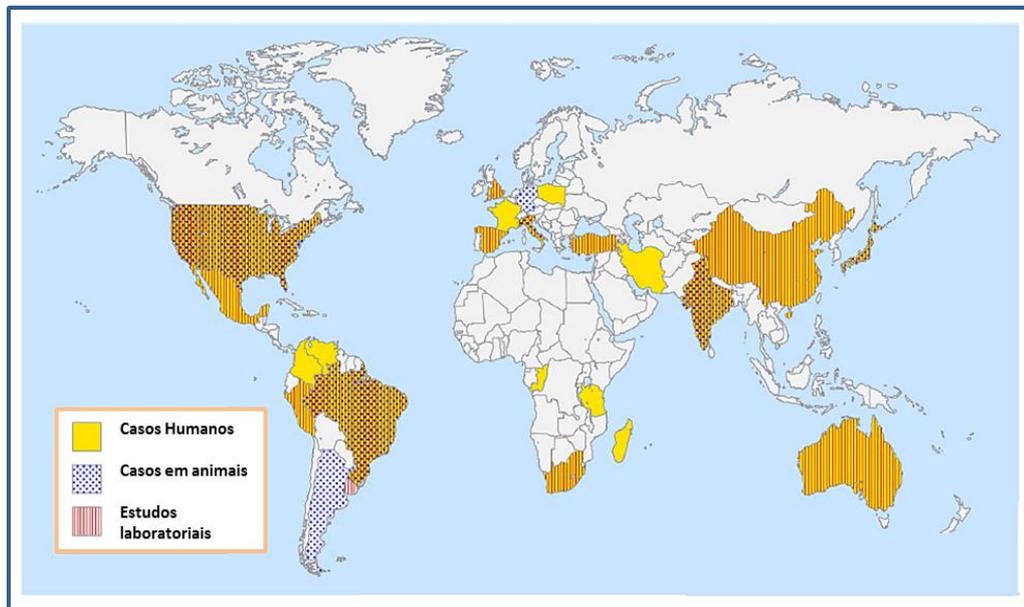


Figura 3. Distribuição mundial da produção científica sobre esporotricose no século XXI. Fonte: Barros et al., 2011.

No Brasil, as grandes epidemias de esporotricose ocorreram devido à transmissão zoonótica, e os gatos foram classificados como sendo a principal fonte de infecção (CORDEIRO et al., 2011b; DA SILVA et al., 2012; RODRIGUES; HOOG; CAMARGO, 2013). O aumento exponencial de casos de esporotricose em humanos, felinos e caninos, atingiu proporções epidêmicas no estado do Rio de Janeiro, tornando a esporotricose a micose subcutânea mais frequente no país (BARROS et al., 2010; NUNES et al., 2011). A espécie *S. brasiliensis*, descrita como a mais virulenta do complexo *S. schenckii*, é apontada como predominante no acometimento destes casos (OLIVEIRA et al., 2011a; RODRIGUES;

HOOG; CAMARGO, 2013). No Rio Grande do Sul, muitos casos humanos estão conectados com as atividades ocupacionais (GOMES et al., 2012). Em outros estados, como Espírito Santo, Mato Grosso, Minas Gerais, São Paulo, Paraná e Santa Catarina, a esporotricose tem sido ocasionalmente descrita em cães e gatos (MADRID et al., 2011b). Entretanto, na literatura existem poucas referências sobre a esporotricose em outras áreas geográficas do país. No Nordeste brasileiro, tem destaque a cidade de Mossoró-RN, onde foi relatado um caso de esporotricose canina e o município de Itaporanga-PB, com o relato da infecção em um gato (FILGUEIRA, 2009; NUNES et al., 2011).

1.1.4 Patogenia, Aspectos Clínicos e Diagnóstico

A esporotricose inicia-se com uma lesão traumática por vegetais contaminados ou decorrentes de ferimentos obtidos durante brigas entre animais infectados. A transição micélio-levedura inicia-se 24 ou 48 horas após a inoculação do fungo na fase filamentosa, onde há o desaparecimento das hifas e inicia-se a conversão dos conídios para leveduras, o processo dura em torno de 13 dias (CORREA et al., 1991). A transmissão por contato com um animal contaminado diminui consideravelmente o tempo de desenvolvimento da infecção, uma vez que, o patógeno é transferido diretamente para o tecido lesionado já na forma leveduriforme, e assim não precisará sofrer conversão morfológica para iniciar sua multiplicação (CRUZ, 2010; CRUZ, 2013).

Após a penetração, conversão morfológica e multiplicação fúngica, o patógeno pode permanecer localizado no tecido subcutâneo ou prolongar-se ao longo dos vasos linfáticos adjacentes, constituindo a forma cutânea fixa ou a cutânea linfocutânea, respectivamente. Mais raramente, pode se disseminar por via hematogênica, caracterizando a forma cutânea disseminada (STALKUP, BELL, ROSEN, 2002). Ocasionalmente, o agente fúngico também pode ser inalado, infectar os pulmões e posteriormente disseminar-se para outros sistemas por via hematogênica (REIS et al., 2009).

As manifestações clínicas que podem variar de acordo com o estado imunológico do hospedeiro, carga do inóculo inicial, profundidade do trauma e virulência da cepa (ARRILLAGA-MONCRIEFF et al., 2009; FERNANDES, MATHEWS, BEZERRA, 1999). A forma cutânea-linfocutânea é a mais frequente, ocorrendo em mais de 75% dos casos (RAMOS-E-SILVA et al., 2007). Inicia-se com uma lesão nodular ou ulcerada no local da inoculação do fungo, normalmente localizada nas extremidades, especialmente nas mãos e antebraços e segue uma trajetória linfática caracterizada por lesões nodulares com aspecto de

uma úlcera ou de um pequeno nódulo subcutâneo (LOPES-BEZERRA; SCHUBACH; COSTA, 2006; BARROS; PAES; SCHUBACH, 2011).

A forma cutânea fixa apresenta-se como uma ou poucas lesões no local da inoculação, frequentemente ulcerativa, com bordas eritematosas. A morfologia pode ser vegetativa verrucosa, com placa infiltrada, sem envolvimento linfático (BARROS; PAES; SCHUBACH, 2011). Alguns autores relatam a forma cutânea fixa como a principal clínica de apresentação em crianças (TLOUGAN et al., 2009). A forma cutânea disseminada é resultado da disseminação hematogênica do sítio de inoculação primário ou do linfonodo. Atinge principalmente hospedeiros imunocomprometidos, pode se apresentar de diversas formas, dentre elas sinusite e meningite e é caracterizada pela extensão das lesões a grandes áreas da pele (DE ARAUJO, MARQUES, KERDEL, 2001; BARROS; PAES; SCHUBACH, 2011). A forma mucosa é incluída por alguns autores como uma variante da forma cutânea. Na conjuntiva, as lesões granulomatosas são acompanhadas de material seropurulento e vermelhidão. Na mucosa nasal, as lesões, frequentemente, envolvem o septo com drenagem de sangue e desprendimento de crostas. (SCHUBACH, et al., 2005). Em gatos com esporotricose, o nariz é a região mais afetada e sinais respiratórios são comuns (GREMIÃO, et al., 2009; BARROS; PAES; SCHUBACH, 2011).

As formas extracutâneas são difíceis de serem encontradas e diagnosticadas, embora tenha se tornado mais freqüentes após o aparecimento da AIDS. Outras formas extracutâneas como a osteoarticular e o comprometimento pulmonar são as manifestações mais comuns, mas também há relatos de casos de disseminação hematogênica grave com envolvimento de múltiplos órgãos (LOPES-BEZERRA; SCHUBACH; COSTA, 2006; BARROS; PAES; SCHUBACH, 2011). Depois da pele, o tecido mais acometido é o ósseo. As lesões osteoarticulares podem variar de grandes a pequenos granulomas com lesões líticas idênticas a osteomielite; e ocorrem por contiguidade ou disseminação hematogênica. (MORRIS-JONES, 2002; KOHLER, HAMDAN, FERRARI, 2007).

A esporotricose pulmonar primária é comumente associada a doença pulmonar obstrutiva crônica, alcoolismo, uso crônico de corticóides e doenças imunossupressoras. Devido à raridade de envolvimento pulmonar e a sua forma clínica é similar a tuberculose, muitas vezes diagnóstico é tardio (BARROS; PAES; SCHUBACH, 2011). Eritema nodoso e eritema multiforme foram relatados em casos de esporotricose por transmissão zoonótica. Estas condições parecem estar associadas com reação de hipersensibilidade, o que resulta de

uma exposição contínua a grandes quantidades de fungos e reinfecções subclínicas (GUTIERREZ-GALHARDO, et al., 2002; GUTIERREZ-GALHARDO, et al., 2005).

O diagnóstico da esporotricose pode ser obtido através da correlação de dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais. A análise laboratorial inclui: exame citopatológico, histopatológico e cultura (SILVIA et al., 2012). Assim, o diagnóstico clínico baseado na patogenia e nas alterações patológicas, deve ser confirmado pela observação microscópica de estruturas leveduriformes no material coletado das lesões e no isolamento e identificação do agente etiológico envolvido no processo (CRUZ, 2013). Os materiais coletados como: secreção, crostas e tecidos das lesões através de swabs estéreis no caso de suspeita de esporotricose, devem ser encaminhados imediatamente para análise micológica e histopatológica (NOBRE et al., 2001).

O citodiagnóstico, a partir de material (exsudado, aspirado, decalcado, biopsiado) submetido às colorações de Gram, Wright, Giemsa, Rosenfeld, permite que se evidencie, principalmente em gatos, um excesso de formas leveduriformes, arredondadas, ovaloides, em forma de “charuto”, com 3-5 μm de diâmetro e 5-9 μm de comprimento. Independentemente dos resultados obtidos pela citologia deve-se, sempre, também, colher e submeter o material a exame micológico (LARSSON, 2011). Já o exame histopatológico deve ser realizado a partir de uma biópsia incisional ou excisional de uma lesão nova, intacta e não drenante. O exame histopatológico permite o estabelecimento do diagnóstico etiológico em percentis de 95% a 100% dos casos (SCHUBACH, et al., 2003a).

A partir dos materiais coletados, deve realizar o isolamento em cultura para observação dos aspectos macroscópicos e microscópicos da colônia. O cultivo pode ser realizado em diferentes meios de cultura, tais como, ágar Sabouraud dextrose, acrescido ou não com cicloeximida, ágar BHI, ágar Batata. Para propiciar ou afastar o diagnóstico etiológico da esporotricose, o período de incubação do semeado varia de 10-14 dias (LARSSON, 2011). A possibilidade de se estabelecer o diagnóstico, através de isolamento do agente, oscila entre 34% e 94% dos casos, na dependência da origem do material colhido (SCHUBACH et al., 2003a).

Vale ressaltar a importância do diagnóstico diferencial uma vez que esporotricose apresenta manifestações clínicas comuns a doenças que cursam lesões cutâneas, como a leishmaniose tegumentar americana e a micobacteriose (SCHUBACH et al., 2003b). O diagnóstico diferencial de outras dermatopatias em animais também é importante, e embora a

leishmaniose seja muito mais prevalente em cães, o diagnóstico diferencial em felinos também deve ser levado em consideração (SCHUBACH et al., 2003b; SOUZA et al., 2005; SOUZA et al., 2009).

1.1.5 Tratamento

Desde o início do século XX, a solução saturada de iodeto de potássio é usada no tratamento da esporotricose, com taxas de sucesso terapêutico variando entre 80 e 100%. Além disso, o baixo custo financeiro colocou este composto na posição de fármaco mais utilizado nos casos de esporotricose (CORDEIRO et al., 2011; BARROS; PAES; SCHUBACH, 2011). Dessa forma, o iodeto de potássio continua sendo a droga de primeira escolha para o tratamento das formas cutâneo-linfática, cutânea localizada e cutânea disseminada em muitos pacientes. No entanto, para a forma extracutânea e em muitos casos da forma cutânea disseminada, este composto não apresenta o mesmo padrão de eficácia (SIDRIM; ROCHA, 2004). Alguns estudos sugerem que o iodeto de potássio gera um aumento da proteólise agindo sobre os granulomas, enquanto outros autores afirmam que este sal pode promover um aumento da fagocitose. Porém, seu exato mecanismo de ação ainda permanece desconhecido (BARROS; PAES; SCHUBACH, 2011).

Para o tratamento da esporotricose faz-se necessário, primeiramente, o reconhecimento da extensão da infecção e a identificação de fatores que predisõem o hospedeiro à gravidade da doença. A escolha do tratamento baseia-se na condição clínica do indivíduo, na dimensão das lesões cutâneas, na avaliação das interações medicamentosas, nos efeitos adversos e no envolvimento sistêmico (LOPES-BEZERRA; SCHUBACH; COSTA, 2006, CORDEIRO et al., 2011). A dificuldade no tratamento pode ser atribuída a fatores como: diagnóstico tardio, baixo arsenal terapêutico, longa duração do tratamento e desistência da terapia pelos pacientes (GOMES et al., 2012).

A anfotericina B é indicada para o tratamento das formas clínicas graves e moderadas em pacientes imunodeprimidos e/ou em casos de indivíduos que não respondem aos fármacos de primeira escolha (LOPES-BEZERRA; SCHUBACH; COSTA, 2006). Apesar da eficácia da anfotericina B contra *Sporothrix* spp., os efeitos colaterais desse fármaco são inevitáveis, como hipocalcemia, hipertermia, anorexia, náuseas, vômitos, cefaléia, mialgia e flebite, fatores que limitam o seu uso (BUSTAMANTE; CAMPOS, 2004).

Nos últimos anos, o itraconazol foi classificado como fármaco de primeira escolha para o tratamento das formas cutâneas e linfocutâneas da esporotricose em pacientes imunocomprometidos, que apresentam formas clínicas mais extensas e com acometimento sistêmico (LOPES-BEZERRA; SCHUBACH; COSTA, 2006, KAUFFMAN, 2007a, SILVA et al., 2012). A administração do fármaco deve ser mantida por no mínimo um mês após a cura clínica. O uso do derivado azólico itraconazol, como uma alternativa terapêutica eficaz para esporotricose, provocou uma redução dos efeitos colaterais provocada por outros fármacos (SILVA et al., 2012). O azólico fluconazol tem apresentado resultados satisfatórios quando utilizado para o tratamento da esporotricose, mas não é considerada uma droga de primeira escolha para a terapia da doença (LOPES-BEZERRA; SCHUBACH; COSTA, 2006). O fluconazol é menos efetivo que o itraconazol, sendo utilizado em pacientes que apresentam intolerância ou interações medicamentosas com o itraconazol (KAUFFMAN et al., 2007a).

A terbinafina é um antifúngico do grupo das alilaminas, e tem demonstrado em vários estudos *in vitro*, ação primária fungicida frente a fungos dimórficos, incluindo espécies do gênero *Sporothrix*. Nenhuma cepa demonstrou resistência frente a droga, que além de apresentar efeitos tóxicos reduzidos, mostrou ser efetiva e bem tolerada pelos pacientes quando comparado ao itraconazol, tornando-se assim uma opção para o tratamento da esporotricose cutânea (MEINERZ et al., 2007, FRANCESCONI et al., 2011).

Para o tratamento da esporotricose em casos de gravidez, o uso desses medicamentos é importante, mas a utilização do iodeto de potássio e o itraconazol são contra indicados. A anfotericina B pode ser usada após 12 semanas de gestação, porém essa medicação deve ser reservada para casos de forma pulmonar ou disseminada da doença. O tratamento à base de termoterapia, ou seja, a aplicação de calor (42-43°C) no local da lesão através de uma bolsa de água quente, fonte de infravermelho ou outro método semelhante até a completa cicatrização, é bastante aconselhável para os casos de forma cutânea (KAUFFMAN et al., 2007a).

No caso do tratamento da esporotricose felina, a administração de medicamentos é considerada um desafio, pois diferentemente dos seres humanos, a maioria das drogas antifúngicas utilizadas apresentam efeitos adversos tóxicos, a duração do tratamento é longa e a administração por via oral é difícil, devido à possibilidade de ocorrência de arranhaduras e/ou mordeduras por parte do felino (SILVA et al., 2012).

1.2 Preservação de micro-organismos

As primeiras coleções de culturas de micro-organismos datam do século XIX, as quais iniciaram os primeiros acervos de amostras particulares de cientistas. A partir desse momento, os estudos de culturas mantidas em coleções permanentes foram sendo cada vez mais aprimorados e resultaram em grande avanço na preservação da biodiversidade e na compreensão da biopotencialidade microbiana. Coleções de culturas microbianas são centros de conservação de recursos genéticos *ex situ* que têm como principais objetivos a preservação e o fornecimento de material biológico e informação associada para pesquisa e desenvolvimento científico e industrial; a realização de pesquisa (morfologia, fisiologia, genética e preservação); a conservação da biodiversidade; o depósito de material envolvido em processos de patente; a educação e capacitação de recursos humanos, além do funcionamento como centros de informação para a formulação de políticas e para o público em geral. Desta forma, os bancos de cultura são reconhecidos por seus valores científico, educacional e profissional, mediante troca de materiais e treinamento acadêmico (CANHOS et al., 1995).

No Brasil, desde 2002 o Programa Nacional de Biotecnologia e Recursos Genéticos do Ministério da Ciência e Tecnologia, vem se destacando pelo incentivo à formação de bancos de espécies microbianas por intermédio do Sistema de Informação de Coleções de Interesse Biotecnológico (SICol). Dentre as ações previstas neste Programa são citadas a ampliação e o fortalecimento da infraestrutura de suporte à biotecnologia, incluindo as coleções de culturas (KURY et al., 2000).

De acordo com o *World Federation of Culture Collections - WFCC*, o Brasil possui mais de 37.700 culturas microbianas, estocadas em 53 bancos diferentes. Dentre as coleções de culturas fúngicas de maior expressão no País, pode-se mencionar: Coleção de Culturas do Centro Especializado em Micologia Médica da Universidade Federal do Ceará; Coleção de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco; Coleção de Culturas de Fungos do Instituto Oswaldo Cruz no Rio de Janeiro; Micoteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo; Coleção de Fungos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e Coleção de Micro-organismos do Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo (WFCC, 2011).

Atualmente, a micoteca do Centro Especializado em Micologia Médica – CEMM alberga em torno de 4.000 cepas fúngicas de origem humana, veterinária e ambiental, sendo

todas as cepas cadastradas em um programa de computação apropriado, denominado SISCEMM. Diversas pesquisas estão sendo realizadas com o objetivo de se desenvolver métodos mais adequados para manutenção da viabilidade de espécies fúngicas (BRILHANTE et al., 2004; GIRÃO et al., 2004; SOARES-JUNIOR et al., 2007) O acervo do CEMM é mantido em diferentes condições de estoque, como salina à temperatura de 4 e 25 °C, em meio ágar-batata à -20 °C com ou sem adição do crioprotetor e à -80 °C em glicerol.

Em decorrência da grande diversidade biológica dos fungos, nenhum método de armazenamento é completamente satisfatório, requerendo-se a junção de dois ou mais métodos para garantir melhor recuperação das cepas. Por isso, faz-se necessário a utilização de métodos de preservação de fungos, como o armazenamento em água destilada estéril, utilizado como padrão ouro, o congelamento a -70 °C, a liofilização, a manutenção sob sobreposições de óleo de parafina e imersão em nitrogênio líquido estão sendo cada vez mais usados, apresentando resultados satisfatórios (BRILHANTE et al., 2004; KUMAR; GANVIR; HAZAREY, 2009). A criopreservação é a metodologia de escolha em muitos bancos de micro-organismos, pois conduz a uma situação de dormência metabólica em virtude do resfriamento e, em consequência, as culturas mantêm-se estáveis por longos períodos (OZKAVUKCU, ERDEMLI 2002; STACEY, 2007). De forma geral, a criopreservação inclui redução da temperatura, desidratação celular, congelamento e degelo (BARBAS; MASCARENHA, 2009).

Recentemente, a estocagem em baixas temperaturas vem sendo utilizada para a manutenção de micro-organismos, associada à utilização de crioprotetores não penetrantes, como os açúcares sacarose e lactose. Esses açúcares não são capazes de se difundir através da membrana plasmática, criando uma pressão osmótica que induzem a desidratação celular, portanto, agem como agentes osmóticos externos, removendo o excesso de água intracelular através de um gradiente osmótico e conduzindo a uma baixa incidência de formação de cristais de gelo dentro da célula (BARBAS; MASCARENHA, 2009). Já a utilização do glicerol, que é classificado como crioprotetor penetrante, promove um rearranjo lipídico e protéico, resultando no aumento da fluidez da membrana, grande desidratação a baixas temperaturas, redução à formação de gelo intracelular e aumento da sobrevivência por criopreservação (ROCHA et al., 2013; ABADIAS et al., 2001).

Dentre os problemas que envolvem o congelamento de cepas fúngicas estão o aumento da concentração de eletrólitos e de radicais livres, mudanças no pH, desnaturação de

proteínas e desidratação celular. Além desses problemas, a ocorrência de formação de cristais de gelo, no espaço intracelular, é um efeito extremamente danoso para célula (SHAW; ORANRATNACHAI; TROUNSON, 2000).

1.3 Farnesol e Terpinen-4-ol

Vários estudos estão sendo realizados com o objetivo de avaliar as plantas como fonte de produtos efetivos para a preservação da saúde humana (BERTINI et al., 2005). Os óleos essenciais são misturas complexas de substâncias geralmente odoríferas e líquidas, cuja principal característica é a volatilidade. Normalmente tais óleos são de aroma agradável e intenso, sendo chamados de óleos essenciais (JESUS et al., 2007).

O composto orgânico farnesol é um álcool acíclico sesquiterpeno, constituído por três unidades de isopreno (Figura 4A), parcialmente solúvel em água (HORBNY et al., 2001). O farnesol é encontrado em óleos essenciais de diversas plantas como capim-limão (*Cymbopogon citratus*) (REICHLING et al., 2009), bengo (*Pluchea dioscoridis*) (GRACE, 2002), árvore-do-incenso (*Pittosporum undulatum*) (MEDEIROS et al., 2003), milho (*Zea mays*) (SCHNEE et al., 2002) citronela (*Cymbopogon nardus*), rosa (*Rosa damascena*) (ALMASIRAD et al., 2007), balsamo de tolu (*Tolui ferabalsamum*) (CUSTÓDIO, VEIGA-JUNIOR, 2012), ciclâmen (*Cyclamen persicum*) (JALALI et al., 2012) e camomila (*Matricaria recutita*) (PETRONILHO et al., 2011). Este composto é também encontrado na própolis, sendo apontado como uma das substâncias biologicamente ativas que apresentam atividade antimicrobiana, atuando assim como mecanismo de defesa ao ataque de patógenos (JEON et al., 2011).

O farnesol possui elevada atividade antimicrobiana contra bactérias e fungos (INOUE et al., 2004; JABRA-RIZK et al., 2006a; JABRA-RIZK et al., 2006b; BRILHANTE et al., 2012c; CORDEIRO et al., 2012a; CORDEIRO et al., 2012b). Fato que se confirma pela atividade antibacteriana do farnesol ante a patógenos humanos, como *Escherichia coli* (BREHM-STECHER et al., 2003) *Staphylococcus aureus* (INOUE et al., 2004), *Streptococcus mutans* (KOO et al., 2005) e *Burkholderia pseudomallei* (BRILHANTE et al., 2012c), com destaque para a inibição do crescimento bacteriano sob a forma de biofilme (JABRA-RIZK et al., 2006a). O potencial antifúngico do farnesol já foi demonstrado contra diferentes espécies do gênero *Candida* (CORDEIRO et al., 2012b) e *Cryptococcus* (CORDEIRO et al., 2012a), bem como, contra o fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*, no qual além de agir inibindo o crescimento *in vitro*, retarda a formação do tubo

germinativo, em concentrações que não afetam a viabilidade deste fungo (DERENGOWSKI et al., 2009). Além disso, também apresenta efeito inibitório sobre biofilme fúngico (RAMAGE et al., 2002; YU et al., 2012).

De acordo com os resultados observados na literatura, o farnesol é capaz de desempenhar uma importante atividade como adjuvante terapêutico promovendo a inversão de resistência às drogas antimicrobianas tanto em bactérias (BREHM-STECHER et al., 2003; JABRA-RIZK et al., 2006a) quanto em fungos (YU et al., 2012; CORDEIRO et al., 2012b). Estudos têm demonstrado que o farnesol apresenta baixa toxicidade *in vivo*, como relatado por Navarathna et al. (2007), cuja administração do composto mostrou efeito tóxico insignificante em modelos murinos.

Recentemente, alguns estudos foram capazes de elucidar possíveis mecanismos de ação do farnesol. Segundo Kuroda et al. (2007) o farnesol interfere na formação da membrana celular dos micro-organismos. Estes autores também observaram a diminuição da produção de β -lactamase por cepas, previamente incubadas com farnesol. Adicionalmente foi averiguado que o composto é capaz de inibir a síntese do carreador lipídico (C55), responsável pelo transporte de mureína, o qual é um precursor do peptidoglicano. Outros autores observaram a inibição do crescimento de cepas de *B. pseudomallei* produtoras de β -lactamase (BRILHANTE et al., 2012c), reafirmando a hipótese de Kuroda et al., (2007).

Jabra-Rizk et al. (2006) demonstraram que o farnesol também pode interferir na síntese do ergosterol, por conseguinte danificando a membrana celular do fungo. Rossignol et al. (2007) observaram que a exposição de cepas de *C. parapsilosis* ao farnesol provoca alterações na expressão dos genes ligados à biossíntese do ergosterol. Além disso, há relatos que o farnesol causa apoptose em cepas de *C. albicans* através da ativação das caspases, uma classe de proteases de cisteína que desempenham um papel crucial no processo de apoptose, transmitindo um sinal para apoptose numa cascata proteolítica (SHIRTLIFF et al., 2009). Apesar das hipóteses apresentadas, o mecanismo de ação do farnesol ainda não está completamente elucidado.

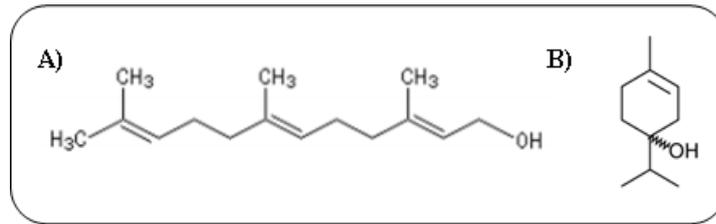


Figura 4. A. Fórmula estrutural do composto farnesol; B. Fórmula estrutural do composto terpinen-4-ol. Fonte: <http://www.biomedcentral.com>

Terpinen-4-ol é um monoterpeneo (Figura 4B), extraído do óleo essencial da planta *Melaleuca alternifolia* conhecida popularmente como árvore-do-chá (HAMMER; CARSON; RILEY, 2003). Na composição química do óleo essencial de *M. alternifolia*, terpinen-4-ol é o composto predominante, variando sua concentração entre 29,4 a 44,9%, sendo o principal responsável pelas propriedades medicinais do óleo essencial, inclusive as características antibacterianas e antifúngicas (VIEIRA et al., 2004). O óleo essencial reduz a taxa de reprodução de patógenos como bactérias, fungos e vírus, além de aumentar a resistência contra esses organismos agressores, por isso é considerado de grande utilidade nas afecções do couro cabeludo e da pele como a caspa e a acne respectivamente (TESKE; TRENTINI, 2001; SILVA et al., 2002).

O óleo de *M. alternifolia* possui atividade bactericida, no entanto pode apresentar ação bacteriostática quando usado em baixas concentrações. Suposições sobre seu mecanismo de ação contra bactérias foram feitas com base na sua estrutura de hidrocarbonetos e lipofilicidade. Presume-se que o mecanismo de ação envolva a perda de funções essenciais à membrana citoplasmática como alterações na permeabilidade como a perda de material intracelular, incapacidade de manter a homeostase e inibição da respiração celular. Na literatura científica, não tem sido relatados casos de resistência bacteriana ao óleo de *M. alternifolia*, apesar de ser usado como medicamento na Austrália desde 1920 (CARSON et al., 2006)

Os componentes da *M. alternifolia* são ativos contra várias espécies de fungos que causam doenças aos humanos. Muitos estudos já demonstraram atividade antifúngica de terpinen-4-ol ante cepas de *Candida* spp., *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Trichosporon* spp., *Aspergillus* spp., *Penicillium* sp. e espécies de dermatófitos: *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis* e *Trichophyton interdigitale* (CONCHA et

al., 1998; HAMMER; CARSON; RILEY, 2003), no entanto, não há relatos da atividade desse composto frente a fungos dimórficos. Esses resultados mostram que terpinen-4-ol parece ser o componente mais ativo do óleo essencial de *M. alternifolia* (OLIVA et al., 2003).

Testes *in vivo* comprovaram que terpinen-4-ol exibiu eficácia terapêutica no tratamento da via oral em ratos contra cepas de *Candida albicans* (CALCABRINI et al., 2004) e infecções vaginais (MONDELLO et al., 2006).

Diante do exposto, o presente estudo objetiva buscar novas estratégias de preservação deste micro-organismo de grande importância no Brasil., assim como, avaliar a atividade antifúngica *in vitro* de farnesol e terpinen-4-ol frente a cepas de *Sporothrix* spp, investigando o mecanismo de ação dessas drogas no metabolismo celular fúngico.

2 PERGUNTAS DE PARTIDA

1. A sacarose e a lactose podem ser empregadas como agentes crioprotetores não-penetrantes mantendo as características fenotípicas de cepas de *Sporothrix* spp. submetidas a criopreservação?
2. O farnesol e o terpinen-4-ol apresentam efeito inibitório *in vitro* frente a cepas de *Sporothrix* spp.?
3. Os compostos farnesol e terpinen-4-ol são capazes de alterar a permeabilidade da membrana citoplasmática em espécies de *Sporothrix*?

3 HIPÓTESES

1. Os carboidratos sacarose e lactose exercem ação crioprotetora, sendo adequados para o uso em métodos de preservação de cepas de *Sporothrix* spp.
2. O farnesol e o terpinen-4-ol são capazes de inibir o crescimento *in vitro* de *Sporothrix* spp.
3. O farnesol e o terpinen-4-ol agem no envoltório celular de *Sporothrix* spp. provocando o escape de macromoléculas para o meio extracelular.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito dos crioprotetores sacarose e lactose em combinação com glicerol em células de *Sporothrix* spp. estocadas em diferentes condições de tempo e temperatura, bem como, determinar a atividade antifúngica *in vitro* do farnesol e do terpinen-4-ol ante cepas de *Sporothrix* spp.

4.2 Objetivos Específicos

1. Investigar o emprego de crioprotetores sacarose e lactose em combinação com glicerol na manutenção da viabilidade fúngica após três, seis e nove meses de estocagem, nas temperaturas de -20°C e -80°C.
2. Determinar a Concentração Inibitória Mínima e a Concentração Fungicida Mínima *in vitro* dos derivados terpênicos farnesol e terpinen-4-ol frente a cepas de *Sporothrix* spp.
3. Avaliar o efeito do farnesol e do terpinen-4-ol sobre a permeabilidade da membrana plasmática ante a cepas de *Sporothrix* spp.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Micro-organismos

Para a avaliação dos métodos de estocagem foram utilizadas 20 cepas de *Sporothrix* spp. na fase filamentosa sendo: *Sporothrix brasiliensis* (n=6); *S. mexicana* (n=5); *S. schenckii* (n=6) e *S. globosa* (n=3). Os isolados previamente identificados foram cedidos pelo Laboratório de Micologia Médica Molecular da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP. Deste total, 10 cepas foram isoladas a partir de seres humanos, 7 cepas de origem animal e 3 do ambiente. Todas as cepas encontram-se estocadas em ágar batata dextrose (Difco, Detroit, EUA.) acrescido de glicerol a 10% (Cromoline Química Fina Ltda, São Paulo) a -20 °C ou em solução salina estéril a 4 °C na Micoteca do Centro Especializado em Micologia Médica – CEMM, da Universidade Federal do Ceará. Para a realização dos testes de sensibilidade foram utilizadas 40 cepas de *Sporothrix* spp. na fase filamentosa sendo: *Sporothrix brasiliensis* (n=26); *S. mexicana* (n=5); *S. schenckii* (n=6) e *S. globosa* (n=3). Para o controle dos experimentos, foram incluídas cepas de *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Candida krusei* ATCC 6258. E para a verificação de modificações na permeabilidade da membrana 16 cepas de *Sporothrix* spp. foram utilizadas, incluindo *S. brasiliensis* (n= 9); *S. mexicana* (n = 3); *S. schenckii* (n = 2) e *S. globosa* (n = 2).

Antes da realização de todos os testes as culturas de *Sporothrix* spp. na fase filamentosa foram recuperadas do estoque mediante semeadura em ágar batata, as quais foram submetidas à análise macroscópica, levando-se em consideração relevo, textura e pigmentação das colônias após 7 dias de incubação a 28 °C, e análise microscópica, através da observação de fragmentos da colônia em microscópio óptico, a partir da montagem de lâmina e lamínula em lactofenol azul-algodão. As culturas foram consideradas positivas para o complexo *S. schenckii* pela presença de hifas hialinas e septadas com conídios nas extremidades com morfologia semelhante à "flor margarida" (MARQUES-EVANGELHISTA, 2010).

5.2 Verificação da viabilidade de *Sporothrix* spp. para os diferentes métodos de armazenamento

Para o processo de estocagem as cepas de *Sporothrix* spp. foram semeadas em meio ágar batata e incubadas durante sete dias a temperatura ambiente (25 – 28 °C). Em seguida, as cepas foram estocadas em criotubos através da raspagem da superfície das

colônias e o acondicionamento em criotubos contendo diferentes soluções de estoque. As soluções de estocagem avaliadas foram: salina fisiológica (0,9%); glicerol 10% acrescido de lactose 10% (GL) e glicerol 10% acrescido de sacarose 10% (GS). Todas as soluções utilizadas foram preparadas em água destilada. As temperaturas de armazenagem testadas foram de 4 °C para solução salina e de - 20 °C e - 80 °C para o uso dos crioprotetores GL e GS. Todos os isolados foram estocados pelos períodos de 3, 6 e 9 meses. Após cada período, as cepas foram retiradas do estoque e recuperadas em meio ágar batata dextrose (Difco, EUA). Após 7 dias de incubação à temperatura ambiente (25 - 28 °C) os isolados foram submetidos a análises de suas características macromorfológicas de relevo, textura e coloração e micromorfológicas quanto a produção de conídios através de microscopia óptica (BRILHANTE et al., 2004).

Tanto no momento da estocagem quanto na retirada do estoque, um fragmento da colônia de cada cepa foi submetido à análise através de microscopia de fluorescência (400x) com calcofluor para a quantificação do número de conídios presentes. Neste procedimento foram avaliados 10 campos distintos e a quantidades de conídios foram classificadas considerando os intervalos: 0-10, 10-50, 50-100 e >150 (KUMAR et al., 2009; HARRINGTON; GEORGE, 2003). As comparações entre parâmetros analisados foram realizadas utilizando o teste t-Student para amostras pareadas, adotando nível de significância máximo de 5% para conclusões afirmativas.

5.3 Agentes Antimicrobianos

Os compostos farnesol (F-OH; (2E,6E)-3,7,11-trimethyldodeca-2,6,10-trien-1-ol; Sigma-Aldrich, USA) e terpinen-4-ol (T-OH; 4-isopropyl-1-methyl-1-cyclohexen-4-ol; Sigma-Aldrich, USA) foram diluídos em DMSO (Dimetil-Sulfóxido), nas concentrações 30% (BRILHANTE et al., 2013) e 100% (BRILHANTE et al., 2014) respectivamente. Para o controle, uma série de diluições em paralelo, contendo o veículo de DMSO sozinho foi feito para medir o efeito do solvente sobre o fungo. O DMSO não afetou o crescimento dos fungos em concentrações presentes nos poços da placa de microdiluição. As drogas antifúngicas anfotericina B (AMB, Sigma-Aldrich, EUA) e itraconazol (ITC, Janssen Pharmaceutica, Bélgica), foram usados como drogas controle. Os intervalos de concentrações testados foram de 0,00781-4 µM para F-OH; 0,07246-37,1 mM para o T-OH; e (0,03125-16 µg/mL⁻¹) para AMB e ITC. As diluições seriadas de todas as drogas testadas foram preparadas em meio

RPMI 1640 (Sigma), com L-glutamina e sem bicarbonato de sódio, tamponada a pH 7,0 com 0,165 M de MOPS (Sigma) (CLSI, 2008).

5.4 Preparo dos inóculos para teste de sensibilidade antifúngica

Os inóculos das cepas de *Sporothrix* spp., na fase filamentosa, foram preparados a partir de culturas em ágar BHI (Himedia, Índia) incubadas durante 6-7 dias a 25 – 28 °C. O procedimento seguiu através da adição de 1 mL de solução salina estéril a 0,9%, adicionada a cada cultura de fungos. Com auxílio de uma alça microbiológica, a superfície das colônias foram gentilmente raspadas a fim de trazer em suspensão conídios e fragmentos de hifas. Em seguida, cada suspensão fúngica foi ajustada de acordo com a escala 2 de McFarland. Por fim, as suspensões foram diluídas na proporção de 1:10 com meio RPMI para obtenção de inóculos com concentração final de 1,0 a 5,0 x 10⁵ UFC mL⁻¹ (BRILHANTE et al., 2014).

5.5 Testes de Sensibilidade *in vitro*

O teste de sensibilidade de *Sporothrix* spp. utilizando F- OH; T -OH; AMB e ITC foi realizado de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008) através do método de microdiluição em caldo - documento M38-A2, com alguns ajustes. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) de cada composto farnesol e terpinen-4-ol foi definida como a concentração mais baixa que produziu uma redução de 80% de crescimento, em comparação com o crescimento do controle sem droga (CORDEIRO et al., 2012b; BRILHANTE et al., 2013). Para os antifúngicos AMB e ITC, a CIM foi considerada como a mais baixa concentração capaz de inibir 50% e 100% de crescimento fúngico, respectivamente (BRILHANTE et al., 2010). Todas as amostras foram testadas em duplicata e os resultados foram lidos visualmente, após três dias de incubação a 35 °C (BRILHANTE et al., 2014). A Concentração Fungicida Mínima (CFM) foi definida como a concentração mais baixa de droga que resultou na morte de 100% da inoculação inicial. Para determinar o CFM, 100 µl de cada amostra, sem crescimento de fungos visíveis foram inoculadas em ágar batata dextrose e incubados a 35 °C durante 7 dias (CANTÓN; PEMÁN; VIUDES, 2003) .

5.6 Avaliação da influência de terpenos na perda do material de absorção nas leituras de 260 e 280 nm

A atividade antifúngica *in vitro* frente às cepas de *Sporothrix* spp. foi previamente determinada pelo ensaio de microdiluição em caldo (CLSI, 2008). Como controle de qualidade foram incluídos nestes poços de ensaio contendo: micro-organismos em contato

com a AMB e ITC; micro-organismos em RPMI; micro-organismos em contato com o timerosal ($C_9H_9HgO_2SNa$, Sigma -Aldrich, EUA) a uma concentração de 0,2 g/mL para cada cepa e poços contendo apenas RPMI. A incubação foi realizada de acordo com o teste de sensibilidade, tal como descrito acima. Após este período, os poços correspondendo a CIM e CIM/2 do teste de compostos e os controles foram usados para as experiências. Aproximadamente 1,0 ml de cada suspensão de fungos, ajustado para escala padrão de 0,5 McFarland foi transferido para microtubos estéreis e centrifugados durante 15 minutos a 13.400 x g. Em seguida, o sobrenadante obtido foi diluído de 1:10 em água destilada estéril, para a leitura no espectrofotômetro num comprimento de onda de 260 e 280 nm para análise da presença de ácidos nucleicos e proteínas, respectivamente (MARQUES, 2013).

6 RESULTADOS

6.1 Estocagem das cepas de *Sporothrix* spp. na fase filamentosa

Todas as cepas *Sporothrix* spp. analisadas no presente estudo foram recuperadas após estocagem, independente das condições ou tempo de armazenamento. Desta forma, nossos resultados mostraram 100% de viabilidade para todas as espécies do complexo *S. schenckii* avaliadas. Vale ressaltar que nenhuma contaminação foi observada, no processo de recuperação. A análise microscópica mostrou as mesmas características micromorfológicas para todas as cepas recuperadas, independente da espécie, condições ou tempo de estocagem. Foram observadas hifas hialinas, septadas, ramificadas que apresentavam conídios dispostos em cachos terminais na extremidade do conidióforo, assemelhando-se à “flor margarida”, como característica do gênero *Sporothrix* (Fig. 5A). Por sua vez, a análise macroscópica também mostrou que independente da espécie condições ou tempo de estocagem, as cepas recuperadas apresentaram colônias de textura coriácea e com superfície rugosa, todas condizentes com sua morfologia antes de serem submetidas ao processo de armazenamento (Fig. 5B). Quanto à coloração, 3 isolados da espécie *S. brasiliensis* apresentaram colônias com pigmentação enegrecida após estocagem em salina à 4 °C, bem como, em GL e GS ambos à -20 °C, nos períodos de 6 e 9 meses (Fig. 5C). As demais espécies exibiram colônias de cor branca a bege, como apresentavam no momento do processo de estocagem.

Quanto à quantificação de conídios, o resultado final foi baseado na média da contagem de conídios de todas as cepas analisadas, sob as mesmas condições e tempo de estocagem (Tabela 1). O estoque em salina a 4 °C mostrou não alterar a quantidade de conídios nas amostras, quando comparado a quantificação anterior a estocagem. Os estoques em GL e GS à -20 °C exibiu uma pequena redução no número de conídios presentes, porém não foram evidenciadas diferenças estatísticas. Os estoques em GL e GS à -80 °C apresentaram diminuição do número de conídios em todos os tempos de estocagem analisados (Fig. 5D e E). Diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$) foram observadas para GL e GS nos períodos de 3 e 6 meses, bem como, para GL no período de 9 meses, contudo o mesmo não foi observado para o estoque em GS neste mesmo período.

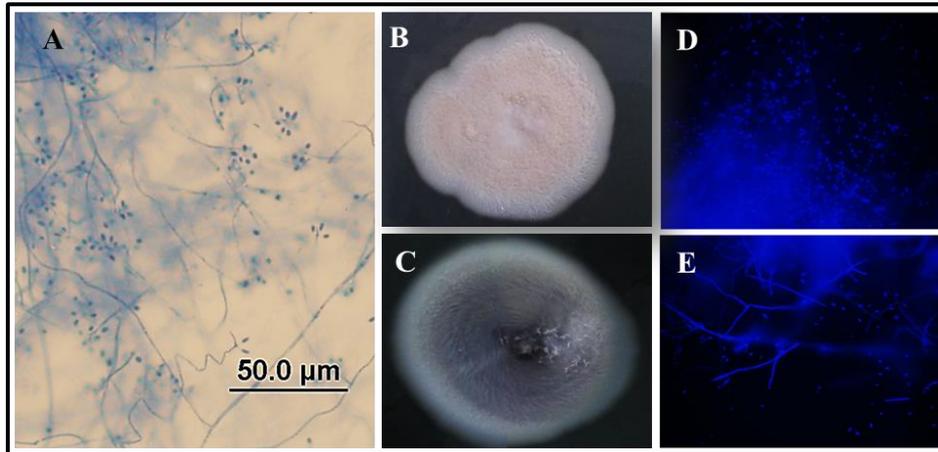


Figura 5. A. Microscopia de *Sporothrix* spp.; B. Macroscopia de *Sporothrix* spp.; C Pigmentação enegrecida de *Sporothrix* spp., após estocagem em salina à 4 °C, e Glicerol + Lactose e Glicerol + Sacarose ambos à -20 °C, nos períodos de 6 e 9 meses; D e E. Contagem dos conídios utilizando a microscopia de fluorescência.

Tabela 1 – Média da contagem dos conídios antes e depois da estocagem de *Sporothrix* spp.

Condições		Períodos			
		Antes	3 meses	6 meses	9 meses
Salina	4 °C	142,0	143,3	145,5	150,5
GL	-20 °C	142,0	118,3	118,3	123,3
GS		142,0	118,3	123,3	130,5*
GL	-80 °C	142,0	76,8	86,0	98,3
GS		142,0	75,8	78,0	101,0*

GL: glicerol 10% + lactose 10%; GS: glicerol 10% + sacarose 10%.

* Não foi observada diferença estatística

6.2 Atividade antifúngica dos compostos farnesol e terpinen-4-ol das cepas de *Sporothrix* spp.

Farnesol e terpinen-4-ol inibiram todos os isolados de *Sporothrix* spp. testados com diferentes valores de CIM. Os valores de CIM variando 0,015-1,0 μ M para F-OH (média geométrica de 0,09) e 0,57-9,27 mM para T-OH (média geométrica de 2,35) (Tabela 1). Os valores de CFM variando 0,125-4,0 μ M e 1,15-37,1 mM, respectivamente, para o F-OH e T-OH. Farnesol foi o composto mais ativo *in vitro* para as todas as cepas testadas, incluindo cepas de *Sporothrix* menos sensíveis a AMB (CIM = 4 μ g/mL) e ITC (CIM = 2 μ g/ml) (dados não mostrados). A CIM para as cepas controle acordados com as diretrizes do CLSI (CLSI, 2008). Os resultados são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Parâmetros de sensibilidade das cepas de *Sporothrix* spp. na fase filamentosa.

Espécies (n)	Origem (n)	Drogas	CIM			CFM	
			Valores (n)	Média geométrica	Intervalo	Média geométrica	Intervalo
<i>S. brasiliensis</i> (26)	Humana (6)	T-OH	0,57 (1) 1,1 (4) 2,3 (14) 4,6 (6) 9,2 (1)	2,44	0,57-9,27	23,58	1,15-37,1
	Animal (20) Ambiental (0)	F-OH	0,01 (2) 0,03 (6) 0,06 (10) 0,12 (5) 0,25 (3)	0,06	0,015-0,25	0,76	0,125-4,0
<i>S. schenckii</i> (6)	Humana (4)	T-OH	1,1 (2) 2,3 (3) 9,2 (1)	2,31	1,15-9,27	29,44	18,55-37,1
	Animal (1) Ambiental (1)	F-OH	0,03 (1) 0,12 (2) 0,5 (1) 1,0 (2)	0,25	0,03-1,0	1,0	0,125-4,0
<i>S. mexicana</i> (5)	Humana (3)	T-OH	1,1 (2) 4,6 (2) 9,2 (1)	3,05	1,15 – 9,27	18,55	4,63-37,1
	Animal (0) Ambiental (2)	F-OH	0,01 (1) 0,06 (1) 0,5 (2) 1,0 (1)	0,18	0,015-1,0	1,31	0,5-4,0
<i>S. globosa</i> (3)	Humana (3)	T-OH	0,57 (1) 1,1 (1) 2,3 (1)	1,15	0,57 – 2,31	18,55	9,27-37,1
	Animal (0) Ambiental (0)	F-OH	0,03 (1) 0,06 (1) 0,25 (1)	0,07	0,03-0,25	1,25	1,0-2,0

CIM: concentração inibitória mínima; CFM: concentração fungicida mínima; MG: média geométrica. A CIM das cepas controle *Candida krusei* ATCC 6258 e *C. parapsilosis* ATCC 22019 foram: 1,0 μ g/mL para AMB; 0,25 μ g/mL para ITC; 37,0 mM para T-OH e 2,0 μ M para F-OH.

6.3 Efeito dos compostos farnesol e terpinen-4-ol frentes as cepas de *Sporothrix* spp. para verificar a permeabilidade da membrana celular

Após contato com doses inibitórias (CIM) e sub-inibitórias (CIM/2) de farnesol e terpinen-4-ol, não foram observadas alterações significativas na permeabilidade da membrana celular nas espécies de *Sporothrix*, capazes de provocar o extravasamento de macromoléculas como ácidos nucleicos e proteínas para o meio extracelular (Figura 6). O timerosal, utilizado como controle positivo do teste, é capaz de provocar lise celular, por isso observou-se a

presença relevante de moléculas de ácido nucleico e proteínas após o contato deste sal com as cepas de *Sporothrix*. Os antifúngicos anfotericina e itraconazol também não são capazes de causar dano na membrana fúngica que possibilite o escape dessas moléculas, como foi observado no teste.

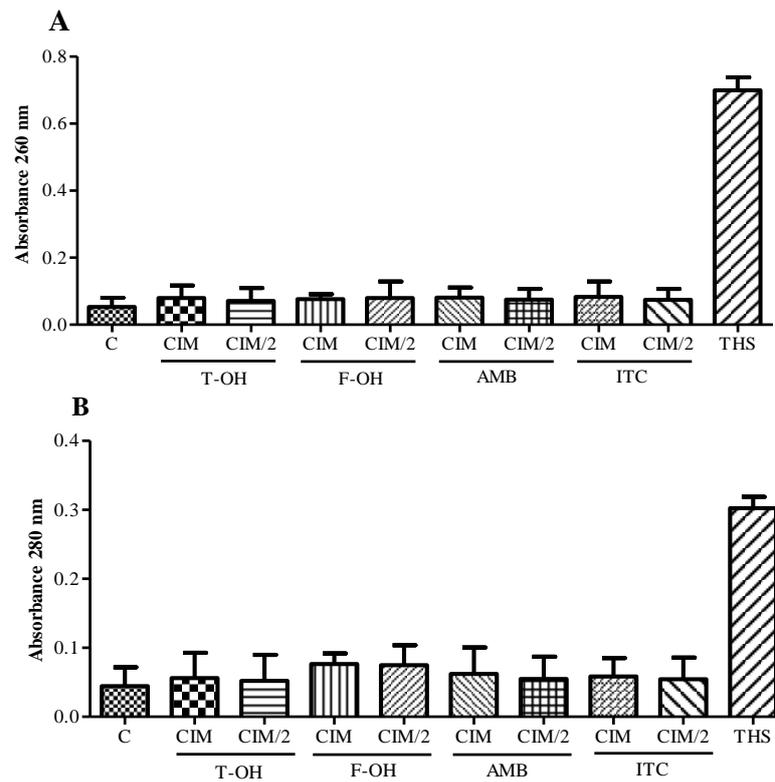


Figura 6: *Sporothrix* spp. cepas (n=16) foram incubadas em meio RPMI 1640, sem antimicrobianos como controles de crescimento (C); com terpinen-4-ol (T-OH); farnesol (F-OH); anfotericina B (AMB) e o itraconazol (ITC), em concentrações equivalentes CIM e CIM/2 para cada cepa, e timerosal (THS) na concentração de 0,2g/mL. Todos os experimentos foram realizados em duplicata. A) Absorbância de conteúdos extracelulares a 260 nm e B) Absorbância de conteúdos extracelulares a 280 nm.

7 DISCUSSÃO

As pesquisas em micologia são em grande parte dependente do isolamento e manutenção de culturas puras. Assim, muitos protocolos têm sido sugeridos para a conservação de cepas fúngicas, embora não são aplicáveis a todas as espécies (LIMA; BORBA, 2001). A recente descrição de novas espécies que constituem o complexo *S. schenckii* desperta interesse em avaliar as coleções mantendo diferentes espécies de *Sporothrix*. Além disso, não há relatos do uso e efeito do método de criopreservação na manutenção da viabilidade de *Sporothrix* spp. Assim, o presente estudo avaliou a manutenção de 4 espécies de complexo *S. schenckii* (*S. brasiliensis*, *S. schenckii*; *S. mexicana* e *S. globosa*), em diferentes condições de armazenamento, incluindo a criopreservação.

Nesta pesquisa, foi observado 100% de viabilidade de todas as cepas estocadas em salina fisiológica a 4 °C, de todas as espécies avaliadas e independente do tempo de estocagem. Resultado similar foi relatado por Medonza et al. (2005) relataram 100% de recuperação após estocagem através do método de Castellani e assim como observado no presente estudo, todos isolados analisados mantiveram suas características macro e micromorfológicas (MENDOZA et al., 2005). Borba et al. (1992), também observaram 100% de viabilidade e características morfológicas inalteradas e após estocagem de cepas *Sporothrix* spp. em água destilada, e 85% de viabilidade em isolados mantidos em óleo mineral (BORBA; SILVA; OLIVEIRA, 1992).

De acordo com relatos da literatura, a manutenção de cepas de *Sporothrix* spp. pelo método de Castellani e óleo mineral demonstraram resultados satisfatórios quanto à viabilidade dos isolados. No entanto, apesar da simplicidade destes métodos, existem desvantagens, tais como fazer a monitorização frequente das colônias de fungos para impedir a desidratação, devido à evaporação do meio e a contaminação de culturas por ácaros micófagos, que são muito comuns em regiões tropicais (BORMAN, et al., 2006). Além disso, relatos de alterações da atividade bioquímica, perfil de sensibilidade e virulência de cepas de *Sporothrix* spp. após estocagem, já foram relatados (BORBA; SILVA; OLIVEIRA, 1992; LIMA; BORBA, 2001; LIMA; SCHÄFFER; BORBA, 2003; LIMA, et al., 2004). Visando evitar tais desvantagens, atualmente a criopreservação é a técnica preferida por muitos bancos de micro-organismos, por diminuir e/ou cessar a atividade metabólica celular e assim permitir que os isolados permaneçam estáveis, mantendo suas características genéticas, fisiológicas e

morfológicas por períodos de tempo prolongados, além de impedir a contaminação das amostras (OZKAVUKCU; ERDEMLI, 2002; HOMOLKA, 2013).

O processo de criopreservação pode lesar irreversivelmente as células fúngicas, algumas espécies revelam-se mais suscetíveis ao processo e não sobrevivem a criopreservação. Atualmente, diferentes agentes crioprotetores vêm sendo utilizados com objetivo de diminuir os danos causados a célula pelo processo de congelamento (HUBÁLEK, 2003). Na ausência de relatos do uso da criopreservação de isolados de *Sporothrix* spp., o presente trabalho, propõe uma metodologia baseada no uso do glicerol como um crioprotetor penetrante, associado a crioprotetores não penetrantes, como lactose ou sacarose.

A criopreservação das espécies do complexo *S. schenckii* avaliadas resultou em 100% de recuperação mesmo no maior período de estocagem avaliado (9 meses), para as duas temperaturas testadas (-20 e -80 °C), bem como, para as duas associações de crioprotetores avaliados (GL e GS). Tais resultados mostraram que *Sporothrix* spp. é capaz de manter-se viável após o processo de congelamento. Ademais, é importante ressaltar, que como nos processos não envolvem congelamento celular, as características macro e micromorfológicas das cepas de *Sporothrix* spp. também foram mantidas, evidenciando que a criopreservação é um processo passível de ser utilizado na manutenção de culturas deste micro-organismo.

No tocante a contagem de conídios, o estoque em salina fisiológica a 4 °C e em criopreservação a -20 °C não demonstraram alterar a quantidade de conídios nas amostras. Contudo, a criopreservação a -80 °C apesar de não afetar a viabilidade das amostras, apresentou redução no número de conídios presentes. Tal observação, pode estar associada a destruição de conídios ocasionado pela baixa temperatura de estocagem. Desta forma, os estoques em salina a 4 °C ou em crioprotetores a -20 °C mostraram-se mais eficazes na manutenção da integridade dos conídios de *Sporothrix* spp.

Apesar da introdução de novos antifúngicos nos últimos anos, a resposta ao tratamento, particularmente em doentes imunocomprometidos permanece insatisfatória, uma vez que a frequência de infecções fúngicas tem aumentado rapidamente (PIERCE et al., 2013). Além do arsenal limitado, o obstáculo para o sucesso terapêutico utilizando antifúngicos, está relacionado principalmente aos efeitos adversos, baixo espectro da atividade antifúngica e surgimento de resistência intrínseca das espécies patogênicas para o uso clínico de drogas (COWEN; STEINBACH, 2008). Muitos compostos isolados de extratos de plantas e óleos essenciais têm demonstrado atividade biológica *in vivo* e *in vitro*

(MONDELLO et al., 2006; CORDEIRO et al., 2012b). Tais compostos são conhecidos pela sua atividade antibacteriana (BRILHANTE et al., 2012c), antifúngica (MARCOS-ARIAS et al., 2011), anti-inflamatório (KHALIL et al., 2004), entre outros. Quimicamente, estes compostos são a maioria dos terpenos, tais como farnesol e terpinen-4-ol (PINTO et al., 2013).

Brilhante et al. (2013) investigaram a atividade antifúngica *in vitro* de farnesol contra cepas de *Coccidioides posadasii*, com CIM variando, 0,078-0,0616 μM , são baixos em comparação com os valores de CIM encontrados neste estudo (0,015-1,0 μM). No entanto, o trabalho descrito previamente por Derengowski et al. (2009) para o fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* com média do CIM de 25 μM , enquanto que para as espécies *Sporothrix* a média foi de 0,18 μM .

Outras espécies fúngicas como *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii* os valores de CIM variaram de 0,29-75 μM para ambas as espécies (CORDEIRO et al., 2012a). Cordeiro et al. (2012b) também mostraram atividade de farnesol contra várias espécies de *Candida* com valores de CIM variando de 9,37-150 μM , bem acima dos valores encontrados neste estudo. Em outro estudo, Brilhante et al. (2012c) observaram atividade *in vitro* do farnesol contra *Burkholderia pseudomallei*, mostrando CIM entre 75 a 150 μM para todas as cepas testadas. No presente trabalho, farnesol mostrou alta atividade contra todas as espécies de *Sporothrix* testadas. No entanto, *in vivo* o potencial antifúngico é desconhecido.

Os dados aqui apresentados também mostraram que terpinen-4-ol, pôde inibir o crescimento *in vitro* de cepas do complexo *Sporothrix schenckii*. Marcos-Arias et al. (2011) analisaram *in vitro* efeitos antifúngicos de derivados terpênicos contra isolados de *Candida* e terpinen-4-ol foi um dos compostos mais ativos contra *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. guilliermondii*. A inibição da formação de biofilme de *C. albicans* foi avaliada por terpinen-4-ol, em concentrações de 0,5 e 1xCIM₅₀. Terpinen-4-ol foi capaz de inibir de forma eficaz o crescimento do biofilme (RAMAGE et al., 2002). Em outro trabalho, os efeitos de terpinen-4-ol sob a suscetível crescimento *in vitro* de fluconazol linhagens de *C. albicans* sensíveis e resistentes foram igualmente examinados e mostrou valores de CIM variando 32,4-129,8 mM (NINOMIYA et al., 2012). Os resultados do nosso estudo mostrando maior sensibilidade das espécies *Sporothrix* para terpinen-4-ol, com valores de CIM de 0,57-9,27 mM. Alguns dados de ensaios *in vivo* sobre a ação de terpinen-4-ol foram disponíveis, no entanto, provas de atividade anti-inflamatória provável de terpinen-4-ol foi demonstrado, com

a capacidade de efeito inibitório sobre a pele humana induzida por inflamação (KHALIL et al., 2004).

O mecanismo de ação de compostos de plantas não são bem conhecidos (DERENGOWSKI et al, 2009), no entanto, a presença de terpenos pode indicar as interações de toxicidade com os constituintes da membrana (HAMMER; CARSON; RILEY, 2004) e inibição da síntese de ergosterol (BRILHANTE et al., 2013). A OD₂₆₀ e OD₂₈₀ de filtrados tratados com farnesol e terpinen-4-ol quando comparadas com suspensões de controle não mostram diferenças significativas.

A falha de terpenos a lise de células de *Sporothrix* sugere que o seu mecanismo principal de ação não é de danos na membrana celular bruto e irreversível, não induzir a perda de 260 e 280 nm, o material de absorção, tais como ácidos nucleicos e proteínas (JABRA-RIZK et al., 2006; BRILHANTE et al, 2013). Estudos com *C. albicans* utilizando coloração de azul de metileno mostraram que as células tratadas com terpinen-4-ol não foram capazes de fazer com que a fluidez da membrana aumentasse (HAMMER; CARSON; RILEY, 2004).

Em resumo, os resultados deste trabalho mostraram que as espécies, *S. brasiliensis*, *S. schenckii*; *S. mexicana* e *S. globosa*, pertencentes ao complexo *S. schenckii* apresentaram elevada taxa de recuperação após estocagem sob as condições avaliadas, abrindo perspectivas para o uso de métodos de criopreservação na manutenção de isolados de *Sporothrix* spp. Novos estudos poderão demonstrar se este método é capaz de manter estáveis características genéticas, fisiológicas e de virulência, inerentes a cada cepa. Ademais, os compostos terpênicos farnesol e terpinen-4-ol tiveram efeito antifúngico *in vitro* contra *Sporothrix* spp. Assim, testes *in vivo* e novos estudos são necessários para confirmar a atividade de derivados terpênicos e uma melhor compreensão dos mecanismos de ação envolvidos.

8 CONCLUSÕES

1. Os estoques do *Sporothrix* spp. em solução salina (NaCl a 0,9%) à 4 °C, glicerol 10% acrescido de lactose 10% e glicerol 10% acrescido de sacarose 10% mantidas nas temperaturas de -20 °C e -80 °C permitiram 100% de recuperação de cepas em até 9 meses.
2. As estratégias de preservação em geral, mativeram o mínimo de conídios, excetuando-se glicerol 10% acrescido de sacarose 10% nas temperaturas de -20 °C e -80 °C.
3. Os derivados terpênicos farnesol e terpinen-4-ol apresentaram atividade antifúngica *in vitro* frente as cepas de *Sporothrix* spp. com CIMs variando 0,015 a 1,0 µM e 0,57 a 9,27 mM respectivamente.
4. As atividades antifúngicas *in vitro* dos compostos farnesol e terpinen-4-ol não foram associadas à formação de poros na membrana das cepas de *Sporothrix* spp.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABADIAS, M.; BENABARRE, A.; TEIXIDO, N.; USALL, J.; VINAS, I. Effect of freeze drying and protectants on viability of the biocontrol yeast *Candida sake*. **International journal of food microbiology**, v. 65, n. 3, p. 173-182, 2001.

ALMASIRAD, A; AMANZADEH, Y; TAHERI, A; IRANSHAHI M Composition of a Historical Rose Oil Sample (*Rosa damascena* Mill., Rosaceae). **Journal of Essential Oil Research**, n. 19, v. 2, p. 110-112, 2007.

ALMEIDA-PAES, R.; FRASES, S.; MONTEIRO, P. C. F.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M.; NOSANCHUK, J. D. Growth conditions influence melanization of Brazilian clinical *Sporothrix schenckii* isolates. **Microbes Infection**, v. 11, n. 5 p. 554–562, 2009.

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

BARBAS, J. P.; MASCARENHA, E. R. D. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. **Cell Tissue Bank**, v. 10, p. 49–62, 2009.

BARROS, M. B. L.; PAES, R. A.; SCHUBACH, A. *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. D., WANKE, B., SCHUBACH, A. Esporotricose: a evolução e os desafios de uma epidemia. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 27, n. 6, p. 455–460, 2010.

BERTINI, L. M.; PEREIRA, A. F.; OLIVEIRA, C. L. L.; MENEZES, E. A.; MORAIS, S. M.; CUNHA, F. A.; BARREIRA, E. S. C. Perfil da Sensibilidade de Bactérias Frente a Óleos Essenciais de Algumas Plantas do Nordeste do Brasil. **Informa**, v. 17, n. 3/4, p. 80-83, 2005.

BREHM-STECHER, B. F.; JOHNSON, E. A. Sensitization of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to antibiotics by the sesquiterpenoids nerolidol, farnesol, bisabolol, and apritone. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 47, n. 10, p. 3357-60, 2003.

BRILHANTE, R. S. N.; CAVALCANTE, C. S. P.; SOARES-JUNIOR, F. A.; MONTEIRO, A. J.; BRITO, E. H. S.; CORDEIRO, R. A.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Evaluation of *Microsporum canis* in different methods of storage. **Medical Mycology**, v. 42, p. 499–504, 2004.

BRILHANTE, R. S. N.; DE LIMA, R. A. C.; CAETANO, E. P.; LEITE, J. J. G.; CASTELO, D. D. S. C. M.; RIBEIRO, J. F.; & ROCHA, M. F. G. Effect of farnesol on growth, ergosterol biosynthesis, and cell permeability in *Coccidioides posadasii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 5, p. 2167-2170, 2013.

BRILHANTE, R. S. N.; FECHINE, M. A. B.; CORDEIRO, R. A.; ROCHA, M. F. G.; RIBEIRO, J. F.; MONTEIRO, A. J.; LIMA, R. A. C.; MESQUITA, J. R. L.; CAMARGO, Z. P.; SIDRIM, J. J. C. *In vitro* effect of sulfamethoxazole-trimethoprim against *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 54, n. 9, p. 3978-3979, 2010.

BRILHANTE, R. S. N.; MALAQUIAS, A. D. M.; CAETANO, E. P.; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M.; LIMA, R. A. C.; MARQUES, F. J. F.; ALENCAR, L. P.; MONTEIRO, A. J.; CAMARGO, Z. P.; BANDEIRA, T. J. P. G.; RODRIGUES, A. M.; CORDEIRO, R. A.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. *In vitro* inhibitory effect of miltefosine against strains of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* and *Sporothrix* spp. **Medical Mycology**, 2014.

BRILHANTE, R. S.; VALENTE, L. G.; ROCHA, M. F.; BANDEIRA, T. J.; CORDEIRO, R. A.; LIMA, R. A.; LEITE, J. J.; RIBEIRO, J. F.; PEREIRA, J. F.; CASTELO-BRANCO, D. S.; MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J. J. Sesquiterpene farnesol contributes to increased susceptibility to β -lactams in strains of *Burkholderia pseudomallei*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 56, n. 4, p. 2198-200, 2012c.

BORBA, C. M.; SILVA, A. M.; OLIVEIRA, P. C. Long-time survival and morphological stability of preserved *Sporothrix schenckii* strains. **Mycoses**; v. 8, p. 185-8, 1992.

BORMAN, A. M.; SZEKELY, A.; CAMPBELL, C. K.; JOHNSON, E. M. Evaluation of the viability of pathogenic filamentous fungi after prolonged storage in sterile water and review of recent published studies on storage methods. **Mycopathologia**, v. 6, p. 361-8, 2006.

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

CALCABRINI, A.; STRINGARO, A.; TOCCACIELI, L.,; MESCHINI, S.; MARRA, M.; COLONE, M.; SALVATORE, G.; MONDELLO, F.; ARANCIA, G.; MOLINARI, A. Terpinen-4-ol, the main component of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil inhibits the *in vitro* growth of human melanoma cells. **J Invest Dermatol**, v. 122, p. 349-360, 2004.

CANHOS, V. P.; UMINO, C. Y.; MANFIO, G. P. Microbial diversity and ecosystem function. London: CAB International. **Coleções de Culturas de Micro-organismos**, p. 439-46, 1995.

CANTÓN, E.; PEMÁN, J.; VIUDES, A.; QUINDÓS, G.; GOBERNADO, M.; ESPINEL-INGROFF, A. Minimum fungicidal concentrations of amphotericin B for bloodstream *Candida* species. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 45, n. 3, p. 203-206, 2003.

CARMICHAEL, J. W. Chrysosporium and some other aleuriosporic Hyphomycetes. **Canadian Journal of Botany**, v. 40, p. 1137-1173, 1962.

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

CARSON, C. F.; HAMMER, K. A.; RILEY, T. V. *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. **Clinical microbiology reviews**, v. 19, n. 1, p. 50-62, 2006.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Método de referência para testes de diluição em caldo para determinação da sensibilidade de leveduras à terapia antifúngica: Norma aprovada – M27-A2**, v. 22, n. 15, 2. ed. Pennsylvania, Estados Unidos, 2002a.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Método de referência para testes de diluição em caldo para determinação da sensibilidade a terapia antifúngica dos fungos filamentosos: Norma aprovada – M38-A**, v. 22, n. 16, Pennsylvania, Estados Unidos, 2002b.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts**; Approved Standard. 3rd ed. CLSI document M27-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008a.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi**. 2nd ed. Approved standard. CLSI document M38-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008b.

CONCHA, J. M.; MOORE, L. S.; HOLLOWAY, W. J. Antifungal activity of *Melaleuca alternifolia* (tea-tree) oil against various pathogenic organisms. **J. Am. Podiatr. Med. Assoc.**, v. 88, n. 10, p. 489-92, 1998.

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

CORDEIRO, R. A.; NOGUEIRA, G. C.; BRILHANTE, R. S. N.; TEIXEIRA, C. E. C.; MOURÃO, C. I.; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M.; ARAUJO NETO, P. M.; RIBEIRO, J. F.; MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Farnesol inhibits *in vitro* growth of the *Cryptococcus neoformans* species complex with no significant changes in virulence-related exoenzymes. **Veterinary Microbiology**, n. 159, p. 375-80, 2012a.

CORDEIRO, R. A.; TEIXEIRA, C. E.; BRILHANTE, R. S.; CASTELO-BRANCO, D. S.; PAIVA, M. A.; GIFFONI LEITE, J. J.; LIMA, D. T.; MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J. J.; ROCHA, M. F. Minimum inhibitory concentrations of amphotericin B, azoles and caspofungin against *Candida* species are reduced by farnesol. **Medical Mycology**, v. 51, n. 1, p. 53-9, 2012b.

CORREA, B; GAMBALE, W; PAULA, CR; PALAZZO, S. Morphogenesis of *Sporothrix schenckii* *in vivo* and *in vitro* through the method of viability by fluorescence. **Applied Fluorescence Technology**. v. 3, p.1-8, 1991.

COWEN, L. E.; STEINBACH, W. J. Stress, drugs, and evolution: the role of cellular signaling in fungal drug resistance. **Eukaryotic cell**, v. 7, n. 5, p. 747-764, 2008.

CRISEO, G., G. MALARA, O. ROMEO, AND A. PUGLISI GUERRA. Lympho-cutaneous sporotrichosis in an immunocompetent patient: a case report from extreme southern Italy. **Mycopathologia**, v. 166, n. 3, p. 159–162, 2008.

CRUZ, L. C. H. **Micologia veterinária**. Rio de Janeiro: Revinter; 2010.

CRUZ, L. C. H. Complexo *Sporothrix schenckii*. Revisão de parte da literatura e considerações sobre o diagnóstico e a epidemiologia. **Revista veterinária Zootecnia**, 20ª (Edição Comemorativa), p. 08-28, 2013.

CUSTÓDIO, D. L.; VEIGA-JUNIOR, V, F. True and common balsams. **Rev. bras. Farmacogn**, v. 22, n. 6, p.1372-1383, 2012.

DA SILVA, M. B. T. D.; COSTA, M. M. D. M.; TORRES, C. C. D. S.; GALHARDO, M. C. G.; VALLE, A. C. F. D.; MAGALHÃES, M. D. A. F.; OLIVEIRA, R. M. D. Urban sporotrichosis: a neglected epidemic in Rio de Janeiro, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 28, n. 10, p. 1867-1880, 2012.

DE ARAUJO, T.; MARQUES, A. C.; KERDEL, F. Sporotrichosis. **International Journal Dermatology**, v. 40, n. 12, p. 737-742, 2001.

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

DERENGOWSKI, L. S.; DE-SOUZA-SILVA, C.; BRAZ, S. V.; MELLO-DE-SOUSA, T. M.; BÁO, S. N.; KYAW, C. M.; SILVA-PEREIRA, I. Antimicrobial effect of farnesol, a *Candida albicans* quorum sensing molecule, on *Paracoccidioides brasiliensis* growth and morphogenesis. **Ann Clin Microbiol Antimicrob**, p. 8-13, 2009.

FERNANDES, K. S. S.; HERBERT L.; MATHEWS, H. L.; BEZERRA, L. M. L. Differences in virulence of *Sporothrix schenckii* conidia related to culture conditions and cell-wall components. **Journal of Medical Microbiology [S.I.]**, v. 48, n. 2, p. 195-203, 1999.

FILGUEIRA, K. D. Esporotricose na espécie canina: relato de um caso na cidade de Mossoró, RN. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 2, p. 673-677, 2009.

FRANCESCONI, G.; FRANCESCONI DO VALLE, A.C.; PASSOS, S.L.; DE LIMA BARROS, M. B. L.; ALMEIDA-PAES, R.; CURI, A. L.; LIPORAGE, J.; PORTO, C. F.; GALHARDO M.C. Comparative study of 250 mg/day terbinafine and 100 mg/day itraconazole for the treatment of cutaneous sporotrichosis. **Mycopathologia**, v. 171, n. 5, p. 349-354, 2011.

GILABERTE, Y.; ASPIROZ, C., ALEJANDRE, M. C.; ANDRES-CIRIANO, E.; FORTUÑO, B.; CHARLEZ, L.; REVILLO, M. J.; HAMBLIN, M. R.; REZUSTA, A. Cutaneous sporotrichosis treated with photodynamic therapy: an *in vitro* and *in vivo* study. **Photomed. Laser. Surg.**, v. 32, p. 54-57, 2014.

GIRÃO, M. D.; PRADO, M. R.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G.; Viabilidade de cepas de *Malassezia pachydermatis* mantidas em diferentes métodos de conservação. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, p. 229-233, 2004.

GOMES, A. R.; MADRID, I. M.; MATOS, C. B.; TELLES, A. J.; WALLER, S. B.; NOBRE, M. O.; MEIRELES, M. C. A. Dermatopatias Fúngicas: aspectos clínicos, diagnósticos e terapêuticos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 6, n. 4, p. 272-284, 2012.

GRACE, M. H. Chemical composition and biological activity of the volatiles of *Anthemis melampodina* and *Pluchea dioscoridis*. **Phytotherapy Research**, v. 16, n. 2, p. 183-185, 2002.

GREMIÃO, I. D. F.; SCHUBACH, T. M. P.; PEREIRA, S. A.; RODRIGUES, A. M.; CHAVES, A. R.; BARROS, M. B. L. Intralesional amphotericin B in a cat with refractory localised sporotrichosis. **Journal of Feline Medicine and Surgery**. v. 11, n. 8, p. 720-723, 2009.

GUARRO, J., GENÉ, J.; STCHIGEL, A. M. Developments in fungal taxonomy. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 3, p. 454-500, 1999.

HAMMER, K. A.; CARSON C. F.; RILEY, T. V. Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, p. 853-860, 2003.

HAMMER, K. A.; CARSON C. F.; RILEY, T. V. Antifungal effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and its components on *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 53, p. 1081-1085, 2004.

HARRINGTON, B. J.; GEORGE, J. H. Calcofluor white: a review of its uses and applications in clinical mycology and parasitology. **Lab Medicine**, v. 34, p. 361-367, 2003.

HEKTOEN, L.; PERKINS, C. F. Refractory subcutaneous abscess caused by *Sporothrix schenckii*: a new pathogenic fungus. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 5, n. 1, p. 77-91, 1900.

HOMOLKA L. Preservation of live cultures of basidiomycetes-recent methods. **Fungal Biology** 2013.

HUBÁLEK Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. **Cryobiology**, v. 46, p. 205-29, 2003.

JABRA-RIZK, M. A.; MEILLER, T. F.; JAMES, C. E.; SHIRTLIFF, M. E. Effect of farnesol on *Staphylococcus aureus* biofilm formation and antimicrobial susceptibility. **Antimicrobial Agents Chemother**; v. 50, n. 4, p. 1463-9, 2006a.

JABRA-RIZK, M. A.; SHIRTLIFF, M. E.; JAMES, C. E.; MEILLER, T. Effect of farnesol on *Candida dubliniensis* biofilm formation and fluconazole resistance. **FEMS Yeast Res**, v. 6, p.1063 – 1073, 2006b.

JEON, J-G.; PANDIT, S.; XIAO, J.; GREGOIRE, S.; FALSETTA, M. L.; KLEIN, M. I.; KOO, H. Influences of trans-trans farnesol, a membrane-targeting sesquiterpenoid, on *Streptococcus mutans* physiology and survival within mixed-species oral biofilms. **International Journal of Oral Science**, v. 3, p. 2, p. 98–106, 2011.

JESUS, E. R.; BARIN, C. S.; MACHADO, R. E. Óleo Essencial de *Melaleuca alternifolia* - Otimização do Método de Análise. **XV Encontro de Química da Região Sul**. UEPG. 2007.

KAUFFMAN, C. A.; BUSTAMANTE, B.; CHAPMAN, S. W.; PAPPAS, P. G. Clinical Practice Guidelines for the Management of Sporotrichosis: 2007 Update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 45, n. 10, p. 1255–1265, 2007a.

KHALIL, Z.; PEARCE, A. L.; SATKUNANATHAN, N.; STORER, E.; FINLAY-JONES, J. J.; HART, P. H. Regulation of wheal and flare by tea tree oil: complementary human and rodent studies. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 123, n. 4, p. 683-690, 2004.

KOHLER, L. M.; HAMDAN, J. S.; FERRARI, T. C. Successful treatment of a disseminated *Sporothrix schenckii* infection and *in vitro* analysis for antifungal susceptibility testing. **Diagnostic Microbiology Infectious Disease**, v. 58, n. 1, p. 117–120, 2007.

KOO, H.; SCHOBEL, B.; SCOTT-ANNE, K.; WATSON, G.; BOWEN, W. H.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L.; PARK, Y. K. Apigenin and tt-farnesol with fluoride effects on *S. mutans* biofilms and dental caries. **Journal of Dental Research**, v. 84 n. 11, p. 1016-20, 2005.

KUMAR, R. S.; GANVIR, S. M.; HAZAREY, V. K. Candida and calcofluor white: Study in precancer and cancer. **Journal of Oral and Maxillofacial Pathology**, v. 13, p. 2, 2009.

KURODA, M.; NAGASAKI, S.; OHTA, T. Sesquiterpene farnesol inhibits recycling of the C55 lipid carrier of the murein monomer precursor contributing to increased susceptibility to lactams in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal Antimicrobial Chemother**, v.59, p.425– 432, 2007.

KURY, B. A. et al., Diretrizes e estratégias para a modernização de coleções biológicas e a consolidação de sistemas integrados de informação sobre biodiversidade. Brasília Centro de Gestão e Estudos Estratégicos. **Ministério da Ciência e Tecnologia**, 2000.

LACAZ, C. S., PORTO, E., MARTINS, J. E. C. M. Esporotricose e outras micoses gomosas. In: Micologia Médica. São Paulo, **Savier**, p. 233-247, 1991.

LARSSON, C. E. Sporotrichosis. **Brazilian Journal of Veterinary Reserach Animal Science**, v. 48, n. 3, p. 250-259, 2011.

LIMA, R. F.; BORBA, C. M. Viability, morphological characteristics and dimorphic ability of fungi preserved by different methods. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 18, p. 191-6, 2001.

LIMA, R. F.; SANTOS BRITO, M. M.; SCHÄFFER, G. M.; LIMA, O. C.; BORBA, C. M. Evaluation of the *in vitro* and *in vivo* dimorphism of *Sporothrix schenckii*, *Blastomyces dermatitidis*, and *Paracoccidioides brasiliensis* isolates after preservation in mineral oil. **Canadian Journal Microbiology**; v. 50, p. 445-9, 2004.

LIMA, R. F.; SCHÄFFER, G. V.; BORBA, C. M. Variants of *Sporothrix schenckii* with attenuated virulence for mice. **Microbes and Infection**, v. 5, p. 933-8, 2003.

LOPES-BEZERRA, L. M.; SCHUBACH, A.; COSTA, R. O. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v.78, n. 2, p.293-308, 2006.

LUTZ, A. AND SPLENDORE A. Sobre uma mycose observada em homens e ratos. **Revista Medica**, v. 21, p. 433– 450, 1907.

MADRID, I. M.; MATTEI, A. S.; FERNANDES, C. G.; NOBRE, M. O.; MEIRELES, M. C. A. Epidemiological Findings and Laboratory Evaluation of Sporotrichosis: A Description of 103 Cases in Cats and Dogs in Southern Brazil. **Mycopathologia**. v. 173, n.4, p. 265-273, 2011b.

MADRID, I. M.; SANTIN, R.; SCHUCH, L. F. D.; GOMES, A. R.; NOBRE, M. O.; MEIRELES, M. C. A. Morphological pattern and thermotolerance of clinical and from environment isolates of *Sporothrix schenckii* from the south of Brazil. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 18, n. 2/3, p. 57-61, 2011a.

MADRID, I. M.; XAVIER, M. O.; MATTEI, A. S.; FERNANDES, C. G.; GUIM, T. N.; SANTIN, R.; SCHUCH, L. F. D.; NOBRE, M. O.; MEIRELES, M. C. A. Role of melanin in the pathogenesis of cutaneous sporotrichosis. **Microbes and Infection**, v. 12, n. 2, p.162-165, 2010.

MAGAND, F.; PERROT, J. L.; CAMBAZARD, F.; RABERIN, M. H.; LABELLE, B. Sporotrichose cutané e autochtone française. **Annales de Dermatologie et de Vénérologie**, v. 136, p. 273–275, 2009.

MARCOS-ARIAS, C.; ERASO, E.; MADARIAGA, L.; QUINDÓS, G. *In vitro* activities of natural products against oral Candida isolates from denture wearers. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 11, n. 1, p. 119, 2011.

MARIMON, R.; CANO, J.; GENÉ, J.; SUTTON, D. A.; KAWASAKI M.; GUARRO J. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 10, p. 3198-3206, 2007.

MARIMON, R.; GENÉ, J.; CANO, J.; TRILLES, L.; LAZERA, M. S.; GUARRO, J. Molecular phylogeny of *Sporothrix schenckii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 9, p. 3251–3256, 2006.

MARQUES-EVANGELISTA, O. M.; ALMEIDA-PAES, R.; DE MEDEIROS-MUÑIZ, M.; DE LIMA-BARROS, B. M.; GUTIERREZ-GALHARDO, C. M.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M. Sporotrichosis Caused by *Sporothrix globosa* in Rio de Janeiro Brazil: Case report. **Mycopathologia**, v. 169, n. 5, p. 359-363, 2010.

- MARQUES F. J. F. Efeito inibitório de drogas antituberculose frente à *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* e *Cryptococcus* spp.: síntese de análogos químicos, atividade antifúngica *in vitro* e mecanismo de ação. [Tese]. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará; 2013.
- MEDEIROS, J. R.; CAMPOS, L. B.; MENDONÇA, S. C.; DAVIN, L. B.; LEWIS, N. G. Composition and antimicrobial activity of the essential oils from invasive species of the Azores, *Hedychium gardnerianum* and *Pittosporum undulatum*. **Phytochemistry**, v. 4, n. 2, p. 561-565, 2003.
- MEHTA, K. I. S., SHARMA, N. L., KANGA, A. K., VIKRAM K. MAHAJAN, V. K., NITIN RANJAN, N. Isolation of *Sporothrix schenckii* from the environmental sources of cutaneous sporotrichosis patients in Himachal Pradesh, India: results of a pilot study. **Mycoses**, v. 50, n. 6, p. 496–501, 2007.
- MEINERZ, A. R. M.; NASCENTE, P. S.; SCHUCH, L. F. D.; CLEFF, M. B.; SANTIN, R.; BRUM, C. S.; NOBRE, M. O.; MEIRELES, M. C. A.; MELLO, J. R. B. *In vitro* susceptibility of isolates of *Sporothrix schenckii* to terbinafine and itraconazole. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.40, n. 1, p. 60–62, 2007.
- MENDOZA, M.; ALVARADO, P.; TORRES, E. D; et al. Comportamiento fisiológico y de sensibilidad *in vitro* de aislamientos de *Sporothrix schenckii* mantenidos 18 años por dos métodos de preservación. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 22, p. 151–6, 2005.
- MONDELLO, F., DE BERNARDIS, F., GIROLAMO, A., CASSONE, A., SALVATORE, G. *In vivo* activity of terpinen-4-ol, the main bioactive component of *Melaleuca alternifolia* Cheel (tea tree) oil against azole-susceptible and-resistant human pathogenic *Candida* species. **BMC infectious diseases**, v. 6, n. 1, p. 158, 2006.
- MORRIS-JONES, R. Sporotrichosis. **Clinical Experimental Dermatology**, v. 27, n. 6, p. 427–431, 2002.
- MORRIS-JONES, R.; YOUNGCHIM, S.; GOMES, B. L.; AISEN, P.; HAY, R. J.; NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A.; HAMILTON, A. J. Synthesis of melanin-like pigments by *Sporothrix schenckii* *in vitro* and during mammalian infection. **Infection Immunity [S.I.]**, v. 71, n. 7, p. 4026-4033, 2003.
- NAVARATHNA, D. H.; HORNBY, J. M.; KRISHNAN, N.; PARKHURST, A.; DUHAMEL, G. E.; NICKERSON, K. W. Effect of farnesol on a mouse model of systemic candidiasis, determined by use of a DPP3 knockout mutant of *Candida albicans*. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 4, p. 1609-18, 2007.
- NINOMIYA, K.; MARUYAMA, N.; INOUE, S.; ISHIBASHI, H.; TAKIZAWA, T.; OSHIMA, H.; ABE, S. The Essential Oil of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree Oil) and Its Main Component, Terpinen-4-ol Protect Mice from Experimental Oral Candidiasis. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 35, n. 6, p. 861-865, 2012.
- NOBRE, M. O.; POTTER-DE-CASTRO, A.; CAETANO, D.; LEONARDO-DE-SOUZA, L.; ARAUJO-MEIRELES, M. C. Recurrence of sporotrichosis in cats with zoonotic involvement. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 18, n. 3, p. 137-140, 2001.

NOBRE, M.O., MADRID, I.M., ANTUNES, T.A., MARTINS, A.A., FERNANDES, C.G., MATTEI, A.S., SPANAMBERG, A., MEIRELES, M.C.A., FERREIRO, L. Virulence differences between albino and pigmented *Sporothrix schenckii* isolates. **Journal de Mycologie Médicale / Journal of Medical Mycology [S.I.]**, v. 18, n. 4, p. 191-197, 2008.

NUNES, G. D. L.; CARNEIRO, R. S.; FILGUEIRA, K. D.; FILGUEIRA, F. G. F.; FERNANDES, T. H. T. Esporotricose felina no município de Itaporanga. **Arquivo Ciência Veterinária e Zoologia**, v. 14, n. 2, p. 157-161, 2011.

OLIVA, B.; PICCIRILLI, E.; CEDDIA, T.; PONTIERI, E.; AURELI, P.; FERRINI, A. M. Antimycotic activity of *Melaleuca alternifolia* essential oil and its major components. **Lett Appl Microbiology**, v. 37, p. 185–187, 2003.

OLIVEIRA, M. M.; ALMEIDA-PAES, R.; MUNIZ, M. M.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M. Phenotypic and molecular identification of *Sporothrix* isolates from an epidemic area of sporotrichosis in Brazil. **Mycopathologia**, v. 172, p. 257-67, 2011a.

OZKAVUKCU, S.; ERDEMLI, E. Cryopreservation: basic knowledge and biophysical effects. **J Ankara Medical School**, v. 24: 187-196, 2002.

PETRONILHO, S.; MARASCHIN, M.; DELGADILLO, I.; COIMBRA, M. A.; ROCHA, S. M. Sesquiterpenic composition of the inflorescences of Brazilian chamomile (*Matricaria recutita* L.): Impact of the agricultural practices. **Industrial Crops and Products**, v. 34, n. 3, p. 1482–1490, 2011.

PIERCE, C. G.; SRINIVASAN, A.; UPPULURI, P.; RAMASUBRAMANIAN, A. K.; LÓPEZ-RIBOT, J. L. Antifungal therapy with an emphasis on biofilms. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 13, n. 5, p. 726-730, 2013.

PINTO, E.; HRIMPENG, K.; LOPES, G.; VAZ, S.; GONÇALVES, M. J.; CAVALEIRO, C.; SALGUEIRO, L. Antifungal activity of *Ferulago capillaris* essential oil against *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* and dermatophyte species. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, p. 1-10, 2013.

RAMAGE, G.; SAVILLE, S. P.; WICKES, B. L.; LÓPEZ-RIBOT, J. L. Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation by farnesol, a quorum-sensing molecule. **Applied Environmental Microbiology**, v. 68, n. 11, p. 5459-63, 2002.

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

REICHLING, J.; SCHNITZLER, P.; SUSCHKE, U.; SALLER, R. Essential oils of aromatic plants with antibacterial, antifungal, antiviral, and cytotoxic properties an overview. **Forsch Komplementmed**, v. 16, n. 2, p. 79-90, 2009.

REIS, R. S., ALMEIDA-PAES, R., MUNIZ, M. M., TAVARES, P. M., MONTEIRO, P. C., SCHUBACH, T. M., GUTIERREZ-GALHARDO, M. C., ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M. Molecular characterisation of *Sporothrix schenckii* isolates from humans and cats involved in

the sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 5, p. 769-774, 2009.

ROCHA, M. F. G.; LIMA, D. T.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; MONTEIRO, A. J.; TEIXEIRA, C. E. C.; et al. Glucose and lactose as cryoprotectants for fungal strains immobilised in sodium alginate: an emphasis on the conservation of the zygomycetes *Rhizopus* and *Mucor*. **Mycoses**, v. 56, p. 321–6, 2013.

RODRIGUES, A. M. Taxonomia polifásica e características proteômicas do complexo *Sporothrix schenckii*. [Dissertação]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 2010.

RODRIGUES, A. M.; DE HOOG, S.; DE CAMARGO, Z. P. Emergence of pathogenicity in the *Sporothrix schenckii* complex. **Medical Mycology**, v. 51, n. 4, p. 405-412, 2013.

ROSSER, J. R. Sporotrichosis: diagnostic and treatment challenges. In: World congress of veterinary dermatology. Hong Kong, China. Proceedings p. 220-226, 2008.

ROSSIGNOL, T.; LOGUE, M. E.; REYNOLDS, K.; BUTLER, G. Transcriptional response of *Candida parapsilosis* following exposure to farnesol. **Antimicrobial Agents Chemother**, v.51, p. 2304 – 2312, 2007.

SCHENCK, B. R. On refractory subcutaneous abscess caused by a fungus possibly related to the *Sporotricha*. **Bulletin Johns Hopkins Hosp.**, v. 9, p. 286–290, 1898.

SCHUBACH T. M. P.; FIGUEIREDO F.B.; OKAMOTO T.; BARBIERE I.; PEREIRA A.S.; CUZZI-MAYA T.; ANDRADE M.V.; MADEIRA M.F.; LEAL C.A.; SILVA R.M.M.; SCHUBACH A. O. Leishmaniose tegumentar americana em gato doméstico (*Felis catus*) naturalmente infectado no Rio de Janeiro – Relato de isolamento de *Leishmania* sp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 1, p.342, 2003b.

SCHUBACH, A.; BARROS, M. B. L.; SCHUBACH, T. M.; FRANCESCONI-DO-VALLE, A. C.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; SUED, M.; DE MATOS 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**, v. 24, n. 4, p. 491–493, 2005.

SCHUBACH, T. M.; SCHUBACH, A.; OKAMOTO, T.; PELLON, I. V.; FIALHO-MONTEIRO, P. C.; REIS, R. S.; BARROS, M. B.; ANDRADE-PEREZ, M.; WANKE, B. Haematogenous spread of *Sporothrix schenckii* in cats with naturally acquired sporotrichosis. **Journal of Small Animal Practice**, v.44, n. 9, p. 395-398, 2003a.

SCHNEE, C.; KÖLLNER, T. G.; GERSHENZON, J.; DEGENHARDT, J. The maize gene terpene synthase 1 encodes a sesquiterpene synthase catalyzing the formation of (E)-beta-farnesene, (E)-nerolidol, and (E, E)-farnesol after herbivore damage. **Plant. Physiol**, v. 130, n. 4, p. 2049-60, 2002.

SHAW, J. M.; ORANRATNACHAI, A.; TROUNSON, A. O. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. **Theriogenology**, v. 53, p. 59–72, 2000.

SHIRTLIFF, M. E.; KROM, B. P.; MEIJERING, R. A. M.; PETERS, B. M.; ZHU, J.; SCHEPER, M. A.; HARRIS, M. L.; JABRA-RIZK, M. A. Farnesol-induced apoptosis in *Candida albicans*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, p. 2392 – 2401, 2009.

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

SILVA, R. S. S.; DEMUNER, A. J.; BARBOSA, L. A.; CASALI, V. W. D.; NASCIMENTO, E. A.; PINHEIRO, A. L. Efeito do Estresse Hídrico sobre Características de Crescimento e a Produção de Óleo Essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel. **Acta Scientiarum**, v. 24, n. 5, p. 363-368, 2002.

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

SOARES-JÚNIOR, F. A.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; BRITO, E. H. S.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Glucose improves the *in vitro* viability of *Microsporium canis* and *Trichophyton mentagrophytes* var. *mentagrophytes*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 69, p. 218–221, 2007.

SOUZA, N. T.; NASCIMENTO, A. C. B. M.; SOUZA, J. O. T.; SANTOS, F. C. G. C. A.; CASTRO R. B. Esporotricose canina: relato de caso [Canine sporotrichosis: case report]. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootenia**, v. 61, n. 3, p. 572-576, 2009.

SOUZA, A. I.; BARROS, E. M. S.; ISHIKAWA, E.; ILHA, I. M. N.; MARIN, G. R. B.; NUNES, V. L. B. Feline leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.128, n. 1-2, p. 41-45, 2005.

STACEY, G. N. Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols. Day JG, Stacey GN, editors. **Totowa, NJ: Humana Press**, p. 368, 2007.

STALKUP, J. R.; BELL, K.; ROSEN, T. Disseminated cutaneous sporotrichosis treated with itraconazole. **Cutis**, v. 69, n. 5, p. 371-378, 2002.

STACEY, G. N. Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols. DAY, J. G.; STACEY G. N. editors. **Totowa, NJ: Humana Press**, p. 368, 2007.

TESKE, M.; TRENTINI, A. M. M. Herbário compêndio de fitoterapia. **Curitiba: Herbarium Lab. Bot. Ltda.**, 4. ed, 2001.

TRILLES, L.; FERNÁNDEZ-TORRES, B.; LAZÉRA, M. S.; WANKE, B.; SCHUBACH, A. O.; ALMEIDA PAES, R.; ISABEL INZA, I.; GUARRO, J. *In vitro* Antifungal Susceptibilities of *Sporothrix schenckii* in Two Growth Phases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 49, n. 9, p. 3952–3954, 2005.

VIEIRA, T. R.; BARBOSA, L. C. A.; MALTHA, C. R. A. Constituintes químicos de *Melaleuca alternifolia* (Myrtaceae). **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 536-539, 2004.

YU, L. H.; WEI, X.; MA, M.; CHEN, X. J.; XU, S. B. Possible inhibitory molecular mechanism of farnesol on the development of fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilm. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 56, n. 2, p. 770-5, 2012.

APÊNDICE

Apêndice 1. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) de farnesol frente às cepas de *Sporothrix* spp.

NÚMERO CEMM	ESPÉCIE	ORIGEM DE ISOLAMENTO	FARNESOL	
			CIM (µM)	CFM (µM)
CEMM 05-3-048	<i>S. schenckii</i>	Gato	1	>4
CEMM 05-3-049	<i>S. brasiliensis</i>	Gato	0,0625	0,5
CEMM 05-3-050	<i>S. brasiliensis</i>	Gato	0,0625	0,5
CEMM 05-3-051	<i>S. brasiliensis</i>	Gato	0,125	0,5
CEMM 05-3-052	<i>S. brasiliensis</i>	Cão	0,125	2
CEMM 05-3-053	<i>S. brasiliensis</i>	Gato	0,125	1
CEMM 05-3-055	<i>S. brasiliensis</i>	Gato	0,0625	0,125
CEMM 05-3-056	<i>S. brasiliensis</i>	Gato	0,015625	0,125
CEMM 05-3-057	<i>S. brasiliensis</i>	Gato	0,03125	0,25
CEMM 05-3-058	<i>S. brasiliensis</i>	Gato	0,25	2
CEMM 05-3-059	<i>S. brasiliensis</i>	Gato	0,125	2
CEMM 05-3-061	<i>S. brasiliensis</i>	Gato	0,0625	0,5
CEMM 05-3-062	<i>S. brasiliensis</i>	Gato	0,0625	1
CEMM 05-3-068	<i>S. brasiliensis</i>	Gato	0,25	4
CEMM 05-3-069	<i>S. brasiliensis</i>	Gato	0,0625	4
CEMM 05-3-070	<i>S. brasiliensis</i>	Gato	0,015625	2
CEMM 05-3-071	<i>S. brasiliensis</i>	Gato	0,125	1
CEMM 05-3-074	<i>S. brasiliensis</i>	Gato	0,03125	1
CEMM 05-3-075	<i>S. brasiliensis</i>	Gato	0,0625	4
CEMM 05-3-076	<i>S. brasiliensis</i>	Gato	0,03125	0,5
CEMM 05-3-079	<i>S. brasiliensis</i>	Gato	0,0625	0,125
CEMM 05-3-082	<i>S. brasiliensis</i>	Humano	0,03125	1
CEMM 05-3-084	<i>S. brasiliensis</i>	Humano	0,03125	1
CEMM 05-3-090	<i>S. schenckii</i>	Humano	0,125	0,125
CEMM 05-3-091	<i>S. brasiliensis</i>	Humano	0,0625	1
CEMM 05-3-092	<i>S. schenckii</i>	Humano	1	1
CEMM 05-3-093	<i>S. brasiliensis</i>	Humano	0,03125	>4
CEMM 05-3-094	<i>S. brasiliensis</i>	Humano	0,0625	0,125
CEMM 05-3-095	<i>S. schenckii</i>	Humano	0,03125	0,5
CEMM 05-3-096	<i>S. brasiliensis</i>	Humano	0,25	0,125
CEMM 05-3-097	<i>S. schenckii</i>	Humano	0,5	1
CEMM 05-3-100	<i>S. mexicana</i>	Vegetal	1	2
CEMM 05-4-001	<i>S. mexicana</i>	Solo	0,5	>4
CEMM 05-4-002	<i>S. schenckii</i>	Solo	0,125	4
CEMM 05-4-004	<i>S. globosa</i>	Humano	0,03125	2
CEMM 05-4-005	<i>S. globosa</i>	Humano	0,0625	1
CEMM 05-4-006	<i>S. globosa</i>	Humano	0,25	1
CEMM 05-4-007	<i>S. mexicana</i>	Humano	0,0625	0,5
CEMM 05-4-008	<i>S. mexicana</i>	Humano	0,015625	1
CEMM 05-4-009	<i>S. mexicana</i>	Humano	0,5	1

Apêndice 2. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) de terpinen-4-ol frente às cepas de *Sporothrix* spp.

NÚMERO CEMM	ESPÉCIE	ORIGEM DE ISOLAMENTO	TERPINEN-4-OL	
			CIM (mM)	CFM (mM)
CEMM 05-3-048	<i>S. schenckii</i>	Gato	2,3187	>37,1
CEMM 05-3-049	<i>S. brasiliensis</i>	Gato	4,6375	37,1
CEMM 05-3-050	<i>S. brasiliensis</i>	Gato	2,3187	37,1
CEMM 05-3-051	<i>S. brasiliensis</i>	Gato	2,3187	37,1
CEMM 05-3-052	<i>S. brasiliensis</i>	Cão	4,6375	>37,1
CEMM 05-3-053	<i>S. brasiliensis</i>	Gato	4,6375	37,1
CEMM 05-3-055	<i>S. brasiliensis</i>	Gato	9,275	>37,1
CEMM 05-3-056	<i>S. brasiliensis</i>	Gato	1,159375	18,55
CEMM 05-3-057	<i>S. brasiliensis</i>	Gato	2,31875	18,55
CEMM 05-3-058	<i>S. brasiliensis</i>	Gato	4,6375	37,1
CEMM 05-3-059	<i>S. brasiliensis</i>	Gato	4,6375	37,1
CEMM 05-3-061	<i>S. brasiliensis</i>	Gato	2,31875	37,1
CEMM 05-3-062	<i>S. brasiliensis</i>	Gato	4,6375	37,1
CEMM 05-3-064	<i>S. brasiliensis</i>	Cão	2,31875	18,55
CEMM 05-3-068	<i>S. brasiliensis</i>	Gato	2,31875	18,55
CEMM 05-3-069	<i>S. brasiliensis</i>	Gato	1,159375	37,1
CEMM 05-3-070	<i>S. brasiliensis</i>	Gato	2,31875	18,55
CEMM 05-3-074	<i>S. brasiliensis</i>	Gato	2,31875	18,55
CEMM 05-3-075	<i>S. brasiliensis</i>	Gato	2,31875	>37,1
CEMM 05-3-076	<i>S. brasiliensis</i>	Gato	2,31875	18,55
CEMM 05-3-079	<i>S. brasiliensis</i>	Gato	2,31875	37,1
CEMM 05-3-082	<i>S. brasiliensis</i>	Humano	2,31875	18,55
CEMM 05-3-084	<i>S. brasiliensis</i>	Humano	2,31875	>37,1
CEMM 05-3-090	<i>S. schenckii</i>	Humano	1,159375	18,55
CEMM 05-3-091	<i>S. brasiliensis</i>	Humano	1,159375	37,1
CEMM 05-3-092	<i>S. schenckii</i>	Humano	9,275	37,1
CEMM 05-3-093	<i>S. brasiliensis</i>	Humano	1,159375	9,275
CEMM 05-3-094	<i>S. brasiliensis</i>	Humano	2,31875	9,275
CEMM 05-3-095	<i>S. schenckii</i>	Humano	2,31875	18,55
CEMM 05-3-096	<i>S. brasiliensis</i>	Humano	0,57969	1,159375
CEMM 05-3-097	<i>S. schenckii</i>	Humano	2,31875	37,1
CEMM 05-3-100	<i>S. mexicana</i>	Vegetal	9,275	>37,1
CEMM 05-4-001	<i>S. mexicana</i>	Solo	4,6375	37,1
CEMM 05-4-002	<i>S. schenckii</i>	Solo	1,159375	>37,1
CEMM 05-4-004	<i>S. globosa</i>	Humano	2,31875	>37,1
CEMM 05-4-005	<i>S. globosa</i>	Humano	0,57969	18,55
CEMM 05-4-006	<i>S. globosa</i>	Humano	1,159375	9,275
CEMM 05-4-007	<i>S. mexicana</i>	Humano	1,159375	4,6375
CEMM 05-4-008	<i>S. mexicana</i>	Humano	1,159375	9,275
CEMM 05-4-009	<i>S. mexicana</i>	Humano	4,6375	37,1

PUBLICAÇÕES