



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA**

**ALANNA MAYARA SOARES DE SOUSA**

**GERANIOL ENCAPSULADO EM MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA: UMA  
ESTRATÉGIA PROMISSORA CONTRA *Sporothrix brasiliensis***

**FORTALEZA**

**2025**

ALANNA MAYARA SOARES DE SOUSA

GERANIOL ENCAPSULADO EM MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA: UMA  
ESTRATÉGIA PROMISSORA CONTRA *Sporothrix brasiliensis*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia Médica. Área de concentração: Microbiologia Humana e Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante

FORTALEZA

2025

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S696g      Sousa, Alanna Mayara Soares de.  
Geraniol encapsulado em Micropartículas de Quitosana : Uma estratégia promissora contra *Sporothrix brasiliensis* / Alanna Mayara Soares de Sousa. – 2025.  
65 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2025.  
Orientação: Profa. Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante.

1. Esporotricose. 2. Biofilmes. 3. Encapsulamento. 4. Monoterpeno. 5. Agente antifúngico. I. Título.  
CDD 616.9

ALANNA MAYARA SOARES DE SOUSA

GERANIOL ENCAPSULADO EM MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA: UMA  
ESTRATÉGIA PROMISSORA CONTRA *Sporothrix brasiliensis*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia Médica. Área de concentração: Microbiologia Humana e Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

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

---

Prof. Dr. Marcus De Melo Teixeira  
Universidade de Brasília (UnB)

---

Prof. Dr. Ricardo Barbosa De Lucena  
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

A Deus.

A minha mãe, Luzimar.

A todos que contribuíram para esse momento.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as bençãos, por me cercar de pessoas incríveis e me dar forças e saúde para caminhar e superar os momentos difíceis. Nada seria possível sem a Sua Graça e proteção.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pelo apoio financeiro e pela manutenção da bolsa que tornou essa caminhada possível. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro para a realização deste trabalho.

À Universidade Federal do Ceará (UFC), por oferecer o espaço e a infraestrutura necessários para o desenvolvimento da pesquisa.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica (PPGMM), que contribuíram para minha formação acadêmica e científica.

A equipe do Prof. Dr. Rodrigo Silveira Vieira e ao Núcleo de Pesquisas em Lubrificantes Prof. Ícaro de Sousa Moreira, pela colaboração fundamental para as etapas experimentais deste estudo.

Ao *One Health Microbiology Laboratory* (ONEHMIC Lab), por todo suporte, recursos e acolhimento ao longo dessa jornada.

À Profa. Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante, por ter me recebido no laboratório, acreditado em mim e me guiado desde o estágio até o mestrado. Por toda a atenção e dedicação com seus alunos. Sou imensamente grata por ter caminhado sob sua orientação e por todo o aprendizado que levarei comigo.

À minha mãe, Luzimar, meu maior exemplo de força, fé e amor. Só nós sabemos o quanto essa jornada foi difícil, mas a senhora nunca hesitou em me apoiar, mesmo quando o caminho era incerto. Obrigada por segurar as pontas, por ser meu porto seguro e por nunca duvidar do meu potencial. Tudo que conquisto é, e sempre será, por você! Você é o amor da minha vida.

Ao meu irmão, Alan, meu parceiro de vida. Apesar dos desentendimentos, sei que nosso vínculo é inquebrável. Amo você!

Ao Pablo, meu amor, meu companheiro de todas as horas. Obrigada por ser meu suporte físico, emocional e financeiro nesses anos todos, por suportar meu estresse, por me dar conforto e por fazer o possível e o impossível para me ver feliz. Meu amor por você só cresce, e essa conquista também é sua; é só mais um passinho até chegarmos na nossa vida dos sonhos!

Aos meus sogros, Ana de Fátima e José Mauro, por me acolherem como parte da família e estarem sempre dispostos a ajudar. Obrigada Dona Ana, pelas comidas deliciosas que aquecem a alma. Amo vocês.

Aos meus melhores amigos, Álvaro, Cecília, João e Thays. São 20 anos de amizade, vocês são como irmãos pra mim. Obrigada por todas as vivências compartilhadas, pelos momentos felizes, pelos desabafos e até pelas brigas que só fortalecem nossa amizade. Amo vocês imensamente.

Às minhas amigas lindas Isa, Isadora, Mariany e Rebeca. Obrigada pelo carinho, acolhimento e por compartilharem essa jornada comigo mesmo que distantes fisicamente. Hoje, cada uma de vocês está trilhando seu próprio caminho, conquistando seus sonhos, e isso me motiva demais. Nossa amizade ultrapassa os muros da universidade, e quero levar vocês comigo para toda a vida. Amo e admiro cada uma de vocês!

Ao Anderson, Feynman e Mirele que tornaram a caminhada do mestrado mais leve e especial. Obrigada por toda a ajuda nos experimentos, na escrita, nos momentos de aflição que foram inevitáveis e também pelos momentos de leveza entre as pressões do laboratório. Não imaginei que teria um vínculo tão bonito com vocês. Cada um com seu jeitinho e personalidade me motiva a querer ser mais e ir além. Encerro esse ciclo com o coração grato de poder compartilhar parte da vida com vocês!

As técnicas do laboratório Maria Gleiciane e Terezinha e a todos os demais colegas do ONEHMIC Lab que, de alguma forma, contribuíram para minha jornada, seja ajudando nos experimentos, compartilhando conhecimentos ou trazendo leveza com conversas descontraídas.

Essa caminhada foi intensa e desafiadora, mas cercada de pessoas incríveis que tornaram tudo mais possível. A todos vocês, meu mais sincero e profundo agradecimento!

“A maioria das grandes transformações resulta de centenas de pequenos passos, quase imperceptíveis, que damos ao longo do caminho”

- Lori Gottlieb



## RESUMO

*Sporothrix brasiliensis* é um fungo dimórfico responsável por causar a esporotricose, micose subcutânea de ampla distribuição e crescente relevância no Brasil. Associada a surtos zoonóticos, essa espécie apresenta alta virulência, principalmente devido à sua capacidade de formar biofilmes, estrutura que limita a ação de antifúngicos e contribui para a persistência da infecção. Diante desse cenário, cresce o interesse por novas estratégias terapêuticas, como o uso de compostos naturais com atividade antifúngica. O geraniol, um monoterpene com reconhecida ação antimicrobiana, tem sua aplicação limitada pela baixa solubilidade, alta volatilidade e instabilidade química. Para superar essas limitações, o encapsulamento em micropartículas de quitosana surge como alternativa promissora, promovendo maior estabilidade e liberação controlada do composto. Assim, este estudo avaliou o efeito de micropartículas de quitosana carregadas com geraniol (MQGE) sobre células planctônicas e biofilmes em formação de *S. brasiliensis*, bem como suas interações com antifúngicos clássicos utilizados no tratamento da esporotricose. Para este estudo foram utilizadas nove cepas na forma filamentosa. A atividade antifúngica na forma planctônica foi avaliada por meio de ensaios de microdiluição em caldo, seguindo protocolo do CLSI. O efeito do composto sobre os biofilmes em formação foi avaliado pela quantificação da atividade metabólica, utilizando o ensaio de redução de MTT. Também foi avaliada a interação do composto com anfotericina B e itraconazol por meio da técnica de *checkerboard*. As MQGE apresentaram concentrações inibitórias mínimas (CIM) variando de 2 a 8 µg/mL frente *S. brasiliensis* na forma filamentosa. Os biofilmes se mostraram sensíveis ao composto, com redução de 80% da atividade metabólica na concentração de 32 µg/mL. Além disso, nos testes de interação farmacológica entre MQGE com anfotericina B e itraconazol, nenhuma combinação apresentou antagonismo, sendo todas classificadas como indiferentes. Esses resultados ressaltam que o geraniol encapsulado em micropartículas de quitosana possui efeitos antifúngicos sobre formas planctônicas e biofilmes de *S. brasiliensis*, na forma filamentosa, além de não demonstrar antagonismo com antifúngicos clássicos.

**Palavras-chave:** esporotricose; biofilmes; encapsulamento; monoterpene; agente antifúngico.

## ABSTRACT

*Sporothrix brasiliensis* is a dimorphic fungus responsible for causing sporotrichosis, a subcutaneous mycosis of wide distribution and growing relevance in Brazil. This species, associated with zoonotic outbreaks, has high virulence, mainly due to its ability to form biofilms. This structure limits the action of antifungal drugs and contributes to the persistence of the infection. Given this scenario, there is growing interest in new therapeutic strategies, such as using natural compounds with antifungal activity. Geraniol, a monoterpene with recognized antimicrobial action, has its application limited by low solubility, high volatility and chemical instability. To overcome these limitations, encapsulation in chitosan microparticles has emerged as a promising alternative, promoting greater stability and controlled release of the compound. Thus, this study evaluated the effect of chitosan microparticles loaded with geraniol (CMGE) on planktonic cells and biofilms in the formation of *S. brasiliensis*, as well as their interactions with classical antifungals used in the treatment of sporotrichosis. In this study, nine filamentous strains were used. The antifungal activity of the planktonic form was evaluated using broth microdilution assays, following the CLSI protocol. The effect of the compound on biofilm formation was assessed by quantifying the metabolic activity using the MTT reduction assay. The interaction of the compound with amphotericin B and itraconazole was also evaluated using the checkerboard technique. CMGE showed minimum inhibitory concentrations (MIC) ranging from 2 to 8 µg/mL against *S. brasiliensis* in the filamentous form. Biofilms were sensitive to the compound, with an 80% reduction in metabolic activity at 32 µg/mL concentration. Furthermore, in the pharmacological interaction tests between CMGE with amphotericin B and itraconazole, no combination showed antagonism, and all were classified as indifferent. These results highlight that the geraniol encapsulated in microparticles of chitosan has antifungal effects on planktonic cells and biofilms of *S. brasiliensis* in the filamentous form and does not show antagonism with classical antifungals.

**Keywords:** sporotrichosis; biofilms; encapsulation; monoterpene; antifungal agent.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Forma filamentosa de <i>Sporothrix</i> spp.....	21
Figura 2 - Forma leveduriforme de <i>Sporothrix</i> spp.....	22
Figura 3 - Divisão de <i>Sporothrix</i> spp. em clado clínico e clado ambiental inferida a partir de sequências da região ITS. ....	24
Figura 4 - Etapas da formação de biofilmes por fungos filamentosos .....	26
Figura 5 – Biofilmes de <i>Sporothrix brasiliensis</i> na forma filamentosa.....	27
Figura 6 - Expansão temporal da esporotricose felina no Brasil entre 1950 e 2022 .....	29
Figura 7 - Esquema representativo das rotas de transmissão da esporotricose .....	31
Figura 8 - Biofilmes formados por <i>Sporothrix brasiliensis</i> em fragmentos de unha de gato....	32
Figura 9 - Forma cutânea fixa da esporotricose .....	33
Figura 10 - Forma linfocutânea da esporotricose .....	34
Figura 11 - Forma cutânea disseminada da esporotricose .....	34
Figura 12 - Lesões de esporotricose em gato .....	35
Figura 13 - Estrutura química do geraniol elaborada no software ChemBioDraw .....	41
Figura 14 - Estrutura química da quitosana a partir da desacetilação da quitina .....	42
Figura 15 - Efeito dos compostos na atividade metabólica de biofilmes de <i>Sporothrix brasiliensis</i> na forma filamentosa.....	51

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Origem e local de isolamento das cepas de <i>Sporothrix brasiliensis</i> utilizadas neste estudo.....	46
Tabela 2 - Concentração inibitória mínima dos compostos e antifúngicos frente a cepas de <i>Sporothrix brasiliensis</i> na forma planctônica filamentosa. ....	50
Tabela 3 - Concentração inibitória mínima e índice de concentração inibitória fracionária de MQGE em combinação com antifúngicos, contra células planctônicas de <i>Sporothrix brasiliensis</i> , na forma filamentosa.....	52
Tabela 4 Concentração inibitória mínima e índice de concentração inibitória fracionária de MQGE em combinação com antifúngicos, contra biofilmes em formação de <i>Sporothrix brasiliensis</i> , na forma filamentosa.....	53

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMB	Anfotericina B
ABLC	Complexo lipídico de anfotericina B
L-AmB	Anfotericina B Lipossomal
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BDA	Batata dextrose ágar
BHI	<i>Brain heart infusion</i>
BT2	$\beta$ -tubulina
CAL	Calmodulina
CIM	Concentração inibitória mínima
CIMB	Concentração inibitória mínima em biofilme
CHS1	Quitina sintase
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ED	Exame Direto
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
EUA	Estados Unidos da América
GD	Grau de desacetilação
GE	Geraniol
GMS	Coloração de metenamina de prata de Grocott-Gomori
HIV/AIDS	<i>Human Immunodeficiency Virus/Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
ICIF	Índice de Concentração Inibitória Fracionada
IND	Indiferente
ITC	Itraconazol
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
KOH	Hidróxido de potássio
MALDI-TOF	<i>Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry</i>
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MQ	Micropartículas de quitosana
MOPS	Ácido 3-(N-morfolina) propanossulfônico
MQGE	Micropartículas de quitosana carregadas com geraniol
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide

NPL/ISM	Núcleo de Pesquisas em Lubrificantes Prof. Ícaro de Sousa Moreira
ONEHMIC	Laboratório de Microbiologia em Saúde única
PAS	Ácido periódico de Schiff
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PLECT	Paracoccidioidomicose, leishmaniose, esporotricose, cromoblastomicose e tuberculose
qPCR	<i>real time quantitative PCR</i>
PM	Peso molecular
QBP	Quitosana de baixo peso
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RPMI	Meio suplementado de <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
spp	Espécies
SsCBF	Fração de ligação à Concanavalina A
UFC	Unidade Formadora de Colônia

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>19</b>
<b>2.1 Esporotricose.....</b>	<b>19</b>
<b>2.1.1 Histórico.....</b>	<b>19</b>
<b>2.1.2 Agente etiológico.....</b>	<b>20</b>
2.1.2.1 Morfologia.....	20
2.1.2.2 Taxonomia.....	22
2.1.2.3 Fatores de virulência.....	25
2.1.2.3.1 Biofilmes.....	25
<b>2.1.3 Epidemiologia.....</b>	<b>28</b>
<b>2.1.4 Patogenia .....</b>	<b>30</b>
<b>2.1.5 Manifestações clínicas.....</b>	<b>33</b>
<b>2.1.6 Diagnóstico da esporotricose.....</b>	<b>35</b>
<b>2.1.7 Tratamento da esporotricose humana e animal.....</b>	<b>38</b>
<b>2.2 Estratégias terapêuticas no controle de infecções por <i>S. brasiliensis</i>.....</b>	<b>40</b>
2.2.1 A virulência aumentada de <i>S. brasiliensis</i> .....	40
2.2.2 Geraniol .....	40
2.2.3 Micropartículas de quitosana.....	42
<b>3 HIPÓTESES .....</b>	<b>44</b>
<b>4 OBJETIVOS .....</b>	<b>45</b>
4.1 Objetivo Geral .....	45
4.2 Objetivos Específicos.....	45
<b>5 METODOLOGIA.....</b>	<b>46</b>
5.1 Local de estudo .....	46
5.2 Microrganismos .....	46
5.3 Compostos e Drogas controle .....	47
5.4 Preparação de micropartículas de lecitina-quitosana carregadas com GE .....	47
5.5 Teste de sensibilidade de células planctônicas .....	48
5.6 Determinação de atividade antifúngica contra biofilmes em formação .....	48
5.6.1 Preparação dos biofilmes de <i>S. brasiliensis</i> .....	48
5.6.2 Quantificação da atividade metabólica por ensaio de redução de MTT.....	48

5.7 Ensaio de combinação de drogas - <i>checkerboard</i> .....	49
5.8 Análise estatística dos ensaios com biofilmes .....	49
6 RESULTADOS .....	50
6.1 Efeito dos compostos frente a forma planctônica de <i>S. brasiliensis</i> .....	50
6.2 Efeito da exposição de biofilmes em formação de <i>S. brasiliensis</i> aos compostos .....	50
6.3 Interação entre MQGE e antifúngicos em células planctônicas.....	52
6.4 Interação entre MQGE e antifúngicos em biofilmes em formação.....	53
7. DISCUSSÃO .....	54
8. CONCLUSÕES.....	57
REFERÊNCIAS .....	58



## 1 INTRODUÇÃO

A esporotricose é uma micose subcutânea de distribuição cosmopolita, com maior prevalência em regiões tropicais e subtropicais, causada por fungos termodimórficos do gênero *Sporothrix* (Gonçalves *et al.*, 2024). As espécies patogênicas associadas a infecções em humanos e animais pertencem ao chamado clado clínico, um grupo que compreende as espécies de maior importância médica. Nesse clado, destacam-se *Sporothrix brasiliensis*, *Sporothrix schenckii* e *Sporothrix globosa* (Rodrigues *et al.*, 2022; Machado *et al.*, 2025).

Enquanto *S. schenckii* e *S. globosa* apresentam transmissão predominantemente sapronótica, por meio de inoculação traumática através de solo ou material vegetal contaminado, *S. brasiliensis* distingue-se por seu elevado potencial de virulência e capacidade de transmissão zoonótica, especialmente no Brasil, através de mordidas e arranhões de gatos infectados (Rodrigues *et al.*, 2020; Gremião *et al.*, 2021). Essa dinâmica tem sido impulsionada por condições urbanas precárias, como falta de saneamento e superpopulação felina, tornando a esporotricose uma zoonose negligenciada e um grande desafio de saúde pública (Rossow *et al.*, 2020; Gonçalves *et al.*, 2024).

O tratamento atual da esporotricose é feito com itraconazol, como primeira linha, terbinafina e anfotericina B, para casos moderados a graves, e iodeto de potássio, sendo ainda muito utilizado por países emergentes e em situações nas quais o itraconazol é contraindicado (Rodrigues *et al.*, 2020; Orofino-Costa *et al.*, 2022). A escolha terapêutica depende de fatores como a forma clínica da doença, a gravidade das lesões e o perfil imunológico do hospedeiro (Sharma; Sharma; Sharma, 2022). Apesar da eficácia desses medicamentos, limitações como toxicidade, relatos de recidiva e a menor sensibilidade de alguns isolados clínicos, especialmente *S. brasiliensis*, atribuída principalmente à formação de biofilmes, têm desafiado a eficácia das terapias convencionais (García-Carnero; Martínez-Álvarez, 2022; Rodrigues *et al.*, 2022).

A formação de biofilmes destaca-se como um importante fator de virulência associado à persistência da esporotricose (Brilhante *et al.*, 2018; García-Carnero; Martínez-Álvarez, 2022). Os biofilmes são estruturas organizadas que conferem maior resistência aos antifúngicos, atuando como barreiras físicas e modulando o metabolismo fúngico, dificultando a penetração e ação dos fármacos (Costa-Orlandi *et al.*, 2017). Em *S. brasiliensis*, a capacidade de formar biofilmes está associada à maior virulência e recorrência da infecção (Rossow *et al.*, 2020; Villalobos-Duno *et al.*, 2021).

Diante desse cenário, cresce o interesse por novas estratégias terapêuticas com potencial antifúngico, especialmente aquelas baseadas em compostos naturais com atividade antimicrobiana. Um dos destaques é o geraniol, um monoterpene encontrado em diversas plantas aromáticas, que vem sendo amplamente estudado devido às suas propriedades antimicrobianas, cujos mecanismos de ação incluem a redução dos níveis de ergosterol, levando à desestabilização da membrana celular, e a indução de espécies reativas de oxigênio (ROS). (Lei *et al.*, 2019). A decisão de incluir esse composto no presente trabalho foi motivada por suas propriedades antimicrobianas observadas em outros estudos, especialmente contra leveduras (Leite *et al.*, 2015) e fungos filamentosos (Pereira *et al.*, 2014).

No entanto, apesar da sua comprovada ação antimicrobiana, o uso de geraniol em sua forma livre apresenta desafios significativos, devido à alta volatilidade, baixa solubilidade, instabilidade frente à luz, oxigênio e temperatura, além do curto tempo de ação (Chen; Viljoen, 2022). Diante disso, estratégias como a nanoemulsão e o encapsulamento do geraniol têm sido desenvolvidas com o objetivo de criar sistemas de liberação que aumentem sua estabilidade, solubilidade e eficácia terapêutica (Pontes *et al.*, 2023; Celebioglu *et al.*, 2025). Nesse contexto, o encapsulamento do geraniol em micropartículas de quitosana surge como uma alternativa promissora para superar suas limitações farmacológicas.

A quitosana, um biopolímero derivado da quitina, possui propriedades antimicrobianas intrínsecas, além de ser biocompatível, biodegradável e apresentar baixa toxicidade (Brilhante *et al.*, 2023). Em estudo conduzido por Garcia *et al.* (2020), foi demonstrado que a quitosana de baixo peso molecular é eficaz contra células planctônicas e biofilmes de *S. brasiliensis*. Além disso, estudos como o de Garcia *et al.* (2021) e Costa *et al.* (2025) demonstraram que o encapsulamento de óleos essenciais em micropartículas de quitosana contribui para a melhoria da estabilidade desses compostos, permitindo sua liberação controlada e aumentando a eficácia frente a biofilmes de *Candida albicans* e *Histoplasma capsulatum*, respectivamente.

Apesar do crescente número de estudos sobre os efeitos isolados do geraniol e da quitosana frente a patógenos fúngicos, ainda não há registros que avaliem a eficácia de micropartículas de quitosana com geraniol contra *S. brasiliensis*, especialmente frente à formação de biofilmes. Assim, este estudo investiga, *in vitro*, a atividade antifúngica dessas micropartículas frente a células planctônicas e biofilmes em formação de *S. brasiliensis*, além das interações com anfotericina B e itraconazol, visando contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas no combate à esporotricose.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Esporotricose

#### 2.1.1 Histórico

O primeiro relato clínico da esporotricose foi feito em 1898, por Benjamin Schenck, que isolou o agente causador a partir de lesões localizadas na mão e no braço direito de um paciente atendido no Hospital Universitário Johns Hopkins, nos Estados Unidos (EUA) (Schenck, 1898). Em sua publicação intitulada “*On refractory subcutaneous abscess caused by a fungus possibly related to the Sporotricha*”, Schenck detalhou as características culturais e morfológicas do microrganismo, além do desenvolvimento e resultados das inoculações (Schenck 1898; Rodrigues *et al.*, 2020).

Dois anos depois, em 1900, Hektoen e Perkins relataram o segundo caso da doença, também nos EUA, em Chicago. O paciente, uma criança do sexo masculino, apresentou um abscesso subcutâneo refratário no dedo indicador esquerdo após ser atingido por um martelo (Hektoen; Perkins, 1900). Esses pesquisadores observaram que o microrganismo isolado apresentava semelhanças morfológicas, culturais e patogênicas com o descrito por Schenck. Com base nisso, propuseram o nome *Sporothrix schenckii* para o fungo causador da esporotricose (Hektoen; Perkins, 1900; Barros; Almeida-Paes; Schubach, 2011).

Apesar de Hektoen e Perkins (1900) terem proposto a criação do gênero *Sporothrix*, durante décadas o fungo foi incluído no gênero *Sporotrichum*, que compreende fungos basidiomicetos que não são dimórficos nem patogênicos para humanos ou outros animais (Barros; Almeida-Paes; Schubach, 2011). Essa classificação persistiu até 1962, quando Carmichael definiu diferenças nas características reprodutivas entre os membros do gênero *Sporotrichum* e o fungo associado aos casos de esporotricose, alterando o binômio para *Sporothrix schenckii* (Carmichael, 1962; Orofino-Costa *et al.*, 2017).

O primeiro relato de infecção animal natural foi descrito em 1907 por Lutz e Splendore em ratos, na cidade de São Paulo, Brasil, sendo também considerada a infecção humana por mordidas desses animais (Lutz; Splendore, 1907; Barros; Almeida-Paes; Schubach, 2011). Em 1908, Splendore descreveu a presença de corpos asteroides em tecidos infectados, contribuindo para o diagnóstico histopatológico da esporotricose (Orofino-Costa *et al.*, 2017). Em 1910, Page, Frothingham e Paige descreveram um surto de linfangite epizootica em cavalos na região da Pensilvânia, EUA, observando que o fungo isolado era idêntico ao descrito por Schenck (1898) e Hektoen e Perkins (1900) como causador de esporotricose em humanos (Page; Frothingham; Paige, 1910).

A transmissão da esporotricose ganhou maior destaque a partir de surtos identificados em humanos, os quais evidenciaram o potencial de disseminação da doença (Rodrigues; De Hoog; De Camargo, 2013a). Um dos mais conhecidos afetou aproximadamente 3.000 mineiros na região de Witwatersrand, África do Sul, que tiveram contato com madeiras com a presença de *Sporothrix* spp. (López-Romero *et al.*, 2011). Nos EUA, em 1988, um surto abrangeu 15 estados e envolveu 84 trabalhadores expostos ao musgo *Sphagnum* contaminado com o fungo (Dixon *et al.*, 1991). No Japão, foram registrados 2.515 casos de esporotricose entre as décadas de 1940 e 1980, com significativa redução desde então. Entre os pacientes acometidos, cerca de 36% relataram a presença de lesões no momento suspeito da inoculação (Fukushiro, 1984).

A partir da década de 1990, a esporotricose passou a apresentar características epidemiológicas distintas no Brasil (Rodrigues *et al.*, 2020). Em 1998, foi registrado um surto zoonótico no Rio de Janeiro, com casos de esporotricose humana associados predominantemente à transmissão por gatos infectados com *S. brasiliensis*, e desde então, o país se consolidou como epicentro zoonótico mundial da doença, especialmente a cidade do Rio de Janeiro (Gremião *et al.*, 2020).

À medida que a compreensão sobre a esporotricose evoluiu, também se ampliou o reconhecimento de suas implicações clínicas em humanos e animais. No entanto, a subnotificação persiste como desafio, pois a esporotricose não é de notificação compulsória na maioria dos países (Queiroz-Telles; Bucerri; Benard, 2019). No Brasil, a notificação compulsória da esporotricose humana passou a ser obrigatória em âmbito nacional apenas a partir da publicação da Portaria GM/MS nº 6.734, assinada em 18 de março de 2025 (Brasil, 2025). Até então, a obrigatoriedade da notificação era restrita a alguns estados, como Rio de Janeiro e Pernambuco, que, diante da crescente incidência e relevância epidemiológica da doença, instituíram normativas próprias para vigilância e controle (Machado *et al.*, 2025).

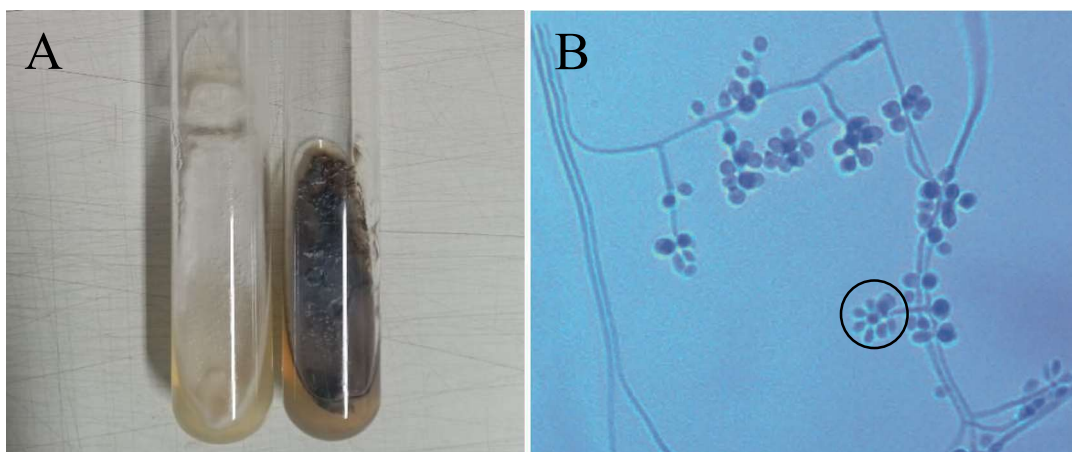
## **2.1.2 Agente etiológico**

### **2.1.2.1 Morfologia**

*Sporothrix* spp. são fungos termodimórficos, ou seja, apresentam características morfológicas e fisiológicas distintas conforme a temperatura (Machado *et al.*, 2025). Como saprófita, colonizando substratos como solo, restos de plantas e matéria orgânica em decomposição ou quando cultivado em laboratório em temperaturas entre 25-28°C, apresenta-se na forma filamentosa (Rodrigues *et al.*, 2020; Machado *et al.*, 2025). Em hospedeiros mamíferos ou quando cultivado em temperaturas entre 35-37°C, sofre uma transição para a forma leveduriforme (Barros; Almeida-Paes; Schubach, 2011; Rodrigues *et al.*, 2020).

A forma filamentosa é capaz de crescer em uma variedade de meios de cultura, como ágar batata dextrose (BDA), ágar Sabouraud e ágar Mycosel (Barros; Almeida-Paes; Schubach, 2011; Bonifaz; Vázquez-González, 2013). O crescimento ocorre dentro de 5 a 7 dias e macroscopicamente podem ser observadas colônias membranosas a coriáceas, com coloração branca a creme no início, tornando-se marrons a pretas após algum tempo de incubação (Figura 1A) (Barros; Almeida-Paes; Schubach, 2011; Bonifaz; Vázquez-González, 2013). Microscopicamente, apresenta hifas finas, hialinas, septadas e ramificadas, medindo de 1 a 3  $\mu\text{m}$  de espessura (Sidrim; Rocha, 2004). Os conídios primários, ou simpodiais, surgem nas extremidades de conidióforos eretos em arranjos semelhantes a uma “flor de margarida”. São hialinos e com paredes delicadas, geralmente tendo aspecto oval a elíptico (Figura 1B) (Bonifaz; Vázquez-González, 2013; Rodrigues *et al.*, 2020).

Figura 1 - Forma filamentosa de *Sporothrix* spp.

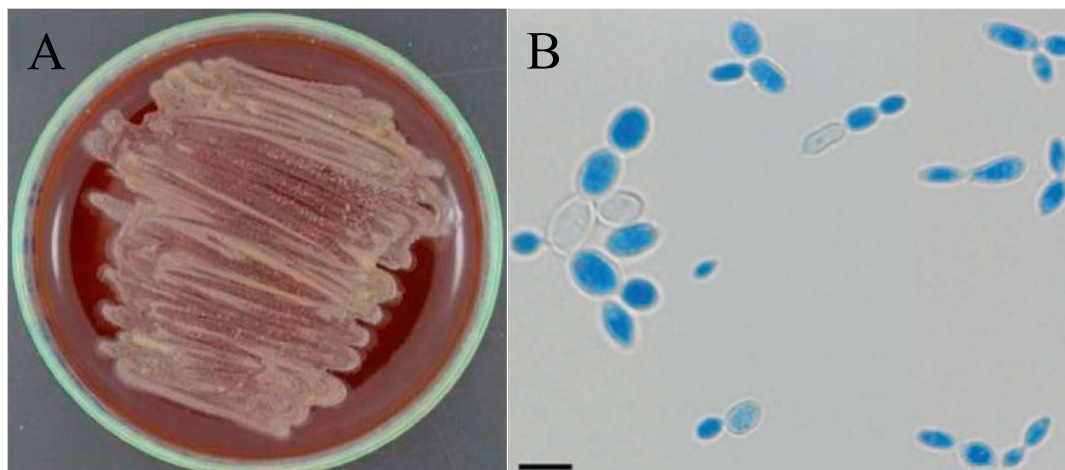


Fonte: A. ONEHMIC Lab (2025); B. Orofino-Costa *et al.* (2017).

**Legenda:** Macro e micromorfologia da forma filamentosa de *Sporothrix* spp. A. Macromorfologia de *Sporothrix* spp. cultivado em ágar batata a 28 °C por 7 dias e 60 dias. B. Micromorfologia de *Sporothrix* spp. apresentando hifas hialinas e conidióforos originando conídios em arranjo de “flor de margarida” (círculo). Lâmina corada com azul de algodão, em aumento de 400x.

A reversão para a fase leveduriforme pode ser conseguida em laboratório, através do uso de meios enriquecidos, como ágar BHI (do inglês, *brain heart infusion*) suplementado com 5% de sangue de carneiro (Silva, 2017; Brilhante *et al.*, 2019). Após 3 a 5 dias de incubação, podem ser observadas colônias lisas de coloração creme e superfície irregular, como mostra a Figura 2A (Bonifaz *et al.*, 2015). Após a reversão morfológica, a forma leveduriforme pode ser mantida em meios de rotina como o ágar Sabouraud (Barros; Almeida-Paes; Schubach, 2011). Ao exame microscópico pode-se observar leveduras que variam em forma e tamanho, podendo ser ovais, esféricas ou de formato alongado, similar a um charuto (Figura 2B) medindo de 2 a 6  $\mu\text{m}$  (Sidrim; Rocha, 2004; Barros; Almeida-Paes; Schubach, 2011).

Figura 2 - Forma leveduriforme de *Sporothrix* spp.



Fonte: **A.** Silva (2017); **B.** Rodrigues, Fernandes e De Camargo (2017).

**Legenda:** Macro e micromorfologia da forma leveduriforme de *Sporothrix* spp **A.** Macromorfologia de *Sporothrix* spp. na forma leveduriforme cultivado em ágar BHI suplementado com 5% de sangue de carneiro a 37 °C por 7 dias. Colônia com superfície irregular e coloração creme. **B.** Aspecto microscópico de leveduras de *Sporothrix* spp. Células ovais ou em forma de charuto, algumas com brotamentos. Lâmina corada com método Gram, em aumento de 1000x.

#### 2.1.2.2 Taxonomia

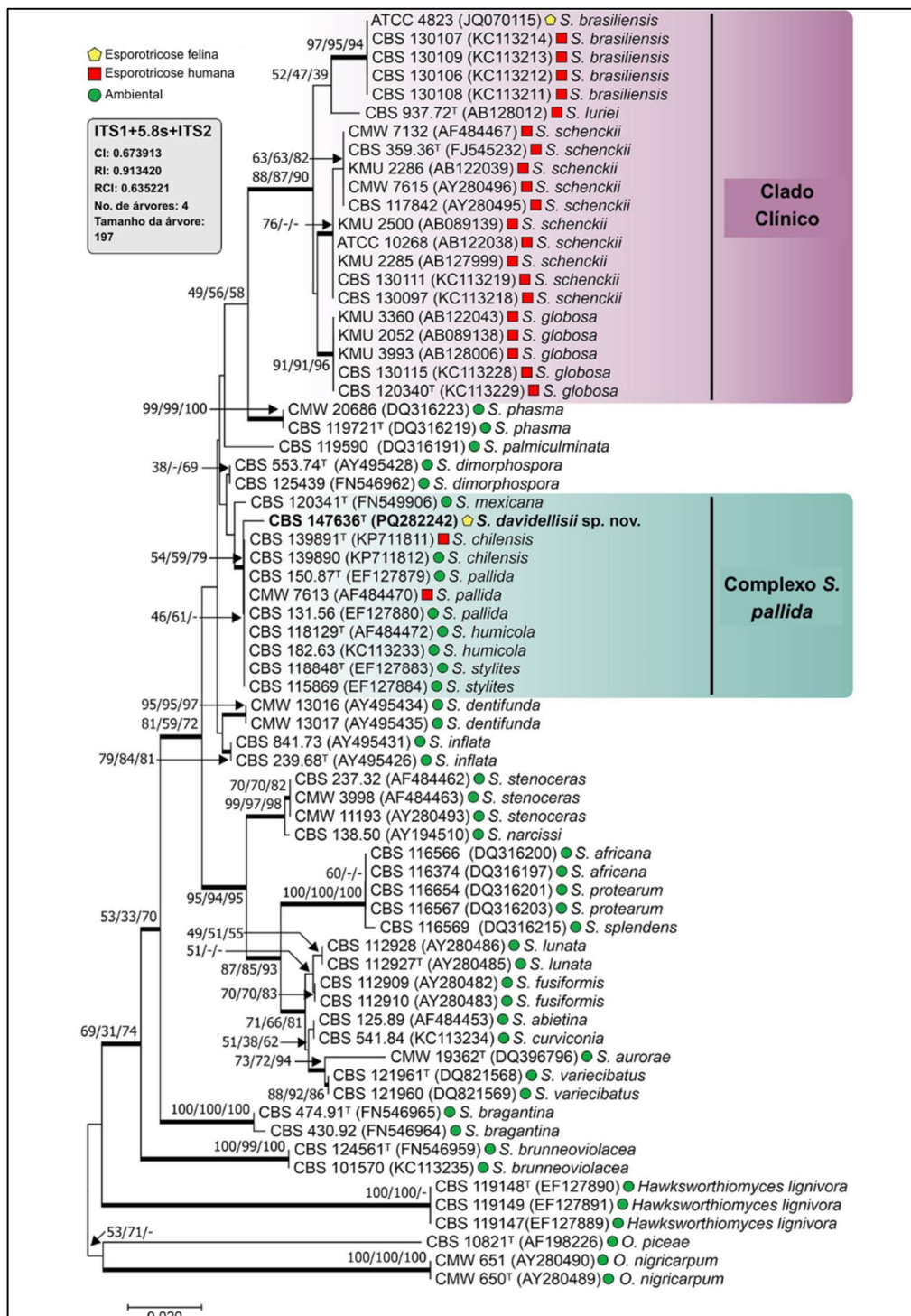
A taxonomia das espécies de *Sporothrix* tem evoluído ao longo do tempo, à medida que novos dados morfológicos e moleculares foram incorporados (Oliveira *et al.*, 2024). O gênero está classificado no filo Ascomycota, classe Sordariomycetes, ordem Ophiostomatales e família Ophiostomataceae (De Beer; Duong; Wingfield, 2016; Rodrigues *et al.*, 2016). Por muitos anos, a esporotricose foi associada a apenas uma espécie, *S. schenckii*, estando ligada a lesões traumáticas decorrentes do manejo de solo, plantas e flores, sendo assim conhecida como “doença do jardineiro” (Xavier *et al.*, 2023). Mais de um século após a descoberta de *Sporothrix* spp., sabe-se que se trata de um gênero composto por múltiplas espécies, com expressiva diversidade genética e ecológica, que influencia as várias associações entre esses microrganismos e seus hospedeiros e nichos (Rodrigues *et al.*, 2020).

Por muito tempo, espécies de *Sporothrix* clinicamente relevantes foram classificadas como um “complexo de espécies”, denominado complexo *S. schenckii*, que incluía principalmente *Sporothrix schenckii*, *Sporothrix brasiliensis*, *Sporothrix globosa*, *Sporothrix luriei* e *Sporothrix mexicana* (Marimon *et al.*, 2007; Rodrigues; De Hoog; De Camargo, 2013a). No entanto, os avanços no conhecimento sobre a filogenia de *Sporothrix* spp. aliados a estudos sobre o sistema *Sporothrix*-esporotricose, têm evidenciado diferenças morfológicas, fisiológicas, genéticas, epidemiológicas e terapêuticas entre esses fungos. Esses achados

reforçam o reconhecimento de espécies distintas, tornando a denominação de complexo de espécies inadequada (Rodrigues *et al.*, 2020; Orofino-Costa *et al.*, 2022).

Atualmente, sugere-se adotar o termo clado clínico para se referir a *S. brasiliensis*, *S. schenckii*, *S. globosa* e *S. luriei*, que são comumente isolados de casos humanos e animais (Machado *et al.*, 2025). As demais espécies estão incluídas no clado ambiental, e são frequentemente associadas a substratos que variam desde o solo e matéria orgânica em decomposição até insetos e plantas, tendo pouco potencial patogênico para humanos e outros animais (Rodrigues *et al.*, 2022; Machado *et al.*, 2025). Um achado relevante é *Sporothrix davidellisii*, espécie do clado ambiental recentemente identificada a partir de um caso de esporotricose felina em Melbourne, Austrália. O fungo, isolado de um gato doméstico, apresentou características genéticas e morfológicas distintas, além da capacidade de crescer em temperaturas elevadas, sugerindo potencial patogênico oportunista (Kidd *et al.*, 2025). A Figura 3 apresenta a árvore filogenética das espécies de *Sporothrix*, baseada em sequências da região ITS (Espaçador Transcrito Interno), evidenciando sua separação nos clados clínico e ambiental.

Figura 3 - Divisão de *Sporothrix* spp. em clado clínico e clado ambiental inferida a partir de sequências da região ITS.



Fonte: Adaptado e traduzido de Kidd *et al.* (2025).



### 2.1.2.3 Fatores de virulência

São considerados fatores de virulência os atributos ou componentes de um microrganismo que contribuem para sua capacidade de causar danos ao hospedeiro, ao facilitar a invasão, disseminação e evasão das respostas imunológicas, além de conferir vantagens para a sobrevivência em ambientes naturais (García-Carnero; Martínez-Álvarez, 2022). Diferentes fatores de virulência contribuem para a patogenicidade do clado clínico de *Sporothrix*, incluindo o dimorfismo térmico (Silva-Bailão *et al.*, 2021), produção de melanina (Almeida-Paes *et al.*, 2012, 2016) e formação de biofilmes (Brilhante *et al.*, 2018). A capacidade de transição entre a forma micelial saprófita, a cerca de 25°C, para uma levedura patogênica quando exposto a temperaturas entre 35°C e 37°C, favorece a adaptação e sobrevivência de *Sporothrix* spp. no hospedeiro (Gremião *et al.*, 2017). Dentre as espécies de maior interesse clínico, *S. brasiliensis* destaca-se pela elevada termotolerância, com crescimento eficiente em temperaturas corporais compatíveis com a de mamíferos (Silva-Bailão *et al.*, 2021).

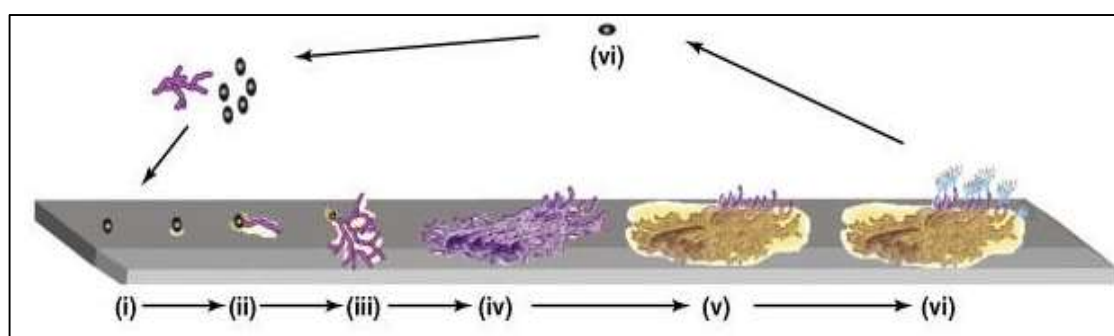
A produção de melanina é outro importante fator de virulência encontrado na maioria das espécies patogênicas de *Sporothrix*. Esses pigmentos, gerados pela polimerização oxidativa de compostos fenólicos, não são essenciais para o crescimento fúngico, mas desempenham um papel fundamental na sobrevivência do organismo, conferindo proteção ao neutralizar radicais livres e aumentar a resistência a estressores ambientais, como radiação UV e defesas do hospedeiro (Bonifaz *et al.*, 2015; García-Carnero; Martínez-Álvarez, 2022). Ambas as formas morfológicas de *Sporothrix* spp. são capazes de produzir pelo menos um dos três tipos de melanina: DHN-melanina, eumelanina ou piomelanina (Almeida-Paes *et al.*, 2012, 2015). Estudos *in vitro* demonstraram que as melaninas de *S. brasiliensis* reduzem sua suscetibilidade à anfotericina B e terbinafina (Almeida-Paes *et al.*, 2017a).

#### 2.1.2.3.1 Biofilmes

Os biofilmes são comunidades microbianas altamente organizadas que aderem a superfícies bióticas ou abióticas e são envoltas por uma matriz extracelular polimérica (Sardi *et al.*, 2014). As células sésseis presentes nos biofilmes apresentam um fenótipo distinto das células planctônicas, com alterações na expressão gênica, na taxa de crescimento e na sensibilidade a antifúngicos (Vila; Rozental, 2016; Berman; Krysan, 2020). Essa estrutura é a forma preferencial de crescimento de muitos fungos, proporcionando proteção frente a condições ambientais adversas e à ação de drogas antifúngicas, sendo uma das principais causas de infecções humanas persistentes (Sardi *et al.*, 2014; Costa-Orlandi *et al.*, 2017).

A matriz extracelular é fundamental para a formação, manutenção e funcionalidade dos biofilmes. Além de garantir a integridade estrutural, atua como barreira física que dificulta a penetração de antifúngicos e a ação do sistema imune (Sánchez-Herrera *et al.*, 2021; García-Carnero; Álvarez-Martínez, 2022). Embora tanto leveduras quanto fungos filamentosos sejam capazes de formar biofilmes, os estudos envolvendo fungos filamentosos ainda são mais limitados (Costa-Orlandi *et al.*, 2017; García-Carnero; Martínez-Álvarez, 2022). Harding *et al.* (2009) propuseram um modelo de formação de biofilmes por fungos filamentosos composto por seis etapas, representadas na Figura 4.

Figura 4 - Etapas da formação de biofilmes por fungos filamentosos



Fonte: Adaptado de Harding *et al.* (2009).

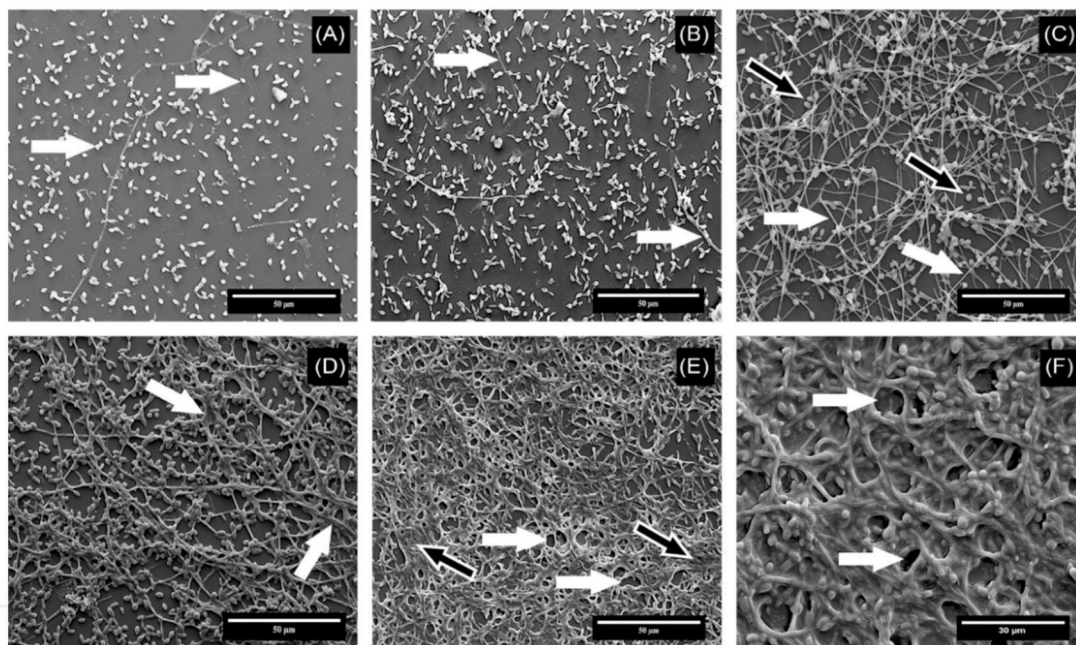
**Legenda:** Etapas da formação de biofilmes por fungos filamentosos. (i) adsorção, (ii) adesão ativa, (iii) primeira microcolônia, (iv) maturação inicial, (v) biofilme maduro e (vi) dispersão de conídios ou fragmentos de hifas.

A primeira etapa consiste na adsorção de propágulos, em que conídios ou fragmentos de hifas entram em contato com uma superfície. Em seguida, ocorre a adesão ativa, caracterizada pela secreção de adesinas, que facilitam a fixação. A terceira etapa envolve a formação da microcolônia inicial, com alongação e ramificação das hifas, que originam uma monocamada e o início da produção de matriz extracelular. Na fase de maturação inicial, formam-se redes compactas de hifas tridimensionais, envoltas por matriz extracelular e com canais de água que permitem o transporte de nutrientes. A maturação final pode resultar na formação de estruturas de resistência, como corpos de frutificação, dependendo da espécie fúngica. Por fim, na etapa de dispersão, conídios ou fragmentos de hifas são liberados, reiniciando o ciclo de formação do biofilme (Harding *et al.*, 2009; Costa-Orlandi *et al.*, 2017).

Esse modelo também pode ser observado em *Sporothrix* spp., cuja capacidade de formar biofilmes foi inicialmente descrita por Sánchez-Herrera *et al.* (2014), na forma filamentosa. Posteriormente, Brilhante *et al.* (2018) demonstraram que cepas patogênicas de *Sporothrix* na sua forma filamentosa, são capazes de formar biofilmes, *in vitro*, com várias delas consideradas fortes produtoras, levando em média 120 horas para atingir a maturação (Figura 5). Os autores

também relataram significativa redução na sensibilidade desses biofilmes aos antifúngicos clássicos, com tolerância superior a 50 vezes em comparação à forma planctônica.

Figura 5 – Biofilmes de *Sporothrix brasiliensis* na forma filamentosa



Fonte: Brilhante *et al.* (2018).

**Legenda:** Biofilmes de *Sporothrix brasiliensis* na forma filamentosa, formados em lamínulas Thermanox. **A.** Células aderidas à superfície (setas) após 24 h; **B.** Início da filamentação (setas) após 48 h; **C.** Rede de hifas (setas brancas) e conídios (setas pretas com contorno branco) após 72 h; **D.** Espessamento do biofilme e matriz extracelular inicial (setas) após 96 h; **E.** Biofilme maduro contendo matriz (setas pretas com contorno branco) e canais de água (setas brancas) após 120 h; **F.** Canais de água evidentes (setas) após 144 h.

A avaliação, *in vitro*, da formação de biofilmes e de sua sensibilidade a antifúngicos pode ser realizada por metodologias diversas, com destaque para os métodos colorimétricos e microscópicos. O ensaio de redução do MTT, um método colorimétrico amplamente empregado, destaca-se pela reprodutibilidade, rapidez e aplicabilidade em pesquisas científicas (Brilhante *et al.*, 2022, 2023). Desenvolvido por Mosmann (1983) e adaptado por Cole (1986), esse ensaio foi o primeiro método de viabilidade celular projetado para placas de 96 poços. Baseia-se na redução do sal de tetrazólio em cristais de formazan insolúveis por enzimas mitocondriais de células metabolicamente ativas (Figura 6), gerando uma coloração púrpura cuja absorbância, quantificada por espectrofotometria, é proporcional à viabilidade celular (Kamiloglu *et al.*, 2020). Além dos métodos colorimétricos, técnicas microscópicas como a microscopia eletrônica de varredura (MEV) e a confocal de varredura a laser, são utilizadas para caracterizar a estrutura tridimensional dos biofilmes (Alves *et al.*, 2013; Simitsopoulou; Chatzimoschou; Roilides, 2016).

### 2.1.3 Epidemiologia

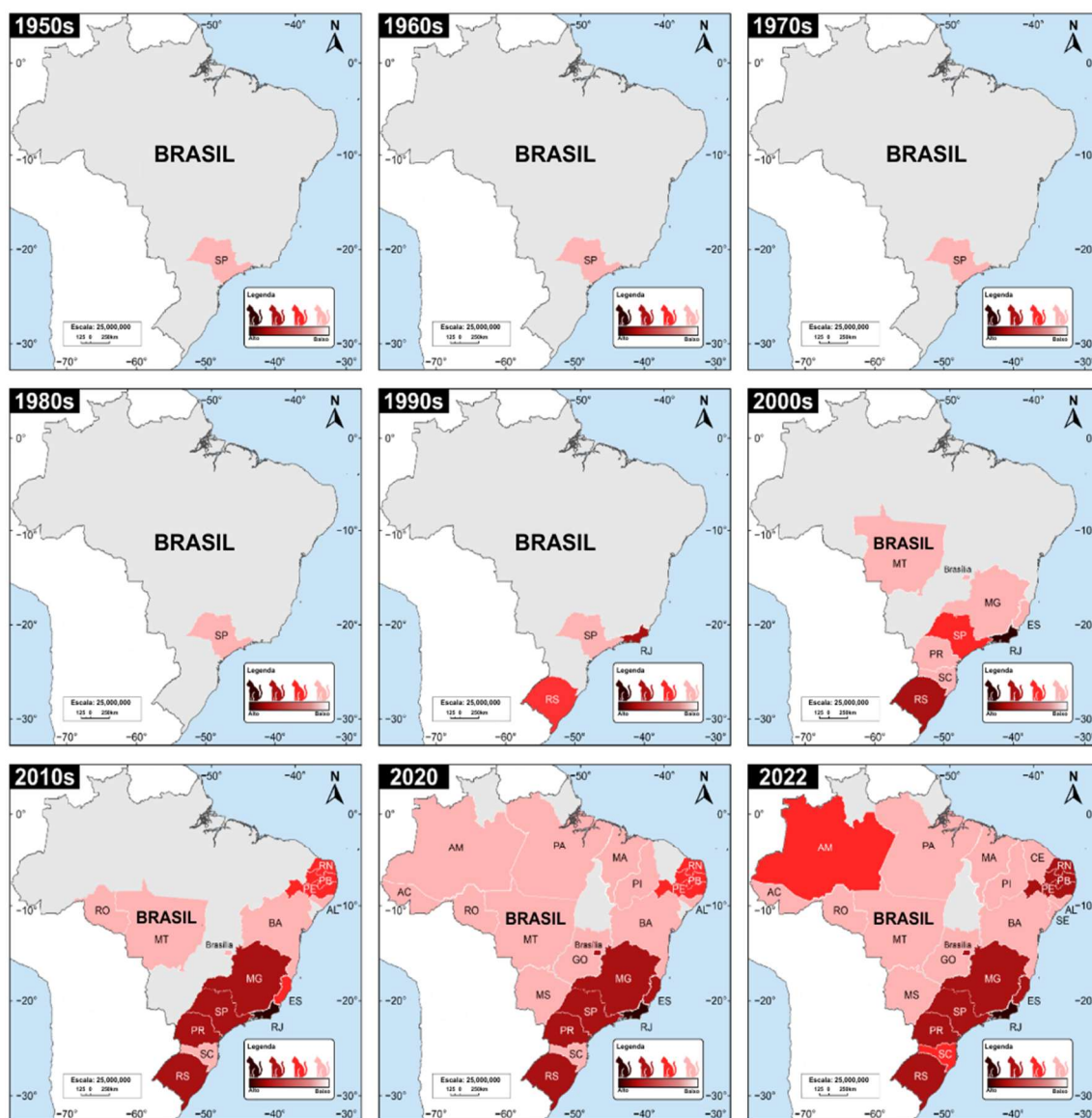
A esporotricose é a principal micose subcutânea de distribuição mundial, com prevalência em regiões tropicais e subtropicais, sendo endêmica em países da África, Ásia e América do Sul (Gonçalves *et al.*, 2024). As espécies de *Sporothrix* de interesse clínico apresentam distribuição geográfica distinta e estão associadas a diferentes rotas de transmissão (Rodrigues *et al.*, 2022).

*S. schenckii* possui distribuição cosmopolita, predominando na África do Sul, Austrália e em partes da América do Sul e América do Norte, com transmissão principalmente por via sapronótica, associada a traumas com material vegetal contaminado (Orofino-Costa *et al.*, 2017; Rodrigues *et al.*, 2020). Na Ásia, *S. globosa* é o principal agente etiológico, com mais de 90% dos casos atribuídos à inoculação traumática de material vegetal contaminado (Orofino-Costa *et al.*, 2017). A relevância epidemiológica de *S. luriei* é pequena, com poucos casos registrados, incluindo infecções humanas na África, Itália e Índia, além de um caso de infecção canina no Brasil (Chakrabarti *et al.*, 2015; De Beer; Duong; Wingfield, 2016).

A esporotricose é a micose subcutânea mais comum na América Latina, com áreas de alta endemicidade no Brasil, Colômbia, Peru e Venezuela (Rodrigues *et al.*, 2020). No entanto, as epidemias que ocorrem no Brasil apresentam características peculiares, especialmente nas regiões Sul e Sudeste, com destaque para o potencial de transmissão zoonótica de *S. brasiliensis*, quase sempre relacionada aos gatos, principais fontes de transmissão para humanos, cães e outros felinos (Chakrabarti *et al.*, 2015; Gremião *et al.*, 2017). Além disso, a esporotricose causada por essa espécie tem se expandido para além do território brasileiro, com registros também na Argentina, Chile, Paraguai e Panamá (Rodrigues *et al.*, 2022).

Entre o final dos anos 1950 e o início dos anos 1990, a transmissão zoonótica da esporotricose, no Sudeste do Brasil, era pouco frequente (Rodrigues *et al.*, 2020). No entanto, a partir da década de 1990, ocorreu uma mudança no perfil epidemiológico da esporotricose, onde o crescimento de casos foi associado ao aumento da população de gatos que atuam como principais reservatórios do patógeno (Figura 6) (Rodrigues *et al.*, 2022; Xavier *et al.*, 2023).

Figura 6 - Expansão temporal da esporotricose felina no Brasil entre 1950 e 2022



Fonte: Traduzido de Rodrigues *et al.* (2022).

As epidemias de esporotricose estão associadas a condições urbanas desfavoráveis, como pobreza e falta de saneamento básico, aliadas à elevada população felina (Gonçalves *et al.*, 2024). No Brasil, a maior incidência da doença é registrada entre mulheres adultas de baixa renda, devido ao cuidado domiciliar de gatos infectados (Rodrigues *et al.*, 2020; Gonçalves *et al.*, 2024). A esporotricose transmitida por gatos, associada principalmente a *S. brasiliensis*, vem se expandindo em direção à região Nordeste do Brasil (Bento *et al.*, 2021).

Em Natal, no estado do Rio Grande do Norte, foram diagnosticados 121 casos humanos de esporotricose transmitida por gatos entre 2016 e 2019, sendo a maioria das infecções causada por *S. brasiliensis* (Bento *et al.*, 2021). Oliveira *et al.* (2024) descreveram o surgimento de 1.176 casos de esporotricose em gatos entre 2016 e 2021 na Região Metropolitana de Recife, o

que resultou em significativa transmissão zoonótica, tendo *S. brasiliensis* como o principal agente etiológico. Esse cenário, antes caracterizado por casos esporádicos, agrupados e autolimitados, passou a configurar uma emergência em saúde pública (Rodrigues *et al.*, 2022).

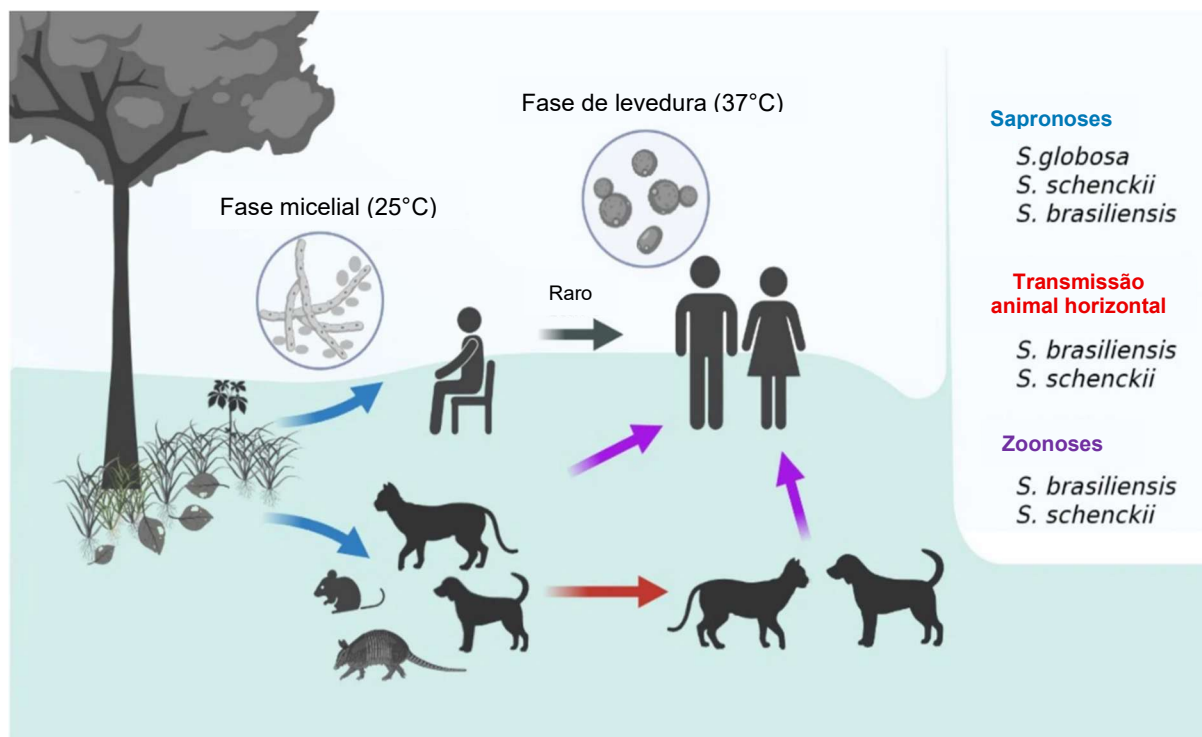
No estado do Ceará, o primeiro caso confirmado de esporotricose felina causada por *S. brasiliensis* foi relatado em 2022, na cidade de Fortaleza. Diante da crescente circulação do fungo na região, considerou-se a possibilidade de infecção autóctone. No entanto, não se descartou a possibilidade de infecção alóctone, visto que o animal havia visitado Recife, em Pernambuco, semanas antes do surgimento das lesões (Aguilar *et al.*, 2023). Em um intervalo de tempo próximo, um estudo realizado no Hospital São José de Doenças Infecciosas (HSJ), descreveu cinco casos humanos de esporotricose atendidos entre 2022 e 2023, com origem nos municípios de Fortaleza, Iracema e Porteiras. Estes dois últimos fazem fronteira com estados do Nordeste onde a esporotricose já é considerada endêmica. Todos os pacientes relataram contato prévio com felinos doentes, reforçando a importância da transmissão zoonótica na dinâmica da doença (Damasceno *et al.*, 2023). Esses relatos evidenciam a expansão e o potencial zoonótico de *Sporothrix* spp., ressaltando a necessidade de uma abordagem em Saúde Única para medidas preventivas e vigilância integrada entre saúde humana, animal e ambiental (Gremião *et al.*, 2020; Rossow *et al.*, 2020).

Embora alguns grupos sejam mais suscetíveis, a esporotricose pode acometer diversas espécies animais como gatos, cães, tatus, ratos, camundongos, camelos, bovinos, cavalos e aves (Sidrim; Rocha, 2004). Em humanos pode afetar ambos os sexos e todas as idades, a depender do nível de exposição (Chakrabarti *et al.*, 2015). Além disso, atividades recreativas e ocupações como de jardineiros, agricultores, cuidadores de gatos e veterinários podem aumentar o risco de infecção (Sidrim; Rocha, 2004; Chakrabarti *et al.*, 2015).

#### **2.1.4 Patogenia**

A esporotricose é uma micose subcutânea cuja transmissão ocorre principalmente por duas vias distintas: a via clássica, de caráter sapronótico, e a via alternativa, que pode ser subdividida em epizoótica e zoonótica (Rodrigues *et al.*, 2020). Essas rotas estão representadas na Figura 7.

Figura 7 - Esquema representativo das rotas de transmissão da esporotricose



Fonte: Traduzido de Valdez *et al.* (2023).

A via sapronótica ocorre por inoculação traumática do fungo a partir do contato com solo, plantas ou matéria orgânica contaminada, sendo particularmente associada a atividades ocupacionais como agricultura, floricultura, mineração e exploração de madeira (Orofino-Costa *et al.*, 2017). Predominante em áreas rurais, essa via de transmissão está principalmente relacionada às espécies *S. schenckii* e *S. globosa* (Rodrigues *et al.*, 2016; Gremião *et al.*, 2017).

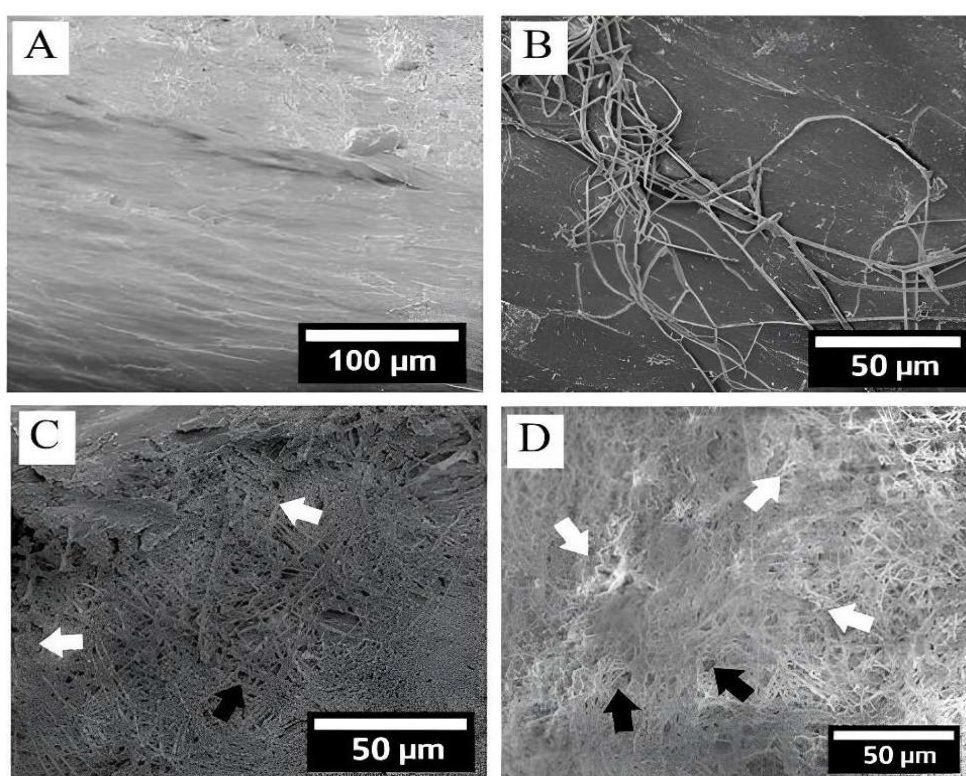
Já a via alternativa envolve a transmissão horizontal do fungo entre animais, como cães, roedores e, principalmente felinos; e a transmissão zoonótica, que ocorre quando humanos são infectados por meio de arranhões, mordidas ou contato direto com secreções de animais doentes, principalmente gatos domésticos e de rua (Gremião *et al.*, 2017; Rossow *et al.*, 2020). Essa via tem ganhado crescente importância em contextos urbanos e está intimamente associada à *S. brasiliensis*, reconhecida por sua maior virulência e capacidade de transmissão entre animais e para humanos (Gremião *et al.*, 2017; Rodrigue *et al.*, 2020).

Os felinos são considerados hospedeiros altamente suscetíveis à infecção por *Sporothrix* spp., devido a seus hábitos naturais, como afiar as unhas em troncos de árvores e enterrar fezes no solo. A esporotricose felina é mais frequente em machos adultos não castrados, pois, por serem animais territorialistas, estão mais propensos a conflitos e ferimentos, o que favorece a transmissão do fungo (Rodrigues *et al.*, 2022).



Um estudo de Brilhante *et al.* (2021) investigou a formação de biofilmes por espécies de *Sporothrix* na superfície de garras de gatos, utilizando um modelo *ex vivo* (Figura 8). O estudo demonstrou que todas as espécies analisadas foram capazes de formar biofilmes nos fragmentos de unhas, sendo o período de sete dias considerado ideal para a maturação. Esses dados reforçam o papel dos felinos como importantes vetores de transmissão, tanto para humanos quanto para outros gatos, uma vez que a formação de biofilmes nas garras pode facilitar a disseminação do fungo.

Figura 8 - Biofilmes formados por *Sporothrix brasiliensis* em fragmentos de unha de gato.



Fonte: Adaptado de Brilhante *et al.* (2021).

**Legenda:** Imagens por microscopia eletrônica de varredura de biofilmes formados por *Sporothrix brasiliensis* em fragmentos de unha de gato. **A.** Controle negativo, superfície de uma unha de gato sem crescimento fúngico. **B.** Filamento inicial após 24 h de incubação. **C.** Biofilme formado após 72 h (3 dias) de incubação, já apresentando matriz e canais de água. **D.** Biofilme formado após 168 h (7 dias) de incubação.

No entanto, o impacto da esporotricose tanto em animais quanto em humanos varia conforme múltiplos fatores, como o tamanho do inóculo, a ação direta do patógeno e a resposta imunológica do hospedeiro. Assim, a gravidade da infecção associada às vias clássica e alternativa depende da combinação dos seguintes fatores: (1) o morfotipo da célula transmitida; (2) a quantidade de inóculo e (3) a espécie de *Sporothrix* responsável pela infecção (Rodrigues *et al.*, 2020).



### 2.1.5 Manifestações clínicas

A esporotricose pode ser classificada em formas cutânea e extracutânea, de acordo com a localização das lesões. A forma cutânea é dividida em cutânea fixa, linfocutânea e cutânea disseminada (Barros; Almeida-Paes; Schubach, 2011). Manifestações cutâneas surgem após traumas que comprometem a integridade da epiderme, permitindo a penetração do fungo na pele (Bonifaz *et al.*, 2015).

A forma cutânea fixa (Figura 9), caracteriza-se pelo aparecimento de uma ou poucas lesões restritas ao local de inoculação. Essas lesões costumam ser ulceradas, com bordas eritematosas, e podem apresentar diferentes morfologias, incluindo aspecto vegetativo, verrucoso ou papular (Bonifaz *et al.*, 2015; Orofino-Costa *et al.*, 2017).

Figura 9 - Forma cutânea fixa da esporotricose



Fonte: Barnacle *et al.* (2023).

**Legenda:** Lesão ulcerada no dedo médio.

A forma linfocutânea (Figura 10) é a apresentação clínica mais comum. Inicialmente, manifesta-se como uma pequena pápula ou pústula eritematosa no local da inoculação. Após alguns dias ou semanas, novas lesões surgem e se espalham linearmente ao longo dos vasos linfáticos, aspecto conhecido como cancro esporotricótico (Bonifaz *et al.*, 2015; Orofino-Costa *et al.*, 2022). Embora ocorra em qualquer área da pele, os locais mais afetados são os membros superiores e inferiores, e a face, principalmente em crianças (Orofino-Costa *et al.*, 2022).

Figura 10 - Forma linfocutânea da esporotricose



Fonte: Rodrigues *et al.* (2020).

**Legenda:** Lesão nodular ulcerativa no polegar, seguida de lesões nodulares e/ou ulcerativas nos vasos linfáticos regionais.

A esporotricose cutânea disseminada (Figura 11) apresenta múltiplas lesões polimórficas em locais não contíguos, sem envolvimento extracutâneo (Bonifaz *et al.*, 2015; Orofino-Costa *et al.*, 2022). Antes da transmissão zoonótica, era rara e associada à disseminação hematogênica do fungo em imunossuprimidos (Barros; Almeida-Paes; Schubach, 2011). Com o aumento dos casos zoonóticos ligados a gatos doentes, tornou-se mais frequente devido a traumas múltiplos, podendo ocorrer também em pessoas imunocompetentes (Orofino-Costa *et al.*, 2022).

Figura 11 - Forma cutânea disseminada da esporotricose



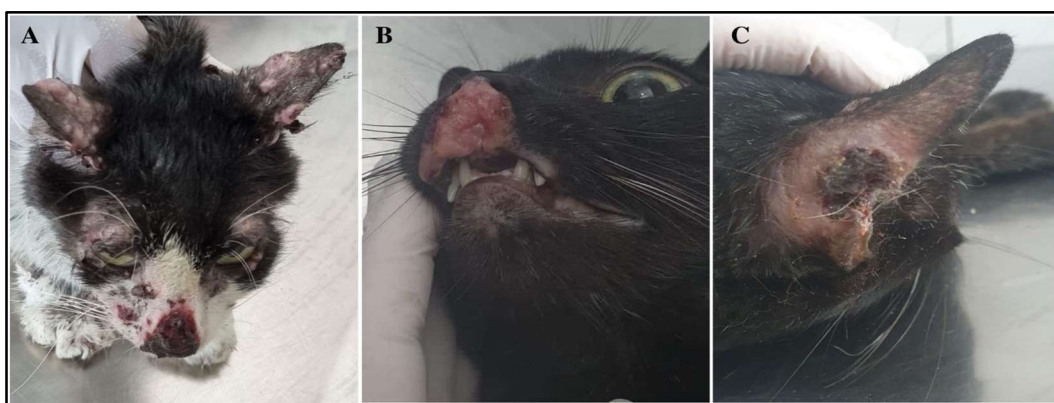
Fonte: Orofino-Costa *et al.* (2017).

**Legenda:** Forma sistêmica com lesões cutâneas disseminadas.

Já a forma extracutânea, rara e de difícil diagnóstico, ocorre quando a infecção se dissemina para outros órgãos e tecidos por via hematogênica ou, em situações ainda mais incomuns, por inalação de propágulos fúngicos (Orofino-Costa *et al.*, 2017; Alves *et al.*, 2020). As apresentações mais comuns incluem as formas ocular, pulmonar e osteoarticular, geralmente associadas a pacientes imunossuprimidos, como diabéticos e portadores de HIV/AIDS (Orofino-Costa *et al.*, 2022).

Já nos gatos, principais hospedeiros animais e vetores da esporotricose para humanos, as manifestações clínicas mais comuns incluem múltiplas lesões ulceradas na pele, linfonodos aumentados e sinais respiratórios (Aguiar *et al.*, 2023). As ulcerações ocorrem predominantemente na região cefálica, incluindo a ponta das orelhas e o nariz, além das patas (Figura 12) (Rodrigues *et al.*, 2022). Por razões ainda desconhecidas, *S. brasiliensis* não é eficientemente controlado pelo sistema imunológico felino, ao contrário do que ocorre em humanos e alguns outros mamíferos, como cães, resultando em uma alta carga de leveduras nas lesões (Valdez *et al.*, 2023).

Figura 12 - Lesões de esporotricose em gato



Fonte: ONEHMIC Lab

**Legenda:** Esporotricose felina. **A.** Gato com múltiplas lesões crostosas, ulceradas e nodulares na região cefálica. **B.** Gato com lesão cutânea ulcerada na região oronasal. **C.** Gato com lesão cutânea crostosa e ulcerada no pavilhão auricular.

### 2.1.6 Diagnóstico da esporotricose

O diagnóstico da esporotricose envolve a correlação entre dados epidemiológicos, clínicos e laboratoriais (Sharma; Sharma; Sharma, 2022). Para a confirmação laboratorial, pode ser realizado o exame micológico direto, sempre acompanhado do isolamento do agente em cultura, que constitui o padrão-ouro, enquanto sorologia, histopatologia e técnicas moleculares são utilizados como testes complementares (Orofino-Costa *et al.*, 2022). Clinicamente, os aspectos das lesões cutâneas na esporotricose podem ser confundidos com os de outras doenças,

sobretudo diante das dermatopatias que compõem o acrônimo PLECT (Paracoccidioidomicose, Leishmaniose tegumentar americana, Esporotricose, Cromoblastomicose e Tuberculose cutânea), sendo, portanto, necessária a realização de um diagnóstico laboratorial diferencial, precoce e preciso (Rodrigues *et al.*, 2022; Schechtman *et al.*, 2022; Salazar *et al.*, 2023).

O exame direto (ED) é uma ferramenta útil para a detecção inicial de células leveduriformes em amostras frescas, sendo uma das primeiras abordagens laboratoriais no diagnóstico da esporotricose. Para isso, as amostras são tratadas com hidróxido de potássio (KOH) a 10%, facilitando a visualização das estruturas fúngicas (Barros, Almeida-Paes e Schubach, 2011). No entanto, sua sensibilidade varia conforme o hospedeiro e a apresentação clínica da doença. Em gatos, devido à alta carga fúngica, o ED permite um diagnóstico preliminar rápido e o início imediato do tratamento. Entretanto, sua sensibilidade diminui após a introdução da terapia antifúngica (Machado *et al.* 2025).

Em humanos, especialmente nas formas cutânea fixa e linfocutânea, a detecção direta de estruturas fúngicas em amostras clínicas, como exsudatos ou fragmentos de lesão, é dificultada pela baixa quantidade de leveduras viáveis (Orofino-Costa *et al.*, 2022; Machado *et al.*, 2025). Apesar do baixo custo e fácil execução, o exame direto deve sempre ser complementado pelo cultivo micológico, pois, a ausência de estruturas fúngicas no exame direto não exclui o diagnóstico, reforçando a importância da associação com métodos mais sensíveis, como a cultura e a análise molecular (Rodrigues *et al.* 2022)

A cultura fúngica permanece como o padrão-ouro para o diagnóstico definitivo da esporotricose, permitindo a identificação precisa do agente etiológico por meio do crescimento e análise morfológica da colônia (Rodrigues *et al.*, 2022). O isolamento de *Sporothrix* spp. pode ser feito a partir de vários tipos de amostras biológicas, como fragmentos de tecido, secreções purulentas, exsudatos de lesões e aspirados de linfonodos, e devem ser cultivadas em meios de cultura padrão para análises micológicas, sendo eles o ágar Sabouraud simples, ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol e ágar Mycosel, e incubados a 25 °C para favorecer o crescimento da forma micelial do fungo (Orofino-Costa *et al.*, 2022).

As colônias tornam-se visíveis entre 5 a 7 dias, podendo demorar até duas semanas dependendo das condições da amostra e da carga fúngica (Orofino-Costa *et al.*, 2022; Rodrigues; Hagen; De Camargo, 2022). Para confirmação do dimorfismo térmico, uma característica fundamental de espécies patogênicas de *Sporothrix*, realiza-se a conversão para a forma leveduriforme em meios enriquecidos como BHI e incubados a 35–37 °C (Barros; Almeida-Paes; Schubach, 2011). Essa transição morfológica é um dos principais critérios para diferenciação do gênero e confirmação do diagnóstico (Sharma; Sharma; Sharma, 2022).

A histopatologia é outra técnica utilizada para identificar *Sporothrix* spp., porém, em amostras humanas, a escassez de estruturas fúngicas pode tornar os achados inespecíficos (Rodrigues *et al.*, 2022). No entanto, colorações como GMS (metenamina de prata de Grocott-Gomori) e PAS (ácido periódico de Schiff) aumentam significativamente a sensibilidade, permitindo a visualização de leveduras ovais, esféricas ou em forma de charuto, localizadas no interior de células gigantes ou dispersas no tecido (Sidrim; Rocha, 2004; Machado *et al.*, 2025). O padrão histopatológico inclui reação granulomatosa, hiperplasia epidérmica (com ou sem ulceração), acantose papilomatosa, hiperkeratose, microabscessos intraepidérmicos e elementos fúngicos, como leveduras e corpos asteroides. Estes últimos, caracterizados como estruturas eosinofílicas radiadas ao redor das leveduras, apesar de não patognomônicos, são sugestivos de esporotricose (Rodrigues *et al.*, 2022; Sharma, Sharma e Sharma, 2022).

A sorologia tem se consolidado como uma ferramenta diagnóstica complementar na esporotricose, especialmente útil em formas sistêmicas ou atípicas da doença (Orofino-Costa *et al.*, 2022). Os testes sorológicos são baseados na detecção de anticorpos circulantes, e o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) é o método mais amplamente utilizado devido à sua alta sensibilidade e especificidade em humanos e gatos (Orofino-Costa *et al.*, 2022; Machado *et al.*, 2025). Os principais alvos antigênicos do ELISA incluem as glicoproteínas da parede celular Gp60 (principalmente em *S. brasiliensis*) e Gp70 (principalmente em *S. schenckii*) ou a fração de ligação à concanavalina A (SsCBF), que é amplamente reativa entre as espécies de *Sporothrix* (Machado *et al.*, 2025). Embora não seja capaz de distinguir entre espécies, o ELISA baseado em SsCBF tem se mostrado útil no monitoramento terapêutico já que a diminuição dos títulos de anticorpos ao longo do tratamento pode indicar boa resposta clínica (Etchecopaz *et al.*, 2021; Rodrigues *et al.*, 2022).

As técnicas moleculares melhoraram a velocidade, precisão e a especificidade do diagnóstico da esporotricose. Entre as estratégias mais utilizadas, destaca-se a reação em cadeia da polimerase (PCR) e suas variantes, como a PCR quantitativa em tempo real (qPCR) e a multiplex qPCR (Della Terra *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2019). A PCR convencional é uma técnica rápida e de baixo custo, amplamente utilizada para amplificar alvos genéticos, como os genes CHS1 (quitina sintase I), BT2 ( $\beta$ -tubulina) e CAL (calmodulina). No entanto, essa técnica apresenta limitações na diferenciação entre espécies próximas (Rodrigues *et al.*, 2022). Assim, o sequenciamento de DNA é considerado o método de referência para a detecção e diferenciação de espécies clinicamente relevantes, como *S. brasiliensis*, *S. schenckii* e *S. globosa*, sendo a região ITS amplamente utilizada como marcador de código de barras molecular (Orofino-Costa *et al.*, 2022; Machado *et al.*, 2025). Além disso, métodos

complementares, como MALDI-TOF (espectrometria de massas de tempo de voo por dessorção/ionização a laser assistida por matriz; do inglês, *matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry*), têm sido empregados para a identificação rápida e específica de espécies patogênicas do gênero *Sporothrix*, demonstrando elevado potencial em estudos de vigilância epidemiológica e no diagnóstico em laboratórios de referência (Etchecopaz *et al.*, 2021).

### **2.1.7 Tratamento da esporotricose humana e animal**

A recuperação espontânea da esporotricose em humanos e animais é rara, tornando o tratamento essencial para a maioria dos casos (Rodrigues *et al.*, 2022). A escolha da terapia depende de diversos fatores, como a forma clínica, a gravidade da infecção, o estado imunológico do hospedeiro e a espécie de *Sporothrix* envolvida (Sharma; Sharma; Sharma, 2022). O fármaco de primeira escolha para o tratamento da esporotricose é o itraconazol, tendo como alternativas o iodeto de potássio, terbinafina e anfotericina B (Almeida-Paes *et al.*, 2017b).

Desde sua introdução em 1903, o iodeto de potássio tem sido utilizado em países emergentes como uma alternativa terapêutica eficaz e de baixo custo, sendo especialmente empregado no tratamento das formas cutâneas da esporotricose, tanto em humanos quanto em felinos, quando o itraconazol não é tolerado ou está contraindicado (Brilhante *et al.*, 2019; Rodrigues *et al.*, 2020). O iodeto de potássio possui atividade imunomoduladora e pode suprimir a produção de intermediários tóxicos do oxigênio por leucócitos polimorfonucleares, o que lhe confere um efeito anti-inflamatório. No entanto, sua capacidade de destruir diretamente os microrganismos ainda não é totalmente elucidada (Rodrigues *et al.*, 2022). Os efeitos adversos mais comuns são, dor de cabeça, diarreia, náusea, dor abdominal e gosto metálico, que raramente impedem a continuação do tratamento (Orofino-Costa *et al.*, 2022).

O itraconazol é o fármaco de primeira escolha para o tratamento da esporotricose, devido à sua eficácia, segurança e conveniência posológica, desde que não haja contraindicação, sendo utilizado também para o tratamento de animais no Brasil (Xavier *et al.*, 2023; Orofino-Costa *et al.*, 2017, 2022). Trata-se de um triazol fungistático, que age inibindo a síntese de ergosterol, o principal esterol da membrana celular fúngica, através da inibição da enzima citocromo P450 lanosterol 14  $\alpha$ -desmetilase (Mahajan, 2014; Rodrigues *et al.*, 2022). Embora tenha boa eficácia, o tratamento com itraconazol pode causar vários efeitos colaterais, sendo os mais comuns dores de cabeça e distúrbios gastrointestinais (Orofino-Costa *et al.*, 2022).

A terbinafina, uma alilamina de ação fungicida, é utilizada no tratamento da esporotricose, sendo a alternativa para casos leves a moderados quando o itraconazol e o iodeto de potássio não podem ser administrados (Orofino-Costa *et al.*, 2017). A terbinafina interfere na síntese inicial do ergosterol através da inibição da enzima esqualeno epoxidase (Mahajan, 2014). Devido à baixa interação com outras drogas, a terbinafina é especialmente indicada para pacientes idosos com outras comorbidades e, entre seus efeitos adversos mais comuns, estão cefaleia, náusea, distensão e dor abdominal, dispepsia e diarreia (Orofino-Costa *et al.*, 2022).

Em casos graves, como nas formas extracutânea ou cutânea disseminada, a anfotericina B é recomendada até que a melhora clínica seja alcançada, quando deve ser substituída por itraconazol (Orofino-costa *et al.*, 2017; Sharma; Sharma; Sharma, 2022). A anfotericina B é um antifúngico poliênico de ação fungicida, que se liga ao ergosterol da membrana citoplasmática fúngica, promovendo a formação de poros e aumentando a permeabilidade celular a íons e outras moléculas. Além disso, pode induzir dano oxidativo por meio da liberação de radicais livres letais (Mahajan, 2014). Embora muito eficaz, seu uso clínico é limitado pela alta toxicidade. Com o objetivo de melhorar o índice terapêutico e reduzir complicações tóxicas, foram desenvolvidas formulações associadas a lipídios, como o complexo lipídico de anfotericina B (ABLC) e a anfotericina B lipossomal (L-AmB) (Carolus *et al.*, 2020).

Embora os antifúngicos atualmente disponíveis sejam, em geral, eficazes no tratamento da esporotricose, nos últimos anos tem-se observado um aumento nas falhas terapêuticas, incluindo relatos de recidivas após melhora inicial e de isolados com menor sensibilidade aos antifúngicos clássicos (Waller *et al.*, 2021). Nessas situações, torna-se necessário o ajuste ou aumento da dose para alcançar a eficácia terapêutica esperada, o que eleva o risco de efeitos adversos e pode impactar negativamente a adesão dos pacientes ao tratamento, especialmente em regiões com acesso limitado a cuidados médicos (Poester *et al.*, 2022).

Em especial no Brasil, isolados clínicos de *S. brasiliensis* têm demonstrado menor sensibilidade, *in vitro*, ao itraconazol, possivelmente devido a formação de biofilmes, que podem atuar na inibição, adsorção, inativação, neutralização ou expulsão dos antifúngicos (Rodrigues *et al.*, 2022; García-Carnero; Martínez-Álvarez, 2022). Diante desse cenário, torna-se essencial a busca por novos compostos com potencial antifúngico, especialmente aqueles capazes de inibir ou reduzir a formação de biofilmes por *S. brasiliensis*, ou ainda atuar em associação com os antifúngicos já utilizados, a fim de contornar os casos de resistência e melhorar a eficácia terapêutica.



## 2.2 Estratégias terapêuticas no controle de infecções por *S. brasiliensis*

### 2.2.1 A virulência aumentada de *S. brasiliensis*

*S. brasiliensis* é um patógeno fúngico emergente, caracterizado por sua transmissão zoonótica e epizootica, especialmente no Brasil. Diferentemente da forma clássica da esporotricose associada à manipulação de solo e vegetais, *S. brasiliensis* está envolvido em surtos urbanos e é responsável por mais de 90% dos casos de esporotricose em humanos e felinos no país (Rossow *et al.*, 2020; Gremião *et al.*, 2021).

Estudos comparativos indicam que *S. brasiliensis* apresenta maior carga fúngica, capacidade invasiva e potencial de dano tecidual do que outras espécies do clado clínico, o que pode explicar sua predominância em surtos (Gremião *et al.*, 2017). Além disso, com relação a composição da parede, foram identificadas diferenças marcantes entre *S. schenckii* e *S. brasiliensis*. Embora ambas possuam paredes celulares com dupla camada, *S. brasiliensis* apresenta parede mais espessa, com maior teor de ramnose e quitina, menor quantidade de Gp70 e microfibrilas mais longas, as quais favorecem a conexão entre leveduras e, como consequência, a formação de biofilmes (Rossow *et al.*, 2020; Villalobos-Duno *et al.*, 2021).

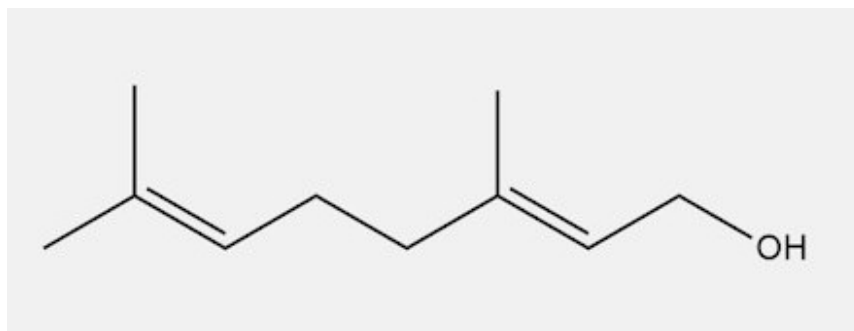
Nesse contexto, e diante do aumento nos relatos de resistência e recidivas, especialmente nas infecções causadas por *S. brasiliensis*, além da limitada variedade de antifúngicos disponíveis para o tratamento da esporotricose, observa-se interesse crescente por novas estratégias terapêuticas. Entre as alternativas promissoras, destaca-se o uso de compostos naturais com potencial antifúngico.

### 2.2.2 Geraniol

O geraniol (C<sub>10</sub>H<sub>18</sub>O) é um monoterpene alifático com um grupo de álcool funcional em sua composição orgânica (Figura 13). Está presente em óleos essenciais extraídos de vários tipos de plantas como *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon nardus*, *Pelargonium graveolens*, *Rosa Damascena* e *Rosa centifolia* (Lira *et al.*, 2020). Por apresentar odor e sabor característicos o geraniol é classificado pela *United States Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos como um aditivo para aromatizar alimentos, como bebidas, doces e sorvetes (Chen; Viljoen, 2022).



Figura 13 - Estrutura química do geraniol elaborada no software *ChemBioDraw*



Fonte: Lei *et al.* (2019).

Esse fitocomposto também tem despertado interesse por sua ampla atividade biológica, em especial a atividade antifúngica, apresentando atividade significativa contra uma variedade de patógenos, incluindo *Trichophyton rubrum* (Pereira *et al.*, 2014), *Candida albicans* (Leite *et al.*, 2015) e *Aspergillus* spp. (Tang *et al.*, 2018). O possível mecanismo de ação antimicrobiana do geraniol está relacionado à sua capacidade de se ligar aos lipídios da membrana celular de microrganismos, comprometendo a integridade estrutural e aumentando sua permeabilidade. Essa alteração permite a penetração em alvos intracelulares essenciais, resultando em morte celular (Lei *et al.*, 2019; Lira *et al.*, 2020).

Pereira *et al.* (2014) investigaram o efeito do geraniol contra *T. rubrum*, causador de dermatofitose crônica. O geraniol inibiu o crescimento micelial, a germinação de conídios e o crescimento fúngico em fragmentos de unha, e o mecanismo de ação envolveu o vazamento de material intracelular e a inibição da biossíntese de ergosterol.

No estudo conduzido por Leite *et al.* (2015), o geraniol foi capaz de inibir o crescimento de *C. albicans*, incluindo isolados clínicos e cepas padrão. A investigação dos mecanismos de ação indicou que o composto atuou alterando a integridade da membrana celular, promovendo aumento da permeabilidade e interferindo em funções essenciais da membrana. Adicionalmente, foi capaz de inibir a formação de estruturas morfológicas associadas à virulência de *C. albicans*, como pseudo-hifas e clamidoconídios.

No caso de *Aspergillus* spp., Tang *et al.* (2018) demonstraram que o geraniol, aplicado por fumigação, inibiu significativamente o crescimento de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus ochraceus*, patógenos responsáveis pela deterioração de grãos. O mecanismo de ação contra *A. flavus* foi atribuído à indução de espécies reativas de oxigênio (ROS), enquanto contra *A. ochraceus* foi associado à alteração na permeabilidade da membrana celular.

Apesar da comprovada atividade antimicrobiana do geraniol, sua aplicação enfrenta limitações devido à sua natureza hidrofóbica, alta volatilidade e instabilidade frente a fatores

ambientais como luz, temperatura e oxigênio, o que compromete sua integridade e reduz sua eficácia em exposições prolongadas (Chen; Viljoen, 2022). Nesse contexto, estratégias como a nanoemulsão e o encapsulamento de geraniol têm sido desenvolvidas para criar sistemas de entrega que aumentam sua estabilidade e eficácia (Pontes *et al.*, 2023; Celebioglu *et al.*, 2025).

Estudos *in vivo* utilizando o modelo de embriões de zebrafish demonstraram que o geraniol apresenta toxicidade significativa em concentrações elevadas, causando efeitos como coagulação embrionária, edema do saco vitelino, pigmentação reduzida e deformidades na cauda (Silva-Rodrigues *et al.*, 2024).

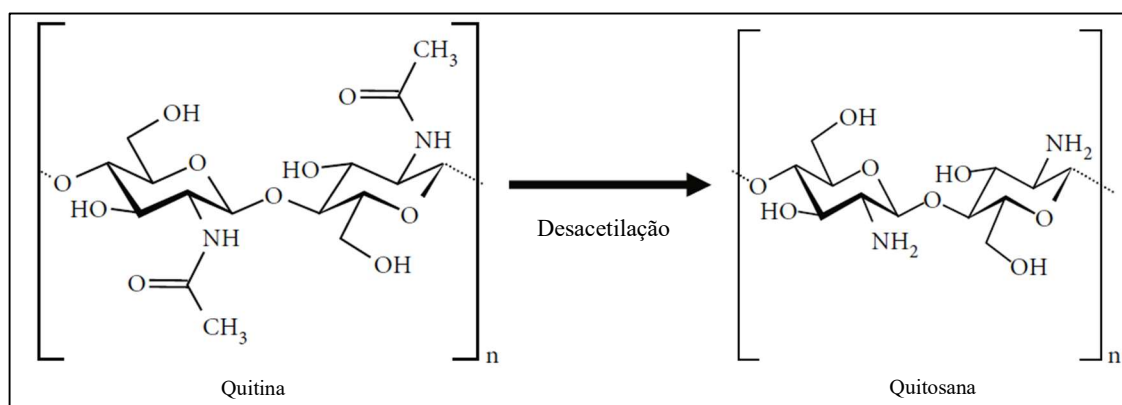
### 2.2.3 Micropartículas de quitosana

Estratégias de encapsulamento baseadas em materiais de origem renovável têm despertado crescente interesse na indústria farmacêutica, por oferecerem formas eficientes de proteção e liberação controlada de compostos bioativos (Celebioglu *et al.*, 2025).

Sistemas de liberação controlada de fármacos são formulações que associam um princípio ativo a um veículo, geralmente um polímero, com o objetivo de otimizar a eficácia terapêutica e a biodisponibilidade dos medicamentos (Baharlouei; Rahman, 2022). Dentre os polímeros utilizados, destacam-se polissacarídeos derivados de plantas, animais ou microrganismos, devido à sua ampla disponibilidade na natureza e propriedades favoráveis à aplicação farmacêutica (Celebioglu *et al.*, 2025).

Um exemplo notável é a quitosana, um biopolímero linear obtido pela desacetilação parcial da quitina (Figura 14), que tem sido amplamente utilizada como agente antimicrobiano, devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa toxicidade, podendo interagir com células microbianas de diferentes formas, dependendo de seu peso molecular (Garcia *et al.*, 2020; Brilhante *et al.*, 2023).

Figura 14 - Estrutura química da quitosana a partir da desacetilação da quitina



Fonte: Traduzido de Alemu; Getachew; Mondal (2023).

No estudo realizado por Garcia *et al.* (2020), foi demonstrado que a quitosana de baixo peso molecular apresentou maior eficácia antifúngica frente a células planctônicas e biofilmes de *S. brasiliensis*, requerendo menores concentrações para inibir o crescimento do fungo. A eficácia da quitosana está relacionada à sua capacidade de interagir com a parede celular dos fungos, principalmente por meio de interações eletrostáticas entre seus grupos amino protonados, carregados positivamente, e os componentes negativamente carregados das superfícies celulares. Essa interação pode causar alterações na permeabilidade da membrana plasmática, induzir a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e promover danos estruturais que levam à morte celular (Brilhante *et al.*, 2023).

A natureza catiônica da quitosana leva, sob condições ácidas, ao desenvolvimento de várias formas, como nano/micropartículas, emulsões, fibras, hidrogéis, filmes e membranas. Por isso, tem sido amplamente empregada como matriz para o encapsulamento de extratos naturais, óleos essenciais e compostos bioativos puros de origem natural, como o geraniol (Oliveira *et al.*, 2018; Detsi *et al.*, 2021).

Estudos anteriores realizados por nosso grupo de pesquisa demonstraram que a utilização de micropartículas de quitosana para a encapsulação de óleos essenciais contribui para potencializar a atividade antifúngica desses compostos, com resultados significativos frente a biofilmes de *C. albicans* (Garcia *et al.* 2021) e de *H. capsulatum* (Costa *et al.*, 2025). Além disso, os estudos de Garcia *et al.* (2021, 2023) demonstraram que a encapsulação de óleos essenciais em micropartículas de também reduziram sua toxicidade potencial. Esse efeito foi atribuído à liberação controlada e prolongada dos compostos bioativos, permitindo que a dose fosse direcionada ao local desejado de forma mais eficiente, minimizando os riscos de superexposição ou efeitos adversos.

Embora existam numerosos estudos sobre as atividades do geraniol e de micropartículas de quitosana, isoladas ou em combinação com óleos essenciais, ainda não há investigações sobre a ação combinada desses compostos contra biofilmes de *S. brasiliensis*. Considerando que os sistemas de liberação representam uma estratégia promissora para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas, o presente estudo tem como objetivo avaliar *in vitro* a eficácia de micropartículas de quitosana carregadas com geraniol frente a células planctônicas e biofilmes em formação de *S. brasiliensis* na sua forma filamentosa, bem como suas possíveis interações sinérgicas com anfotericina B e itraconazol.

### 3 HIPÓTESES

- Geraniol isolado possui atividade antifúngica, *in vitro*, frente células planctônicas e biofilmes em formação de *S. brasiliensis*, na sua forma filamentosa;
- Geraniol encapsulado em micropartículas de quitosana possui atividade antifúngica, *in vitro*, frente células planctônicas e biofilmes em formação de *S. brasiliensis*, na forma filamentosa;
- As micropartículas contendo geraniol apresentam sinergismo, *in vitro*, com anfotericina B e itraconazol frente a células planctônicas e biofilmes em formação de *S. brasiliensis*, na sua forma filamentosa.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos do geraniol isolado e encapsulado em micropartículas de quitosana sobre células planctônicas e biofilmes em formação de *S. brasiliensis*.

### 4.2 Objetivos Específicos

- Investigar o efeito antifúngico, *in vitro*, do geraniol isolado frente células planctônicas e biofilmes em formação de *S. brasiliensis*, na sua forma filamentosa;
- Avaliar o efeito antifúngico, *in vitro*, do geraniol encapsulado em micropartículas de quitosana frente células planctônicas e biofilmes em formação de *S. brasiliensis*, na sua forma filamentosa;
- Analisar a interação, *in vitro*, do geraniol encapsulado em micropartículas de quitosana com anfotericina B e itraconazol frente células planctônicas e biofilmes em formação de *S. brasiliensis* na forma filamentosa.

## 5 METODOLOGIA

### 5.1 Local de estudo

As pesquisas foram realizadas no laboratório *One Health Microbiology Laboratory* (ONEHMIC Lab), da Universidade Federal do Ceará (UFC), Brasil. Este estudo contou com a colaboração do Núcleo de Pesquisas em Lubrificantes Prof. Ícaro de Sousa Moreira (NPL/ISM), para a preparação e análise das micropartículas.

### 5.2 Microrganismos

Para esse estudo foram utilizadas nove cepas de *S. brasiliensis* na forma filamentosa (Tabela 1).

Tabela 1 - Origem e local de isolamento das cepas de *Sporothrix brasiliensis* utilizadas neste estudo.

Cepas (Código ONEHMIC Lab)	Espécie	Local de origem	Fonte de Isolamento
ONEHMIC 05-3-003	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	RS, Brasil	Gato
ONEHMIC 05-3-005	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	RS, Brasil	Cão
ONEHMIC 05-3-028	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	RJ, Brasil	Gato
ONEHMIC 05-3-031	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	RJ, Brasil	Gato
ONEHMIC 05-3-064	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	MG, Brasil	Humano
ONEHMIC 05-3-067	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	CE, Brasil	Gato
ONEHMIC 05-3-068	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	CE, Brasil	Gato
ONEHMIC 05-3-069	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	CE, Brasil	Gato
ONEHMIC 05-3-070	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	CE, Brasil	Gato

**Legenda:** ONEHMIC Lab: *One Health Microbiology Laboratory*. CE: Ceará. MG: Minas Gerais. RJ: Rio de Janeiro. RS: Rio Grande do Sul

Todos os isolados utilizados neste estudo foram obtidos da coleção de culturas do ONEHMIC Lab. Todas as cepas foram previamente caracterizadas a nível de espécie por PCR, com sequenciamento do *locus* da calmodulina (Rodrigues; De Hoog; De Camargo, 2013b). As cepas foram cultivadas em batata dextrose ágar (BDA; Sigma-Aldrich, EUA) e incubadas a 28 °C por 7 dias. A cepa de referência *Candida parapsilosis* ATCC 22019 foi utilizada como

controle nos testes de sensibilidade antifúngica. Por se tratar de microrganismos de coleção previamente estabelecida, não foi necessária aprovação por comitê de ética.

### 5.3 Compostos e Drogas controle

Para o desenvolvimento deste estudo, foram utilizados geraniol (GE; Sigma-Aldrich, EUA), na formulação líquida ( $\geq 98\%$  de pureza), quitosana de baixo peso molecular (QBP; Sigma-Aldrich, EUA) e os antifúngicos anfotericina B (AMB; Sigma-Aldrich, EUA) e itraconazol (ITC; Janssen Pharmaceutica, Bélgica). A caracterização da quitosana empregada nesse estudo, quanto ao peso molecular (PM) e grau de desacetilação (GD), foi realizada anteriormente utilizando viscosimetria e análise potenciométrica, conforme descrito por Garcia *et al.* (2020). AMB e ITC foram utilizados na verificação das interações farmacológicas e também como controle para os testes de sensibilidade. Para o preparo de soluções-estoque, geraniol, anfotericina B e itraconazol foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich, EUA). Em seguida, foram homogeneizados em agitador mecânico tipo vórtex até completa dissolução, transferidos para microtubos estéreis e estocados a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso. A QBP foi armazenada a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 5.4 Preparação de micropartículas de lecitina-quitosana carregadas com GE

Micropartículas de lecitina-quitosana carregadas com GE foram preparadas utilizando um método modificado descrito por Ilk, Saglam e Özgen, 2017. A solução de quitosana foi preparada dissolvendo quitosana (1%, m/v) em uma solução de ácido acético a 0,5% (v/v), seguida pela dissolução de Tween-80 (1%, m/v) na solução de quitosana. Separadamente, a lecitina (7,5%, m/v) foi dissolvida em uma solução de DMSO (10%, v/v). O GE foi adicionado à solução de lecitina a uma concentração de 10 mg/mL sob agitação magnética. A solução de quitosana (11,5 mL) e o complexo lecitina/GE foram aquecidos a  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ , e 1 mL da solução de lecitina/GE foi injetado lentamente na solução de quitosana pré-aquecida sob agitação magnética. Após a agitação, o pH foi ajustado para 4,5. A suspensão de micropartículas foi centrifugada (1000 g, 30 min) e lavada com água para remover partes do composto que não foram encapsuladas. Micropartículas de quitosana também foram sintetizadas utilizando solução de lecitina sem GE, sendo empregadas como controle nos testes de sensibilidade. As amostras resultantes foram rotuladas como MQ (micropartículas de quitosana) e MQGE (micropartículas de quitosana carregadas com geraniol).

## 5.5 Teste de sensibilidade de células planctônicas

Os testes de sensibilidade foram realizados pela técnica de microdiluição em caldo em microplacas de 96 poços, conforme o documento M38-A2 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2017), com adaptações. Concentrações variando de 2 a 1024 µg/mL (GE, MQ e MQGE) e 0,03 a 16 µg/mL (AMB e ITC). Os inóculos foram preparados em solução salina e em seguida ajustados para uma concentração final  $0,4-5 \times 10^4$  UFC/mL em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, EUA), tamponado a pH 7,0 com 0,165M de MOPS (Sigma-Aldrich, EUA). As microplacas foram incubadas a 35 °C por 72 h. A concentração inibitória mínima (CIM) de GE, MQ, MQGE, AMB e ITC foi definida como a menor concentração capaz de inibir 100% do crescimento visual fúngico em comparação com os poços controle (ausência dos compostos e drogas). *Candida parapsilosis* ATCC 22019 foi utilizada como controle de qualidade dos experimentos. Os experimentos foram conduzidos em duplicata.

## 5.6 Determinação de atividade antifúngica contra biofilmes em formação

### 5.6.1 Preparação dos biofilmes de *S. brasiliensis*

Os testes foram realizados de acordo com os protocolos descritos por Brilhante *et al.*, 2018. Para a formação de biofilmes de *S. brasiliensis* na forma filamentosa, foram utilizadas placas de 96 poços com fundo chato. Uma alíquota de 200 µL de suspensão fúngica, contendo  $2 \times 10^5$  UFC/mL, preparada em meio RPMI 1640, foi adicionada a cada poço das microplacas. Em seguida, as placas foram incubadas a 35 °C por 24 horas, para adesão celular. Após esse período, o sobrenadante foi removido e os poços lavados duas vezes com PBS estéril, e os biofilmes foram expostos aos compostos nas concentrações correspondentes a  $4 \times \text{CIM}$ ,  $2 \times \text{CIM}$ , CIM, CIM/2 e CIM/4. Em seguida, as microplacas foram incubadas a 35 °C por 72 horas. Para cada cepa o experimento foi realizado em duplicata. Após a exposição, a sensibilidade dos biofilmes foi avaliada pela quantificação da atividade metabólica MTT (Brilhante *et al.*, 2022).

### 5.6.2 Quantificação da atividade metabólica por ensaio de redução de MTT

A atividade metabólica dos biofilmes foi quantificada por meio do ensaio de redução do MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) (MTT; Sigma, Darmstadt, Alemanha) (Brilhante *et al.*, 2022). Para a realização deste ensaio, utilizou-se uma solução estoque de MTT (5 mg/mL em PBS com 2% de glicose).

Em cada poço contendo biofilme, foram adicionados 100 µL da solução de MTT e, após um período de incubação de 4 h a 35 °C, protegidos da luz, a mudança de cor resultante foi medida com um espectrofotômetro de placas a 540 nm. A concentração inibitória mínima em



biofilme (CIMB) foi determinada como a menor concentração capaz de inibir 50% (CIMB50) da atividade metabólica do biofilme, em comparação com a atividade do controle que não recebeu o tratamento (Pierce *et al.*, 2008). Todos os testes foram realizados em duplicata.

### 5.7 Ensaio de combinação de drogas - *checkerboard*

Para a avaliação das interações de MQGE com os antifúngicos, foram selecionadas três cepas de *S. brasiliensis* na forma filamentosa. O teste de *checkerboard* foi realizado conforme descrito por Almeida-Paes *et al.* (2016), com adaptações. Para avaliar as combinações de MQGE (2 a 1024 µg/mL) com AMB ou ITC (0,03 a 16 µg/mL) frente à forma planctônica de *S. brasiliensis*, a CIM foi definida como a menor concentração capaz de inibir 100% do crescimento visual fúngico.

Já para os ensaios frente aos biofilmes, a formação foi realizada conforme descrito anteriormente. As concentrações de MQGE (0,5 a 32 µg/mL), AMB e ITC (0,008 a 4 µg/mL) foram selecionadas com base nos resultados de sensibilidade obtidos frente à forma planctônica, adotando-se a concentração inicial de  $4 \times \text{CIM}$  para o composto e cada antifúngico. A atividade metabólica foi mensurada pelo ensaio de redução do MTT (Brilhante *et al.*, 2022), conforme descrito anteriormente, e os dados obtidos foram utilizados para o cálculo do Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF). As interações foram classificadas como sinérgicas ( $\text{ICIF} \leq 0,5$ ), indiferentes ( $0,5 < \text{ICIF} \leq 4$ ) ou antagônicas ( $\text{ICIF} > 4$ ), conforme critérios propostos por Odds (2003).

### 5.8 Análise estatística dos ensaios com biofilmes

Os resultados experimentais de absorbância foram obtidos em duplicata, sendo posteriormente transformados em médias e avaliados quanto à normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Os valores médios de absorbância foram comparados pelo teste t de Student pareado. As dosagens foram testadas em pares, de acordo com concentrações crescentes, para detectar reduções na absorbância, e a eficiência dos compostos testados foi comparada entre dosagens semelhantes. Em todas as situações, o nível de significância máximo adotado para conclusões afirmativas foi de 95% ( $p < 0,05$ ). Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software SPSS versão 20 (IBM SPSS Statistics, Armonk, NY, EUA).

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Efeito dos compostos frente a forma planctônica de *S. brasiliensis*

Os compostos testados apresentaram atividade inibitória frente às cepas de *S. brasiliensis* na sua forma filamentosa (Tabela 2). Os valores de CIM variaram de 4 a 16 µg/mL para GE, e de 2 a 8 µg/mL para MQGE. Para as MQ os valores foram de 1 a 2 µg/mL, já para as drogas antifúngicas os valores de CIM obtidos foram de 1 a 8 µg/ml para anfotericina B e de 0,5 a 4 µg/ml para itraconazol. Tais resultados estão expressos na tabela abaixo.

Tabela 2 - Concentração inibitória mínima dos compostos e antifúngicos frente a cepas de *Sporothrix brasiliensis* na forma planctônica filamentosa.

Cepa fúngica (código ONEHMIC)	Concentração inibitória mínima (µg/mL)				
	AMB	ITC	MQ	GE	MQGE
ONEHMIC 5-03-003	4	2	2	16	8
ONEHMIC 5-03-005	2	1	1	8	2
ONEHMIC 5-03-028	2	2	2	16	8
ONEHMIC 5-03-031	1	0,5	2	16	8
ONEHMIC 5-03-064	2	4	2	4	2
ONEHMIC 5-03-067	4	2	2	4	4
ONEHMIC 5-03-068	8	4	1	4	4
ONEHMIC 5-03-069	1	0,5	1	8	4
ONEHMIC 5-03-070	4	1	2	16	8

**Legenda:** ONEHMIC Lab: *One Health Microbiology Laboratory*. AMB: Anfotericina B. ITC: Itraconazol. MQ: Micropartículas de quitosana. GE: Geraniol isolado. MQGE: Micropartículas de quitosana carregadas com geraniol.

### 6.2 Efeito da exposição de biofilmes em formação de *S. brasiliensis* aos compostos

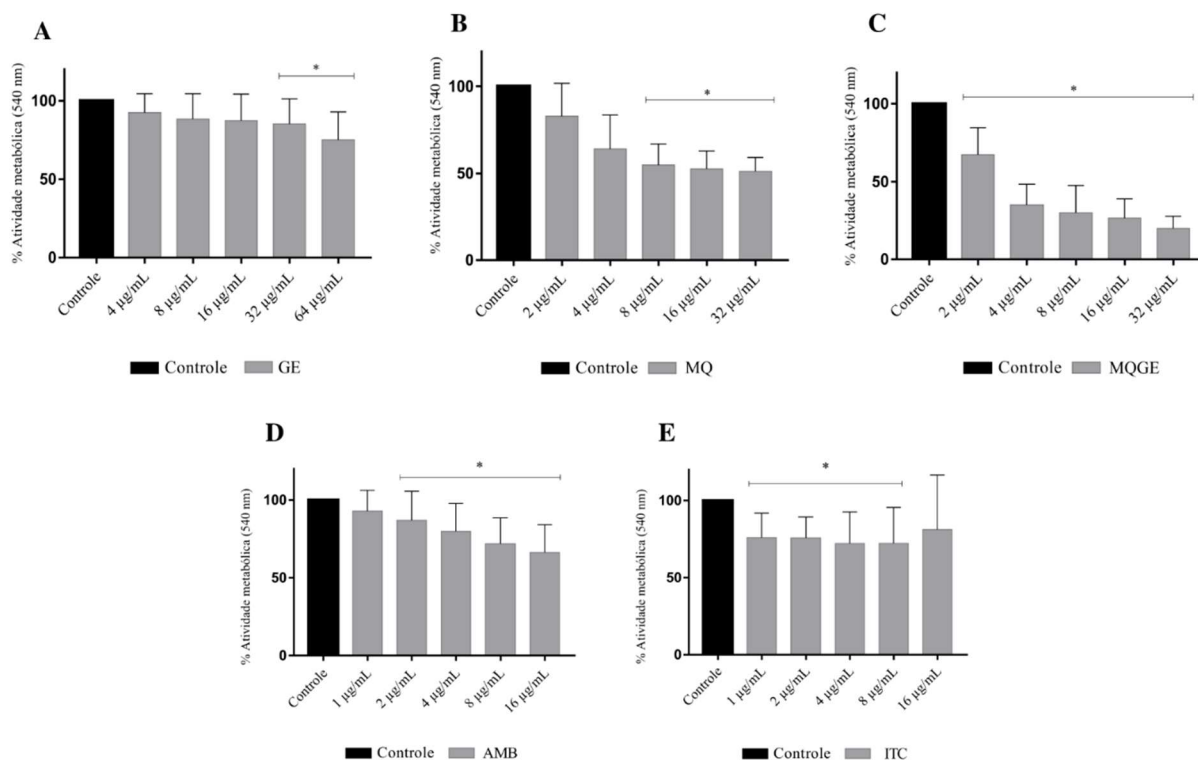
Com relação ao efeito dos compostos durante o processo de formação dos biofilmes de *S. brasiliensis* na forma filamentosa (Figura 15) observou-se perfis de resposta diferentes para cada composto. A adição de GE durante a formação de biofilme de *S. brasiliensis* (Figura 15A) reduziu a atividade metabólica a partir da concentração de 32 µg/mL, atingindo uma inibição máxima de 25% na concentração de 64 µg/mL ( $p < 0,05$ ).

A adição de MQ reduziu a atividade metabólica (Figura 15B) a partir da concentração de 8 µg/mL, com redução máxima de 49% na concentração de 32 µg/mL ( $p < 0,05$ ). Já adição de MQGE foi capaz de reduzir a atividade metabólica em todas as concentrações testadas (Figura 15C), com redução máxima de 80% na concentração de 32 µg/mL ( $p < 0,05$ ).

Os antifúngicos convencionais foram utilizados como drogas controle, sendo observadas reduções significativas na atividade metabólica a partir da concentração de 2 µg/mL

para AMB (Figura 15D), e de 1 µg/mL para ITC (Figura 15E), com exceção da concentração de 16 µg/mL, que não apresentou diferença significativa. As reduções máximas alcançadas ( $p < 0,05$ ) foram de 28% na concentração de 16 µg/mL e de 33% na concentração de 8 µg/mL para AMB e ITC, respectivamente.

Figura 15 - Efeito dos compostos na atividade metabólica de biofilmes de *Sporothrix brasiliensis* na forma filamentososa.



**Legenda:** Atividade metabólica de biofilmes de *S. brasiliensis* expostos a diferentes concentrações dos compostos por 72 h. **A.** Atividade metabólica do biofilme exposto ao Geraniol isolado (GE) **B.** Atividade metabólica do biofilme exposto a Micropartículas de Quitosana isoladas (MQ). **C.** Atividade metabólica biofilme exposto a Micropartículas de Quitosana carregadas com Geraniol (MQGE). **D.** Atividade metabólica do biofilme exposto a anfotericina B (AMB) **E.** Atividade metabólica do biofilme exposto ao itraconazol (ITC). As barras pretas correspondem ao biofilme não tratado (controle). As barras cinzas correspondem aos biofilmes tratados com GE, MQ, MQGE, AMB e ITC. Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão. \*Diferença significativa em comparação com o controle ( $p < 0,05$ ).

### 6.3 Interação entre MQGE e antifúngicos em células planctônicas

Os valores de CIM dos antifúngicos AMB e ITC isolados ou combinados com MQGE, bem como o ICIF obtido para as formas filamentosas de *S. brasiliensis*, são mostrados na Tabela 3. Nestas combinações nenhuma interação de antagonismo foi observada, sendo todas classificadas como indiferentes.

Tabela 3 - Concentração inibitória mínima e índice de concentração inibitória fracionária de MQGE em combinação com antifúngicos, contra células planctônicas de *Sporothrix brasiliensis*, na forma filamentosa.

Cepa fúngica (código ONEHMIC)	CIM <sub>100</sub> isolada (µg/mL)			CIM <sub>100</sub> combinada (µg/mL)		Interpretação ICIF	
	AMB	ITC	MQGE	MQGE/AMB	MQGE/ITC	MQGE/AMB	MQGE/ITC
ONEHMIC 05-3-031	8	2	128	128/4	128/1	IND	IND
ONEHMIC 05-3-064	4	4	256	256/4	256/2	IND	IND
ONEHMIC 05-3-069	4	1	128	128/4	128/0,5	IND	IND

**Legenda:** ONEHMIC Lab: *One Health Microbiology Laboratory*. AMB: Anfotericina B. ITC: Itraconazol. MQGE: Micropartículas de quitosana carregadas com geraniol. CIM: Concentração inibitória mínima. ICIF: Índice da concentração inibitória fracionada, em que a interação é classificada como sinérgica (SIN;  $ICIF \leq 0,5$ ), indiferente (IND;  $0,5 < ICIF \leq 4$ ) ou antagônica (ANT;  $ICIF > 4$ ).

#### 6.4 Interação entre MQGE e antifúngicos em biofilmes em formação

As interações farmacológicas entre MQGE e os antifúngicos AMB e ITC também foram investigadas contra biofilmes em formação de *S. brasiliensis*. Os valores de CIMB<sub>50</sub> para os antifúngicos isolados ou combinados com MQGE, bem como o ICIF obtido para a combinação contra os biofilmes são mostrados na Tabela 4. Da mesma forma, as combinações de MQGE com AMB e ITC não apresentaram interações antagônicas, sendo classificadas como indiferentes para todas as cepas testadas.

Tabela 4 Concentração inibitória mínima e índice de concentração inibitória fracionária de MQGE em combinação com antifúngicos, contra biofilmes em formação de *Sporothrix brasiliensis*, na forma filamentosa.

Cepa fúngica (código ONEHMIC)	CIMB <sub>50</sub> isolada (µg/mL)			CIMB <sub>50</sub> combinada (µg/mL)		Interpretação ICIF	
	AMB	ITC	MQGE	MQGE/AMB	MQGE/ITC	MQGE/AMB	MQGE/ITC
ONEHMIC 05-3-031	1	0,125	4	2/1	2/0,0312	IND	IND
ONEHMIC 05-3-064	1	0,0312	4	2/1	1/0,008	IND	IND
ONEHMIC 05-3-069	1	0,0625	2	1/0,5	1/0,0312	IND	IND

**Legenda:** ONEHMIC Lab: *One Health Microbiology Laboratory*. AMB: Anfotericina B. ITC: Itraconazol. MQGE: Micropartículas de quitosana carregadas com geraniol. CIMB: Concentração inibitória mínima em biofilme. ICIF: Índice da concentração inibitória fracionada, em que a interação é classificada como sinérgica (SIN;  $ICIF \leq 0,5$ ), indiferente (IND;  $0,5 < ICIF \leq 4$ ) ou antagônica (ANT;  $ICIF > 4$ ).

## 7. DISCUSSÃO

Até o momento, não foram encontrados na literatura estudos que avaliem a atividade do GE, isolado ou encapsulado, contra fungos dimórficos. Portanto, este trabalho representa a primeira investigação experimental com essa abordagem frente a *S. brasiliensis*. Em suma, os resultados obtidos neste estudo demonstram o potencial do GE como agente antifúngico frente a *S. brasiliensis*, especialmente quando encapsulado em micropartículas de quitosana. Os achados aqui apresentados contribuem para o avanço do conhecimento sobre novas estratégias terapêuticas para a esporotricose e podem orientar pesquisas futuras.

O GE isolado apresentou atividade antifúngica frente à forma filamentosa planctônica de *S. brasiliensis*, com valores de CIM variando entre 4 e 16 µg/mL. Estudos anteriores já relataram a inibição de outros patógenos fúngicos pelo GE, com resultados semelhantes aos observados neste estudo, como em *C. albicans* com CIM de 16 a 32 µg/mL (Leite *et al.*, 2015) e *T. rubrum* com CIM de 16 a 256 µg/mL (Pereira *et al.*, 2014). Os resultados obtidos para anfotericina B e itraconazol estão na mesma faixa de concentrações descrita por outras pesquisas (Brilhante *et al.*, 2018, Garcia *et al.*, 2020).

Apesar do potencial antifúngico do GE, sua aplicação direta é limitada por baixa solubilidade, alta volatilidade e instabilidade frente à luz e ao oxigênio, o que compromete sua biodisponibilidade (Chen; Viljoen, 2022). Considerando essas limitações, este estudo avaliou a atividade antifúngica do GE encapsulado em micropartículas de quitosana frente a células planctônicas e biofilmes em formação de *S. brasiliensis*, e suas interações com as drogas antifúngicas utilizadas no tratamento da esporotricose.

A quitosana é um polissacarídeo natural catiônico que devido às suas propriedades benéficas, incluindo biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa toxicidade tem sido amplamente utilizada como matriz para o encapsulamento de diversos compostos bioativos (Baharlouei; Rahman, 2022; Alemu; Getachew; Mondal, 2023). Estudos prévios demonstraram que a incorporação de óleos essenciais em micropartículas de quitosana melhorou a estabilidade desses compostos e potencializou sua eficácia, *in vitro*, frente biofilmes de fungos patogênicos (Garcia *et al.*, 2021; Costa *et al.*, 2025). Além disso, a ação antifúngica, *in vitro*, da quitosana de diferentes pesos moleculares já foi investigada contra cepas filamentosas de *S. brasiliensis* (Garcia *et al.*, 2020).

Neste estudo, observou-se que as MQGE apresentaram maior atividade antifúngica frente à forma planctônica de *S. brasiliensis* do que o GE isolado, com valores de CIM variando entre 2 e 8 µg/mL. Esses resultados sugerem que o encapsulamento contribuiu para

potencializar a ação do composto, possivelmente ao favorecer sua estabilidade e biodisponibilidade. Achados semelhantes foram relatados em estudos que demonstraram o aumento da eficácia antifúngica e antibacteriana do GE após sua incorporação em sistemas de liberação controlada (Pontes *et al.*, 2023; Celebioglu *et al.*, 2025).

Já as MQ apresentaram valores de CIM menores (1 e 2 µg/mL) que MQGE frente à forma planctônica de *S. brasiliensis*. Esse resultado difere dos achados por Garcia *et al.* (2021, 2023), nos quais micropartículas de quitosana carregadas com óleos essenciais apresentaram maior eficácia, *in vitro*, do que aquelas sem o composto. Embora não haja uma explicação clara para esse resultado, a diferença em relação aos estudos supracitados pode estar relacionada às características específicas da molécula encapsulada.

Detsi *et al.* (2020) relatam que a natureza do composto encapsulado pode influenciar propriedades físico-químicas das partículas, como tamanho, potencial zeta e estabilidade. Assim, é possível hipotetizar que as MQ vazias interajam mais rapidamente com a parede celular das células planctônicas, enquanto a incorporação do GE promove modificações na formulação que resultam em uma ação menos imediata frente a forma planctônica.

A exposição dos biofilmes em formação às MQGE resultou em uma redução de 80% na atividade metabólica na concentração de 32 µg/mL, valor expressivamente superior ao observado para o GE isolado, que reduziu apenas 25% da atividade metabólica na maior concentração testada (64 µg/mL). Esse ganho de eficácia pode estar relacionado à proteção conferida pelo sistema de encapsulamento, que reduz a degradação do GE e permite uma liberação mais prolongada e eficaz do composto (Oliveira *et al.*, 2018). Os resultados obtidos se assemelham aos observados em *C. albicans* (Garcia *et al.*, 2021) e *H. capsulatum* (Costa *et al.*, 2025), sugerindo que a encapsulação do GE pode favorecer sua atividade antifúngica frente a biofilmes de *S. brasiliensis*.

Diante dos biofilmes, as MQGE também apresentaram melhor desempenho do que as MQ, que reduziram cerca de 49% da atividade metabólica nas mesmas condições. Esse resultado sugere que a presença do GE contribuiu para intensificar o efeito antifúngico frente aos biofilmes, possivelmente por meio de um efeito sinérgico entre os dois componentes. Detsi *et al.* (2020) destacam que, no contexto de nanossistemas, a carga positiva da quitosana favorece sua adesão à matriz extracelular dos biofilmes, que tem carga negativa. Essa interação pode melhorar a liberação do composto encapsulado e facilitar seu acesso às células fúngicas.

Considerando esses mecanismos, é plausível que a maior eficácia das MQGE, em comparação às MQ, esteja relacionada à atuação combinada da quitosana com o GE encapsulado. Achados semelhantes foram observados por Garcia *et al.* (2023), que relataram

maior inibição de biofilmes de *C. albicans* em formulações contendo óleos essenciais encapsulados em micropartículas de quitosana, quando comparadas a micropartículas sem o composto.

Quando combinada com os antifúngicos MQGE apresentou indiferença em todas as combinações, sem evidência de antagonismo. Achados semelhantes foram descritos por Costa *et al.* (2025), que relataram interações indiferentes entre micropartículas de quitosana contendo óleos essenciais e os mesmos antifúngicos frente a *H. capsulatum* na forma planctônica filamentosa.

Considerando que o mecanismo de ação das MQGE frente a *S. brasiliensis* ainda não estejam elucidados, é difícil explicar o resultado observado. No entanto, estudos prévios já demonstraram que seus componentes podem atuar sobre alvos celulares semelhantes aos dos antifúngicos clássicos, como a membrana plasmática, mas por mecanismos distintos (Garcia *et al.*, 2020; Lira *et al.*, 2020), isso poderia explicar, pelo menos em parte, por que a combinação da MQGE os antifúngicos não gerou resultados antagônicos, mas sim resultados indiferentes.

Neste estudo os testes foram realizados apenas com a forma filamentosa de *S. brasiliensis*. Como fungo dimórfico, essa espécie ocorre na natureza na forma filamentosa, e, ao infectar o hospedeiro, a elevação da temperatura induz sua transição para a forma leveduriforme. Estudos anteriores mostraram que as duas morfologias de *Sporothrix spp.* apresentam diferenças na composição da parede celular, como nas quantidades de glucosamina e  $\beta$ -1,3-glucana, o que pode influenciar tanto a interação com o sistema imunológico quanto a resposta aos antifúngicos (Martínez-Álvarez *et al.*, 2017).

Esse padrão também foi observado em pesquisas com *H. capsulatum*, outro fungo dimórfico, nas quais as CIMs para a forma leveduriforme foram geralmente mais baixas do que para a forma filamentosa (Brilhante *et al.*, 2023; Costa *et al.*, 2025). Assim, torna-se necessário investigar a atividade da MQGE frente à forma leveduriforme de *S. brasiliensis*, considerando que as diferenças estruturais da parede celular entre as duas formas podem impactar na sua suscetibilidade.



## 8. CONCLUSÕES

- O geraniol isolado demonstra atividade antifúngica contra células planctônicas e biofilmes em formação de *S. brasiliensis*, na forma filamentosa;
- O geraniol encapsulado em micropartículas de quitosana apresenta melhor atividade antifúngica quando comparado ao composto isolado contra células planctônicas e biofilmes de *S. brasiliensis*, na forma filamentosa;
- O geraniol encapsulado em micropartículas de quitosana não exibe antagonismo com anfotericina B e itraconazol, em relação às células planctônicas e biofilmes de *S. brasiliensis*, na forma filamentosa.

## REFERÊNCIAS

- AGUIAR, B. A. et al. First case report of feline sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis* in the state of Ceará - Brazil. **Medical Mycology Case Reports**, v. 40, p. 12-15, 2023.
- ALEMU, G.; GETACHEW, E.; MONDAL, A. K. Study on the Physicochemical Properties of Chitosan and their Applications in the Biomedical Sector. **International Journal of Polymer Science**, v. 2023, p. 1-13, 2023.
- ALVES, M. M. et al. Fatal pulmonary sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis* in Northeast Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 5, p. 1-11, 2020.
- ALVES, E. et al. Scanning Electron Microscopy for Fungal Sample Examination. **Laboratory Protocols in Fungal Biology**. London: Springer, 2013.
- ALMEIDA-PAES, R. et al. Biosynthesis and functions of a melanoid pigment produced by species of the *Sporothrix* complex. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 24, p. 8623-8630, 2012.
- ALMEIDA-PAES, R. et al. Phenotypic Characteristics Associated with Virulence of Clinical Isolates from the *Sporothrix* Complex. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1-10, 2015.
- ALMEIDA-PAES, R. et al. Melanins protect *Sporothrix brasiliensis* and *Sporothrix schenckii* from the antifungal effects of terbinafine. **PLOS ONE**, v.11, n. 3, p. 1-13, 2016.
- ALMEIDA-PAES, R. et al. Refractory sporotrichosis due to *Sporothrix brasiliensis* in humans appears to be unrelated to *in vivo* resistance. **Medical Mycology**, v. 55, n. 5, p. 507-517, 2017a.
- ALMEIDA-PAES, R. et al. Minimal inhibitory concentration distributions and epidemiological cutoff values of five antifungal agents against *Sporothrix brasiliensis*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 5, p. 376-381, 2017b.
- ARENAS, R. et al. Sporotrichosis: From KOH to Molecular Biology. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 62, p. 1-10, 2018.
- BAHARLOUEI, P.; RAHMAN, A. Chitin and Chitosan: Prospective Biomedical Applications in Drug Delivery, Cancer Treatment, and Wound Healing. **Marine Drugs**, v. 20, p. 1-13, 2022.

BARNACLE, J. R. et al. The first three reported cases of *Sporothrix brasiliensis* cat-transmitted sporotrichosis outside South America. **Medical Mycology Case Reports**, v. 39, p. 14-17, 2023.

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

BENTO, A. O. et al. The spread of cat-transmitted sporotrichosis due to *Sporothrix brasiliensis* in Brazil towards the Northeast region. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 8, p. 1-20, 2021.

BERMAN, J.; KRYSAN, D. J. Drug resistance and tolerance in fungi. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, p. 319-331, 2020.

BONIFAZ, A.; VÁZQUEZ-GONZÁLEZ, D. Diagnosis and Treatment of Lymphocutaneous Sporotrichosis: What Are the Options?. **Current Fungal Infection Reports**, v. 7, p. 252-259, 2013.

BONIFAZ, A. et al. Sporotrichosis: The-State-of-The-Art. **Medical Mycology: Current Trends and Future Prospects**, v. 9, p. 234-253, 2015.

BRASIL. Portaria GM/MS Nº 6.734, de 18 de março de 2025. Dispõe sobre a inclusão da esporotricose humana na Lista Nacional de Notificação Compulsória de Doenças, Agravos e Eventos de Saúde Pública nos serviços de saúde públicos e privados em todo o território nacional. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 18 mar. 2025.

BRILHANTE, R. S. N. et al. Antifungal susceptibility of *Sporothrix schenckii* complex biofilms. **Medical Mycology**, v. 56, n. 3, p. 297-306, 2018.

BRILHANTE, R. S. N. et al. Potassium iodide and miltefosine inhibit biofilms of *Sporothrix schenckii* species complex in yeast and filamentous forms. **Medical mycology**, v. 57, n. 6, p. 764-772, 2019.

BRILHANTE, R. S. N. et al. Biofilm formation on cat claws by *Sporothrix* species: An *ex vivo* model. **Microbial Pathogenesis**, v. 150, p. 1-4, 2021.

BRILHANTE, R. S. N. et al. Inhibitory effect of proteinase K against dermatophyte biofilms: an alternative for increasing the antifungal effects of terbinafine and griseofulvin. **Biofouling**, v. 22, n. 3, p. 286-297, 2022.

BRILHANTE, R. S. N. et al. Antifungal activity of chitosan against *Histoplasma capsulatum* in planktonic and biofilm forms: a therapeutic strategy in the future. **Journal of Fungi**, v. 9, p. 1-12, 2023.

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

CAROLUS, H. et al. Amphotericin B and Other Polyenes – Discovery, Clinical Use, Mode of Action and Drug Resistance. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 321, 2020.

CHAKRABARTI, A. et al. Global epidemiology of sporotrichosis. **Medical Mycology**, v. 53, p. 3-14, 2015.

CELEBIOGLU, A. et al. Encapsulation of Essential Oil-Cyclodextrin Inclusion Complexes in Electrospun Pullulan Nanofibers: Enhanced Storage Stability and Antibacterial Property for Geraniol and Linalool. **Food and Bioprocess Technology**, v. 18, p. 1296-1310, 2025.

CHEN, W.; VILJOEN, A. M. Geraniol – A review update. **South African Journal of Botany**, v. 150, p. 1205-1219, 2022.

CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; **Approved Standard – 3rd edn**. CLSI document M38ed3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017.

COLE, S. P. C. Rapid chemosensitivity testing of human lung tumor cells using the MTT assay. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 17, p. 259-263, 1986.

COSTA, A. C. et al. In vitro study of essential oils encapsulated in chitosan microparticles against *Histoplasma capsulatum* and their pathogenicity in *Caenorhabditis elegans*. **Biofouling**, v. 41, n. 2, p. 181-196, 2025.

COSTA-ORLANDI, C. B. et al. Fungal Biofilms and Polymicrobial Diseases. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 22, p. 1-24, 2017.

DAMASCENO, L. S. et al. Esporotricose: Uma micose em expansão no Ceará. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 27, p. 247-48, 2023.

DE BEER, Z. W.; DUONG, T. A.; WINGFIELD, M. J. The divorce of *Sporothrix* and *Ophiostoma*: solution to a problematic relationship. **Studies in Mycology**, v. 83, p. 165-191, 2016.

DELLA TERRA, P. P. et al. Development and evaluation of a multiplex qPCR assay for rapid diagnostics of emerging sporotrichosis. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 69, p. 704-716, 2021.

DETISI, A. et al. Nanosystems for the Encapsulation of Natural Products: The Case of Chitosan Biopolymer as a Matrix. **Pharmaceutics**, v. 12, p. 1-48, 2020.

DIXON, D. M. et al. Isolation and Characterization of *Sporothrix schenckii* from Clinical and Environmental Sources Associated with the Largest U.S. Epidemic of Sporotrichosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, p. 1106-1113, 1991.

ETCHECOPAZ, A. et al. *Sporothrix brasiliensis*: A Review of an Emerging South American Fungal Pathogen, Its Related Disease, Presentation and Spread in Argentina. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 170, p. 1-32, 2021.

FENG, X. et al. Preparation and characterization of geraniol nanoemulsions and its antibacterial activity. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 1-13, 2022.

FUKUSHIRO, R. Epidemiology and Ecology of Sporotrichosis in Japan. **Zbl. Bakt. Hyg**, v. 257, p. 228-233, 1984.

GARCIA, L. G. S. et al. Antifungal activity of different molecular weight chitosans against planktonic cells and biofilm of *Sporothrix brasiliensis*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 143, p. 341-348, 2020.

GARCIA, L. G. S. et al. Essential oils encapsulated in chitosan microparticles against *Candida albicans* biofilms. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 166, p. 621-632, 2021.

GARCIA, L. G. S. et al. Chitosan microparticles loaded with essential oils inhibit duo-biofilms of *Candida albicans* and *Streptococcus mutans*. **Journal of Applied Oral Science**, v. 31, p. 1-11, 2023.

GARCÍA-CARNERO, L. C.; MARTINEZ-ÁLVAREZ, J. A. Virulence Factors of *Sporothrix schenckii*. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 318, p. 1-12, 2022.

GONÇALVES, N. V. et al. Occurrence of sporotrichosis in Belém, Pará, Brazil: a metaphor for unsustainable socioeconomic development. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 28, n. 5, p.1-8, 2024.

GREMIÃO, I. D. F. et al. Zoonotic Epidemic of Sporotrichosis: Cat to Human Transmission. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 1, p. 1-7, 2017.

GREMIÃO, I. D. F. et al. Geographic Expansion of Sporotrichosis, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 26, n. 3, p. 621-624, 2020.

GREMIÃO, I. D. F. et al. Guideline for the management of feline sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis* and literature revision. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, p. 107-124, 2021.

HARDING, M.W et al. Can filamentous fungi form biofilms?. **Trends in Microbiology**, v. 17, n. 11, p. 475-480, 2009.

HEKTOEN, L.; PERKINS, C. F. Refractory subcutaneous abscesses caused by *Sporothrix schenckii*. A new pathogenic fungus. **Journal of Experimental Medicine**, v. 5, n. 1, p. 77-89, 1900.

ILK, S.; SAGLAM, N.; ÖZGEN, M. Kaempferol loaded lecithin/chitosan nanoparticles: preparation, characterization, and their potential applications as a sustainable antifungal agent. Artificial Cells, **Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 45, n. 5, p. 907–916, 2017.

KAMILOGLU, S. et al. Guidelines for cell viability assays. **Food Frontiers**, v.1, p. 332–349, 2020.

KIDD, S. E. et al. *Sporothrix davidellisii*: A new pathogenic species belonging to the *Sporothrix pallida* complex. **Medical Mycology**, v. 63, p. 1-14, 2025.

LEI, Y. et al. Pharmacological Properties of Geraniol – A Review. **Planta Medica**, v. 85, p. 48-55, 2019.

LEITE, M. C. Alvino et al. Investigating the antifungal activity and mechanism(s) of geraniol against *Candida albicans* strains. **Medical Mycology**, v. 53, p. 275-284, 2015.

LIRA, M. H. P. et al. Antimicrobial activity of geraniol: an integrative review. **Journal of Essential Oil Research**, v. 32, p. 1-11, 2020.

LÓPEZ-ROMERO, E. et al. *Sporothrix schenckii* complex and sporotrichosis: an emerging health problem. **Future Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 85-102, 2011.

LUTZ, A.; SPLENDORE, A. Sobre uma micose observada em homens e ratos: contribuicao para o conhecimento das assim chamadas esporotricoses. **Revista Médica de São Paulo**, v. 1, n. 3 p. 429-464, 1907.

MACHADO, T. C. et al. Insights from Cutting-edge Diagnostics and Epidemiology of Sporotrichosis and Taxonomic Shifts in *Sporothrix*. **Current Fungal Infection Reports**, v. 19, n. 3, p. 1-23, 2025.

MAHAJAN, V. K. Sporotrichosis: An Overview and Therapeutic Options. **Dermatology Research and Practice**, v. 2014, p. 1-13, 2014.

MARIMON, R. et al. *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.

MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, J.A. et al. *Sporothrix Schenckii Ssensu Stricto* and *Sporothrix Brasiliensis* Are Differentially Recognized by Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1-15, 2017.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

ODDS, F. C. Synergy, antagonism, and what the chequerboard puts between them. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 1, 2003.

OLIVEIRA, P. R. F. de et al. Emerging Cases of Cat-Transmitted Sporotrichosis Driven by *Sporothrix brasiliensis* in Northeast Brazil. **Mycopathologia**, v. 189, n. 66, p. 1-14, 2024.

OLIVEIRA, J. L. de et al. Geraniol Encapsulated in Chitosan/Gum Arabic Nanoparticles: A Promising System for Pest Management in Sustainable Agriculture. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, p. 5325–5334, 2018.

OROFINO-COSTA, Rosane et al. Sporotrichosis: an update on epidemiology, etiopathogenesis, laboratory and clinical therapeutic. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 92, n. 5, p. 606-620, 2017.

OROFINO-COSTA, R. et al. Human sporotrichosis: recommendations from the Brazilian Society of Dermatology for the clinical, diagnostic and therapeutic management. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 97, n. 6, p. 757-770, 2022.

PAGE, C. G.; FROTHINGHAM, L.; PAIGE, J. B. *Sporothrix* and epizootic lymphangitis. **Journal of Medical Research**, v. 23, n. 6, p. 137-150, 1910.

PEREIRA, F. O. et al. Antifungal activity of geraniol and citronellol, two monoterpenes alcohols, against *Trichophyton rubrum* involves inhibition of ergosterol biosynthesis. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, n. 2, p. 228-234, 2015.

PIERCE, C. et al. A Simple and Reproducible 96-Well Plate-Based Method for the Formation of Fungal Biofilms and Its Application to Antifungal Susceptibility Testing. **Nature Protocols**, v. 9, n. 3, p. 1494-500, 2008.

POESTER, V. R. et al. Treatment of Human Sporotrichosis Caused by *Sporothrix brasiliensis*. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 70, p. 1-7, 2022.

PONTES, C. S. et al. Improving Drug Delivery on *Candida Albicans* Using Geraniol Nanoemulsion. **Pharmaceutics**, v. 15, p. 1-19, 2023.

QUEIROZ-TELLES, F.; BUCCHERI, R.; BERNARD, G. Sporotrichosis In Immunocompromised Hosts. **Journal of Fungi**, v. 5, n. 8, p. 1-23, 2019.

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

RODRIGUES, A. M.; DE HOOG, G. S.; DE CAMARGO, Z. P. Genotyping species of the *Sporothrix schenckii* complex by PCR-RFLP of calmodulin. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 78, n. 4, p. 383–387, 2013b.

RODRIGUES, A. M. et al. *Sporothrix chilensis* sp. nov. (Ascomycota: Ophiostomatales): a soil-borne agente of human sporotrichosis with mild-pathogenic potencial to mammals. **Fungal Biology**, v. 120, n. 2, p. 246-264, 2016.

RODRIGUES, A. M. et al. The threat of emerging and re-emerging pathogenic *Sporothrix* species. **Mycopathologia**, v. 185, p. 813-842, 2020.

RODRIGUES, A. M. et al. Current Progress on Epidemiology, Diagnosis, and Treatment of Sporotrichosis and Their Future Trends. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 776, p. 1-32, 2022.

RODRIGUES, A. M.; HAGEN, F.; DE CAMARGO, Z. P. A Spotlight on *Sporothrix* and Sporotrichosis. **Mycopathologia**, v. 187, p. 407-411, 2022.

ROSSOW, J. A. et al. A One Health Approach to Combatting *Sporothrix brasiliensis*: Narrative Review of an Emerging Zoonotic Fungal Pathogen in South America. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 247, p. 1-26, 2020.

SALAZAR, L. G. S. et al. Síndrome verrugoso: diagnóstico diferencial. **Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica**, v. 21, n. 2, p. 173-186, 2023.

SARDI, J. C. O. et al. Highlights in pathogenic fungal biofilms. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 31, n. 1, p. 22-29, 2014.

SÁNCHEZ-HERRERA, R. et al. Formación de biopelículas en el hongo patógeno *Sporothrix schenckii*: desarrollo, arquitectura y características bioquímicas. **Acta Universitaria**, v. 24, p. 11-15, 2014.

SÁNCHEZ-HERRERA, R. et al. Analysis of biofilm formation by *Sporothrix schenckii*. **Medical Mycology**, v. 59, p. 31-40, 2021.

SCHECHTMAN, R. C. et al. Esporotricose: hiperendêmica por transmissão zoonótica, com apresentações atípicas, reações de hipersensibilidade e maior gravidade. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 97, n. 1, p. 1-13, 2022.

SCHENCK, B. R. On Refractory Subcutaneous Abscesses caused by a Fungus possibly related to the *Sporotricha*. **John Hopkins Hospital Bulletin**, v. 9, n. 93, p. 286–290, 1898.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos. 1.ed. Rio de Janeiro, **Guanabara Koogan**, 2004.

SHARMA, B.; SHARMA, A. K.; SHARMA, U. Sporotrichosis: A Comprehensive Review on Recent Drug-Based Therapeutics and Management. **Current Dermatology Reports**, v. 11, p. 110-119, 2022.

SILVA-BAILÃO, M. G. et al. Comparative proteomics in the three major human pathogenic species of the genus *Sporothrix*. **Microbes and Infection**, v. 23, p. 1-9, 2021.



SILVA, M. L. Q. Efeito inibitório, *in vitro*, do iodeto de potássio e da miltefosina frente a cepas do complexo *sporothrix schenckii* em biofilme nas formas filamentosa e leveduriforme. **Dissertação (Mestrado em Microbiologia Médica)** – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

SILVA-RODRIGUES, G. et al. Geraniol Potentiates the Effect of Fluconazole against Planktonic and Sessile Cells of Azole-Resistant *Candida tropicalis*: In Vitro and In Vivo Analyses. **Pharmaceutics**. v. 16, p. 1-25, 2024.

SIMITSOPOULOU, M.; CHATZIMOSCHOU, A.; ROILIDES, E. Biofilms and Antifungal Susceptibility Testing. In: ***Candida Species: Methods and Protocols***. New York: Springer, 2016. p. 183–197.

SINGULANI, J. L. et al. Geraniol and Linalool Anticandidal Activity, Genotoxic Potential and Embryotoxic Effect on Zebrafish. **Future Microbiology**. v. 13, p. 1637-1646, 2018.

TANG, X. et al. Antifungal Activity of Essential Oil Compounds (Geraniol and Citral) and Inhibitory Mechanisms on Grain Pathogens (*Aspergillus flavus* and *Aspergillus ochraceus*). **Molecules**, v. 23, n. 2108, p. 1-18, 2018.

VALDEZ, A. F. et al. A Review on Sporotrichosis and the Emergence of *Sporothrix brasiliensis* as a Pathogen. **Current Tropical Medicine Reports**, v. 10, p. 252-261, 2023.

VILA, T. V. M.; ROZENTAL, S. Biofilm Formation as a Pathogenicity Factor of Medically Important Fungi. **Fungal Pathogenicity**, In: InTechOpen, p., 1-24, 2016.

VILLALOBOS-DUNO, H. L. et al. Comparison of Cell Wall Polysaccharide Composition and Structure Between Strains of *Sporothrix schenckii* and *Sporothrix brasiliensis*. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 1-12, 2021.

WALLER, S. B. et al. Antifungal resistance on *Sporothrix* species: an overview. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, p. 73-80, 2021.

XAVIER, M. O. et al. *Sporothrix brasiliensis*: Epidemiology, Therapy, and Recent Developments. **Journal of Fungi**, v. 9, n. 921, p. 1-18, 2023.

ZHANG, M. et al. Fast diagnosis of sporotrichosis caused by *Sporothrix globosa*, *Sporothrix schenckii* and *Sporothrix brasiliensis* based on multiplex real-time PCR. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 2, p. 1-11, 2019.