



Universidade Federal da Paraíba
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e
Sintéticos Bioativos



LUANNA DE OLIVEIRA E LIMA

(-)-Carveol: Atividade antifúngica sobre *Sporothrix brasiliensis*, citotoxicidade,
ADMET e Docking molecular

João Pessoa – PB

2024

LUANNA DE OLIVEIRA E LIMA

(-)-Carveol: Atividade antifúngica sobre *Sporothrix brasiliensis*, citotoxicidade,
ADMET e Docking molecular

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos.

Área de concentração: Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Felipe Queiroga
Sarmento Guerra

João Pessoa-PB

2024

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

L732c Lima, Luanna de Oliveira e.
(-)-Carveol : atividade antifúngica sobre *Sporothrix brasiliensis*, citotoxicidade, ADMET e Docking molecular / Luanna de Oliveira e Lima. - João Pessoa, 2024.
73 f. : il.

Orientação: Felipe Queiroga Sarmento Guerra.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Esporotricose. 2. (-)-Carveol - Toxicidade. 3. Antifúngicos. 4. Fungicida - Monoterpeno. I. Guerra, Felipe Queiroga Sarmento. II. Título.

UFPB/BC

CDU 616.992(043)



Ata da 505^a (quingentésima quinta) Dissertação de Mestrado do(a) aluno(a) do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos **Luanna de Oliveira e Lima**, candidato(a) ao Título de "Mestre" em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de concentração Farmacologia.

Às quatorze horas (14h00) do dia vinte e seis de setembro do ano de dois mil e vinte e quatro (26/09/2024), no Auditório do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos, da Universidade Federal da Paraíba, reuniram-se em caráter de Solenidade Pública os membros da Comissão designada para examinar o(a) discente **Luanna de Oliveira e Lima**, candidato(a) ao Título de "MESTRE" em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de concentração Farmacologia. Foram componentes da Comissão Examinadora os pesquisadores Fillipe de Oliveira Pereira, Ph.D em Farmacologia; Ricardo Dias de Castro, Ph.D em Farmacologia, e Felipe Queiroga Sarmento Guerra, Ph.D em Farmacologia. Sendo o primeiro, integrante do corpo docente da Universidade Federal de Campina Grande, e os demais, integrantes do corpo docente da Universidade Federal da Paraíba. Dando início aos trabalhos, o(a) Presidente da Comissão, professor(a) Felipe Queiroga Sarmento Guerra, após declarar os objetivos da reunião, apresentou o(a) candidato(a) **Luanna de Oliveira e Lima**, a quem concedeu a palavra para que dissertasse oral e sucintamente sobre o tema apresentado e intitulado "**(-)-Carveol: Atividade antifúngica sobre *Sporothrix brasiliensis*, citotoxicidade, ADMET e Docking molecular**". Após discorrer sobre o referido tema durante cerca de quarenta minutos, o(a) candidato(a) foi arguido(a) pelos examinadores na forma regimental. Em seguida, passou a comissão, em caráter secreto, a proceder à avaliação e julgamento do trabalho, concluindo por atribuir-lhe o conceito APROVADO(A). Em face da aprovação, declarou o(a) Presidente achar-se o(a) examinado(a) **Luanna de Oliveira e Lima** legalmente habilitado(a) a receber o Título de "MESTRE" em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, na área de concentração Farmacologia, cabendo a Universidade Federal da Paraíba, providências, como de direito, a expedição do Diploma que o(a) mesmo(a) faz jus. Nada mais havendo a tratar, foi lavrada a presente ata que é abaixo assinada pelos membros da Comissão e pelo(a) discente.

Felipe Q. S. Guerra
Prof. Dr. Felipe Queiroga Sarmento Guerra (Orientador)

Fillipe de Oliveira Pereira
Prof. Dr. Fillipe de Oliveira Pereira (Examinador)

Ricardo Dias de Castro
Prof. Dr. Ricardo Dias de Castro (Examinador)

Luanna de Oliveira e Lima
Luanna de Oliveira e Lima (Discente)



DEDICATÓRIA

Dona Eunice, minha eterna fã número 1.
Passados 3 anos, ainda é irreal não ter sua
presença no meu dia a dia. Mas sinto sua oração
por mim, em cada passo que dou.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Cida, minha companheira e porto seguro, por todo o amor sentido nos pequenos detalhes. Por sua admiração e orgulho, confiança e torcida. A principal razão para que eu queira sempre evoluir e me tornar melhor. Você sempre será meu orgulho e inspiração.

Ao meu pai, Leonardo, por sempre acreditar em mim, por seu orgulho e admiração. Sem todo auxílio, e investimento em minha educação, com certeza não teria chegado até aqui.

Ao meu noivo, Alexandre, por sempre acreditar em mim mesmo quando não acreditei. Por me acompanhar às leituras dos experimentos nos finais de semana, por me dar forças e estimular a concluir este desafio, por sua paciência e dedicação, na alegria e na tristeza.

Ao meu orientador, Professor Doutor Felipe Queiroga Sarmento Guerra. Faço questão de usar o termo ‘orientador’ pois ele faz questão de cumprir com a definição do termo. Mesmo com tantas responsabilidades e desafios, sempre se fez presente e me orientou quando precisei. Exemplo de comprometimento, responsabilidade, empatia e dedicação. É um orgulho e uma honra ser sua aluna, e poder aprender tanto.

Às companheiras de laboratório Jaqueline Barreto, Rayanne Linhares, Rute Cavalcante, Aléxia Alencar, e Lara Danubia, por toda ajuda e torcida. Destaco aqui Larissa Alves, que esteve do meu lado em todas as fases, ensinando e aprendendo, errando e acertando, em todas as dúvidas e inseguranças. Tenho convicção que nossa ajuda mútua, tornando os desafios um pouco mais leves, foi essencial para chegarmos até aqui.

Aos professores Dr. Fillipe de Oliveira Pereira e Dr. Ricardo Dias Castro, por prontamente aceitarem o convite de compor minha banca de defesa da dissertação, e dedicarem seu tempo a contribuir nesse trabalho. Tenho plena certeza que colaboraram ricamente no resultado desta dissertação.

Ao Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho por gentilmente ceder a substância teste para a realização deste trabalho. Ao Prof. Dr. Juan Carlos Ramos Gonçalves e Prof. Dra. Marianna Vieira Sobral pela parceria nos testes de citotoxicidade. Ao Dr. Cássio Ilan Soares Medeiros pela parceria na realização dos experimentos *in silico*.

Ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos pela excelência no ensino fornecido, e colaboração na minha evolução profissional.

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.

RESUMO

A esporotricose é uma infecção fúngica subcutânea causada por fungos pertencentes ao clado clínico de *Sporothrix*. É considerada uma doença endêmica no Brasil, sendo um importante problema na saúde pública. O fungo tem características saprófitas, logo, é comumente encontrado no solo, e em matérias orgânicas em decomposição. Nos últimos anos, observa-se que a principal forma de transmissão é a zoonótica, que consiste na transmissão dos propágulos fúngicos do animal para o ser humano ou para outros animais. Esta forma favorece a alta presença de *S. brasiliensis* entre humanos, sendo a espécie mais incidente no país. O tratamento atual apresenta opções escassas, sendo as principais, a solução saturada de iodeto de potássio, itraconazol, terbinafina e anfotericina B, que expressam, como principais problemas, seus efeitos adversos e toxicidade, em alguns casos. Fatores como o aumento de cepas resistentes a estes antifúngicos, o custo e duração prolongada do tratamento e efeitos adversos, têm impulsionado a busca por novas substâncias com atividade antifúngica, e as plantas medicinais e seus fitoconstituintes vem sendo amplamente investigadas nesse sentido. Assim, o objetivo desse estudo foi investigar a atividade antifúngica do monoterpeno (-)-Carveol, apontar alvos moleculares, sua interação medicamentosa com antifúngicos de referência, visualizar sua atuação na célula fúngica e analisar sua toxicidade. Para análise da atividade antifúngica do (-)-Carveol frente *S. brasiliensis*, foram realizadas a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Fungicida Mínima (CFM), análise de interação com sorbitol e ergosterol, análise do efeito em combinação com outros fármacos. Além de avaliar a sua citotoxicidade em queratinócitos humano (HaCaT), análise *in silico* das propriedades farmacocinéticas e toxicológicas ADMET (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade) e predizer o comportamento das ligações químicas por meio do docking molecular. (-)-Carveol apresentou CIM de 256 µg/mL sobre a maioria das cepas testadas, com caráter fungicida. Os resultados sugerem que esta atividade não ocorre sobre a parede celular fúngica e nem pela complexação do monoterpeno ao ergosterol da membrana fúngica. A associação do (-)-Carveol com o itraconazol apresentou efeito antagonista. A viabilidade celular foi mantida acima de 50% nas concentrações de 256 µg/mL e 512 µg/mL na linhagem celular testada. Nos estudos *in silico*, (-)-Carveol apresentou baixa probabilidade de interações medicamentosas farmacocinéticas e toxicidade, melhor distribuição nos tecidos e no plasma quando comparado ao itraconazol; bem como não foi hepatotóxico, não apresentou riscos de mutagenicidade, tumorigenicidade, características apresentadas pelo itraconazol. O (-)-Carveol e o itraconazol interagem ligando-se ao sítio ativo da CYP51, porém o itraconazol apresentou prioridade de ligação, e maior afinidade pelo sítio de ligação. O presente estudo demonstra que (-)-Carveol representa uma potencial atividade antifúngica, podendo se tornar uma alternativa no tratamento da esporotricose e no controle de disseminação do fungo, sendo necessários mais estudos que identifiquem seu mecanismo de ação, além de alternativas que melhorem sua citotoxicidade.

Palavras-chave: Esporotricose, Antifúngicos, Monoterpeno, Fungicida, Toxicidade.

ABSTRACT

Sporotrichosis is a subcutaneous fungal infection caused by fungi belonging to the clinical clade of *Sporothrix*. It is considered an endemic disease in Brazil, representing a significant public health issue. The fungus has saprophytic characteristics, meaning it is commonly found in soil and decomposing organic matter. In recent years, zoonotic transmission has been observed as the primary form of transmission, consisting of the transmission of fungal propagules from animals to humans or other animals. This form favors high presence of *S. brasiliensis* among humans, being the most prevalent species in the country. Current treatment options are scarce, with the main ones being saturated potassium iodide solution, itraconazole, terbinafine, and amphotericin B, which, as primary concerns, express adverse effects and toxicity in some cases. Factors such as the increase in antifungal-resistant strains, the cost and prolonged duration of treatment, and adverse effects have driven the search for new substances with antifungal activity, and medicinal plants and their phytoconstituents have been widely investigated in this regard. Thus, the objective of this study was to investigate the antifungal activity of the monoterpene (-)-Carveol, identify molecular targets, its drug interaction with reference antifungals, visualize its action in the fungal cell, and analyze its toxicity. To analyze the antifungal activity of (-)-Carveol against *S. brasiliensis*, the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Fungicidal Concentration (MFC) were determined, along with interaction analysis with sorbitol and ergosterol, and the effect of its combination with other drugs was analyzed. In addition, its cytotoxicity in human keratinocyte (HaCaT) was evaluated, along with an in silico analysis of the pharmacokinetic and toxicological properties ADMET (absorption, distribution, metabolism, excretion, and toxicity) to predict the behavior of chemical bonds through molecular docking. (-)-Carveol showed an MIC of 256 µg/mL on the majority of strains tested, with fungicidal characteristics. The results suggest that this activity does not occur on the fungal cell wall nor through the complexation of the monoterpene with the ergosterol of the fungal membrane. The association of (-)-Carveol with itraconazole showed an antagonistic effect. Cell viability remained above 50% at concentrations of 256 µg/mL and 512 µg/mL in the tested cell line. In the in silico studies, (-)-Carveol presented a low probability of pharmacokinetic drug interactions and toxicity, better distribution in tissues and plasma when compared to itraconazole; as well as not being hepatotoxic and showing no risks of mutagenicity or tumorigenicity, which are characteristics presented by itraconazole. Both (-)-Carveol and itraconazole interact by binding to the active site of CYP51, but itraconazole showed binding priority and greater affinity for the binding site. This study demonstrates that (-)-Carveol exhibits potential antifungal activity and may serve as an alternative for the treatment of sporotrichosis and the control of fungal dissemination. Further studies are needed to identify its mechanism of action and explore strategies to improve its cytotoxicity profile.

Keywords: Sporotrichosis, Antifungals, Monoterpene, Fungicide, Toxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Principais membros de relevância clínica do gênero <i>Sporothrix</i>	17
Figura 2 - Expansão da esporotricose humana e felina nos últimos anos no Brasil	18
Figura 3 - Mapa mundial com foco na América de casos de esporotricose causadas por <i>Sporothrix brasiliensis</i> relacionados ao Brasil.....	21
Figura 4 - Morfologia de <i>Sporothrix</i> spp. em suas formas micelial e leveduriforme ...	24
Figura 5 - Estrutura química do (-)-Carveol	35
Figura 6 - Viabilidade celular da linhagem de queratinócito humano (HaCaT) após 72 horas de tratamento com diferentes concentrações de (-)-Carveol.....	52
Figura 7 - Processo de resolução e validação da estrutura 3D da enzima CYP51 de <i>S. brasiliensis</i>	56
Figura 8 - Docking molecular dos ligantes (-)-Carveol e itraconazol com o sítio ativo da enzima CYP51 de <i>S. brasiliensis</i> previsto pelo AlphaFold2	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - CIM ($\mu\text{g/mL}$) e CFM ($\mu\text{g/mL}$) do (-)-Carveol sobre cepas de <i>Sporothrix brasiliensis</i>	46
Tabela 2 - CIM ($\mu\text{g/mL}$) do (-)-Carveol e antifúngicos controles na ausência e na presença do sorbitol e do ergosterol	48
Tabela 3 - CIM ($\mu\text{g/mL}$) combinada e efeitos da combinação entre (-)-Carveol e antifúngicos frente a cepa 200 e 279	50
Tabela 4 - Parâmetros farmacocinéticos <i>in silico</i> (pkCSM) do (-)-Carveol e do itraconazol	53
Tabela 5 - Propriedades toxicológicas e drogabilidade <i>in silico</i> do (-)-Carveol, itraconazol e anfotericina B	55
Tabela 6 - Energias livres de ligação (ΔG) e constante inibitória (Ki) dos ligantes (-)-Carveol e itraconazol frente a enzimas CYP51 de <i>S. brasiliensis</i> previsto pelo AlphaFold2 ..	57

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Å	Angstrom (10^{-10} m)
µg/mL	Micrograma/mililitros
µL	Microlitros
ABD	Agar Batata Dextrose
ASD	Agar Sabouraud Dextrose
ADMET	Adesão, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade
BHI	Brain Heart Infusion
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais
CYP	Citocromo P450
DCF	Departamento de Ciências farmacêuticas
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EPM	Erro Padrão da Média
HaCaT	Células de Queratinócitos Humanos
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IRIS	Síndrome Inflamatória da Reconstituição Imune
MTT	Brometo de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio
OE	Óleo essencial
OMS	Organização Mundial da Saúde
q.s.p	Quantidade suficiente para
PCR	Reação de Cadeia de Polimerase
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
RPMI	Roswell Park Memorial Institut
SNC	Sistema Nervoso Central
spp.	Espécies
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFPB	Universidade Federal da Paraíba

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
2.1	ESPOROTRICOSE	16
2.1.1	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	20
2.1.2	Diagnóstico.....	22
2.1.3	Terapia e suas barreiras	26
2.2	PRODUTOS NATURAIS.....	32
2.2.1	Carveol	35
3	OBJETIVOS.....	37
3.1	OBJETIVO GERAL.....	37
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	38
4.1	LOCAL DA PESQUISA	38
4.2	CEPAS FÚNGICAS.....	38
4.3	MEIOS DE CULTURA	38
4.4	SUBSTÂNCIAS	39
4.5	PREPARO DO INÓCULO	39
4.6	ENSAIOS ANTIMICROBIANOS.....	39
4.6.1	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	39
4.6.2	Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)	40
4.6.3	Ação sobre a parede celular fúngica – ensaio com sorbitol	41
4.6.4	Ação sobre a membrana celular fúngica – ensaio com ergosterol	41
4.6.5	Estudo de associação – <i>Checkerboard</i>	42
4.7	ENSAIO DE CITOTOXICIDADE	42
4.8	ENSAIOS <i>in silico</i>	43
4.8.1	ADME, análise físico-química e de toxicidade	43
4.8.2	Previsão da estrutura 3D para CYP51 de <i>S. brasiliensis</i>	44
4.8.3	<i>Docking</i> molecular.....	44
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46

5.1	DETERMIMAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA E DA CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA.....	46
5.2	EFEITO DO (-)-CARVEOL NA PRESENÇA DO SORBITOL E ERGOSTEROL EXÓGENO.....	48
5.3	EFEITO DA SUA ASSOCIAÇÃO COM ANFOTERICINA B E ITRACONAZOL.....	50
5.4	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE EM CÉLULA NÃO TUMORAL	51
5.5	ENSAIOS <i>in silico</i>	53
5.5.1	Previsão farmacocinética e toxicológica do (-)-Carveol e do itraconazol	53
5.5.2	(-)-Carveol se liga ao sítio ativo do CYP51	55
5.5.3	Estudos de ancoragem	57
6	CONCLUSÕES	60
	REFERÊNCIAS	61
	ANEXOS	72

1 INTRODUÇÃO

A esporotricose é uma infecção fúngica subcutânea causada por fungos pertencentes ao clado clínico *Sporothrix*. É considerada uma doença endêmica no Brasil, em destaque no estado do Rio de Janeiro, e como problema de saúde pública precisa ser discutida e conhecida pela população. O fungo apresenta termodimorfismo, isto é, no solo ou em matérias vegetais, por volta de 25°C se encontra em sua fase filamentosa, e quando inoculado no hospedeiro mamífero à temperatura de 35-37°C se encontra na sua forma leveduriforme (Fichman *et al.*, 2023; Rodrigues *et al.*, 2022). A doença pode acometer o ser humano e animais (Gremião *et al.*, 2021; Rodrigues *et al.*, 2020).

A transmissão pode acontecer via sapronose, ou seja, pelo contato do fungo presente no ambiente com o hospedeiro mamífero, ou zoonose, onde o animal infectado transmite os propágulos fúngicos para o ser humano com a pele lesionada (inoculação direta ou indireta) (Fichman *et al.*, 2023; Waller *et al.*, 2021). *S. brasiliensis*, *S. schenckii*, *S. globosa* e *S. luriei*, compõem o clado clínico patogênico, sendo *S. brasiliensis* a espécie de maior incidência no nosso país, principalmente associada a transmissão zoonótica (Rodrigues *et al.*, 2022).

O tratamento de primeira escolha para a esporotricose linfocutânea e cutânea é o itraconazol, devido à sua eficácia, segurança e conveniência posológica. Porém este fármaco é hepatotóxico, teratogênico e embriotóxico. Outras opções terapêuticas disponíveis é a solução saturada de iodeto de potássio, posaconazol, terbinafina, que apresentam efeitos colaterais leves, como cefaleia e náusea, porém o posaconazol é um medicamento de alto custo (Orofino-Costa *et al.*, 2022; Xavier *et al.*, 2023).

Para casos sistêmicos, a opção terapêutica é a anfotericina B, que é cardiotóxica e nefrotóxica, e é administrada via intravenosa, sendo necessário acompanhar os exames laboratoriais do paciente. Tem crescido os registros de cepas resistentes aos antifúngicos disponíveis para o tratamento. Essa resistência acontece por diversos fatores expressos pelo clado clínico, como: produção de melanina, diversidade genética, e mutações em enzimas-alvo dos antifúngicos (Waller *et al.* 2021). Somado a isso, o tempo e custo do tratamento, efeitos adversos, e recidivas da doença, são questões que dificultam a adesão do paciente (Cavassin *et al.* 2021; Fichman *et al.*, 2023). Diante de todas essas adversidades, é necessário buscar alternativas para o controle dessa doença.

O (-)-Carveol é um álcool monoterpênico que possui diversas atividades biológicas relatadas na literatura, como como, agente anti-inflamatório (MARQUES *et al.*, 2019), antioxidante, vasorelaxante, dentre outras (Kaur *et al.*, 2019; Marques *et al.*, 2019; Serafim *et*

al., 2021; Silva *et al.*, 2020). Além disso, (-) -Carveol apresentou forte atividade antibacteriana frente *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Typhimurium*, *Bacillus cereus* (Guimarães *et al.*, 2019). Quanto à sua atividade antifúngica, foi constatada frente as espécies *Candida glabrata*, *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii*, *C. albicans* (Moraes, 2021). Raj *et al.* (2023) constatou sua atividade sobre uma cepa padrão de *C. albicans*, ainda apontando para sua ação via membrana celular fúngica.

Vale ressaltar portanto, que não há estudos na literatura avaliando o potencial antifúngico do (-)-Carveol frente *Sporothrix* spp. Logo, diante de toda problemática exposta acerca do *Sporothrix brasiliensis*, culminando na carência de alternativas ao tratamento e prevenção da esporotricose, é de extrema importância buscar moléculas bioativas seguras tanto para o ser humano quanto animais, com potencial antifúngico sobre essa espécie. Assim, o presente estudo investigou, através de métodos *in vitro* e *in silico*, a atividade antifúngica desse monoterpeno sobre cepas de *S. brasiliensis*, avaliando suas propriedades farmacocinéticas e tóxicas, a fim de contribuir para seu potencial antifúngico e futura aplicação clínica.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 ESPOROTRICOSE

A esporotricose é uma infecção fúngica subaguda ou crônica, que atinge normalmente pele, tecido subcutâneo e vasos linfáticos, causada por fungos pertencentes ao clado clínico *Sporothrix*. É considerada uma doença endêmica em diversas regiões do mundo, incluindo o Brasil, sendo considerada um grave problema de saúde pública. Devido as características de seu agente etiológico, é de fácil contágio e disseminação, e tem o poder de acometer tanto humanos quanto animais, com considerável morbidade e mortalidade (Gremião *et al.*, 2021; Rodrigues *et al.*, 2020).

As formas clínicas mais comuns da esporotricose são a forma cutânea fixa e a linfocutânea. Nestas, a manifestação se desenvolve a partir de uma lesão cutânea inicial, com inoculação das partículas fúngicas através dela, diretamente (a lesão ocorre no momento da inoculação, através de arranhão, mordida ou corte) ou indiretamente (a pele com uma lesão prévia entra em contato com o fungo). Ocorre aparecimento inicial de uma pústula nodular avermelhada e indolor no local de inoculação do fungo, que pode adquirir caráter ulcerativo evoluindo a depender da condição imunológica do hospedeiro (Orofino-Costa *et al.*, 2022; Tirado-Sánchez; Bonifaz, 2018).

Na forma cutânea fixa essa lesão inicial indolor pode evoluir para ulceração, com bordas irregulares e aspecto verrucoso. Na linfocutânea, forma-se a pústula, e com o passar das semanas ocorre evolução, com o aparecimento de novas pústulas no trajeto linfático regional, que pode ser tanto ascendente quanto descendente ao local inicial. Ambas ocorrem mais comumente nos locais mais expostos do corpo, membros inferiores, superiores e rosto (Orofino-Costa *et al.*, 2022).

Outras formas clínicas mais raras, porém, mais graves da doença são: osteoarticular (comprometimento articular com destruição da cartilagem, e lesões osteolíticas, com dor, edema e limitação funcional), mucosa (contato dos propágulos fúngicos com a mucosa ocular, palato ou faringe), sistêmica (disseminação hematogênica do patógeno a partir de lesão cutânea ou osteoarticular) (Orofino-Costa *et al.*, 2022).

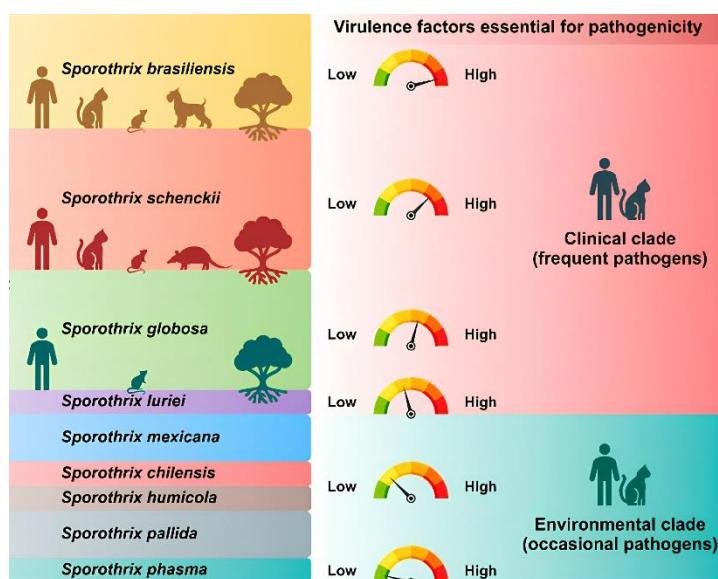
O fungo causador da doença apresenta termodimorfismo, isto é, à temperatura ambiente por volta de 25°C se encontra em sua fase filamentosa, e a transição para o estado leveduriforme ocorre quando inoculado no hospedeiro mamífero, à temperatura de 35-37°C. O fungo tem características saprófitas, logo, é comumente encontrado no solo, e em matérias orgânicas em

decomposição. Característica essa que batizava popularmente a doença como ‘doença do jardineiro’, uma vez que a principal forma de contaminação (sapronose) era o contato com esses materiais contaminados, sendo considerada uma micose ocupacional (Costa, 2019; Rodrigues *et al.*, 2020).

Nessa via sapronótica o hospedeiro mamífero pode se contaminar com a forma filamentosa, presente no ambiente (solo, tronco de árvores, matérias orgânicas). Porém, hoje a via de contaminação mais comum é a zoonótica. Consiste na transmissão dos propágulos fúngicos do animal (principalmente gatos) para o ser humano ou para outros animais. Os padrões de contato entre gatos e outros animais, como cachorros, ou entre gatos e humanos (no caso de animais domésticos, ou de rua, que tenham contato com pessoas, desencadeando a esporotricose humana), frequentemente envolvendo arranhões e mordidas, contribuem para a ocorrência de epizootias e transmissão zoonótica (Rodrigues *et al.*, 2020; Waller *et al.*, 2021).

Os gatos são as principais vítimas da esporotricose, devido seus hábitos de explorar o território, muitas vezes sem supervisão, apresentando principalmente úlceras cutâneas como sinais clínicos. Nos felinos doentes, as lesões cutâneas contêm uma alta concentração de leveduras, diferente de outros animais, como cães, que possuem baixa carga fúngica nas lesões. Essas leveduras são transferidas para o ser humano, e para outros animais através de arranhões ou mordidas, evidenciando a importância desses animais na cadeia epidemiológica da esporotricose (De Oliveira Bento *et al.*, 2021; Gremião *et al.*, 2021).

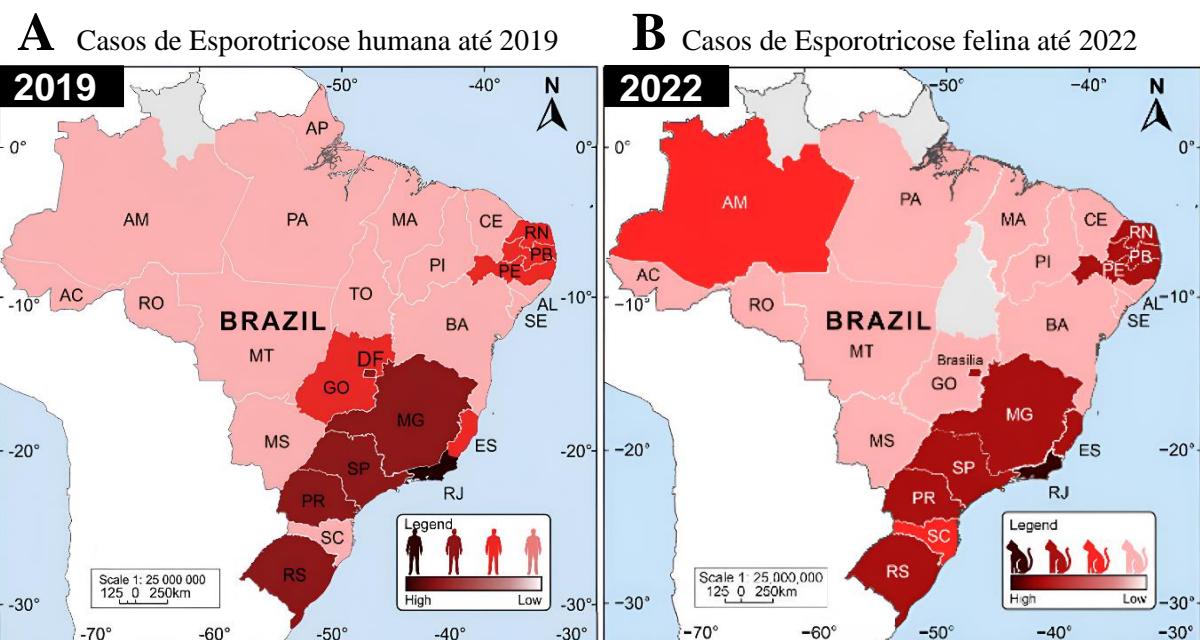
Figura 1 - Principais membros de relevância clínica do gênero *Sporothrix*



Fonte: Rodrigues *et al.* (2022)

Atualmente estão identificadas 53 espécies dentro do gênero *Sporothrix*, que são agrupadas em clados de acordo com suas semelhanças (origem, virulência, patogenicidade, dentre outros). Como exposto na Figura 1, no clado patogênico estão as espécies *S. brasiliensis*, *S. schenckii*, *S. globosa* e *S. luriei*, espécies mais comumente isoladas de pacientes diagnosticados com esporotricose. No clado ambiental, *S. mexicana*, *S. chilensis*, *S. humicola*, *S. pallida*, e *S. phasma*, são patógenos ocasionais com potencial patogênico moderado para mamíferos. Outras espécies estão inseridas no clado ambiental com pouca ou nenhuma patogenicidade para mamíferos (Rodrigues *et al.*, 2022).

Figura 2 - Expansão da esporotricose humana e felina nos últimos anos no Brasil



Fonte: Adaptado de Rodrigues *et al.* (2020); Rodrigues *et al.* (2022)

Legenda: Imagem de gato = esporotricose felina; Imagem de humano = esporotricose humana; quanto mais intensa a coloração, maior o número de casos.

Nos últimos anos, há relatos de casos de esporotricose humana em 25 dos 26 estados brasileiros (Figura 2 A). A partir da década de 1990 houve um aumento de manifestações epizooticas em felinos, e consequentemente a transmissão do fungo para os humanos, tendo o estado do Rio de Janeiro como epicentro (Figura 2), com milhares de casos documentados na literatura (Rodrigues *et al.*, 2020). A partir dos anos 2000 notou-se um avanço dessa endemia para outros estados do Sudeste e para a região Sul, facilitado pelas características do fungo e forma de transmissão (Rodrigues *et al.*, 2022).

A região Nordeste tem apresentado um aumento expressivo no número de casos de esporotricose humana e felina nos últimos anos (Figura 2), com destaque para os estados de Pernambuco (Valeriano *et al.*, 2020), Paraíba (Silva Neto, *et al.*, 2023) e Rio Grande do Norte

(Do Monte Alves *et al.*, 2020). O que se observa nesses surtos, é um predomínio da identificação de *S. brasiliensis*, espécie diretamente relacionada com a transmissão zoonótica (De Oliveira Bento *et al.*, 2021).

Na Paraíba, o aumento substancial no número de casos teve início em 2018. A Secretaria de Saúde do Estado emitiu uma resolução CIB/SES/PB nº 80/18 em 07 de agosto de 2018, onde reconhece a proporção da esporotricose humana no estado e determina a notificação compulsória, disponibilizando um sistema para cadastro de casos suspeitos e confirmados da doença. No ano de 2019 por exemplo foram notificados 711 casos da doença em todo estado. A alta nos casos perdurou nos anos seguintes, com uma leve atenuação. Em 2023, por exemplo, foram notificados 577 casos, a grande maioria concentrados na capital João Pessoa (De Oliveira Bento *et al.*, 2021; SESPB, 2023).

Espécies de interesse clínico não são distribuídas uniformemente em todo o mundo, porém observa-se um predomínio de uma única espécie nos locais em que se desenvolve uma endemia. Por exemplo, na Ásia a espécie mais prevalente é a *S. globosa* (99,3% dos casos), na Austrália e sul da África a *S. schenckii* (94% dos casos), sudeste da América do Sul a *S. brasiliensis* (88% dos casos), oeste da América do Sul, América Central e do Norte a *S. schenckii* (89% dos casos) (Angelo, 2021).

Além do termodimorfismo, *Sporothrix* spp. apresenta outros fatores de virulência que caracterizam sua patogenicidade, como glicoproteínas, proteínas secretadas, vesículas extracelulares, melanina. Algumas proteases, Proteinase I por exemplo, desempenham um papel essencial na interação deste fungo com as células hospedeiras, conferindo capacidade de invasão aos tecidos cutâneos. As adesinas no *Sporothrix* spp. são responsáveis por mediar a ligação da levedura à matriz dérmica. A Gp70, uma glicoproteína de 70 kDa, é uma adesina que possui papel crucial na modulação da resposta imune do hospedeiro, é altamente imunogênica e é detectada em soro de camundongos infectados (Carnero *et al.*, 2018).

A melanina é um pigmento marrom que confere proteção à célula fúngica contra macrófagos e neutrófilos. Tanto leveduras quanto hifas são capazes de produzir melanina através das vias 1,8-di-hidroxinaftaleno (DHN) e L-3,4-di-hidroxifenilalanina (L-DOPA). Uma terceira via, de L-tirosina (piomelanina), foi observada para *S. brasiliensis*, *S. schenckii* e *S. globosa*. A produção desse pigmento é maior e mais rápida em *S. brasiliensis* do que em *S. schenckii* por exemplo (Guan *et al.*, 2021; Waller *et al.*, 2021).

Mais um exemplo é a expressão de proteínas associadas a vesículas pelo gênero. A glucanase da parede celular induz a lise de macrófagos e outras células hospedeiras devido à remodelação de sua superfície. A superóxido dismutase (SOD) por sua vez, contribui para o

crescimento e sobrevivência do patógeno sob condições de estresse oxidativo, assim como dentro de macrófagos (García-Carnero; Martínez-Álvarez, 2022).

Observa-se que tem crescido substancialmente relatos de cepas de *Sporothrix* spp. resistentes aos antifúngicos disponíveis na clínica, e *S. brasiliensis* é a espécie fúngica com maior capacidade de adquirir mecanismo mutacional ou de resistência. Quanto à resistência uma cepa pode ser *non-wild-type* (tipo não selvagem) - espécies de *Sporothrix* com suscetibilidade reduzida ao antifúngico, devido a mecanismo mutacional ou de resistência adquirido - ou *wild-type* (tipo selvagem) - isolados sem mecanismo de resistência adquirida (Waller *et al.*, 2021).

A melanina, pigmento marrom que confere proteção à célula fúngica contra macrófagos e neutrófilos, também a protege de oxidantes derivados de nitrogênio e do antifúngico Anfotericina B, e em alguns casos protege contra o efeito da terbinafina, um antifúngico alternativo à terapia com anfotericina B. Esse efeito funciona como uma “armadura” interferindo no contato do antifúngico com a célula fúngica (Carnero *et al.*, 2018).

A diversidade genética também está relacionada ao desenvolvimento de resistência do fungo. Cepas que apresentaram polimorfismo genético apresentaram variabilidade de perfis de suscetibilidade antifúngica (Waller *et al.*, 2020). Os azólicos atuam inibindo as monooxigenases do citocromo P450, particularmente CYP51 que está envolvido na biossíntese do ergosterol. Uma mutação nessa enzima-alvo do antifúngico interfere a sua ligação e o seu efeito, sendo outro importante mecanismo de resistência do fungo (Waller *et al.*, 2021).

Durante a primeira reunião do grupo de especialistas em antifúngicos da Organização Mundial da Saúde (OMS), realizada em 2020, os patógenos pertencentes ao gênero *Sporothrix*, e consequentemente a esporotricose, foram destacados como candidatos para inclusão na lista de Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs) da OMS. Essa lista engloba doenças que afetam principalmente populações de baixa renda em regiões tropicais e subtropicais e que são responsáveis por significativa mortalidade e morbidade (WHO, 2020). Esse reconhecimento, evidencia a importância de conhecer a doença, seu fungo causador, e estudar maneiras de combatê-lo.

2.1.1 *Sporothrix brasiliensis*

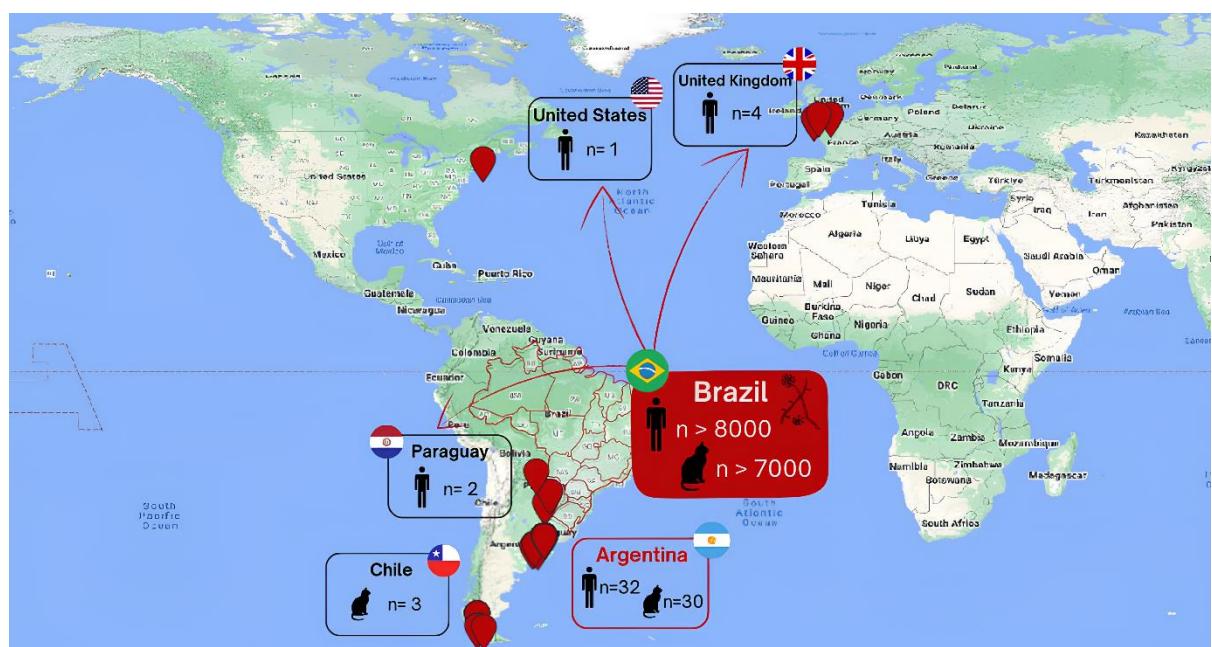
S. schenckii, *S. brasiliensis*, *S. globosa* são os principais agentes etiológicos da esporotricose em todo o mundo, identificados em mais de 90% dos casos relatados. Ademais, *S. brasiliensis* é a espécie responsável pela característica endêmica da esporotricose transmitida

por gatos no Brasil, estando assim diretamente ligada a transmissão e proliferação dessa zoonose (Xavier *et al.*, 2023). Assim, fica clara a importância de estudar tal espécie com foco no controle de sua difusão, que gera um grande problema de saúde pública.

A espécie *S. brasiliensis* compõe uma população de patógenos geneticamente homogênea, com perfil de suscetibilidade *in vitro* semelhante entre os indivíduos, sendo considerada a espécie mais virulenta em felinos e humanos (Figura 1). Uma das principais causas disso, é a sua resistência térmica quando comparados com outras espécies do mesmo clado, como por exemplo *S. globosa*, que é sensível em temperaturas acima de 35°C. Esse é um importante mecanismo de adaptação nos felinos, que possuem temperatura corporal de $\pm 39^{\circ}\text{C}$ (Angelo, 2021; Gremião *et al.*, 2021).

Por muito tempo acreditou-se que a espécie seria exclusiva do país, porém nos últimos anos este cenário mudou como demonstrado na Figura 3. A Argentina por exemplo, apresentou um aumento expressivo no número de casos tanto da esporotricose humana quanto animal na última década. No Paraguai em 2017 ocorreu o relato de dois casos de infecção após contato com gato infectado no território brasileiro. Além disso o primeiro caso de esporotricose zoonótica nos EUA foi relatado por uma paciente que viajou do Brasil, onde foi mordida por um gato infectado. Ainda foram relatados casos no Reino Unido de pacientes infectados pós contato com gatos importados do Brasil (Angelo, 2021; Xavier *et al.*, 2023).

Figura 3 - Mapa mundial com foco na América de casos de esporotricose causadas por *Sporothrix brasiliensis* relacionados ao Brasil



Fonte: Adaptado de Xavier *et al.* (2023).

Legenda: Imagem de gato = esporotricose felina; Imagem de humano = esporotricose humana; n = número de casos.

Esse cenário sugere que a espécie esteja presente em todo o território, como demonstrado na Figura 2. No Brasil se observa que em regiões onde se inicia uma epizootia em gatos, conjuntamente ocorre um aumento expressivo nos casos de esporotricose humana. E nessas epizootias a espécie mais observada é justamente a *S. brasiliensis*. Para este fim, a transmissão zoonótica favorece a alta presença de *S. brasiliensis* entre humanos, o que vem sendo observado nos últimos levantamentos epidemiológicos (Costa, 2019; Gremião *et al.*, 2021; Rodrigues *et al.*, 2020).

Assim, é de grande importância difundir o conhecimento sobre esta importante zoonose. Estudos acerca da epidemiologia da doença, permite o surgimento de mais relatos de casos, e consequentemente, possibilita que os estabelecimentos de saúde entendam a importância de notificar os casos suspeitos e identificados. Fazer com que a população, mesmo que de regiões não endêmicas, conheçam o fungo, entendam as formas de contaminação, é um passo essencial para o controle da disseminação da doença.

2.1.2 Diagnóstico

No Brasil, *S. brasiliensis*, *S. schenckii* e *S. globosa* coexistem, sendo *S. brasiliensis* a mais virulenta. A espécie também é identificada na grande maioria dos casos de esporotricose felina, estando diretamente relacionada a propagação dessa zoonose. Por essa razão, além de identificar o fungo causador dos sinais clínicos, e consequentemente a doença, também é de extrema importância identificar a espécie, a fim de monitorar a zoonose e a variabilidade genética das espécies nas regiões em que são encontradas (Gremião *et al.*, 2021; Orofino-Costa *et al.*, 2022).

O diagnóstico se inicia na suspeita clínica da doença. Para isso, é necessário que o profissional da saúde realize uma anamnese completa: se havia uma lesão prévia, aspecto da lesão, saber se o paciente teve contato com algum animal, a região em que reside, há quantos dias notou a lesão, dentre outros questionamentos. Esse passo, anterior ao processamento laboratorial, é determinante para o diagnóstico diferencial com outras patologias que apresentam sinais clínicos semelhantes, como leishmaniose tegumentar americana, histoplasmose e paracoccidioidomicose (Almeida-Paes *et al.*, 2022; Thompson *et al.*, 2021).

O diagnóstico de micoses endêmicas geralmente é baseado na combinação de dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais. Entre os métodos laboratoriais comuns estão o exame

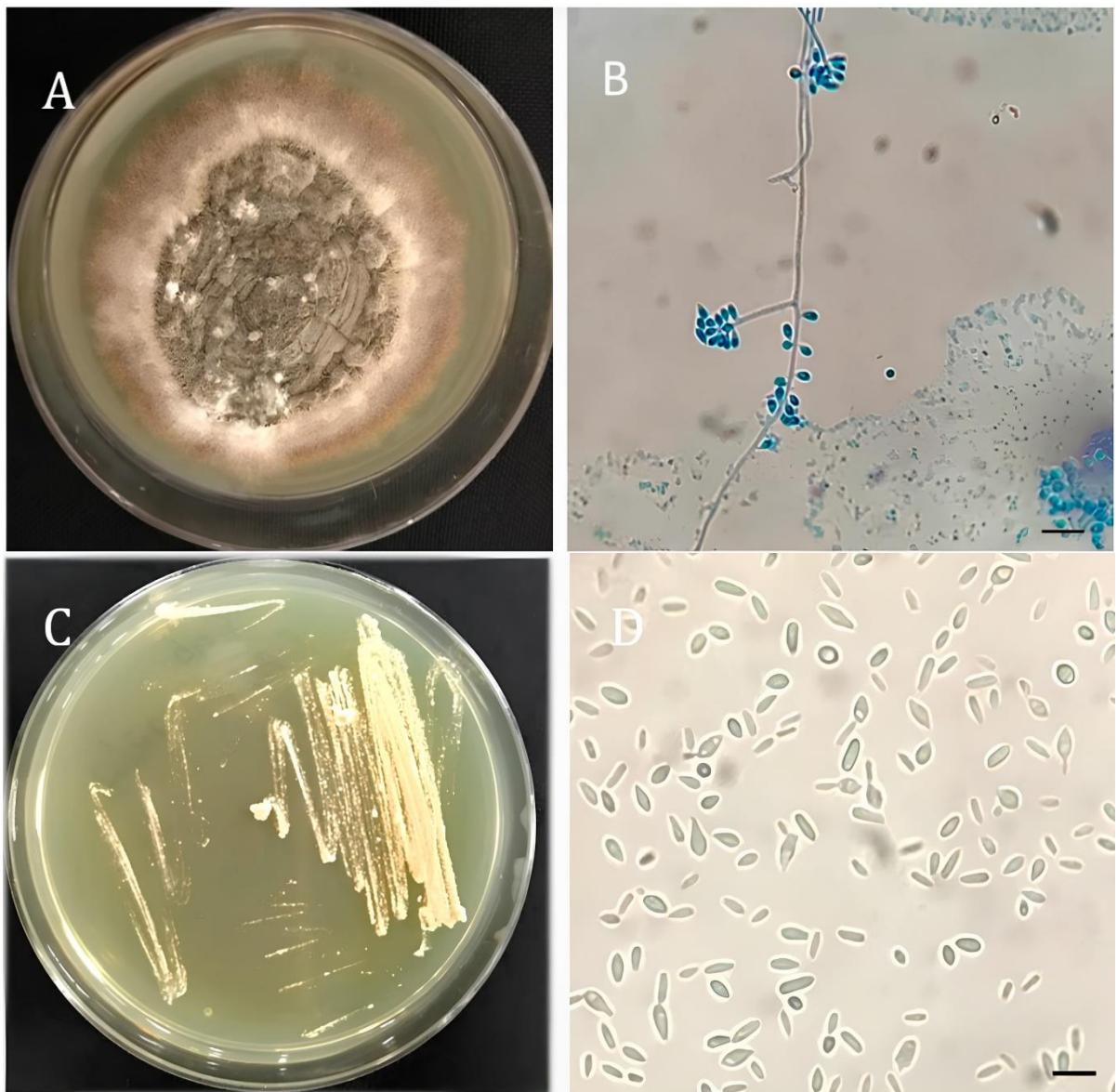
microscópico direto (EMD) utilizando hidróxido de potássio (KOH) e a cultura de amostras biológicas. Embora o EMD dos agentes patogênicos possa ser bastante indicativo de micoses endêmicas, para a esporotricose humana a sensibilidade desse método é baixa, devido à insuficiência de partículas fúngicas nas lesões. Diferente da esporotricose felina, que apresenta alta carga fúngica na lesão, sendo o EMD padrão-ouro de diagnóstico neste caso (Almeida-Paes *et al.*, 2022; Thompson *et al.*, 2021).

Já a cultura é o principal meio para identificar *Sporothrix* spp. Consiste na identificação do gênero, ao inocular amostras de lesões cutâneas em meio Ágar Sabouraud Dextrose (ASD), Ágar Mycosel, ou Ágar Batata Dextrose (ABD). O crescimento de *Sporothrix* spp. surge em 3-6 dias, em temperatura ambiente entre 25° - 28°C. O mesmo processo pode ser realizado com materiais orgânicos a fim de identificar a presença do fungo em um ambiente, onde o crescimento surge de 10-19 dias, podendo variar de acordo com a espécie presente ali (Orofino-Costa *et al.*, 2022; Rodrigues *et al.*, 2022).

A identificação é feita observando a macro e a micromorfologia do crescimento. Macroscopicamente (Figura 4 A), as colônias começam a crescer como fungos filamentosos hialinos, podem se manter assim inteiramente brancos, ou ainda se tornam marrons a pretos após alguns dias, principalmente no centro da colônia. Microscopicamente (Figura 4 B), a forma micelial é observada como hifas septadas, finas, ramificadas e hialinas, com células conidiogênicas surgindo de hifas indiferenciadas, formando conídios de paredes espessas pequenos, com um arranjo em formato de flor (Orofino-Costa *et al.*, 2022; Rodrigues *et al.*, 2022).

O termodimorfismo é uma característica marcante do clado clínico *Sporothrix*, logo é importante estimular a transição morfológica da amostra. O fungo deve ser semeado em meio enriquecido ágar Brain Heart Infusion (BHI) e incubado a 35–37 C para obter colônias leveduriformes. Neste caso o tempo de transição pode ser mais demorado, logo recomenda-se incubação por até 30 dias para garantir um resultado satisfatório. Na forma de levedura, macroscopicamente (Figura 4 C) as colônias são de cor creme e lisas, de aspecto cremoso. Microscopicamente (Figura 4 D), é possível observar células fusiformes e ovais medindo 2,5 – 5 µm de diâmetro, como botões em forma de charuto (Magalhães *et al.*, 2022; Rodrigues *et al.*, 2022).

Figura 4 - Morfologia de *Sporothrix* spp. em suas formas micelial e leveduriforme



Fonte: Magalhães *et al.* (2022)

Legenda: (A) Cultura micelial após incubação de dez dias a 25 °C em ASD. (B) Microscopia óptica de hifas e conídios típicos de *S. brasiliensis* (azul de algodão, $\times 400$). (C) Cultura leveduriforme após sete dias a 37 °C e 5% de CO₂ em BHI. (D) Microscopia óptica de colônia leveduriforme (solução salina, $\times 400$). Barra = 10 µm.

É relevante mencionar que essas características morfológicas não são suficientes para distinguir as espécies, que é um aspecto clínico essencial da doença. Nesse sentido, existem ferramentas diagnósticas adicionais que complementam a cultura e o exame direto, oferecendo resultados rápidos e eficientes. No entanto, apesar de sua utilidade e potencial promissor, devido ao custo, essas ferramentas podem ser de difícil acesso. Uma importante característica de alguns destes métodos é a capacidade de identificar a espécie da amostra, sendo essencial no

monitoramento da endemia, características da transmissão e variabilidade genética das espécies (Orofino-Costa *et al.*, 2022; Gremião *et al.*, 2021).

Ferramentas moleculares desempenham um papel crucial na identificação de espécies relevantes e na orientação do tratamento, além de ajudar na detecção e controle de surtos. Esses métodos reduzem o tempo de identificação proporcionando um diagnóstico mais rápido e preciso. O sequenciamento de DNA é o principal método para a identificação molecular de espécies de *Sporothrix* de importância clínica e permite a análise da diversidade genética e da estrutura populacional do fungo durante surtos e epidemias, esclarecendo as rotas de transmissão e a expansão de agentes emergentes como *S. brasiliensis* (Orofino-Costa *et al.*, 2022; Rodrigues *et al.*, 2022).

Técnicas moleculares utilizadas para diferenciar *S. brasiliensis*, *S. schenckii*, *S. globosa* e *S. luriei* geralmente empregam DNA extraído de culturas puras e incluem métodos como: a reação em cadeia da polimerase com polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP-PCR), PCR específica para espécies, amplificação por círculo rolante (RCA), polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado (AFLP), DNA polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD, T3B) e PCR quantitativo em tempo real (qPCR) (Carnero *et al.*, 2018; Orofino-Costa *et al.*, 2022).

Essas técnicas possuem aplicações variadas, desde diagnósticos rotineiros em laboratórios clínicos, até investigações sobre a estrutura populacional e estudos ecológicos que visam detectar DNA de *Sporothrix* spp. em amostras ambientais. A eficácia da identificação molecular depende significativamente da qualidade e quantidade do DNA isolado, bem como do alvo molecular escolhido. Extrações que não incluem etapas de purificação, por exemplo, podem resultar em inibição da reação em cadeia da polimerase devido a impurezas presentes no material. No entanto, métodos que utilizam kits comerciais para a extração e purificação de DNA têm demonstrado ser eficazes e satisfatórios, especialmente em amostras clínicas (Orofino-Costa *et al.*, 2022; Rodrigues *et al.*, 2022).

O MALDI-ToF MS (espectrometria de massa por ionização com dessorção a laser assistida por matriz e analisador de tempo de voo) é uma ferramenta potencial na identificação de leveduras. Atualmente os bancos de dados foram expandidos para identificar fungos filamentosos. Logo o método já é empregado para identificação rápida e específica de *S. brasiliensis*, *S. schenckii*, *S. globosa*, *S. luriei* e membros do complexo *S. pallida*, a partir de colônias cultivadas *in vitro*, com considerável economia de material e mão de obra. Portanto, a precisão do MALDI-ToF MS na identificação de *Sporothrix* spp. depende de um banco de dados preciso para fungos filamentosos (Matos *et al.*, 2019; Rodrigues *et al.*, 2022).

O diagnóstico pode ser um importante fator que leva a subnotificação da doença. Uma boa investigação da história clínica do paciente é determinante para guiar o diagnóstico e consequentemente o tratamento do caso. Por conseguinte, a coleta e incubação corretas, manejo da amostra, e identificação, é o caminho para notificação do caso clínico e tratamento eficaz do paciente.

2.1.3 Terapia da esporotricose

A esporotricose é uma doença de caráter endêmico, de fácil propagação. No tocante ao tratamento dessa doença, a terapia escolhida é determinada pela forma clínica expressa pelo paciente e suas condições imunológicas. Além disso a espécie causadora também deve interferir nessa escolha, uma vez que possuem susceptibilidades distintas aos antifúngicos. Além disso, é essencial determinar a fonte de infecção deste paciente, a fim de controlar a disseminação da doença, e evitar uma piora do quadro ou recidiva (Xavier *et al.*, 2023). As principais opções terapêuticas para esporotricose são solução saturada de iodeto de potássio, derivados azólicos, terbinafina e anfotericina B.

A solução saturada de iodeto de potássio foi o primeiro fármaco usado no tratamento da esporotricose e continua sendo boa opção terapêutica por ser de baixo custo, bem como pela rápida resposta clínica. Na esporotricose o iodeto de potássio tem atividade imunomoduladora, pode suprimir a produção de intermediários tóxicos do oxigênio pelos leucócitos polimorfonucleares e, portanto, exercer seu efeito anti-inflamatório, inibindo por exemplo a formação de granulomas. Esse efeito *in vivo* parece estar relacionado à regulação de citocinas, com aumento dos níveis de IL-10 e IL-35 (Rodrigues *et al.* 2022).

Quanto à posologia, a solução saturada é feita com 50g do iodeto em 35 mL de água (0,07g/gota) sendo a dose pediátrica de 10-15 gotas, 2×/dia, e para adultos 20-25 gotas, 2×/dia. Os eventos adversos são leves, sendo os mais comuns a cefaleia, diarreia, náusea, dor abdominal e gosto metálico, que não costumam interferir na adesão do tratamento. É contraindicado na insuficiência renal, alergia a iodo, doenças autoimunes, gravidez e lactação. Tem entrado em desuso desde o emprego do itraconazol na doença, mas devido ao seu baixo custo, ainda é usado para tratar formas cutâneas em humanos e felinos, em associação ou não com o itraconazol (Orofino-Costa *et al.*, 2022; Xavier *et al.*, 2023).

O mecanismo de ação do iodeto de potássio ainda não está esclarecido, mas este medicamento é muito eficaz para melhorar o quadro clínico e controlar prontamente a carga fúngica. Alguns estudos buscam entender essa ação e o seu potencial. Costa *et al.* (2013) expôs

leveduras de *Sporothrix* spp. a concentrações crescentes de iodeto de potássio, e observou que ouve lise celular causada por liberação de enzimas lisossomais. Outro estudo quis monitorar a capacidade do iodeto, e constatou que a substância inibiu o desenvolvimento de biofilmes leveduriforme e micelial de *Sporothrix* spp. (Brilhante *et al.* 2019).

Quanto aos antifúngicos azólicos, seu principal alvo é a lanosterol 14 α -demetilase, que é produto do gene ERG11. Essa enzima é um membro da classe de enzimas do citocromo P450 (CYP450) e tem papel crítico na biossíntese do ergosterol, que é um componente fundamental da membrana fúngica. O tratamento com azóis resulta na diminuição do ergosterol celular e leva ao acúmulo de esteróis metilados tóxicos na célula fúngica. Têm ação fungistática, o que provavelmente contribui para o desenvolvimento de cepas resistentes (Orofino-Costa *et al.*, 2022; Shafiei *et al.*, 2020).

O itraconazol é um triazol de primeira geração, e é hoje o tratamento de primeira escolha para a esporotricose, devido à sua eficácia, segurança e conveniência posológica para esporotricose linfocutânea e cutânea, pois alcança altas concentrações no tecido cutâneo. Dependendo da gravidade da doença e do estado imunológico do hospedeiro, a dose terapêutica pode variar de 100 a 400 mg/dia, em geral, 100-200 mg/dia para forma cutânea, tanto para imunocompetentes quanto para imunossuprimidos, 200-400 mg/dia para osteoarticular e sistêmica para imunocompetentes e 400 mg/dia para imunossuprimidos. Em caso de insuficiência da resposta terapêutica, pode ser utilizado em associação com as alternativas terapêuticas (Gremião *et al.*, 2021; Rodrigues *et al.* 2022).

As limitações mais importantes no tratamento com o itraconazol são interação medicamentosa - pode interagir com mais de 200 medicamentos interferindo na eficácia do tratamento - e os efeitos adversos, sendo os mais comuns a cefaleia, náusea, dor abdominal, diarreia ou constipação intestinal. É hepatotóxico, então seu uso é limitado para pacientes com doenças hepáticas. Além disso não pode ser administrado em gestantes, por ser teratogênico e embriotóxico (Etchecopaz *et al.*, 2021; Orofino-Costa *et al.*, 2022).

Barros *et al.* (2011) acompanharam o tratamento de 645 pacientes com esporotricose cutânea tratados exclusivamente com itraconazol, com monitoramento do desaparecimento dos sinais e de eventos adversos. Estes, foram observados em 18.1% dos pacientes que estavam com tratamento de 100 mg/dia e 21.9% dos que estavam usando 200-400 mg/dia, sendo náusea e dor no estômago os efeitos mais relatados por eles. Sobretudo 71.6% dos pacientes completaram o tempo e manejo de tratamento prescrito (12 a 24 semanas), e sua totalidade obteve a cura, embora os casos de esporotricose linfocutânea demoraram mais para serem curados.

Por sua vez Poester *et al.* (2022), avaliaram o tratamento de 25 casos de esporotricose causadas pela espécie *S. brasiliensis*. Os isolados foram testados quanto a uma possível resistência para o itraconazol, que não foi observada. O tratamento com itraconazol foi iniciado para todos, porém em 42% dos casosouve uma falta de resposta clínica, principalmente em doses de 100 mg/dia, em que foi necessário aumentar a dose ou combinação com outros antifúngicos. Essa falta de resposta clínica foi associada à demora para o diagnóstico desses casos (em média 3 meses desde o aparecimento dos sintomas). Logo o bom prognóstico da doença se liga à rápida identificação do fungo causador e a agilidade para início do tratamento.

Outros azólicos empregados com menor frequência nos casos clínicos são o cetoconazol e o posaconazol. O cetoconazol é um imidazol que tem atividade comprovada sobre *S. mexicana*, porém não é muito usado devido à sua baixa eficácia, e efeitos colaterais potencialmente graves na administração sistêmica, onde pode causar insuficiência adrenal ao inibir enzimas na via de síntese de esteroides, promover diminuição da síntese de cortisol, e em altas doses, também pode causar ginecomastia em homens. O posaconazol é um triazol de segunda geração que tem atividade satisfatória sobre *S. schenckii* e *S. brasiliensis*, em especial em combinação com anfotericina B, porém tem alto custo (Espinel-Ingroff *et al.*, 2017; Rodrigues *et al.* 2022).

A terbinafina é uma alilamina fungicida utilizada como alternativa ao iodeto de potássio e azólicos, caso esses não possam ser administrados. Seu mecanismo interfere na síntese do ergosterol pela inibição da enzima esqualeno epoxidase presente na membrana celular fúngica. É metabolizada por diversas isoenzimas CYP, mas tem pouca interação medicamentosa e, por isso, pode ser administrada em idosos e em pacientes com comorbidades, embora também seja contraindicada em gestantes, pois penetra o leite materno (De Oliveira Santos *et al.*, 2018).

Possui atividade relatada sobre as espécies *S. brasiliensis*, *S. schenckii*, *S. globosa*, *S. mexicana* e é considerada como o tratamento de segunda linha para esporotricose linfocutânea e cutânea. Dentre os eventos adversos mais comuns estão cefaleia, náusea, distensão, dor abdominal e diarreia. Terbinafina se apresenta na forma de comprimido e a dosagem recomendada é de 250-500 mg/dia para casos de esporotricose cutânea, e ainda de 250-1000 mg/dia para forma osteoarticular (Orofino-Costa *et al.*, 2022; Xavier *et al.*, 2023).

Como já apontado, a melanina é um fator de virulência deste fungo. Esse pigmento protege a parede celular fúngica da ação desse antifúngico, diminuindo sua eficácia. Logo uma importante alternativa a esse mecanismo de resistência, é associar seu uso à fármacos com potencial de inibir a síntese desse componente, aumentando assim a susceptibilidade fúngica (Gómez-Gaviria; Martínez-Álvarez; Mora-Montes, 2023). Esse mecanismo já foi testado por

Almeida-Paes *et al.* (2016), onde a combinação da terbinafina com o triciclazol (inibidor potente da DHN-melanina), diminuiu a CIM do antifúngico frente cepas de *S. schenckii* e *S. brasiliensis*.

A anfotericina B, pertencente da classe dos polienos, é um antibiótico macrolídeo complexo, caracterizado por um anel macrolactona com uma série de ligações duplas conjugadas (heptaeno). É cardiotóxico e nefrotóxico, sendo necessário o monitoramento da função renal e dosagem de potássio sérico do paciente durante o tratamento. É a única terapia medicamentosa liberada para uso na gravidez com forma grave da doença, por não ser teratogênica. É utilizada nos casos sistêmicos da doença, em pacientes hospitalizados, uma vez que é administrado via endovenosa. A dosagem recomendada é de 3,0-5,0 mg/kg/dia, e o tempo médio de tratamento é de 3 meses, e em alguns casos pode chegar a 12 meses (Cavassin *et al.* 2021; Fichman *et al.*, 2023).

Diferente das classes anteriores, os polienos não tem como alvo uma enzima específica. Os fármacos desta classe interagem com o ergosterol interferindo na permeabilidade da membrana. O ergosterol é uma molécula essencial na célula fúngica pois participa de muitos processos celulares, como fluidez de membrana, endocitose, regulação de proteínas de membrana, e sinalização celular. Esses antifúngicos possuem alta especificidade com o esterol da membrana fúngica quando comparado com o esterol da célula humana (colesterol), devido a forma e composição de suas respectivas moléculas e tipos de ligações de interação (Cavassin *et al.* 2021).

Esse mecanismo pode ocorrer de diferentes formas: formação de poros, adsorção de superfície, o modelo de esponja de esterol e o modelo de dano oxidativo. A formação de poros na membrana é o principal mecanismo estudado para a anfotericina B exercer sua ação. A molécula interage com o ergosterol formando um canal na membrana que permite a passagem de íons e pequenas moléculas, levando à lise celular. A anfotericina B forma poros relativamente largos (aproximadamente 0,46 nm) e pode transportar moléculas tão grandes quanto a sacarose, enquanto outros representantes da mesma classe formam poros menores (Carolus, *et al.* 2020; Lima, *et al.* 2023).

No segundo e terceiro modos, pela adsorção ou extração do ergosterol da membrana, a membrana fosfolipídica é desestabilizada e àqueles processos celulares que dependem do ergosterol, ficam enfraquecidos. Neles os polienos podem adsorver moléculas de ergosterol na superfície da bicamada fosfolipídica, ou grandes agregados de moléculas de anfotericina B posicionadas paralelamente podem se formar na membrana, funcionando como uma “esponja de esterol”. Por fim, ainda que o “como” não seja totalmente esclarecido, a anfotericina B induz

o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS), resultando em danos ao DNA, proteínas, mitocôndrias e membranas (Carolan, *et al.* 2020).

Fichman *et al.* (2022), avaliou o histórico de casos de 73 pacientes com esporotricose disseminada. Em todos houve a identificação da *S. brasiliensis*, e 52.1% deles eram portadores do HIV. Doses médias foram de 750 mg para anfotericina B desoxicolato, e 4500 mg do complexo lipídico. 20.5% descontinuaram o tratamento devido aparecimento de efeitos adversos. Os efeitos mais severos foram associados à formulação de desoxicolato, e 3 pacientes morreram decorrentes de acometimento renal. 52.1% dos pacientes obtiveram a cura, que foi associada a ausência de envolvimento ósseo, das vias aéreas superiores e do SNC. O sucesso da terapia depende, além da adesão correta ao tratamento, do diagnóstico e início do tratamento precoces.

Fichman *et al.* (2023) avaliaram a suscetibilidade antifúngica de 46 cepas de *Sporothrix brasiliensis* isoladas de pacientes com esporotricose grave tratados com anfotericina B, contra anfotericina B, itraconazol, terbinafina e posaconazol. As formas clínicas foram esporotricose cutânea disseminada (94.6%) e disseminada (5.4%). A cura ocorreu em 45.9% dos casos e a morte devido à esporotricose em 24.3%. 93.5% dos isolados foram susceptíveis aos antifúngicos testados, e foram classificados como selvagens. Os isolados com CIM mais elevadas não tiveram relação com quadros mais graves, por isso os resultados da suscetibilidade antifúngica não são o único guia para uma terapia bem-sucedida da esporotricose.

Bernardes-Engemann *et al.* (2022) avaliaram 100 cepas de *Sporothrix* spp. obtidas de casos de 1999 a 2018. Todas as cepas foram identificadas como *S. brasiliensis* e treze foram classificadas como não selvagens, apresentando resistência contra pelo menos um antifúngico testado (itraconazol, posaconazol, cetoconazol, terbinafina e anfotericina B), sendo duas delas contra diferentes drogas. Pacientes infectados por estas cepas necessitaram de mais tempo de tratamento além de doses maiores do que as descritas na literatura e um deles apresentou sequela permanente. Além disso, três deles, com imunossupressão, morreram de esporotricose. Para evitar falha no tratamento, sugere-se como parte da rotina clínica o isolamento das cepas para teste de sensibilidade aos antifúngicos, principalmente em pacientes imunossuprimidos.

Um estudo retrospectivo de Lima *et al.* (2023) avaliou casos de esporotricose meníngea, quadro muito raro, que acomete exclusivamente pacientes imunossuprimidos, e em muitos casos com síndrome inflamatória da reconstituição imune (IRIS). O estudo avaliou 53 pacientes que tinham esporotricose disseminada e imunossupressão e passaram por punção lombar. Desses, 17 apresentaram meningite. O grau de letalidade dos pacientes com meningite foi de

64.7%, com maior chance de morte em comparação com aqueles sem meningite, corroborando com estudo de Galhardo *et al.* (2010) que encontrou letalidade de 57% nesse quadro.

Algumas terapias alternativas também têm sido empregadas no tratamento. A termoterapia é frequentemente utilizada em gestantes com esporotricose não complicada, aproveitando a sensibilidade térmica das espécies de *Sporothrix* a temperaturas acima de 39°C. O tratamento pode ser feito com bolsa de água quente, infravermelho ou métodos similares, com o objetivo de alcançar localmente 42-43°C por 20 a 30 minutos, três vezes ao dia. Essa abordagem também melhora a permeação de fármacos sistêmicos através da vasodilatação, e é uma alternativa para pacientes que não toleram certos medicamentos (Orofino-Costa *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2021).

A criocirurgia, consiste na aplicação de nitrogênio líquido em lesões verrucosas em dois ciclos de congelamento/descongelamento, mensalmente, até a cura clínica, e pode aumentar a penetração dos antifúngicos sistêmicos na lesão cutânea. Fichman *et al.* (2018) aplicaram a técnica em gestantes, entre 16 e 24 semanas de gestação, que tiveram contato com gatos em uma área endêmica. O tratamento consistiu em dois ciclos de 10 a 30 segundos, mensalmente até a cicatrização. Em metade dos casos, o agente causador foi *S. brasiliensis*, com lesões classificadas como úlcera vegetativa ou nodular vegetativa. A criocirurgia promoveu um aumento nas células dendríticas, neutrófilos e macrófagos no tecido subcutâneo e sua migração para os linfonodos regionais (Alvarez; Oliveira; Pires, 2022; Orofino-Costa *et al.*, 2022).

Uma linha de pesquisa busca desenvolver uma vacina para esporotricose subcutânea. Trata-se de epítopos do peptídeo sintetizado pela glicoproteína Gp70, componente da parede celular fúngica. Um epítopo apresentou efeito imuno protetor em camundongos infectados com *S. globosa*, induzindo uma resposta celular e humoral favorável para o controle da doença. Outro peptídeo promove aumento de células T CD4+ e níveis mais altos de citocinas (IFN, IL-17A e IL-1) em camundongos infectados com células de levedura de *S. brasiliensis* (De Almeida *et al.*, 2018).

Fica clara a relevância dos felinos na cadeia epidemiológica da esporotricose, logo, garantir o tratamento do animal infectado é de extrema importância para controlar a propagação da doença, e consequentemente a contaminação do ser humano. Porém, uma grande problemática se encontra no abandono do tratamento em casos de esporotricose felina, por diversos fatores: a longevidade (6 a 12 meses) e alto custo do tratamento antifúngico, dificuldade na administração oral de medicamentos a animais infectados, e ainda os casos de animais de rua, que não possuem tutores e têm livre deslocamento (Alvarez; Oliveira; Pires, 2022).

O tratamento para esporotricose humana não fica atrás. Tempo de tratamento e custo do antifúngico, seus efeitos adversos, cuidado com a lesão, são questões que dificultam a adesão do paciente. O que ocorre em muitos casos é nos primeiros sinais de melhora da lesão, o paciente abandona o tratamento acreditando estar curado. Consequentemente há recidiva e é preciso reiniciá-lo, com chances de necessitar de uma dose mais alta. É preciso que o paciente entenda a importância de seguir a prescrição do tratamento, a fim de eliminar qualquer carga fúngica, evitando recidiva (Gómez-Gaviria; Martínez-Álvarez; Mora-Montes, 2023; Waller *et al.*, 2021).

Diante desses empecilhos, e limitações de opções terapêuticas, fica evidente a necessidade de buscar alternativas seguras para o tratamento da esporotricose, seja para humanos seja para animais. Tão necessário quanto, é o controle da disseminação do fungo, uma vez que este é de fácil propagação, e está presente em ambientes e superfícies de amplo acesso para humanos e animais. Logo, é fundamental ampliar o leque também de produtos eficazes e seguros que os eliminem de tais superfícies.

2.2 PRODUTOS NATURAIS

Ao longo da história, o ser humano sempre manteve uma relação próxima com diversas espécies vegetais, criando métodos específicos para aproveitá-las em diversas finalidades, incluindo a saúde. Desde tempos antigos, as plantas têm sido usadas por diferentes culturas para prevenir e tratar doenças. Em todo o planeta, o emprego de plantas medicinais tem um papel fundamental nos cuidados iniciais de saúde, mesmo que os componentes químicos dessas plantas nem sempre sejam totalmente conhecidos (Duarte; Luís; Gallardo, 2022).

As plantas medicinais e aromáticas têm um papel importante na medicina tradicional e são objeto de intensas pesquisas científicas, em busca de compostos mais eficazes e menos prejudiciais. Elas representam uma rica fonte de novos compostos com atividades biológicas, oferecendo diversas substâncias que podem ser aproveitadas no tratamento de várias doenças infecciosas. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) define plantas medicinais como aquelas que contém centenas ou até milhares de diferentes substâncias que, quando utilizadas corretamente em conjunto, atuam no organismo para exercer funções específicas, seja na prevenção, tratamento ou cura de doenças, e que possuem uma tradição de uso por parte da população ou comunidade (Anand *et al.*, 2019; ANVISA, 2022).

O Brasil é o país com a maior biodiversidade de plantas do mundo. Possui mais de 55 mil espécies descritas, o que corresponde a 22% do total mundial. A grande biodiversidade de

espécies vegetais presentes no Brasil constitui uma de suas maiores riquezas e se destaca como fonte para obtenção de novas substâncias com finalidades terapêuticas. Muitas dessas plantas são estudadas por suas propriedades medicinais, oferecendo potencial para o desenvolvimento de novos medicamentos e tratamentos naturais. As florestas brasileiras, como a Amazônia e a Mata Atlântica, abrigam espécies ricas em compostos bioativos no combate a doenças, alívio de sintomas e promoção de saúde (Rosa, *et al.* 2021; Dos Santos; Pereira, 2020).

Pesquisas científicas têm demonstrado que plantas nativas brasileiras podem ser eficazes no tratamento de doenças crônicas, infecciosas e autoimunes, além de possuírem propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e antimicrobianas. Com o avanço da biotecnologia e da farmacologia, o Brasil tem a oportunidade de transformar essa riqueza natural em inovações terapêuticas que beneficiem a saúde global, reforçando a importância da conservação e do uso sustentável da biodiversidade vegetal (Nogueira, *et al.* 2024; Silva, *et al.* 2023).

No caminho da descoberta de novos fármacos os produtos naturais têm demonstrado grande relevância como fonte. Em 2020, Newman e Cragg analisaram o conteúdo de todos os fármacos aprovados pelo Food and Drug Administration (FDA) entre janeiro de 1981 e setembro de 2019, e foi constatado que os compostos derivados de produtos naturais foram o segundo grupo mais prevalente nas composições. Tanto os extratos totais quanto os compostos individuais isolados são investigados (Duarte; Luís; Gallardo, 2022; Ekiert; Szopa, 2022).

Os metabólitos secundários desempenham um papel crucial na sobrevivência das plantas e na continuidade de suas espécies dentro dos ecossistemas. Eles têm diversas funções, como a proteção contra herbívoros e microrganismos, a defesa contra radiação UV e a atração de polinizadores ou animais que ajudam na dispersão de sementes. As plantas apresentam uma notável capacidade de biossíntese de metabólitos secundários, tanto em relação à quantidade de substâncias quanto à diversidade dentro de uma mesma espécie (Böttger *et al.*, 2018). Esses metabólitos são conhecidos por suas diversas atividades biológicas, muitas das quais possuem relevância comercial nas áreas farmacêutica, alimentícia, agrícola e de perfumaria, entre outras (Wink, 2020).

Os principais grupos de compostos com atividade biológica incluem alcaloides, flavonoides, cumarinas, taninos, quinonas e óleos essenciais. Os óleos essenciais são substâncias aromáticas voláteis extraídas de diferentes partes das plantas. Quimicamente, a maior parte dos óleos essenciais é composta por derivados de fenilpropanóides ou terpenoides, sendo os terpenoides os mais abundantes (Akhtar; Swamy; Sinniah, 2019). Tanto para os óleos

quanto para substâncias isoladas deles, existem diversas atividades biológicas relatadas na literatura.

A revisão sistemática realizada por Chassagne *et al.* (2021) traz um panorama atual geral acerca dos estudos de plantas com atividades antibacterianas, por exemplo. Apenas dos anos de 2012 a 2019, 958 espécies de plantas foram analisadas e apresentaram atividade antibacteriana. Quanto ao patógeno, *Staphylococcus aureus* foi a bactéria patogênica mais investigada nesses estudos, e quanto ao produto natural as espécies *Cinnamomum verum*, *Rosmarinus vulgaris* e *Thymus vulgaris* foram os principais objetos de estudo. Há um estímulo para investigar cada vez mais essa atividade em outras fontes, uma vez que é estimado o relato de 28.187 espécies medicinais usadas por humanos.

No que se refere às pesquisas frente *Sporothrix* spp. tem crescido a busca de alternativas para o controle da doença tendo os produtos naturais como fonte. Um estudo realizado por Oliveira *et al.* (2017), avaliou a atividade dos extratos etanólicos das folhas e das cascas de *Vismia guianensis*, uma planta tropical que tem sido usada como fonte de atividades biológicas por possuir compostos fenólicos, como naftoquinonas e flavonoides. Além do teste *in vitro*, camundongos Balb/c machos foram infectados com *S. schenckii* ATCC 16345 e tratados com os extratos. Foi observada uma boa atividade antifúngica, com uma CIM de 3,9 µg/mL, e com importante redução da carga fúngica nos baços dos animais.

Em um estudo realizado por Borba-Santos e colaboradores (2021) a Buparvaquona, uma naftoquinona, foi testada quanto sua atividade frente *S. brasiliensis*. Também foi utilizado um modelo experimental de infecção por *S. brasiliensis* no modelo *Galleria mellonella*. A Buparvaquona apresentou forte atividade antifúngica, além de alta seletividade para células fúngicas em detrimento de células de mamíferos. Quanto ao modelo experimental, a substância diminui substancialmente a carga fúngica, de forma semelhante ao itraconazol, e ainda numa concentração mais baixa que este.

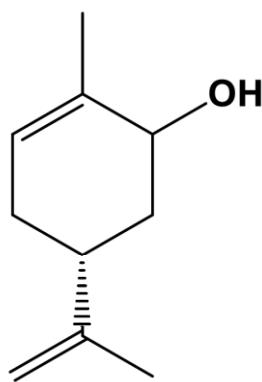
O estudo de Waller *et al.* (2023) avaliou a atividade antifúngica do monoterpeno γ -terpineno contra cepas *wild-type* e *non-wild-type* de *Sporothrix brasiliensis*. Esse monoterpeno já apresenta atividades biológicas relatadas, mas até então não sobre este fungo. O γ -terpineno apresentou potencial atividade antifúngica frente cepas *Sporothrix brasiliensis*, incluindo àquelas resistentes ao itraconazol. Ainda foi observado que o monoterpeno agiu sinergicamente ao itraconazol, nessas cepas resistentes. O que demonstra uma potencial alternativa para melhorar a atividade do antifúngico numa possível aplicação clínica.

2.2.1 Carveol

Os terpenos fazem parte da composição dos óleos essenciais e são classificados de acordo com as unidades isoprênicas (C_5H_8) que constituem sua estrutura. Isto é, hemiterpenos possuem 1 unidade, monoterpenos possuem 2 unidades, sesquiterpenos 3 unidades, e assim sucessivamente para diterpenos, triterpenos, tetraterpenos, e poli-isoprenoides (quando possuírem mais que 8 unidades). Os monoterpenos são compostos que apresentam 10 carbonos em sua estrutura e baixo peso molecular, correspondendo a um grupo maior e mais diversificado. Por esse motivo são mais comumente encontrados em óleos essenciais (Medeiros, 2023; Tietel *et al.*, 2021).

O (-)-Carveol (Figura 5) é um álcool monoterpênico monocíclico insaturado natural, que possui fórmula molecular $C_{10}H_{16}O$ e sinônimos p-menta-6,8-dien-2-ol, p-Mentha-1,8-dien-6-ol e ainda 2-metil-5-(1-metiletenil)-2-ciclohexen-1-ol. É um líquido claro, incolor e insolúvel em água, e possui peso molecular de 152,23 g/mol (Serafim *et al.*, 2021). É encontrado nos óleos essenciais da casca da laranja (*Citrus reticulata*), sementes de cominho (*Carum carvi*), e folhas da *Cymbopogon giganteus* (Ahmed *et al.*, 2020; Cardoso-Teixeira *et al.*, 2018; Hritcu *et al.*, 2020; Kpoviessi *et al.* 2014; Malik *et al.*, 2020). O (-)-Carveol é muito empregado nas indústrias farmacêutica, cosmética e alimentícia como agente aromatizante e flavorizante (Bhatia *et al.*, 2008).

Figura 5 - Estrutura química do (-)-Carveol



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

O monoterpeno (-)-Carveol possui diversas atividades biológicas relatadas na literatura, que o torna um importante objeto de pesquisa para diferentes áreas. No estudo de Hritcu *et al.* (2020) por exemplo, foi analisado se o (-)-Carveol melhoraria o comprometimento da memória induzido e o estresse oxidativo no hipocampo de ratos. Ficou claro que ele foi eficaz em reverter

os déficits cognitivos, além de auxiliar na diminuição do estresse oxidativo cerebral, podendo ser considerado um agente terapêutico para condições neurológicas relacionadas à demência.

Sua atividade anti-inflamatória também já foi observada. (-)-Carveol reduziu íons superóxidos (O_2^-) e pode exercer essa atividade por meio da supressão de enzimas pró-inflamatórias [como sintase de óxido nítrico induzida (iNOS) e Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (NADH)], e mediadores inflamatórios [Fatores de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α) e interleucina-1 alfa (IL-1 α)] (Marques et al., 2019).

Ahmed et al. (2020) buscaram demonstrar o potencial antidiabético do Carveol e avaliar um possível efeito hepatoprotetor. Foi constatada, dentre outras ações, afinidade de ligação máxima contra a proteína de transporte sódio-glicose (SGLT), que nos rins tem o papel de reabsorção da glicose, demonstrando que o Carveol pode ser um agente terapêutico promissor no gerenciamento da diabetes. Além disso, ele atenuou o nível sérico de algumas enzimas hepáticas, sugerindo um efeito protetor hepatocelular.

Um outro grande problema de saúde pública é a hipertensão, que em mulheres gestantes por exemplo desencadeiam o difícil quadro de pré-eclâmpsia. Ao avaliar a atividade do (-)-Carveol no músculo liso de artérias umbilicais humanas (HUAs), foi observado que o (-)-Carveol tem um importante efeito vasorrelaxante na contratilidade das células musculares lisas de HUA. Tal efeito se dá pela modulação parcial dos canais de potássio ativados por cálcio de grande condutância (BKCa) pelo (-)-Carveol, sugerindo que o bloqueio desses canais pode contribuir para o relaxamento (Silva, D. et al., 2020).

Destacando o efeito antimicrobiano deste produto, o (-)-Carveol apresentou atividade antibacteriana frente *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Typhimurium*, *Bacillus cereus*. Inclusive apresentando efeitos antimicrobianos promissores, até maiores que a sulfanilamida. Através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi observado que a ação se dá pela perda da integridade ou função da membrana celular (Guimarães et al., 2019).

Quanto à sua atividade antifúngica, foi constatada sobre as espécies de *Candida glabrata*, *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii*, *C. albicans* (Moraes, 2021). Em um estudo realizado por Raj et al. (2023), Carveol apresentou uma CIM de 345 µg/ml frente a cepa de *C. albicans* ATCC 90028, ainda apontando para sua ação via membrana celular fúngica. Vale ressaltar portanto, que não existe nenhum estudo na literatura avaliando o potencial antifúngico do (-)-Carveol frente *Sporothrix* spp.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a atividade antifúngica do (-)-Carveol frente cepas clínicas de *Sporothrix brasiliensis*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) do (-)-Carveol;
- Estudar os possíveis mecanismos de ação do (-)-Carveol com foco sobre a parede celular e a membrana plasmática fúngica;
- Avaliar o efeito do (-)-Carveol em associação aos antifúngicos utilizados no tratamento da esporotricose;
- Avaliar sua citotoxicidade frente linhagem celular de queratinócito humano não tumoral (HaCaT);
- Realizar ensaios *in silico* das propriedades farmacocinéticas e toxicológicas ADMET (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade).
- Analisar as interações moleculares do (-)-Carveol com possíveis alvos farmacológicos através do *docking* molecular.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 TIPO DE PESQUISA

4.1 LOCAL DA PESQUISA

Os ensaios laboratoriais referentes ao estudo da atividade antifúngica foram realizados no Laboratório de Micologia pertencente ao Departamento de Ciências Farmacêuticas (DCF), localizado no Centro de Ciências da Saúde (CCS) do Campus I da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

O ensaio de atividade citotóxica foi realizado no Laboratório de Oncofarmacologia, sob a supervisão dos professores Dr. Juan Carlos Ramos Gonçalves e Dra. Marianna Vieira Sobral, localizado no Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) do Campus I da UFPB.

Os estudos *in silico* foram realizados em colaboração com o Dr. Cássio Ilan Soares Medeiros no Laboratório de Pesquisas de Atividade Antibacteriana e Antifúngica de Produtos Naturais e/ou Sintéticos Bioativos, DCF/CCS/UFPB.

4.2 CEPAS FÚNGICAS

Para este estudo, foram utilizadas 12 cepas de *Sporothrix brasiliensis*, previamente identificadas e codificadas como: IPEC 100/ CFP 0051, LM 44, LM 46, LM 200, LM 260, LM 279, LM 284, LM 295, LM 310, LM 366, LM 373, LM 383. As amostras fúngicas pertencem à Micoteca do Laboratório de Micologia (DCF/CCS), armazenadas em tubos de ágar batata em refrigerador.

4.3 MEIOS DE CULTURA

Os meios de cultura utilizados nos experimentos foram Ágar Mycosel, Ágar Sabouraud Dextrose (ASD), RPMI 1640 sem bicarbonato (Sigma-Aldrich®, São Paulo, SP, Brasil), preparados conforme as descrições do fabricante. O Ágar Batata, utilizado para repiques recentes e conservação das cepas foi preparado a partir da própria batata-inglesa em laboratório (200g de batata, 15g de ágar e 1 litro de água destilada) de acordo com Sidrim e Rocha (2004).

4.4 SUBSTÂNCIAS

A substância-teste, (-)-Carveol ($C_{10}H_{16}O$), foi cedida pelo professor Dr. José Maria Barbosa Filho. Para a realização dos testes farmacológicos, a substância foi preparada no momento dos experimentos, sendo emulsionadas em DMSO 5% e TWEEN 80 2%, e diluídas em meio RPMI 1640.

Anfotericina e Itraconazol, fármacos utilizados na terapia da esporotricose, foram obtidos da Cayman Chemical®, e foram utilizados como controles nos experimentos. E o Sorbitol e o Ergosterol foram obtidos da Sigma-Aldrich®, São Paulo, SP, Brasil, todos preparados conforme orientações dos fabricantes.

4.5 PREPARO DO INÓCULO

As suspensões de inóculo fúngico foram preparadas a partir de culturas recentes dessas cepas, semeadas em tubos com Ágar Batata e incubadas à temperatura ambiente durante 7 dias. Após esse período, o crescimento é coberto com cerca de 1mL de água destilada estéril e raspado levemente com alça descartável estéril, a fim de obter uma suspensão rica em conídios e fragmentos de hifas. Essa mistura é deixada em repouso de 3 a 5 minutos até que as partículas mais pesadas da suspensão se depositem no fundo do tubo. A porção mais superior é transferida para um tubo de fundo em U transparente estéril, e o ajuste do inóculo é feito acrescendo água destilada estéril. A turbidez do inóculo final foi padronizada visualmente com o tubo 2 da escala McFarland, que corresponde a uma concentração de $1 - 5 \times 10^6$ UFC/mL (Unidades Formadoras de Colônia por Mililitros) (Brilhante *et al.*, 2014; CLSI– M38A2, 2008).

4.6 ENSAIOS ANTIMICROBIANOS

4.6.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) é um método inicial e crucial na prospecção de alternativas terapêuticas para qualquer doença microbiana. Através desta busca inicial, é possível determinar se uma substância-teste possui potencial terapêutico em um dado alvo. A CIM é determinada através da técnica de microdiluição em caldo por meio de microplaca de 96 poços com fundo em “U” (ALAMAR®) (CLSI – M38A2, 2008).

Inicialmente, foram distribuídos 100 µL de caldo RPMI 1640 nos poços da microplaca. Posteriormente, 100 µL da substância teste foram dispensados nos primeiros poços da primeira linha da placa, e em seguida realizada a diluição seriada a uma razão 2:1, obtendo-se concentrações de 1024 até 8 µg/mL. Por conseguinte, foi acrescentado 10 µL do inóculo fúngico, preparado na escala 2 de McFarland, a todos os poços testes. Além disso, o mesmo procedimento foi realizado utilizando o itraconazol como substância-teste como controle (Brilhante *et al.*, 2014; CLSI – M38A2, 2008).

Para realização do teste foram realizados os controles de esterilidade (poços contendo apenas o meio de cultura), de viabilidade (poços contendo o meio de cultura e o inóculo) e de solvente (poços contendo uma solução dos solventes utilizados no preparo da substância, com o inóculo), a fim de validar o experimento. As placas preparadas foram fechadas e incubadas à temperatura ambiente, de 3 a 5 dias. O ensaio foi realizado em triplicata e os resultados foram expressos como a moda das CIM obtidas nos três experimentos (CLSI – M38A2, 2008).

Após o tempo da incubação, a leitura foi feita visualmente, observando-se a presença ou ausência de crescimento fúngico. O mesmo procedimento foi realizado para o Itraconazol, como controle positivo. A CIM foi definida como a menor concentração do composto que inibiu visivelmente o crescimento fúngico das cepas ensaiadas, quando comparado com o crescimento controle (Brilhante *et al.*, 2014).

4.6.2 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)

A Concentração Fungicida Mínima (CFM) é determinada a fim de apontar se a substância-teste apresenta potencial fungicida (eliminação completa de forma irreversível da cepa), ou potencial fungistático (inibe o crescimento fúngico sem causar morte imediata). Esse dado é essencial para caracterizar a substância, tendo impacto principalmente em seu manejo em terapias combinadas (Silva, R. *et. al*, 2020).

Após a determinação da CIM, sucede-se retirando alíquotas de 10 µL do sobrenadante das cavidades onde foi observada completa inibição do crescimento fúngico correspondentes à CIM, CIM x2 e CIM x4, nas placas de microdiluição. Essas alíquotas são depositadas em placas de Petri contendo ASD, sendo este processo realizado em triplicata. As placas foram incubadas à temperatura ambiente durante 3 a 5 dias (Balouiri; Sadiki; Ibnsouda, 2016).

A CFM é definida como a menor concentração da substância que inibe o crescimento visível em meio sólido. A interpretação dos dados da CFM consiste na avaliação da inibição

crescimento fúngico por completo, classificando os resultados em: atividade fungistática, quando $CFM/CIM \geq 4$ ou fungicida quando $CFM/CIM < 4$ (Siddiqui *et. al.*, 2013).

4.6.3 Ação sobre a parede celular fúngica – ensaio com sorbitol

A fim de observar se o (-)-Carveol causaria algum dano aos componentes da parede celular fúngica, a atividade do mesmo foi testada na presença do sorbitol. O sorbitol é um protetor osmótico usado para estabilizar os protoplastos de fungos. Caso o produto teste atue de alguma forma sobre a parede celular fúngica, ele provocará lise celular quando na ausência do sorbitol, mas permitirá o crescimento fúngico na presença deste protetor osmótico. O que será observado na prática, é um aumento na CIM da substância (Frost *et al.*, 1995).

O teste foi realizado através da técnica de microdiluição em caldo por meio de microplaca de 96 poços, semelhante à descrição da seção 4.6.1. Porém o mesmo processo é feito com o RPMI na ausência do sorbitol, e com adição do sorbitol a 0,8M. A caspofungina é o antifúngico mais aplicado como controle para este teste, porém possui baixa atividade antifúngica sobre *S. brasiliensis* (Carnero *et al.*, 2018).

Sendo assim, para garantir a autenticidade do ensaio, o mesmo processo foi realizado com a cepa ATCC 76485 de *C. albicans*, que é suscetível à caspofungina, antifúngico que atua inibindo a síntese do $\beta(1,3)$ -D-glucana, componente essencial da parede celular. Além disso, foram realizados os controles de esterilidade do RPMI 1640 com e sem o sorbitol, e o de viabilidade do inóculo com adição do RPMI 1640 com e sem o sorbitol (Frost *et al.*, 1995; Zacchino, 2001).

4.6.4 Ação sobre a membrana celular fúngica – ensaio com ergosterol

O ergosterol é um componente fundamental da membrana celular fúngica, auxiliando na manutenção da integridade dela. Alguns fármacos disponíveis para o uso clínico interagem diretamente com o ergosterol, gerando danos à membrana celular fúngica. Neste teste, adiciona-se ergosterol exógeno ao meio de cultura, e caso a substância-teste realize essa interação, haverá um prejuízo da sua ligação ao ergosterol da membrana fúngica. Nesse cenário, é esperado que a CIM do produto aumente, uma vez que precisará de uma concentração maior da molécula antifúngica para chegar ao alvo molecular (Escalante *et al.*, 2008).

O teste foi realizado como descrito na seção 4.6.3, porém na ausência e com adição do ergosterol 400 $\mu\text{g/mL}$. Para o controle, o mesmo procedimento foi executado com o antifúngico

anfotericina B, cujo mecanismo de ação é conhecido e envolve sua ligação ao ergosterol presente na membrana fúngica. Além disso, como descritos anteriormente, foram realizados os controles de esterilidade com e sem o ergosterol, e o de viabilidade do inóculo com e sem o ergosterol (Escalante *et al.*, 2008).

4.6.5 Estudo de associação – *Checkerboard*

O ensaio de associação foi realizado através do método *Checkerboard* a fim de definir a natureza da interação entre o (-)-Carveol e os antifúngicos utilizados na clínica da esporotricose, itraconazol e anfotericina B. Essa interação pode ser sinérgica (aumento da atividade da substância em associação), indiferente (quando a combinação é correspondente com a atividade individual da substância) ou antagonista (quando a atividade da substância é reduzida na presença do antifúngico, e vice-versa) (Odds, 2003; Shin, 2003).

Inicialmente, 100 µL de caldo RPMI foram adicionados nos poços da microplaca de 96 poços com fundo em “U” (ALAMAR®). Em seguida, 100 µL de uma solução de (-)-Carveol foi adicionada à primeira fileira no sentido vertical da placa, prosseguindo com uma diluição seriada a uma razão 2:1 na direção horizontal. Então 100 µL de uma solução de antifúngico foi adicionada à primeira fileira no sentido horizontal da placa, prosseguindo com uma diluição seriada na direção vertical, obtendo-se concentrações correspondentes à CIM×8, CIM×4, CIM×2, CIM, CIM÷2, CIM÷4 e CIM÷8, para ambas substâncias (Odds, 2003; Shin, 2003).

Por fim, foi adicionado 10 µL do inóculo em todos os poços. Foi necessário 4 placas para realizar a metodologia: uma associando (-)-Carveol e o itraconazol, e outra associando (-)-Carveol e a anfotericina B, para duas cepas distintas. Essas placas foram incubadas à temperatura ambiente de 3 a 5 dias. O ICIF (Índice da Concentração Inibitória Fracionada) foi calculado através da soma do CIFA + CIFB (CIFA= Concentração Inibitória Fracionada do (-)-Carveol; CIFB= Concentração Inibitória Fracionada da anfotericina B ou itraconazol). O CIF de cada substância, é calculado através da relação CIM combinada/CIM isolada. Assim, se ICIF ≤ 0,5 houve sinergismo, se ICIF > 4,0, antagonismo e se 0,5 < ICIF ≤ 4, indiferença (Odds, 2003; Shin, 2003).

4.7 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

A fim de avaliar a citotoxicidade do (-)-Carveol na linhagem celular de queratinócito humano (HaCaT), foi realizado o ensaio colorimétrico de redução do MTT (brometo de 3-(4,5

dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio). O MTT é um sal tetrazólio de coloração amarela com capacidade de atravessar a bicamada lipídica das células. Nas mitocôndrias está contida a enzima succinato desidrogenase, responsável por converter o MTT em cristais de formazan, que apresentam coloração roxa. Assim, a intensidade dessa coloração é diretamente proporcional à quantidade de células viáveis, indicando a integridade metabólica das células, sendo quantificada através de espectrofotometria (Mosmann, 1983; Ghasemi et al., 2021).

Para este experimento as células de queratinócitos humanos (HaCaT) foram semeadas em placas de 96 poços na concentração de 3×10^5 células/mL, e incubadas durante 24 horas à 37 °C e atmosfera de 5% de CO₂. Em seguida, as células foram tratadas com diferentes concentrações de (-) Carveol (1024-512-256 µg/mL) por 72 horas. Após o período de tratamento, o sobrenadante foi parcialmente removido, e a solução de MTT adicionada em todos os poços, e as placas foram incubadas 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 absorbância de 570 nm.

Os resultados foram expressos como média ± 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 $p < 0,05$.

4.8 ENSAIOS *in silico*

4.8.1 ADME, análise físico-química e de toxicidade

A avaliação *in silico* das propriedades farmacocinéticas e toxicológicas ADMET (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade) de uma substância, é uma importante aliada dos ensaios biológicos, enriquecendo as informações e o potencial terapêutico de uma molécula candidata a um novo fármaco. O (-)-Carveol foi submetido a análises farmacocinéticas por meio da ferramenta online pkCSM (<https://biosig.lab.uq.edu.au/pkcsmprediction>), visando estudar suas propriedades farmacocinéticas e toxicológicas mais relevantes. As propriedades ADMET incluem parâmetros de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (Pires, Blundell, Ascher, 2015; Yan, 2018).

Adicionalmente, o (-)-Carveol e o itraconazol foram comparados entre si e com outros fármacos licenciados por meio de duas ferramentas online: Osiris Property Explorer e

Molinspiration (Daina, Michelin, Zoete, 2017). Nessa análise, foi aplicada a “regra dos cinco de Lipinski”, que categoriza moléculas como “semelhantes a drogas”, considerando os seguintes critérios: $c\text{LogP} \leq 5$, peso molecular (MW) ≤ 500 Da, número de aceitadores de ligações de hidrogênio ≤ 10 ($n\text{ALH} \leq 10$) e número de doadores de ligações de hidrogênio ≤ 5 ($n\text{DLH} \leq 5$). O cálculo do $c\text{LogP}$ é baseado na fórmula que satisfaz a lipofilicidade, hidrofobicidade e polaridade do composto. Moléculas que não atendem a mais de um desses critérios podem apresentar desafios relacionados à biodisponibilidade (Lipinski *et al.*, 2001).

4.8.2 Previsão da estrutura 3D para CYP51 de *S. brasiliensis*

O programa AlphaFold2 foi utilizado para construir o modelo tridimensional da proteína CYP51 de *S. brasiliensis*, com o auxílio da implementação pelo ColabFold. O código do ColabFold está disponível gratuitamente e utiliza uma máquina virtual para a síntese dos modelos (Jumper *et al.*, 2021; Varadi *et al.*, 2022). A conformação dos modelos da CYP51 prevista pelo AlphaFold2 foi validada por meio do diagrama de Ramachandran. A análise dos ângulos de torção phi (Φ) e psi (Ψ) foi realizada utilizando o servidor online PROCHECK para calcular a conformação do modelo previsto. Além disso, o modelo também foi submetido a uma verificação adicional utilizando o servidor online MolProbity para confirmar sua avaliação (Sobolev *et al.*, 2020).

4.8.3 Docking molecular

O *docking* molecular é um método computacional que tem como principal objetivo predizer o comportamento das ligações químicas nas interações fármaco-receptor. Para tal, inicialmente, a estrutura do (-)-Carveol e do fármaco controle, itraconazol, foram obtidas do PubChem NCBI (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) no formato de entrada '.sdf'. Através dos softwares Avogadro 1.2.0 em pH 7.4 e Mopac 2012 no nível PM6, foram realizadas minimizações de energia e a otimização molecular com o campo de força AM1-BCC. Foram adicionadas as cargas de Gasteiger com o software Chimera 1.16 obtendo os arquivos de entrada dos ligantes no formato ‘.mol2’ (Halgren, 2002; Hanwell *et al.*, 2012).

Posteriormente, a proteína foi carregada no software AutoDockTools 1.5.4 (ADT) (Morris *et al.*, 2009), para a adição dos hidrogênios polares e cargas de Kollman, além da mesclagem de hidrogênios não polares. Em seguida, as simulações de *docking* foram feitas com

a identificação do sítio ativo da proteína alvo com o centro de grid: (1.544; 0.855; -7.425Å), dimensões (54 x 82 x 68 x) e espaçamentos de 0.375 Å (Morris *et al.*, 2009).

Após a localização do sítio ativo, o *docking* foi desenvolvido no AutoDock 4.2, com 100 operações de algoritmo genético Lamarckiano e nos parâmetros padrões do ADT. Com isso, foram gerados valores de Energia Livre de Ligação (ΔG) e Constante Inibitória (K_i), sendo selecionadas as conformações com menor valor de ΔG . Por fim, com o auxílio dos softwares PyMol 2.5.3 e Discovery Studio 2021, os resultados foram analisados, determinando as regiões de ligação do alvo com a molécula ligante, os tipos de interações e os aminoácidos do sítio ativo que participam das ligações (Bell; Zhang, 2019).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA E DA CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA

As problemáticas acerca da esporotricose envolvem fatores ambientais, fúngicos e farmacológicos, como: facilidade de propagação do fungo no ambiente, e de transmissão da doença por felinos resultando em surtos da doença, escassez de alternativas medicamentosas, dificuldades no tratamento, como efeitos adversos aos medicamentos, e aparecimento de espécies resistentes a eles. Tendo a área de produtos naturais como fonte de fármacos, é importante explorá-la a fim de encontrar moléculas bioativas com ação sobre este fungo (Fernandes *et al.*, 2023).

Tabela 1 - CIM ($\mu\text{g/mL}$) e CFM ($\mu\text{g/mL}$) do (-)-Carveol sobre cepas de *Sporothrix brasiliensis*

<i>S. brasiliensis</i>	(-)-Carveol			Natureza de Atividade	ITZ	Controles	
	CIM	CFM	CFM/CIM			*MO	**Est
IPEC 100/ CFP 0051	256	256	1	Fungicida	8	+	-
LM 44	128	128	1	Fungicida	0,25	+	-
LM 46	256	256	1	Fungicida	<0,25	+	-
LM 200	128	128	1	Fungicida	<0,25	+	-
LM 260	256	256	1	Fungicida	0,5	+	-
LM 279	256	256	1	Fungicida	<0,25	+	-
LM 284	256	256	1	Fungicida	0,25	+	-
LM 295	256	256	1	Fungicida	0,5	+	-
LM 310	256	256	1	Fungicida	0,5	+	-
LM 366	128	128	1	Fungicida	0,25	+	-
LM 373	128	128	1	Fungicida	0,25	+	-
LM 383	128	128	1	Fungicida	0,25	+	-

Legenda: CFM/CIM = Razão CFM sobre CIM; ITZ = Itraconazol; *MO = controle de viabilidade; **Est = controle de esterilidade; + = crescimento de microrganismo; - = ausência de crescimento de microrganismo.

Nesse estudo foi avaliada a atividade antifúngica do monoterpeno (-)-Carveol sobre 12 cepas de *Sporothrix brasiliensis*. Os resultados expostos na Tabela 1 mostram as CIM e CFM do monoterpeno frente cada cepa, que permite a determinação da natureza da atividade sobre elas. Também traz a CIM do Itraconazol, fármaco de primeira escolha no tratamento da esporotricose. Paralelamente foram realizados controles de esterilidade e viabilidade, que validaram os experimentos.

O (-)-Carveol expressou atividade antifúngica sobre todas as cepas testadas, apresentando CIM que variou entre 128 e 256 µg/mL, estabelecendo a CIM em 256 µg/mL, apresentada pela maioria das cepas. A CFM apresentou resultados iguais à CIM para cada cepa, logo, a substância apresentou atividade fungicida para as cepas de *S. brasiliensis* avaliadas. Para o itraconazol, foram observados valores de CIM que variaram de < 0,25 µg/mL a 8 µg/mL. Com exceção de uma, as cepas utilizadas nesse experimento foram sensíveis ao itraconazol, de acordo com os valores de corte epidemiológicos (ECVs) estabelecidos por Espinel-Ingroff *et al.* (2017).

Esse é o primeiro estudo que avalia a atividade desse composto sobre *S. brasiliensis*. Sua atividade antifúngica foi sinalizada primeiramente por Montenegro *et al.* (2019), sobre espécies de *Candida*. Foi avaliada a ação do Carveol e de derivados sintéticos (a partir de modificações em sua estrutura) sobre *C. glabrata*, *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii*, e *C. albicans*. As CIM variaram entre 0,5 µg/mL e 16 µg/mL, demonstrando um importante potencial antifúngico do composto.

Raj *et al.* (2023) avaliaram a atividade antifúngica de dois monoterpenos, α-terpineol e terpineno-4-ol, além do Carveol, frente *Candida albicans*. Nesse caso, utilizaram a técnica de disco difusão, e foi encontrada CIM de 336, 690 e 345 µg/ml, respectivamente. Ainda que se observe um aumento da CIM nesse estudo, que se explica pelo emprego de uma cepa com resistente aos azólicos, trata-se de uma potencial atividade antifúngica da substância.

Os casos de esporotricose tem aumentado nas últimas décadas, e a incidência na identificação de *S. brasiliensis* alerta os pesquisadores para importância de buscar formas de controlar essa propagação. No que tange o uso de produtos naturais nessa busca, Waller *et al.* (2023) avaliou a atividade do monoterpenos γ-terpineno frente cepas *S. brasiliensis* sensíveis e resistentes ao itraconazol. As cepas foram susceptíveis ao monoterpeno, com uma CIM média de 3000 µg/ml, tanto para cepas sensíveis quanto resistentes ao itraconazol.

As cepas de *Sporothrix brasiliensis* do presente estudo foram majoritariamente sensíveis ao itraconazol, de acordo com os critérios estabelecidos por Espinel-Ingroff *et al.* (2017), logo, o (-)-Carveol apresentou uma melhor atividade comparado ao γ-terpineno também sobre cepas

sensíveis. Ampliar os métodos de controle da esporotricose é urgente, tanto devido ao aumento no número de casos, quanto de cepas resistentes. Por isso é tão importante aprofundar essa atividade, buscando recursos para melhorá-la, bem como conhecer a ação e as características dessa substância.

5.2 EFEITO DO (-)-CARVEOL NA PRESENÇA DO SORBITOL E ERGOSTEROL EXÓGENO

A parede celular e a membrana plasmática fúngica se apresentam como alvos principais para a ação de fármacos antifúngicos. Quando uma molécula age sobre a parede celular inibindo sua síntese, provoca a lise das células fúngicas, porém essa é prejudicada na presença do protetor osmótico. Esse efeito é evidenciado por um aumento no valor de CIM em meio com sorbitol, comparado ao valor de CIM em sua ausência. Outra ação comum é a interação direta com o ergosterol. Ao adicionar ergosterol exógeno ao meio, a molécula se ligará a ele, precisando de uma concentração maior dela para atingir a célula fúngica, logo, na prática ocorre um aumento no valor de CIM em meio com ergosterol, comparado ao valor de CIM no meio sem ergosterol (Escalante *et al.*, 2008; Sousa *et al.*, 2020).

O efeito do monoterpeno sobre a parede celular fúngica, e sobre o ergosterol contido na membrana fúngica, foi analisado na presença e na ausência do protetor osmótico sorbitol, e do ergosterol exógeno, respectivamente. A Tabela 2 traz as CIM do (-)-Carveol sobre as cepas 200 e 279 de *Sporothrix brasiliensis*, na ausência e na presença das substâncias. Além dos controles positivos, anfotericina B que tem ação conhecida interferindo no ergosterol, e caspofungina (sobre *C. albicans*) que tem atividade conhecida através da parede celular fúngica. Os controles de esterilidade e viabilidade também foram realizados, com resultados iguais aos da seção 5.1.

Tabela 2 - CIM ($\mu\text{g/mL}$) do (-)-Carveol e antifúngicos controles na ausência e na presença do sorbitol e do ergosterol

Cepas	LM 200		LM 279		<i>C. albicans</i> ATCC 76485
	(-)-Carv ($\mu\text{g/mL}$)	AnfB ($\mu\text{g/mL}$)	(-)-Carv ($\mu\text{g/mL}$)	AnfB ($\mu\text{g/mL}$)	Caspofungina ($\mu\text{g/mL}$)
	+Sorb	128	-	256	-
-Sorb	128	-	256	-	0,55
+Erg	128	3,25	256	3,25	-
-Erg	128	1,625	256	1,625	-

Legenda: - = Não foi testado; +Sorb = Presença de sorbitol; -Sorb = Ausência de sorbitol; +Erg = Presença de ergosterol; -Erg = Ausência de ergosterol; (-)-Carv = (-)-Carveol; AnfB = Anfotericina B; Caspo = Caspofungina.

A caspofungina é uma equinocandina que atua inibindo a síntese do β (1,3) -D-glucana, componente essencial da parede celular, porém possui baixa atividade antifúngica sobre *S. brasiliensis* (Carnero *et al.*, 2018). A anidulafungina é uma outra representante da classe que poderia ser empregada como controle, por possuir atividade sobre *Sporothrix*, porém não foi possível adquiri-la a tempo para realização dos experimentos. Logo, a fim de garantir a validade do método, foi realizado o mesmo teste com uma cepa padrão de *C. albicans*, suscetível a caspofungina. O objetivo, foi garantir que o sorbitol estava estável, exercendo sua função de protetor osmótico.

É possível observar que na presença do protetor osmótico as CIM do (-)-Carveol para ambas as cepas se mantém as mesmas quando comparadas as CIM na ausência do mesmo, sugerindo que este monoterpeno não atua através da inibição da síntese da parede celular fúngica. Ainda, o mesmo cenário foi observado no teste com o ergosterol. As CIM do (-)-Carveol no meio com ergosterol para ambas as cepas se mantém as mesmas quando comparadas as CIM na ausência dele, sugerindo que esse monoterpeno não atua por ligação (complexação) com o ergosterol de membrana. Os controles positivos validaram os testes e consequentemente os resultados obtidos.

O efeito contrário foi observado no estudo de Balkrishna *et al.* (2022), que testou o extrato da planta inteira de *Withania somnifera*, contra uma cepa de *S. globosa*, outra espécie patogênica. Ao realizar os ensaios de proteção com sorbitol e ligação de ergosterol, as CIM do monoterpeno dobraram na presença tanto do sorbitol, quanto do ergosterol. Isto é, além de interferir na síntese da parede celular fúngica, também consegue se complexar ao ergosterol da membrana, interferindo em sua permeabilidade.

O estudo de Raj *et al.* (2023) inclusive, lançou mão de outro tipo de método de mecanismo de ação. Buscou visualizar se o Carveol causou danos a permeabilidade da membrana de células de *Candida*, utilizando o iodeto de propídio com análise por citômetro de fluxo, e visualizando essa ação através de microscopia de fluorescência. O iodeto de propídio é um corante vermelho que penetra apenas células com membranas danificadas. Logo, as células tratadas com o Carveol apresentaram captação de iodeto de 80,08%, e coloração vermelha intensa na microscopia, demonstrando que o monoterpeno causou danos à membrana.

Vale salientar que esse experimento não define o mecanismo de ação de uma substância, uma vez que existem outras ações não investigadas por esses dois métodos. Além disso, existe

a possibilidade de um composto ter mais de um alvo de ação/ligação. Por essa razão é necessário realizar outros experimentos mais específicos, *in silico* (5.5) ou *in vitro* (perspectivas futuras), que apontem outros alvos de ação da substância.

5.3 EFEITO DA SUA ASSOCIAÇÃO COM ANFOTERICINA B E ITRACONAZOL

A combinação de dois ou mais fármacos é uma prática clínica comum utilizada em diversas áreas. Na área das infecções fúngicas, costuma ser uma alternativa para casos em que ocorre resistência ao tratamento, manifestação acentuada de algum efeito adverso, ou ainda se as expectativas do resultado não são atingidas. Lança-se mão então da associação com outro medicamento, e se necessário com ajuste de dose - nos casos em que o primeiro não for bem tolerado - para seguir o tratamento. Porém essa alternativa só deve ser abordada se vantajosa e segura, isto é, quando as interações medicamentosas são sinérgicas (Raffetin *et al.*, 2018).

Os resultados do ensaio *Checkerboard* estão expressos nas Tabela 3. Foram selecionadas duas cepas para esse experimento. Observa-se na tabela a CIM da combinação entre (-)-Carveol e itraconazol, (-)-Carveol e anfotericina B, e vice-versa para ambas as cepas, seus respectivos valores de CIF e ICIF, e o tipo de interação resultante desses valores.

Tabela 3 - CIM ($\mu\text{g/mL}$) combinada e efeitos da combinação entre (-)-Carveol e antifúngicos frente as cepas 200 e 279

Cepas	Substâncias	CIM	CIF	ICIF	Tipo de interação
200	(-)-Carveol CI	64	0,25	32,25	Antagonismo
	Itraconazol CC	1	32		
	(-)-Carveol CA	64	0,25	1,25	
279	Anfotericina B CC	0,55625	1		Indiferença
	(-)-Carveol CI	256	0,5	8,5	Antagonismo
	Itraconazol CC	1	8		
	(-)-Carveol CA	128	0,5	2,5	Indiferença
	Anfotericina B CC	2,225	2		

Legenda: CI = combinado com itraconazol; CC = combinado com Carveol; CA = combinado com anfotericina B; CIF = Concentração Inibitória Fracionada; ICIF = Índice de Concentração Inibitória Fracionada.

Foi observado o mesmo tipo de interação nas combinações do (-)-Carveol com os antifúngicos para ambas as cepas de *S. brasiliensis*, embora as substâncias tenham apresentado

CIM individuais e combinadas diferentes. A combinação do monoterpeno com o itraconazol resultou numa interação de antagonismo, uma vez que o ICIF foi maior que 4. A combinação do (-)-Carveol com a anfotericina B, resultou em um ICIF variando entre 1 até 4, com interação de indiferença (Odds, 2003; Shin, 2003).

Os resultados mostram que a associação do (-)-Carveol com o itraconazol, primeira escolha no tratamento da esporotricose, deve ser evitada. Essa associação pode comprometer a eficácia de ambos os compostos, potencialmente agravando a infecção fúngica. O antagonismo entre os dois medicamentos pode comprometer o êxito da terapia antifúngica, pois a redução na concentração efetiva de moléculas bioativas disponíveis pode enfraquecer o efeito esperado contra o fungo (Diniz-Neto *et al.*, 2024).

Em um estudo de Borba-Santos *et al.* (2022) foi avaliada a atividade antifúngica de alguns derivados de uma naftoquinona frente *S. brasiliensis* e *S. schenkii*, e foi selecionado o de melhor atividade para observar sua interação com o itraconazol. A naftoquinona apresentou ICIF abaixo de 1 para ambas as cepas, apresentando interação sinérgica para a combinação.

Waller *et al.* (2023) também avaliou a atividade do monoterpeno γ -terpineno em combinação com o itraconazol frente cepas *S. brasiliensis*. Foi encontrada atividade sinérgica em 33,33% das cepas analisadas, e atividade indiferente nas cepas restantes (66,67%). Logo este monoterpeno não apresenta limitações à combinação com o itraconazol.

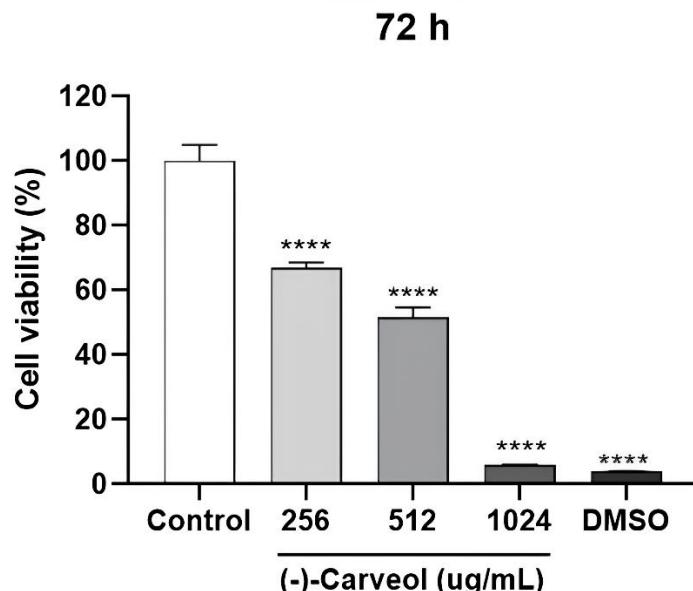
O antagonismo observado nesse estudo pode ser explicado por diferentes hipóteses. Uma importante, é o fato de ter associado uma molécula fungicida – (-)-Carveol) – com um fármaco fungistático – itraconazol –, onde um atrapalha a ação do outro. Outra suposição é que ambos possuam o mesmo alvo de ação, ou sítio de ligação, e um atrapalhe ou impeça a ligação do outro ao seu alvo a fim de executar suas respectivas atividades. Vale salientar contudo, que esse é o primeiro estudo que avalia a associação do (-)-Carveol com um antifúngico.

5.4 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE EM CÉLULA NÃO TUMORAL

No geral, a pele é o primeiro tecido que entra em contato com o *Sporothrix* spp. para que haja a inoculação fúngica. Os queratinócitos desempenham papéis essenciais na restauração da barreira epidérmica e no início de respostas imunológicas. Além de atuarem como parte dessa barreira física, também contribuem para o controle de infecções por diversos patógenos, incluindo fungos, ao participarem do desenvolvimento de respostas que combatem esses microrganismos (Paredes-Rojas *et al.* 2022).

Diante disso, foi avaliado o efeito citotóxico do (-)-Carveol sobre a linhagem celular de queratinócito humano (HaCaT) através do ensaio colorimétrico MTT. Os resultados, dispostos na Figura 6, estão expressos como percentual de viabilidade celular em função das diferentes concentrações da substância ($\mu\text{g/mL}$) no tempo de 72 horas.

Figura 6 - Viabilidade celular da linhagem de queratinócito humano (HaCaT) após 72 horas de tratamento com diferentes concentrações de (-)-Carveol



Legenda: dados obtidos a partir de três experimentos realizados em triplicatas 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. * $p<0,05$ e *** $p<0,0001$ quando comparado os grupos de tratamento com o controle. Média do controle: 100,0% \pm 0,09.

Como observado, todas as concentrações avaliadas do (-)-Carveol reduziram a viabilidade celular significativamente, quando comparado ao grupo controle. A viabilidade celular foi mantida acima de 50% nas concentrações de 256 $\mu\text{g/mL}$ e 512 $\mu\text{g/mL}$ na linhagem celular testada. Com base nestes resultados, entende-se que a citotoxicidade da molécula é diretamente proporcional à sua concentração, sendo as maiores concentrações as que mais causaram redução da porcentagem de células viáveis.

Não foram encontrados estudos anteriores avaliando a atividade citotóxica do (-)-Carveol. Entretanto Kpoviessi *et al.* (2014) avaliaram a citotoxicidade de óleos essenciais de espécies de *Cymbopogon*. Primeiro identificaram que o (-)-Carveol estava entre os compostos majoritários do óleo de *Cymbopogon giganteus*. Sua citotoxicidade foi investigada sobre células de ovário de hamster chinês (CHO) e sobre uma linhagem celular de fibroblastos

humanos não cancerígenos (WI38). Este óleo apresentou baixa citotoxicidade sobre estas linhagens celulares.

5.5 ENSAIOS *in silico*

5.5.1 Previsão farmacocinética e toxicológica do (-)-Carveol e do itraconazol

Conhecer os parâmetros físico-químicos associados às suas propriedades farmacocinéticas ADME (absorção, distribuição, metabolismo e excreção), além da toxicidade, é de extrema importância para o desenvolvimento de um medicamento. As características farmacocinéticas dos compostos (-)-Carveol e itraconazol foram examinadas, revelando dados que destacam suas propriedades farmacológicas, conforme detalhado na Tabela 4.

Tabela 4 - Parâmetros farmacocinéticos *in silico* (pkCSM) do (-)-Carveol e do itraconazol

Propriedade	Nome do modelo	(-)-CAR	ITZ
Absorção	Solubilidade em água (log mol/L)	-1.775	-3.442
	Permeabilidade Caco2 (logPapp in 10^{-6} cm/s)	1.397	1.138
	Absorção Intestinal (humana) (%)	95.176	100.00
	Permeabilidade da pele (log Kp)	-2.081	-2.735
	Substrato da glicoproteína P	Não	Sim
	Inibidor da glicoproteína P I	Não	Sim
Distribuição	Inibidor da glicoproteína P II	Não	Sim
	VDss (humana) (log L/kg)	0.167	-0.167
	Fração não ligada (humano) (%)	31.96	0.31
	Permeabilidade BBB (log BB)	0.564	-2.115
Metabolismo	Permeabilidade do SNC (log PS)	-2.578	-3.414
	Substrato CYP2D6	Não	Não
	Substrato CYP3A4	Não	Sim
	Inibidor CYP1A2	Não	Não
	Inibidor CYP2C19	Não	Sim
	Inibidor CYP2C9	Não	Sim
Excreção	Inibidor CYP2D6	Não	Não
	Inibidor CYP3A4	Não	Sim
	Depuração total (ml/min/kg)	12.62	8.32
	Substrato OCT2 renal	Não	Não
Toxicidade	Toxicidade AMES	Não	Não
	Hepatotoxicidade	Não	Sim
	Sensibilização da pele	Sim	Não
	Toxic. aguda oral em ratos (LD50) (mol/kg)	1.95	2.96

Legenda: (-)-CAR = (-)-Carveol; ITZ = itraconazol; Caco2 = células de adenocarcinoma de cólon humano; BBB = *blood-brain barrier* (barreira hematoencefálica); VDss = volume de distribuição no estado estacionário; SNC = Sistema Nervoso Central; OCT2 = transportador de cátions orgânicos 2.

Ambos os compostos exibem uma notável taxa de absorção intestinal, ultrapassando os 90%. Apresentam solubilidade relativamente elevada em água ($-4 \sim 0,5$ log mol/L), juntamente com uma permeabilidade Caco-2 alta ($> 0,90$). No entanto, a permeabilidade cutânea do itraconazol é elevada e maior em relação ao (-)-Carveol ($\log K_p > -2,5$). Ainda a nível de absorção, o (-)-Carveol não é substrato nem inibidor da glicoproteína P, tendo assim menor probabilidade de interações medicamentosas e toxicidade.

Devido as características lipofílicas do (-)-Carveol, este pode transpor a barreira hematoencefálica ($\log BB > 0,3$), o que resulta em uma maior chance de interações com sistema nervoso central (SNC). O volume de distribuição no estado estacionário (VD_{ss}) é mediano, considerado alto quando ($VD_{ss} > 0,45$), e isso pode proporcionar uma melhor distribuição nos tecidos e no plasma. Somado a isso, cerca de 31,96% e 0,31% dos compostos (-)-Carveol e itraconazol respectivamente, não estão ligadas as proteínas plasmáticas e consequentemente a fração ligada do itraconazol é bem superior à do (-)-Carveol.

Quanto ao metabolismo da molécula, é importante salientar que o (-)-Carveol não é substrato ou inibidor das principais isoenzimas do complexo citocromo P450 (CYP450), apresentando assim baixa probabilidade de interações medicamentosas farmacocinéticas. O mesmo não é observado para o itraconazol que é substrato da CYP3A4, e inibidor da CYP2C19, CYP2C9, CYP3A4, o que explica sua interação com inúmeros medicamentos, já descrita na literatura (Orofino-Costa *et al.*, 2022).

A depuração de ambas as moléculas é predominantemente renal. As duas substâncias apresentaram taxa de depuração moderada (5,0 – 15,0 mL/min/Kg), com valores próximos, de 12,62 mL/min/Kg para o (-)-Carveol e 8,32 mL/min/Kg para o itraconazol. Outra similaridade no âmbito da excreção dessas moléculas é que ambas não são substratos do transportador de cátions orgânicos 2 (OCT2), que está expresso na membrana basolateral do túbulo proximal dos rins, e promove a eliminação de compostos endógenos e de vários fármacos em uso na clínica (Benzi, 2019).

Quanto a toxicidade, nos testes de mutagenicidade de AMES os compostos não apresentaram indícios de mutagenicidade, e o (-)-Carveol não foi hepatotóxico, característica do itraconazol. As análises das propriedades toxicológicas e do potencial terapêutico do (-)-Carveol em comparação com outros agentes antifúngicos como itraconazol e anfotericina B, desempenham um papel crucial na orientação do desenvolvimento de novos medicamentos, relacionados principalmente à segurança do paciente. Essas propriedades estão dispostas na Tabela 5.

Tabela 5 - Propriedades toxicológicas e drogabilidade *in silico* do (-)-Carveol, itraconazol e anfotericina B

Compostos	Risco de Toxicidade ^[a]					Drogabilidade ^[b]					
	MUT	TUMO	IRRI	REP	cLogP	cLogS	D-L	D-S	nHBA	nHBD	MW
(-)-Car					2.51	-2.14	-18.48	0.28	1.0	1.0	152.00
ITZ					5.15	-7.30	8.09	0.08	12.0	0.0	704.00
AMB					0.32	-5.08	-0.14	0.27	18.0	13.0	923.00

Legenda: Não tóxico; Ligeiramente tóxico; Altamente tóxico; ^[a]MUT: Mutagênico; TUMO: Tumorigênico; IRRI: Irritante; REP: Efeitos sobre Sistema Reprodutivo. ^[b] D-L: Droga-Semelhança; D-S: Droga-Escore; nHBA: Número de Aceitadores de Ligação de Hidrogênio; nHBD: Número De Doadores De Ligação De Hidrogênio; MW: Peso Molecular;

Observa-se que (-)-Carveol revelou ser irritante, mas não apresentou riscos de mutagenicidade, tumorigenicidade, nem possibilidade de efeitos adversos sobre o sistema reprodutivo. Contrariamente, o itraconazol apresentou características mutagênicas e tumorigênicas. Vale ressaltar que o monoterpeno atende a todos os critérios fundamentais da Regra dos Cinco de Lipinski, que avalia a adequação de um composto para absorção oral e, consequentemente, seu potencial como um medicamento oral eficaz. Para isso deve apresentar boa permeabilidade nas membranas biológicas e boa absorção intestinal que é determinada pelos seguintes parâmetros: MW ≤ 500 Da, cLog S ≤ 5, cLog P ≤ 5, nHBD ≤ 5, nHBA ≤ 10.

5.5.2 (-)-Carveol se liga ao sítio ativo do CYP51

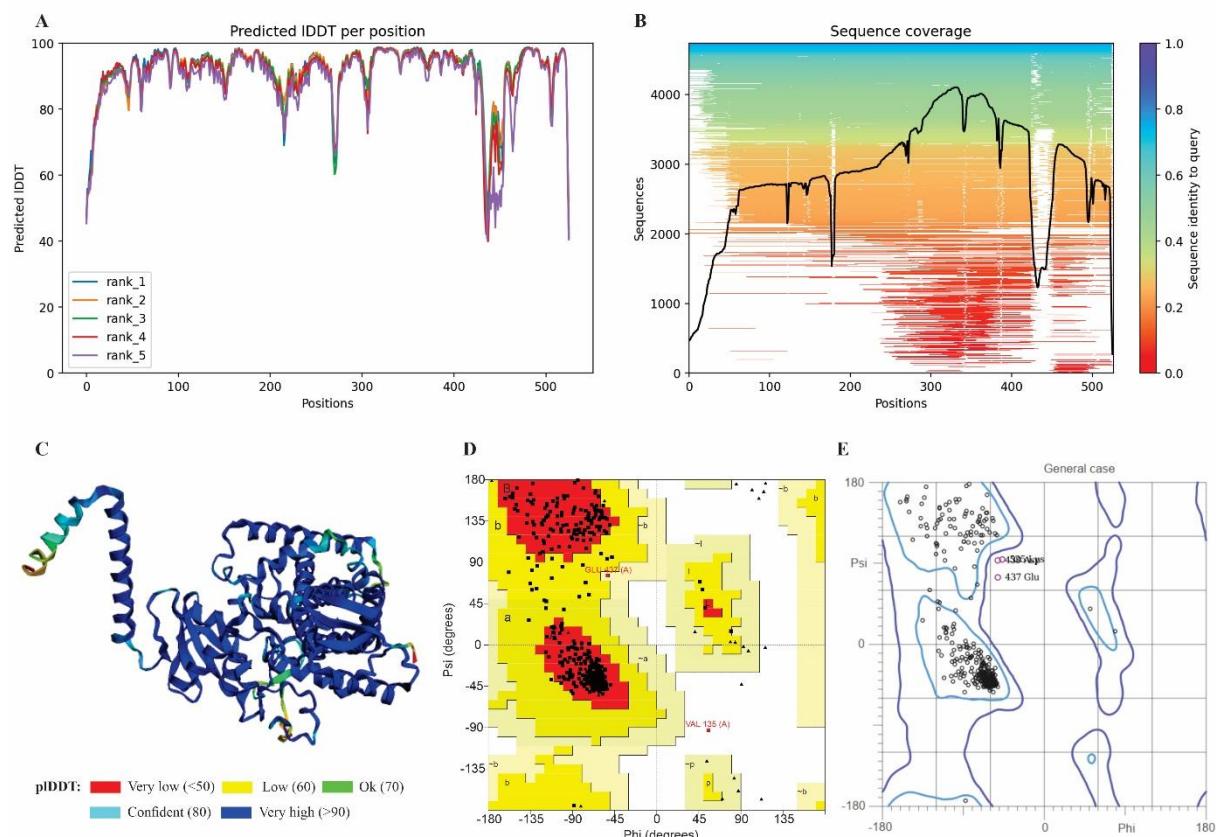
Com o resultado do *Checkerboard* surgiu a hipótese de que a interação do (-)-Carveol com o itraconazol seria devido a afinidade de ambos pelo mesmo sítio de ligação, para promover sua ação antifúngica. Assim, foi investigado se (-)-Carveol interage com a enzima Lanosterol 14 α -demetilase (CYP51) codificada pelo gene ERG11. Essa busca também foi encorajada pelo estudo de Raj *et al.* (2023) que avaliou a atividade do Carveol sobre *Candida albicans*, e observou a interação da substância com a enzima da espécie fúngica.

Para a análise da interação do (-)-Carveol e do itraconazol com o sítio ativo da CYP51 de *S. brasiliensis*, foi necessária a predição da proteína, pois não há registros do modelo cristalográfico no PDB. Para validar o ensaio bioquímico, o modelo da CYP51 foi predito pelo AlphaFold2 (ferramenta para previsões de estruturas de proteínas) e obtido em formato PDB. O programa gera previsões de alta qualidade da estrutura 3D de moléculas de proteínas a partir de suas sequências de aminoácidos (Varadi *et al.*, 2022).

A CYP51 de *S. brasiliensis* com 526 aminoácidos modelados adequadamente, que pode ser observado pela métrica pLDDT, que calcula a diferença local entre as distâncias reais

e distâncias previstas entre os átomos em uma estrutura proteica. A diferença entre essas distâncias é calculada para cada resíduo individualmente e depois atribui-se um escore. Valor de escore $\geq 70\%$ são classificados como confiáveis (Mariani *et al.*, 2013). Nesse estudo, o escore pLDDT foi de 91.8%. Dentre as cinco melhores opções de proteínas obtidas pelas previsões, os valores pLDDT foram calculados e em seguida atribuiu-se um *rank* para cada previsão obtida, e então optou-se pelo rank_1, por apresentar maior conservação e confiabilidade em toda sua estrutura (Figura 7 A, B e C).

Figura 7 - Processo de resolução e validação da estrutura 3D da enzima CYP51 de *S. brasiliensis*



Legenda: **A e B.** Predição pLDDT e cobertura de posição de resíduos de aminoácidos da CYP51. **C.** Estrutura tridimensional da CYP51 de *S. brasiliensis* prevista por AlphaFold2. **D e E.** Validação do modelo de pontuação máxima pelo gráfico PROCHECK Ramachandran e MolProbity Ramachandran, respectivamente.

A cobertura de sequências utilizada para produzir os modelos da proteína foi baseado em número de sequências homólogas entre 500 e 5.000 e a identidade das sequências foi de aproximadamente 70%. As regiões com baixa cobertura não prejudicam a identidade do sítio ativo da enzima, embora possa haver lacunas nas sequências. Sendo assim, as previsões e

modelos resultantes são confiáveis e úteis para estudar o sítio ativo da enzima como pode ser observado no topo do gráfico (Figura 7B).

Para verificar a confiabilidade do melhor modelo previsto, gráficos de Ramachandran foram obtidos independentemente nos servidores PROCHECK e MolProbity. O servidor PROCHECK mostrou que mais de 93.7% dos resíduos para a CYP51 estavam nas regiões mais favoráveis (A, B e L) indicando um modelo de boa qualidade (Figura 7 D). Os gráficos MolProbity Ramachandran, também mostraram score > 99.8% dos resíduos da CYP51 de *S. brasiliensis* nas regiões permitidas, o que novamente confirmou a qualidade do modelo previsto (Figura 7 E). Assim, ambos os softwares justificaram a confiabilidade das estruturas previstas da enzima em estudo (Sobolev *et al.*, 2020).

5.5.3 Estudos de ancoragem

Nas simulações de *docking* molecular com a enzima CYP51 de *S. brasiliensis* foram calculadas as energias livres de ligação (ΔG) e constantes inibitórias (K_i) dos compostos (-)-Carveol e itraconazol (Tabela 6).

Tabela 6 - Energias livres de ligação (ΔG) e constante inibitória (K_i) dos ligantes (-)-Carveol e itraconazol frente a enzimas CYP51 de *S. brasiliensis* previsto pelo AlphaFold2

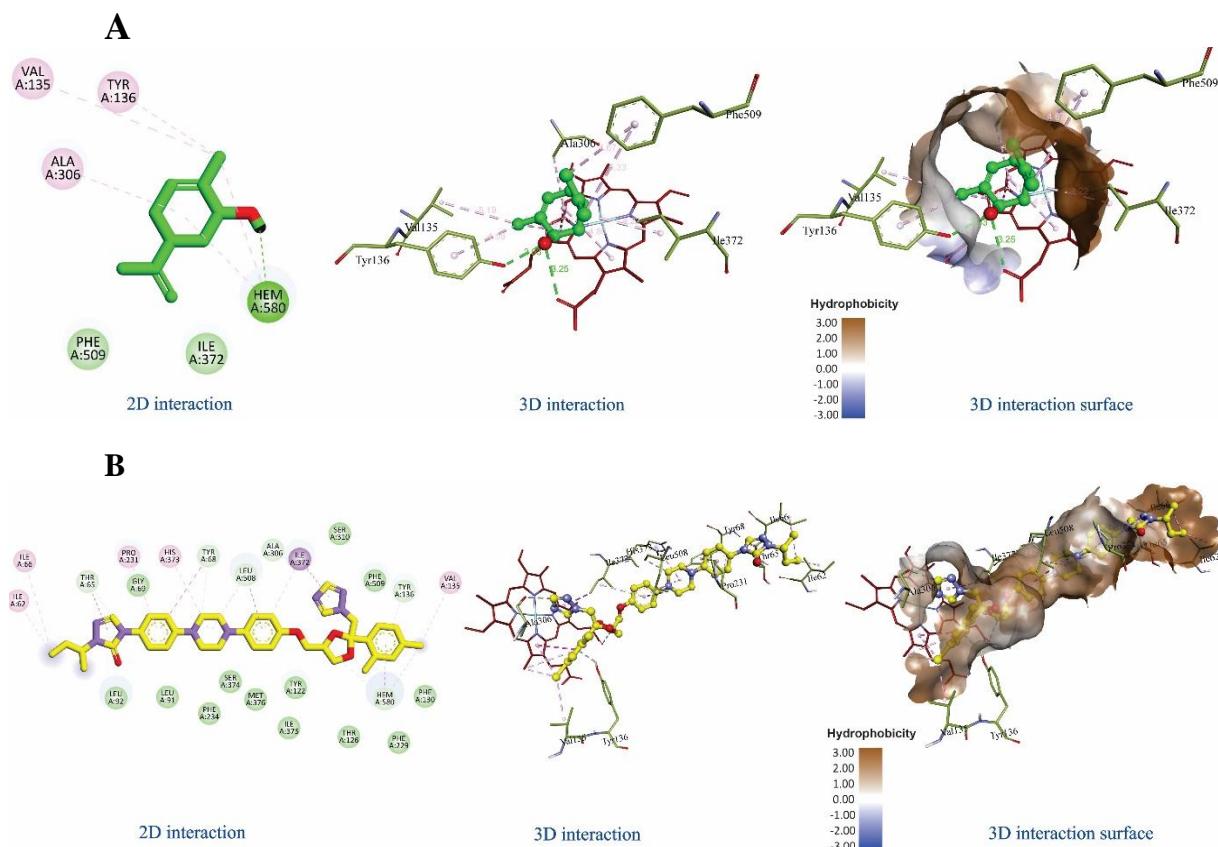
Enzima	Ligantes	ΔG (kcal/mol)	K_i
CYP51	(-)-Carveol	- 5,24	144,88 μ M
	Itraconazol	- 10,46	21,69nM

Legenda: ΔG = energia livre de ligação; K_i = constante de afinidade; μ M = micromolar; nM = nanomolar.

O (-)-Carveol e o fármaco controle itraconazol interagem ligando-se ao sítio ativo da CYP51 fúngica com energias de ligação bem definidas, em destaque o (-)-Carveol apresentou energia de ligação de -5.24kcal/mol e uma K_i de 144.88 μ M, portanto demonstrando afinidade pelo sítio ativo da enzimático. De modo semelhante, as interações do itraconazol com a CYP51 demonstram alta afinidade pelo sítio ativo enzimático favorecido pelas menores energias de ligação e K_i . Importante destacar que o composto (-)-Carveol possui afinidade pelo sítio ativo da enzima em estudo, no entanto, o antifúngico itraconazol apresentou prioridade de ligação (Tabela 6).

A interação do itraconazol concorda com a atividade dos azólicos, classe de antifúngicos a que pertence. Seu mecanismo de ação se dá pela inibição da enzima Lanosterol 14 α -demetilase (CYP51) codificada pelo gene ERG11, que converte lanosterol em ergosterol na membrana celular, prejudicando a composição da membrana fúngica (Daina, Mcmanus, Sunish, 2019). Através do ensaio *in vitro* desse estudo, ficou claro que o (-)-Carveol não se complexa ao ergosterol para causar dano a membrana, mas, pode exercer a mesma ação ao interagir com a enzima CYP51 prejudicando a síntese do ergosterol. Ademais é necessário investigar sua ação em outros alvos, citoplasmáticos e nucleares, a fim de confirmar de que maneira exerce sua ação antifúngica.

Figura 8 - Docking molecular dos ligantes (-)-Carveol e itraconazol com o sítio ativo da enzima CYP51 de *S. brasiliensis* previsto pelo AlphaFold2



Legenda: **A** e **B**, Principais tipos de interações do (-)-Carveol e do itraconazol (respectivamente) com o sítio ativo da enzima CYP51 em 2D, 3D e o modelo 3D de superfície mostrando as regiões com maior ou menor grau e hidrofobicidade;  = Ligação de Hidrogênio Convencional;  = Hidrogênio-Carbono;  = Van der Waals;  = Pi-Sigma;  = Pi-Alquil/Alquil

Também foram avaliados os principais tipos de ligações do (-)-Carveol e do itraconazol com o sítio ativo da enzima CYP51, visualizados na Figura 8. É possível observar que o (-)-Carveol estabelece algumas interações hidrofóbicas (Alquil/Pi-alquil, e ligações de van der

Waals) que são importantes para estabilizar o ligante no sítio ativo enzimático. Além disso, destaca-se as ligações de hidrogênio entre o resíduo Tyr136 e o grupo OH do (-)-Carveol com distância de ligação de 2.63 Å e do grupo porfirínico com o OH do monoterpeno (3.25 Å) contribuindo ainda mais para a estabilidade e permanência do (-)-Carveol no sítio ativo enzimático. Ainda é interessante observar que devido a predominância de caráter apolar da molécula do (-)-Carveol ocorre majoritariamente interações hidrofóbicas com o sítio ativo enzimático, também de elevada hidrofobicidade (Figura 8 A).

Não obstante, as interações do itraconazol com a CYP51 foram mais favoráveis em comparação ao (-)-Carveol (Figura 8 B). Itraconazol possivelmente apresenta uma maior complementariedade molecular em relação ao sítio ativo enzimático, que é relativamente grande e de elevada hidrofobicidade. Além disso, o itraconazol interage com a enzima por meio de várias ligações químicas majoritariamente de caráter apolar (Alquil/Pi-alquil, Pi-sigma e ligações de van der Waals), ligações estas mais fracas em relação as ligações de hidrogênio, mas resultando em efeito cumulativo o que produz maior afinidade deste fármaco pelo sítio ativo da CYP51 de *S. brasiliensis* (Figura 8 B).

Esses resultados se relacionam com os valores de K_i e ΔG encontrados para as substâncias. O itraconazol estabelece diversas interações com o sítio ativo da enzima, gerando um $\Delta G = - 10.46$ kcal/mol provavelmente devido ao tamanho do ligante, possibilitando assim melhor complementariedade molecular. Isso pode explicar o que foi encontrado no ensaio de combinação de drogas. (-)-Carveol e itraconazol interagem com o mesmo sítio ativo para exercer sua ação antifúngica, com o itraconazol possuindo prioridade de ligação e interagindo com o alvo mais fortemente. Logo, ao serem administradas juntas, competem pelo mesmo objetivo, e suas respectivas atividades são prejudicadas.

6 CONCLUSÃO

O (-)-Carveol demonstrou potencial antifúngico sobre *Sporothrix brasiliensis*. Foi observada CIM de 256 µg/mL sobre as cepas testadas, sendo essa atividade de natureza fungicida. A ação antifúngica da molécula não acontece pela através da parede celular fúngica, ou pela complexação do monoterpeno ao ergosterol da membrana. Também foi demonstrado que a combinação do (-)-Carveol com o itraconazol é desencorajada, uma vez que apresentaram interação antagônica. (-)-Carveol também apresentou considerável citotoxicidade sobre as células de queratinócitos humanas.

Quanto à análise *in silico* do estudo, o (-)-Carveol apresentou características farmacocinéticas e toxicológicas favoráveis à administração ao organismo e não foi hepatotóxico. Além disso, o (-)-Carveol mostrou-se não ser mutagênico ou tumorigênico e parece não ter efeitos biológicos sobre o sistema reprodutivo. Com o *docking* molecular foi possível observar que aquele antagonismo descrito no ensaio de combinação de fármacos, pode ter como justificativa a mesma enzima alvo para ambas as drogas. Tanto o itraconazol quanto o (-)-Carveol interagem com a enzima CYP51 para exercer sua ação antifúngica, mas foi observado que o itraconazol possui prioridade de ligação, e interage com o alvo mais fortemente, prejudicando a interação do monoterpeno com este alvo.

Assim, mais estudos devem ser realizados para avaliar a aplicabilidade *in vivo* do (-)-Carveol, buscando alternativas à sua lipofilicidade e citotoxicidade, com sistemas de administração de drogas em nanoscala, por exemplo. Além disso, investigar outros alvos terapêuticos que o (-)-Carveol possa interagir, como por exemplo à nível de DNA. Esses estudos futuros ajudarão na validação de seu uso potencial como alternativa terapêutica, auxiliando no tratamento das manifestações clínicas da esporotricose bem como no controle e propagação do fungo causador.

REFERÊNCIAS

- AHMED, O. A. A.; FAHMY, U. A.; BAKHAIDAR, R.; EL-MOSELHY, M. A.; OKBAZGHI, S. Z.; AHMED, A. F.; HAMMAD, A. S. A.; ALHAKAMY, N. A. Omega-3 Self-Nanoemulsion Role in Gastroprotection against Indomethacin-Induced Gastric Injury in Rats. **Pharmaceutics.** v. 7, n. 12, p. 140. DOI: 10.3390/pharmaceutics12020140. 2020.
- ALMEIDA-PAES, R.; BERNARDES-ENGEDEMAN, A. R.; DA SILVA MOTTA, B.; PIZZINI, C. V.; DE ABREU ALMEIDA, M.; DE MEDEIROS MUNIZ, M.; DIAS, R. A. B.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M. Immunologic Diagnosis of Endemic Mycoses. **Journal of fungi** (Basel, Switzerland), v. 8, n. 10, p. 993. DOI: 10.3390/jof8100993. 2022.
- ALMEIDA-PAES, R.; FIGUEIREDO-CARVALHO, M. H. G.; BRITO-SANTOS, F.; ALMEIDA-SILVA, F.; OLIVEIRA, M. M. E.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M. Melanins Protect *Sporothrix brasiliensis* and *Sporothrix schenckii* from the Antifungal Effects of Terbinafine. **PLoS ONE**, v. 11, n. 3, p. e0152796. DOI: 10.1371/journal.pone.0152796. 2016.
- ALVAREZ, C.M.; OLIVEIRA, M.M.E.; PIRES, R.H. Sporotrichosis: A Review of a Neglected Disease in the Last 50 Years in Brazil. **Microorganisms**, v. 10, p. 2152. DOI: 10.3390/ microorganisms10112152. 2022.
- ANAND, U.; JACOBO-HERRERA, N; ALTEMIMI, A.; LAKHSSASS, L. A Comprehensive Review on Medicinal Plants as Antimicrobial Therapeutics: Potential Avenues of Biocompatible Drug Discovery. **Metabolites**, v. 9, n. 11. DOI: 10.3390/metabo9110258 2019.
- ANGELO, D. F. d. S. **Caracterização molecular de isolados clínicos de *Sporothrix* spp. oriundos de felinos domésticos do estado da Paraíba.** 2021. 51f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal da Paraíba, Areia, PB. 2021.
- ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Orientações Sobre O Uso de Fitoterápicos e Plantas Medicinais. **Cartilha de orientações sobre o uso de fitoterápicos e plantas medicinais.** 2022. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/orientacoes-sobre-o-uso-de-fitoterapicos-e-plantas-medicinais>>. Acesso em: 11 jul. 2024.
- BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 6, n. 2, p. 71–79. DOI: 10.1016/j.jpha.2015.11.005. 2016.
- BARROS, M. B. D. L.; SCHUBACH, A. O.; DE OLIVEIRA, R. D. V. C.; MARTINS, E. B.; TEIXEIRA, J. L.; WANKE, B. Treatment of Cutaneous Sporotrichosis with Itraconazole—Study of 645 Patients. **Clin. Infect. Dis.**, v. 52, p. e200–e206. DOI: 10.1093/cid/cir245. 2011.
- BELL, E. W.; ZHANG, Y. DockRMSD: An open-source tool for atom mapping and RMSD calculation of symmetric molecules through graph isomorphism. **Journal of Cheminformatics**, v. 11, n. 1, p. 1–9. DOI: 10.1186/s13321-019-0362-7. 2019.

BENZI, J. R. d. L. Influência do inibidor do transportador de cátions orgânicos 2 (OCT2) cimetidina e do diabetes experimental na disposição cinética da gabapentina em ratos. 2019. 95f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, SP. 2018.

BERNARDES-ENGEMANN, A. R.; TOMKI, G. F.; RABELLO, V. B. D. S.; ALMEIDA-SILVA, F.; FREITAS, D. F. S.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; ALMEIDA-PAES, R.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M. Sporotrichosis Caused by Non-Wild Type *Sporothrix brasiliensis* Strains. **Front. Cell. Infect. Microbiol.** v. 12, p. 893501. DOI: 10.3389/fcimb.2022.893501. 2022.

BHATIA, S. P.; MCGINTY, D.; LETIZIA, C. S.; API, A. M. Fragrance material review on carveol. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 11, S85–S87. DOI: 10.1016/j.fct.2008.06.032. 2008.

BORBA-SANTOS, L. P.; BARRETO, T. L.; VILA, T.; CHI, K. D.; DOS SANTOS MONTI, F.; DE FARIA, M. R.; ALVIANO, D. S.; ALVIANO, C. S.; FUTURO, D. O.; FERREIRA, V.; DE SOUZA, W.; ISHIDA, K.; ROZENTAL, S. *In Vitro* and *In Vivo* Antifungal Activity of Buparvaquone against *Sporothrix brasiliensis*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 65, n. 9, p. e0069921. DOI: 10.1128/AAC.00699-21. 2021.

BORBA-SANTOS, L.P.; NICOLETTI, C.D.; VILA, T; FERREIRA, P. G.; ARAÚJO-LIMA, C. F.; GALVÃO, B. V. D.; FELZENSZWALB, I.; SOUZA, W.; SILVA, F. C.; FERREIRA, V. F.; FUTURO, D. O.; ROZENTAL, S. A novel naphthoquinone derivative shows selective antifungal activity against *Sporothrix* yeasts and biofilms. **Braz J Microbiol**, v. 53, p. 749–758. DOI: 10.1007/s42770-022-00725-1. 2022.

BÖTTGER, A.; VOTHKNECHT, U.; BOLLE, C.; WOLF, A. Plant Secondary Metabolites and Their General Function in Plants. In: **Lessons on Caffeine, Cannabis & Co. Learning Materials in Biosciences**. Springer, Cham. DOI: 10.1007/978-3-319-99546-5_1. 2018.

BRILHANTE, R. S. N; MALAQUIAS, A. D. M.; CAETANO, E. P.; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M.; LIMA, R. A. C.; MARQUES, F. J. F.; SILVA, N. F.; ALENCAR, L. P.; MONTEIRO, A. J.; CAMARGO, Z. P.; BANDEIRA, T. J. P. G.; ROFRIGUES, A. M.; CORDEIRO, R. A.; MOREIRA, J. L. B.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. In vitro inhibitory effect of miltefosine against strains of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* and *Sporothrix* spp. **Medical Mycology**, v. 52, n. 3, p. 320-325. DOI: 10.1093/mmy/myt027. 2014.

BRILHANTE, R. S. N.; SILVA, M. L. Q. D.; PEREIRA, V. S.; DE OLIVEIRA, J. S.; MACIEL, J. M.; SILVA, I. N. G. D.; GARCIA, L. G. S.; GUEDES, G. M. M.; CORDEIRO, R. A.; PEREIRA-NETO, W. A.; DE CAMARGO, Z. P.; RODRIGUES, A. M.; SIDRIM, J. J. C.; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M.; ROCHA, M. F. G. Potassium iodide and miltefosine inhibit biofilms of *Sporothrix schenckii* species complex in yeast and filamentous forms. **Medical mycology**, v. 57, n. 6, p. 764–772. DOI: 10.1093/mmy/myy119. 2019.

CHASSAGNE, F.; SAMARAKOON, T.; PORRAS, G.; LYLES, J. T.; DETTWEILER, M.; MARQUEZ, L.; SALAM, A. M.; SHABIH, S.; FARROKHI, D. R.; QUAVE, C. L. A

Systematic Review of Plants With Antibacterial Activities: A Taxonomic and Phylogenetic Perspective. **Front. Pharmacol.**, v. 11, p.586548. DOI: 10.3389/fphar.2020.586548. 2021.

CARDOSO-TEIXEIRA, A. C.; FERREIRA-DA-SILVA, F. W.; PEIXOTO-NEVES, D.; OLIVEIRA-ABREU, K.; PEREIRA-GONÇALVES, Á.; COELHO-DE-SOUZA, A. N.; LEAL-CARDOZO, J. H. Hydroxyl Group and Vasorelaxant Effects of Perillyl Alcohol, Carveol, Limonene on Aorta Smooth Muscle of Rats. **Molecules**, v. 26, n. 6. DOI: 10.3390/molecules23061430. 2018.

CARNERO, L. C. G; PÉREZ, N. E. L.; HERNÁNDEZ, S. E. G.; ÁLVAREZ, J. A. M. Immunity and Treatment of Sporotrichosis. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 100. DOI:10.3390/jof4030100. 2018.

CAROLUS, H.; PIERSON S, LAGROU, K; VAN DIJCK, P. Amphotericin B and Other Polyenes—Discovery, Clinical Use, Mode of Action and Drug Resistance. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 4, p. 321. DOI: 10.3390/jof6040321. 2020.

CAVASSIN, F. B.; BAÚ-CARNEIRO, J. L.; VILAS-BOAS, R. R; QUEIROZ-TELLES, F. Sixty years of Amphotericin B: An Overview of the Main Antifungal Agent Used to Treat Invasive Fungal Infections. **Infect Dis Ther**, v. 10, p. 115–147. DOI: 10.1007/s40121-020-00382-7. 2021.

CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Publication M38-A2: Reference method for broth dilution antifungals susceptibility testing of conidium-forming filamentous fungi**; approved standard — second edition. Wayne, Pa. CLSI, v. 28, n. 14, p. 1-30. 2008.

COSTA, M. C. L. d. **Distribuição Espacial da Esporotricose Felina no Município de João Pessoa, Estado da Paraíba, Brasil**. 2019. 32f. Monografia (Bacharelado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal da Paraíba, Areia, PB. 2019.

DAINA, A.; MICHELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Sci Rep**, v. 7, p 1–13. DOI: org/10.1038/srep42717. 2017.

DE ALMEIDA, J. R. F.; JANNUZZI, G. P.; KAIHAMI, G. H.; BREDA, L. C. D.; FERREIRA, K. S.; DE ALMEIDA, S. R. An immunoproteomic approach revealing peptides from *Sporothrix brasiliensis* that induce a cellular immune response in subcutaneous sporotrichosis. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 4192. DOI: 10.1038/s41598-018-22709-8. 2018.

DE OLIVEIRA BENTO, A.; DE SENA COSTA, A. S.; LIMA, S. L.; DO MONTE ALVES, M.; DE AZEVEDO MELO, A. S.; RODRIGUES, A. M.; et al. The spread of cattransmitted sporotrichosis due to *Sporothrix brasiliensis* in Brazil towards the Northeast region. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 15, n. 8, p. e0009693. DOI: 10.1371/journal.pntd.0009693. 2021.

DE OLIVEIRA SANTOS, G. C.; VASCONCELOS, C. C.; LOPES, A. J. O.; DE SOUSA CARTÁGENES, M. D. S.; FILHO, A. K. D. B.; DO NASCIMENTO, F. R. F.; RAMOS, R. M.; PIRES, E. R. R. B.; DE ANDRADE, M. S.; ROCHA, F. M. G.; DE ANDRADE MONTEIRO, C. *Candida* Infections and Therapeutic Strategies: Mechanisms of Action for

Traditional and Alternative Agents. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1351. DOI:10.3389/fmicb.2018.01351. 2018.

DINIZ-NETO, H.; SILVA, S. L.; CORDEIRO, L. V.; SILVA, D. F.; OLIVEIRA, R. F.; ATHAYDE-FILHO, P. F.; OLIVEIRA-FILHO, A. A.; GUERRA, F. Q. S.; LIMA, E. O. Antifungal activity of 2-chloro-N-phenylacetamide: a new molecule with fungicidal and antibiofilm activity against fluconazole-resistant *Candida* spp. **Brazilian Journal of Biology**, v. 84, p. e255080. DOI: 10.1590/1519-6984.255080. 2024.

DO MONTE ALVES, M.; PIPOLO MILAN, E.; DA SILVA-ROCHA, W. P.; SOARES DE SENA DA COSTA, A.; ARAÚJO MACIEL, B.; CAVALCANTE VALE, P. H.; DE ALBUQUERQUE, P. R.; LOPES LIMA, S.; SALLES DE AZEVEDO MELO, A.; MESSIAS RODRIGUES, A.; CHAVES, G. M. Fatal pulmonary sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis* in Northeast Brazil. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 14, n. 5, p. e0008141. DOI: 10.1371/journal.pntd.0008141. 2020.

DOS SANTOS, C. B.; PEREIRA, M. A. T. O USO DE PLANTAS MEDICINAIS DA CAATINGA: As concepções dos moradores da fazenda fagundes em Curaçá – ba. **Revista Científica do UniRios**, v. 1, n. 1, p. 194–225, 2020.

DUARTE, A. P.; LUÍS, Â.; GALLARDO, E. Natural Products: Therapeutic Properties and Beyond II. **Molecules**, v. 27, p. 6140. DOI: 10.3390/molecules27196140. 2022.

EKIERT, H.M.; SZOPA, A. Biological Activities of Natural Products II. **Molecules**, v. 27, p. 1519. DOI: 10.3390/ molecules27051519. 2022.

ESCALANTE, A.; GATTUSO, M.; PÉREZ, P.; ZACCHINO, S. Evidence for the mechanism of action of the antifungal phytolaccoside B isolated from *Phytolacca tetramera* Hauman. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 10, p. 1720–1725. DOI: 10.1021/np070660i. 2008.

ESPINEL-INGROFF, A.; ABREU, D. P. B.; ALMEIDA-PAES, R.; BRILHANTE, R. S. N.; CHAKRABARTI, A.; CHOWDHARY, A.; HAGEN, F.; CÓRDOBA, S.; GONZALEZ, G. M.; GOVENDER, N. P.; GUARRO, J. JOHNSON, E. M.; KIDD, S. E.; PEREIRA, S. A.; RODRIGUES, A., ROZENTAL, S.; SZESZS, M. W.; BALLESTÉ, R. A.; BONIFAZ, A.; BONFIETTI, L. X.; BORBA-SANTOS, L. P.; CAPILLA, J.; COLOMBO, A. L.; DOLANDE, M.; ISLA, M. G.; TURNIDGE J. Multicenter, international study of MIC/MEC distributions for definition of epidemiological cutoff values for *Sporothrix* species identified by molecular methods. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 61, p. e01057-17. DOI: 10.1128/AAC.01057-17. 2017.

ETCHECOPAZ, A.; TOSCANINI, M.A.; GISBERT, A.; MAS, J.; SCARPA, M.; IOVANNITTI, C.A.; BENDEZÚ, K.; NUSBLAT, A.D.; IACHINI, R.; CUESTAS, M.L. *Sporothrix brasiliensis*: A Review of an Emerging South American Fungal Pathogen, Its Related Disease, Presentation and Spread in Argentina. **J. Fungi**, 7, 170. DOI: 10.3390/jof7030170. 2021.

FERNANDES, A.; RODRIGUES, P. M.; PINTADO, M.; TAVARIA, F. K. A systematic review of natural products for skin applications: Targeting inflammation, wound healing, and photo-aging. **Phytomedicine**, v. 115, p. 154824. DOI: 10.1016/j.phymed.2023.154824. 2023.

FICHMAN, V.; ALMEIDA-SILVA, F.; FRANCIS SARAIVA FREITAS, D.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R.M.; GUTIERREZ-GALHARDO, M.C.; ALMEIDA-PAES, R. Severe Sporotrichosis Caused by *Sporothrix brasiliensis*: Antifungal Susceptibility and Clinical Outcomes. **J. Fungi**, v. 9, n. 49. DOI: 10.3390/jof9010049. 2023.

FICHMAN, V.; FREITAS, D.F.S.; DO VALLE, A.C.F.; DE SOUZA, R.V.; CURI, A.L.L.; VALETE-ROSALINO, C.M.; DE MACEDO, P.M.; VARON, A.G.; FIGUEIREDO-CARVALHO, M.H.G.; ALMEIDA-SILVA, F. Severe Sporotrichosis Treated with Amphotericin B: A 20-Year Cohort Study in an Endemic Area of Zoonotic Transmission. **J. Fungi**, 8, 469. DOI: 10.3390/jof8050469. 2022.

FROST, D. J.; BRANDT, K. D.; CUGIER, D.; GOLDMAN, R. A whole-cell *Candida albicans* assay for the detection of inhibitors towards fungal cell wall synthesis and assembly. **The Journal of antibiotics**, v. 48, n. 4, p. 306–310. DOI: 10.7164/antibiotics.48.306. 1995.

GALHARDO, M. C. G.; SILVA, M. T. T.; LIMA, M. A.; NUNES, E. P.; SCHETTINI, L. E.; DE FREITAS, R. F.; PAES, R. A.; NEVES, E. S.; DO VALLE, A. C. *Sporothrix schenckii* meningitis in AIDS during immune reconstitution syndrome. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry**, v. 81, p. 696–699. DOI: 10.1136/jnnp.2009.173187. 2010.

GARCÍA-CARNERO, L. C.; MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, J. A. Virulence Factors of *Sporothrix schenckii*. **J. Fungi**, v. 8, p. 318. DOI: 10.3390/jof8030318. 2022.

GHASEMI, M.; TURNBULL, T.; SEBASTIAN, S.; KEMPSON, I. 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. DOI:10.3390/ijms222312827. 2021.

GÓMEZ-GAVIRIA, M.; MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, J. A.; MORA-MONTES, H. M. Current Progress in *Sporothrix brasiliensis* Basic Aspects. **J. Fungi**, v. 9, p. 533. DOI: 10.3390/jof9050533. 2023.

GREMIÃO, I.D.F.; MARTINS DA SILVA DA ROCHA, E.; MONTENEGRO, H.; CARNEIRO, A. J. B.; XAVIER, M. O.; FARIA M. R.; MONTI, F.; MANSHO, W.; PEREIRA, R. H. M. A.; PEREIRA, S. A.; LOPES-BEZERRA, L. M. Guideline for the management of feline sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis* and literature revision. **Braz J Microbiol**, v. 52, p.107–124. DOI: 10.1007/s42770-020-00365-3. 2021.

GUAN, M.-Q.; YAO, L.; ZHEN, Y.; SONG, Y.; CUI, Y.; LI, S. SHAN. Melanin of *Sporothrix globosa* Affects the Function of THP-1 Macrophages and Modulates the Expression of TLR2 and TLR4. **Microb. Pathog**, v. 159, p. 105158. DOI: 10.1016/j.micpath.2021.105158. 2021.

GUIMARÃES, A. C.; MEIRELES, L. M.; LEMOS, M. F.; GUIMARÃES, M.; ENDRINGER, D. C.; FRONZA, M.; SCHERER, R. Antibacterial activity of terpenes and terpenoids present in essential oils. **Molecules**, v. 24, n. 13. DOI: 10.3390/molecules2413247. 2019.

HALGREN, T. A. Force Fields: MMFF94. **Encyclopedia of Computational Chemistry**. Doi: 10.1002/0470845015.cma012m. 2002.

HANWELL, M. D.; CURTIS, D. E.; LONIE, D. C.; VANDERMEERSCH, T.; ZUREK, E.; HUTCHISON, G. R. Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. **Journal of Cheminformatics**, v. 4, n. 8, p. 1–17. DOI: 10.1186/1758-2946-4-17. 2012.

HRITCU, L.; BOIANGIU, R. S.; DE MORAIS, M. C.; DE SOUSA, D. P. (-)-cis-Carveol, a Natural Compound, Improves β -Amyloid-Peptide 1-42-Induced Memory Impairment and Oxidative Stress in the Rat Hippocampus, **BioMed Research International**, n. 8082560, p. 9. DOI: 10.1155/2020/8082560. 2020.

JUMPER, J.; EVANS, R.; PRITZEL, A.; GREEN, T.; FIGURNOV, M.; RONNEBERGER, O; TUNYASUVUNAKOOL, K.; BATES, R.; ŽÍDEK, A.; POTAPENKO, A.; BRIDGLAND, A.; MEYER, E.; HOHL, S. A. A.; BALLARD, A. J.; COWIE, A.; ROMERA-PAREDES, B.; HASSABIS, D. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. **Nature**, v. 596, p. 583–589. DOI: 10.1038/s41586-021-03819-2. 2021.

KPOVISSI, S.; BERO, J.; AGBANI, P.; GBAGUIDI, F.; KPAGONOU-KPOVISSI, B.; SINSIN, B.; ACCROMBESSI, G.; FRÉDÉRICH, M.; MOUDACHIROU, M.; QUETIN-LECLERCQ, J. Chemical composition, cytotoxicity and in vitro antitrypanosomal and antiplasmodial activity of the essential oils of four *Cymbopogon* species from Benin. **Journal of ethnopharmacology**, v. 151, n. 1, p. 652–659. DOI: 10.1016/j.jep.2013.11.027. 2014.

LIMA, M. A.; FREITAS, D. F. S.; OLIVEIRA, R. V. C.; FICHMAN, V.; VARON, A. G.; FREITAS, A. D.; LAMAS, C. C.; ANDRADE, H. B.; VELOSO, V. G.; ALMEIDA-PAES, R.; ALMEIDA-SILVA, F.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M.; MACEDO, P. M.; VALLE, A. C. F.; SILVA, M. T. T.; ARAÚJO, A. Q. C.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C. Meningeal Sporotrichosis Due to *Sporothrix brasiliensis*: A 21-Year Cohort Study from a Brazilian Reference Center. **J. Fungi**, v. 9, p. 17. DOI: 10.3390/jof9010017. 2023.

LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 46, p 3–26. DOI: 10.1016/s0169-409x(00)00129-0. 2001.

MAGALHÃES, V. C. R.; COLOMBO, S. A.; FREITAS, G. J. C.; MOURA, A. S.; VIEIRA, F. C. L.; LYON, A. C.; AZEVEDO, M. I.; PERES, N. T. A.; SANTOS, D. A. Late diagnosis of disseminated *Sporothrix brasiliensis* infection with bone marrow involvement in an HIV-negative patient. **Pathogens**, v. 11, n. 12, p. 1516. DOI: 10.3390/pathogens11121516. 2022.

MALIK, I.; SHAH, F. A.; ALI, T.; TAN, Z.; ALATTAR, A.; ULLAH, N.; KHAN, A.; ALSHAMAN, R.; LI, S. Potent Natural Antioxidant Carveol Attenuates MCAO-Stress Induced Oxidative, Neurodegeneration by Regulating the Nrf-2 Pathway. **Front Neurosci**. v. 26, n. 14, p. 659. DOI: 10.3389/fnins.2020.00659. 2020.

MARQUES, F. M.; FIGUEIRA, M. M.; SCHMITT, E. F. P.; KONDRTYUK, T. P.; ENDRINGER, D. C.; SCHERER, R.; FRONZA, M. *In vitro* anti-inflammatory activity of terpenes via suppression of superoxide and nitric oxide generation and the NF- κ B signalling pathway. **Inflammopharmacology**, v. 27, n. 2, p. 281-289. DOI: 10.1007/s10787-018-0483-z. 2019.

MATOS, A. M. F.; MOREIRA, L. M.; BARCZEWSKI, B. F.; DE MATOS, L. X.; DE OLIVEIRA, J. B. V.; PIMENTEL, M. I. F.; ALMEIDA-PAES, R.; OLIVEIRA, M. G.; PINTO, T. C. A.; LIMA, N. Identification by MALDI-TOF MS of *Sporothrix brasiliensis* isolated from a subconjunctival infiltrative lesion in an immunocompetent patient. *Microorganisms*, v. 8, n. 22. DOI: 10.3390/microorganisms8010022. 2019.

MEDEIROS, C. I. S. **Avaliação da atividade antifúngica do linalol sobre *Candida albicans* de secreções vulvovaginais.** 2023. 164f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba. 2023.

MONTENEGRO, I.; MELLADO, M.; RUSSO, A.; SAID, B.; BESOAIN, X.; GODOY, P.; WERNER, E.; CARO, N.; MADRID, A.; Carveoylphenols and their antifungal potential against pathogenic yeasts. *Antibiotics (Basel)*, v. 8, n. 4, p.185. DOI: 10.3390/antibiotics8040185. 2019.

MORAES, G. F. Q. **O potencial antimicrobiano do carveol: Uma revisão integrativa.** 2021. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Farmácia) – Universidade Federal de Campina Grande, Paraíba, 2021.

MORRIS, G. M.; HUEY, R.; LINDSTROM, W.; SANNER, M. F.; BELEW, R. K.; GOODSELL, D. S.; OLSON, A. J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. *Journal of computational chemistry*, v. 30, n. 16, p. 2785. DOI: 10.1002/jcc.21256. 2009.

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. DOI: 10.1016/0022-1759(83)90303-4. 1983.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *J. Nat. Prod.*, v. 83, p. 770–803. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.9b01285. 2020

NOGUEIRA, T. S. R.; VIEIRA, M. G. C.; ROBAINA, R. R. S.; BRAZ-FILHO, R.; CONTIJO, D. C.; OLIVEIRA, A. B.; VIEIRA, I. J. C. An update review on monoterpene indole alkaloids and biological activities of *Tabernaemontana* species occurring in Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, p. 117921. DOI: DOI: 10.1016/j.jep.2024.117921. 2024.

ODDS, F. C. Synergy, antagonism, and what the chequerboard puts between them. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 52, n. 1, p. 1–1. DOI: 10.1093/jac/dkg301. 2003.

OLIVEIRA, A. H.; DE OLIVEIRA, G. G.; CARNEVALE NETO, F.; PORTUONDO, D. F.; BATISTA-DUHARTE, A.; CARLOS, I. Z. Anti-inflammatory activity of *Vismia guianensis* (Aubl.) Pers. extracts and antifungal activity against *Sporothrix schenckii*. *Journal of ethnopharmacology*, v. 195, p. 266–274. DOI: 10.1016/j.jep.2016.11.030. 2017.

OROFINO-COSTA, R.; FREITAS, D. F.; BERNARDES-ENGEMANN, A. R.; RODRIGUES, A. M.; TALHARI, C.; FERRAZ, C. E.; VEASEY, J. V.; QUINTELLA, L.; SOUSA, M. S. L. A; VETTORATO, R.; ALMEIDA-PAES, R.; MACEDO, P. M. Human sporotrichosis: Recommendations from the Brazilian Society of Dermatology for the clinical,

diagnostic and therapeutic management. **An Bras Dermatol**, v. 97, n. 757. DOI: 10.1016/j.abd.2022.07.001. 2022.

PAREDES-ROJAS, A.; PALMA-RAMOS, A.; CASTRILLÓN-RIVERA, L. E.; MENDOZA-PÉREZ, F.; NAVARRO-GONZÁLEZ, M. D. C.; ARENAS-GUZMÁN, R.; CASTAÑEDA-SÁNCHEZ, J. I.; LUNA-HERRERA, J. Keratinocyte Response to Infection with *Sporothrix schenckii*. **J. Fungi**, v. 8, p. 437. DOI: 10.3390/jof8050437. 2022.

PIRES, D. E. V.; BLUNDELL, T. L.; ASCHER, D. B. pkCSM: Predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures. **J Med Chem**, v. 58, 4066–4072. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.5b00104. 2015.

POESTER, V.R.; BASSO, R.P.; STEVENS, D.A.; MUNHOZ, L.S.; DE SOUZA RABELLO, V.B.; ALMEIDA-PAES, R.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R.M.; ZANCHI, M.; BENELLI, J.L.; XAVIER, M.O. Treatment of Human Sporotrichosis Caused by *Sporothrix brasiliensis*. **J. Fungi**, v. 8, p. 70. DOI: 10.3390/jof8010070. 2022.

RAFFETIN, A.; COURBIN, V.; JULLIEN, V.; DANNAOUI, E. *In Vitro* Combination of Isavuconazole with Echinocandins against Azole-Susceptible and-Resistant *Aspergillus* spp. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 62, n. 1, p. e01382-17. DOI: 10.1128/AAC.01382-17. 2018.

RAJ, N.; FAKHRI, K. U.; PATHAK, P.; AHMEDI, S.; MANZOOR, N. Monoterpenes as potential antifungal molecules against *Candida* cell membranes: *in-vitro* and *in-silico* studies. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, p. 1-16. DOI: 10.1080/07391102.2023.2294183. 2023.

RODRIGUES, A.M.; DELLA TERRA, P.P.; GREMIÃO, I.D. *et al.* The threat of emerging and re-emerging pathogenic *Sporothrix* species. **Mycopathologia**, v. 185, p. 813–842. DOI: 10.1007/s11046-020-00425-0. 2020.

RODRIGUES, A.M.; GONÇALVES, S.S.; DE CARVALHO, J.A.; BORBA-SANTOS, L.P.; ROZENTAL, S.; CAMARGO, Z.P.d. Current Progress on Epidemiology, Diagnosis, and Treatment of Sporotrichosis and Their Future Trends. **J. Fungi**, v. 8, p. 776. DOI: 10.3390/jof8080776. 2022.

ROSA, M. N.; SILVA, R. L. V.; LONGATO, G. B.; EVANGELISTA, A. F.; GOMES, I. N. F.; ALVES, A. L. V.; OLIVEIRA, B. G.; PINTO, F. E.; ROMÃO, W.; REZENDE, A. R.; ARAÚJO, A. A.; OLIVEIRA, L. S. F. M.; SOUZA, A. A. M.; OLIVEIRA, S. C.; RIBEIRO, R. I. M. A.; SILVA, V. A. O.; REIS, R. M. Bioprospecting of natural compounds from Brazilian Cerrado biome plants in human cervical cancer cell lines. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 7, p. 3383. DOI: 10.3390/ijms22073383. 2021.

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE - PARAÍBA. **Boletim epidemiológico da esporotricose humana – cenário atual do estado da Paraíba**. João Pessoa, 30 nov. 2023. Disponível em: <<https://paraiba.pb.gov.br/diretas/saude/arquivos-1/vigilancia-em-saude/boletim-esporotricose-humana>>. Acesso em: 28 ago. 2024.

SERAFIM, C. A. D. L.; ARARUNA, M. E. C.; ALVES JÚNIOR, E. B.; SILVA, L. M. O.; SILVA, A. O.; DA SILVA, M. S.; ALVES, A. F.; ARAÚJO, A. A.; BATISTA, L. M. (-)

Carveol Prevents Gastric Ulcers via Cytoprotective, Antioxidant, Antisecretory and Immunoregulatory Mechanisms in Animal Models. **Front. Pharmacol.**, v. 12, n. 736829. DOI: 10.3389/fphar.2021.736829. 2021.

SHAFIEI, M.; PEYTON, L.; HASHEMZADEH, M.; FOROUMADI, A. History of the development of antifungal azoles: A review on structures, SAR, and mechanism of action. **Bioorganic Chemistry**, v. 104, p. 104240. DOI: 10.1016/j.bioorg.2020.104240. 2020.

SHIN, S. Anti-Aspergillus activities of plant essential oils and their combination effects with ketoconazole or amphotericin B. **Archives of Pharmacal Research**, v. 26, n. 5, p. 389, 1 maio. DOI: 10.1007/BF02976696. 2003.

SIDDQUI, Z. N.; FAROOQ, F.; MUSTHAFA, T. M.; AHMAD, A.; KHAN, A. U. Synthesis, characterization and antimicrobial evaluation of novel halopyrazole derivatives. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 17, n. 2, p. 237-243. DOI: 10.1016/j.jscs.2011.03.016. 2013.

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

SILVA, D. F; ALBUQUERQUE, A. C. L. d.; LIMA, E. d. O.; BAEDER, F. M.; LUNA, A. B. H.; RIBEIRO, E. D.; ROCHA, J. F.; SOARES, M. S. M.; COSTA, L. J. d.; RODRIGUES, W. C. d. S. P.; SERRÃO, M. d. C. P. N. ; CARDOSO, A. M. R. ; RAMOS, A. E. ; MAIA, G. L. d. A.; BARBOSA FILHO, J. M.; FRANÇA, F. M. G.; PERUZZO, D. C.; OLIVEIRA FILHO, A. A. d.; KANTOVITZ, K. R. Antimicrobial and anti-adherent potential of the ethanolic extract of Praxelis clematidea (Griseb.) RM King & Robinson on pathogens found in the oral cavity. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 10, p. e9189109237-e9189109237. DOI: 10.33448/rsd-v9i10.9237. 2020.

SILVA NETO, F.; GADELHA, C.; SILVA, L.; PAZOS, N.; SILVA, A.; SILVA, M.; SOUSA, B.; BERNARDES DULGHEROFF, A. C.; GUERRA, F.; MAGALHÃES DA SILVEIRA, V.; OLIVEIRA, M.; LIMA NETO, R. Case Report: Ocular Sporotrichosis-A Seven-Case Series. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 108, n. 6, p. 1109–1114. DOI: 10.4269/ajtmh.22-0501. 2023.

SILVA, R. E. R.; SILVA, A. A.; MORAIS, L. P.; ALMEIDA, N. S.; IRITI, M.; KERNTOPFT, M. R.; MENEZES, I. R. A.; COUTINHO, H. D. M. Relaxant Effect of Monoterpene (−)-Carveol on Isolated Human Umbilical Cord Arteries and the Involvement of Ion Channels. **Molecules**, v. 25, n. 11, p. 2681. DOI:10.3390/molecules25112681. 2020.

SILVA, V. A. O.; ROSA, M. N.; GOMES, I. N. F.; VITAL, P. S.; ALVES, A. L. V.; EVANGELISTA, A. F.; LONGATO, G. B.; CARLONI, A. C.; OLIVEIRA, B. G.; PINTO, F. E.; ROMÃO, W.; REZENDE, A. R.; ARAÚJO, A. A.; OLIVEIRA, L. S. F. M.; SOUZA, A. A. M.; OLIVEIRA, S. C.; RIBEIRO, R. I. M. A.; REIS, R. M. Bio-prospecting of Crude Leaf extracts from thirteen plants of Brazilian Cerrado Biome on Human Glioma Cell lines. **Molecules**, v. 28, n. 3, p. 1394. DOI: 10.3390/molecules28031394. 2023.

SOBOLEV, O. V.; AFONINE, P. V.; MORIARTY, N. W.; HEKKELMAN, M. L.; JOOSTEN, R. P.; PERRAKIS, A.; ADAMS, P. D. A Global Ramachandran Score Identifies

Protein Structures with Unlikely Stereochemistry. **Structure**, v. 28, n.11, p. 1249-1258.e2. DOI:10.1016/j.str.2020.08.005. 2020.

SOUZA, J. P. D.; MEDEIROS, C. I. S.; PEREIRA, F. D. O.; GUERRA, F. Q. S.; OLIVEIRA FILHO, A. A. D.; LIMA, E. DE O. Estudo do potencial antifúngico e do mecanismo de ação do timol contra cepas de *Candida parapsilosis* resistentes ao fluconazol e a anfotericina B. **Rev. Ciênc. Méd. Biol.**, v. 19, n. 3, p. 489-494. DOI: 10.9771/cmbio.v19i3.32901. 2020.

TIETEL, Z.; KAHREMANY, S.; COHEN, G.; OGEN-SHTERN, N. Medicinal properties of jojoba (*Simmondsia chinensis*). **Israel Journal of Plant Sciences**, v. 68, p. 38-47. DOI: 10.1163/22238980-bja10023. 2021.

THOMPSON, G. R.; LE, T.; CHINDAMPORN, A.; KAUFFMAN, C. A.; ALASTRUEY-IZQUIERDO, A.; AMPEL, N. M.; ANDES, D. R.; ARMSTRONG-JAMES, D.; AYANLOWO, O.; BADDLEY, J. W. Global Guideline for the Diagnosis and Management of the Endemic Mycoses: An Initiative of the European Confederation of Medical Mycology in Cooperation with the International Society for Human and Animal Mycology. **Lancet Infect. Dis.**, v. 21, p. e364–e374. DOI: 10.1016/S1473-3099(21)00191-2. 2021.

TIRADO-SÁNCHEZ, A.; BONIFAZ, A. Nodular Lymphangitis (Sporotrichoid Lymphocutaneous Infections). Clues to Differential Diagnosis. **Journal of fungi** (Basel, Switzerland), v. 4, n. 2, p. 56. DOI: 10.3390/jof4020056. 2018.

VALERIANO, C. A. T.; FERRAZ, C. E.; OLIVEIRA, M. M. E.; INACIO, C. P.; DE OLIVEIRA, E. P.; LACERDA, A. M. Cat-transmitted disseminated cutaneous sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis* in a new endemic area: Case series in the northeast of Brazil. **JAAD Case Rep.** v. 6, n. 10, p. 988–92. DOI: 10.1016/j.jdcr.2020.07.047. 2020.

VARADI, M. *et al.* AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. **Nucleic acids research**, v. 50, p. D439-D444. DOI:10.1093/nar/gkab1061. 2022.

WALLER, S. B.; LANA, D. F. D.; QUATRIN, P. M.; FERREIRA, M. R. A.; FUENTE.FRIA, A. M.; MEZZARI, A. Antifungal resistance on *Sporothrix* species: an overview. **Braz J Microbiol**, v. 52, p. 73–80. DOI: 10.1007/s42770-020-00307-z. 2021

WALLER, S. B.; RIPOLL, M. K.; GONÇALVES, H. P.; LANA, D. F. D.; FARIA, R. O.; MEIRELES, M. C. A.; FUENTEFRIA, A. M.; MELLO, J. R. B.; CLEFF, M. B. Are γ -terpinene, 1,8-cineole, p-coumaric acid, and quercetin active against wild-type and non-wild-type *Sporothrix brasiliensis* to itraconazole? **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 54, n. 1, p. 531-541. DOI:10.1007/s42770-022-00879-y. 2023.

WALLER, S. B.; RIPOLL, M. K.; MADRID, I. M.; ACUNHA, T.; CLEFF, M. B.; CHAVES, F. C.; MELLO, J. R. B.; FARIA, R. O.; MEIRELES, M. C. A. Susceptibility and resistance of *Sporothrix brasiliensis* to branded and compounded itraconazole formulations. **Braz J Microbiol**, v. 52, p. 155–162. DOI: 10.1007/s42770-020-00280-7. 2020.

WANG, Y. L.; QI, R. Q.; LAN, J.; LI, Z. X.; GAO, X. H. Exogenous Local Hyperthermia at 41°C Is Effective to Eliminate Mouse Model of Sporotrichosis, Independent of Neutrophil

Extracellular Traps Formation. **Annals of dermatology**, v. 33, n. 1, p. 37–45. DOI: 10.5021/ad.2021.33.1.37. 2021.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. First meeting of the who antifungal expert group on identifying priority fungal pathogens - Meeting Report. 2020. Disponível em: < <https://www.who.int/publications/i/item/9789240006355> >. Acesso em: 15 de agosto de 2024.

WINK, M. Evolution of the Angiosperms and Co-evolution of Secondary Metabolites, Especially of Alkaloids. In: Mérillon, JM., Ramawat, K. (eds) Co-Evolution of Secondary Metabolites. Reference Series in **Phytochemistry**. Springer, Cham, p. 151-154. DOI: 10.1007/978-3-319-96397-6_22. 2020.

XAVIER, M. O.; POESTER, V. R.; TRÁPAGA, M. R.; STEVENS, D. A. *Sporothrix brasiliensis*: Epidemiology, Therapy, and Recent Developments. **J. Fungi**, v. 9, n. 921. DOI: 10.3390/jof9090921. 2023.

YAN, A. Prediction of ADME Properties. In: **Applied Chemoinformatics**. [s.l.] Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, p. 333–357. 2018.

ZACCHINO, S. Estratégias para a descoberta de novos agentes antifúngicos. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Ed. Argos, p. 435–479, 2001.

ANEXOS

Anexo 1 – Coautoria em artigo publicado durante mestrado

doi.org/10.1002/cbdv.202301982

Research Article



www.cb.wiley.com

Cytotoxicity and Biological Activities of Geopolis Extract from the Stingless bee (*Melipona scutellaris*) in Isolates of *Staphylococcus aureus*

Maria Gabriella da Silva Albuquerque Borges,^[a] Luanna de Oliveira e Lima,^[b] Ana Caroline Meneses Ferreira Veras,^[b] Rafael Carlos Ferreira,^[c] Danielle da Nóbrega Alves,^[d] Isac Almeida de Medeiros,^[b] Marciane Magnani,^[e] Marianna Vieira Sobral,^[c] Ricardo Dias de Castro,^[d] Saulo Relison Tintino,^[f] Cícera Datiane de Morais Oliveira-Tintino,^[f] Henrique Douglas Melo Coutinho,*^[f] Felipe Queiroga Sarmento Guerra,^[b] Daniela Bomfim de Barros,^[a] and Maria Betânia Melo de Oliveira^[a]

Geopolis resins are produced by stingless bees (*Meliponinae*), developed from the collection of resinous materials, waxes and exudates, from the flora of the region where stingless bees are present, in addition to the addition of clay or earth in its composition. Several biological activities are attributed to Ethanol Extracts of Geopolis (EEGP). The bioactive properties are associated with the complex chemical composition that the samples have. This work aims to evaluate the biological activities of the EEGP, in order to contribute with a natural therapeutic alternative, to face infections, mainly those caused by resistant strains of *Staphylococcus aureus*. The EEGP MIC tests showed antibacterial activity against two strains of *S. aureus*, both at concentrations of 550 µg/mL. The MBC performed with the inhibition values showed that the EEGP has bacteriostatic

activity in both strains. Biofilm inhibition rates exhibited an average value greater than 65% at the highest concentration. The EEGP antioxidant potential test showed good antioxidant activity (IC50) of 11.05 ± 1.55 µg/mL. In the cytotoxicity test against HaCat cells, after 24 hours, EEGP induced cell viability at the three tested concentrations (550 µg/mL: $81.68 \pm 3.79\%$; 1100 µg/mL: $67.10 \pm 3.76\%$; 2200 µg/mL: $67.40 \pm 1.86\%$). In view of the above, the safe use of EEGP from the Brazilian northeast could be proven by the cytotoxicity test, and its use as an antioxidant and antibacterial agent has proven to be effective, as an alternative in combating oxidative stress and microorganisms such as *S. aureus*, which, through the spread and ongoing evolution of drug resistance, generates an active search for effective solutions.

Anexo 2 - Coautoria em artigo publicado durante mestrado



ISSN 1519-6984 (Print)
ISSN 1678-4375 (Online)

Original Article

Antifungal activity of terpenes isolated from the Brazilian Caatinga: a review

Atividade antifúngica de terpenos isolados da caatinga: uma revisão

D. B. Barros^{a*}, N. S. Nascimento^b, A. P. Sousa^c, A. V. Barros^d, Y. W. B. Borges^d, W. M. N. Silva^d, A. B. S. Motta^e, J. E. L. Pinto^f, M. G. V. Sampaio^f, M. F. S. Barbosa^d, M. C. Fonseca^f, L. A. Silva^f, L. O. Lima^f, M. G. S. A. Borges^d, M. B. M. Oliveira^d, M. T. S. Correia^d, L. R. C. Castellano^d, F. Q. S. Guerra^d and M. V. Silva^d

^aUniversidade Federal de Pernambuco – UFPE, Biosciences Center, Post-graduation in Sciences, Recife, PB, Brasil

^bUniversidade de São Paulo – USP, Department of Biochemistry and Pharmaceutical Technology, São Paulo, SP, Brasil

^cUniversidade Federal da Paraíba – UFPB, Department of Physiology and Pathology, João Pessoa, PB, Brasil

^dUniversidade Federal de Pernambuco – UFPE, Department of Biochemistry, Recife, PB, Brasil

^eUniversidade Federal da Paraíba – UFPB, Technical School of Health, Health Sciences Center, João Pessoa, PB, Brasil

^fUniversidade de São Paulo – USP, Post-graduation in immunology, Institute of Biomedical Sciences, São Paulo, SP, Brasil

*Universidade Federal da Paraíba – UFPB, Department of Pharmaceutical Sciences, João Pessoa, PB, Brasil

Abstract

Terpenoids, also named terpenes or isoprenoids, are a family of natural products found in all living organisms. Many plants produce terpenoids as secondary metabolites, and these make up a large part of essential oils. One of most important characteristic is that the compounds are volatile, have odor and can be used in a variety of applications in different industrial segments and traditional medicine. Brazil has a rich and diverse flora that can be used as a source of research for obtaining new molecules. Within the Brazilian flora, it is worth mentioning the Caatinga as an exclusively Brazilian biome where plants adapt to a specific series of weather conditions and therefore become a great storehouse of the terpenoid compounds to be described herein. Fungal infections have become increasingly common, and a great demand for new agents with low toxicity and side effects has thus emerged. Scientists must search for new molecules exhibiting antifungal activity to develop new drugs. This review aims to analyze scientific data from the principal published studies describing the use of terpenes and their biological applications as antifungals.

Keywords: terpenoids, antifungal activity, Brazil, Northeast, essential oils.

Resumo

Os terpenóides, também chamados terpenos ou isoprenóides, são uma família de produtos naturais encontrados em todos os organismos vivos. Muitas plantas são produtoras destes metabólitos secundários, que constituem uma grande parte dos óleos essenciais. Uma das características mais importantes é que os compostos são voláteis, têm odor e podem ser utilizados numa variedade de aplicações em diferentes segmentos industriais ou na medicina tradicional. O Brasil tem uma flora rica e diversificada que pode ser utilizada como fonte de pesquisa para a obtenção de novas moléculas. Dentro desta flora, vale a pena mencionar a Caatinga como um bioma exclusivamente brasileiro que possui plantas adaptadas a uma série de condições climáticas e, portanto, um armazém de compostos a serem descritos. As infecções fúngicas são doenças cada vez mais comuns, devido a isso existe uma grande procura de novos agentes com baixa toxicidade e efeitos secundários. Os cientistas devem procurar novas moléculas que exibam atividade antifúngica para o desenvolvimento de novos medicamentos contra as infecções fúngicas. Esta revisão visa analisar dados científicos dos principais estudos publicados que descrevem o uso de terpenóides e as suas aplicações biológicas como antifungais.

Palavras-chave: terpenóides, atividade antifúngica, Brasil, Nordeste, óleos essenciais.

1. Introduction

The Caatinga's phytogeographic domains are primarily in Brazil's northeast and contain a significant number of native flora species. Plants from the Caatinga, present

a considerable variety of secondary metabolites, phytoconstituents, and essential oils, and have thus stood out in the pharmaceutical industry (Moura et al., 2020).

*e-mail: daniela.bomfim@ufpe.br

Received: January 8, 2023 Accepted: May 10, 2023



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Anexo 3 – Coautoria em artigo publicado durante mestrado



Article

α -Pinene: Docking Study, Cytotoxicity, Mechanism of Action, and Anti-Biofilm Effect against *Candida albicans*

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

- ¹ Department of Biochemistry, Federal University of Pernambuco, Recife 50670-901, PE, Brazil
- ² Department of Pharmaceutical Sciences, Paraíba Federal University, João Pessoa 58051-900, PB, Brazil
- ³ Human Immunology Research and Education Group-GEPIH, Technical School of Health, Federal University of Paraíba, João Pessoa 58051-900, PB, Brazil
- ⁴ Postgraduate Program in Natural Products and Synthetic Bioactive, Federal University of Paraíba, João Pessoa 58051-900, PB, Brazil
- ⁵ University Hospital Julio Muller, Federal University of Mato Grosso, Cuiabá 78060-900, MT, Brazil
- ⁶ Department of Clinical and Social Dentistry, Federal University of Paraíba, João Pessoa 58051-900, PB, Brazil
- ⁷ Cheminformatics Laboratory, Postgraduate Program in Natural Products and Synthetic Bioactive, Quality Management, University Hospital, Federal University of Paraíba, João Pessoa 58051-900, PB, Brazil
- ⁸ 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.)



Citation: Bomfim de Barros, D.; de Oliveira e Lima, L.; Alves da Silva, L.; Cavalcante Fonseca, M.; Ferreira, R.C.; Diniz Neto, H.; da Nóbrega Alves, D.; da Silva Rocha, W.P.; Scotti, L.; de Oliveira Lima, E.; et al. α -Pinene: Docking Study, Cytotoxicity, Mechanism of Action, and Anti-Biofilm Effect against *Candida albicans*. *Antibiotics* **2023**, *12*, 480. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12030480>

Abstract: *Candida albicans* is associated with serious infections in immunocompromised patients. Terpenes are natural-product derivatives, widely studied as antifungal alternatives. In a previous study reported by our group, the antifungal activity of α -pinene against *C. albicans* was verified; α -pinene presented an MIC between 128–512 μ g/mL. In this study, we evaluate time-kill, a mechanism of action using in silico and in vitro tests, anti-biofilm activity against the *Candida albicans*, and toxicity against human cells (HaCaT). Results from the molecular-docking simulation demonstrated that thymidylate synthase ($-52 \text{ kcal mol}^{-1}$), and δ -14-sterol reductase ($-44 \text{ kcal mol}^{-1}$) presented the best interactions. Our in vitro results suggest that α -pinene's antifungal activity involves binding to ergosterol in the cellular membrane. In the time-kill assay, the antifungal activity was not time-dependent, and also inhibited biofilm formation, while rupturing up to 88% of existing biofilm. It was non-cytotoxic to human keratinocytes. Our study supports α -pinene as a candidate to treat fungal infections caused by *C. albicans*.

Anexo 4 – Coautoria em artigo submetido durante mestrado

Manuscript has been submitted - MM-2024-0226 Caixa de entrada x



Medical Mycology <onbehalfof@manuscriptcentral.com>
para camilamendes2314, larissaalvesl2210, mim, barbosa.ufpb, fqsg, guilherme.chaves, wps ▾
04-Sep-2024

qua., 4 de set., 20:23 (há 5 dias)



Dear Soares, Camila Mendes, Silva, Larissa Alves da; Lima, Luanna Oliveira; Barbosa-Filho, José; Guerra, Felipe; Chaves, Guilherme Maranhão; Silva-Rocha, Walicyranison

You have been listed as a co-author on a manuscript submitted to Medical Mycology. The manuscript title is "IN VITRO ACTIVITY OF (-) MYRtenol ON VIRULENCE FACTORS OF Candida albicans ISOLATED FROM THE ORAL CAVITY". If you were not involved in the production of this manuscript, please contact the editorial office at mm.editorialoffice@jeditorial.com. Alternatively, if you are a co-author on this paper you do not have to take any further action.

Thank you for your attention to this matter.

Sincerely,

Editor-in-Chief
Medical Mycology