



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E**  
**SINTÉTICOS BIOATIVOS**

**LARISSA ALVES DA SILVA**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE CEPAS CLÍNICAS DE *Sporothrix*  
spp ISOLADAS DA PARAÍBA E POTENCIAL ANTIFÚNGICO DO (-) – MIRTENOL  
COMO ALTERNATIVA TERAPÊUTICA**

**JOÃO PESSOA - PB**

**2024**

**LARISSA ALVES DA SILVA**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE CEPAS CLÍNICAS DE *Sporothix spp*  
ISOLADAS DA PARAÍBA E POTENCIAL ANTIFÚNGICO DO (-) – MIRTENOL  
COMO ALTERNATIVA TERAPÊUTICA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento aos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Área de concentração: Farmacologia.

**ORIENTADOR:** Prof. Dr. Felipe Queiroga Sarmiento Guerra.

**COORIENTADORA:** Prof<sup>a</sup>. Dra. Ana Carolina Bernardes Dulgheroff.

**JOÃO PESSOA – PB**

**2024**

Emitido em 04/09/2024

ATA Nº 1/2024 - CCS - DCF (11.01.16.07)  
(Nº do Documento: 1)

(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 04/09/2024 17:56 )  
FELIPE QUEIROGA SARMENTO GUERRA  
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR  
1335891

(Assinado digitalmente em 04/09/2024 20:03 )  
ULRICH VASCONCELOS DA ROCHA GOMES  
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR  
2009494

(Assinado digitalmente em 05/09/2024 09:32 )  
ANA CAROLINA BERNARDES DULGHEROFF  
PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO  
1143714

(Assinado digitalmente em 05/09/2024 07:21 )  
ELOIZA HELENA CAMPANA  
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR  
3042848

Documento assinado digitalmente  
 LARISSA ALVES DA SILVA  
Data: 05/09/2024 10:26:49-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ufpb.br/documentos/> informando seu número: 1, ano: 2024, documento (espécie): ATA, data de emissão: 04/09/2024 e o código de verificação: a974a437eb

**Catálogo na publicação**  
**Seção de Catalogação e Classificação**

S586c Silva, Larissa Alves da.

Caracterização molecular de cepas clínicas de *Sporothrix* spp isoladas da Paraíba e potencial antifúngico do (-) - mirtenol como alternativa terapêutica / Larissa Alves da Silva. - João Pessoa, 2024.

100 f. : il.

Orientação: Felipe Queiroga Sarmiento Guerra.

Coorientação: Ana Carolina Bernardes Dulgheroff.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Farmacologia. 2. Esporotricose - Paraíba. 3. Caracterização molecular. 4. Identificação das espécies. 5. Monoterpeno. 6. Fitoconstituente. 7. Atividade antimicrobiana. I. Guerra, Felipe Queiroga Sarmiento. II. Dulgheroff, Ana Carolina Bernardes. III. Título.

Elaborado por Larissa Silva Oliveira de Mesquita - CRB-15/746

*A minha filha Cecília. Dedico.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus pelo seu infinito amor, por se fazer presente em todos os momentos da minha vida e por segurar minha mão durante toda essa trajetória, me fortalecendo diante dos obstáculos.

À Cecília, minha filha, por ser minha fonte de força e inspiração diária, e por ser o maior presente de Deus na minha vida.

Aos meus pais, por sempre estarem ao meu lado incentivando, ajudando e torcendo por mim. Sou extremamente grata aos sacrifícios que fizeram em prol da minha educação, na sua forma humilde e simples de serem, que proporcionaram o melhor que poderiam oferecer. Aos meus irmãos, pelo o apoio e cuidado com Cecília. Agradeço a toda minha família e amigos que se fizeram presentes na minha vida.

Ao Professor Felipe Queiroga Sarmiento Guerra, que desde a iniciação científica, no terceiro período da graduação, continua sendo meio orientador. Agradeço pela paciência, dedicação e por todos os ensinamentos que transcenderam os conhecimentos científicos, que foram fundamentais para meu crescimento acadêmico e pessoal.

À Professora Ana Carolina Bernardes Dulgheroff, minha coorientadora, sempre disponível e com importantes contribuições na construção do artigo.

À minha banca examinadora, professores Eloisa Campana e Ulrich Vasconcelos, por terem dedicado seu tempo e delicadeza para avaliar meu trabalho. Ao professor José Maria Barbosa Filho por gentilmente ceder a substância teste para a realização deste trabalho.

Agradeço ao professor Anderson Rodrigues e sua aluna Jamile Ambrósio pela parceria, por todo apoio nos experimentos e pela prontidão no esclarecimento de dúvidas. Agradeço a Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), através do Laboratório de Patógenos Fúngicos Emergente, pelo apoio físico na realização dos experimentos moleculares.

Aos companheiros de laboratório Jaqueline Barreto, Rute Cavalcante, Alécia Alencar, Laísa Carvalho e Lara Danubia, pela parceria e apoio de sempre. Em especial a minha dupla do laboratório, Luanna de Oliveira pelo apoio experimental e espiritual, sempre disposta a ouvir e ajudar nos momentos que mais precisei.

Aos meus amigos da graduação e mestrado, em especial a Heivila Monique, pelo apoio incondicional e por estar sempre disposta a ajudar. Sem ela essa jornada seria árdua.

À Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, em nome de seus servidores e professores, que contribuíram arduamente para meu crescimento na ciência e pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro e técnico; à Universidade Federal da Paraíba e ao Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos pelo apoio físico e institucional.

Agradeço.

## RESUMO

A esporotricose é uma micose subcutânea, de curso subagudo ou crônico, capaz de acometer tanto os humanos como os animais. Essa infecção é causada pelo fungo pertencente ao gênero *Sporothrix*, de distribuição geográfica cosmopolita. Segundo o boletim epidemiológico da secretaria de saúde do estado da Paraíba, o número de casos notificados da doença foi crescente nos últimos anos, logo faz-se necessário compreender a distribuição populacional das espécies isoladas no estado. Além disso, o aumento de resistência antifúngica, custo do tratamento com antifúngicos atuais e seu limitado arsenal disponíveis, tem impulsionado a busca por novas substâncias com atividade antifúngica, e as plantas medicinais e seus fitoconstituintes são amplamente investigadas. Em vista disso, o objetivo desse estudo foi analisar a diversidade genética, a distribuição do tipo acasalamento e avaliar a atividade antifúngica do (-) - mirtenol em isolados clínicos de esporotricose humana na Paraíba-Brasil. Para isso, um total de 36 culturas de *Sporothrix* spp., de casos confirmados de esporotricose, previamente isolados de pacientes atendidos no Hospital Universitário Lauro Wanderley foram utilizados e seus dados clínicos e demográficos coletados. Foi realizada a identificação das espécies utilizando a técnica de PCR espécie – específica com marcadores direcionados ao gene da calmodulina. O idiomorfo do tipo acasalamento das espécies foi identificado por PCR utilizando primers visando a *MAT1-1* e *MAT1-2* loci. AFLP foram utilizadas para genotipagem dos isolados. Para análise da atividade antifúngica do (-) – mirtenol frente as espécies ensaiadas foram realizadas a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM); Concentração Fungicida Mínima (CFM), a formação de biofilme e atuação desse monoterpene sobre o biofilme na fase de adesão e maduro, além de avaliar a citotoxicidade do (-) – mirtenol em células de queratinócitos humano (HaCaT). Como resultado, a distribuição da doença identificou que os casos ocorreram na capital de João Pessoa e região metropolitana. Entre os 36 isolados de *Sporothrix*, 75% acometeram o sexo feminino, com ocorrência de 69% na forma linfocutânea, e 98% da transmissão foi pela via zoonótica. Todos isolados foram identificados pelos métodos moleculares como *S. brasiliensis* e detectado a presença de um único idiomorfo sexual, MAT1-2, provável que esta espécie seja originária do genótipo de espécies do Rio de Janeiro. Os resultados do AFLP indicam a possibilidade de circulação de um ou dois grupos genéticos em João Pessoa e região metropolitana. O (-) - mirtenol apresentou forte atividade antifúngica sobre todas as cepas de *S. brasiliensis* testadas, com 84% das cepas testado com CIM em 128 µg/mL e CFM de 256 µg/mL, exibindo ação fungicida, reduziu significativamente a formação do biofilme e a sua ruptura. Na citotoxicidade, o monoterpene não reduziu a viabilidade celular de forma significativa na CIM (128 µg/mL). Diante dos resultados expostos, nossos dados caracterizaram geneticamente pela primeira vez isolados da Paraíba, observando uma baixa variação intragenotípica. Os achados desta pesquisa sugerem que (-) – mirtenol pode representar uma nova e promissora alternativa terapêutica no tratamento de infecções fúngicas causadas por *Sporothrix* spp.

Palavras chaves: Esporotricose, Molecular, Identificação, Monoterpene, Fitoconstituente, Atividade antimicrobiana.

## ABSTRACT

Sporotrichosis is a subcutaneous mycosis, with a subacute or current course, capable of affecting both humans and animals. This infection is caused by a fungus belonging to the genus *Sporothrix*, with a cosmopolitan geographic distribution. According to the epidemiological bulletin from the health department of the state of Paraíba, the number of reported cases of the disease has increased in recent years, so it is necessary to investigate the population distribution of the isolated species in the state. Furthermore, the increase in antifungal resistance, the cost of treatment with current antifungals and their limited available arsenal, has driven the search for new substances with antifungal activity, and medicinal plants and their phytoconstituents have been widely investigated. In view of this, the objective of this study was to analyze the genetic diversity, the distribution of mating type and evaluate the antifungal activity of (-) - myrtenol in clinical isolates of human sporotrichosis in Paraíba-Brazil. For this, a total of 36 cultures of *Sporothrix* spp., from confirmed cases of sporotrichosis, previously isolated from patients treated at the Lauro Wanderley University Hospital were used and their clinical and demographic data were found. Species identification was carried out using the species-specific PCR technique with markers directed to the calmodulin gene. The *mating type* idiomorph of the species was identified by PCR using primers rotating at the MAT1-1 and MAT1-2 loci. AFLP were used for genotyping the isolates. To analyze the antifungal activity of (-) - myrtenol against the species tested, the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was determined; Minimum Fungicide Concentration (CFM), the formation of biofilm and the action of this monoterpene on the biofilm in the adhesion and mature phase, in addition to evaluating the cytotoxicity of (-) - myrtenol in human keratinocyte cells (HaCaT). As a result, the distribution of the disease shows that cases occurred in the capital of João Pessoa and the metropolitan region. Among the 36 *Sporothrix* isolates, 75% affected females, with 69% occurring in the lymphocutaneous form, and 98% of transmission was via the zoonotic route. All isolates were identified by molecular methods as *S. brasiliensis* and detected the presence of a single sexual idiomorph, MAT1-2, probably that this species originates from the genotypes of species from Rio de Janeiro. The AFLP results indicate the possibility of the circulation of one or two genetic groups in João Pessoa and the metropolitan region. (-) - myrtenol showed strong antifungal activity against all strains of *S. brasiliensis* tested, with 84% of the strains tested with MIC at 128 µg/mL and CFM at 256 µg/mL, exhibiting fungicidal action, it was also able to reduce significantly inhibit biofilm formation and inhibit mature biofilm. Regarding cytotoxicity, the monoterpene did not significantly reduce cell viability at MIC (128 µg/mL). Given the results presented, our data genetically characterized isolates from Paraíba for the first time, observing low intragenotypic variation. The findings of this research suggest that (-)-myrtenol represents a new and promising therapeutic alternative in the treatment of fungal infections caused by *Sporothrix* spp.

Keywords: Sporotrichosis, Molecular, Identification, Monoterpene, Phytoconstituent, Antimicrobial activity.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Análise filogenética dos principais membros de relevância médica no gênero <i>Sporothrix</i> .....	20
Figura 2- Morfologia de <i>Sporothrix</i> spp. ....	25
Figura 3- Estrutura química do monoterpene (-) - mirtenol.....	28

### 5.1. ARTIGO SUBMETIDO NA REVISTA MYCOSES

Figure 1 Geographic distribution and prevalence of <i>Sporothrix</i> species, between 2019 and 2020 in the city of João Pessoa-PB (n=36).....	51
Figure 2- Time between the onset of the first symptoms of sporotrichosis and the definitive diagnosis in study patients (n = 36). ....	53
Figure 3- Macro and micromorphology of the <i>Sporothrix brasiliensis</i> identified in the study cultivated on PDA at 25°C for 14 days. ....	54
Figure 4-The dendrogram depicts the cluster profile generated by the AFLP method .....	55
Figure 5-The dendrogram depicts the cluster profile generated by the AFLP method. ....	58
Figure 6-Minimum Spanning Tree (MST) derived from AFLP data .....	58
Figure 7– Principal component analysis (PCA) and multidimensional scaling (MDS) .....	60
Figure 8- Distribution of <i>Sporothrix</i> spp. Genotypes generated by AFLP using a Self-Organizing Map (SOM) .....	61

### 5.2. ARTIGO A SER SUBMETIDO NA CHEMISTRY & BIODIVERSITY

Figura 1- Efeito inibitório do (-) – mirtenol no biofilme de <i>S. brasiliensis</i> filamentoso, realizado na fase de adesão e no biofilme maduro .....	79
Figura 2-Viabilidade celular da linhagem de queratinócito humano (HaCaT) após 72 horas de tratamento com diferentes concentrações de (-)-Mirtenol .....	80



## LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1-Sequências de primers espécie-específicos que tem como alvo o gene calmodulina (CAL) dos membros do gênero <i>Sporothrix</i> .....	36
---	----

### 5.1. ARTIGO SUBMETIDO NA REVISTA MYCOSES

Table 1- Clinical and epidemiological characteristics of patients with sporotrichosis included in this study (n = 36) .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
---	-------------------------------------

Table 2- Polymorphic statistics calculated for the combinations #3EcoRI-GA/MseITT and #5 EcoRI-GA/MseIAG for <i>Sporothrix</i> spp.....	69
---	----

### 5.2. ARTIGO A SER SUBMETIDO NA CHEMISTRY & BIODIVERSITY

Tabela 1- Resultado da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) do monoterpeno (-) - mirtenol e do antifúngico itraconazol sobre cepas de <i>Sporothrix brasiliensis</i> .....	76
--	----

Tabela 2- Análise da produção de biofilme in vitro de <i>Sporothrix brasiliensis</i> .....	77
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

<b>CFM</b>	Concentração Fungicida Mínima
<b>CIM</b>	Concentração Inibitória Mínima
<b>CLSI</b>	Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais
<b>DCF</b>	Departamento de Ciências farmacêuticas
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>PCR</b>	Reação de Cadeia de Polimerase
<b>AFLP</b>	Polimorfismo de Comprimento de Fragmento Amplificado
<b>MAT</b>	Mating Type
<b>µg/mL</b>	Micrograma/mililitros
<b>UFC</b>	Unidade Formadora de Colônia
<b>UFPB</b>	Universidade Federal da Paraíba
<b>HULW</b>	Hospital Universitário Lauro Wanderley
<b>DMIP</b>	Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia
<b>LPFE</b>	Laboratório de Patógenos Fúngicos Emergentes
<b>EPM</b>	Escola Paulista de Medicina
<b>UNIFSP</b>	Universidade Federal de São Paulo
<b>uL</b>	Microlitros
<b>spp.</b>	Espécies
<b>q.s.p</b>	Quantidade suficiente para
<b>RPMI 1640</b>	Roswell Park Memorial Institut 1640
<b>ABD</b>	Ágar Batata Dextrose
<b>ASD</b>	Ágar Sabouraud Dextrose
<b>NaCl</b>	Cloreto de Sódio
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>LM</b>	Laboratório de Micologia
<b>OE</b>	Óleo essencial
<b>HaCaT</b>	Células de Queratinócitos Humanos
<b>CAL</b>	Calmodulina
<b>DO</b>	Densidade óptica
<b>DOc</b>	Densidade óptica de corte
<b>DP</b>	Desvio Padrão
<b>EPM</b>	Erro Padrão da Média

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	17
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....	20
2.1 GÊNERO <i>SPOROTHRIX</i> E A ESPOROTRICOSE .....	20
2.2 TRATAMENTO ANTIFÚNGICO .....	23
2.3 DIAGNÓSTICO .....	24
2.4 PRODUTOS NATURAIS: FITOCONSTITUINTE (-) – MIRTENOL.....	27
3 OBJETIVOS.....	32
3.1 OBJETIVO GERAL.....	32
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	34
4.1 LOCAL DA PESQUISA .....	34
4.2 POPULAÇÃO E AMOSTRA.....	34
4.3 ASPÉCTOS ÉTICOS.....	34
4.4 EXPERIMENTAL .....	35
4.4.1. Caracterização fenotípica .....	35
4.4.2. Identificação molecular .....	35
4.4.2.1 Extração.....	35
4.4.2.2 Reação em cadeia de polimerase (PCR) espécie específica .....	35
4.4.1.3 PCR para detecção de mating type (MAT) .....	37
4.4.1.4 Polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado (AFLP) <i>  fingerprinting</i> .....	37
4.4.3 Avaliação da atividade antifúngica.....	37
4.4.3.1 Fitoconstituente (-) – mirtenol e antifúngicos .....	37
4.4.3.2 Meios de cultura .....	38
4.4.3.3 Microrganismos.....	38
4.4.3.4 Inóculo fúngico .....	38
4.4.3.5 Determinação da CIM (Concentração Inibitória Mínima) - CLSI M38A ..	39
4.4.3.6 Determinação da CFM (Concentração Fungicida Mínima) .....	40
4.4.3.7 Analisar a formação do biofilme filamentosos e leveduriforme .....	40
4.4.3.8 Ensaio de sensibilidade de biofilmes de <i>Sporothrix</i> spp .....	41
4.4.3.9 Avaliação da biomassa .....	41

<b>4.4.3 Avaliação da citotoxicidade em células não tumorais HaCaT .....</b>	<b>42</b>
<b>4.4.4 Análise estatística .....</b>	<b>42</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>45</b>
<b>5.1. ARTIGO SUBMETIDO NA REVISTA MYCOSES (FI: 4.1).....</b>	<b>45</b>
<b>5.2. ARTIGO A SER SUBMETIDO NA CHEMISTRY &amp; BIODIVERSITY (FI: 2.3) .....</b>	<b>70</b>
<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>87</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>89</b>

# Introdução

## 1 INTRODUÇÃO

A esporotricose é uma infecção fúngica de caráter agudo ou crônico, causada por fungos termodinórficos pertencentes ao gênero *Sporothrix*, que acomete homens e animais, principalmente, por meio traumático na pele, proliferando-se na forma de levedura ocasionando o aparecimento de lesões cutâneas e extra cutânea (Rossow et al., 2020; Gremião et al., 2021). As espécies relevantes pertencem ao clado clínico, tais como *S. brasiliensis*, *Sporothrix schenckii*, *S. globosa*, *S. luriei* e *S. mexicana* (Conceição-Silva & Morgado, 2018; da Cruz Bahiense Rocha et al., 2021).

*Sporothrix brasiliensis* é a espécie mais virulenta do clado clínico, é a principal espécie transmitida zoonoticamente por arranhões ou mordidas de animais infectados, principalmente os gatos (Rediguieri et al., 2022; Rodrigues et al., 2020; Lopes-bezerra et al., 2018; Casto et al., 2013). A transmissão pela via sapronótica da esporotricose acontece por a inoculação traumática de propágulos fúngicos no tecido subcutâneo, estando relacionado, muitas vezes, ao contato com plantas e solo contaminado dentre ambientes de trabalho ou lazer, como jardinagem, floricultura e agricultura, tendo *S. schenckii* como espécie mais relacionada (Gremião et al., 2017; Rediguieri et al., 2022; Rodrigues et al., 2016).

Pós-período de incubação, esta micose pode se manifestar nas formas linfocutânea ou cutânea fixa ou cutânea disseminada; de forma secundária observa-se acometimento extra cutânea, tais como a esporotricose ocular, pulmonar, neurológica e osteoarticular (Arenas et al., 2018). O diagnóstico dessa doença em humanos se dá por exame clínico e micológico, tendo a cultura fúngica como padrão ouro, no entanto, esta metodologia se limita a identificação do gênero *Sporothrix*, fazendo-se necessário análises moleculares, tais como a técnica de Reação em cadeia da Polimerase (PCR) espécie-específico como alternativa a este cenário (Lopes-Bezerra et al., 2018; Ramírez-Soto et al., 2018; Rodrigues et al., 2016).

Além da identificação das espécies de *Sporothrix*, o entendimento da variabilidade filogenética é essencial, pois esta pode fornecer subsídios sobre as possíveis taxas de mutação na descendência fúngica. Logo, é importante não apenas sua caracterização genotípica, mas todo conhecimento sobre a evolução, variabilidade e relação genética entre as suas espécies. Para isso, pode-se utilizar outras ferramentas de avaliação do genoma do fungo, como a técnica de polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado (AFLP) *fingerprinting* e análise do gene *Mating type* (MAT) que codifica fatores de transcrição essenciais para a reprodução

sexual, dessa forma sendo possível distinguir e rastrear esses patógenos emergentes que se espalham pelos hospedeiros mamíferos (de Carvalho et al., 2022; Redigueri et al., 2022).

No Brasil a esporotricose ainda é uma doença negligenciada, não sendo sua notificação compulsória em todos os locais de ocorrência. Com isso, entende-se o porquê não se conhecer sua exata prevalência, tendo como referência seu primeiro surto em 1998 com uma expansão principalmente na região sudeste do país, sendo o estado do Rio de Janeiro o estado mais prevalente (de Carvalho et al., 2021; Lopes-Bezerra et al., 2018). Atualmente, alguns estudos já mostram um aumento na incidência significativa de esporotricose em felinos e em humanos na região nordeste do Brasil, particularmente no Rio Grande do Norte, Pernambuco e Paraíba, segundo o boletim epidemiológico da Secretaria Estadual de Saúde da Paraíba, o número de notificações foi crescente nos últimos anos (Oliveira Bento et al., 2021a; Silva et al., 2021).

O tratamento clássico da esporotricose se estabelece por quatro principais medicamentos: iodeto de potássio, itraconazol, terbinafina e anfotericina B, todavia, atualmente o itraconazol é o mais utilizado em infecções mais superficiais, já a anfotericina B é a alternativa para os casos graves. No entanto, terapias dessa infecção tem enfrentado problemas, aumento do surgimento de cepas resistentes, além do número limitado de antifúngicos empregados no tratamento dessa micose (Scordino et al., 2016; Oliveira et al., 2017).

Isso justifica as investigações de novos agentes antifúngicos para melhorar o manejo desta doença, seja para prevenção, seja para tratamento eficaz. Nesse contexto, uma alternativa a este cenário são as pesquisas com plantas medicinais que possuem potencial de atividade antimicrobiana relevante, como os álcoois monoterpênicos bicíclicos (Nikitina et al., 2021).

O (-) – Mirtenol é uma dessas substâncias, estudos vêm demonstrando seus efeitos biológicos, tais como, estresse oxidativo (Xuemei, Liu et al., 2021), angiogênese (Huang et al., 2021), neuroprotetor (Silva-Martins et al., 2021), protetor gástrico (Viana et al., 2019), antibacteriano (Cordeiro et al., 2020) e antifúngicos (Cavalcante et al., 2021).

Foi a partir destas evidências que este estudo caracterizou molecularmente isolados clínicos de *Sporothrix* spp. Além disso, investigou a atividade antifúngica do monoterpeno (-) - mirtenol contra a *S. brasiliensis* na forma planctônica, classificou os isolados clínicos quanto a capacidade de formação do biofilme filamentoso, avaliou a capacidade desse monoterpeno na inibição da formação e na redução do biofilme maduro, bem como avaliou a citotoxicidade em células de queratinócitos

# Fundamentação Teórica

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

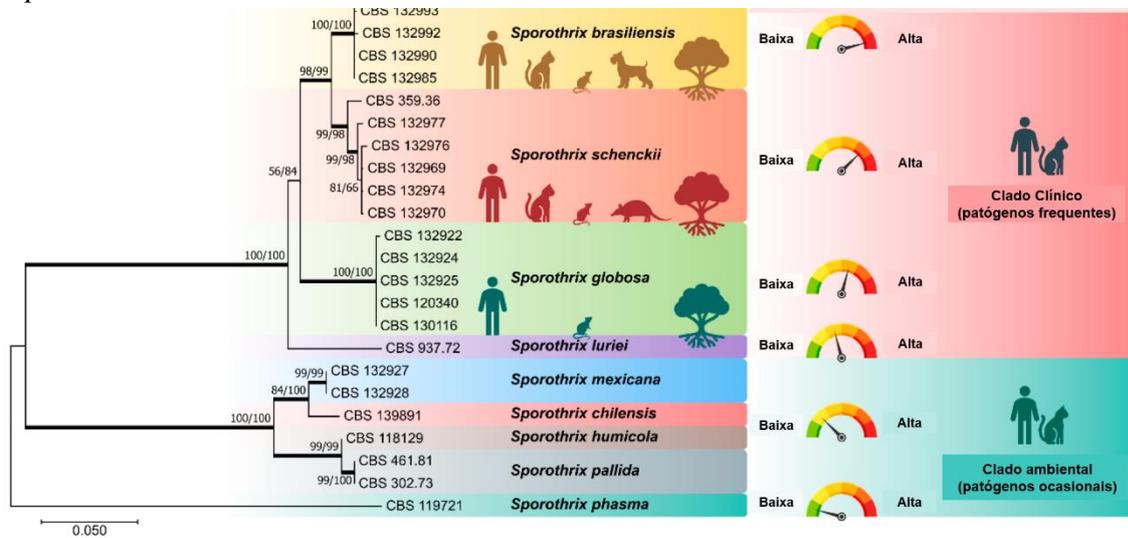
### 2.1 GÊNERO *SPOROTHRIX* E A ESPOROTRICOSE

A esporotricose é uma infecção fúngica subcutânea que pode se manifestar de formas subagudas quanto crônicas provocada por espécies do gênero *Sporothrix*, esta micose é considerada uma zoonose emergente, acometendo seres humanos e animais. (Rodrigues et al., 2014; Rodrigues et al., 2016; Ramírez-soto et al., 2018). Atualmente, a esporotricose configura-se como um grave problema de saúde pública devido à sua ampla disseminação em regiões tropicais e subtropicais. Inicialmente descrita por Benjamin Schenck em 1898, a patologia destaca-se pelo seu potencial de desencadear surtos em comunidades vulneráveis (Rodrigues et al., 2022).

Nesse contexto, a esporotricose é causada pelo fungo termodimórfico do gênero *Sporothrix*. Anteriormente atribuída estritamente ao *S. schenckii*, emergiu na década de 1990, um novo padrão causador dessa zoonose no Brasil, com surtos transmitidos por gatos, o *Sporothrix brasiliensis*, que é a espécie predominante nesses casos, diferindo de *S. schenckii* e *S. globosa*, que estão mais associados a infecções ambientais (Rodrigues et al., 2016; Moussa et al., 2017; Rabello et al., 2022). Recentemente, *S. brasiliensis* foi identificado em casos autóctones fora do Brasil, destacando sua capacidade de rápida disseminação (Xavier et al., 2023).

Os avanços na taxonomia molecular revelaram a diversidade dentro do gênero *Sporothrix*, identificando aproximadamente 53 espécies (Rodrigues et al., 2020). Entre essas, o *S. brasiliensis*, *S. schenckii*, *S. globosa* e *S. luriei* formam um grupo monofilético de importância clínica, frequentemente isoladas em casos da doença (Rodrigues et al., 2016; Moussa et al., 2017; Rabello et al., 2022). Além dessas, outras espécies com potencial patogênico moderado para humanos e animais estão restritas ao solo, enquanto fungos pertencentes ao clado ambiental apresentam baixa ou nenhuma virulência para hospedeiros vertebrados de sangue quente (Figura 1) (De Beer, Doung, Wingfield, 2016; Rodrigues et al., 2016).

**Figura 1** Análise filogenética dos principais membros de relevância médica no gênero *Sporothrix*.



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

Tradicionalmente, a esporotricose é transmitida pela inoculação traumática de propágulos de *Sporothrix* na pele, caracterizando uma saponose, ou seja, a transferência do fungo do ambiente para um hospedeiro vertebrado de sangue quente (Oliveira Bento et al, 2021). Esta micose ocupacional está comumente associada a lesões sofridas durante atividades ao ar livre, afetando principalmente jardineiros, agricultores, extrativistas e floristas (Rodrigues et al., 2014; Rodrigues et al., 2016).

Nesse contexto, uma via de infecção alternativa, é a horizontal entre animais, principalmente gatos domésticos. Nos casos envolvendo gatos, a doença é disseminada por meio de arranhões, mordidas ou contato direto com suas secreções, podendo infectar outros animais, causando epizootias, ou seres humanos, configurando uma zoonose (Rodrigues et al., 2014; Rodrigues et al., 2016).

A esporotricose, predominantemente subcutânea, manifesta-se de formas variadas, sendo a linfocutânea a mais frequente. As lesões iniciais são pápulas nodulares avermelhadas e indolores no local de inoculação do fungo. Em casos graves, a infecção pode se espalhar ao longo dos vasos linfáticos, formando nódulos endurecidos e lesões com aspecto de cordões (Vikram, 2014; Tirado-Sanchez, 2017).

A disseminação para ossos e vísceras é rara, ocorrendo mais frequentemente em pacientes imunossuprimidos, enquanto a forma pulmonar, resultante da inalação de propágulos fúngicos, é incomum (Aung et al., 2013).

Os gatos são os hospedeiros mais vulneráveis à infecção por *Sporothrix*, frequentemente manifestando formas graves da doença e podendo evoluir para óbito (Sanhotene et al., 2015; Gremião et al., 2021). Eles exibem lesões ulcerativas múltiplas, predominantemente localizadas na cabeça e nas patas. Essa zoonose demonstra maior prevalência em gatos machos adultos, sem donos e não castrados, com elevado número de leveduras nas lesões em comparação às manifestações em humanos (Gremião et al., 2014; Pereira et al., 2014; Pereira et al., 2015).

Para colonizar o organismo hospedeiro, os fungos desenvolvem diversos fatores de virulência. Embora os detalhes sobre os mecanismos de *Sporothrix* spp. ainda sejam limitados, a literatura já descreveu alguns desses fatores, incluindo o dimorfismo térmico, a síntese de melanina, adesinas e proteinases (Mora-Montes et al., 2015). Além disso, estudos recentes destacam a formação de biofilmes como um fator importante na virulência de *Sporothrix*. Esses fatores contribuem para a capacidade do fungo de estabelecer e manter infecções no hospedeiro, influenciando sua patogenicidade e resistência aos tratamentos (Brilhante et al., 2018).

Nesse interim, o dimorfismo do *Sporothrix* envolve a forma filamentosa à 25°C e a transição para o estado leveduriforme no hospedeiro mamífero. Essa mudança constitui um fator de virulência essencial para a colonização e infecção em mamíferos. Uma vez que as leveduras são o principal agente infeccioso transmitido na transmissão induzida por gatos, entender o mecanismo pelo qual ocorre possibilita a compreensão de sua importância na transmissão e na infecção endógena (Borges et al., 2013; Orofino-costa et al., 2017).

No Brasil, a esporotricose é classificada como uma doença de notificação compulsória em alguns estados e municípios, uma medida crucial para seu controle. No entanto, a insuficiência na notificação compromete a eficácia das estratégias de controle. A infecção, amplamente disseminada pelo país, também apresentou um aumento significativo de casos na Argentina, Paraguai, Estados Unidos e Reino Unido, todos associados à transmissão por gatos oriundos do Brasil. No Chile, a infecção foi identificada em felinos, mas ainda não foram relatados casos humanos (Xavier et al., 2023; Silva et al., 2022).

## 2.2 TRATAMENTO ANTIFÚNGICO

A esporotricose é reconhecida como um grave problema de saúde pública no Brasil, com crescente disseminação. Esta zoonose, causada pelo *Sporothrix brasiliensis*, tem originado milhares de casos e, recentemente, tem se expandido para países vizinhos (Brandolt et al., 2019; Gremião et al., 2020).

A seleção do antifúngico apropriado para o tratamento é determinada com base na apresentação clínica da infecção e no estado imunológico do paciente, e o tratamento frequentemente exige uma abordagem prolongada (Pires et.al., 2017).

As opções terapêuticas disponíveis para o manejo desta micose incluem fármacos antifúngicos, tais como itraconazol, iodeto de potássio, terbinafina e anfotericina B. Cada um desses agentes antifúngicos tem suas próprias características e aplicações, e a escolha entre eles deve considerar fatores como a gravidade da infecção, a resposta do paciente ao tratamento e possíveis efeitos colaterais (Serrano et.al., 2022; Rosa et.al., 2017).

Nesse sentido, entre os medicamentos mais frequentemente utilizados estão os derivados azólicos, que atuam de maneira específica na desmetilação da enzima 14 $\alpha$ -lanosterol, dependente do citocromo P450, essencial para biossíntese de ergosterol, o que compromete sua integridade e contribui para a eliminação da infecção. O itraconazol é o antifúngico amplamente empregado tanto em humanos quanto em animais afetados (Pires, 2017; De paiva viana filho et.al., 2020).

Outro fármaco utilizado tanto em humanos quanto em animais é o iodeto de potássio. Que se demonstra eficaz no tratamento da esporotricose cutânea, tendo sua ação aprimorada quando associado a derivados azólicos, ajudando a estimular o sistema imunológico. No entanto, apresenta efeitos colaterais que dificultam o seu uso, além de ser contraindicado para grávidas devido ao seu elevado potencial tóxico (Junior et.al., 2022; Santos et.al., 2018; Rosa et.al., 2017; Serrano et.al., 2022).

A anfotericina B é da classe dos poliênicos, seu mecanismo de ação é atuando através de sua união com ergosterol, desestabilizando a membrana fúngica. Este antifúngico é amplamente empregada em infecções sistêmicas graves. Possui um amplo espectro, sendo conhecida por seus efeitos colaterais significativos, como cardiotoxicidade e nefrotoxicidade, que estão associados à dosagem administrada (Lopes-bezerra et al., 2006; Freitas, 2014). Embora a anfotericina B não seja a primeira opção para tratar a esporotricose, é reconhecida por sua eficácia contra algumas cepas sensíveis de *Sporothrix spp.* (Serrano et.al., 2022; Rosa et.al., 2017; Rivera-Toledo et al., 2020).

No grupo das alilaminas, destaca-se a terbinafina, mesmo não sendo o fármaco de eleição para o tratamento dessa micose, existe relatos na literatura do seu potencial terapêutico. Ele age inibindo a síntese do ergosterol pela esqualo-epoxidase (Abreu, 2017).

O número de antifúngicos disponíveis para o tratamento desta micose é limitado, a literatura tem relatado diversos problemas associados, como toxicidade, efeitos colaterais, alto custo terapêutico e o surgimento de cepas resistentes aos medicamentos existentes (Scordino et al., 2016; De oliveira et al., 2017). Diante desses desafios, há uma crescente necessidade de explorar novos agentes terapêuticos, uma vez que o desenvolvimento de antifúngicos não tem acompanhado o ritmo das demandas clínicas atuais, o que destaca a urgência em buscar alternativas eficazes para o tratamento (Poester et al., 2021).

### 2.3 DIAGNÓSTICO

Todas as espécies patogênicas de *Sporothrix* são termodimórficas, manifestando-se como fungos filamentosos no solo, em plantas e em excretas de animais, ou *in vitro* à 25 °C, e como estruturas leveduriformes durante o parasitismo nos tecidos do hospedeiro ou *in vitro* à 35-37 °C. Nos felinos doentes, as lesões cutâneas contêm um elevado número de estruturas fúngicas parasitárias, aumentando o potencial zoonótico da transmissão (De Miranda et al., 2018).

Após a infecção por *Sporothrix* spp., o fungo passa por alterações estruturais significativas, adaptando-se ao novo ambiente por meio de variações na temperatura, pH e pressão osmótica. Essas mudanças são essenciais para a adaptação ao hospedeiro e promovem a conversão da fase miceliana para a fase leveduriforme (Orofino-costa et al., 2022). (Figura 1)

Nesse contexto, a esporotricose é classificada em algumas formas clínicas que permitem e orientam o diagnóstico diferencial preciso e a escolha de exames laboratoriais apropriados, são elas: cutânea, mista localizada, imunorreativa, sistêmica, osteoauricular, mucosa (Rodrigues et al., 2022).

O diagnóstico definitivo da esporotricose requer uma combinação de exames clínicos e laboratoriais. A identificação da doença é baseada em uma anamnese detalhada e na análise dos achados epidemiológicos locais, uma vez que as lesões podem ser confundidas com outras patologias (Junior et al., 2022).

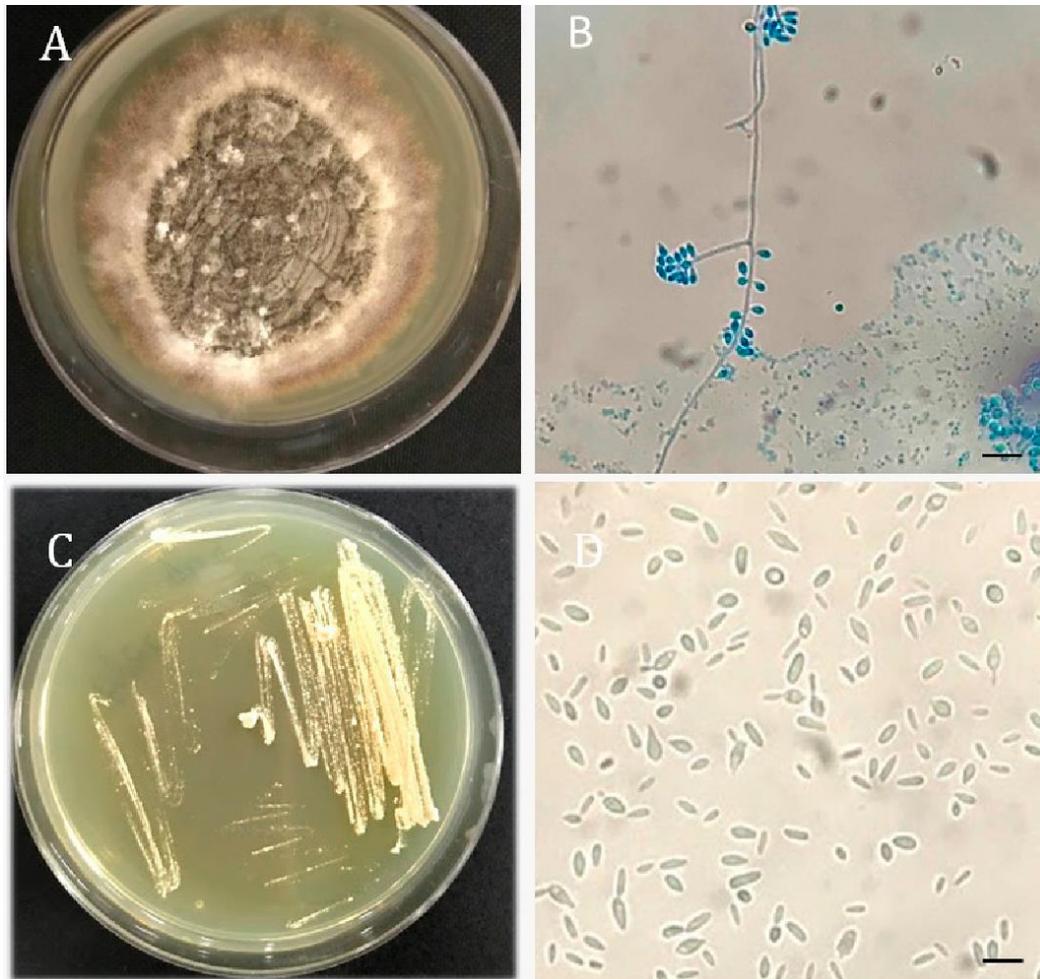
Os métodos laboratoriais para diagnóstico de esporotricose incluem abordagens fenotípicas e moleculares. A identificação fenotípica é baseada nas características macro e micromorfológicas das colônias de *Sporothrix* spp. Espécies como *S. globosa* podem ser

sensíveis a temperaturas superiores à 35°C, e a demonstração laboratorial do termodimorfismo ajuda a confirmar a identificação fenotípica (Miranda et al., 2013; Chen et al., 2017). O diagnóstico diferencial da esporotricose visa distinguir a infecção de outras condições com sintomas similares, como linfadenite tuberculosa e leishmaniose. Clínicamente, a esporotricose é diferenciada por suas lesões nodulares e ulcerativas características. Laboratorialmente, a confirmação é feita através do cultivo do fungo *Sporothrix* spp., exame histopatológico e, em alguns casos, técnicas moleculares como a PCR. Esses métodos permitem identificar o agente patogênico e assegurar o tratamento adequado (Rodrigues et al., 2014; Quintella et al., 2011).

O exame micológico direto utilizando hidróxido de potássio (KOH) ou colorações diferenciais apresenta baixa sensibilidade para o diagnóstico da esporotricose humana, devido à escassez de elementos fúngicos nas lesões. Por outro lado, na esporotricose felina, a elevada carga fúngica nas lesões facilita o diagnóstico rápido através do exame direto, revelando leveduras de formatos variados, como redondas, ovais ou alongadas. Apesar de o exame direto não permitir a diferenciação das espécies de *Sporothrix*, ele é crucial para excluir outras infecções cutâneas semelhantes (Miranda et al., 2013; Chen et al., 2017).

O diagnóstico de *Sporothrix* baseia-se principalmente na cultura de amostras clínicas, como lesões ou secreções, em ágar Sabouraud. As culturas positivas geralmente aparecem dentro de 2 semanas, mas podem exigir até 30 dias para confirmação. À 25 °C, o fungo desenvolve hifas finas com conidióforos eretos e conídios unicelulares hialinos dispostos em arranjo floral, além de conídios sésseis, marrons, e (sub)globosos ou triangulares ao longo de hifas indiferenciadas. A observação do dimorfismo é crucial para distinguir *Sporothrix* de outras espécies ambientais (Bonifaz, Vázquez-gonzález, 2013; Orofino-costa et al., 2015; Bayry, 2017). (Figura 2).

**Figura 2-** Morfologia de *Sporothrix* spp.



**Legenda:** (A) Cultura de colônias filamentosas após dez dias a 25 °C em Ágar Dextrose Sabouraud (SDA). (B) Microscopia óptica de hifas e conídios típicos de *S. brasiliensis* (azul de algodão, ×400). (C) Cultura de colônias leveduriformes após sete dias a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> em ágar Infusão Cérebro-Coração (BHI). (D) Microscopia óptica de colônia leveduriforme (solução salina, ×400). Barra = 10 μm.

**Fonte:** Magalhães et al. (2022).

A identificação fenotípica de *Sporothrix* exige de 7 a 14 dias para a cultura e mais 10 a 21 dias para ensaios fisiológicos, mas suas características morfológicas frequentemente não são suficientes para distinguir as espécies clinicamente relevantes. Assim, ferramentas moleculares são essenciais para identificar espécies críticas e orientar a terapia, além de auxiliar na detecção e controle de surtos. O sequenciamento molecular reduz o tempo de identificação para cerca de 12 horas, oferecendo um diagnóstico mais preciso e rápido (Bonifaz, Vázquez-gonzález, 2013; Camacho et al., 2015).

Métodos moleculares são importantes para a identificação das espécies do clado clínico de *Sporothrix*, complementar aos métodos convencionais. A exemplo, tem a Reação em cadeia da Polimerase (PCR) espécie-específico é baseado no sequenciamento do DNA, e possui maior sensibilidade e especificidade em todos os tipos de diagnóstico das espécies de *Sporothrix* comparadas com testes fenotípicos.

As análises filogenéticas revelam que *S. brasiliensis*, agente etiológico da esporotricose é uma espécie monofilética com baixa diversidade haplotípica, reduzida recombinação gênica e um número limitado de mutações, sugerindo que sua reprodução ocorra por um modo reprodutivo clonal. Além disso, isolados de casos de esporotricose, tanto em humanos quanto em felinos no Brasil, apresentaram os mesmos genótipos, evidenciando que os gatos são a principal fonte de infecções por *Sporothrix brasiliensis* (Rodrigues et al., 2013; Teixeira et al., 2015). Nesse contexto, além da identificação específica, compreender a evolução e a variabilidade genética das espécies de *Sporothrix* é de suma importância. Técnicas como o polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado (AFLP) e a análise do gene Mating type (MAT), que codifica fatores de transcrição essenciais para a reprodução sexual, oferecem uma visão detalhada da genética do fungo (Lopes-bezerra et al., 2018; Ramírez-Soto et al., 2018; Rodrigues et al., 2020).

A técnica de impressão digital baseada em PCR do Polimorfismo de Comprimento de Fragmento Amplificado (AFLP) tem se destacado como uma ferramenta poderosa na investigação de padrões de herança genética devido à sua capacidade de gerar um grande número de marcadores a partir de restrição genômica sem a necessidade de informações prévias sobre a sequência. Esse método tem sido amplamente utilizado em diversos organismos, como no estudo da diversidade genética de *Artemia* (Polido et al., 2002; Silva et al., 2013).

Portanto, a AFLP não só contribui para o entendimento da diversidade genética, mas também para a elucidação de mecanismos reprodutivos essenciais na taxonomia de *Sporothrix* spp. Essas ferramentas moleculares possibilitam o rastreamento e a distinção de patógenos emergentes, fundamentais para a monitorização de surtos e implementação de medidas de controle apropriadas, especialmente em contextos epidemiológicos envolvendo a propagação entre hospedeiros mamíferos (De Carvalho et al., 2022; Redigueri et al., 2022).

## **2.4 PRODUTOS NATURAIS: FITOCONSTITUINTE (-) – MIRTENOL**

As plantas são uma das fontes mais importantes de compostos naturais usados no desenvolvimento de cosméticos, pesticidas e de novos medicamentos, sendo que este último

vem ganhando forças nas últimas décadas. Possuem uma diversidade de compostos biologicamente ativos importantes que são essenciais para o desenvolvimento e sua proteção, sendo vital para sua sobrevivência nos ambientes (Deng et al., 2020). Esses compostos são chamados de metabólitos primários e secundários, que são produtos de transição do metabolismo da planta, restrito em pequenas moléculas (Aminah et al., 2021; Reis et al., 2020).

Assim, pode-se citar os óleos essenciais (OE) consistem em milhares de componentes que são misturas complexas de compostos voláteis obtidas de todas as partes das plantas e se apresentam imiscíveis ou muito pouco miscíveis em água. Essa característica lipofílica os capacita de interagir com a membrana citoplasmática e outras estruturas lipídicas, podendo exercer seu efeito biológico por meio da inibição de enzimas envolvidas na síntese do ergosterol; pela formação de complexos com este lipídeo; interferindo na síntese de proteínas, na divisão celular ou na biossíntese da parede celular fúngica. Esses efeitos podem resultar na inibição ou morte celular (Ferreira et al., 2021b; Radice et al., 2022).

Os fitoconstituintes dos óleos essenciais apresentam uma grande variedade química, de todos esses compostos presentes, os terpenos são os mais abundantes. Os terpenos são substâncias isoladas de óleos voláteis que são classificadas de acordo com suas unidades isoprênicas ( $C_5H_8$ ), como os monoterpenos que possuem 2 unidades. Os monoterpenos são compostos de que possuem baixo peso molecular e corresponde a um grupo mais diversificado e maior, por isso a maioria dos monoterpenos estão presentes nos óleos essenciais (Felipe; Bicas, 2017; Zielińska-Błajet; Feder-Kubis, 2020).

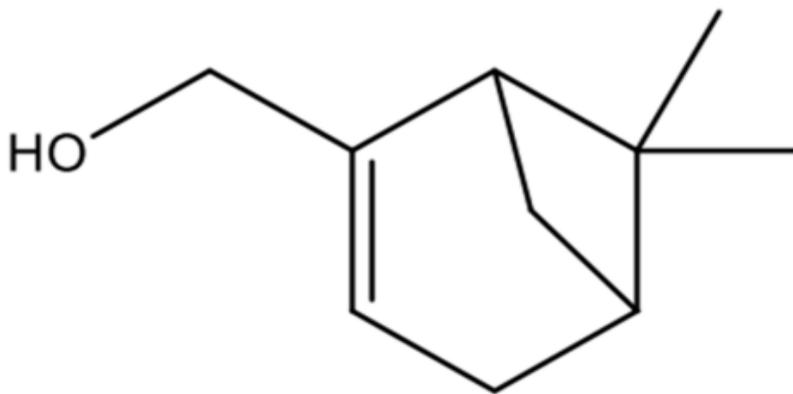
Os monoterpenos são amplamente distribuídos e são os mais emblemáticos no grupo dos terpenos, conhecidos por possuírem diferentes propriedades, tais como atividades antioxidante, inibitória enzimática e antifúngica, broncodilatadora, sendo hepatoprotetores, possuindo funções sedativas, antiviral e estimulando a captação de glicose e lipólise (Wojtunik-Kulesza et al., 2019; Tan et al., 2016; Galan et al., 2020; Sousa et al., 2020; Kaziyama; Fernandes; Simoni, 2012).

Dentre essas substâncias, encontra-se o (-) - mirtenol (Figura 3), também conhecido como “cis mirtenol” ou somente “mirtenol”, com fórmula molecular  $C_{10}H_{16}O$  (152,24 g/mol). Um monoterpeno bicíclico de álcool que possui um aroma agradável e é frequentemente empregado na fabricação de produtos de beleza e agentes aromatizantes de alimentos, devido a isso, pode ser encontrado em diversas espécies aromáticas, a exemplo: *Myrtus communis* L., da família *Myrtaceae*, *Tanacetum vulgare* L. (*Magnoliopsida*), *Rhodiola rosea* L. (*Crassulaceae*)

e *Artemisia vulgaris* L. (*Asteraceae*) (Mrabi; Jaouadi; Zeouk et al., 2023; Barbhuiya; Pathak, 2024).

Um fitoconstituente da classe dos monoterpenos e representante do grupo químico dos álcoois monocíclicos, sendo suas formas isoméricas (+)-mirtenol e (-)-mirtenol, provavelmente, as mais versáteis (Moreira, 2013). Pode ser obtido a partir da oxidação do  $\alpha$ -pineno e possui uma ampla utilização como ingrediente de fragrâncias de cosméticos diversos (Oliveira, 2019).

**Figura 3-** Estrutura química do monoterpeno (-) – mirtenol.



**Fonte:** Mrabi, Jaouadi, Zeouk et al. (2023)

Este monoterpeno apresenta importantes propriedades biológicas relatadas. Tendo a sua atividade sido constatada, sobre o estresse oxidativo (Xuemei et al., 2021), angiogênese (Huang et al., 2021), cardioproteção (Britto et al., 2018), anti-inflamatória e analgésica (De Oliveira, 2019), neuroprotetor (Silva-Martins et al., 2021), protetor gástrico (Viana et al., 2019), antibacteriano (contra formas planctônica e biofilme) (Cordeiro et al., 2020; Selvaraj et al., 2020) e antifúngico, sobre cepas de *Candida* spp. (Cavalcante et al., 2021).

Segundo a International Joint/WHO Expert Comitê de Aditivos Alimentares, não constatou problemas na ingestão de mirtenol, reconhecendo como ingrediente aromatizante seguro. Estudos realizado por Maione et al. (2022), o (-) - mirtenol não apresentou toxicidade em ensaios envolvendo o invertebrado *Galleria mellonella* e em células de queratinócitos humanos em tratamento de 24 horas e dosagens menores que 200  $\mu\text{g/mL}$ . Somado a isso, apresentou características de um agente profilático, prolongando a sobrevivência das larvas após a infecção com *Candida auris/Klebsiella pneumoniae*.

Além disso, estudo de Cordeiro et al. (2020) verificou potencial do (-) - mirtenol em ser possível candidato a uma nova droga, através da avaliação de parâmetros *in silico*. Como resultado, os autores demonstraram que esse fitoconstituente possui perfil farmacocinético favorável, com perspectiva de uso por via oral. A excelente biodisponibilidade oral teórica e boa solubilidade demonstrada, pode garantir uma adequada absorção e distribuição *in vivo*. Dessa forma, (-) - mirtenol se apresenta como uma substância promissora.

# Objetivos

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a diversidade genética, a distribuição populacional de *Sporothrix* spp. isoladas de pacientes com esporotricose atendidos no hospital universitário Lauro Wanderley, e avaliar a atividade antifúngica do (-) mirtenol nestes isolados clínicos.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar fenotipicamente *Sporothrix* isoladas;
- Identificar *Sporothrix* molecularmente via PCR espécie-específico;
- Realizar a identificação do idiomorfo sexual (MAT1-1 e MAT1-2) dos isolados clínicos de *Sporothrix*;
- Analisar a distribuição de *Sporothrix* spp. no estado da Paraíba, correlacionando com os dados clínicos dos isolados;
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) do (-) – mirtenol frente cepas de *Sporothrix* identificadas, na forma filamentosa;
- Analisar a formação de biofilme filamentoso;
- Verificar a atividade do monoterpeno (-) – mirtenol sobre o biofilme formado e a ruptura do biofilme maduro;
- Avaliação da citotoxicidade do (-) – mirtenol em células de queratinócitos humano (HaCaT).

# Material e Métodos

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 LOCAL DA PESQUISA**

Os ensaios de identificação molecular e caracterização filogenética foram realizados no Laboratório de Patógenos Fúngicos Emergentes do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (DMIP) da Escola Paulista de Medicina (EPM), Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), campus São Paulo.

Os ensaios de avaliação da atividade antifúngica de (-) - mirtenol sobre cepas de *Sporothrix* brasiliensis foram realizados no Laboratório de Pesquisa de micologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas (DCF), Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal da Paraíba (UFPB), João Pessoa, Paraíba. Os dados sofram adquiridos dos prontuários dos pacientes positivos, presente no setor de micologia do laboratório clínico do Hospital Universitário Lauro Wanderley (HULW).

### **4.2 POPULAÇÃO E AMOSTRA**

Foram utilizadas como cepas testes, um painel com 36 isolados clínicos que foram isoladas no ano de 2019 e 2020 de pacientes atendidos no Hospital Universitário Lauro Wanderley (HULW) e cedidas através do Laboratório de Micologia Clínica pertencente ao departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), João Pessoa, Paraíba, Brasil.

Como controle foram utilizadas cepas de referência de *Sporothrix* de diferentes espécies do Laboratório de Patógenos Fúngicos Emergentes do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (DMIP) da Escola Paulista de Medicina (EPM), Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), campus São Paulo-SP, sob coordenação do professor Dr. Anderson Messias Rodriguez.

Para correlação epidemiológica foram utilizados os prontuários dos pacientes, presente no laboratório onde as amostras foram coletadas no HULW, seguindo as diretrizes de ética da instituição hospitalar.

### **4.3 ASPÉCTOS ÉTICOS**

Este estudo atendeu as normas que contemplam os requisitos éticos propostos pela resolução 466/12 do conselho Nacional de Saúde que dispõe de normas e diretrizes

regulamentadoras da pesquisa envolvendo seres humanos. Para isso, o projeto foi submetido ao comitê de ética e pesquisa da UFPB, com CAAE: 65629622.0.0000.5188 (Apêndice A), bem como autorizado pela instituição para sua realização.

## **4.4 EXPERIMENTAL**

### **4.4.1. Caracterização fenotípica**

A identificação dos isolados de *Sporothrix* spp foi realizados de acordo com métodos estabelecidos por Marimon et al. (2007). Para o estudo do crescimento vegetativo e reprodutivo foram analisados a macromorfologia (diâmetro, textura e cor das colônias) e micromorfologia (presença de hifas, pigmentação e arranjo de conídios). As características morfológicas foram avaliadas a partir de colônias cultivadas em placas de ágar batata dextrose (ABD) (200g de batata, 15g de ágar e 1 litro de água destilada) incubadas na temperatura de 25°C durante 21 dias. Para a caracterização microscópica dos isolados foram estudadas: a presença ou não de conídios sésseis, o formato, a coloração, a ornamentação, a disposição dos conídios através da técnica de microcultivo de Riddell (1950). Após crescido foi feita a leitura em Microscopio Óptico Nikon Eclipse Ci®.

### **4.4.2. Identificação molecular**

#### **4.4.2.1 Extração**

Os isolados foram submetidos à extração de DNA seguida por PCR espécie-específico com base no gene da calmodulina (CAL) segundo descrito por Rodrigues, Hoog e Camargo (2015). Brevemente, as amostras foram incubadas à temperatura ambiente em placa de Agar Sabouraud Dextrose (ASD) durante sete a 14 dias e da cultura monospórica foi realizada a extração utilizando um kit de extração de DNA. A concentração e pureza do DNA genômico foram analisados por espectrofotometria (NanoDrop; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA).

#### **4.4.2.2 Reação em cadeia de polimerase (PCR) espécie específica**

O DNA previamente extraído foi utilizado na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) conforme protocolo descrito por Rodrigues, Hoog e Camargo (2015), o qual descreve um

conjunto de oligonucleotídeos de inicialização espécie-específico (*S. brasiliensis*, Sbra-F e Sbra-R; *S. schenckii*, Ssch-F e Ssch-R e *S. globosa*, Sglo-F e SgloR (Quadro 1). Além disso, foi utilizado um par de primers (reverse e forward) como controle interno específico (IPC- 12 F e IPC-R) que tem como alvo a região 5.8s do operon do DNA ribossomal do *Sporothrix* e espécies relacionadas, para verificar a presença do DNA do fungo. Cepas de *Sporothrix schenckii* e de *Sporothrix brasiliensis* previamente caracterizadas por sequenciamento gênico foram utilizadas como amostras controles.

**Quadro 1**-Sequências de primers espécie-específicos que tem como alvo o gene calmodulina (CAL) dos membros do gênero *Sporothrix*

<b>Espécies alvo</b>	<b>Primers</b>	<b>Sequência dos primers (5'-3')</b>	<b>Tamanho (Pb) amplificadas</b>
<i>S. brasiliensis</i>	Sbra-F	CCC CCG TTT GAC GCT TGG	469
	Sbra-R	CCC GGA TAA CCG TGT GTC ATA AT	
<i>S. schenckii</i>	Ssch-F	TTT CGA ATG CGT TCG GCT GG	331
	Ssch-R	CTC CAG ATC ACC GTG TCA	
<i>S. globosa</i>	Sglo-F	CGC CTA GGC CAG ATC ACC ACT AAG	243
	Sglo-R	CCA ATG TCT ACC CGT GCT	
<i>Sporothrix/ Ophiostoma</i>	IPC-F	ATG CGA TAC GTA ATG TGA ATT GC	101

O produto da PCR foi separado por eletroforese em gel de agarose 1,2% na presença do corante de ácido nucleico, o SYBR Safe. Um marcador de tamanho molecular de 50 bp DNA foi utilizado como ladder. As bandas foram irradiadas por luz ultravioleta e reveladas através do fotodocumentador. O tamanho da banda revelada pelo PCR espécie-específico de cada isolado foi comparado com os controles positivos para *Sporothrix brasiliensis* e *Sporothrix schenckii*.

#### **4.4.1.3 PCR para detecção de mating type (MAT)**

O DNA extraído também foi utilizado para realização da PCR seletiva para locus MAT usando primers para os alvos MAT1-1 e MAT1-2 descrito por Carvalho et al. (2021). Cepas de referência de cada idiomorfo correspondente foram usadas como controles positivos. Amplicon de 673pb foram observados para isolados MAT1-1 e 291pb para os MAT1-2.

#### **4.4.1.4 Polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado (AFLP) *fingerprinting***

O DNA extraído foi purificado utilizando um kit de purificação de DNA genômico para a realização do AFLP utilizando o protocolo de Vos et al. (1995) com as modificações descritas por Carvalho et al. (2020).

De maneira geral, o DNA genômico de *Sporothrix* (200 ng) foi digerido usando as enzimas de restrição EcoRI (GAATTC) e MseI (TTAA) e ligado a adaptadores EcoRI e MseI simultaneamente. Uma PCR pré-seletiva foi realizada com Iniciadores EcoRI+0 e MseI+0 (Vos et al., 1995). Por último, realizou uma PCR seletiva usando o Primer EcoRI com seleção de duas bases (5'- GAC TGC GTA CCA ATT CNN-3') marcado com 6- carboxifluoresceína (FAM; azul) e o primer MseI não marcado com seleção de duas bases (5'-GAT GAG TCC TGA GTA ANN-3'). Duas combinações foram utilizadas para genotipagem dos isolados de *Sporothrix* (#3 EcoRIGA/MseI-TT e #5 EcoRI-GA/MseI-AG). Os fragmentos AFLP foram resolvidos por eletroforese capilar com um analisador genético ABI3730xl ao lado de um GeneScan Padrão de tamanho interno LIZ600 (35–600 bp; Applied Biosystems Foster City, CA, EUA). Para avaliar a capacidade de reproduzir os resultados com precisão, os eletroferogramas serão representativos de dois ensaios independentes. A análise dos fragmentos foi realizada utilizando o software BioNumerics v. 7.6 (Applied 14 Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium). Esta técnica ocorreu no laboratório do professor Anderson Messias Rodrigues da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

### **4.4.3 Avaliação da atividade antifúngica**

#### **4.4.3.1 Fitoconstituente (-) – mirtenol e antifúngicos**

O monoterpeno selecionado para esta pesquisa foi obtido da Sigma-Aldrich® e fornecido pelo professor Dr. José Maria Barbosa Filho do DCF/CCS/UFPB. O antifúngico

utilizado como controle foi o itraconazol (Cayman Chemical®), sendo selecionado para a execução dos ensaios por se tratar de antifúngico padrão utilizados na condição clínica em estudo.

As substâncias foram preparadas no momento da execução dos ensaios. O monoterpene foi preparado na concentração inicial de 2.048 µg/mL, devidamente solubilizados em 5% de Dimetilsulfóxido (DMSO) e 2% de Tween 80.

#### **4.4.3.2 Meios de cultura**

O meio de cultura ágar batata dextrose (ABD) (200g de batata, 15g de ágar e 1 litro de água destilada) foi utilizado para a manutenção das cepas de *Sporothrix* spp. e o meio de cultura líquido Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640-L-glutamina (sem bicarbonato de sódio) (Sigma-Aldrich®, São Paulo, SP, Brasil) foi utilizado para os ensaios antifúngicos, sendo preparado e mantido de acordo com as instruções do fabricante.

#### **4.4.3.3 Microrganismos**

Foram utilizadas 24 cepas clínicas de *Sporothrix brasiliensis* e uma cepa padronizada de *Sporothrix brasiliensis* IPEC 100 (OU 10C) CFP 0051, na forma filamentosa. Os isolados foram fornecidos pelo Laboratório de Micologia da Universidade Federal da Paraíba-UFPB. Os microrganismos foram mantidos em tubos de ensaio contendo PDA inclinado, sob refrigeração (8°C) até o momento da realização dos ensaios. Antes de cada experimento, as células foram reativadas em placas de Agar Batata Dextrose para preparação do inóculo.

#### **4.4.3.4 Inóculo fúngico**

Para o preparo do inóculo dos fungos, antes da realização dos ensaios microbiológicos, as suspensões foram preparadas a partir de culturas recentes semeadas em Agar Batata e incubadas à 30°C durante 5-7 dias, para otimização do crescimento fúngico. Após esse período as colônias foram cobertas com cerca de 2mL de água destilada estéril, e por meio de leves agitações das colônias com a alça estéril descartável, com isso, resultando uma mistura de conídios e fragmentos de hifas. Aguardando de 3 a 5 minutos até que as partículas mais pesadas da suspensão se depositem no fundo do tubo, então a suspensão superior foi transferida para outro tubo estéril e colocado em um agitador de tubos por 15 segundos com um auxílio de um aparelho vortex (Fanem Ltd., Guarulhos, SP, Brasil). A turbidez do inóculo final foi

padronizada com o tubo 1 ou 2 na escala de McFarland, que corresponderá a um inóculo de  $10^5$  UFC/mL ou  $2 \times 10^6$  UFC/mL, respectivamente (CLSI, 2017; SVETAZ et al., 2010, Rodrigues et al., 2018).

#### **4.4.3.5 Determinação da CIM (Concentração Inibitória Mínima)**

Define-se a CIM para os antifúngicos testados como a menor concentração que inibi visualmente o crescimento fúngico verificado nos orifícios, quando comparado com o crescimento controle.

A CIM do (-) - mirtenol, bem como do antifúngico padrão (itraconazol) foi determinada por meio da técnica de microdiluição em microplaca contendo 96 poços com fundo em forma de “U” (ALAMAR®), padronizada no documento CLSI M38A, 2017, e em duplicata. A emulsão do (-) – mirtenol foi preparada no momento da execução dos testes, utilizando DMSO (5%) e Tween 80 (2%) e água destilada estéril em quantidade suficiente para obter a concentração de 2048  $\mu\text{g/mL}$ , sendo sua concentração de teste nos poços das placas variando entre 1024  $\mu\text{g/mL}$  e 8  $\mu\text{g/mL}$ . Enquanto o itraconazol (controle positivo), foi utilizado nos ensaios em concentrações que variam de 32 a 0,25  $\mu\text{g/mL}$ .

Utilizando as placas de 96 poços, foram adicionados em cada poço da placa 100  $\mu\text{L}$  do meio RPMI 1640 (duplamente concentrado), posteriormente, 100  $\mu\text{L}$  da solução da substância teste/antifúngico foram dispensadas nas cavidades da primeira linha da placa. Por meio de uma diluição seriada a uma razão de dois, foram obtidas concentrações de modo que a primeira linha da placa se encontra a maior concentração, e na última a menor concentração. Por fim foi adicionado 10  $\mu\text{L}$  do inóculo em todos os poços.

O controle de viabilidade microbiana foi realizado adicionando 100  $\mu\text{L}$  do RPMI e 10  $\mu\text{L}$  do inóculo. Já o controle de esterilidade do meio, foi adicionado 200  $\mu\text{L}$  do meio sem a suspensão fúngica, além da realização do controle dos solventes utilizados para preparação do composto. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. As placas foram seladas e então incubadas à 25-28°C para a forma filamentosa por até 72 horas para realização da leitura. Após esse tempo, a leitura foi realizada visualmente. A CIM foi definida como a menor concentração do composto capaz de produzir inibição visível sobre o crescimento fúngico das cepas ensaiadas, quando comparado com o crescimento controle. O resultado foi expresso pela média aritmética das CIM's obtidas nos três ensaios.

#### 4.4.3.6 Determinação da CFM (Concentração Fungicida Mínima)

Após a leitura da CIM, alíquotas de 10 µL foram retiradas de cada poço da placa de microtitulação que não apresentaram crescimento fúngico, e semeadas em meio Ágar Sabouraud Dextrose (ASD). As placas foram incubadas a 28°C por 48-72 horas. A CFM foi definida como a menor concentração do antifúngico que produzirá 3 ou menos colônias no meio (Rodrigues et al., 2014).

#### 4.4.3.7 Analisar a formação do biofilme filamentosos e leveduriformes

A formação do biofilme foi realizada como descrito por Brilhante et al. (2015), com algumas modificações. Todos os 24 isolados de *Sporothrix* spp. foram cultivados previamente em ágar batata por 6 a 7 dias a temperatura de 28 a 30 °C. Posteriormente, foram preparadas suspensões fúngicas na concentração de  $2 \times 10^5$  conídeos/mL, como descrito anteriormente.

Para a formação do biofilme, alíquotas de 1.000 µL de cada inóculo foram transferidas para placas de poliestireno com 24 poços de superfície lisa tratada e fundo chato (KASVI), e incubadas por 24 h à 25°C, em condições estáticas, para etapa de pré adesão. Após as 24h, o sobrenadante de cada poço foi cuidadosamente removido e foram adicionados 1.000 µL de meio RPMI duplamente concentrado (Sigma-Aldrich ®, São Paulo, SP, Brasil), tamponada a pH 7,0 com MOPS 0,165M. As placas foram incubadas durante 4 dias a 28 a 30°C, para a formação e maturação dos biofilmes. O ensaio foi realizado em cinco exemplares.

Controle de esterilidade foi realizado utilizando meio de cultura sem adição de microrganismos, os quais foram submetidos ao mesmo protocolo que os demais poços e foram utilizados para obtenção dos valores de branco. Estes valores foram utilizados para estabelecer a densidade óptica de corte (DOc) para as formações de biofilme, que foi definida como a densidade óptica média obtida para o espaço em branco de referência, mais 3 vezes o seu desvio padrão.

Em seguida, a classificação da formação do biofilme dos 24 isolados foi realizada através da avaliação da biomassa, por meio da coloração por cristal violeta. As cepas foram classificadas como descritos por Cordeiro et al. (2015), em não formadoras ( $DO \leq DOc$ ), fracas formadoras ( $DOc < DOc \leq 2 \times DOc$ ), formadora moderada ( $2 \times DOc < DO \leq 4 \times DOc$ ) e fortes formadoras ( $4 \times DOc < DO$ ). Todos os testes foram realizados em quintuplicata.

#### 4.4.3.8 Ensaio de sensibilidade de biofilmes de *Sporothrix* spp

Os isolados classificados como fortes formadoras de biofilme foram selecionados para analisar se o monoterpene seria capaz de impedir a formação do biofilme e se causaria danos ao biofilme maduro.

Foi avaliado no estágio inicial da formação do biofilme, descrito por Brilhante *et al.*, (2018b), com algumas modificações. Para a formação do biofilme foi adicionado 1000 µL do inóculo fúngico com a concentração de  $2 \times 10^5$  conídios/mL na placa de 24 poços de superfície lisa tratada e fundo chato (KASVI), que foram incubadas por 24 h, à 30 °C, para a adesão das células (Brilhante *et al.*, 2015). Em seguida, o sobrenadante de cada poço foi cuidadosamente removido e o meio RPMI foi adicionado com diferentes concentrações do monoterpene, na CIM, CIMx5, CIMx10 e CIMx20 e incubado por 72h, a 30°C.

Para avaliar se o monoterpene teria efeito sobre o biofilme já formado, foi utilizado a metodologia descrita anteriormente até o amadurecimento dos biofilmes. Uma vez formado, os biofilmes foram lavados com solução salina tamponada com fosfato (PBS) para remover as células frouxamente ligadas. Concentrações de mirtenol previamente determinadas pelos valores da CIM, CIMx5, CIMx10 e CIMx20 foram adicionadas aos poços, seguido de incubação por 72h à 30°C.

Os controles de crescimento para o teste foram feitos em RPMI sem adição de droga, controles de esterilidades realizados com o meio sem adição de microrganismos. Em seguida, submetidas a ensaios de quantificação de biomassa utilizando coloração cristal violeta. O ensaio realizado em cinco exemplares (Martinez; Casadevall, 2006).

#### 4.4.3.9 Avaliação da biomassa

Para avaliação da biomassa por cristal violeta, os poços das placas de 24 poços revestidos com biofilme foram lavados duas vezes com 1000 µL de PBS e depois secos ao ar por 45 minutos. Em seguida, cada poço foi corado com 1000µL de cristal violeta aquoso a 0,4% por mais 45 minutos. Em seguida, cada poço lavado quatro vezes com 2000 µL de água destilada esterelizada e imediatamente descorado com 2000 µL de etanol 95%. Finalmente, após mais 45 minutos de descoloração, 200 µL de solução serão transferidos para um novo poço em placas de 96 poços e a quantidade de corante cristal violeta na solução descolorante foi medida com um leitor de placas de microtitulação (SpectraMAX 340 Adjustable Microplate Reader; Molecular Devices Ltd.) em 540 nm. As análises foram realizadas em triplicata. Para

calcular a porcentagem de ruptura do biofilme formado, foi utilizada a fórmula: % de ruptura do biofilme =  $100 - [(ABS590 \text{ teste}/ABS590 \text{ controle}) \times 100]$ .

#### **4.4.3 Avaliação da citotoxicidade em células não tumorais HaCaT**

O ensaio colorimétrico de redução do MTT (brometo de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-il) -2,5- difeniltetrazólio) foi utilizado para avaliar a citotoxicidade do (-)-mirtenol na linhagem celular de queratinócito humano (HaCaT).

O MTT é um sal tetrazólio de coloração amarela que atravessa normalmente a bicamada lipídica das células. Devido à atividade da enzima succinato desidrogenase presente nas mitocôndrias, o MTT é convertido em cristais de formazan de coloração roxa. Essa conversão é diretamente proporcional à quantidade de células viáveis, indicando a integridade metabólica das células, podendo ser quantificada por meio de espectrofotometria (Mosmann, 1983; Ghasemi et al., 2021).

Para este ensaio, as células de queratinócitos humanos (HaCaT) foram semeadas em placas de 96 poços na concentração de  $3 \times 10^5$  células/mL, e incubadas por 24 horas à 37 °C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, as células foram tratadas com a substância em diferentes concentrações, (-)-Mirtenol (512-256-128 µg/mL) por 72 horas. Após o período de tratamento, foram removidos 110 µL do sobrenadante, em seguida, adicionados 10 µL de MTT em todos os poços, que foram incubados novamente por 4 horas.

Posteriormente, foi adicionado SDS-HCL 0,01 N para dissolver os cristais de formazan, e a placa foi deixada em agitação durante a noite. Por fim, a leitura da placa foi realizada em um espectrofotômetro de microplacas (Synergy HT, BioTeK, EUA) com absorvância de 570 nm.

#### **4.4.4 Análise estatística**

As análises estatísticas realizadas neste estudo foram definidas conforme as especificidades de cada ensaio microbiológico realizado. Para isso, foi estabelecido um intervalo de confiança de 95% para as diferenças entre as médias, considerando o valor de  $p < 0,05$ .

Para a análise do biofilme nas diferentes fases foi utilizado a média  $\pm$  erro padrão, e analisado por Análise de Variância (ANOVA) two way seguido do teste de Tukey.  $p < 0,0001$  quando comparado os grupos de tratamento com o controle.

Na citotoxicidade os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.) e comparados por meio da Análise de Variância (ANOVA) one-way, seguido pelo teste Dunnett. Os resultados foram considerados significativos quando  $p < 0$

# Resultados

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. ARTIGO SUBMETIDO NA REVISTA MYCOSES (FI: 4.1)

#### **Analyses of the genetic diversity and population structures of *Sporothrix* spp. clinical isolates from Paraíba-Brazil**

Larissa Alves da Silva<sup>1</sup>, Jamile Ambrósio de Carvalho<sup>2</sup>, Luanna de Oliveira e Lima<sup>1</sup>, Francisco Bernardino da Silva Neto<sup>3</sup>, Edeltrudes de Oliveira Lima<sup>1</sup>, Walicyranison Plínio da Silva Rocha<sup>4</sup>, Zoilo Pires de Camargo<sup>2</sup>, Anderson Messias Rodrigues<sup>5</sup>, Ana Carolina Bernardes Dulgheroff<sup>6</sup>, Felipe Queiroga Sarmiento Guerra<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Federal University of Paraíba (UFPB), João Pessoa, Brazil, Laboratory of Mycology, Bioactive Natural and Synthetic Products Postgraduate Program; <sup>2</sup> Federal University of São Paulo (UNIFESP), São Paulo, Brazil, Laboratory of Emerging Fungal Pathogens; <sup>3</sup> Lauro Wanderley University Hospital, Federal University of Paraíba (UFPB), João Pessoa, Brazil; Department of Infectious, Parasitic and Inflammatory Diseases, Center for Medical Sciences, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil; <sup>4</sup> Federal University of Paraíba (UFPB); <sup>5</sup>Laboratory of Emerging Fungal Pathogens, Department of Microbiology, Immunology, and Parasitology, Discipline of Cellular Biology, Federal University of São Paulo, 04023062, Brazil; <sup>6</sup>Professional and Technological Centre - Technical School of Health, Federal University of Paraíba (UFPB).

#### **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors acknowledge the financial support granted by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq 403715/2022-9), São Paulo Research Support Foundation (FAPESP 2017/27265-5) and The National Institute of Science and Technology in Human Pathogenic Fungi, Brazil (CNPq 405934/2022-0). Special thanks to Neuza Maria Cavalcante Oliveira and Ana Raquel Fernandes Ribeiro for supporting the collection.

#### **CONFLICT OF INTEREST STATEMENT**

The authors declare no conflicts of interest.

## **ABSTRACT**

### **BACKGROUND:**

Sporotrichosis is a subcutaneous mycosis of global distribution, capable of affecting both humans and animals, and caused by species of the genus *Sporothrix* spp.

### **OBJECTIVES:**

This study aimed to evaluate the genetic diversity and mating type distribution of clinical isolates of human sporotrichosis in Paraíba, Brazil, to better understand the population structure, epidemiology, and diversification of this pathogen, as well as to explore possible transmission routes.

### **METHODS:**

A total of 36 clinical isolates were morphologically identified, and clinical and demographic data were collected. Fungal DNA extraction was then performed, followed by species-specific PCR using markers targeting the calmodulin gene. The mating type idiomorph of the species was identified by PCR using primers targeting the MAT1-1 and MAT1-2 loci. Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) was used to evaluate the genetic variability of *Sporothrix* spp.

### **RESULTS:**

The distribution of the disease identified that all cases occurred in João Pessoa and adjacent cities. From the 36 isolates, the majority (75%) being affected females, a prevalent occurrence of the lymphocutaneous form, and 98% zoonotic transmission were confirmed. Micro- and macromorphological structures were similar to each other, confirming *Sporothrix* spp. All isolates were confirmed as *S. brasiliensis* and the presence of a single sexual idiomorph, MAT1-2, was detected. The AFLP results indicate the possibility of the circulation of one or two genetic groups in João Pessoa and the metropolitan region.

### **CONCLUSIONS:**

To our knowledge, this is the first time isolates in the Paraíba state are genetically characterized, all identified as *Sporothrix brasiliensis*. It is likely that this species in Paraíba originated from Rio de Janeiro, as all possess the MAT1-2 idiomorph - indicating low intergenotypic variation.

**Keywords:** Sporotrichosis; identification; molecular; *Sporothrix brasiliensis*; epidemiology; morphology; species-specific.

## INTRODUCTION

Sporotrichosis is a fungal disease, which can be either acute or chronic, caused by thermodimorphic fungi, and belonging to the clinical clade of *Sporothrix* spp. It affects humans and animals (primarily) through traumatic implantation of the fungus into the skin. The clade includes the following species: *Sporothrix schenckii* (*sensu stricto*), *S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. luriei*, and *S. Mexicana*<sup>1-2</sup>.

The classic transmission of sporotrichosis is sapronotic, via the traumatic implantation of fungal propagules into subcutaneous tissue, and is often related to contact with contaminated plants and soil. It is also commonly associated with occupational or recreational activities such as gardening, floriculture, and agriculture. However, zoonotic transmission has recently advanced, particularly with the involvement of cats in the sporotrichosis transmission route<sup>3-5</sup>.

Sporotrichosis is a neglected disease and is not a notifiable disease in all regions where it occurs, so its exact prevalence is unknown. Since 1998, Brazil has experienced an advance of the disease, particularly in the southeast, with the state of Rio de Janeiro and Rio Grande do Sul reporting the highest number of cases<sup>6-7</sup>. Recently, there has also been an increase in the incidence of sporotrichosis outbreaks in cats and humans in the northeastern region of Brazil, particularly in Rio Grande do Norte and Pernambuco, states neighboring Paraíba<sup>8-9</sup>.

Laboratory diagnosis of infection is usually performed by isolating and identifying the microorganism using culture (gold standard), since direct mycological or histopathological examination of human clinical samples presents low sensitivity. However, the identification of species in the clinical clade of *Sporothrix* by phenotypic methods is unreliable, necessitating an alternative, such as molecular analysis by species-specific Polymerase Chain Reaction (PCR)<sup>7,10,5</sup>.

In Paraíba, human sporotrichosis became a notifiable disease in 2018. According to the epidemiological bulletin from the State Health Department of Paraíba, the number of notifications per year has been increasing, with 711 cases reported in 2019 and 577 cases in 2023. Therefore, it has become essential to investigate the epidemiological characteristics of the mycosis in these cases, and the species distribution involved, since there are currently no molecular data on *Sporothrix* spp. in the state of Paraíba.

Additionally, understanding the phylogenetic variability of *Sporothrix* spp. is crucial as it may provide insights into potential mutation rates in the fungal progeny. Given the importance of the *Sporothrix* genus as an infection causing agent in humans, and the lack of clinical-epidemiological data in Paraiba (Brazil), this study aimed to capture the distribution and biological behavior of the *Sporothrix* species involved in these cases.

## **MATERIALS E METHODS**

### **Ethics statement**

The authors confirm that the ethical policies of the journal, as noted on the journal's author guidelines page, have been adhered to and the appropriate ethical review committee approval has been received. All clinical and demographic data of the patient were collected in accordance with the Local Research Ethics Committee from the Federal University of Paraiba, approved under number 65629622.0.0000.5188. The written consent was waived because of data anonymization and commitment to preserve the identity of the patients.

### **Sporothrix Isolates**

A total of 36 *Sporothrix* isolates from clinical origin were included in this study. The clinical isolates were retrieved from patients with clinically suspected sporotrichosis attending the University Hospital Lauro Wanderley (HULW), Federal University of Paraiba (UFPB), between 2019 and 2020. The isolates were grown on Sabouraud dextrose agar slants (SDA; Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) for 7-14 days at 25°C. Colonies that exhibited morphological aspects similar to *Sporothrix* sp. were subcultured and stocked in glass tubes with water supplemented with chloramphenicol at room temperature for further identification<sup>11</sup>. The clinical data the patients were collected from their respective medical records, within SM - ULAC do HULW, following the hospital ethical standards.

### **Morphological Characterization of *Sporothrix* isolates**

*Sporothrix* isolates were identified according to established methods described by Marimon *et al.*, 2007<sup>12</sup>. Characteristics of vegetative and reproductive mycelium were analysed in micromorphology (presence of hyphae, pigmentation, and arrangement of conidia) and macromorphology (diameter, texture, and colour of colonies). Morphological characters were evaluated from cultures grown on Potato Dextrose Agar (PDA) (200 g potato, 15 g dextrose,

15 g agar, and 1-liter distilled water) at 25°C for 14 days. For the microscopic characterization of the isolates, the following were studied: the presence or absence of sessile conidia, the shape, colouring, ornamentation, arrangement of the conidia using the Ridell (1950) microculture technique<sup>13</sup>. After growth, it was read using a Nikon Eclipse Ci® optical microscope.

## **Molecular Identification**

### **Extraction of genomic DNA**

Genomic DNA was extracted and purified directly from 14-dayold monosporic colonies grown on Sabouraud Dextrose Agar (SDA) (Difco™ BD/Sparks, MD, EUA) using the Fast DNA kit (MP Biomedicals, Vista, CA, EUA), as previously described by Rodrigues et al<sup>14</sup>. DNA concentrations were estimated on a NanoDrop 2000 spectrophotometer (ThermoFisher Scientific, Wilmington, DE, USA) and stored at –20°C until use<sup>14</sup>.

### **Species-specific PCR**

All DNA that was extracted from the isolates was characterized to the species level, using species-specific Polymerase Chain Reaction (PCR) assay that targets fragments of the calmodulin gene<sup>14</sup>. Reference strains of (*S. brasiliensis* – Ss08) and the negative control (absence of DNA) were used as control samples. PCR products were analysed by 1.2% agarose gel electrophoresis at 100 V for 1 hour in the presence of GelRed (Biotium, Hayward, CA, EUA). Bands were visualized with UV light equipment L-Pix (Loccus Biotecnologia, São Paulo, Brazil)<sup>14</sup>.

### **PCR detection of mating-type (MAT) gene**

The extracted DNA was also used to perform selective PCR for the MAT locus using primers for the MAT1-1 and MAT1-2 targets described by Carvalho<sup>39</sup>. Reference strains of each corresponding idiomorph were used as positive controls. Amplicons of 673 pb were observed for isolates MAT1-1 and 291 pb for MAT1-2.

### **Amplified fragment length polymorphism (AFLP) fingerprinting**

The extracted DNA was purified using a genomic DNA purification kit to perform AFLP using the protocol by Vos et al. (1995) with the modifications described by Carvalho et al. (2020)<sup>15,6</sup>. Briefly, *Sporothrix* genomic DNA (200 ng) was digested using the restriction

enzymes EcoRI (GAATTC) and MseI (TTAA) and connected to the EcoRI and MseI adapters simultaneously. A pre-selective PCR was performed with the primers EcoRI+0 and MseI+0<sup>15</sup>. Finally, a selective PCR was performed using the EcoRI Primer with two base selection (5'-GAC TGC GTA CCA ATT CNN-3') labelled with 6-carboxyfluorescein (FAM; blue) and the unlabelled MseI primer with selection of two bases (5'-GAT GAG TCC TGA GTA ANN-3'). Two combinations were used for genotyping *Sporothrix* isolates (#3 EcoRIGA/MseI-TT and #5 EcoRI-GA/MseI-AG). AFLP fragments were resolved by capillary electrophoresis with an ABI3730xl genetic analyser alongside a GeneScan LIZ600 Internal Size Standard (35–600 bp; Applied Biosystems Foster City, CA, USA). To evaluate the ability to accurately reproduce results, electropherograms were representative of two independent assays. Fragment analysis was performed using the BioNumerics v. software. 7.6 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium).

### **Analysis of AFLP data**

In relation to the raw data generated by AFLP, only strong and high-quality fragments with sizes between 50 and 500 base pairs were considered. Peak patterns were converted into a binary matrix considering the presence (1) or absence (0) of fragments in certain positions, as described by Carvalho et al., 2020<sup>6</sup>. From these data, genetic distance was calculated using Jaccard's similarity coefficient and dendrograms were constructed using the unweighted pairwise average arithmetic method (UPGMA) in order to verify the relationship between the different *Sporothrix* species. Also to evaluate the diversity and evolutionary relationship between species, the minimum spanning tree model (MST), principal component analysis (PCA), multidimensional scaling (MDS) and self-organizing map (SOM) were performed as described by Carvalho et. al. (2020) and Carvalho et al. (2021b)<sup>6,39</sup>.

Basically, the MST provides an indication of evolutionary directionality, which can even be used to understand the transmission of pathogens. It is a tree that connects all samples to minimize branch distances, the oldest isolates are in the middle and the younger at terminal nodes<sup>17</sup>. Reduction and dimensional methods (PCA and MDS) were used to generate three-dimensional graphs that represent how isolates are dispersed according to their similarity. And finally, the SOM is an artificial learning neural network that also organizes based on similarity, but in a two-dimensional way (map), the lighter shades of grey and thicker lines indicate greater genetic distance between the isolates<sup>6,39</sup>. All figures generated in Corel Draw X8 (Corel, Ottawa, ON, Canada).

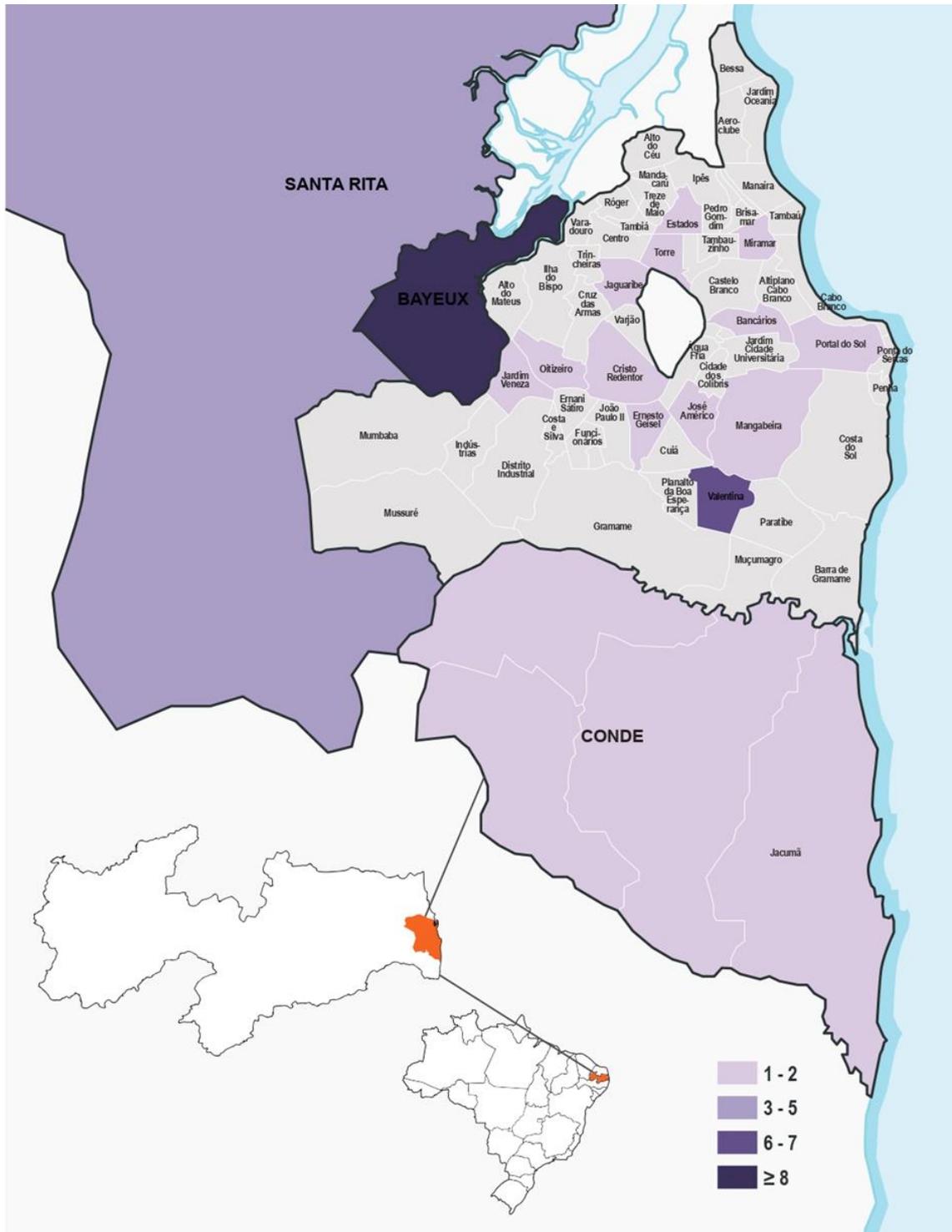
## RESULTS

### Population Distribution

According to our results, *Sporothrix brasiliensis* was the only species identified, both in metropolitan regions and city neighborhoods. It should be noted that this data only includes patients treated at the Lauro Wanderley University Hospital, by the infectious disease service, which is a reference center for sporotrichosis.

The distribution of the disease according to the residence of the infected individuals revealed that all of the cases occurred in urban areas. Twenty-two patients resided in the city of João Pessoa, state of Paraíba. Of these, 12 cases occurred in the southern part of the city, with the highest concentration in the Valentina neighborhood, this was followed by 5 cases in the western part of the city, while the eastern and northern city sectors presented 3 and 2 cases, respectively. Additionally, 14 cases occurred in neighboring municipalities, with Bayeux presenting the highest rate, followed by Santa Rita, Conde, and Jacumã. These data are illustrated in Figure 1.

**Figure 1** Geographic distribution and prevalence of *Sporothrix* species, between 2019 and 2020 in the city of João Pessoa-PB (n=36)



### Epidemiological and clinical characteristics of the population

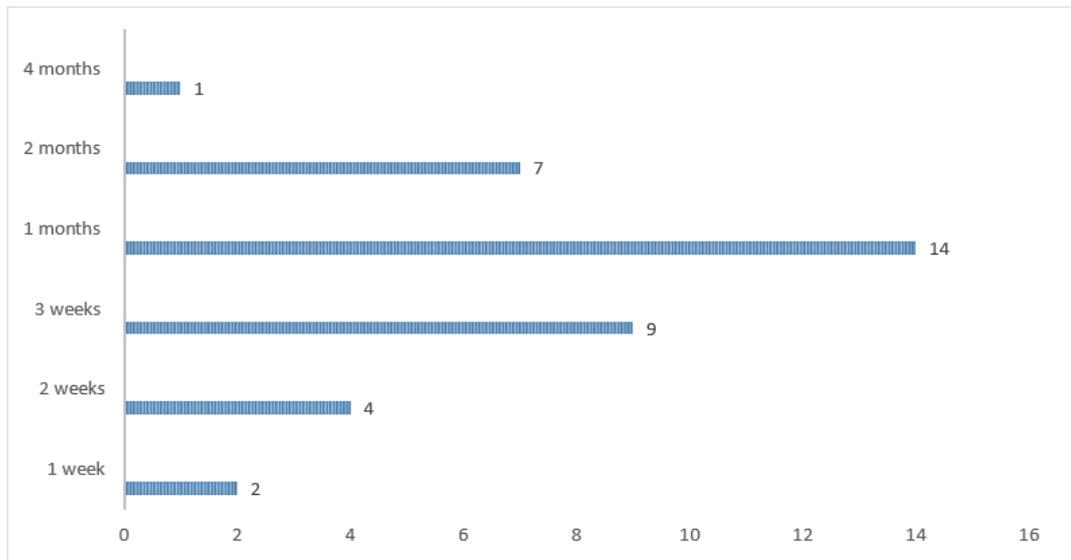
Based on the data collected from the patients included in this investigation, shown in Table 1, the majority were female (n = 27, 75%) and 25% (n = 9) were male. As to clinical forms, all cases presented a history of cutaneous sporotrichosis, located on the lower or upper limbs, in either the fixed cutaneous or lymphocutaneous form, with the latter form being more prevalent, representing 69% of the cases. Detailing the source of infection, it was found that most cases involved reports of accidents with animals, principally infected cats, characterizing a zoonotic transmission route.

A time variation between the onset of the first symptoms and the definitive diagnosis, ranging from 1 week to 4 months was noted. As illustrated in the figure 2, most patients (n = 23) were diagnosed between 3 weeks and 1 month after the appearance of initial signs and symptoms.

**Table 1-** Clinical and epidemiological characteristics of patients with sporotrichosis included in this study (n = 36).

<b>Variables</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
<b>Gender</b>		
Female	27	75%
Male	9	15%
<b>Clinical presentation</b>		
Lymphocutaneous	25	69%
Cutaneous-Fixed	11	31%
Disseminated	0	0%
<b>Source of infection</b>		
Zoonosis	34	98%
Environmental	2	2%

**Figure 2-** Time between the onset of the first symptoms of sporotrichosis and the definitive diagnosis in study patients (n = 36).

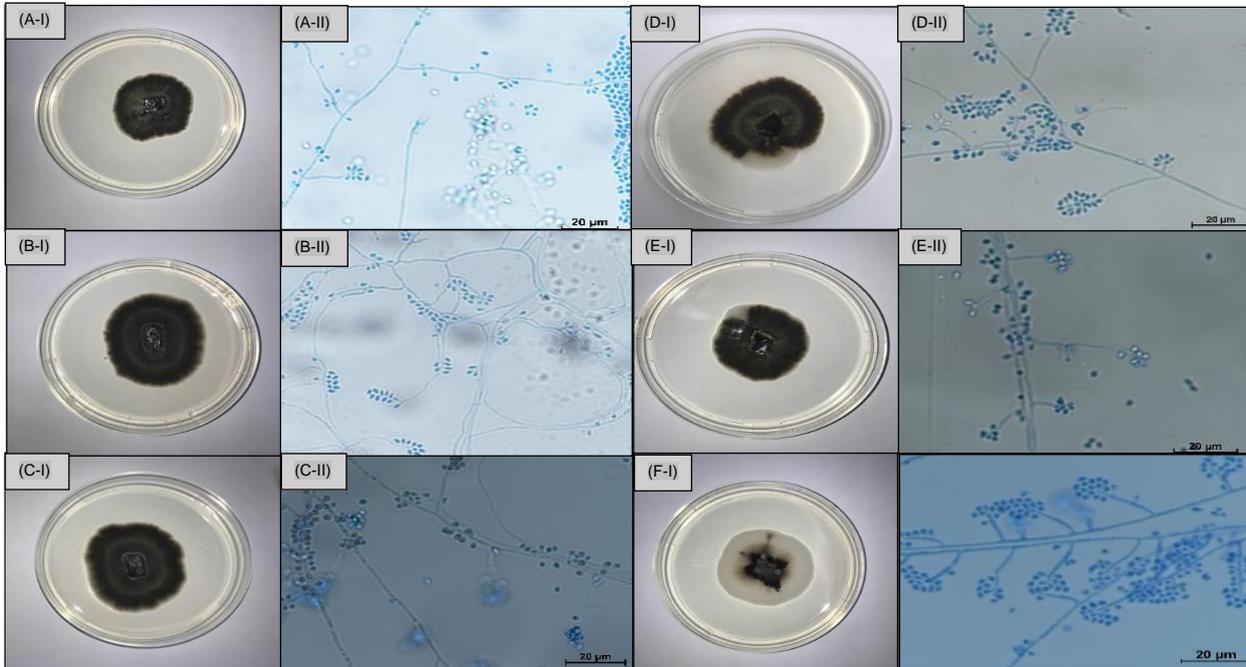


### Macromorphology and Micromorphology

Based on macro and micromorphological characteristics, the 36 isolates were identified as *Sporothrix* spp. The strains replicated on PDA medium at 25°C for 21 days. Macromorphological characteristics of the colonies varied in pigmentation and melanin production. These were divided into two categories: black and mixed. Black colonies predominated, comprising 58% (21) of the samples, displaying black frontal sides with intense melanin production. However, some strains presented mixed characteristics, exhibiting a combination of black and white colours. The colonies reached a diameter of 33 to 51 mm; all presented slightly wrinkled surfaces, defined zones, and beige to transparent peripheries (Figure 3).

Micromorphological analyses revealed similar arrangements. Hyaline, septate, and branched hyphae were observed, along with clusters of small, hyaline sympodial conidia at the ends of the conidiophores, and pigmented sessile conidia, which were brown to dark brown in colour, with thick walls, being globose to subglobose in shape. The average area of the conidia was from 5.78 to 3.38  $\mu\text{m}^2$ , with the pigmented conidia presenting a larger area compared to the hyaline conidia present in the analysed slides (Figure 3).

**Figure 3-** Macro and micromorphology of the *Sporothrix brasiliensis* identified in the study cultivated on PDA at 25°C for 14 days. AI-CI: black pigmented colonies. AII-CII: Hyaline hyphae containing some dematiaceous conidia. DI-FI: Colonies with mixed pigmentation. DII-FII: Hyaline hyphae containing some dematiaceous conidia. Scale bars: 20 µm.



### Species and Mating-Type Idiomorph Identification

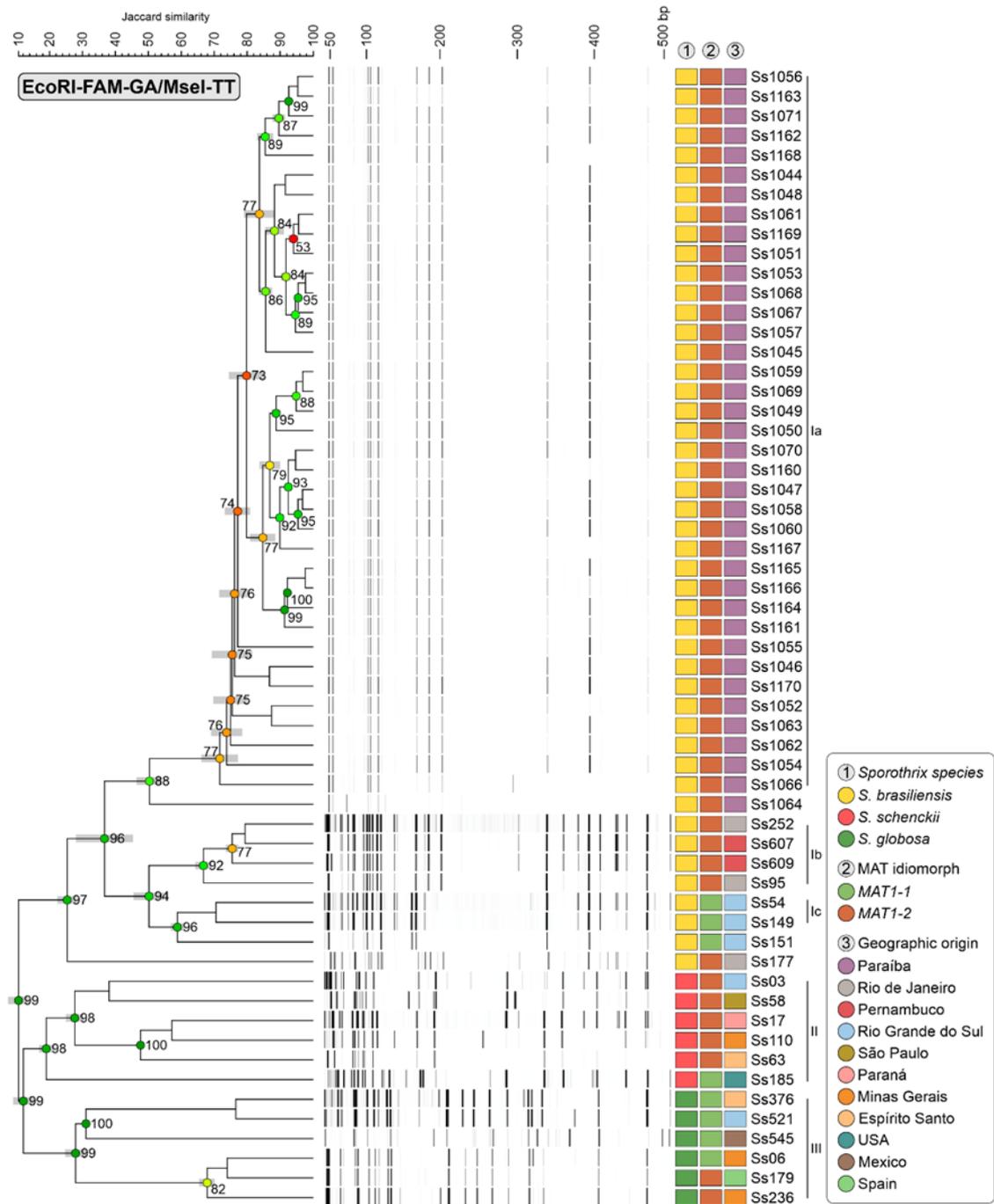
For species-level identification, the isolates 36 were evaluated using species-specific PCR. All samples were identified as *S. brasiliensis*. Additionally, mating type was verified through selective PCR for mating type genes, represented by the idiomorphs MAT1-1 or MAT1-2. The results indicated the presence of a single idiomorph (MAT1-2) in each tested isolate.

Typical AFLP dendrograms based on Jaccard's similarity coefficient were used to assess the diversity within the *Sporothrix brasiliensis* isolates samples. Two markers were employed to verify the genetic variation of the agents (#3 EcoRI-GA/MseI-TT and #5 EcoRI-GA/MseI-AG). In total, 178 fragment points were amplified in the range of 50 to 500 bp, as shown in Figures 4 and 5. After analyzing the AFLP results, three main groups were observed in both dendrograms for the respective markers #3 EcoRI-GA/MseI-TT and #5 EcoRI-GA/MseI-AG: group I (JS = 25.354% ± 2.38%) and (JS = 24.787% ± 2.25%) consisting of reference and clinical strains of *S. brasiliensis*; group II (JS = 18.980% ± 1.57%) and (JS = 25.393% ± 2.33%) containing reference isolates of *S. schenckii*, and group III (JS = 27.900% ± 2.57%) and (JS =

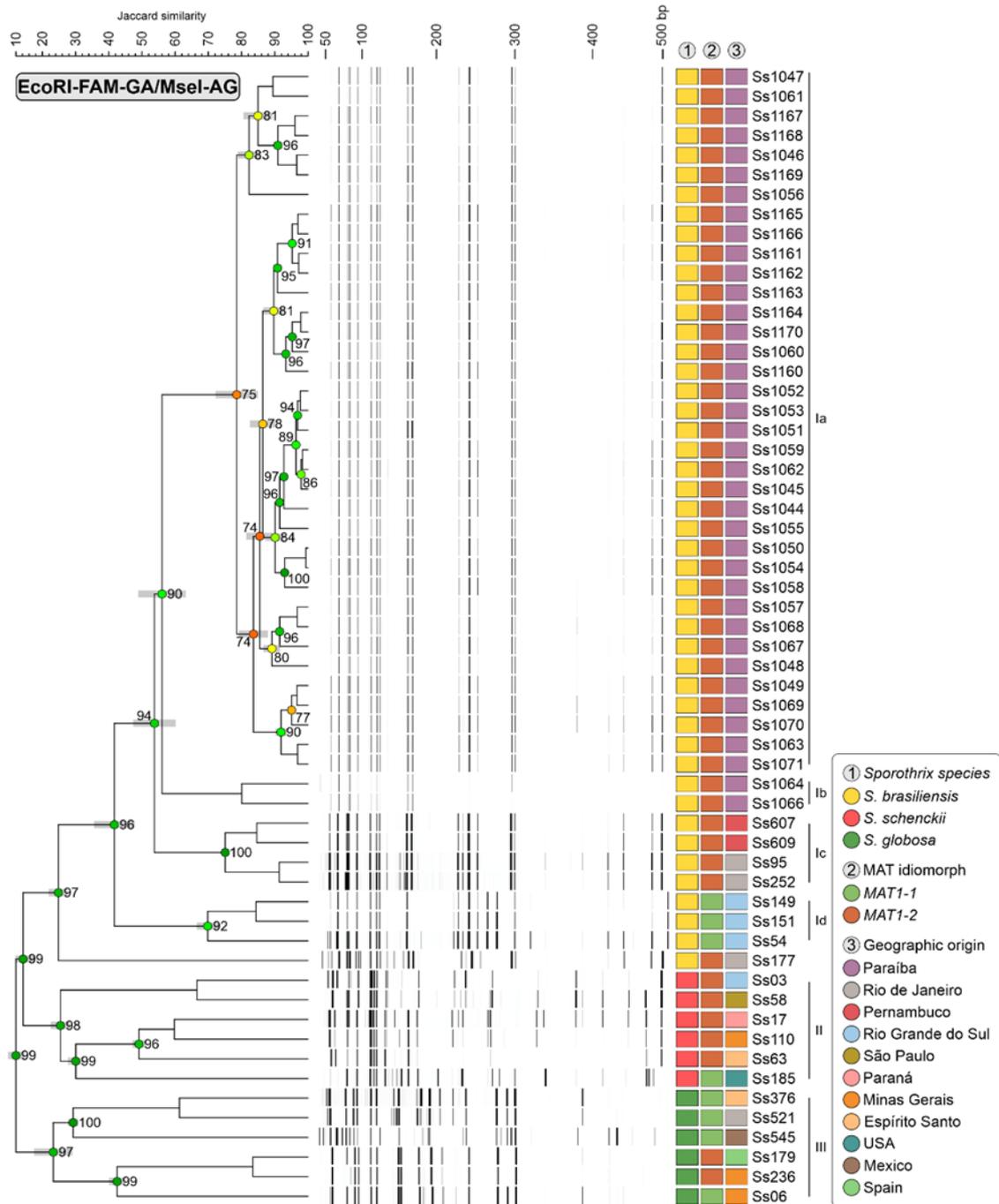
23.247%  $\pm$  5.14%) formed by reference strains of *S. globosa*. High cophenetic correlation coefficients ( $\geq 99\%$ ) were observed in the branches separating these groups.

In the #3 EcoRI-GA/MseI-TT dendrogram (Figure 4), group I isolates are divided into three subclades (Ia, Ib, and Ic). Subclade Ia (JS = 71.640%  $\pm$  4.99%) consists exclusively of clinical isolates from João Pessoa and adjacent cities, indicating the circulation of a single genetic group in this region. Subclades Ib (JS = 66.680%  $\pm$  1.77%) and Ic (JS = 70.500%  $\pm$  0.00%) comprise the reference strains from various regions of Brazil. In the #5 EcoRI-GA/MseI-AG combination (Figure 5), group I was divided into four subclades (Ia, Ib, Ic, and Id). Subclades Ia (JS = 78.487%  $\pm$  5.75%) and Ib (JS = 79.980%  $\pm$  0.00%) consist exclusively of clinical isolates from João Pessoa and adjacent cities, indicating the circulation of at least two genetic groups in this region. Subclades Ic (JS = 75.047%  $\pm$  0.42%) and Id (JS = 69.747%  $\pm$  2.60%) are formed by reference strains from various regions of Brazil.

**Figure 4-**The dendrogram depicts the cluster profile generated by the AFLP method. The dataset consisted of 46 *S. brasiliensis* isolates (38 clinical isolates from Paraíba and 8 reference strains), 6 *S. schenckii* (reference strains), 6 *S. globosa* (reference strains). The dendrograms were constructed using the Jaccard similarity coefficient and UPGMA clustering algorithm in BioNumerics software v7.6.

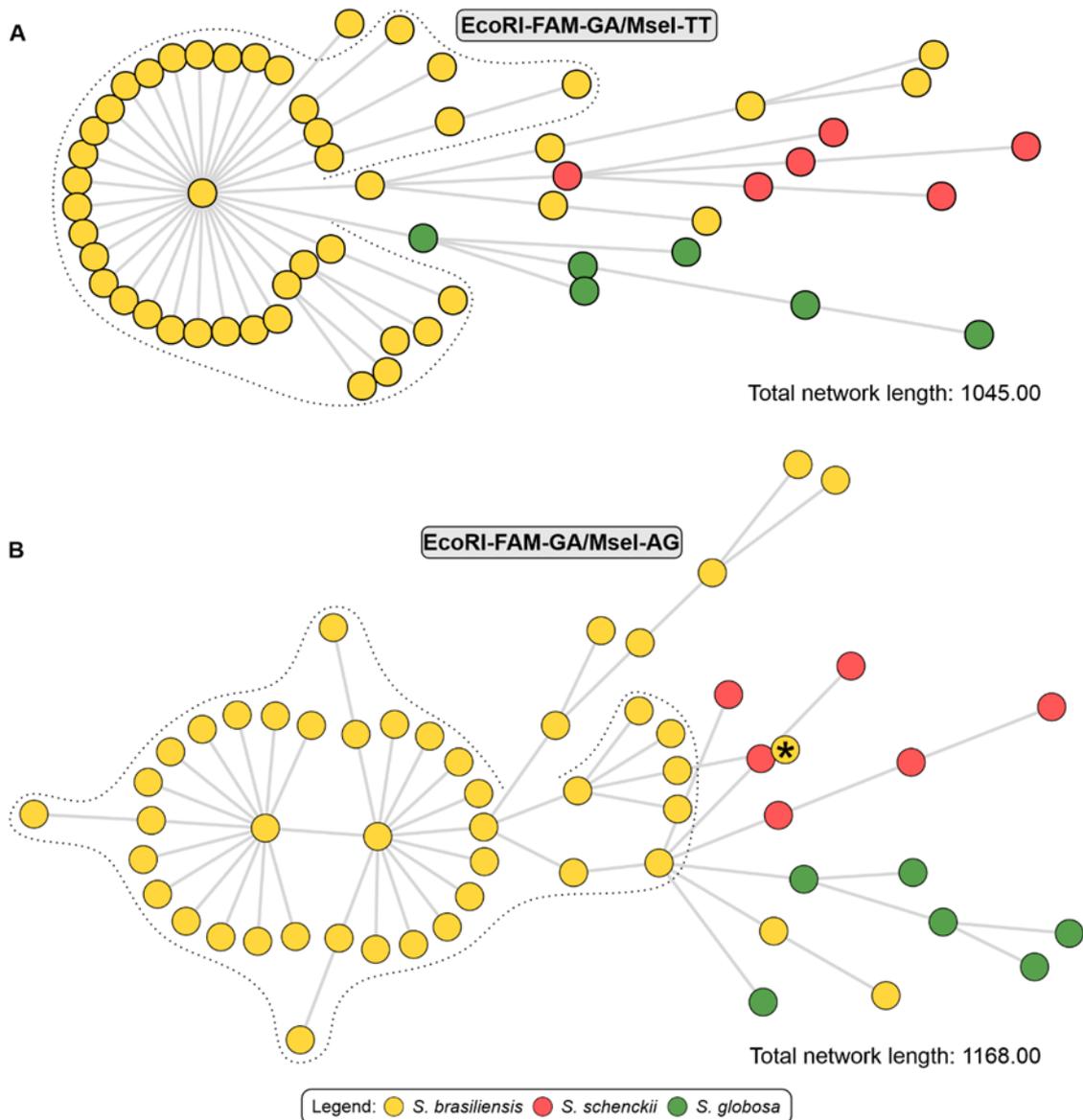


**Figure 5-**The dendrogram depicts the cluster profile generated by the AFLP method. The dataset consistd of 46 *S. brasiliensis* isolates (38 clinical isolates from Paraíba and 8 reference strains), 6 of *S. schenckii* (reference strains), 6 of *S. globosa* (reference strains). The dendrograms were constructed using the Jaccard similarity coefficient and UPGMA clustering algorithm in BioNumerics software v7.6.



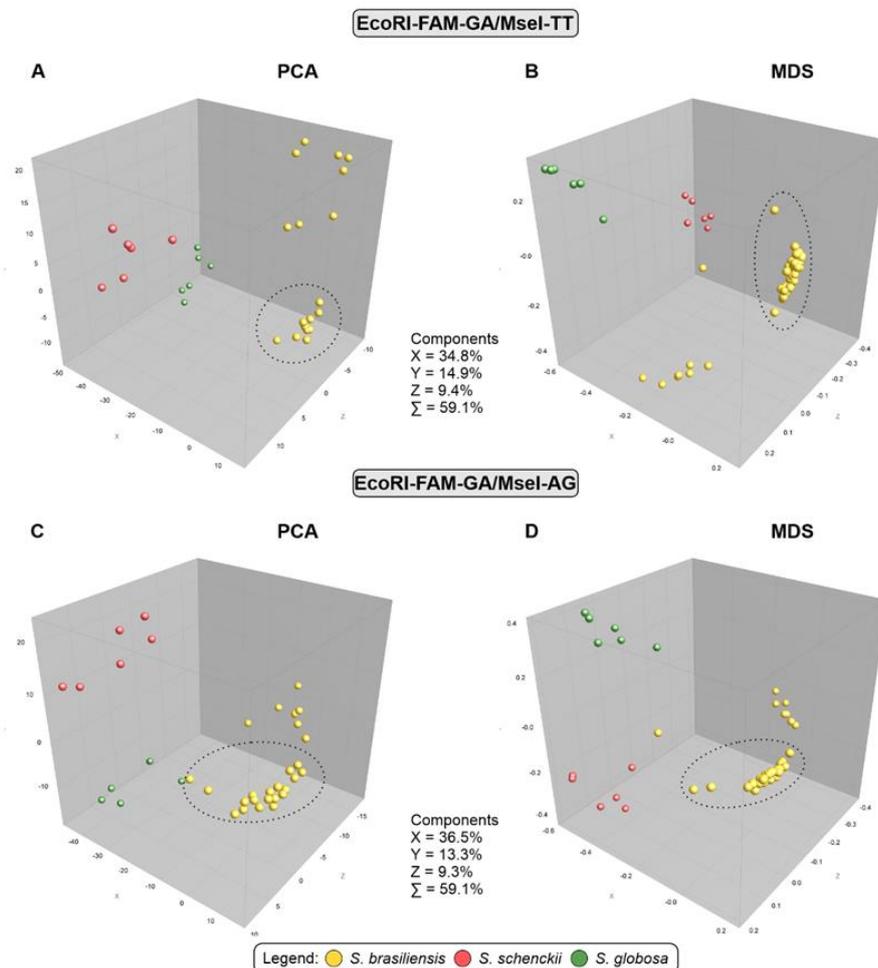
The marker characteristics for the primer combinations used in the AFLP reaction are provided in Table 2 (additional), which revealed the excellent ability of each primer combination to detect intra- and interspecific polymorphisms.

**Figure 6-** Minimum Spanning Tree (MST) derived from AFLP data. The dataset consists of 46 *S. brasiliensis* isolates (38 clinical isolates from Paraíba and 8 reference strains), 6 of *S. schenckii* (reference strains), 6 of *S. globosa* (reference strains). The dotted lines represent the cluster profile obtained by the AFLP method of *S. brasiliensis* isolates from Paraíba. The analysis was performed using the BioNumerics



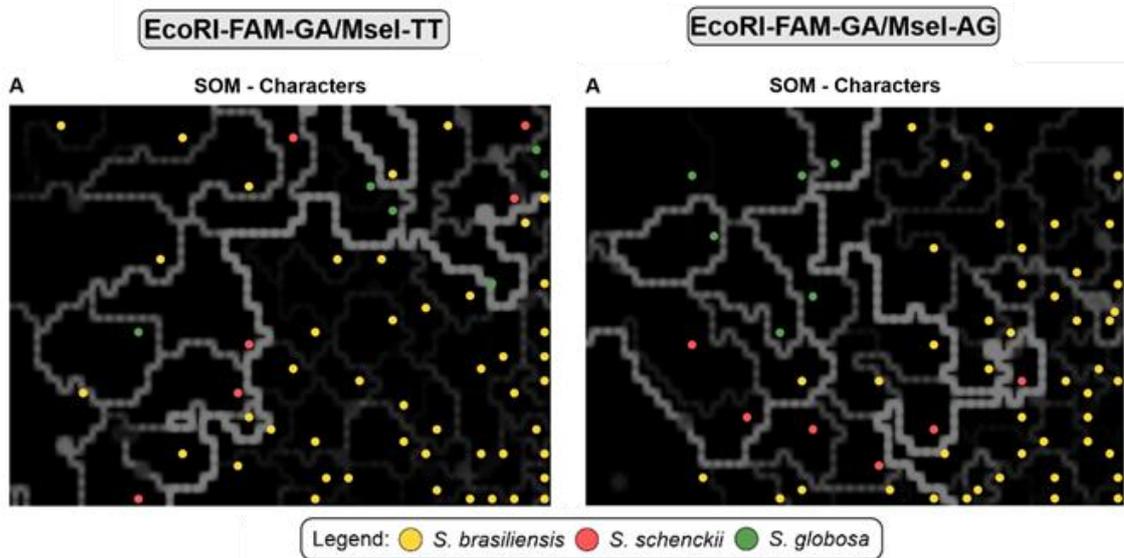
Cluster analysis performed based on MST (Figure 6) identified evidence of genotypic dispersion in João Pessoa and metropolitan regions, where the main genetic groups circulating in recent outbreaks transmitted by cats are related to genotypes of *S. brasiliensis* that occur in the states of Rio de Janeiro and Pernambuco, this proximity can also be seen in the dendrograms #5 EcoRI-GA/MseI-AG. Next, the population structure was evaluated using multivariate analyses such as Principal Component Analysis (PCA) and Multidimensional Scaling (MDS), represented by graphs in Figure 7. It was possible to visualize the subdivision of genetic groups formed in both graphs, and a small intraspecific genetic diversity among the isolates from Paraíba. The PCA combination (#3 and #5) revealed the cumulative percentage sum of the first three components (X, Y, and Z), which was 59.1% for both, indicating a robust genetic structure.

**Figure 7**– Principal component analysis (PCA) and multidimensional scaling (MDS)  
The dataset consists of 46 isolates of *S. brasiliensis* (38 clinical isolates from Paraíba and 8 reference strains), 6 of *S. schenckii* (reference strains), 6 of *S. globosa* (reference strains). The isolates were plotted in three-dimensional space and colored according to genetic groups. The analysis was performed using the BioNumerics software v7.6.



Analysis of the SOM results (Figure 8-A) shows neural networks where the presence of reconstructed scenarios in *S. brasiliensis* genotypes can be observed, and also indicates little intraspecific diversity between isolates, which is characteristic of outbreaks from a common source, such as occurs in the transmission of sporotrichosis by cats. On the other hand, genetic distance between species can also be observed.

**Figure 8-** Distribution of *Sporothrix* spp. Genotypes generated by AFLP using a Self-Organizing Map (SOM) Kohonen maps using characters. A total of 46 *S. brasiliensis* isolates (38 clinical isolates from Paraíba and 8 reference strains), 6 of *S. schenckii* (reference strains) and 6 of *S. globosa* (reference strains) were included in this study. The dimensioning analyses were performed using BioNumerics v7.6 to assess the consistency of the differentiation of the populations defined by the cluster analysis. The distance between black blocks can be inferred by observing the thickness and brightness of the lines (white, grey) connecting them. The thicker and lighter the line, the greater the distance between the samples in the black blocks and their neighboring blocks. Isolates were assigned specific colors corresponding to their genetic groups.



## DISCUSSION

Regarding the epidemiological profile of the patients included in this study, the majority were female, similar to findings for an outbreak in southern Brazil<sup>18</sup>. Despite this mycosis affecting people regardless of age and sex, occupational activities and animal contact influence the infection rate in distinct populations. Studies indicate a high incidence among women due to more contact with felines; currently the primary transmission source of infection to<sup>19,20</sup>.

The main clinical presentations and their anatomical locations in the isolates of this study are consistent with the literature, revealing higher incidences on the lower and upper limbs, which are more exposed areas, and at risk of fungal inoculation through trauma, resulting primarily in cutaneous lesions, with or without lymphatic involvement<sup>18</sup>. From the data collected, a prolonged period between lesion onset and diagnosis of up to 4 months was

observed. This suggests that sporotrichosis continues as a neglected disease, and despite diagnostic advances, immediate clinical suspicion is often lacking due to limited specific information concerning these infections<sup>21,22</sup>.

Cases of human sporotrichosis have been reported in nearly all 26 Brazilian states and are directly related to feline *S. brasiliensis* transmission, predominantly concentrated in the southwest and southern regions of the country<sup>23</sup>. However, dissemination is increasing in the Brazilian northeast<sup>24</sup>.

The capital of Paraíba, João Pessoa, is divided into four zones: south, east, north, and west. Of these zones, the southern zone stands out for its high number of reported cases. This is followed by the metropolitan regions, which may be partly explained by urban expansion. Characteristically, this is a diverse environment comprising areas engaged in both rural and urban activities in a single space. Alzuguir et al., 2020 have also noted a higher incidence of the disease in Rio de Janeiro, in areas with low per capita income and inadequate sanitation infrastructure<sup>25</sup>.

In this study, socioeconomic characteristics were not studied by locality, but a higher number of cases were observed in regions presenting recent urbanization. During mating season, cats can roam up to 6 km, transmitting disease to other neighborhoods. This behavior may be responsible for the spread, and explain the occurrence of cases in adjacent areas<sup>26</sup>.

The phenotypic characterization of *Sporothrix* spp. isolates in this study revealed an average colony growth of 39 mm, with dark brown to black pigmentation associated with melanin production in the fungal cell structure. One hypothesis for this dark coloration could be the warmer climate in this region of Brazil, where increased temperatures may have prompted the fungus to develop defense mechanisms to enhance its thermotolerance. Melanin is an important virulence factor, crucial for the organism's survival within the environment and against aggressions it might encounter as well<sup>27</sup>.

Microscopic analysis revealed abundant production of pigmented sessile conidia in all 36 strains, displaying similar morphology among them. Septate and branched hyphae were observed, with conidiophores producing pear-shaped/oval hyaline conidia, along with globose or subglobose conidia with dark pigmentation indicating the presence of melanin. These characteristics are consistent with previous studies associating *S. brasiliensis* with higher quantities of dematiaceous globose conidia<sup>12,23</sup>.

In human sporotrichosis diagnoses, mycological culture is considered the gold standard, despite specific limitations. *Sporothrix* species are morphologically and physiologically very

similar, making phenotypic identification imprecise, with identification periods (depending on fungal colony growth) ranging from 5 to 10 days. These factors directly impact the need for early diagnosis and epidemiological control of species circulating within Brazil<sup>28,29</sup>. Molecular diagnosis plays a crucial role in managing treatment, reducing identification time, and providing more accurate results. It is also epidemiologically important for recognizing outbreaks involving the varied *Sporothrix* species<sup>7</sup>. All samples in this study were identified through species-specific PCR as *S. brasiliensis*, since 2013, the most commonly isolated species in Brazil for feline sporotrichosis. *S. brasiliensis* is the most virulent species in the complex, associated with more severe clinical presentations in humans and infections in animals, from with zoonotic transmission. Moreover, in Brazil, *S. brasiliensis* is considered the center of dispersion, and generally presents better responses to antifungals (both *in vitro* and *in vivo*) when compared to other species<sup>30,31,32,3,33,34,7,35</sup>.

The results of this study provide insights into the genetic diversity and population structure of *Sporothrix brasiliensis* in greater João Pessoa and its metropolitan region. Finding only *S. brasiliensis*, MAT1-2, and the analysis of AFLP fragments revealing low intra-specific diversity suggests a single transmission route in the region, likely being predominantly clonal, unlike isolates from Espírito Santo where samples of *S. schenckii* and both idiomorphs were found<sup>36</sup>.

Further, the origin of the samples found in Paraíba is likely Rio de Janeiro, since when analyzing the infection routes of *S. brasiliensis* in Brazil, two main types are observed: MAT1-1, prevalent in the states of Minas Gerais and Rio Grande do Sul, and the rest, which belong to Rio de Janeiro, where idiomorph MAT1-2 prevails<sup>37</sup>. This suggests that due to the high frequency of MAT1-2 loci, the *S. brasiliensis* population migrated from Rio de Janeiro (the epicenter of sporotrichosis outbreaks in Brazil) to João Pessoa and neighboring cities<sup>37</sup>. Therefore, the low intra-specific diversity found among the samples in this study and the probable origin and migration direction from southeast to northeast are suggestive of a founder effect described by Carvalho et al., 2021 in other samples from the Northeast region, which aids in understanding the dynamics of *S. brasiliensis* expansion in Brazil<sup>6</sup>.

The effect is explained by the hypothesis that a parental genotype, in this case from Rio de Janeiro, migrates to a particular region, leading to direct horizontal transmission between animals, and establishing and generating a founder population. The result is fewer circulating genotype variations in the region, as observed in the isolates of this study<sup>38,39</sup>. Thus, there is a need to establish sanitary barriers to contain greater dissemination. Further studies, including

samples from other cities in the state of Paraíba farther from the capital, may find *S. brasiliensis* isolates with greater intra-specific diversity.

Despite the close genetic relationship of the isolates found in Paraíba with samples from Rio de Janeiro and neighboring Pernambuco, they do not cluster in the same clade. According to Thines (2019), diversification through host shifts is generally followed by radiation, specialization, and speciation, a result of the evolutionary process of effective adaptation to the new host<sup>40</sup>.

In addition, the characteristics of the markers highlighted in Table 2 (suplementar) confirm the low diversity of *S. brasiliensis*, this, due to the statistical values provided by AFLP, as the data show that the primers performed well, as observed by Carvalho et al. (2021)<sup>39</sup>.

A high genetic diversity was found among species, as evidenced more clearly in SOM. *S. schenckii* exhibits greater genetic separation, consistent with other studies which report *S. schenckii* as having the highest genetic diversity among *Sporothrix* species<sup>33,6</sup>.

Considering that the study samples were of convenience, covering only the capital and metropolitan regions and the years 2019 to 2020, future studies that expanded the coverage area and period of the study would be important to consolidate this genetic characterization of *Sporothrix* in Paraíba.

## CONCLUSION

In this study, clinical data revealed that sporotrichosis follows a pattern of zoonotic transmission, being primarily by cats. Due to occupational activities, women are most affected, showing higher rates of lymphocutaneous and fixed cutaneous involvement. Additionally, demographic data suggest an epidemic-urban profile in the Paraíba region.

Micro- and macromorphological criteria enabled identification of the disease-causing genus; however, in species identification, molecular tools were proven to be more precise.

This study characterizes genetically, for the first time, the *Sporothrix* isolates from Paraíba. The only idiomorph found was MAT1-2, with low intra-genotypic variation observed as compared to *S. brasiliensis* samples from other states, suggesting a founder effect in Paraíba isolates, likely originating from Rio de Janeiro. We therefore see the need to implement sanitary barriers, as well as molecular diagnostic tools to effectively control and mitigate the disease.

## REFERENCES

1 Conceição-Silva FM, Fernanda Nazaré. Immunopathogenesis of human sporotrichosis: what we already know. **Journal Of Fungi**. 2018, v. 4, n. 3, p. 89. doi:10.3390/jof4030089.

- 2 Bento AO, Costa ASS, Lima SL, do Monte Alves M, Melo ASA, Rodrigues AM, Rocha WPS & Chaves GM. The spread of cat-transmitted sporotrichosis due to *Sporothrix brasiliensis* in Brazil towards the Northeast region. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. 2021, 15(8), e0009693. doi: 10.1371/journal.pntd.0009693.
- 3 Gremião, Isabella Dib Ferreira, Miranga LHM, Reis EG, Rodrigues AM, & Pereira SA. Zoonotic epidemic of sporotrichosis: cat to human transmission. **Plos Pathogens**. 2017, v. 13, n. 1, p. e1006077. doi:10.1371/journal.ppat.1006077.
- 4 Redigueri BC, da Cruz Bahiense I, De Carvalho JA, Leite GR, Falqueto A, Rodrigues AM, & Gonçalves SS. Clinical, epidemiological, and epizootic features of *Sporothrix brasiliensis* in Espírito Santo, Brazil. **Ecohealth**, 2022, 19(1), 124-134. doi:10.1007/s10393-022-01578-8.
- 5 Rodrigues AM, de Hoog GS, & de Camargo ZP. *Sporothrix* species causing outbreaks in animals and humans driven by animal–animal transmission. **PLoS pathogens**. 2016, 12(7), e1005638. doi: 10.1371/journal.ppat.1005638
- 6 de Carvalho JA, Hagen F, Fisher MC, de Camargo ZP, Rodrigues AM. Genome-wide mapping using new AFLP markers to explore intraspecific variation among pathogenic *Sporothrix* species. **PLoS Negl Trop Dis**. 2020 Jul 1;14(7):e0008330. doi: 10.1371/journal.pntd.0008330. PMID: 32609739; PMCID: PMC7329091.
- 7 Lopes-Bezerra LM, Mora-Montes HM, Zhang Y, Nino-Vega G, Rodrigues AM, de Camargo ZP, & de Hoog S. Sporotrichosis between 1898 and 2017: The evolution of knowledge on a changeable disease and on emerging etiological agents. **Medical Mycology**. 2018, 56, S126–S143. Oxford University Press. doi:org/10.1093/mmy/myx103.
- 8 de Oliveira Bento A, de Sena Costa AS, Lima SL, do Monte Alves M, de Azevedo Melo AS, Rodrigues AM, da Silva-Rocha WP, Milan EP & Chaves GM. The spread of cat-transmitted sporotrichosis due to *Sporothrix brasiliensis* in Brazil towards the Northeast region. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. 2021a, 15(8). doi: 10.1371/JOURNAL.PNTD.0009693.
- 9 Silva CE, Valeriano CA, Ferraz CE, Neves RP, Oliveira MME, Silva JCAL, Magalhães V, & Lima-Neto RG. Epidemiological features and geographical expansion of sporotrichosis in the state of Pernambuco, northeastern Brazil. **Future microbiology**. 2021, 16(18), 1371-1379. doi:10.2217/Fmb-2021-0142.
- 10 Ramírez-Soto MC, Aguilar-Ancori EG, Tirado-Sánchez A, & Bonifaz A. Ecological determinants of sporotrichosis etiological agents. **Journal of Fungi**. 2018, 4(3), 1–11. doi:10.3390/jof4030095.
- 11 Brillhante RSN, Silva NF, de Lima RAC, Caetano ÉP, de Alencar LP, de Souza Collares Maia Castelo-Branco D, Moreira JLB, Bandeira SP, de Camargo ZP, Rodrigues AM, de Jesus Pinheiro Gomes Bandeira T, Monteiro AJ, de Aguiar Cordeiro R, Sidrim JJC, & Rocha MFG. Easy storage strategies for *sporothrix* spp. strains. **Biopreservation and Biobanking**. 2015, 13(2), 131–134. doi:10.1089/bio.2014.0071.

- 12 Marimon R, Cano J, Gené J, Sutton DA, Kawasaki M, & Guarro J. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest. **Journal of clinical microbiology**. 2007, 45(10), 3198-3206. doi: [10.1128/JCM.00808-07](https://doi.org/10.1128/JCM.00808-07).
- 13 Riddell, Roland W. Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. **Mycologia**. 1950, v. 42, n. 2, p. 265-270. doi:10.1080/00275514.1950.12017830.
- 14 Rodrigues AM, de Hoog GS, & de Camargo ZP. Molecular diagnosis of pathogenic *Sporothrix* species. **PLoS neglected tropical diseases**. 2015;9(12):1-22. doi:10.1371/journal.pntd.0004190
- 15 Vos Pieter, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Lee TVD, Hornes M, Zabeau M, et al. AFPL: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Res**. 1995, v.23, n. 21, p. 4407-14. doi:10.1093/nar/23.21.4407.
- 17 Salipante SJ, Hall BG. Inadequacies of minimum spanning trees in molecular epidemiology. **J Clin Microbiol**. 2011 Oct;49(10):3568-75. doi: 10.1128/JCM.00919-11.
- 18 Brandolt TM, Madrid IM, Poester VR, Sanchotene KO, Basso RP, Klafke GB, de Lima Rodrigues M, & Xavier MO. Human sporotrichosis: A zoonotic outbreak in Southern Brazil, 2012–2017. **Medical Mycology**. 2019, 57(5), 527–533. doi:10.1093/mmy/myy082.
- 19 Franco de Oliveira JDA, Carolina Cabral de Oliveira A, Cruz CO, Loures GP, da Silva Felipe YF., & Franciscato C. Esporotricose: a importância do diagnóstico para o controle da enfermidade Sporotrichosis: the importance of diagnosis for controlling the disease. **Journal Archives of Health**. 2022, 3(2), 225–229.
- 20 Rudramurthy SM, Shankarnarayan SA, Hemashetter BM, Verma S, Chauhan S, Nath R, Savio J, Capoor M, Kaur H, Ghosh AK, & Chakrabarti A. Phenotypic and molecular characterisation of *Sporothrix globosa* of diverse origin from India. **Brazilian Journal of Microbiology**. 2021, 52(1), 91–100. doi:10.1007/s42770-020-00346-6.
- 21 Alvarez CM, Oliveira MME, & Pires RH. Sporotrichosis: A Review of a Neglected Disease in the Last 50 Years in Brazil. **Microorganisms**. 2022, 10(11), 2152. doi:10.3390/microorganisms10112152.
- 22 Silva MBTD, Costa MMDM, Torres CCDS, Galhardo MCG, Valle ACFD, Magalhães MDAF, Oliveira, RMD et al. Esporotricose urbana: epidemia negligenciada no Rio de Janeiro, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**. 2012, 28, 1867-1880. doi:10.1590/S0102-311X2012001000006
- 23 Rodrigues AM, Gonçalves SS, de Carvalho JA, Borba-Santos LP, Rozental S, & Camargo ZPD. Current progress on epidemiology, diagnosis, and treatment of sporotrichosis and their future trends. **Journal of Fungi**. 2022, 8(8), 776. doi:10.3390/jof8080776.
- 24 de Oliveira Bento A, de Sena Costa AS, Lima SL, do Monte Alves M, de Azevedo Melo AS, Rodrigues AM, da Silva-Rocha WP, Milan EP, & Chaves GM. The spread of cat-transmitted sporotrichosis due to *sporothrix brasiliensis* in brazil towards the Northeast region. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. 2021b, 15(8). doi:10.1371/journal.pntd.0009693.

- 25 Alzuguir CL, Pereira SA, Magalhães MA, Almeida-Paes R, Freitas DF, Oliveira LF, & Pimentel MIF. Geo-epidemiology and socioeconomic aspects of human sporotrichosis in the municipality of Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brazil, between 2007 and 2016. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. 2020, *114*(2), 99-106. doi:10.1093/trstmh/trz081.
- 26 Ferreira JP, Leitão I, Santos-Reis M, & Revilla E. Human-related factors regulate the spatial ecology of domestic cats in sensitive areas for conservation. **PLoS One**. 2011, *6*(10), e25970. doi:10.1371/journal.pone.0025970.
- 27 Orofino-Costa R, Macedo PMD, Rodrigues AM, & Bernardes-Engemann AR. Sporotrichosis: an update on epidemiology, etiopathogenesis, laboratory and clinical therapeutics. **Anais brasileiros de dermatologia**. 2017, *92*, 606-620. doi:10.1590/abd1806-4841.2017279.
- 28 Macêdo-Sales PA de, Souto SRL da S, Destefani CA, Lucena RP de, Rocha EM, & Baptista AR. Laboratory diagnosis of feline sporotrichosis in samples from Rio de Janeiro State, Brazil: imprint cytopathology limitations. **an-mazonian ournal of ealth**. 2018, *9*(2), 7. doi:10.5123/S2176-62232018000200002
- 29 Poester VR, Von Groll A, Munhoz LS, Melo AM, Basso RP, Madrid IM, Mora-Montes, HM & Orzechowski Xavier, M. Species-specific PCR for the diagnosis of sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis*. **Archives of Veterinary Science**. 2021, *26*(3). doi: 10.5380/avs.v26i3.76496.
- 30 Fernandes GF, Santos PO, Rodrigues AM, Sasaki AA, Burger E, Camargo ZP. Characterization of virulence profile, protein secretion and immunogenicity of different *Sporothrix schenckii* sensu stricto isolates compared with *S. globosa* and *S. brasiliensis* species. **Virulence**. 2013;*4*(3):241–9. doi.org/10.4161/viru.23112.
- 31 Rodrigues AM, de Melo Teixeira M, de Hoog GS, Schubach TMP, Pereira SA, Fernandes GF, Bezerra LML, Felipe MS & de Camargo ZP. Phylogenetic analysis reveals a high prevalence of *Sporothrix brasiliensis* in feline sporotrichosis outbreaks. **PLoS neglected tropical diseases**. 2013, *7*(6), e2281. doi:10.1371/journal.pntd.0002281.
- 32 Almeida-Paes R, de Oliveira MME, Freitas DFS, do Valle ACF, Zancopé-Oliveira RM, & Gutierrez-Galhardo MC. Sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: *Sporothrix brasiliensis* is associated with atypical clinical presentations. **PLoS neglected tropical diseases**. 2014, *8*(9), e3094. doi.org/10.1371/journal.pntd.0003094.
- 33 Zhang Y, Hagen F, Stielow B, Rodrigues AM, Samerpitak K, Zhou X, et al. Phylogeography and evolutionary patterns in *Sporothrix* spanning more than 14 000 human and animal case reports. **Personia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**. 2015, *35*(1), 1-20. doi.org/10.3767/003158515X687416.
- 34 Poester VR, Xavier MO, Munhoz LS, Basso RP, Zancopé-Oliveira RM, Freitas DFS, Pasqualotto AC. *Sporothrix brasiliensis* Causing Atypical Sporotrichosis in Brazil: A Systematic Review. **Journal of Fungi**. 2024; *10*(4):287. doi:10.3390/jof10040287

- 35 Rodrigues AM, Della Terra PP, Gremião ID, Pereira SA, Orofino-Costa R, & de Camargo ZP. The threat of emerging and re-emerging pathogenic *Sporothrix* species. **Mycopathologia**. 2020, 185(5), 813-842. doi:10.1007/s11046-020-00425-0.
- 36 Bahiense Rocha, Isabela da Cruz, Della Terra PP, de Oliveira RC, Zanotti RL, Falqueto A, de Camargo ZP, Rodrigues AM, Goncalves SS. Molecular-based assessment of diversity and population structure of *Sporothrix* spp. clinical isolates from Espirito Santo-Brazil. *Mycoses*. 2020, v. 64, n. 4, 2. doi:10.1111/myc.13230.
- 37 Teixeira MDM, Rodrigues AM, Tsui CKM, de Almeida LGP, Van Diepeningen AD, van den Ende BG, Fernandes GF, Kano R, Hamelin RC, Lopes-Bezerra LM, Vasconcelos ATR, de Hoog S, de Camargo ZP, Felipe MSS2015. Asexual Propagation of a Virulent Clone Complex in a Human and Feline Outbreak of Sporotrichosis. **Eukaryot Cell**. 2015, 14. Doi:10.1128/ec.00153-14.
- 38 Gonçalves SS, da Cruz Bahiense Rocha I, Redigueri BC, de Carvalho JA, Maifrede SB, Kruschewsky WLL, Falqueto A, Rodrigues AM. Human and Feline Sporotrichosis in a Reference Center of Southeastern Brazil: Genetic Differentiation, Diversity, and Antifungal Susceptibility of *Sporothrix* Species. **Journal of Fungi**. 2023; 9(8):831. doi:10.3390/jof9080831
- 39 Carvalho JÁ, Beale MA, Hagen F, Fisher MC, Kano R, Bonifaz A, Toriello C, Negroni R, Rego RS de M, Gremião IDF, Pereira SA, de Camargo ZP, & Rodrigues AM. Trends in the molecular epidemiology and population genetics of emerging *Sporothrix* species. **Studies in Mycology**. 2021, 100, 100129. doi: 10.1016/j.simyco.2021.100129.
- 40 Thines M. An evolutionary framework for host shifts - jumping ships for survival. *New Phytol*. 2019 Oct;224(2):605-617. doi: 10.1111/nph.16092. Epub 2019 Sep 9. doi:10.1111/nph.16092.
- 41 Zhang, Y., Hagen, F., Stielow, B., Rodrigues, A. M., Samerpitak, K., Zhou, X., ... & de Hoog, G. S. (2015). Phylogeography and evolutionary patterns in *Sporothrix* spanning more than 14 000 human and animal case reports. *Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 35(1), 1-20. doi:10.3767/003158515X687416.

## ADDITIONAL

**Table 1** - Polymorphic statistics calculated for the combinations #3EcoRI-GA/MseITT and #5 EcoRI-GA/MseIAG for *Sporothrix* spp.

<b>#3 EcoRI-GA/MseI-TT</b>									
<b>Species</b>	<b>Isolates (n)</b>	<b>Fragments</b>	<b>H</b>	<b>PIC</b>	<b>E</b>	<b>Havp</b>	<b>MI</b>	<b>D</b>	<b>Rp</b>
<i>S. brasiliensis</i>	46	43	0,4736	0,3614	16,5652	0,0002	0,0039	0,8517	7,3913
<i>S. brasiliensis</i> PB	38	22	0,4294	0,3372	15,1315	0,0005	0,0077	0,5271	2,6842
<i>S. schenckii</i>	6	52	0,4838	0,3668	21,3333	0,0015	0,0330	0,8324	27,3333
<i>S. globosa</i>	6	45	0,4999	0,3749	22,6666	0,0018	0,0419	0,7472	22,6666

## 5.2. ARTIGO A SER SUBMETIDO NA CHEMISTRY & BIODIVERSITY (FI: 2.3)

### Efeito do (-) – mirtenol na atividade antifúngica e antibiofilme sobre isolados clínicos de *Sporothrix brasiliensis*.

Larissa Alves da Silva<sup>1</sup>, Luanna de Oliveira e Lima<sup>1</sup>, Heivila Monique da Silva Alexandre<sup>1</sup>, Francisco Bernardino da Silva Neto<sup>2</sup>, Edeltrudes de Oliveira Lima<sup>1</sup>, Walicyranison Plínio da Silva Rocha<sup>3</sup>, Juan Carlos Ramos Gonçalves<sup>1</sup>, Ana Carolina Bernardes Dulgheroff<sup>4</sup>, Felipe Queiroga Sarmiento Guerra<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil; Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais Sintéticos Bioativos. <sup>2</sup> Hospital Universitário Lauro Wanderley, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), João Pessoa, Brasil; Departamento de Doenças Infecciosas, Parasitárias e Inflamatórias, Centro de Ciências Médicas, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil; <sup>3</sup>Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil. <sup>4</sup>Centro Profissional e Tecnológico – Escola Técnica de Saúde da Universidade Federal da Paraíba.

## INTRODUÇÃO

A esporotricose é uma enfermidade fúngica subcutânea mais prevalente no mundo, sendo o Brasil apresentando maior incidência. Seu gênero abrange quatro espécies criptais que são clinicamente relevantes: *Sporothrix brasiliensis*, *Sporothrix schenckii*, *Sporothrix globosa* e *Sporothrix luriei*. O agente etiológico são fungos pertencentes ao gênero *Sporothrix*, que através de uma porta de entrada na pele, proliferam na forma de levedura e determinam o aparecimento de lesões cutâneas ou linfocutâneas, incluindo pápulas, nódulos e úlceras. (Rossow et al., 2020; Gremião et al., 2021).

No Brasil, a esporotricose possui importante via de transmissão zoonótica que está intimamente relacionado a arranhões ou mordidas principalmente por gatos domésticos infectados, sendo causada principalmente pela espécie *Sporothrix brasiliensis*. Esta é a espécie mais virulenta do clado clínico, sendo a composição da parede celular a principal diferença entre elas, contribuindo para aumento da resistência e virulência (Redigueri et al., 2022; Rodrigues et al., 2020; Lopes-bezerra et al., 2018; Casto et al., 2013).

Ultimamente, o tratamento para esporotricose preconizado é o uso do antifúngico itraconazol, como primeira escolha. A depender da forma clínica que está acometendo o paciente são utilizados outros antifúngicos como a solução saturada de iodeto de potássio,

terbinafina e anfotericina B, este último podendo ser em associação com o itraconazol. No entanto, tem sido relatados o surgimento de cepas resistentes, além do número limitado de antifúngicos eficazes para o tratamento da doença (Rodrigues et al., 2020)

Assim como outros microrganismos, as espécies de *Sporothrix* apresentam algumas adaptações para se estabelecerem em ambientes hostis, como a formação de biofilme. Já existem relatos que as infecções pelo clado clínico de *Sporothrix* spp são recalcitrantes ou persistentes, sugerindo que esse perfil pode estar intimamente relacionado a formação de biofilme, visto que, uma das características dos biofilmes é a composição glicoproteica da matriz extracelular secretada por esses fungos patogênicos, sendo este relevante por participar da resistência aos antifúngicos (Brilhante et al. 2018b; Singh et al. 2020; Sánchez et al., 2021).

Dessa forma, é de extrema importância o desenvolvimento de novas estratégias para melhorar o manejo desta doença, tanto da prevenção como do tratamento medicamentoso eficaz. E uma das principais fontes de pesquisa são os produtos naturais e seus derivados, como os álcoois monoterpênicos bicíclicos que têm demonstrado diversos efeitos biológicos na literatura. (Nikitina et al., 2021).

Dentro desse grupo de substâncias, tem -se o (-) – Mirtenol que é encontrando em diversas plantas medicinais tais como *Myrtus communis* L. (*Myrtaceae*), *Rhodiola rosea* L. (*Crassulaceae*) (*Rosenroot*), entre outros (Rajizadeh et al. 2019). Vários estudos confirmam seus efeitos biológicos, tais como, estresse oxidativo (Xuemei, Liu et al., 2021), angiogênese (Huang et al., 2021), neuroprotetor (Silva-Martins et al., 2021), protetor gástrico (Viana et al., 2019), antibacteriano (Cordeiro et al., 2020) e antifúngico, sobre cepas de *Candida* spp (Cavalcante et al., 2021).

Foi a partir dessas evidências que este estudo teve como objetivo investigar a atividade antifúngica do monoterpêno (-) - mirtenol contra cepas de *Sporothrix brasiliensis* na forma planctônica e na inibição da formação e na redução do biofilme maduro, bem como avaliou a citotoxicidade em células de queratinócitos.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **MATERIAL E MÉTODOS**

#### 1- Substância teste, medicamentos antifúngicos e meios de culturas

Os antifúngicos (anfotericina B; itraconazol) foram obtidos comercialmente do fabricante Cayman Chemical. O meio de cultura Sabouraud Dextrose Agar (SDA) (KASVI)

Laboratories, Detroit, MI, EUA) foi utilizado para a manutenção das cepas de *Sporothrix*. O meio de cultura líquido Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640-L-glutamina (sem bicarbonato de sódio) (Sigma-Aldrich ®, São Paulo, SP, Brasil) foi utilizado para os ensaios antifúngicos. Ambos os meios de cultura foram preparados de acordo com as instruções do fabricante. O (-) - mirtenol foi cedido pelo professor José Maria Barbosa Filho, e para os testes foi dissolvido em DMSO e Tween 80 (Sigma-Aldrich ®, São Paulo, SP, Brasil).

## 2- Microrganismos

Foram utilizadas 24 cepas clínicas de *Sporothrix brasiliensis* e uma referência de *Sporothrix brasiliensis* IPEC 100 (OU 10C) CFP 0051, na fase filamentosa. Os isolados foram fornecidos pelo Laboratório de Micologia da Universidade Federal da Paraíba-UFPB. Os microrganismos foram mantidos em Sabouraud Dextrose Agar (SDA) a 4 °C até a realização dos testes. Antes de cada experimento, as células foram reativadas em placas de ágar batata para preparação do inóculo e padronizados com a escala 2 de Mcfarland para uma concentração final  $10^5$  x 10<sup>5</sup> UFC/mL e escala 2 Mcfarland  $2 \times 10^6$  UFC/mL (Brilhante et al., 2018).

## 3- Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima

A CIM do (-) - mirtenol foi determinada por meio da técnica de microdiluição em microplaca contendo 96 poços com fundo em forma de “U” (ALAMAR®), segundo o documento CLSI M38A, 2017, e em duplicata.

Inicialmente, foram distribuídos em todos os poços da placa 100 µL do meio RPMI 1640 com glutamina, duplamente concentrado, posteriormente 100 µL da substância teste/antifúngico foram dispensadas nas cavidades da primeira linha da placa, e por meio de uma diluição seriada a uma razão de um para dois (1:2), de forma as concentrações nos poços variaram entre 1024 µg/mL até 8 µg/mL. Por fim foi adicionado 10 µL do inóculo ( $1$  a  $5 \times 10^5$  UFC/mL) nas cavidades, em que cada linha da placa refere-se a uma cepa fúngica específica. Concomitantemente, foram realizados controle com Itraconazol, foi utilizada nos ensaios em concentrações de 32 a 0,25 µg/mL, meio RPMI duplamente concentrado como controle de esterilidade e meio RPMI duplamente concentrado com inóculo como controle da viabilidade fúngica. As placas seladas e então incubadas à 25-28°C por até 72 horas para realizar a leitura. Após esse tempo, a leitura foi realizada visualmente. A CIM foi definida como a menor concentração do composto capaz de produzir inibição visível sobre o crescimento fúngico das cepas ensaiadas, quando comparado com o crescimento controle. O resultado foi expresso pela média aritmética das CIM's obtidas nos três ensaios.

Após leitura da CIM, alíquotas de 10 µL do sobrenadante das cavidades onde foi observada completa inibição do crescimento fúngico (CIM, CIM x2 e CIM x 4) nas placas de microdiluição, foram semeadas em meio ágar Sabouraud dextrose e incubadas à  $28 \pm 2$  °C durante 48-72 horas. A CFM foi considerada como a menor concentração do composto que produzirá 3 ou menos colônias no meio de cultura. Os ensaios foram realizados em triplicata e o resultado expresso pela média aritmética das CFM's obtidas nos três ensaios (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016; NCUBE N. S.; AFOLAYAN A. J.; OKOH A. I., 2008).

#### 4- Ensaio de formação do biofilme

Os isolados (n= 24) foram cultivados em Agar Batata por 5 dias, na temperatura de 25°C. Os inóculos foram preparados para obter a concentração de  $2 \times 10^5$  conídeos/mL (1,0 Mcfarland). Posteriormente, alíquotas de 1.000 µL de cada inóculo foram transferidas para placas de poliestireno com 24 poços de superfície lisa tratada e fundo chato (KASVI), e incubadas por 24 h a 25°C, em condições estáticas, para etapa de pré adesão. Após as 24h, o sobrenadante de cada poço foi cuidadosamente removido e foram adicionados 1.000 µL de meio RPMI duplamente concentrado (Sigma-Aldrich ®, São Paulo, SP, Brasil), tamponada a pH 7,0 com MOPS 0,165M. As placas foram incubadas por 5 dias a 25°C para formação e maturação do biofilme, a sua biomassa foi avaliada com coloração de cristal violeta, por leitura no espectrofotômetro em uma densidade óptica de 540nm.

Ensaio realizado em cinco exemplares. Controle de esterilidade foi realizado utilizando meio de cultura sem adição de microrganismos, os quais foram submetidos ao mesmo protocolo que os demais poços e foram utilizados para obtenção dos valores de branco. Estes valores foram utilizados para estabelecer a densidade óptica de corte (DOc) para as formações de biofilme, que foi definida como a densidade óptica média obtida para o espaço em branco de referência, mais 3 vezes o seu desvio padrão. Em seguida, a biomassa de biofilme de cada cepa testada foi quantificada espectrofotometricamente através da coloração violeta cristalina e as densidades ópticas obtidas (DO) foram utilizadas para classificar a capacidade de formação de biofilme do *Sporothrix* spp, como se segue: não produtores de biofilme ( $DO \leq DOc$ ), produtores fracos ( $DOc < DO \leq 2 \times DOc$ ), produtores moderados ( $2 \times DOc < DO \leq 4 \times DOc$ ) e produtores fortes ( $4 \times DOc < DO$ ) (Cordeiro et al., 2015).

#### 5- Efeito do mirtenol na formação dos biofilmes *Sporothrix*

O efeito do mirtenol sobre o biofilme foi avaliado na cepa de *Sporothrix brasiliensis* que obteve melhor produção de biofilme, conforme mencionado anteriormente.

Foi avaliado no estágio inicial da formação do biofilme, descrito por Brilhante *et al.*, 2018b. Uma alíquota de suspensão fúngica na forma filamentosa, com a concentração de  $2 \times 10^5$  conídeos/mL foi adicionada a cada poço da placa de poliestireno de 24 poços, em seguida foi incubada na temperatura de 25°C por 24h para adesão celular. Depois de 24h, foi retirado o sobrenadante e o meio RPMI foi adicionado com diferentes concentrações do monoterpene, na CIM (128 µg/mL), CIMx5 (640 µg/mL), CIMx10 (1.280 µg/mL) e CIMx20 (2.560 µg/mL) e incubado por mais 5 dias. Em seguida, submetidas a ensaios de quantificação de biomassa utilizando coloração cristal violeta. Ensaio realizado em cinco exemplares. O biofilme não tratado correspondeu ao controle de crescimento, já os poços com meio de cultura sem adição do microorganismo são os controles de esterilidade.

#### 6- Efeito do mirtenol sobre o biofilme maduro do *S. Brasiliensis*

Alíquotas de 1000 µL do inóculo de *S. brasiliensis* LM 289 contendo aproximadamente  $10^5$  conídeos/mL foram transferidos para placa de 24 poços e incubadas por 24h a 25°C para adesão celular. Em seguida, foi retirado o sobrenadante e o meio RPMI foi adicionado, foi incubado por 5 dias a 25°C para a maturação do biofilme filamentoso do *Sporothrix*. Uma vez formado, os biofilmes foram lavados com solução salina tamponada com fosfato (PBS) para remover as células frouxamente ligadas. Concentrações de mirtenol previamente determinadas pelos valores da CIM (128 µg/mL), CIMx5 (640 µg/mL), CIMx10 (1.280 µg/mL) e CIMx20 (2.560 µg/mL) foi adicionado aos poços, seguido de incubação por 72h a 25°C. Em seguida, submetidas a ensaios de quantificação de biomassa utilizando coloração cristal violeta. Ensaio realizado em cinco exemplares. O biofilme não tratado correspondeu ao controle de crescimento, já os poços com meio de cultura sem adição do microorganismo são os controles de esterilidade

#### 7- Quantificação da biomassa

A quantificação da biomassa foi realizada por técnica de coloração do cristal violeta. Poços contendo o biofilme foram lavados duas vezes com PBS e depois desidratado com metanol por aproximadamente 5 minutos, o sobrenadante foi removido e poços foram secos ao ar livre. Posteriormente, foram adicionados 1000 µL de cristal violeta a 0,3% em cada poço.

Após 20 minutos, o corante foi removido e os poços foram lavados com água destilada, em seguida o corante impregnado no material celular foi removido adicionando 1000µL de ácido acético a 33% (v/v) durante 30 segundos. Os sobrenantes foram transferidos para nova placa de microtitulação de 96 poços, e os valores de absorvância foram lidos em 540nm utilizando leitor de placas, espectrofotômetro (Brilhante *et al.*, 2015b).

#### 8- Avaliação da citotoxicidade em células não tumorais de queratinócito humano (HaCaT)

O ensaio colorimétrico de redução do MTT (brometo de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-il) -2,5- difeniltetrazólio) foi utilizado para avaliar a citotoxicidade do (-) - mirtenol na linhagem celular de queratinócito humano (HaCaT).

Para este ensaio, as células de queratinócitos humanos (HaCaT) foram semeadas em placas de 96 poços na concentração de  $3 \times 10^5$  células/mL, e incubadas por 24 horas à 37 °C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, as células foram tratadas com a substância em diferentes concentrações, (-) - mirtenol (512-256-128 µg/mL) por 72 horas. Após o período de tratamento, foram removidos 110 µL do sobrenadante, em seguida, adicionados 10 µL de MTT em todos os poços, que foram incubados novamente por 4 horas.

Posteriormente, foi adicionado SDS-HCL 0,01 N para dissolver os cristais de formazan, e a placa foi deixada em agitação durante a noite. Por fim, a leitura da placa foi realizada em um espectrofotômetro de microplacas (Synergy HT, BioTeK, EUA) com absorvância de 570 nm.

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.) e comparados por meio da Análise de Variância (ANOVA) one-way, seguido pelo teste Dunnett. Os resultados foram considerados significativos quando  $p < 0,05$

## RESULTADOS

### Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima

Neste estudo, foi evidenciado o efeito antifúngico do (-) - mirtenol sobre 24 cepas de *S. brasiliensis*. Os valores da CIM e CFM para o (-) - mirtenol e itraconazol (fármaco padrão) estão ilustrados na Tabela 1. A molécula foi capaz de inibir o crescimento de todos os isolados, com CIM variando 256 a 64 µg/mL, 20 das 24 cepas ensaiadas foram inibidas até a concentração 128 µg/mL, 3 cepas inibidas na concentração de 64 µg/mL e apenas uma na

concentração de 256 µg/mL. Para o itraconazol, foram observados valores de CIM que variaram de 0,25 µg/mL a 16 µg/mL.

A CFM do mirtenol variou entre 128 e 256 µg/mL. Na análise comparativa da CIM e CFM (Tabela 1) foi observado que foram iguais ou duas vezes superior a CIM, dependendo da cepa ensaiada, logo este possui efeito fungicida, uma vez que a razão CFM/CIM foi menor que 4 (Siddiqui et al., 2013).

**Tabela 1** - Resultado da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) do monoterpeno (-) - mirtenol e do antifúngico itraconazol sobre cepas de *Sporothrix brasiliensis*.

<i>S. brasiliensis</i>	(-)-mirtenol			Natureza de Atividade	*Itrac	Controles	
	CIM	CFM	$\frac{CFM}{CIM}$		CIM	**MO	**Est
IPEC 100; CFP 0051	128	256	2	Fungicida	16	+	-
LM 44	128	128	1	Fungicida	0,25	+	-
LM 46	128	128	2	Fungicida	0,5	+	-
LM 200	128	256	2	Fungicida	05	+	-
LM 260	64	128	2	Fungicida	0,5	+	-
LM 264	256	256	1	Fungicida	1	+	-
LM 279	128	256	2	Fungicida	0,25	+	-
LM 284	128	256	2	Fungicida	0,25	+	-
LM 295	128	128	1	Fungicida	0,5	+	-
LM 310	128	256	1	Fungicida	0,5	+	-
LM 328	128	256	2	Fungicida	0,25	+	-
LM 366	128	256	2	Fungicida	0,25	+	-
LM 373	128	256	2	Fungicida	0,25	+	-
LM 383	128	128	1	Fungicida	0,25	+	-
LM 394	128	128	1	Fungicida	0,5	+	-
LM 410	64	128	2	Fungicida	0,5	+	-
LM 437	64	128	2	Fungicida	0,5	+	-

LM 463	128	256	2	Fungicida	0,5	+	-
LM 467	128	128	1	Fungicida	0,25	+	-
LM 476	128	128	1	Fungicida	0,25	+	-
LM 478	128	256	2	Fungicida	0,5	+	-
LM 485	128	256	2	Fungicida	0,25	+	-
LM 491	128	128	1	Fungicida	1	+	-
LM 492	128	256	1	Fungicida	0,5	+	-

\*Itraconazol; \*\*MO = Controle de microrganismo; \*\*Est = Controle de esterilidade.

CFM/CIM > 4 significa que é fungistático, <4 significa que é fungicida.

CIM e CFM expressas em µg/mL.

### Ensaio de formação do biofilme

A biomassa dos biofilmes maduros de todas as cepas, sem a presença da substância teste, foram quantificados. Conforme apresentado na tabela 2, todos os isolados foram classificados como fortes produtoras de biofilme.

**Tabela 2** - Análise da produção de biofilme in vitro de *Spotothrix brasiliensis*.

<i>S. brasiliensis</i>	DO (Média ±DP)	Capacidade de formação de Biofilme
IPEC 100; CFP 0051	1,508±0,120	Forte
LM 44	1,488±0,028	Forte
LM 46	0,818±0,101	Forte
LM 200	0,913±0,012	Forte
LM 260	0,907±0,002	Forte
LM 264	0,950±0,002	Forte
LM 279	0,861±0,034	Forte
LM 284	0,954±0,113	Forte

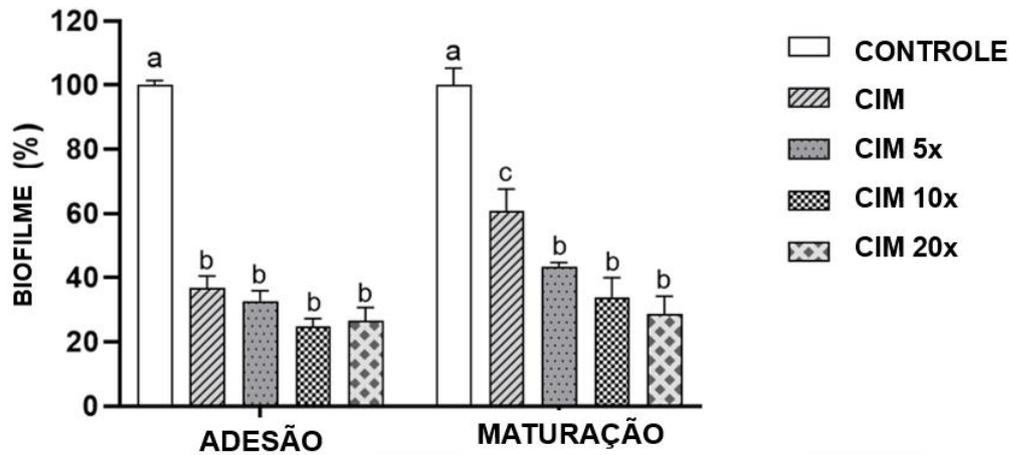
LM 295	1,325±0,023	Forte
LM 310	1,023±0,098	Forte
LM 328	1,395±0,120	Forte
LM 366	0,836±0,075	Forte
LM 373	1,858±0,029	Forte
LM 383	2,045±0,065	Forte
LM 394	1,875±0,019	Forte
LM 410	1,569±0,014	Forte
LM 437	1,113±0,015	Forte
LM 463	0,991±0,098	Forte
LM 467	1,022±0,100	Forte
LM 476	1,465±0,012	Forte
LM 478	1,655±0,098	Forte
LM 485	1,025±0,043	Forte
LM 491	1,569±0,009	Forte
LM 492	1,029±0,045	Forte

### **Efeito do mirtenol na formação (adesão) e na redução do biofilme maduro de *Sporothrix brasiliensis***

Entre as 24 cepas que foram verificadas a capacidade de formação do biofilme, como demonstrado anteriormente na tabela 2, a cepa com melhor produção de biofilme (LM 383) foi escolhida para a avaliação da atividade antifúngica do (-) – mirtenol sobre a capacidade de inibir a formação do biofilme (adesão) e na redução do biofilme formado (fase madura), os resultados estão expressos na Figura 1.

O monoterpeno apresentou redução na fase de adesão de 63% a 73%, enquanto que no biofilme maduro apresentou redução de 39% a 71% entre as respectivas concentrações de 128 a 2560 µg/mL (CIM a CIMx20). Além disso, ocorreu diferença significativa na comparação da concentração de CIM2x no tratamento da fase madura do biofilme com todos os grupos de tratamento nas diferentes concentrações, com redução maior em todas as concentrações na fase de adesão. Houve diferença significativa quando comparado o controle de crescimento com todos os grupos testados ( $p < 0.0001$ ).

**Figura 1-** Efeito inibitório do (-) – mirtenol no biofilme de *S. brasiliensis* filamentoso, realizado na fase de adesão e no biofilme maduro.

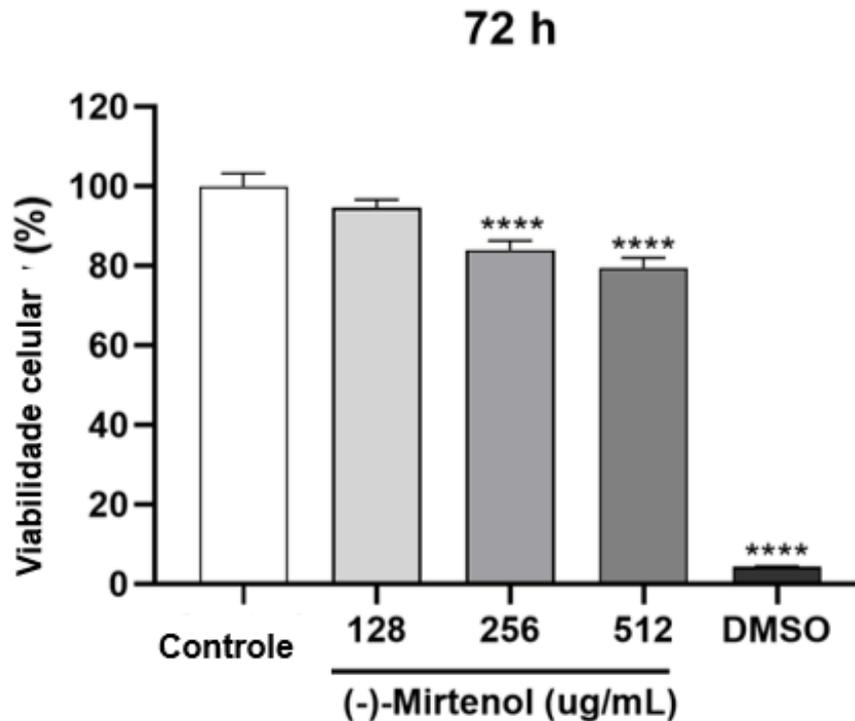


**Legenda:** Dados obtidos a partir de um experimento em quintuplicada e apresentados como média  $\pm$  EPM, analisado por Análise de Variância (ANOVA) two way seguido do teste de Tukey. Letras diferentes denotam diferenças significativas entre as condições.  $p < 0,0001$  quando comparado os grupos de tratamento com o controle.

#### **Avaliação da citotoxicidade em células não tumorais de queratinócito humano (HaCaT)**

O efeito citotóxico do (-) - mirtenol sobre a linhagem celular de queratinócito humano (HaCaT) foi realizada, e os resultados estão expressos como percentual de viabilidade celular em função das diferentes concentrações da substância ( $\mu\text{g}$ ) no tempo de 72 horas. O resultado demonstrou que na menor concentração analisada CIM (128  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) não afetou a viabilidade celular do HaCaT. No entanto, a partir da concentração de 256  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ocorreu uma diminuição significativa da viabilidade, quando comparada ao grupo controle (Figura 2).

**Figura 2-**Viabilidade celular da linhagem de queratinócito humano (HaCaT) após 72 horas de tratamento com diferentes concentrações de (-)-mirtenol.



**Legenda:** dados obtidos a partir de um experimento em triplicata e apresentados em média do percentual de viabilidade celular  $\pm$  E.P.M. (erro padrão da média), comparados por análise de variância (ANOVA) seguido do teste Dunnett. \*\*\*\* $p < 0,0001$  quando comparado os grupos de tratamento com o controle. Média do controle: 100 %  $\pm$  0,05

## DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo que observar a atividade antifúngica do (-) – mirtenol frente cepas de *S. brasiliensis*. Tal efeito biológico tem sido relatado com outras espécies fúngicas, como observado por Cavalcante em 2021, que esse monoterpene apresentou atividade inibitória em *Candida* spp., com CIM variando entre 512 e 256  $\mu\text{g/mL}$ , enquanto outro estudo utilizando *Candida auris* visualizou a forte atividade antifúngica, com CIM de 50  $\mu\text{g/mL}$  (Maione et al., 2022). Corroborando com esses achados, Nikitina et al., 2021 mostraram que o (-) –Mirtenol apresentou atividade promissora frente fungos filamentosos e leveduriformes, com uma faixa de CIM variando entre 47  $\mu\text{g/mL}$  à 23,5  $\mu\text{g/mL}$ .

O mesmo autor relata em estudo realizado em 2010 que o isômero (+) – mirtenol contra *Candida albicans*, *Candida parapsilose*, *Penicillium tardum*, *Candida kruzei* e *Penicillium chrysogenum* (Nikitine et al., 2010).

Além disso, já foi demonstrado atividade antibacteriana e antibiofilme do (-) – mirtenol, demonstrando potencial terapêutico antimicrobiano (Cordeiro, et al., 2020; Selvaraj et al., 2020; Mahmoud et al., 2022; Liu et al., 2022).

Apesar do mecanismo antifúngico desse monoterpene ainda não está totalmente elucidado, dados da literatura sugerem que sua atividade antifúngica danifica a membrana celular fúngica, possivelmente levando ao rompimento da morfogênese da célula. Além disso, Cordeiro e colaboradores, usando docking molecular, visualizaram a ligação do (-) – Mirtenol a uma enzima (transpeptase) que atua na síntese 32 da parede celular (Cordeiro et al., 2020; Gomes et al., 2017).

Uma ampla gama de fungos patogênicos pode se desenvolver como uma comunidade microbiana, formando biofilmes. Essa capacidade de formar biofilme pode conferir vantagens aos microrganismos, permitindo que evitem os mecanismos imunológicos do hospedeiro, resistem ao tratamento antifúngico, associado a falta de tratamentos eficazes (Sanches et al., 2020; Silva et al., 2009; Rajendran et al., 2015).

A capacidade de formação de biofilme está relacionada com a diminuição da eficácia das terapias antimicrobianas. Estudos sobre biofilmes bacterianos são muito mais abundantes na literatura, mas há relatos de que fungos, incluindo fungos dimórficos, também são capazes de formar tal estrutura. (Rodrigues et al., 2018; Mitchell et al., 2016).

A formação de biofilme de *Sporothrix* spp foi descrito anteriormente, bem como a suscetibilidade reduzida ao itraconazol e outros antifúngicos (Sanches et al., 2014; Brilhante et al., 2018; Borba-santos et al., 2022). Nossos resultados mostraram que todos os isolados de *S. brasiliensis* tiveram forte capacidade de formar biofilmes na fase filamentosa, corroborando com o estudo de Brilhante e colaboradores em 2018 utilizando várias espécies de *Sporothrix*, visualizaram forte produção de biofilme na espécie de *S. brasiliensis*.

Adicionalmente, a atividade antibiofilme do (-) – mirtenol demonstrada nesse estudo, apesar de não ser relatada na literatura contra cepas de *S. brasiliensis*, estudos anteriores demonstram que esse monoterpene possui atividade promissora na inibição e redução de biofilme de outros gêneros fúngicos e bactérias patogênicas, como demonstrado por Maione et al. (2022) utilizando *C. auris* e *K. pneumoniae* mostrando atividade antibiofilme eficiente. Cordeiro et al. (2020) e Mahmoud et al. (2022) também observaram notável eficiência em biofilmes de *S. aureus*.

É importante ressaltar que em nossos resultados foi possível visualizar uma diferença estatística ( $P < 0,005$ ) no tratamento do biofilme nas diferentes fases do seu desenvolvimento. Na formação do biofilme utilizando a CIM (128  $\mu\text{g/mL}$ ) ocorreu uma melhor inibição do que o tratamento com o biofilme maduro, indicando que esse monoterpene também poderia ser utilizado no tratamento inicial ou prevenção da contaminação, visto que já vem sendo relatado a ocorrência da formação de biofilme em garras de gatos, na qual desempenha um papel importante na dispersão do fungo e produção de cepas mais resistentes (Brilhante et al., 2020; Santos et al., 2022).

Tendo em vista a importância da avaliação toxicológica, os resultados desse estudo demonstraram que na menor concentração testada não ocorreu redução da viabilidade celular, o mesmo foi observado por Maione et al. (2022) que também utilizaram HaCAT em concentrações que variaram de 5 a 200  $\mu\text{g/mL}$  com a duração do tratamento de 24h, apenas na última concentração ocorreu redução da viabilidade celular. A partir dos achados do presente estudo, fica claro que o (-) - mirtenol não é tóxico na sua CIM, possui atividade antifúngica promissora, inibidor de biofilme e, portanto, pode ser considerado essencial a realização de novos estudos com esse monoterpene, com o intuito de no futuro ser um possível candidato terapêutico contra *Sporothrix* spp.

## CONCLUSÃO

Em conclusão, o (-) - mirtenol apresentou atividades antifúngica contra *S. brasiliensis* células planctônicas e também foi capaz de reduzir a formação e inibição do biofilme. Além disso, o monoterpene utilizado não reduziu a viabilidade celular de forma significativa na menor concentração analisada, a viabilidade foi reduzida apenas a partir da concentração de 256  $\mu\text{g/mL}$ . O desenvolvimento futuro de metodologias deve ser abordado também para analisar as capacidades de erradicação do biofilme leveduriforme.

## REFERÊNCIAS

BORBA-SANTOS, Luana P. et al. A novel naphthoquinone derivative shows selective antifungal activity against *Sporothrix* yeasts and biofilms. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 749-758, 2022.

BRILHANTE, Raimunda Sâmia Nogueira et al. Biofilm formation on cat claws by *Sporothrix* species: An ex vivo model. **Microbial Pathogenesis**, v. 150, p. 104670, 2021.

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

CASTRO, Rafaela A. et al. Differences in cell morphometry, cell wall topography and Gp70 expression correlate with the virulence of *Sporothrix brasiliensis* clinical isolates. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. e75656, 2013.

CAVALCANTI, Bruno B. et al. Inhibitory Effect of (-)-myrtenol alone and in combination with antifungal agents on *Candida* spp. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 15, p. 1-6, 2021.

Cordeiro R, de A, Serpa R, Marques FJ, de F et al. Inhibitory activity of isoniazid and ethionamide against *Cryptococcus* biofilms. **Can J Microbiol**. 2015; 61: 827–836.

CORDEIRO, Laísa et al. Antibacterial and antibiofilm activity of myrtenol against *Staphylococcus aureus*. **Pharmaceuticals**, v. 13, n. 6, p. 133, 2020.

Cordeiro RA, De Oliveira JS, Castelo-Branco D, de SCM et al. *Candida tropicalis* isolates obtained from veterinary sources show resistance to azoles and produce virulence factors. **Med Mycol**. 2015; 53: 145–152.

GHASEMI, Mahshid et al. The MTT assay: utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 23, p. 12827, 2021.

HUANG, Weidong et al. Inhibition of *Fusarium oxysporum* by AgNPs biosynthesised using *Cinnamomum camphora* fruit extract. **IET nanobiotechnology**, v. 13, n. 1, p. 42- 45, 2019

LIU, Lei et al. Myrtenol inhibits biofilm formation and virulence in the drug-resistant *Acinetobacter baumannii*: Insights into the molecular mechanisms. **Infection and Drug Resistance**, p. 5137-5148, 2022.

LOPES-BEZERRA, Leila M. et al. Cell walls of the dimorphic fungal pathogens *Sporothrix schenckii* and *Sporothrix brasiliensis* exhibit bilaminar structures and sloughing of extensive and intact layers. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 12, n. 3, p. e0006169, 2018.

MAHMOUD, Ruba Y. et al. Increasing the efficacy of treatment of *Staphylococcus aureus*–*Candida albicans* mixed infections with myrtenol. **Antibiotics**, v. 11, n. 12, p. 1743, 2022.

MAIONE, Angela et al. Effect of myrtenol and its synergistic interactions with antimicrobial drugs in the inhibition of single and mixed biofilms of *Candida auris* and *Klebsiella pneumoniae*. **Microorganisms**, v. 10, n. 9, p. 1773, 2022.

Mitchell KF, Zarnowski R, Andes DR. The extracellular matrix of fungal biofilms. **Adv Exp Med Biol**. 2016; 931:21–35.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55–63, 1983.

- NIKITINA, L. E. et al. Antifungal activity of bicyclic monoterpenoids and terpenesulfides. **Chemistry of natural compounds**, v. 46, p. 28-32, 2010.
- Rajendran R, Mowat E, Jones B, Williams C, Ramage G. Prior in vitro exposure to voriconazole confers resistance to amphotericin B in *Aspergillus fumigatus* biofilms. **Int J Antimicrob Agents**. 2015; 46: 342–345.
- REDIGUIERI, Bruno Carneiro et al. Clinical, epidemiological, and epizootic features of *Sporothrix brasiliensis* in Espírito Santo, Brazil. **Ecohealth**, v. 19, n. 1, p. 124-134, 2022.
- RODRIGUES, Anderson Messias et al. A ameaça de espécies patogênicas emergentes e reemergentes de *Sporothrix*. **Mycopathologia**, v. 185, n. 5, pág. 813-842, 2020.
- ROSSOW, John 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. 4, p. 247, 2020.
- SÁNCHEZ-HERRERA, Rocío et al. Analysis of biofilm formation by *Sporothrix schenckii*. **Medical Mycology**, v. 59, n. 1, p. 31-40, 2021.
- SÁNCHEZ-HERRERA, Rocío et al. Formación de biopelículas en el hongo patógeno *Sporothrix schenckii*: desarrollo, arquitectura y características bioquímicas. **Acta Universitaria**, v. 24, n. 2, p. 11-15, 2014.
- SÁNCHEZ-HERRERA, Rocío et al. Analysis of biofilm formation by *Sporothrix schenckii*. **Medical Mycology**, v. 59, n. 1, p. 31-40, 2021.
- SELVARAJ, Anthonymuthu et al. Antibiofilm and antivirulence efficacy of myrtenol enhances the antibiotic susceptibility of *Acinetobacter baumannii*. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 21975, 2020.
- Silva S, Henriques M, Martins A, Oliveira R, Williams D, Azeredo J. Biofilm of non-*Candida albicans* *Candida* species: quantification, structure and matrix composition. **Med Mycol**. 2009; 47: 681–689. 16.
- SINGH, Mohini Prabha et al. Microbial biofilms: development, structure, and their social assemblage for beneficial applications. In: *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Microbial Biofilms*. **Elsevier**, 2020. p. 125-138.
- Silva-Martins S, Beserra-Filho JIA et al. Myrtenol complexed with  $\beta$ -cyclodextrin ameliorates behavioural deficits and reduces oxidative stress in the reserpine-induced animal model of Parkinsonism. **Clin Exp Pharmacol Physiol**. 2021 Nov;48(11):1488-1499.
- SANTOS, Giulia Maria Pires et al. *Sporothrix* spp. biofilms impact in the zoonotic transmission route: Feline claws associated biofilms, itraconazole tolerance, and potential repurposing for miltefosine. **Pathogens**, v. 11, n. 2, p. 206, 2022.
- VIANA, Ana Flavia SC et al. (-)-Myrtenol accelerates healing of acetic acid-induced gastric ulcers in rats and in human gastric adenocarcinoma cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 854, p. 139-148.

XUEMEI, Liu et al. O mirtenol alivia o estresse oxidativo e a inflamação em ratas grávidas diabéticas através da via de sinalização TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology** , v. 35, n. 11, pág. e22904, 2021.

# Conclusão

## CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos neste estudo, conclui-se que:

- Dados clínicos revelaram que a esporotricose segue o padrão de transmissão zoonótica, principalmente por gatos;
- Maior acometimento linfocutâneo e cutâneo fixo;
- Dados demográficos sugerem um perfil epidêmico-urbano na região dos isolados analisados;
- Na identificação baseada nos critérios micro e macromorfológicos, foi possível a identificação do gênero causador da doença;
- Único idiomorfo encontrado foi o MAT1-2, provável que esta espécie seja originária do genótipo de espécies do Rio de Janeiro;
- Baixa variação intragenotípica e uma diversificação genética em relação as amostras de *S. brasiliensis* de outros estados, o que sugere a ocorrência de efeito fundador;
- O (-) - mirtenol apresentou atividades antifúngica contra *S. brasiliensis* células planctônicas, sendo todas fungicidas;
- Todos os 24 isolados foram classificados como fortes produtoras de biofilme;
- O (-) – mirtenol inibiu a formação do biofilme (adesão) e na redução do biofilme formado (fase madura);
- O monoterpeno utilizado não reduziu a viabilidade celular de queratinócitos humanos de forma significativa na menor concentração analisada.

Portanto, esta pesquisa fornece uma visão acerca da diversidade genética e estrutura populacional do *Sporothrix brasiliensis* em João Pessoa e região metropolitana. Além disso, contribui para o aumento com conhecimento das atividades biológicas do (-) - mirtenol, podendo despertar o interesse de outros pesquisadores na realização de estudos adicionais.

# Referências

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA-PAES, Rodrigo et al. Phenotypic characteristics associated with virulence of clinical isolates from the *Sporothrix* complex. **BioMed research international**, v. 2015, n. 1, p. 212308, 2015.
- ALMEIDA-PAES, Rodrigo et al. Sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: *Sporothrix brasiliensis* is associated with atypical clinical presentations. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 9, p. e3094, 2014.
- AMINAH, N.S.; LAILI, E.R.; RAFI, M.; ROCHMAN, A.; INSANU, M.; TUN, K.N.W. Secondary metabolite compounds from *Sida* genus and their bioactivity. *Heliyon*, v. 7, 2021.
- AUNG, Ar Kar et al. Esporotricose pulmonar: série de casos e análise sistemática da literatura sobre padrões clínico-radiológicos e resultados de tratamento. **Medical mycology**, v. 51, n. 5, p. 534-544, 2013.
- BARBHUIYA, Pervej Alom; PATHAK, Manash Pratim. Myrtenol: A Promising Terpene with Potent Pharmacological Properties. **Pharmacological Research-Natural Products**, p. 100067, 2024.
- BAYRY, Jagadeesh (Ed.). **Emerging and re-emerging infectious diseases of livestock**. Springer, 2017.
- BONIFAZ, Alexandro; VÁZQUEZ-GONZÁLEZ, Denisse. Diagnosis and treatment of lymphocutaneous sporotrichosis: what are the options?. **Current Fungal Infection Reports**, v. 7, p. 252-259, 2013.
- BORGES, Tatiana Saleme et al. Isolamento de *Sporothrix schenckii* das garras de gatos domésticos (indoor e outdoor) e em cativeiro em São Paulo (Brasil). **Mycopathologia**, v. 176, p. 129-137, 2013.
- BRANDOLT, Tchana Martinez et al. Esporotricose humana: Um surto zoonótico no sul do Brasil, 2012–2017. **Micologia médica**, v. 57, n. 5, p. 527-533, 2019
- BRILHANTE, Raimunda Sâmia Nogueira et al. Suscetibilidade antifúngica de biofilmes do complexo *Sporothrix schenckii*. **Micologia Médica**, v. 56, n. 3, pág. 297-306, 2018.
- CAMACHO, Emma et al. Molecular epidemiology of human sporotrichosis in Venezuela reveals high frequency of *Sporothrix globosa*. **BMC infectious diseases**, v. 15, p. 1-10, 2015.
- CAVALCANTI, Bruno Bezerra et al. Inhibitory Effect of (-) - myrtenol alone and in combination with antifungal agents on *Candida* spp. **Research, Society and Development**, v.10, n. 15, 2021.

CHAKRABARTI, Arunaloke et al. Epidemiologia global da esporotricose. **Sabouraudia** , v. 53, n. 1, p. 3-14, 2014.

CHEN, Feng et al. Recombinant phage elicits protective immune response against systemic *S. globosa* infection in mouse model. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 42024, 2017.

CORDEIRO, Laísa et al. Antibacterial and antibiofilm activity of myrtenol against *Staphylococcus aureus*. **Pharmaceuticals**, v. 13, n. 6, p. 133, 2020.

DE CARVALHO, Jamile Ambrósio et al. Trends in molecular diagnostics and genotyping tools applied for emerging *Sporothrix* species. **Journal of fungi**, v. 8, n. 8, p. 809, 2022.

DE LIMA BARROS, Mônica Bastos et al. Tratamento da esporotricose cutânea com itraconazol—estudo em 645 pacientes. **Clinical infection diseases** , v. 52, n. 12, p. e200-e206, 2011.

DE MIRANDA, Luisa Helena Monteiro et al. Monitoring fungal burden and viability of *Sporothrix* spp. in skin lesions of cats for predicting antifungal treatment response. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 3, p. 92, 2018.

DE OLIVEIRA BENTO, Aurélio 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. e0009693, 2021.

DE OLIVEIRA LIMA, MI et al. Investigação do potencial antifúngico do linalol contra isolados clínicos de *Trichophyton rubrum* resistente ao fluconazol. *Journal de mycologie medicale* , v. 27, n. 2, pág. 195-202, 2017.

DE PAIVA VIANA FILHO, Laerte et al. Manejo da esporotricose com uso de Itraconazol: revisão narrativa. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 3, n. 5, p. 14678-14689, 2020.

DENG, L.; MING, Q.; LI, N.; LEI, Y.; ZHANG, D.; CHEN, J. X. Natural products and their derivatives: Promising modulators of tumor immunotherapy. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 108, p. 493-508, 2020.

ESPINEL-INGROFF, A. et al. Multicenter, international study of MIC/MEC distributions for definition of epidemiological cutoff values for *Sporothrix* species identified by molecular methods. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 61, n. 10, p. 10.1128/aac. 01057-17, 2017.

FALCÃO, E. M. M. et al. Hospitalizações e óbitos relacionados à esporotricose no Brasil (1992-2015). **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 35, n. 4, p. e00109218, 2 maio 2019.

FELIPE, L. O.; BICAS, J. L. Terpenos: compostos majoritários de óleos essenciais. **Química e Sociedade**, v. 39, n. 2, p. 120-130, 2017. [doi.org/10.21577/0104-8899.20160068](https://doi.org/10.21577/0104-8899.20160068).

FERNANDES, Geisa Ferreira et al. Caracterização do perfil de virulência, secreção proteica e imunogenicidade de diferentes isolados de *Sporothrix schenckii* sensu stricto em comparação com as espécies *S. globosa* e *S. brasiliensis*. **Virulence** , v. 4, n. 3, p. 241-249, 2013.

FERREIRA, E. S.; ROSALEN, P. L.; BENSO, B.; SARDI, J. C. O.; DENNY, C.; SOUSA, S. A.; GUERRA, F. Q. S.; LIMA, E. O.; FREIRES, I. A.; CASTRO, R. D. The Use of Essential Oils and Their Isolated Compounds for the Treatment of Oral Candidiasis: **A Literature Review. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2021, p. 1-16, 2021b. doi: 10.1155/2021/1059274

FILHO, Laerte et al. Manejo da esporotricose com uso de Itraconazol: revisão narrativa. *Brazilian Journal of Health Review*, v. 3, n. 5, p. 14678- 14689, 2020.

FREITAS, D. F. S. Avaliação de fatores epidemiológicos, micológicos , clínicos e terapêuticos associados à esporotricose. Tese (Doutorado em Medicina Tropical) 164f.- INSTITUTO OSWALDO CRUZ. Rio de Janeiro, Fev. 2014.

GALAN, D. M. et al. Eucalyptol (1,8-cineole): an underutilized ally in respiratory disorders? **Journal of Essential Oil Research**, v. 32, n. 2, 3 mar. 2020.

GREMIÃO, Isabella DF et al. Esporotricose felina: aspectos epidemiológicos e clínicos. **Sabouraudia** , v. 53, n. 1, p. 15-21, 2014.

GREMIÃO, Isabella Dib Ferreira et al. Geographic expansion of sporotrichosis, Brazil. **Emerging infectious diseases**, v. 26, n. 3, p. 621, 2020.

GREMIÃO, Isabella Dib Ferreira 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.

HUANG, Weidong et al. Inhibition of *Fusarium oxysporum* by AgNPs biosynthesised using *Cinnamomum camphora* fruit extract. **IET nanobiotechnology**, v. 13, n. 1, p. 42- 45, 2019.

JUNIOR, Romeu Luiz et al. Esporotricose felina: Conduta clínica, diagnóstico e tratamento preconizado no município de Vitória–ES. **Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento** , v. 11, n. 10, pág. e589111031028-e589111031028, 2022.

KAZIYAMA, V. M.; FERNANDES, M. J. B.; SIMONI, I. C. Atividade antiviral de extratos de plantas medicinais disponíveis comercialmente frente aos herpesvírus suíno e bovino. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 3, 2012.

LOPES-BEZERRA, Leila M. et al. Sporotrichosis between 1898 and 2017: The evolution of knowledge on a changeable disease and on emerging etiological agents. **Medical mycology**, v. 56, n. suppl\_1, p. S126-S143, 2018.

LOPES-BEZERRA, Leila M.; MORA-MONTES, Héctor M.; BONIFAZ, Alexandro. *Sporothrix* and Sporotrichosis. In: *Current Progress in Medical Mycology*. Springer, Cham, 2017. p. 309-331.

MAGALHÃES, Vanessa Caroline Randi et al. Late diagnosis of disseminated *Sporothrix brasiliensis* infection with bone marrow involvement in an HIV-negative patient. **Pathogens**, v. 11, n. 12, p. 1516, 2022.

MAIONE, A.; LA PIETRA, A.; DE ALTERIIS, E.; MILEO, A.; DE FALCO, M.; GUIDA, M.; GALDIERO, E. Effect of Myrtenol and Its Synergistic Interactions with Antimicrobial Drugs in the Inhibition of Single and Mixed Biofilms of *Candida auris* and *Klebsiella pneumoniae*. **Microorganisms**, v. 10, p. 1-15, 2022. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10091773>

MIRANDA, Luisa HM et al. Feline sporotrichosis: histopathological profile of cutaneous lesions and their correlation with clinical presentation. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 36, n. 4, p. 425-432, 2013.

MOREIRA, M. R. C. Efeitos do monoterpeno (-)-mirtenol sobre o Sistema Nervoso Central: estudos in vitro e in vivo. 2013. 178 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, 2013.

MOUSSA, Tarek A. A. et al. Origin and distribution of *Sporothrix globosa* causing sapronoses in Asia. **Journal of medical microbiology**, v. 66, n. 5, p. 560-569, 2017.

OLIVEIRA, J. P. Evidências científicas sobre o efeito antinociceptivo de produtos naturais e (-)-mirtenol em modelos de dor orofacial. 157 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, SE, 2019.

OROFINO-COSTA, Rosane et al. Esporotricose humana: recomendações da Sociedade Brasileira de Dermatologia para o manejo clínico, diagnóstico e terapêutico. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 97, n. 6, p. 757-777, 2022.

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

OROFINO-COSTA, Rosane; DE MACEDO, Priscila Marques; BERNARDES-ENGEMANN, Andréa Reis. Hyperendemia of sporotrichosis in the Brazilian Southeast: Learning from clinics and therapeutics. **Current Fungal Infection Reports**, v. 9, p. 220-228, 2015.

PEREIRA, Sandro Antonio et al. The epidemiological scenario of feline sporotrichosis in Rio de Janeiro, State of Rio de Janeiro, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 3, p. 392-393, 2014.

PEREIRA, Sandro Antonio; GREMIAO, Isabella Dib Ferreira; MENEZES, Rodrigo Caldas. Esporotricose em animais: transmissão zoonótica. **Esporotricose: novos desenvolvimentos e perspectivas futuras**, p. 83-102, 2015.

PIRES, C. Revisão de literatura: esporotricose felina. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 15, n. 1, p. 16-23, 15 maio 2017.

POESTER, Vanice Rodrigues et al. Diseleneto de difenila sozinho e em combinação com itraconazol contra *Sporothrix schenckii* s. str. e *Sporothrix globosa*. **Revista Brasileira de Microbiologia**, v. 52, n. 3, p. 1271-1274, 2021.

POESTER, Vanice Rodrigues et al. Potential use of Nikkomycin Z as an anti-*Sporothrix* spp. drug. **Medical Mycology**, v. 59, n. 4, p. 345-349, 2021.

POESTER, Vanice Rodrigues et al. Sinergismo de nikkomycin Z em combinação com difenil disseleneto contra *Sporothrix* spp. **Current Microbiology**, v. 78, n. 8, p. 2905-2909, 2021.  
 POLIDO, Polyana Barros et al. Molecular markers applied to cattle breeding. 2012.

QUINTELLA, Leonardo Pereira et al. Histopathology of cutaneous sporotrichosis in Rio de Janeiro: a series of 119 consecutive cases. **Journal of cutaneous pathology**, v. 38, n. 1, p. 25-32, 2011.

RABELLO, Vanessa Brito Souza et al. The historical burden of sporotrichosis in Brazil: a systematic review of cases reported from 1907 to 2020. **Brazilian journal of microbiology**, v. 53, n. 1, p. 231-244, 2022.

Radice M, Durofil A, Buzzi R, Baldini E, Martínez AP, Scalvenzi L, Manfredini S. Alpha-Phellandrene and Alpha-Phellandrene-Rich Essential Oils: A Systematic Review of Biological Activities, Pharmaceutical and Food Applications. **Life**. 2022; 12(10)

RAMÍREZ-SOTO, Max C. et al. Ecological determinants of sporotrichosis etiological agents. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 3, p. 95, 2018.

REDIGUIERI, Bruno Carneiro et al. Clinical, epidemiological, and epizootic features of *Sporothrix brasiliensis* in Espírito Santo, Brazil. **Ecohealth**, v. 19, n. 1, p. 124-134, 2022.

REIS, J. B.; DE FIGUEIREDO, L. M.; CASTORANI, G.M.; VEIGA, S. M. O. M. Avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais contra patógenos alimentares. **Brazilian Journal of health Review**, v. 3, n. 1, p. 342-363, 2020. doi: 10.34119/bjhrv3n1-025

RIVERA-TOLEDO, Evelyn; JIMÉNEZ-DELGADILLO, Alan Uriel; MANZANO-GAYOSSO, Patricia. Antifúngicos poliénicos. Mecanismo de acción y aplicaciones. **Revista de la Facultad de Medicina UNAM**, v. 63, n. 2, p. 7-17, 2020.

RODRIGUES, Anderson Messias et al. Análise filogenética revela alta prevalência de *Sporothrix brasiliensis* em surtos de esporotricose felina. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7, n. 6, p. e2281, 2013.

RODRIGUES, Anderson Messias et al. Current progress on epidemiology, diagnosis, and treatment of sporotrichosis and their future trends. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 8, p. 776, 2022.

RODRIGUES, Anderson Messias et al. *Sporothrix chilensis* sp. nov.(Ascomycota: Ophiostomatales), a soil-borne agent of human sporotrichosis with mild-pathogenic potential to mammals. **Fungal biology**, v. 120, n. 2, p. 246-264, 2016.

RODRIGUES, Anderson Messias et al. *Sporothrix schenckii* sensu stricto isolated from soil in an armadillo's burrow. **Mycopathologia**, v. 177, p. 199-206, 2014.

RODRIGUES, Anderson Messias et al. The threat of emerging and re-emerging pathogenic *Sporothrix* species. **Mycopathologia**, v. 185, n. 5, p. 813-842, 2020.

RODRIGUES, Anderson Messias; DE HOOG, G. Sybren; DE CAMARGO, Zoilo Pires. Sporothrix species causing outbreaks in animals and humans driven by animal–animal transmission. **PLoS pathogens**, v. 12, n. 7, p. e1005638, 2016.

RODRIGUES, Anderson Messias; DE HOOG, G. Sybren; DE CAMARGO, Zoilo Pires. Genotyping species of the Sporothrix schenckii complex by PCR-RFLP of calmodulin. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 78, n. 4, p. 383-387, 2014.

ROSA, Cristiano Silva et al. Terapêutica da esporotricose: revisão. **Science and animal health**, v. 5, n. 3, p. 212-228, 2017.

ROSSOW, John 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. 4, p. 247, 2020.

SANCHOTENE, Karine Ortiz et al. Sporothrix brasiliensis outbreaks and the rapid emergence of feline sporotrichosis. **Mycoses**, v. 58, n. 11, p. 652-658, 2015.

SANTOS, Agna Ferreira et al. Guia prático para enfrentamento da esporotricose felina em Minas Gerais. **Revista V&Z Em Minas**, 2018.

SCORDINO, F. et al. Antifungal susceptibilities of species of the Sporothrix schenckii complex isolated in Italy. *J. Biol. Research, Italy*. V. 88, p. 139-140. Janeiro, 2015.

Selvaraj A, Valliammai A, Sivasankar C, Suba M, Sakthivel G, Pandian SK. Antibiofilm and antivirulence efficacy of myrtenol enhances the antibiotic susceptibility of Acinetobacter baumannii. *Sci Rep*. 2020 Dec 15;10(1):21975. doi: 10.1038/s41598-020-79128-x. PMID: 33319862; PMCID: PMC7738676.

SERRANO, L. D.; DOS SANTOS, M. V. P.; CAMPRESI, A. C. Esporotricose felina associada à dermatofitose secundária: relato de caso. **Ars Veterinaria**, v. 38, n. 2, p. 72-78, 2022.

SILVA, Cybelle E. et al. Características epidemiológicas e expansão geográfica da esporotricose no estado de Pernambuco, nordeste do Brasil. **Future microbiology**, v. 16, n. 18, p. 1371-1379, 2021.

SILVA, Suzianny Maria Bezerra Cabral da et al. Sexual reproduction in freshwater fairy shrimp, Dendrocephalus brasiliensis (Pesta, 1921) inferred by Amplified Fragment Length Polymorphism markers. **Ciência Rural**, v. 43, p. 1076-1081, 2013.

SILVA-MARTINS, Suellen et al. Myrtenol complexed with  $\beta$ -cyclodextrin ameliorates behavioural deficits and reduces oxidative stress in the reserpine-induced animal model of Parkinsonism. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 48, n. 11, p. 1488-1499, 2021.

SOUSA, Janiere Pereira et al. Study of the antifungal potential and mechanism of action of thymol against strains of Candida parapsilosis resistant to fluconazole and amphotericin B. 2020.

Tan, X.C.; Chua, K.H.; Ravishankar Ram, M.; Kuppusamy, U.R. Monoterpenes: Novel Insights into Their Biological Effects and Roles on Glucose Uptake and Lipid Metabolism in 3T3-L1 Adipocytes. *Food Chem.* **2016**, *196*, 242–250.

TEIXEIRA, Marcus de Melo et al. Asexual propagation of a virulent clone complex in a human and feline outbreak of sporotrichosis. *Eukaryotic Cell*, v. 14, n. 2, p. 158-169, 2015.

VIANA, Ana Flavia SC et al. (–)-Myrtenol accelerates healing of acetic acid-induced gastric ulcers in rats and in human gastric adenocarcinoma cells. *European Journal of Pharmacology*, v. 854, p. 139-148, 2019.

Wojtunik-Kulesza, K.A.; Kasprzak, K.; Oniszczyk, T.; Oniszczyk, A. Natural Monoterpenes: Much More than Only a Scent. *Chem. Biodivers.* 2019, *16*.

XAVIER, Melissa Orzechowski et al. Sporothrix brasiliensis: epidemiologia, terapia e desenvolvimentos recentes. *Journal of Fungi*, v. 9, n. 9, p. 921, 2023.

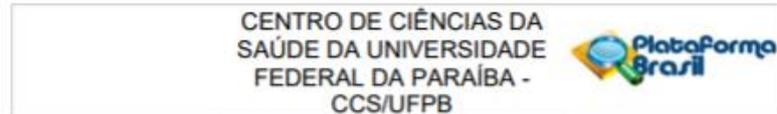
XUEMEI, Liu et al. O mirtenol alivia o estresse oxidativo e a inflamação em ratas grávidas diabéticas através da via de sinalização TLR4/MyD88/NF-κB. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, v. 35, n. 11, pág. e22904, 2021.

ZHOU, Xun et al. Global ITS diversity in the Sporothrix schenckii complex. *Fungal Diversity*, v. 66, p. 153-165, 2014.

ZIELIŃSKA-BŁAJET, Mariola; FEDER-KUBIS, Joanna. Monoterpenes and their derivatives—Recent development in biological and medical applications. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 19, p. 7078, 2020.

## ANEXOS

### Anexo 1- Parecer do comitê ético.



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** AVALIAÇÃO MOLECULAR DA DIVERSIDADE POPULACIONAL DE *Sporothrix* spp. ISOLADOS DA PARAÍBA E BRASIL

**Pesquisador:** FELIPE QUEIROGA SARMENTO GUERRA

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 65629622.0.0000.5188

**Instituição Proponente:** Centro De Ciências da Saúde

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 5.815.119

##### Apresentação do Projeto:

Trata-se de avaliar o projeto de pesquisa em tela do mestrando Felipe Queiroga Sarmiento Guerra, do Departamento de Ciências Farmacéuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, que tem como finalidade realizar identificação e perfil molecular de cepas de *Sporothrix* spp. coletadas no Hospital Universitário Lauro Wanderley da Universidade Federal da Paraíba.

##### Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a distribuição e comportamento biológicos das espécies de *Sporothrix* predominantes nesta área.

##### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

**Riscos:** A pesquisa possui risco de quebra de sigilo dos dados coletados das fichas de prontuários dos pacientes, uma vez que as informações necessárias serão recrutadas de banco de dados do setor de micologia clínica do HULW/CCS/UFPB.

**Benefícios:** Os benefícios desta pesquisa se expressão no maior conhecimento acerca das espécies que estão causando tal surto na Paraíba, no tocante as características epidemiológicas, filogenéticas e perfil de sensibilidade aos antifúngicos das mesmas. Assim, nortear políticas públicas de combate a esta enfermidade.

**Endereço:** Prédio da Reitoria da UFPB 4 1º Andar  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 58.051-900  
**UF:** PB **Município:** JOAO PESSOA  
**Telefone:** (83)3216-7791 **Fax:** (83)3216-7791 **E-mail:** comitedeetica@ccs.ufpb.br

**Anexo 2-** Artigo, produto da dissertação submetido na *Mycoses* – Qualis A1.

Manuscript submitted to *Mycoses* Externa Caixa de entrada x

 **Mycoses** <no-reply@atyponrex.com> para mim ▾ qui., 11 de jul., 09:19 ☆

 Traduza para o português 

Dear Larissa Alves da Silva,

Your manuscript "Analyses of the genetic diversity and population structures of *Sporothrix* spp. clinical isolates from Paraíba-Brazil" has been successfully submitted and is being delivered to the Editorial Office of *Mycoses* for consideration.

You will receive a follow-up email with further instructions from the journal editorial office, typically within one business day. That message will confirm that the editorial office has received your submission and will provide your manuscript ID.

Thank you for submitting your manuscript to *Mycoses*.

Sincerely,  
The Editorial Staff at *Mycoses*



## Anexo 3 – Coautoria artigo publicado durante mestrado – Qualis A2

Am. J. Trop. Med. Hyg., 00(00), 2023, pp. 1–6  
doi:10.4269/ajtmh.22-0501  
Copyright © 2023 The American Society of Tropical Medicine and Hygiene

### Case Report: Ocular Sporotrichosis—A Seven-case Series

Francisco Silva Neto,<sup>1,2</sup> Camila Gadelha,<sup>3</sup> Larissa Silva,<sup>4</sup> Natália Pazos,<sup>4</sup> Alan Silva,<sup>5</sup> Mayara Silva,<sup>6</sup> Bruna Sousa,<sup>6</sup>  
Ana Carolina Bernardes Dulgheroff,<sup>5</sup> Felipe Guerra,<sup>4</sup> Vera Magalhães da Silveira,<sup>7</sup> Manoel Oliveira,<sup>8\*</sup> and  
Reginaldo Lima Neto<sup>5,7\*</sup>

<sup>1</sup>Lauro Wanderley University Hospital, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil; <sup>2</sup>Department of Infectious, Parasitic and Inflammatory Diseases, Center for Medical Sciences, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil; <sup>3</sup>Undergraduated Course in Medicine, Center for Medical Sciences, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil; <sup>4</sup>Post-Graduate Program in Bioactive Synthetic Natural products, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil; <sup>5</sup>Technical Health School, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil; <sup>6</sup>Post-Graduate Program in Fungal Biology, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil; <sup>7</sup>Department of Tropical Medicine, Center for Medical Sciences, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil; <sup>8</sup>Instituto Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil

**Abstract.** Ocular infections associated with sporotrichosis can present four clinical manifestations: granulomatous conjunctivitis, dacryocystitis, Parinaud oculoglandular syndrome, and bulbar conjunctivitis. The incidence of ocular sporotrichosis related to zoonotic transmission has significantly increased in endemic regions and is a frequently misdiagnosed cause of granulomatous conjunctivitis. Therefore, we present a series of seven cases of eye injury by *Sporothrix* strains, including clinical forms, therapeutic approaches, and laboratory procedures to alert health professionals who provide care to these patients.

## Anexo 3- Coautoria e artigo publicado durante o mestrado – Qualis A1.



Article

### $\alpha$ -Pinene: Docking Study, Cytotoxicity, Mechanism of Action, and Anti-Biofilm Effect against *Candida albicans*

Daniela Bomfim de Barros<sup>1,2,3</sup>, Luanna de Oliveira e Lima<sup>2</sup>, Larissa Alves da Silva<sup>2</sup>,  
Mariana Cavalcante Fonseca<sup>2</sup>, Rafael Carlos Ferreira<sup>4</sup>, Hermes Diniz Neto<sup>5</sup>, Danielle da Nóbrega Alves<sup>6</sup>,  
Walicyranison Plínio da Silva Rocha<sup>2</sup>, Luciana Scotti<sup>7</sup>, Edeltrudes de Oliveira Lima<sup>2</sup>,  
Marianna Vieira Sobral<sup>4</sup>, Lúcio Roberto Cançado Castellano<sup>3</sup>, Juliana Moura-Mendes<sup>8,\*</sup>,  
Felipe Queiroga Sarmento Guerra<sup>2,\*</sup> and Márcia Vanusa da Silva<sup>1</sup>

- <sup>1</sup> Department of Biochemistry, Federal University of Pernambuco, Recife 50670-901, PE, Brazil
  - <sup>2</sup> Department of Pharmaceutical Sciences, Paraíba Federal University, João Pessoa 58051-900, PB, Brazil
  - <sup>3</sup> Human Immunology Research and Education Group-GEPIH, Technical School of Health, Federal University of Paraíba, João Pessoa 58051-900, PB, Brazil
  - <sup>4</sup> Postgraduate Program in Natural Products and Synthetic Bioactive, Federal University of Paraíba, João Pessoa 58051-900, PB, Brazil
  - <sup>5</sup> University Hospital Julio Muller, Federal University of Mato Grosso, Cuiabá 78060-900, MT, Brazil
  - <sup>6</sup> Department of Clinical and Social Dentistry, Federal University of Paraíba, João Pessoa 58051-900, PB, Brazil
  - <sup>7</sup> Cheminformatics Laboratory, Postgraduate Program in Natural Products and Synthetic Bioactive, Quality Management, University Hospital, Federal University of Paraíba, João Pessoa 58051-900, PB, Brazil
  - <sup>8</sup> Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas, Universidad Nacional de Asunción, San Lorenzo 111421, Paraguay
- \* Correspondence: jmendes@rec.una.py (J.M.-M.); fqsg@academico.ufpb.br (F.Q.S.G.)

check for

## Anexo 4 - Apresentação oral em simpósio.



Anexo 5 – Resumo publicado no simpósio.



**Anexo 5 – Coautoria de resumo publicado e simpósio.**

**Anexo 6 – Apresentação oral no II Workshop de Micologia Médica.**