

**BIOATIVIDADE DE MOLÉCULAS NATURAIS E COMPOSTOS
SINTÉTICOS SOBRE O FUNGO *Sporothrix schenckii***

LUCIANA DA SILVA MATHIAS

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE

DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES / RJ

Abril - 2010

BIOATIVIDADE DE MOLÉCULAS NATURAIS E COMPOSTOS
SINTÉTICOS SOBRE O FUNGO *Sporothrix schenckii*

LUCIANA DA SILVA MATHIAS

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Olney Vieira da Motta

Campos dos Goytacazes – RJ

Abril de 2010

BIOATIVIDADE DE MOLÉCULAS NATURAIS E COMPOSTOS SINTÉTICOS
SOBRE O FUNGO *Sporothrix schenckii*

LUCIANA DA SILVA MATHIAS

Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de mestre em Ciência Animal.

Comissão Examinadora:

Prof. João Carlos de Aquino Almeida (Doutor, Biofísica)- UFRJ

Prof. Eulógio Carlos Queiroz de Carvalho (Doutor em Patologia) – UENF

Profa. Regina Célia de Souza Campos Fernandes (Doutora, Doenças Infecciosas e Parasitárias) – UFRJ

Prof. Olney Vieira da Motta (Doutor, Biociências e Biotecnologia) – UENF

Orientador

Agradeço...

A DEUS, pelo dom da vida e por tornar possível a realização deste trabalho;

À minha mãe Nely pela compreensão e apoio nas horas mais difíceis;

Ao meu orientador Dr. Olney Vieira da Motta por ser um grande incentivador e não medir esforços para a obtenção de bons resultados, mas principalmente por sua dedicação em todos os trabalhos realizados e pela paciência nas horas devidas;

Ao grande amigo e colaborador de sempre Dr. João Carlos de Aquino Almeida pela amizade, gentileza e disponibilidade sempre que foi preciso para realização deste e de outros trabalhos;

Aos demais colaboradores Dr^a Christiane Fernandes, Luis César Passoni, Paulo Miranda por terem cedido seus compostos sintéticos e naturais para serem utilizados neste trabalho;

Aos professores componentes da banca de defesa de dissertação de mestrado: Dr^a Regina Célia de Souza Campos Fernandes, Dr. João Carlos de Aquino Almeida, Dr. Eulógio Carlos Queiroz de Carvalho, Dr. Milton Masahiko Kanashiro e Dr. Carlos Alberto da Rocha Rosa por compartilharem seus conhecimentos e experiências profissionais comigo;

Aos amigos do Laboratório de Sanidade Animal Sheyla “Maria”, Cristiani “Criscouto”, Luize “doida”, Paula “pauleta” João, Fernando Tobias, Marcela, Luis, Hellen e Sara;

Às técnicas do laboratório de Sanidade Animal Gina e Maria de Lourdes e principalmente à auxiliar Sueli Marins pela lavagem das vidrarias;

Às técnicas do Laboratório de Biologia Celular e Tecidual (CBB/LBCT) Giovana Alves de Moraes, Beatriz Ferreira e Márcia Adriana pela grande amizade, carinho e auxílio no preparo das amostras para microscopia;

A todos os funcionários e amigos do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias;

A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro pela concessão do apoio acadêmico e financeiro para esta pesquisa.

SUMÁRIO

	Páginas
Lista de abreviaturas.....	viii
Lista de Quadros.....	x
Lista de Figuras.....	xii
Lista de Gráficos.....	xvi
Resumo.....	xix
Abstract	xxi
I. Introdução.....	1
II. Objetivos.....	3
2.1. Objetivo geral.....	3
2.2. Objetivos específicos.....	3
III. Revisão Bibliográfica.....	4
3.1 <i>Sporothrix schenckii</i>	4
3.2 Esporotricose.....	6
3.3 Aspectos epidemiológicos.....	8
3.4 Manifestações Clínicas.....	11
3.5 Patogenia.....	16
3.6 Diagnóstico para a esporotricose.....	19
3.7 Tratamento para esporotricose.....	22
IV. Compostos sintéticos.....	24
4.1 Compostos de coordenação	24
4.2 Heteropoliácidos (HPAs).....	25
4.3 Extrato bruto e semi-sintético de <i>Hymenaea stigonocarpa</i> “Jatobá”.....	28
V. Material e Métodos.....	31
5.1 Microrganismos.....	31
5.2 Ensaio de inibição do crescimento de <i>S. schenckii</i> por compostos de coordenação em meio líquido.....	32
5.3 Ensaio de inibição do crescimento de <i>S. schenckii</i> por heteropoliácidos (HPAs) em meio de cultura líquido.....	35
5.4 Ensaio de inibição do crescimento de <i>S. schenckii</i> por extratos da	

planta <i>Hymenaea stigonocarpa</i> em meio de cultura líquido.....	36
5.5 Ensaio de inibição do crescimento de <i>S. schenckii</i> pelo teste de difusão em ágar.....	36
5.6 Ensaio de antifungigrama.....	37
5.7 Atividade Hemolítica.....	38
5.8 Microscopia Óptica, Análise Ultraestrutural e de Superfície.....	38
5.8.1 Microscopia Óptica.....	38
5.8.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão e Varredura.....	38
5.9 Análises dos dados.....	40
VI. Resultados e Discussões.....	40
6.1 Atividade hemolítica.....	40
6.2 Curvas de crescimento.....	41
6.3 Ensaio de inibição do crescimento de <i>S. schenckii</i> por sais de Heteropoliácidos em meio líquido.....	42
6.4 Ensaio de inibição do crescimento de <i>S. schenckii</i> pelos compostos de coordenação utilizando os metais zinco (Zn), cobre (Cu) e cobalto (Co) complexados ao ligante HPCINOL.....	49
6.5 Ensaio de inibição do crescimento de <i>S. schenckii</i> pelos compostos de coordenação utilizando o metal cobre (Cu) com os ligantes BMPA, MBPA, BSA, e BSE em meio de cultura líquido.....	57
6.6 Ensaio de inibição do crescimento de <i>S. schenckii</i> pelos extratos brutos e semi-sintéticos extraídos do “jatobá do cerrado” em meio de cultura líquido.....	64
6.7 Inibição do crescimento de <i>S. schenckii</i> por heteropoliácidos em difusão em ágar.....	70
6.8 Inibição do crescimento de <i>S. schenckii</i> por compostos de coordenação utilizando os metais zinco (Zn), cobre (Cu) e cobalto (Co) complexados ao ligante HPCINOL em difusão em ágar.....	76
6.9 Inibição do crescimento de <i>S. Schenckii</i> por compostos de coordenação utilizando o metal cobre (Cu) complexado aos ligantes BMPA, MBPA, BSA e BSE em difusão em ágar.....	81

6.10 Inibição do crescimento de <i>S. schenckii</i> pelos extratos brutos e semi-sintéticos extraídos do “jatobá do cerrado” em difusão em ágar.....	87
6.11 Antifungigrama para os sais de Heteropoliácidos.....	88
6.12 Análise por Microscopia Óptica e Eletrônica	96
6.12.1 Células leveduriformes de <i>S. schenckii</i> tratadas com heteropoliácidos.....	97
6.12.2 Células leveduriformes de <i>S. schenckii</i> tratadas com compostos de coordenação com base zinco, cobre e cobalto complexados ao ligante HPCINOL.....	103
6.12.3 Células leveduriformes de <i>S. schenckii</i> tratadas com compostos de coordenação com base cobre complexado à diferentes ligantes.....	109
6.12.4 Células leveduriformes de <i>S. schenckii</i> tratadas com os extratos brutos e semi-sintéticos de <i>Hymenaea stigonocarpa</i>	116
VII. Conclusões.....	124
VIII. Referências Bibliográficas.....	126

LISTA DE ABREVIATURAS

Ag ₃ [PW ₁₂ O ₄₀]	12- tungstofosfato de Prata
Ag ₃ [PMo ₁₂ O ₄₀]	Dodecamolibdofosfato de Prata
Ag ₆ [SiW ₁₀ V ₂ O ₄₀]	12-tungstosilicato de Prata
Ag ₄ [SiW ₁₂ O ₄₀]	12-tungstosilicato de Prata
AB	Anfotericina B
ANOVA	Análise de variância
BHA	Ágar de Cérebro e Coração
BHI	Infusão de Cérebro e Coração
BMPA	bis-(2-metilpiridil)amina
BSA	2-[piridin-2-ilmetilamino]etanol
BSE	1[(piridin-2-ilmetil)amino]propan-2-ol
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CC	Compostos de coordenação
CoCl	Cloreto de cobalto
Co	Cobalto
CoHPCINOL	Co 1-(bis-piridin-2-ilmetil-amino)-3-cloropropan-2-ol
Cu	Cobre
CuBMPA	Cu bis-(2-metilpiridil)amina
CuBSA	Cu 2-[piridin-2-ilmetilamino]etanol
CuBSE	Cu 1[(piridin-2-ilmetil)amino]propan-2-ol
CuHPCINOL	Cu 1-(bis-piridin-2-ilmetil-amino)-3-cloropropan-2-ol
CuMBPA	Cu (2-hidroxibenzil) (2-piridilmetil) amina
CuCl	Cloreto de cobre
DMSO	Dimetilsulfóxido
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
EP	Extratos de plantas
FLU	Fluconazol
HPA	Heteropoliácido
HPCINOL	1-(bis-piridin-2-ilmetil-amino)-3-cloropropan-2-ol
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana

ICZ.....Itraconazol
IPAs.....Isopoliácidos
IPEC.....Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas
KET.....Ketoconazol
MBPA.....(2-hidroxibenzil) (2-piridilmetil) amina
MHC.....Complexo de Histocompatibilidade Principal
MIC.....Miconazol
POMs.....Polioxometalatos
Th1.....Citocina T helper 1
Th2.....Citocina T helper 2
Zn.....Zinco
ZnCl.....Cloroeto de zinco

LISTA DE QUADROS

	Página
Quadro 1: Halo de inibição de <i>Sporothrix schenckii</i> frente aos HPAs medidos em milímetros.....	71
Quadro 2: Estatística descritiva dos valores dos diâmetros dos halos obtidos no teste de difusão pelos HPAs.....	73
Quadro 3: Análise de variância (ANOVA) referente à estatística descritiva dos valores dos diâmetros dos halos obtidos no teste de difusão em Agar pelos HPAs.....	74
Quadro 4: Testes de comparação múltipla entre as médias referente ao ensaio de difusão em ágar pelos HPAs.....	75
Quadro 5: Halo de inibição de <i>Sporothrix schenckii</i> frente aos compostos de coordenação complexados ao ligante HPCINOL medidos em milímetros.....	76
Quadro 6: Estatística descritiva dos valores dos diâmetros dos halos obtidos pelo teste de difusão em ágar pelos compostos de coordenação complexados ao ligante HPCINOL.....	78
Quadro 7: Análise de variância (ANOVA) referente à estatística descritiva dos valores dos diâmetros dos halos obtidos no teste de difusão pelos compostos de coordenação ZnHPCINOL, CuHPCINOL e CoHPCINOL.....	79
Quadro 8: Testes de comparação múltipla entre as médias referente aos diâmetros dos halos obtidos no teste de difusão pelos compostos de coordenação ZnHPCINOL, CuHPCINOL e CoHPCINOL.....	80
Quadro 9: Média dos halos de inibição de <i>Sporothrix schenckii</i> frente aos compostos de coordenação complexados ao ligante HPCINOL medidos em milímetros.....	81
Quadro 10: Estatística descritiva dos valores dos diâmetros dos halos referente ao teste de difusão em agar com os compostos de coordenação com base cobre complexados a diferentes ligantes.....	83
Quadro 11: Análise de variância (ANOVA) referente à estatística descritiva dos valores dos diâmetros dos halos obtidos no teste de difusão pelos compostos de coordenação referente ao teste de difusão em ágar com os compostos de	

coordenação com base cobre complexados a diferentes ligantes.....	84
Quadro 12: Testes de comparação múltipla entre as médias para as cepas 0198, 0199 e 0205 referente ao teste de difusão em ágar com os compostos de coordenação com base cobre complexados a diferentes ligantes.....	85
Quadro 13: Testes de comparação múltipla entre as médias para as cepas 0206 e clínica LSA01 referente ao teste de difusão em ágar com os compostos de coordenação com base cobre complexados a diferentes ligantes.....	86
Quadro 14: Avaliação do efeito sinérgico entre drogas antifúngicas e os compostos sintéticos (HPAs) pela medida em milímetros dos halos de inibição.....	89

LISTA DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1: Fases de crescimento do fungo <i>Sporothrix schenckii</i>	5
Figura 2: Formas de apresentação da esporotricose em animais.....	7
Figura 3: Esporotricose cutânea disseminada em paciente HIV-positivo.....	9
Figura 4: Apresentação clínica da esporotricose em humanos.....	13
Figura 5: Esporotricose em cães.....	14
Figura 6: Esporotricose eqüina.....	15
Figura 7: Estrutura de Keggin dos heteropoliácidos.....	26
Figura 8: Árvore e frutos de <i>Hymenaea stigonocarpa</i>	24
Figura 8: Fórmula estrutural dos compostos de coordenação testados frente à <i>S.schenckii</i>	34
Figura 9: Teste de hemólise por difusão em ágar.	48
Figura 10: Crescimento de <i>S. schenckii</i> (cepa 0199) em ágar BHA a 37°C após 22 dias de tratamento com os HPAs.....	48
Figura 11: Crescimento de <i>S. schenckii</i> (cepa 0199) em ágar BHA a 37°C após 20 dias de tratamento com os compostos de coordenação com o ligante HPCINOL.....	56
Figura 12: Crescimento de <i>S. schenckii</i> (cepa 0199) em ágar BHA a 37°C após 23 dias de tratamento com CC com base cobre com os ligantes BMPA, MBPA, BSA e BSE.....	63
Figura 13: Difusão das substâncias em ágar mostrando o grau de sensibilidade de <i>S. schenckii</i> aos compostos sintéticos HPAs.....	72
Figura 14: Difusão das substâncias em ágar mostrando o grau de sensibilidade de <i>S. schenckii</i> aos compostos de coordenação com base zinco, cobre e cobalto complexados ao ligante HPCINOL.....	77
Figura 15: Difusão das substâncias em ágar mostrando o grau de sensibilidade de células leveduriformes de <i>S. schenckii</i> aos compostos de coordenação com base cobre complexados aos ligantes BMPA, MBPA, BSA e BSE.....	82
Figura 16: Difusão das substâncias em ágar mostrando a falta de sensibilidade de células leveduriformes de <i>S. schenckii</i> (cepa 0199) aos extratos brutos e semi-sintéticos extraídos do “jatobá do cerrado”	87

Figura 17: Difusão das substâncias em ágar mostrando a falta de sensibilidade de células leveduriformes de <i>S. schenckii</i> (cepa clínica) aos extratos brutos e semi-sintéticos extraídos do “jatobá do cerrado”	88
Figura 18: Ensaio de antifungigrama para avaliação de sinergismo do Itraconazol na presença dos HPAs.....	90
Figura 19: Ensaio de antifungigrama para avaliação de sinergismo da Anfotericina B na presença dos HPAs.....	91
Figura 20: Ensaio de antifungigrama para avaliação de sinergismo do Cetoconazol na presença dos HPAs.....	92
Figura 21: Ensaio de antifungigrama para avaliação de sinergismo do Fluconazol na presença dos HPAs.....	93
Figura 22: Ensaio de antifungigrama para avaliação de sinergismo do Miconazol na presença dos HPAs.....	94
Figura 23: Microscopia óptica de células leveduriformes do fungo <i>S. schenckii</i> após tratamentos com sais de HPAs.....	97
Figura 24: Micrografias Eletrônicas de Varredura de células leveduriformes do fungo <i>S.schenckii</i> (cepa 0198) tratadas com sais de HPAs.....	99
Figura 25: Micrografias eletrônicas de transmissão de células leveduriformes de <i>S. schenckii</i> (cepa 0198) tratadas com sais de HPAs.....	102
Figura 26: Microscopia óptica de células leveduriformes do fungo <i>S. schenckii</i> após tratamentos com compostos de coordenação com base zinco, cobre e cobalto complexados ao ligante HPCINOL.....	104
Figura 27: Micrografias Eletrônicas de Varredura de células leveduriformes do fungo <i>S.schenckii</i> (cepa 0198) tratadas ou não com compostos de coordenação com base zinco, cobre e cobalto complexados ao ligante HPCINOL.....	105
Figura 28: Micrografias eletrônicas de transmissão de células leveduriformes de <i>S. schenckii</i> (cepa 0198) tratadas ou não com compostos de coordenação com base zinco, cobre e cobalto complexados ao ligante HPCINOL.....	108
Figura 29: Microscopia óptica de células leveduriformes do fungo <i>S. schenckii</i> (cepa 0198) após tratamentos com compostos de coordenação com base cobre complexados a diferentes ligantes.....	110
Figura 30: Micrografias Eletrônicas de Varredura de células leveduriformes do	

fungo <i>S.schenckii</i> (cepa 0198) após tratamentos com compostos de coordenação com base cobre complexados a diferentes ligantes.....	112
Figura 31: Micrografia eletrônica de transmissão de células leveduriformes de <i>S. schenckii</i> (cepa 0198) após tratamentos com compostos de coordenação com base cobre complexados a diferentes ligantes.....	115
Figura 32: Microscopia óptica de células leveduriformes do fungo <i>S. schenckii</i> após tratamentos com extratos de plantas.....	116
Figura 33: Micrografias Eletrônicas de Varredura de células leveduriformes do fungo <i>S.schenckii</i> (cepa 0198) após tratamentos com extratos de plantas.....	119
Figura 34: Micrografia eletrônica de transmissão de conídios albinos após tratamento com scytalone.....	122
Figura 35: Micrografias eletrônicas de transmissão de células leveduriformes de <i>S. schenckii</i> (cepa 0198) após tratamentos com extratos de plantas.....	123

LISTA DE GRÁFICOS

	Página
Gráfico 1: Curva de crescimento de células leveduriformes de <i>S. schenckii</i> (cepa 0198) na presença de heteropoliácidos cultivados em caldo BHI.....	43
Gráfico 2: Curva de crescimento de células leveduriformes de <i>S. schenckii</i> (cepa 0199) na presença de heteropoliácidos cultivados em caldo BHI.....	44
Gráfico 3: Curva de crescimento de células leveduriformes de <i>S. schenckii</i> (cepa 0205) na presença de heteropoliácidos cultivados em caldo BHI.....	45
Gráfico 4: Curva de crescimento de células leveduriformes de <i>S. schenckii</i> (cepa 0206) na presença de heteropoliácidos cultivados em caldo BHI.....	46
Gráfico 5: Curva de crescimento de células leveduriformes de <i>S. schenckii</i> (cepa clínica) na presença de heteropoliácidos cultivados em caldo BHI.....	47
Gráfico 6: Percentual de inibição dos HPAs sobre as cepas 0198,0199,0205,0206 e clínica de <i>S. schenckii</i>	48
Gráfico 7: Curva de crescimento de células leveduriformes de <i>S. schenckii</i> (cepa 0198) na presença dos compostos de coordenação (HPCINOL) cultivados em caldo BHI.....	51
Gráfico 8: Curva de crescimento de células leveduriformes de <i>S. schenckii</i> (cepa 0199) na presença dos compostos de coordenação (HPCINOL) cultivados em caldo BHI.....	52
Gráfico 9: Curva de crescimento de células leveduriformes de <i>S. schenckii</i> (cepa 0205) na presença dos compostos de coordenação (HPCINOL) cultivados em caldo BHI.....	53
Gráfico 10: Curva de crescimento de células leveduriformes de <i>S. schenckii</i> (cepa 0206) na presença dos compostos de coordenação cultivados em caldo BHI.....	54
Gráfico 11: Curva de crescimento de células leveduriformes de <i>S. schenckii</i> (cepa clínica) na presença dos compostos de coordenação cultivados em caldo BHI.....	55
Gráfico 12: Percentual de inibição dos compostos de coordenação com o ligante HPCINOL complexado aos metais zinco, cobre e cobalto sobre as cepas de <i>S. schenckii</i>	56
Gráfico 13: Curva de crescimento de células leveduriformes de <i>S. schenckii</i> (cepa	

0198) na presença dos compostos de coordenação CuBMPA, CuMBPA, CuBSA, e CuBSE cultivados em caldo BHI.....	58
Gráfico 14: Curva de crescimento de células leveduriformes de <i>S. schenckii</i> (cepa 0199) na presença dos compostos de coordenação CuBMPA, CuMBPA, CuBSA, e CuBSE cultivados em caldo BHI.....	59
Gráfico 15: Curva de crescimento de células leveduriformes de <i>S. schenckii</i> (cepa 0205) na presença dos compostos de coordenação CuBMPA, CuMBPA, CuBSA, e CuBSE cultivados em caldo BHI.....	60
Gráfico 16: Curva de crescimento de células leveduriformes de <i>S. schenckii</i> (cepa 0206) na presença dos compostos de coordenação CuBMPA, CuMBPA, CuBSA, e CuBSE cultivados em caldo BHI.....	61
Gráfico 17: Curva de crescimento de células leveduriformes de <i>S. schenckii</i> (cepa clínica) na presença dos compostos de coordenação CuBMPA, CuMBPA, CuBSA, e CuBSE cultivados em caldo BHI.....	62
Gráfico 18: Percentual de inibição dos compostos de coordenação com base cobre e diferentes ligantes: CuBMPA, CuMBPA, CuBSA, e CuBSE cultivados em caldo BHI sobre as células leveduriformes de <i>S. schenckii</i>	63
Gráfico 19: Curva de crescimento de células leveduriformes de <i>S. schenckii</i> (cepa 0198) na presença dos extratos brutos e semi-sintéticos isolados do “Jatobá”) cultivados em caldo BHI.....	65
Gráfico 20: Curva de crescimento de células leveduriformes de <i>S. schenckii</i> (cepa 0199) na presença dos extratos brutos e semi-sintéticos isolados do “Jatobá”) cultivados em caldo BHI.....	66
Gráfico 21: Curva de crescimento de células leveduriformes de <i>S. schenckii</i> (cepa 0205) na presença dos extratos brutos e semi-sintéticos isolados do “Jatobá”) cultivados em caldo.....	67
Gráfico 22: Curva de crescimento de células leveduriformes de <i>S. schenckii</i> (cepa 0206) na presença dos extratos brutos e semi-sintéticos isolados do “Jatobá”) cultivados em caldo BHI.....	68
Gráfico 23: Curva de crescimento de células leveduriformes de <i>S. schenckii</i> (cepa clínica LSA01) na presença dos extratos brutos e semi-sintéticos isolados do “Jatobá”) cultivados em caldo BHI.....	69

Gráfico 24: Percentual de inibição dos extratos brutos e derivados semi-sintéticos do “Jatobá” sobre as células leveduriformes de *S. schenckii*.....70

RESUMO

MATHIAS, Luciana da Silva. Bioatividade de moléculas naturais e compostos sintéticos sobre o fungo *Sporothrix schenckii*. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Fevereiro de 2010;

A esporotricose é uma micose causada pelo fungo dimórfico *Sporothrix schenckii*, causador de infecções em animais e humanos. A pressão do uso de drogas exercida sobre os fungos pode favorecer o aparecimento de resistência entre cepas na natureza conseqüentemente em hospedeiros infectados. Sendo assim, a necessidade de desenvolvimento de novas alternativas para o tratamento das doenças fúngicas é uma realidade, especialmente com o crescimento do número de animais de companhia. Os felinos são os animais mais afetados pela esporotricose e representam um risco à saúde humana, pois a doença é classificada como zoonose. O efeito inibitório, *in vitro*, de moléculas sintéticas como compostos de coordenação (CC) (0,22mg/mL) e heteropoliácidos (HPA) (0,28µM/mL) e extratos da planta (EP) *Hymenaea stigonocarpa* “Jatobá” (500mg/mL) foram testados sobre o fungo *Sporothrix schenckii* usando diferentes abordagens. Todos os produtos foram testados em caldo BHI para avaliar o crescimento leveduriforme a 37°C por no máximo 22 dias de incubação. Culturas foram avaliadas por fotometria. A atividade dos produtos também foi testada pelos métodos de difusão em ágar e antifungigrama e as zonas de inibição foram medidas e comparadas com os antifúngicos usados como controles positivos. As características ultra-estruturais de células leveduriformes de *S. schenckii* foram observadas por microscopia eletrônica de transmissão e varredura após cada tratamento e os resultados mostraram alterações na parede celular, intensa vacuolização e deposição de grânulos no entorno da parede celular das células tratadas. Os dados obtidos sugerem o uso potencial dessas substâncias no futuro para o tratamento de animais afetados pelo fungo *S. schenckii*.

Palavras-chave: *Sporothrix schenckii*, esporotricose, inibição, heteropoliácidos, compostos de coordenação, extratos de plantas e microscopia eletrônica.

ABSTRACT

MATHIAS, Luciana da Silva. Bioactivity of unconventional compounds towards *Sporothrix schenckii*. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. February, 2010.

Sporothricosis is a disease caused by the dimorphic fungus *Sporothrix schenckii* that causes mycosis in animals and humans. The use and pressure of drugs on fungi may favor the resistance phenomenon among strains in nature and hosts infected. Thus, the necessity for the development of alternatives of treatment against fungi diseases is a reality, especially with the increased number of pets. Among animals, felines are the most affected by sporothricosis and represent a risk to human health as the disease is classified as a zoonosis. The in vitro effect of synthetic molecules such as coordination compounds (0,22mg/mL) and heteropolyacids (0,28µM/mL) and plant's extract of *Hymenaea stygonocarpa* "Jatoba" (55mg/mL) was tested on *S. schenckii* using different approaches. All products were tested in broth heart infusion (BHI) to evaluate the yeast growth at 37 °C for a maximum period of 22 days incubation. The activity of the products was also tested by agar diffusion and antifungigrams methods by measuring inhibition zones and compared to commercial drugs used as positive controls. Synergistic effect of heteropolyacids and antifungal drugs was evaluated in solid media. The ultrastructural characteristics of yeast-like phase *S. schenckii* cells were observed by scanning and transmission electronic microscopy after treatment and the results showed cell wall alteration, vacuolization intense and deposit of granules around cell wall of treated cells. Altogether, these results suggest the potential use of these substances in the future for treatment of animals affected by fungus *S. schenckii*.

Key-words: *Sporothrix schenckii*, sporothricosis, inhibition, Heteropolyacids, coordination compounds, plant extract and electronic microscopy.

1- INTRODUÇÃO

Sporothrix schenckii é um fungo dimórfico, agente causador da esporotricose, uma micose subcutânea que pode acometer o homem, animais domésticos e animais silvestres. Descrita em 1898 por Schenck nos Estados Unidos após isolamento do agente e renomeada em 1900 por Henkton e Perkins com o nome de *Sporothrix schenckii*. A doença apresenta distribuição mundial, sendo considerada endêmica principalmente nas regiões tropicais e subtropicais.

Esta micose que até a década de 90 era considerada uma doença de caráter ocupacional, ocorrendo somente em trabalhadores que tinham contato direto com material vegetal contaminado ou através do atendimento dos animais infectados por médicos veterinários, hoje a esporotricose está enquadrada entre as doenças emergentes do estado do Rio de Janeiro e considerada endêmica na baixada fluminense. Nos últimos anos sua transmissão ocorreu mais freqüentemente pela espécie felina (*Felis silvestris catus*), em que o agente é transmitido por arranhões, mordidas ou contato diretamente com as lesões dos felinos que são ricas nas formas leveduriformes do fungo, o que garante a esta espécie um importante papel na epidemiologia desta micose e fonte de infecção em relação a outros animais e aos seres humanos. A infecção também pode ocorrer através da forma filamentosa quando conídios do fungo são inalados pelo hospedeiro, desenvolvendo desta forma, a esporotricose pulmonar ou disseminada. Raramente há a disseminação para os ossos e órgãos internos (Nunes & Escosteguy, 2005).

A esporotricose nos animais produz lesões do tipo cutânea fixa, pelo fato do fungo permanecer no local onde foi inoculado e do tipo pulmonar ou sistêmica, enquanto que nos humanos ela se manifesta nas formas linfocutânea e extracutânea, onde o fungo se espalha pelos linfonodos ou hematogenicamente levando ao quadro clínico multifocal ou difuso.

O fungo se apresenta à temperatura ambiente na forma micelial e é considerado sapróbio de cascas de árvores e de solos ricos em matéria orgânica. Sua forma parasitária ocorre quando há a transformação para a forma leveduriforme à temperatura do corpo humano, 37°C, podendo crescer dessa

forma, em lesões dermo-epidérmicas, viscerais e ósseas. Nesta temperatura o fungo se reproduz por brotamento, não formam conídios e suas células podem medir de 4 a 6 μm de diâmetro com formatos ovalados ou em formas de “charuto” (Carlos et al., 2009).

Eqüinos e caninos, apesar de ser raro, também podem adquirir a doença e transmiti-la ao homem e a outros animais. Como a esporotricose é considerada uma doença ocupacional, os profissionais relacionados à clínica de pequenos animais, floristas, jardineiros e fazendeiros devem ficar alertas quanto à existência da doença e às formas de transmissão durante a manipulação de animais infectados e/ou sadios, assim como ambientes propensos à contaminação pela forma filamentosa do fungo como campos, jardins ou florestas.

Pelo fato das micoses zoonóticas terem adquirido grande importância nos últimos anos devido ao crescente convívio de animais de estimação com o homem, novas perspectivas de estudo que envolvem a descoberta de novos agentes antifúngicos estão em pauta, principalmente devido ao desenvolvimento de resistência pelos microrganismos frente aos antifúngicos existentes e a ocorrência de intoxicação pelo uso prolongado das drogas.

2- OBJETIVOS

2.1 Geral

Observar a atividade de produtos sintéticos e moléculas naturais sobre a forma leveduriforme do fungo *S. schenckii* e possíveis modificações sobre as estruturas externas e internas deste microrganismo após os tratamentos.

2.2 Específicos

2.2.1 Testar o efeito *in vitro* dos compostos de coordenação sintetizados com diferentes metais (Zn, Cu e Co) e ligantes sobre o fungo dimórfico *S. schenckii*;

2.2.2 Testar o efeito *in vitro* dos sais de heteropoliácidos (HPAs) $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_6[\text{SiW}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]$ e $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$ sobre o fungo dimórfico *S. schenckii*;

2.2.3 Testar o efeito *in vitro* de extratos brutos e semi-sintéticos extraídos do epicarpo (casca do fruto) da planta *Hymenaea stigonocarpa* sobre o fungo dimórfico *S. schenckii*;

2.2.4 Descrever por microscopia eletrônica as possíveis alterações ultra-estruturais das células fúngicas após os tratamentos com os compostos *in vitro*;

2.2.5 Avaliar pelo ensaio de antifungigrama possíveis efeitos sinérgicos entre os sais de heteropoliácidos e diferentes antifúngicos.

3- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 *Sporothrix schenckii*

Reino *Fungi*

Divisão *Eumycota*

Subdivisão *Deuteromycotina*

Subfilo *Ascomycota*

Classe *Hyphomycetes*

Ordem *Moniliales*

Família *Moniliaceae*

Gênero *Sporothrix*

Espécie *Sporothrix schenckii*

Sporothrix schenckii é um fungo termalmente dimórfico, que segundo Lacaz e colaboradores (1998) é a única espécie do gênero *Sporothrix* patogênico para homens e animais. Recentemente tem sido demonstrado, através de técnicas moleculares como eletroforese em gel (SDS-PAGE) e reação de amplificação aleatória de DNA polimórfico, que *S. schenckii* faz parte de um complexo de pelo menos seis espécies filogenéticas devido à sua grande variabilidade genética (Fernandes et al., 2009a; Fernandes et al., 2009b; Marimon et al, 2007; Marimon et al, 2006). Estas novas espécies foram classificadas fenotipicamente por Marimon e colaboradores (2007) baseadas na análise da seqüência dos genes de três proteínas (quitina sintase, β -tubulina e calmodulina) e pelo uso de diferentes meios de cultura e temperatura e testes nutricionais. Entre as novas espécies consideradas patogênicas pelo grupo de pesquisadores estão *Sporothrix brasiliensis* encontrada somente no Brasil, *S. mexicana* e *S. globosa* (Marimon et al, 2007).

O fungo quando cultivado em Brain Heart Agar (Acumedia, EUA) a 37°C apresenta-se na forma de leveduras, com forma alongada assemelhando-se a um “charuto” e com brotamentos, medindo de 4 a 6 μ m de diâmetro (Figura 1 D e E).

Nesta fase as colônias possuem coloração creme e textura enrugada com certo endurecimento.

O crescimento à temperatura entre 25 e 30°C o fungo cresce na forma micelial apresentando hifas finas, septadas e delicadas com conídios isolados ou agrupados nas extremidades dos conidióforos adquirindo, na maioria das vezes, um formato de “pétalas de flor” (figura 1C) (Know-Chung & Bennet, 1992; Jungerman & Schwartzman, 1972). Macroscopicamente as colônias filamentosas apresentam no início uma coloração esbranquiçada que com o amadurecimento podem se tornar pigmentadas devido à produção do pigmento melanina (figura 1A e B). Segundo Know-Chung & Bennet (1992), conídios formados com crescimento de 10 a 12 dias possuem maior virulência do que aqueles crescidos entre 4 e 7 dias.

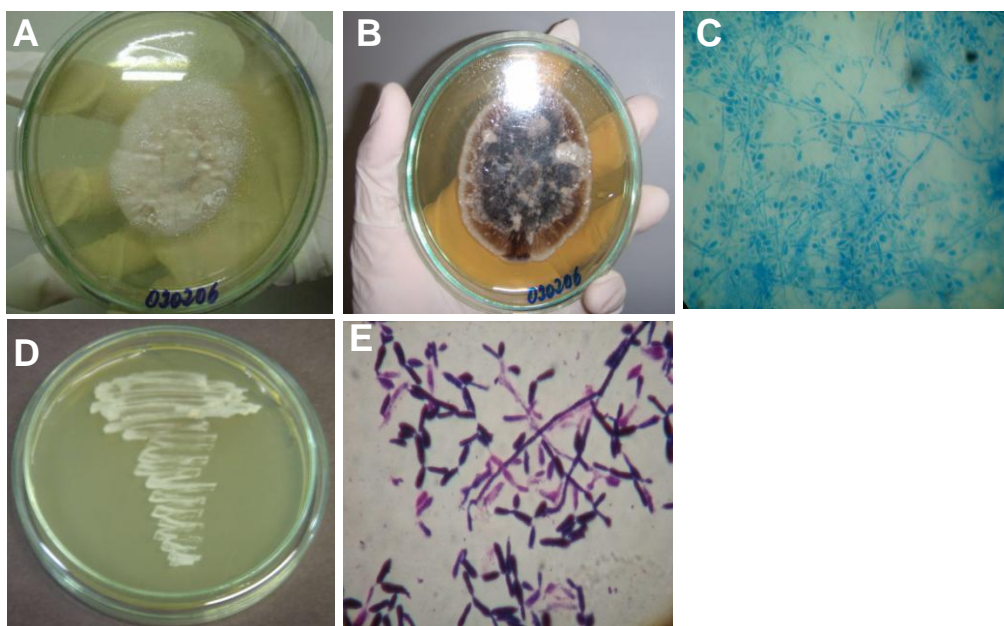


Figura 1: Fases de crescimento do fungo *S. schenckii*. (A) Fase micelial ou filamentososa nos primeiros dias de crescimento a 30°C em Agar Sabouraud dextrose mostrando colônias esbranquiçadas; (B) Fase filamentososa após 35 dias de crescimento a 30°C mostrando colônias pigmentadas; (C) Microscopia óptica do crescimento filamentosos corado com azul de algodão mostrando delicadas hifas septadas com conidióforos na forma de “pétalas de flor” (aumento 1000X); (D) Crescimento na fase leveduriforme a 37°C em Agar Brain Heart (BHA) e (E) Microscopia óptica de células leveduriformes coradas pelo método de gram mostrando células alongadas em forma de “charuto”. (Arquivo pessoal).

3.2 Esporotricose

A esporotricose é uma micose subcutânea de caráter agudo ou crônico causada pelo fungo saprofítico, dimórfico, *Sporothrix schenckii* (Coetzer et al., 1994; Schubach et al. 2001), que pode comprometer o sistema linfático e se disseminar pelo organismo em hospedeiros imunocomprometidos. O fungo pode infectar muitas espécies animais, incluindo os humanos. A transmissão da esporotricose ao homem pode ocorrer por meio de arranhões, mordidas ou até mesmo por contato com soluções cutâneas preexistentes e os aspectos clínicos em humanos diferem daqueles observados em felinos, além da abordagem terapêutica utilizada (Marques et al., 1993).

As lesões mais freqüentes da esporotricose se manifestam clinicamente de forma superficial ou cutânea, podendo ainda se manifestar na forma subcutânea disseminada pelos vasos linfáticos (Kauffman, 1999) (figura 2A e B). Contudo, a esporotricose pode apresentar-se na forma disseminada manifestada como doença pulmonar após a inalação do fungo, que se alojará nos pulmões dos hospedeiros predispostos (figura 2D), desta forma disseminando-se no organismo em articulações, ossos e sistema nervoso central (Kwon-Chung & Bennet, 1992). Nos felinos a lesão no espelho nasal é conhecida vulgarmente como nariz de palhaço (figura 2C), que auxilia o veterinário no momento do diagnóstico.

Acredita-se que a micose seja adquirida em várias situações e ambientes abertos, ou ainda, como doença ocupacional, no caso de fazendeiros, floristas, jardineiros, entre outros, nos quais após algum tipo de trauma ocorre a penetração do fungo na pele do indivíduo devido ao contato com o material contaminado (Kwon-Chung & Bennet, 1992; Larsson, 2000). Um caso de esporotricose humana na região da laringe foi relatado, em um fazendeiro americano, sob tratamento prolongado de corticóides, provavelmente após inalação de conídios do fungo no ambiente de trabalho (Torrealba et al., 2005).



Figura 2: Formas de apresentação da esporotricose em animais: (A) Esporotricose cutânea em um cão mostrando lesão nasal; (B) Forma cutânea com disseminação facial em felino; (C) Felino apresentando forma cutânea com lesões úlcero-crostosas; (D) Forma sistêmica com presença de granulomas (pontos claros indicados pelas setas) no órgão (pulmão) afetado de um felino. (Arquivo pessoal).

Devido ao aumento de relatos de transmissão do felino ao homem, a classe veterinária está entre as categorias profissionais de risco para a doença esporotricose (Kauffman, 1999; Schubach et al. 2001). Esta micose foi enquadrada na categoria de doenças emergentes causadas por fungos, especialmente em pacientes imunodeprimidos, com quadros clínicos variando de doença superficial a sistêmica, envolvendo diferentes partes do organismo humano (Al-Tawfic & Wools, 1998). A esporotricose em indivíduos com AIDS pode se disseminar para órgãos e sistemas levando ao desenvolvimento de formas exóticas da doença (Vilela et al., 2007; Wroblewska et al. 2005, Carvalho et al, 2002; Neto et al., 1999).

3.3 Aspectos epidemiológicos

A esporotricose ocorre mundialmente em locais de clima quente e úmido, logo a temperatura apresenta forte influência sobre o desenvolvimento de *S. schenckii*, fato este observado pela distribuição dos casos de esporotricose onde se verifica a maior frequência em regiões tropicais e subtropicais (Santos et al., 2005; Wroblewska et al., 2005; Sampaio & Rivitti, 2000; Schubach & Schubach 2000). O fungo *S. schenckii* é saprófita, onipresente no solo, vegetação e florestas que dispõem de condições favoráveis de umidade e temperatura para seu crescimento e manutenção do seu ciclo de vida (Kwon-Chung & Bennet, 1992; Conti-Diaz, 1989), sem predileção por alguma planta ou vegetação (Brum et al., 2007). Segundo Conti-Diaz (1989), o fungo é encontrado principalmente em gravetos vegetais, musgos, ninhos e tocas de animais. Um caso de esporotricose disseminada foi descrito em um homem de 31 anos de idade, HIV positivo, infectado durante o cultivo da mini árvore “bonsai” (Dong et al, 1995). A ocorrência desta micose pode depender de desequilíbrios ambientais ou até mesmo pela ação antrópica, que desequilibra o ambiente natural desencadeando variações que irão interferir na relação solo-hospedeiro resultando em surtos esporádicos e variações na epidemiologia (Londero & Ramos, 1998).

Várias espécies de animais podem ser afetadas pelo fungo *S. schenckii*, embora a transmissão para os humanos seja considerada uma ocorrência rara. Dentre os animais acometidos estão os eqüinos, cães, felinos, tatus, camelos e chimpanzés (Marques et al 1993). O fungo tem sido isolado de palhas, cascas de árvores, espinhos, frutas, teias de aranhas, poeira, insetos mortos, larvas, fezes de animais, algas e animais marinhos (Meinerz et al., 2007; Ramos et al., 2007; Xavier et al., 2004; Rivitti & Aoki, 1999). Pode atingir pessoas de qualquer idade, sexo e raça, mas a doença é mais relatada no sexo masculino, provavelmente devido à exposição ao agente de acordo com área de atuação profissional. Entre as classes de trabalhadores acometidos estão fazendeiros, floricultores, produtores de papel, mineradores, trabalhadores de laboratório, médicos veterinários, estudantes de medicina veterinária, dentre outros (Carlos et al., 2009). Em 2007, Meinerz e colaboradores descreveram um caso de esporotricose cutânea com linfangite ascendente em um trabalhador rural contaminado após ter

sido arranhado por um felino de vida livre assintomático, ressaltando a importância do felino doméstico como carreador do agente para a esporotricose. Em 2009, Tlougan e colaboradores relataram um caso de esporotricose neonatal com lesão cutânea fixa na face, mostrando que as crianças são tão suscetíveis à doença quanto os adultos, apresentando o mesmo padrão de manifestações clínicas (figura 3).



Figura 3: Apresentação clínica da esporotricose em humanos: (A e B) Forma cutânea fixa com lesões crostosas em adultos e em crianças, respectivamente (Bonifaz et al., 2007; Tlougan et al., 2009); (C) Forma cutâneo-linfática com lesões ulceradas (Da Rosa et al., 2005).

A doença é endêmica em algumas áreas do México, Costa Rica, Guatemala, Peru, Colômbia, Brasil, Uruguai, Sul da África, Índia e Japão (Fernandes et al., 2009; Agarwal et al., 2008; Barros et al., 2004; Bustamante & Campos, 2001). Em 2008, Argawal e colaboradores descreveram nove casos de esporotricose cutânea na região norte-ocidental da Índia em homens e mulheres com idade entre 18 e 62 anos. Na Europa há relatos em quase todos os países e no Brasil a forma mais freqüente da doença é a subcutânea (Costa et al., 1994) com maior incidência nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Espírito Santo e Rio Grande do Sul (Fernandes et al., 2009a)

No Brasil, a esporotricose foi reportada desde 1907 por Lutz e Splendore, nos estados de São Paulo e Rio Grande do Sul (Freitas et al., 1965, Lopes et al., 1999). Vários autores citaram a ocorrência de surtos de esporotricose envolvendo grandes áreas geográficas e número de casos, normalmente provenientes de uma forma comum de contaminação no ambiente (Dixon et al., 1991). Entre 1998

e 2004, o Centro de Pesquisa Evandro Chagas, Rio de Janeiro/Brasil, confirmou o diagnóstico para a esporotricose em 1503 gatos, 64 cães e 759 pessoas através do isolamento do agente pelo diagnóstico micológico (Barros et al., 2004; Schubach et al., 2004). Em 2008, na cidade de Petrópolis, Rio de Janeiro/Brasil, Pereira e colaboradores relataram a doença em um homem de 36 anos com histórico de alcoolismo, que apresentava lesões cutâneas ulceradas e nodulares difusas no tronco e nos membros inferiores com disseminação linfática sem nenhum relato de trauma que tivesse possibilitado a inoculação do agente. Na região sul do Brasil, a maioria das ocorrências da esporotricose era relacionada com casos de trabalhadores de zonas rurais (Neto et al., 2001) e nas últimas décadas a micose foi mais freqüente em indivíduos de profissões variadas, residentes na zona urbana, estando a infecção associada ao lazer rural, como pescarias e caçadas (Lopes et al., 1999) e pelo contato com animais contaminados. Em Pelotas (RS), Xavier et al (2004) relataram um caso de transmissão de esporotricose em um atendente de clínica veterinária após a arranhadura de um felino durante o atendimento .

O gato pode contrair a esporotricose através de seus hábitos inerentes de cavar buracos e afiar as unhas em pedaços de madeira que podem estar contaminados pelo fungo, em brigas por alimento e disputa por território (Meinerz et al., 2007; Nunes & Escosteguy, 2005; Nogueira *et al.*, 1995). No entanto, o potencial zoonótico da esporotricose felina tem sido reconhecido há alguns anos (Read & Sperling, 1982; Naqvi et al., 1993; Reed et al., 1993) pelo fato da lesão nesta espécie ser rica na forma parasitária do fungo, o que explica a possível transmissão para o homem mesmo na ausência de uma lesão prévia ou de algum histórico de trauma (Rosser & Dunstan, 1990; Werner & Werner, 1994). O fungo é normalmente isolado de unhas de gatos que se contaminam no ambiente em que vivem (Souza et al., 2006; Schubach et al., 2001). Contudo, o fungo também pode ser isolado da cavidade oral e de unhas de felinos saudáveis, desta forma, oferecendo riscos para seus proprietários devido à ocorrência da esporotricose adquirida após arranhões (Souza et al., 2006). Devido ao aumento de casos na região sul do Brasil, Souza et al (2006) avaliaram a freqüência do fungo nas unhas de gatos saudáveis que convivem com gatos com esporotricose e

observaram que dos 24 gatos analisados, sete apresentaram diagnóstico positivo para a doença pelo fato de carregarem o agente em suas cavidades orais e nas unhas.

3.4 Manifestações Clínicas

A micose em humanos pode ocorrer nas formas cutânea e extracutânea. A forma cutânea pode ser subdividida em cutânea fixa ou localizada, linfática e disseminada. Na forma cutânea fixa o fungo permanece no local da inoculação levando à formação de “cancros de inoculação” e é a forma mais comum em áreas endêmicas. A forma linfocutânea é comumente encontrada em todo o mundo e caracteriza-se pela presença de nódulos subcutâneos adjacentes devido à difusão do agente pelo sistema linfático. As formas disseminadas e atípicas têm sido diagnosticadas em pacientes imunocomprometidos como doenças hematológicas, diabetes mellitus, usuários de drogas imunossupressoras, pacientes com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) e abuso de álcool (Carlos et al., 2009; Da-Rosa et al., 2005; Kauffman et al., 2000; Lavale & Mariat, 1983; Rippon, 1982).

Vários casos de esporotricose têm sido descritos em pacientes infectados por HIV (Carvalho et al., 2002; Rocha et al., 2001; Ware et al., 1999;) (figura 4). A esporotricose associada com a infecção por HIV parece ser uma condição rara, não sendo uma doença oportunista comum nestes pacientes. Usualmente, a esporotricose em indivíduos portadores do HIV ocorre como uma manifestação de doenças oportunistas associadas ao estado avançado da infecção por HIV, manifestando-se de forma cutânea disseminada com ou sem envolvimento visceral (Gutierrez-Galhardo et al., 2008). A cura da forma disseminada é complicada em pacientes imunossuprimidos, particularmente esses com AIDS, em que a terapia pode ser limitada à supressão.

Casos de co-infecção HIV/*S. schenckii* têm sido diagnosticados no Rio de Janeiro, Brasil (Schubach et al., 2005). Em 2008 dois casos atípicos de infecções

oportunistas foram diagnosticados em indivíduos infectados com HIV pelo Instituto de Pesquisa Evandro Chagas (IPEC), Rio de Janeiro (Gutierrez-Galhardo et al., 2008). Esses indivíduos apresentavam a doença chamada de Síndrome Inflamatória da Reconstituição Imunológica (SIRI), definida como uma resposta inflamatória aos micróbios co-existent em indivíduos infectados por HIV provocada pela restauração do sistema imune após o início do esquema de drogas anti-retrovirais altamente ativo (HAART).

A HAART, esquema disponível no Brasil desde a década de 90 é responsável pela diminuição da carga viral e aumento da contagem sérica dos linfócitos T CD4+, melhorando a imunidade e evitando o aparecimento das doenças associadas à imunodepressão (Nadal & Manzione, 2009). Durante o tratamento, a supressão da replicação do vírus HIV permite uma gradual restauração da capacidade imunológica, que é o momento crucial para o desenvolvimento da SIRI (French et al., 2004). Nestes relatos os pacientes desenvolveram lesões ulceradas e nodulares nas regiões auricular, do glúteo, dorso e membros superiores que cicatrizaram após tratamento com itraconazol e retornaram com o início de intensa terapia anti-retroviral. O histórico epidemiológico de um dos casos revelou que um dos pacientes possuía um gato com esporotricose apresentando lesões na pele e que havia morrido aproximadamente um mês antes do paciente iniciar a terapia anti-retroviral (Gutierrez-Galhardo et al., 2008).

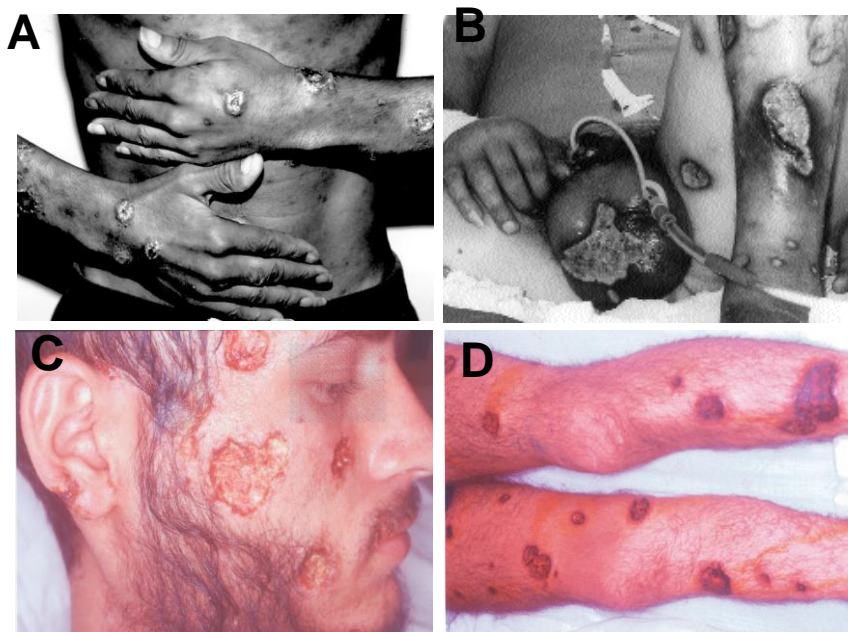


Figura 4: Apresentação da esporotricose em indivíduos com HIV. (A) Homem apresentando nódulos crostosos e ulcerados com disseminação linfática dos membros superiores (Ware et al., 1999); (B) Mostrando lesões ulceradas com base purulenta na região escrotal e membro inferior (Rocha et al., 2001) e (C e D) Esporotricose cutânea disseminada mostrando lesões úlcero-disseminadas na face e membros inferiores em paciente HIV-positivo (Carvalho et al., 2002).

A esporotricose em gatos domésticos exibe peculiaridades não encontradas quando ocorre em outros animais. Nos gatos, a micose caracteriza-se por lesões cutâneas ulceradas com células fúngicas expostas, conseqüentemente aumentando o poder infectante para outros animais ou até mesmo ao homem. Sua disseminação de forma sistêmica pode levar o animal a óbito (Marques et al., 1993). Além da forma cutânea localizada, animais, principalmente felinos, apresentam a forma cutânea linfática e cutânea disseminada.

A ocorrência da esporotricose em cães é considerada rara com poucos relatos na literatura (Miranda et al., 2009), sendo mais comuns nesta espécie os casos de dermatofitoses causados pelos fungos *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum* e *Trichophyton mentagrophytes* (Souza et al., 2009; Moriello, 2004; Paixão et al., 2001). A ocorrência em caninos já foi relatada nas regiões Sul (Madrid et al, 2007), Sudeste (Ramadinha et al., 2006; Sonoda et al., 2006) e

Nordeste do Brasil (Filgueira 2009). A importância epidemiológica desta espécie não é tão relevante quanto o da espécie felina, pelo fato do cão não eliminar números elevados de formas infectantes em seus exsudatos e por isso o seu potencial zoonótico é menor. Entre 2004 e 2006 os Laboratórios de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos (LAPCLIN-DERMZOO), Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC) e Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) têm alertado quanto ao aumento da ocorrência da esporotricose no Rio de Janeiro com mais de 44 casos diagnosticados (Miranda et al., 2009; Santos et al., 2006). Em cães, a forma de apresentação mais comum é a cutânea fixa e linfocutânea, onde são observados múltiplos nódulos, áreas alopecicas e lesões ulceradas com bordas elevadas não dolorosas e nem pruriginosas, principalmente no tronco, cabeça e orelhas (Figura 5 A e B) (Souza et al., 2009; Bernstein et al., 2007; Schubach & Schubach 2000; Scoot et al., 1996), embora também haja ocorrência da forma disseminada (Whittemore & Webb, 2007; Muller & Kirk, 1996). Em 2009, Souza e colaboradores relataram um caso de esporotricose canina em um cão macho da raça boxer com 6 anos de idade que apresentava uma massa na região nasal e dificuldade respiratória (figura 5C).



Figura 5: Esporotricose em cães. (A) Mostrando lesões ulcerativas multifocais na face, orelhas e membros inferiores e (B) com ulceração difusa na orelha (Bernstein et al., 2007). Em (C) mostrando cão apresentando massa na fossa nasal esquerda bem delimitada, sem ulcerações (Souza et al., 2009).

Em eqüinos, a esporotricose pode ser de caráter crônico, em forma de nódulos subcutâneos, geralmente localizados nos membros ou pescoço do animal, que quando ulcerados eliminam exudato purulento contendo células leveduriformes (Copetti et al., 2002; Greydanus-van der Putten et al., 1994; Davis & Worthington, 1964). A esporotricose descrita em eqüinos pode se apresentar em duas formas principais: como uma linfangite proliferativa, desenvolvendo nódulos ao longo dos vasos linfáticos que posteriormente ulceram, ou na forma subcutânea, onde múltiplos nódulos se desenvolvem no sistema intertegumentário, sem envolvimento do sistema linfático, os quais eventualmente ulceram e são drenados (Jungerman & Schwartzman, 1972). Nesta espécie também foi relatada a ocorrência de lesões na cabeça, além de disseminação para os membros torácicos e pescoço como pode ser observado na figura 6 (Copetti et al., 2002).

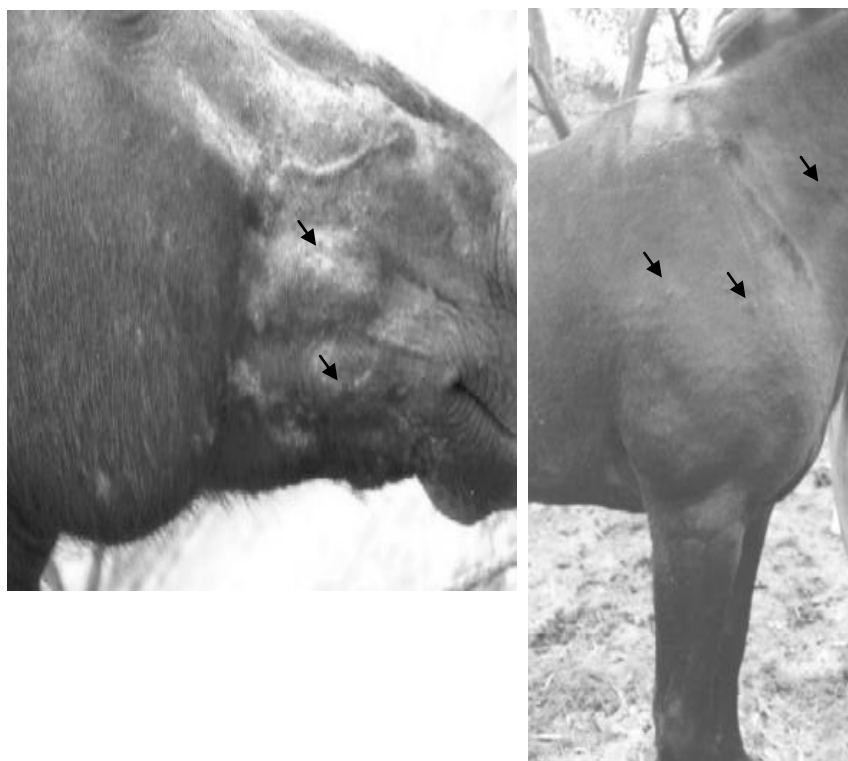


Figura 6: Esporotricose eqüina. Em (A) mostrando intensa alopecia e presença de nódulos subcutâneos (setas) causados por *S. schenckii*. Em (B) mostrando inúmeros nódulos subcutâneos (setas) disseminados pelo pescoço e membro torácico (Copetti et al., 2002).

3.5 Patogenia

Como o *S. schenckii* não é capaz de penetrar na pele íntegra, a infecção somente ocorre pelo implante traumático com objetos ou partes de vegetação contaminada pelo fungo, ou pelo contato com lesões de animais infectados por solução de continuidade. A contaminação por solução de continuidade é comum entre alguns animais como cobras, insetos, pássaros e roedores que acabam se tornando vetores e colaborando para a manutenção da doença (Schubach et al., 2001; Werner & Werner, 1993; Larsson et al., 1989).

Após a inoculação do fungo no hospedeiro, este pode alcançar as camadas mais profundas da pele e os esporos podem passar para a forma parasitária (leveduriforme) devido à mudança térmica, e depois de estabelecida, a infecção pode ficar restrita ao tecido cutâneo ou se estender aos vasos linfáticos, que ao drenar a área pode levar à disseminação pela circulação sanguínea dependendo do estado imunológico do hospedeiro (Kwon-Chung & Bennet, 1992; Rippon, 1988). A infecção causa lesões nodulares que ulceram na região central e drenam exsudato castanho avermelhado ou purulento.

A forma de penetração do fungo nas células endoteliais dos hospedeiros foi estudada e sugerida a participação direta mediada por citocinas cálcio moduladas, sem afetar a integridade das células por lise (Figueiredo *et al.*, 2004). Segundo Dixon et al (1991), o tamanho inicial do inóculo, fatores de virulência do fungo, profundidade do trauma, "status" da resposta imune do hospedeiro e tolerância térmica podem influenciar diretamente no desenvolvimento da doença. A resposta imune frente às infecções fúngicas geralmente é mediada por neutrófilos, macrófagos e células dendríticas, que são responsáveis pelo englobamento do microrganismo (fagocitose), produção de substâncias tóxicas e ativação da imunidade adaptativa pela produção de citocinas e quimiocinas.

Após o reconhecimento do fungo, células apresentadoras de antígeno promovem a internalização do microrganismo, fazem a digestão do mesmo e epítopos do fungo são exibidos nas fendas das moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) classe II para que sejam reconhecidos especificamente por células T CD4+, que por sua vez, são essenciais na determinação da susceptibilidade ou resistência do hospedeiro às infecções

fúngicas. Após a liberação de citocinas específicas há o direcionamento da resposta imune (Th1 ou Th2) para promover a ativação de linfócitos B ou o desenvolvimento de hipersensibilidade do tipo tardio (Rook, 1994).

Fungos dimórficos, como *S. schenckii*, possuem fatores de patogenicidade que são responsáveis pela sua sobrevivência no hospedeiro, levando ao desenvolvimento da doença. Entre os principais fatores de patogenicidade de *S. schenckii* estão a presença de enzimas extracelulares, a termotolerância, composição da parede celular e presença de grânulos de melanina (Hogan et al., 1996; Lopes-Bezerra et al., 2006; Schubach et al., 2006).

A melanina é sintetizada por vários fungos de importância médica (Langfelder et al., 2003). O pigmento foi detectado em cultivos fúngicos há mais de 40 anos e em animais os resultados comprovaram a importância deste fator de virulência para o quadro infeccioso dos animais. Sua síntese tem sido associada com a virulência por reduzir a susceptibilidade dos patógenos à morte por mecanismos antimicrobianos do hospedeiro (Morris-Jones et al., 2003). Em temperatura ambiente protege conídios contra temperaturas extremas, dessecação e radiação. Trata-se de um pigmento hidrofóbico e de alto peso molecular, com coloração marron-escura ou negra, formados através da polimerização oxidativa de compostos fenólicos e indólicos e em fungos podem ser sintetizados a partir de dois precursores: dihidroxifenilalanina, chamada de melanina-dopa produzida pela via polifenoloxidase (ou laccases e tirosinases) e a dihidroxinaftaleno chamada de melanina-DHN produzida pela via pentacetíde. Geralmente esses pigmentos estão concentrados na parede celular da célula fúngica ou no seu entorno, mas estudos relataram sua ocorrência na superfície e no citoplasma do fungo *Paracoccidioides brasilienses* (Silva et al., 2006). Foi observado que *S. schenckii* secreta melanina em condições experimentais, concluindo-se que este componente pode ser um dos fatores que favorecem a infecção pelo fungo, tal como comprovado com *Cryptococcus neoformans*, outro fungo melanogênico de importância médica (Morris-Jones et al., 2003; Nosanchuk et al., 2001). Romero-Martinez et al (2000) demonstraram que a síntese de pigmentos semelhantes à melanina ocorre pela via 1,8-DHN pentacetíde em *S. schenckii* e que o pigmento parece proteger os conídios de danos oxidantes por radicais livres, luz ultravioleta e ao processo fagocítico por macrófagos quando

comparado com conídios albinos que eram duas vezes mais suscetíveis à fagocitose. Observações ultra-estruturais demonstraram que *S. schenckii* sintetiza este pigmento na forma leveduriforme (37°C) e que conídios pigmentados (25 °C) perdem sua camada de melanina durante a fase de transição (Madrid, 2007).

A relação do pigmento com drogas antifúngicas ainda não está bem elucidada. Estudos realizados com os fungos *Histoplasma capsulatum*, *P. brasilienses* e *C. neoformans* mostraram que a melanina proporcionou resistência às células fúngicas a ação da anfotericina B e caspofungina pela diminuição da permeabilidade celular ao antifúngico ou escapando da ação dos radicais livres (van Dium et al, 2004; Nosanchuk, 2002; Silva et al., 2006), enquanto que no fungo *Wangiella dermatitidis*, a presença do pigmento não influenciou na susceptibilidade da célula frente ao antifúngico, bem como, a presença do pigmento em *C. neoformans* não protegeu as células frente ao fluconazol, itraconazol e flucitosina (Jacobson, 2000; Nosanchuk & Casadevall, 2003).

Outros fatores de virulência que estão sendo estudados são o peróxido de ergosterol, extratos lipídicos e exoantígenos da fase leveduriforme do fungo que são responsáveis pela ativação tanto da resposta imune inata por citotoxinas ligadas a ativação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio quanto à resposta imune adaptativa para produzir ambas as citocinas Th1 e Th2. O peróxido de ergosterol trata-se de um esteróide natural encontrado em diversos fungos e funciona proporcionando um mecanismo de evasão, ajudando as formas leveduriformes a escaparem do ataque de espécies reativas de oxigênio durante a fagocitose (Carlos et al., 2009; Sgarbi et al., 1997). Estudos em modelo murino revelaram que na presença de lipídios da parede celular de *S. schenckii*, camundongos competentes para o gene de receptores TLR-4 ativam a resposta imune inata levando a um “burst” oxidativo (Carlos et al., 2009). A descoberta de diferentes mecanismos evasivos do fungo junto com estudos de susceptibilidade podem favorecer a descoberta de novos agentes antifúngicos eficazes contra a doença.

3.6 Diagnóstico para a esporotricose

O principal método diagnóstico da micose causada por *S. schenckii* é sugerido pela identificação do fungo a partir da cultura de secreções como pus, escarro, líquidos corporais e biópsia das lesões que requer o isolamento do fungo em cultura a 25° C em ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol (50mg/mL) e cicloheximide (400mg/mL) para obtenção do crescimento em sua forma filamentosa e sua posterior conversão para a forma leveduriforme a 37°C em ágar Brain Heart para demonstração do seu dimorfismo e conseqüente confirmação do diagnóstico (Kwon-Chung & Bennet, 1992). As evidências clínicas do diagnóstico micológico para a esporotricose podem ser observadas pela técnica de coloração de GRAM (BioChemika), Azul de algodão (Newprov, Brasil) e Panótico (Laborclin, Brasil) pela presença de hifas finas hialinas e septadas com conidióforos em formato de “pétalas de flor” (Xavier et al, 2004). Como o diagnóstico através da cultura fúngica pode demorar de 9 a 14 dias ou quando não se consegue observar o crescimento do fungo devido a falhas na coleta do material ou pelo crescimento concomitante de microrganismos saprófitas, os diagnósticos histopatológicos e imunológicos podem ser utilizados por serem mais rápidos, porém geram dúvidas e só servem como exames preliminares ou complementares às culturas fúngicas (diagnóstico micológico).

Um histórico detalhado, enfatizando o local da injúria, contexto epidemiológico, período de incubação, presença ou ausência de sintomas e indícios revelados pelo exame físico, suplementados pela biópsia da lesão, em certas circunstâncias, podem ajudar na escolha da terapia específica para o paciente (DiNubile, 2008). Por esse motivo, também devem ser levados em conta os sinais, os aspectos zoonóticos e clínicos com lesões cutâneas típicas, associados ou não a quadros extracutâneos, bem como exames dermatológicos e *pós-mortem*, se for o caso, do hospedeiro acometido (Schubach et al., 2003; Neto et al., 1999; Prelaud, 1999).

O exame histopatológico de amostras das lesões é uma importante ferramenta e pode ajudar a definir o diagnóstico, pois demonstra a invasão dos tecidos pelo microrganismo (Barros et al., 2005; Lane, 2003; Rodríguez & Sarmiento 1998), mas vários estudos experimentais têm demonstrado que os

achados histológicos podem variar de acordo com a evolução da doença (Miranda et al., 2009).

Os aspectos microscópicos das lesões da pele têm sido bem descritos tanto em humanos quanto em felinos, mas pouco se conhece sobre os aspectos histopatológicos da doença em cães (Miranda et al., 2009). Para a avaliação histológica as amostras de tecidos são embebidas em parafina e as seções obtidas por microtomia são coradas por Hematoxilina & Eosina ou ainda pelos métodos com ácido Periódico de Schiff (PAS) ou por colorações argênticas (Gomori ou Grocott) e Giemsa.

Em humanos, as lesões da pele podem conter granulomas dispersos no infiltrado dérmico inflamatório caracterizado pela presença de uma zona supurativa central composta por fagócitos mononucleares, uma zona intermediária composta de células epitelióides e uma zona periférica composta de linfócitos e células plasmáticas (Gadelha & Talharis, 1982; Ramos e Silva, 1972; Lurie 1963; Moore & Ackerman, 1946). Em cães, a histopatologia pode revelar a presença de dermatite piogranulomatosa com infiltrado celular constituído por células mononucleares e polimorfonucleares (Schubach & Schubach, 2000). Em amostras de lesões de felinos, são visualizadas numerosas estruturas fúngicas quando comparadas com amostras de humanos e caninos, sendo ocasionalmente encontrados corpos asteróides ao redor das células fúngicas, visualizados pela coloração com Hematoxilina & Eosina, caracterizados pela presença de prolongamentos eosinofílicos (Farias, 2000; Farias et al., 1997; Marques et al., 1993; Gadelha & Talhari, 1982; Moraes & Miranda, 1964; Pinkus & Grekin, 1950).

Como diagnósticos imunológicos podem ser realizados testes sorológicos pelo método de aglutinação em látex, bastante úteis nos casos extrapulmonares isolados ou para fins de monitorização da resposta terapêutica; identificação de anticorpos pela técnica de imunofluorescência direta e contraeletroforese (Kauffman et al., 1999; Mohr et al., 1979); pelo Ensaio Imunoenzimático (ELISA) e ainda pelo teste sorológico em resposta à esporotriquina micelial.

O teste com esporotriquina é feito pela inoculação intradérmica do antígeno esporotriquina, preparado com filtrado de culturas da fase micelial ou leveduriforme do fungo *S. schenckii* inativado. O resultado é positivo quando há o desenvolvimento de resposta inflamatória no local da inoculação, que leva ao

espessamento da pele. Mas, sua utilização é limitada devido à sua baixa especificidade, sendo utilizado apenas para estudos epidemiológicos e como método auxiliar na interpretação das formas atípicas da doença (Madrid, 2007; Campbell, 1998).

Devido à variedade das formas de apresentações da esporotricose, o diagnóstico pode ser confundido com outras doenças endêmicas. Muitos casos de linfangite nodular, por exemplo, caracterizada pela presença de nódulos inflamatórios na pele, pode se desenvolver após inoculação de alguns patógenos como: *Sporothrix schenckii*, *Nocardia brasiliensis*, *Mycobacterium marinum*, *Leishmania (Viannia) panamensis/guyanensis* e *Francisella tularensis*, e gerar confusão na hora de definir o diagnóstico (DiNubile, 2008; Heller & Swaster, 1994; Kostman & DiNubile, 1993). Por esse motivo, em casos de confusão diagnóstica, deve-se realizar o diagnóstico diferencial das lesões cutâneas, que na maioria das vezes, estão associados com hospedeiros imunocomprometidos.

O diagnóstico diferencial pode ser feito através de infecções por *Nocardia brasiliensis*; micobacterioses atípicas; pelo teste de Montenegro para leishmaniose; tularemia (Kaufman 1999; Kaufman 1995; Breeling & Weinstein 1993; Rohatgi 1980); pela tuberculose como diagnóstico diferencial das lesões pulmonares, incluindo também sarcoidose, histoplasmose e neoplasia pulmonar (Kauffman 1999; Breeling et al., 1993; Mohr et al., 1979).

Desde 1998, o Instituto de Pesquisa Evandro Chagas (IPEC-FOCRUZ) tem realizado o monitoramento da epidemia da esporotricose em cães, gatos e humanos, onde o principal diagnóstico diferencial tem sido o da Leishmaniose. Devido às similaridades clínicas em áreas endêmicas, a esporotricose tem se tornado o principal diagnóstico diferencial para a leishmaniose no Rio de Janeiro/Brasil, sendo necessário o isolamento do agente etiológico em materiais obtidos de lesões cutâneas (dos Santos et al., 2007) pelo fato das células leveduriformes de *S. schenckii* serem similares em tamanho às formas amastigotas de *Leishmania sp.*, podendo ser facilmente confundido por exames histopatológicos corados com hematoxilina-eosina. Nestes casos, utilizam-se marcações diferenciais como marcação com prata ou pelo método PAS (Schubach et al., 2006).

3.7 Tratamento para esporotricose

A aplicação de iodetos é o tratamento de eleição para casos de esporotricose em eqüinos, caninos e humanos (Larsson, 2006; Copetti et al., 2002; Davis & Worthington, 1964), tanto pelos resultados favoráveis quanto pelo seu baixo custo. Apesar da utilização da terapia com a solução saturada de iodeto de potássio (20% na dose de 0,1 ml/kg/8 semanas) ser utilizada por muitos anos para tratamento das formas cutâneas e linfocutâneas da doença (Mahajan et al., 2005), seu modo de ação ainda não foi completamente elucidado (Sampaio & Rivitti, 2000; Werner & Werner, 1993) e por isso, sua prescrição para humanos deve ser precedida de testes de função tireoidiana. Os resultados de pesquisas indicam que dificilmente o iodeto de potássio atue diretamente sobre *S. schenckii* (Rex & Bennett, 1990; Urabe & Nagashima, 1969), sugerindo-se que sua provável atividade seja na modulação da reação inflamatória e resposta imune do animal (Hiruma & Kagawa, 1987). Os imidazóis e triazóis podem ser utilizados em conjunto ao iodeto até completa cicatrização das lesões ou até que as culturas das lesões se tornem negativas (Souza et al., 2009). A espécie felina é bastante sensível à droga, podendo desenvolver iodismo representado pela presença de anorexia, sinais de febre, vômito e diarreia, por esse motivo antifúngicos do grupo das alilaminas e azóis, como o itraconazol, são indicados para o tratamento da micose nesta espécie (Nobre et al., 2002).

O itraconazol pertence à classe de substâncias antifúngicas denominadas compostos triazólicos. Trata-se de um derivado sintético com amplo espectro de ação contra micoses sistêmicas e superficiais. Nos últimos anos acabou tomando lugar da terapia tradicional com solução saturada de iodeto de potássio sendo ativo contra *S. schenckii* tanto *in vivo* quanto *in vitro* (Wroblewska et al., 2005; Ghosh et al., 2001; McGinnis et al., 2001). O itraconazol é indicado para tratamento das formas cutâneas localizadas e leves da esporotricose disseminada na proporção de 5 a 10mg/kg a cada 12-24 horas (Kauffman et al., 1999; Breeling et al., 1993) tanto para animais quanto para humanos (Nobre et al., 2002; Wiebe & Karriker, 2005). Apesar da eficácia do itraconazol, há relatos de falhas terapêuticas quando utilizados na espécie felina (Bustamante & Campos, 2004; Schubach et al., 2004b).

O cetoconazol é um antifúngico do grupo dos imidazóis apresentando largo espectro de ação contra micoses sistêmicas e superficiais. É usado, na dose de 5 a 10mg/kg para cães e gatos e quando utilizado no tratamento de micoses profundas, recomenda-se sua associação com anfotericina B na dose de 0,1 a 0,6 mg/kg por via endovenosa, em dias alternados. O cetoconazol tem latência relativamente demorada, o que pode comprometer a vida do paciente. Os efeitos colaterais descritos em cães são inapetência, anorexia, náusea, vômito e diarreia. O prognóstico para a esporotricose varia de regular a bom, porém pode ocorrer recidiva, principalmente devido ao uso incorreto dos medicamentos (Nobre et al., 2002; Wiebe e Karriker, 2005).

A terapia com anfotericina B endovenosa é indicada para casos sistêmicos da doença ou quando há falhas no tratamento com iodeto de potássio e itraconazol. Trata-se de um antibiótico poliênico, cuja função é inibir a atividade antifúngica pela ligação com ergosterol, o esterol primário da membrana celular fúngica, rompendo a integridade osmótica da mesma e resultando no extravasamento de potássio, magnésio, açúcares e metabólitos intracelulares causando morte celular (Terrell et al., 1992). Esse antifúngico é administrado por via intravenosa e exibe baixas taxas de resistência e atividade fungicida verdadeira. Entretanto, a Anfotericina B é utilizada com cautela devido à sua toxidez e possíveis efeitos colaterais (Richter et al., 2004), principalmente em indivíduos portadores da imunodeficiência adquirida (Pereira et al., 2008). O uso do medicamento deve se estender por até 90 dias após a cura clínica (Nobre et al., 2002; Wiebe e Karriker, 2005; Nunes e Escosteguy, 2005) para assegurar os fenômenos de recidiva da infecção.

O tratamento por hipertermia local de lesões cutâneas foi utilizado pela primeira vez em 1951 por Thomas e colaboradores. Este tratamento pode ajudar no tratamento com drogas convencionais e pode ser considerado como uma terapia complementar ou temporária, nos casos de gravidez ou possível interações entre as drogas. Em 1992, Himura et al observaram que ao tratarem lesões cutâneas de 21 indivíduos, diariamente durante 8 semanas, com bolsas de água quente, por aproximadamente 60 minutos, observaram a cura das lesões em 85% dos indivíduos. A justificativa para uso do calor deve-se ao fato de S.

schenckii não crescer *in vitro* a temperaturas superiores a 37°C.

Um novo composto triazólico, o ravuconazol, atua contra vários fungos, entre eles os dermatófitos, zigomicetos, *Cryptococcus neoformans*, *Fusarium* spp. e leveduras do gênero *Candida*, todos freqüentemente envolvidos em doenças animais e de grande importância em medicina veterinária (Minassian et al., 2003). No entanto, esta droga mostrou-se pouco eficaz contra o *S. schenckii* e outros fungos clinicamente relevantes na medicina humana e veterinária (Fung-Tomc et al., 1998).

A terbinafina, um antifúngico do grupo das alilaminas, demonstrou aspecto fungicida, quando testado *in vitro* sobre alguns fungos dimórficos, incluindo *S. schenckii*, não demonstrando resistência frente ao agente, além de efeitos tóxicos reduzidos quando comparado ao itraconazol (Bustamante & Campos, 2004; Coskun et al., 2004; Johnson et al., 2004; Kauffman et al., 2000; Perez, 1999).

4 – Compostos Sintéticos

4.1 Compostos de coordenação

Os compostos de coordenação são compostos sintéticos que podem atuar como nucleases sintéticas, qualificando-se como futuros candidatos a novos quimioterápicos, pois são formados pela reação entre moléculas orgânicas e metais de transição (ferro, manganês, cobalto, zinco, níquel, vanádio). As moléculas orgânicas são denominadas ligantes e possuem grande similaridade aos resíduos de aminoácidos. Vários compostos de coordenação demonstraram atividade sobre a bactéria *Staphylococcus aureus* produtora de enterotoxinas (Silva et al., 2006) e sobre as leveduras *Malassezia pachydermatis* (Silva, 2007; Silva et al., 2008) e *Candida albicans* (Gonçalves et al., 2005; Gonçalves, 2007).

Os compostos de coordenação podem atuar como nucleases sintéticas. As

nucleases são enzimas que pertencem à classe das hidrolases e que atuam sobre os ácidos nucleicos (DNA e RNA) (Cowan, 2001; Hegg & Burstyn, 1998). Entre as suas diversas funções, destaca-se a manutenção da integridade do código genético, o que é proporcionado pela degradação de partes do DNA que apresentam alguma mutação. Tais enzimas têm recebido uma especial atenção das áreas de biotecnologia e medicina, as quais se utilizam das mesmas no trabalho de investigação do código genético, isolamento de genes e em exames médicos (Franklin, 2001). Esse interesse é decorrente da especificidade que tais enzimas apresentam por uma dada seqüência do DNA, o que possibilita a sua clivagem em blocos menores, que por sua vez podem ser seqüenciados com maior facilidade. Uma característica química comum a um grande número de nucleases é a presença de íons metálicos (Mg^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+}) no sítio, aos quais têm sido atribuídas as seguintes funções: (a) formação de nucleófilos fortes (OH^-) em condições suaves de pH; (b) suporte para o substrato (grupo fosfato); (c) neutralização da carga do substrato; (d) ativação das ligações de ésteres de fosfato; (e) estabilização do estado de transição (Cowan, 2001; Holmes et al., 1996). Com a descoberta de que o composto $cis-[Pt(NH_3)_2Cl_2]$ inibia o crescimento de células cancerígenas por atuarem sobre o DNA, confirmou-se que compostos de coordenação podem interagir com a dupla fita do DNA. Tal interação pode ocorrer de diferentes formas: (a) interações não covalentes (eletrostática); (b) interações covalentes; (c) interação por intercalação; (d) interação por oxidação; (e) interação via hidrólise (Holmes et al., 1996).

4.2 Heteropoliácidos (HPAs)

Os heteropoliácidos são compostos ácidos, constituídos por ânions polioxometalatos, que correspondem a octaedros de metal-oxigênio (MO^6) ligados a um heteroátomo (Si, P, Ge, Sn). Os polioxometalatos (POMs) são uma importante e extensa classe de compostos de estruturas normalmente muito simétricas e composição variável, podendo ser formados por diversos elementos (Tsigdinos, 1978). As estruturas dos polioxometalatos podem conter ou não

heteroátomos, o que divide esta classe de compostos em dois grupos: os isopoliânions (isopoliácidos – IPAs), de fórmula geral $(M_mO_y)^{x-}$ e os heteropoliânions (heteropoliácidos – HPAs), de fórmula geral $(X_nM_mO_y)^{x-}$ (Maksimov, 1995). Os mais estudados são os heteropoliácidos que apresentam a estrutura de Keggin, com fórmula geral $X^{n+}M_{12}O_{40}^{(8-n)-}$, onde o heteroátomo X é normalmente o P^{5+} ou Si^{4+} e o metal pode ser o Mo^{6+} , W^{6+} , V^{5+} , entre outros. A estrutura de um heteropoliácido é formada por um metal formado por seis átomos de oxigênios (MO_6), onde três desses se juntam de modo que cada um divide uma face com os outros dois, formando a estrutura secundária M_3O_{10} , no qual um átomo de oxigênio é compartilhado por três átomos metálicos, ou seja, ao heteroátomo. Quatro grupos M_3O_{10} circundam o heteroátomo em coordenação tetraédrica, e cada um deles compartilha os átomos de oxigênio dos vértices com os outros três, formando o heteropoliácido (Hill & Prosser-McCartha, 1995; Koshevnikov, 1995) (figura 7).

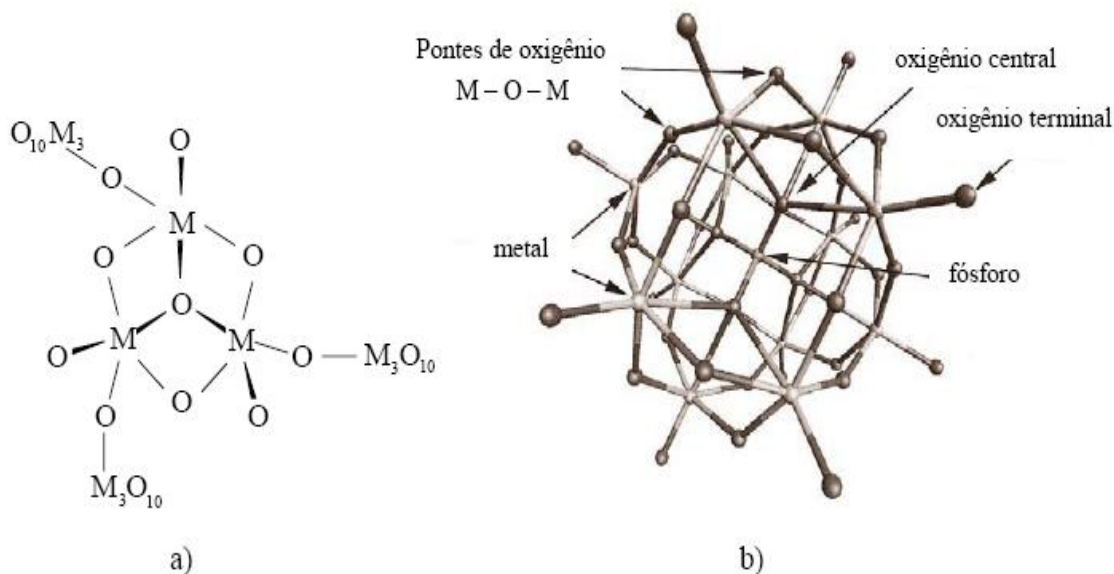


Figura 7: A) O grupo M_3O_{10} da estrutura de Keggin para $M= Mo^{6+}$, W^{6+} , V^{5+} ; B) A estrutura de keggin dos heteropoliácidos (Hill & Prosser-McCartha, 1995; Koshevnikov, 1995) .

Os metais (M) que podem ser incorporados a estas estruturas estão restritos aos átomos que possuem uma conveniente combinação carga/raio iônico, e capacidade de formar ligações metal-oxigênio. Já para o heteroátomo, isto não é uma grande limitação, visto que, até o momento, cerca de 60 elementos do sistema periódico foram utilizados como heteroátomos. Apenas os gases nobres, metais alcalinos e alcalinos terrosos são sistematicamente excluídos da função de heteroátomo (Maksimov, 1995). Os heteroátomos mais comuns são Si, P, As e Ge. Normalmente os metais (M) que formam esta classe de compostos são Mo, W, ou ainda V e, mais raramente, Nb ou Ta, no mais alto estado de oxidação.

Estes elementos se apresentam com uma elevada carga (Mo^{6+} ; W^{6+}), que associados aos respectivos raios iônicos possibilitam a formação destes compostos. Essa versatilidade de elementos que podem compor a estrutura garante uma grande variedade de POMs que podem ser sistematicamente sintetizados e estudados (Jansen, et. al., 1994). Os HPAs de silício são mais estáveis do que os de fósforo, e os de tungstênio mais estáveis do que os de molibdênio. A inserção de átomos de vanádio diminui a estabilidade da estrutura do HPA, tanto que a estrutura de Keggin contendo exclusivamente vanádio não foram observadas (Cavani, 1998; Koshevnikov, 1998).

Além de eficientes oxidantes, os HPAs possuem as vantagens de serem altamente solúveis em solventes polares, possuírem grande estabilidade térmica e química sob condições extremas de reação e bastante atrativos do ponto de vista econômico e ambiental (Mizono et al., 2000).

Em 1908 teve-se o primeiro estudo sistemático de heteropoliácidos (Rosenheim, et. al., apud Tsigdinos, 1978), onde Miolati, de acordo com a teoria iônica de Werner, propôs uma estrutura para estes compostos que foi aceita até 1933, quando Keggin, utilizando as recentes técnicas de difração de raios-X, apresentou outra estrutura, que é aceita atualmente. Esta estrutura é conhecida como estrutura de Keggin (Tsigdinos, 1978).

Devido a estas possibilidades de alteração das características físico-químicas dos HPAs, estes compostos são muito estudados em várias áreas das ciências, como catálise, ciência dos materiais, processos envolvendo fotoquímica e eletroquímica, química analítica, eletrônica, medicina, entre outros. Em

medicina, diversos HPAs têm sido sintetizados, caracterizados e suas atividades biológicas monitoradas, principalmente na área antiviral e antitumoral. Na microbiologia, estudos demonstraram que os HPAs de tungstênio (heteropolitungstatos) aumentaram a atividade de antibióticos β -lactâmicos contra bactérias resistentes. Na química medicinal, existem inúmeras referências de pesquisas utilizando HPAs como agentes antivirais, incluindo o tratamento contra o vírus HIV, e também no tratamento de tumores cancerígenos, mas pouco explorados na área microbiológica, exceto em associação com antibióticos β -lactâmicos no combate a *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina (MRSA) (Rhule et al., 1998), caso no qual estes apresentaram efeito sinérgico.

Na farmacopéia, a maior parte dos descobrimentos e as drogas otimamente eficazes, inclusive agentes anti-HIV, são altamente dispendiosos para sua comercialização. Como fármacos à base de Polioxometalatos (POMs) apresentariam custos menos elevados, em relação à maioria dos fármacos orgânicos, seu desenvolvimento poderia colaborar positivamente com a descoberta de novas drogas possivelmente com grande impacto e comercialização.

4.3 Extrato bruto e semi-sintético de *Hymenaea stigonocarpa*

As espécies do gênero *Hymenaea* têm se mostrado como uma das mais importantes produtoras de resina, ocorrendo em clima tropical e subtropical, principalmente na África e América do Sul. Este gênero está amplamente distribuído em todo o território brasileiro, principalmente nas regiões Sudeste e Norte do Brasil (Lee e Langenheim, 1975).

O gênero *Hymenaea* é formado por 14 espécies de árvores de tamanhos variáveis de 6 a 40 m de altura dependendo da espécie (Langenheim *et al.*, 1982). A mais alta é o jatobá amazônico (*Hymenaea courbaril*) e a menor é o jatobá do cerrado (*Hymenaea stigonocarpa*). O fruto do jatobá, além de ser consumido ao natural, há relatos de sua utilização na medicina popular (Guarim & Moraes 2003). As suas cascas em infusão são utilizadas no combate de febres e a resina fervida

é utilizada no tratamento de cistites, problemas respiratórios e como expectorante. Esta é ainda usada como vermífugo e para aliviar dores de estômago, peito e costas. O chá da casca é empregado para problemas de rins, fígado, infecção intestinal e como cicatrizante (Guarim & Moraes 2003).

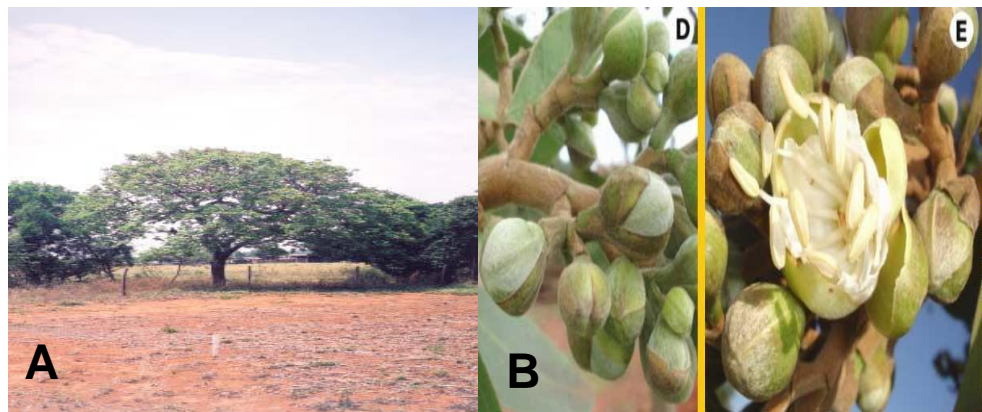


Figura 8: (A) Árvore de *Hymenaea stigonocarpa* conhecida popularmente como “jatobá do cerrado”. (B) Frutos do jatobá (Embrapa, 2007).

A resina que exsuda do epicarpo de *Hymenaea* é um líquido amarelado, transparente e se concentra cristalizado em pedaços, com cheiro aromático e brilhoso, tendo grande aplicação medicinal e poder terapêutico.

Diversos estudos mostraram que os terpenos constituem uma classe de produtos naturais que oferecem uma diversidade muito grande de metabólitos secundários com ampla variedade de estruturas e atividades biológicas pronunciadas como antibacteriana, antiinflamatória e citotóxica (Thomson, 1993; Hanson, 2001). De uma forma mais específica, os diterpenos apresentam propriedades anti-alimentares contra besouros (Schroeder *et al.*, 1999), antifúngica, antibacteriana (Bennamara *et al.*, 1999) e citotóxica (Topcu *et al.*, 1999).

A resina de jatobá é constituída de compostos classificados como sesqui- e diterpênicos, como o ózico e o isoózico (apud Giacomini, 2002; Lee *et al.*, 1976; Bevan *et al.*, 1966) que exibem atividade antimicrobiana (Barrero *et al.*, 1989). A atividade biológica da espécie *H. stigonocarpa* ainda é muito escassa contra fungos. Novais e colaboradores (2003) mostraram a atividade antibacteriana contra a bactéria *Staphylococcus aureus* para o extrato clorofórmico das folhas

desta espécie. Giacomini e colaboradores (2005) submeteram compostos isolados de extratos do epicarpo de *H. courbaril* var. *altissima* a bioensaios simples e todos os compostos se mostraram ativos contra *Artemia salina* e contra as bactérias *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Rodococcus equi*. O extrato metanólico de *Hymenaea courbaril* também foi ativo contra as bactérias *K.pneumoniae*, *M. luteus*, *E. coli*, *S. aureus* e *P. mirabilis*. Para a espécie *H. stigonocarpa* menor ainda é o número de estudos desenvolvidos para avaliação da potencial atividade biológica da espécie.

Oliveira e colaboradores (2002) avaliaram o efeito alelopático de extratos aquosos e etanólicos de folhas e frutos de jatobá do cerrado e concluíram que a taxa de germinação da alface (*Lactuca sativa*) foi reduzida após tratamento com o extrato etanólico dos frutos e o atraso na germinação foi constatado na presença dos extratos aquosos de folhas e frutos, indicando que os aleloquímicos de *H. stigonocarpa* encontram-se, principalmente, nos frutos. Recente trabalho realizado por Siqueira et al (2009) foi observado que substâncias isoladas da resina contida no epicarpo de *H. stigonocarpa* apresentou efeito fungistático sobre células leveduriformes de *C. neoformans* com diminuição da cápsula fúngica e alterações na morfologia das células observadas por microscopia óptica.

Outros extratos naturais, como o óleo essencial de *Origanum vulgare*, o “orégano”, foram testados contra *S. schenckii*. Sua ação terapêutica frente ao demonstrou uma concentração mínima inibitória de apenas 250µl/mL revelando que a ação do extrato bruto sobre o fungo pode estar relacionada ao efeito sinérgico das substâncias nele contida fazendo com que o microrganismo não consiga utilizar rotas de escape que lhe confirmam resistência, diferentemente do que poderia ocorrer quando uma substância pura é aplicada contra um agente possibilitando que o mesmo adquira a capacidade de elaborar rotas de escape que lhe confirmam resistência a esta substância (Cleff et al., 2008). Em outros estudos *in vitro* o mesmo óleo foi avaliado frente a diferentes fungos filamentosos como *Aspergillus niger*, *A.flavus*, *A. ochraceus*, *A. parasiticus*, *Penicillium italicum* e *Fusarium oxysporum* (Buchanan e Shepherd, 1981; Paster et al., 1990; Tantaoui- Elaraki et al., 1993; Daouk et al., 1995) e das leveduras *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans* (Manohar et al., 2001; Chami et al.,2004).

Na área da microbiologia, os fungos leveduriformes têm sido motivo de

intensa preocupação devido às inúmeras patogenias tanto de caráter humano quanto animal a eles associadas. As drogas disponíveis para o tratamento de tais doenças têm custo elevado, efeitos colaterais indesejáveis e pouca efetividade devido ao espectro de atuação, podendo selecionar indivíduos resistentes a essas drogas. Assim, o desenvolvimento de métodos alternativos para o tratamento de tais infecções torna-se imprescindível.

5 - MATERIAL E MÉTODOS

As cepas de *S. schenckii* foram cultivadas em Ágar Cérebro e Coração (BHA) (Acumedia, EUA), previamente reativadas em tubos de ensaio contendo caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI) (Acumedia, EUA) e levadas à estufa a 37°C por 48 a 72 horas. A concentração inicial de cada inóculo foi obtida através da transferência de colônias ativadas para o caldo BHI estéril até atingir uma turbidez equivalente a uma concentração de 0,5 MacFarland em fotômetro (Densimat, bioMérieux, França), equipado com leitor para comprimento de onda 550nm, segundo Araújo et al. (2004). Para a avaliação da atividade antifúngica dos produtos testados foram empregados os métodos de difusão em ágar descrito por Rojas et al, 2006, o método de diluição em meio líquido baseado na metodologia descrita por Lemos et al. 2000 e o antifungigrama foi realizado somente para os heteropoliácidos devido à sua disponibilidade em maiores quantidades.

5.1 Microrganismos

Para os ensaios, *in vitro*, foram utilizados uma amostra clínica de *S. schenckii* (LSASc01), isolada de felino de Macaé pelo Laboratório de Sanidade Animal CCTA/ UENF, além de cepas clínicas de origem animal e humana provenientes da FIOCRUZ-RJ: CMDB/IOC 0198, 0199, 0205 e 0206, obtidas de biópsia de pele de gato doméstico, aspirado de nódulo de humano, unha de gato doméstico, swab nasal de gato doméstico pós-tratamento com itraconazol,

respectivamente. Todas as cepas foram gentilmente cedidas pelo Dr. Mário Jorge Gatti, curador da Coleção Micológica do Departamento de Biologia, Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental – IOC/FIOCRUZ, RJ.

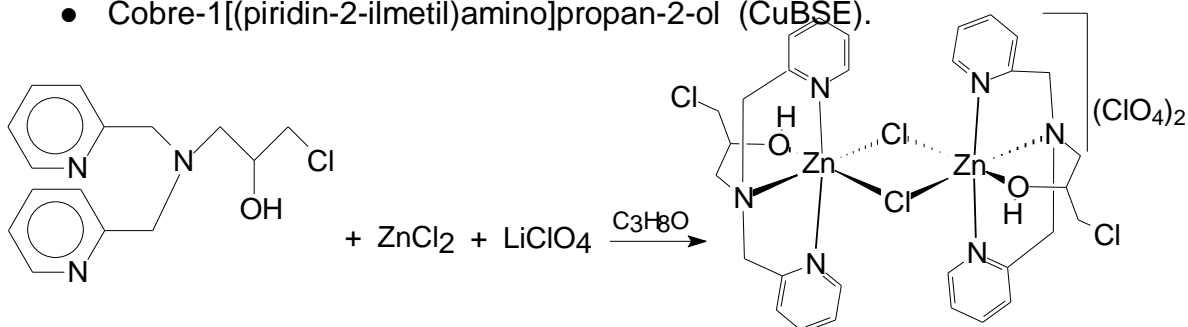
As cepas de *S. schenckii* foram cultivadas em ágar BHA (Acumedia, EUA), previamente reativadas em tubos de ensaio contendo caldo BHI (Acumedia, EUA) e incubadas em estufa a 37°C por 72 horas.

Os testes foram realizados com as moléculas sintéticas com atividade de nuclease e heteropoliácidos previamente utilizados em ensaios realizados no Laboratório de Sanidade Animal (LSA) do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da UENF (Silva et al., 2003; Dias et al., 2004a e b; Samuels et al., 2005; Gonçalves et al. 2007; Silva et al., 2006), e extratos de plantas isolados do epicarpo de *Hymenaea stigonocarpa* “*Jatobá do Cerrado*” todos produzidos junto a colaboradores do Laboratório de Ciências Químicas (LCQUI) do Centro de Ciências e Tecnologias da Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF).

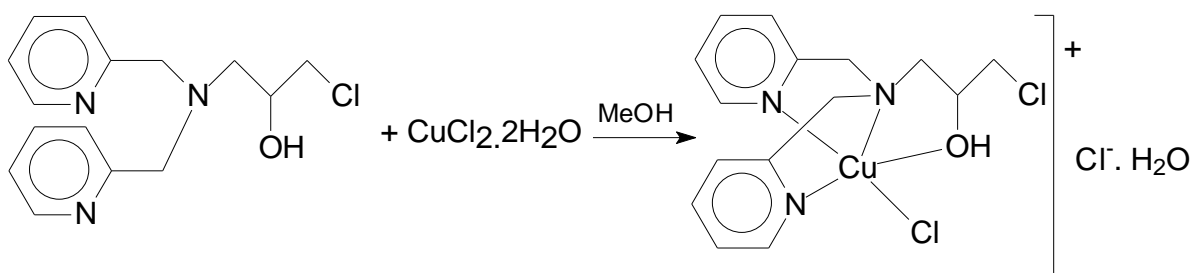
5.2 Ensaio de inibição do crescimento de *S. schenckii* por compostos de coordenação em meio líquido

Para este ensaio foram utilizados complexos de coordenação sintetizados por colaboradores do Laboratório de Ciências Químicas (LCQUI). Os compostos utilizados foram:

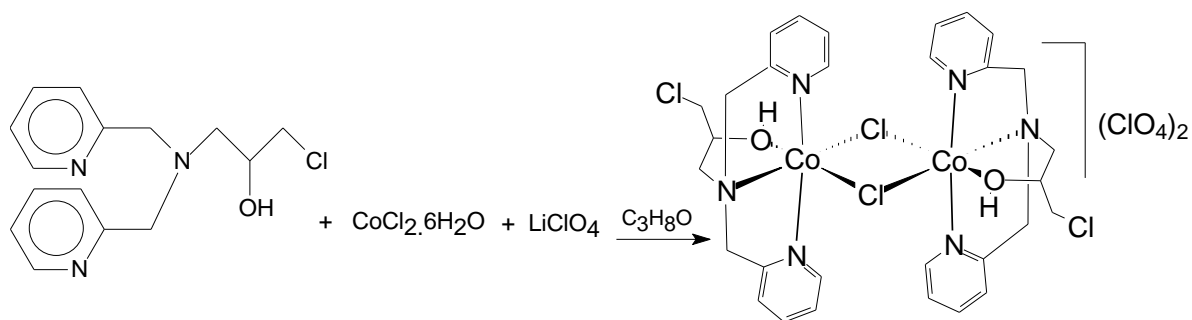
- Zinco-1-(bis-piridin-2-ilmetil-amino)-3-cloropropan-2-ol (ZnHPCINOL);
- Cobre-1-(bis-piridin-2-ilmetil-amino)-3-cloropropan-2-ol (CuHPCINOL);
- Cobalto-1-(bis-piridin-2-ilmetil-amino)-3-cloropropan-2-ol (CoHPCINOL);
- Cobre bis-(2-metilpiridil)amina (CuBMPA);
- Cobre-(2-hidroxibenzil) (2-piridilmetil) amina (CuMBPA);
- Cobre-2-[piridin-2-ilmetilamino]etanol (CuBSA);
- Cobre-1[(piridin-2-ilmetil)amino]propan-2-ol (CuBSE).



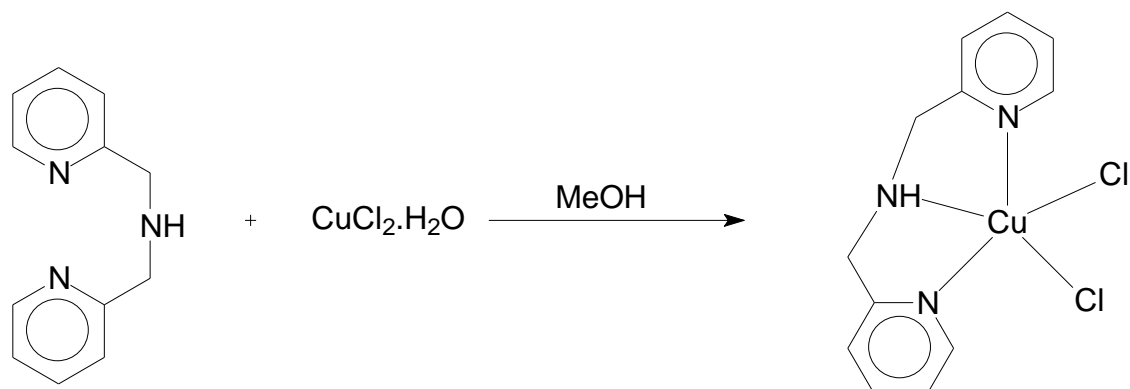
ZnHPCINOL



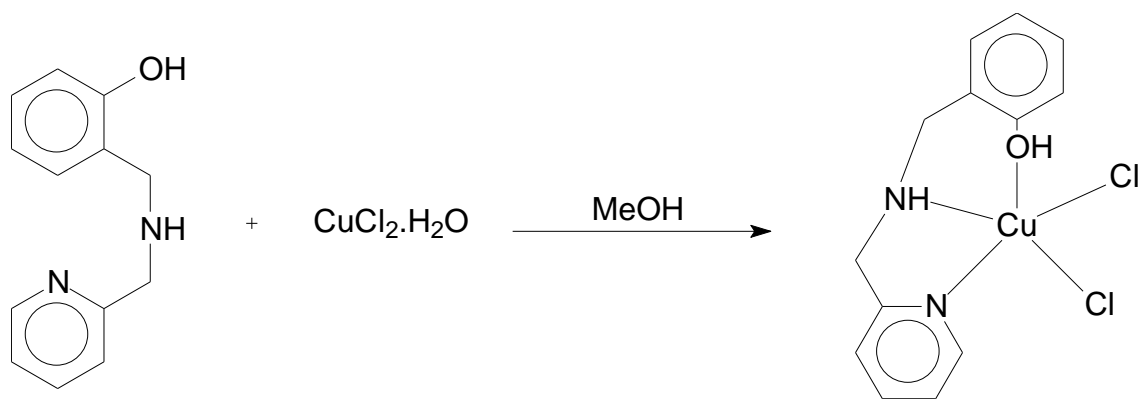
CuHPCINOL



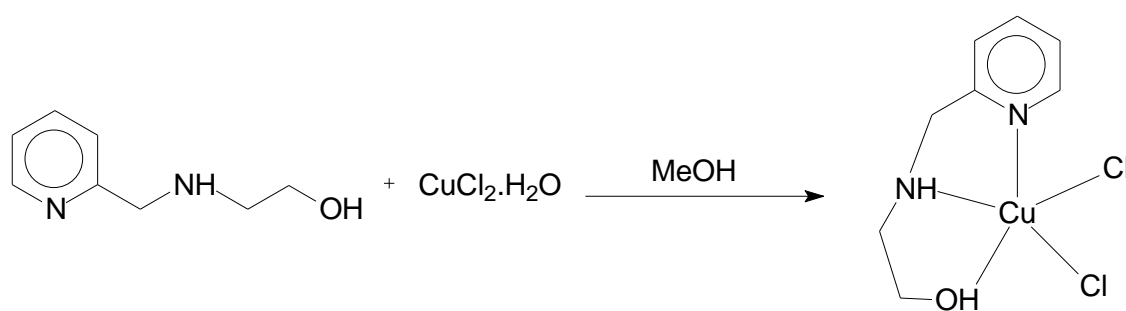
CoHPCINOL



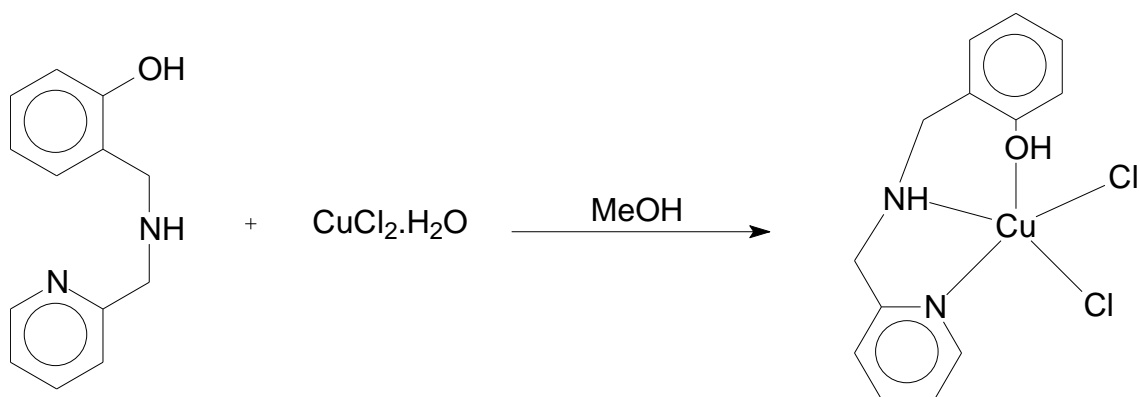
CuBMPA



CuMBPA



CuBSA



CuBSE

Figura 9: Fórmulas estruturais dos compostos de coordenação testados frente a *S. schenckii*.

Para o ensaio uma solução de inóculo foi preparada adicionando-se células fúngicas crescidas por 72 horas a uma solução salina com densidade óptica igual a 0,5 na escala McFarland (equivalente a 10^8 células por mL), seguindo leitura realizada pelo fotômetro Densimat (bioMérieux, França) com leitura no feixe de 550nm. Com o auxílio de uma micropipeta foi distribuído um volume de 1800 μ l de caldo BHI (Acumedia, EUA) em cubetas de vidro e em seguida 100 μ l de inóculo e 100 μ l dos compostos de coordenação. Foram chamados de “controles negativos” as alíquotas de 100 μ l do solvente Dimetilsulfóxido (DMSO), sais e ligantes dos complexos de coordenação e como “controles positivos” as alíquotas do antifúngico itraconazol. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Após estes procedimentos, os tubos foram levados à estufa de incubação a 37°C e leituras periódicas de densidade óptica foram realizadas. A última leitura foi feita quando o controle atingiu a capacidade máxima de leitura do fotômetro (igual a 7.5 da escala MacFarland). Os cultivos foram avaliados por fotometria e curvas de crescimento foram feitas para análise dos resultados (Araújo et al., 2004).

5.3 Ensaio de inibição do crescimento de *S. schenckii* por heteropoliácidos (HPAs) em meio de cultura líquido

Os oxoânions $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaVO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Na_2HPO_4 e AgNO_3 foram utilizados nas reações para obtenção dos seguintes HPAs utilizados neste trabalho:

- Dodecamolibdofosfato de Prata ($\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$);
- 12- tungstofosfato de Prata ($\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$);
- 12-tungstosilicato de Prata ($\text{Ag}_4[\text{SiW}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]$);
- 12-tungstosilicato de Prata ($\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$);

Para a síntese, o oxoânion específico foi solubilizado em água destilada e acidificado em solução até pH=2, extraído e, finalmente, misturado em solução de nitrato de prata para obtenção do seu sal. A síntese dos HPAs foi confirmada por alteração na coloração e por espectroscopia no infravermelho.

Para o teste de inibição a metodologia a ser utilizada foi a mesma descrita anteriormente para os tratamentos com compostos de coordenação. Nesta etapa, foram utilizados os heteropoliácidos para testes de inibição do crescimento de *S. schenckii* e como “controles negativos” foram utilizadas alíquotas de 100 µl do HPA na sua forma ácida ($H_3[PMo_{12}O_{40}]$) e o antifúngico itraconazol como controle positivo.

5.4 Ensaios de inibição do crescimento de *S. schenckii* por extratos da planta *Hymenaea stigonocarpa* em meio de cultura líquido.

A metodologia utilizada foi a mesma descrita anteriormente. Nesta etapa foram utilizados extratos brutos e semi-sintéticos extraídos da resina contida no epicarpo de *H. stigonocarpa*. Como “controles negativos” foram utilizadas alíquotas de 100 µl dos solventes Dimetilsulfóxido (DMSO, VETEC -Brasil) e hexano e o antifúngico itraconazol como controle positivo. Neste trabalho foram utilizados os seguintes extratos brutos : PS1, PS2, PS3, PS4, PS5, P1, P2, P5 e isozato e semi-sintéticos: S2A, S2B e S3A.

5.5 Ensaios de inibição do crescimento de *S. schenckii* pelo teste de difusão em ágar

Para o método de difusão em ágar, alíquotas de 100µL das suspensões dos fungos foram semeadas na superfície do meio de cultura BHA com o auxílio de um suabe estéril. Em cada placa previamente semeada foram perfurados orifícios circulares (mini-poços), com perfurador de 5 mm de diâmetro, onde foram

preenchidos com 50 μL (cada) de: moléculas sintéticas (compostos de coordenação e heteropoliácidos), extratos do Jatobá”, controle positivo (antifúngico itraconazol) e controles negativos (DMSO, hexano, ligantes e ácidos). Após incubação das placas por 5 dias, em estufa a 37°C, os diâmetros dos halos de inibição foram medidos com o auxílio de um paquímetro. Os resultados dos testes foram interpretados de acordo com a tabela de zonas de inibição baseada em *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests (NCCLS Third Edition 2008)* utilizando como comparação os controles positivos. Os experimentos foram realizados em triplicata e as médias dos resultados foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5% de probabilidade.

5.6 Ensaio de antifungigrama

O antifungigrama, ou teste de susceptibilidade aos antifúngicos, ainda não é utilizado como rotina da mesma forma que ocorre com o antibiograma para patógenos bacterianos. Embora tenha o respaldo do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), importante órgão internacional que padroniza e controla a realização de testes de sensibilidade, o mesmo somente é recomendado para situações mais específicas em casos em que o paciente portador de fungemia e/ou com sistema imune comprometido não responde bem ao tratamento, necessitando detectar se há o desenvolvimento de resistência ou para avaliar uma alternativa terapêutica.

Este ensaio foi realizado somente com os HPAs devido à sua disponibilidade em maiores quantidades.

Para o teste os compostos sintéticos HPAs e cinco antifúngicos padronizados foram testados frente a duas cepas (0198 e clínica LSA01) com o intuito de investigar possíveis efeitos sinérgicos entre eles, com o fungo na sua forma leveduriforme. As cepas 0198 e clínica LSA01 foram testadas frente aos sais de HPAs $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_6[\text{SiW}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]$ e $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$.

Para tal, os compostos foram incorporados ao ágar BHA após ser esterilizado, de modo que suas concentrações no agar foram de 350 e 540 µg/mL para $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$, 240 e 360 µg/mL para $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$, 360 e 550 µg/mL para $\text{Ag}_6[\text{SiW}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]$ e 370 e 550 para o HPA $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$ e discos dos antifúngicos Itraconazol (10 µg), Anfotericina B (100 µg), cetoconazol (50 µg), fluconazol (25 µg) e nitrato de miconazol (50µg) foram colocados na superfície do ágar BHA conforme instruções do fabricante (CECON, Brasil). As placas de Petri foram incubadas por 6 dias a 37° C. Ao fim deste período as zonas de inibição foram medidas com auxílio de um paquímetro.

5.7 Atividade Hemolítica

A atividade hemolítica das substâncias testadas foi determinada pelo método de difusão em ágar contendo sangue desfibrinado de carneiro. Primeiramente preparou-se o ágar BHA na proporção de 200mL para cada 100mL de sangue. Para o teste foram perfurados poços de 5mm de diâmetro em placas contendo ágar BHA adicionado de sangue, onde foram adicionados 50 µl dos compostos testados. Na seqüência, as placas foram incubadas a 37°C por 24h e observados o efeito hemolítico dos mesmos.

5.8 Microscopia óptica e Análise Ultraestrutural e de Superfície

5.8.1 Microscopia Óptica

Para microscopia óptica, todas as células tratadas em meio líquido foram coradas pelo método de coloração de GRAM (BioChemika, for microscopy (Fluka) e posteriormente observadas em microscópio óptico Zeiss Axioplan.

5.8.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão e Varredura

As células do fungo *S. schenckii* foram processadas para a análise por microscopia eletrônica de transmissão e varredura para verificação de suas estruturas na presença (tratadas) e ausência (controle, não tratadas) dos compostos testados a fim de se observar possíveis alterações morfológicas e ultra-estruturais. As amostras dos fungos foram preparadas de modo que os cultivos de *S. schenckii* em caldo BHI sem e com tratamento com compostos coordenação (nucleases sintéticas), heteropoliácidos e extratos de Jatobá foram centrifugados e o precipitado obtido de cada amostra foi fixado por duas horas à temperatura ambiente em glutaraldeído 2,5% grau II (Sigma[®], EUA) e tampão Cacodilato 0,1M pH 7.4. Após a fixação, a amostra foi lavada 3 vezes durante 5 minutos em tampão Cacodilato 0,1M, pH 7.4 e pós-fixada por 20 minutos em tetróxido de ósmio 1% (OsO₄, Sigma[®], EUA) adicionado de ferrocianeto de potássio 0,8% (Sigma[®], EUA) ao abrigo da luz. Em seguida, as células foram lavadas com o mesmo tampão e desidratadas em séries crescentes de acetona: 15%, 30%, 50%, 70%, 90% e finalmente por três vezes a 100% (durante 20 minutos cada). Logo depois, as amostras foram infiltradas em etapas de 6 horas em resina epóxi (PolyBed 812 - PolyScience[®], EUA), iniciando em concentrações decrescentes de acetona:epon 3:1, 2:1, 1:1, e depois crescentes 1:2, 1:3 e finalmente incluídas em resina epoxi pura. Após 6 horas as amostras foram emblocadas e colocadas em estufa a 60°C para polimerização por 48 horas e os blocos obtidos foram cortados em Ultramicrótomo Reichert Ultracut's (Leica[®], Suíça). Os cortes ultrafinos foram colocados em grades de cobre, contrastados em acetato de uranila 5% e citrato de chumbo durante 20 e 5 minutos respectivamente e lavados em água deionizada. Depois de secos, os mesmos foram visualizados em Microscópio Eletrônico de Transmissão Zeiss TEM 900 a 80KV.

Para visualização no microscópio eletrônico de varredura, as amostras de leveduras após tratamento, foram fixadas em glutaraldeído 2,5% grau II (Sigma[®], EUA) e tampão Cacodilato 0,1M pH 7.4, lavadas 3 vezes por 5 min com o mesmo tampão e aderidas em lamínulas com poly-L- lisina e pós-fixada com Tetróxido de Ósmio 1% (OsO₅, Sigma[®], EUA) adicionado de ferrocianeto de potássio 0,8%,

lavadas 3 vezes com o mesmo tampão e desidratadas em séries crescentes de etanol: 15%, 30%, 50%, 70%, 90% e finalmente a 100% três vezes (por 20 min cada etapa). Em seguida, as amostras foram secas em aparelho de ponto crítico Bal-Tec Sputter Coater SDC 050, montadas em *stabs*, pulverizadas com ouro (metalização) e finalmente observadas em Microscópio Eletrônico de Varredura Zeiss DSM - 912 a 15 KV.

5.9 Análises dos dados

Com os dados referentes aos ensaios em meio líquido foi realizada a estatística descritiva com média aritmética, desvio padrão e erro padrão da média em um intervalo de confiança de 95%. Para os diâmetros dos halos pelo teste de difusão em ágar foi realizada a estatística descritiva, com média aritmética, desvio padrão e erro padrão da média, análises de variância (ANOVA) e testes de comparações múltiplas entre as médias Tuckey e Duncan com um nível de significância de 0,05%.

6 - RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 Atividade hemolítica

Para se determinar a provável citotoxicidade dos compostos sintéticos e naturais, alíquotas de 50 μ L dos mesmos, nas concentrações de 0,56 μ M/mL para os sais de HPAs, 0,22mg/mL para os compostos de coordenação e 1,5mg/mL para os extratos do “Jatobá”, foram depositados em orifícios de 5 mm de diâmetro em placas contendo ágar com sangue desfibrinado de carneiro e incubados a 37°C para observação de halo de inibição.

Como mostrado na figura 9, os compostos de coordenação e extratos de “Jatobá” não apresentaram atividade hemolítica, enquanto que os sais dos heteropoliácidos mostraram halos muito pequenos indicativos de hemólise.

Geralmente a atividade hemolítica de moléculas antimicrobianas em relação à eritrócitos é frequentemente usada como indicativo de citotoxicidade.

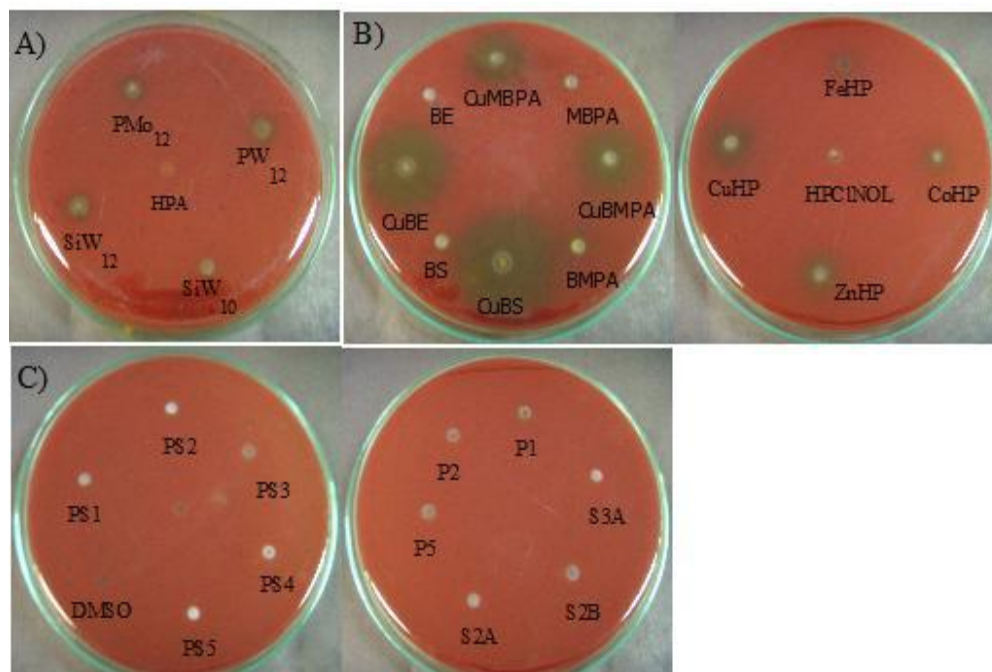


Figura 9: Teste de hemólise por difusão em ágar Mueller Hinton com sangue de carneiro: (A) heteropoliácidos (0,56 μ M/mL); (B) compostos de coordenação (0,22mg/mL); (C) extratos do Jatobá (1,5g/mL).

6.2 Curvas de crescimento

Para se avaliar o efeito fungicida ou fungistático dos compostos sintéticos denominados de compostos de coordenação e sais de heteropoliácidos e substâncias naturais extraídas da planta *Hymenaea stigonocarpa* sobre o fungo *S. schenckii*, foram construídas curvas de crescimento do fungo na sua forma leveduriforme, em caldo BHI, na presença destas substâncias durante aproximadamente 22 dias.

6.3 Ensaio de inibição do crescimento de *S. schenckii* por sais de Heteropoliácidos em meio líquido:

Nos ensaios de inibição realizados foi observado que em meio líquido, o efeito dos HPAs com o sal de prata $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$ foi mais eficiente sobre a forma leveduriforme da cepa 0205 e 0206 de *S. schenckii* do que sobre as cepas 0198 e 0199 (gráficos 1 - 7). Já o sal de HPA $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$ foi mais eficiente sobre as cepas 0199 e 0205 do que os HPAs $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$ e $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$ (gráficos 2 e 3). Somente o HPA $\text{Ag}_6[\text{SiW}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]$ não mostrou efeito significativo em ambos os testes de susceptibilidade sobre as células fúngicas mesmo com aumento de sua concentração de $0,28 \mu\text{M}/\text{mL}$ para $0,56 \mu\text{M}/\text{mL}$, em difusão em ágar (figura 15).

Todos os sais de HPAs testados apresentaram efeito fungistático sobre *S. schenckii* (figura 10). Em estudos anteriores com o fungo *Malassezia pachydermatis*, causador de otite em cães e gatos, o sal de HPA $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$ também foi efetivo provocando efeitos fungicidas e fungistáticos sobre as leveduras (Silva 2007). Quando os mesmos HPAs, contendo nitrato de prata em sua fórmula, foram testados sobre *Candida albicans* e sobre a bactéria *Staphylococcus aureus* enterotoxigênia de origem bovina (LSA88) e sobre outras cepas padronizadas, também demonstraram efeito inibitório, enquanto que o nitrato de prata isoladamente não provocou o mesmo efeito caracterizando a ação antimicrobiana provocada pelo sinergismo entre suas moléculas.

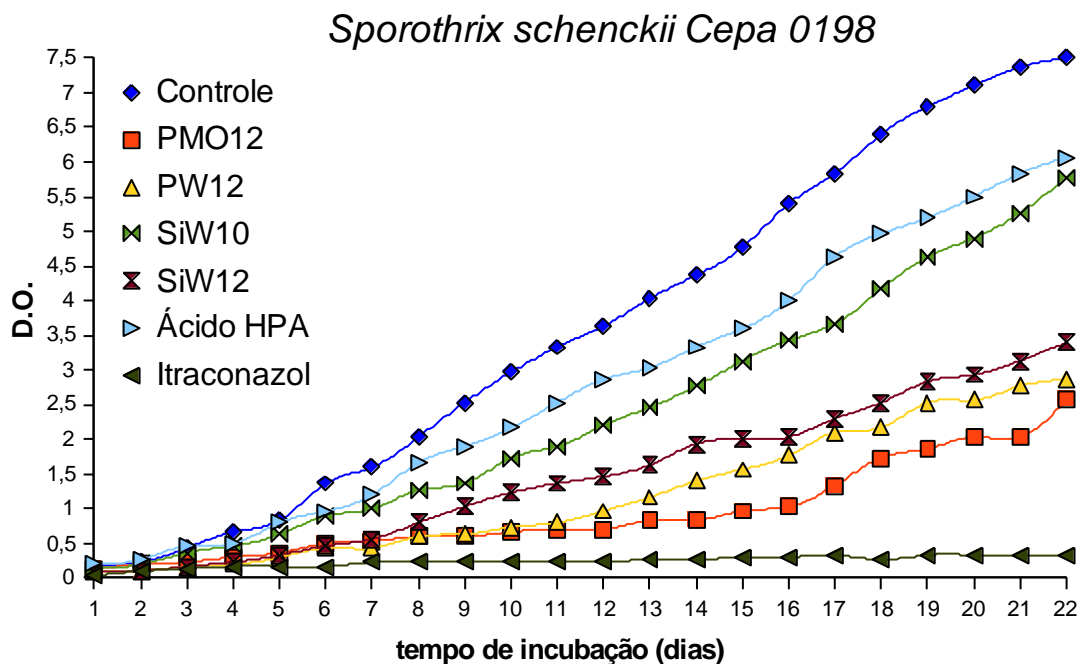


Gráfico 1: Curva de crescimento de células leveduriformes de *S. schenckii* (cepa 0198) na presença de sais de heteropoliácidos cultivados em caldo BHI. ($\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_6[\text{SiW}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$, Ácido HPA (HPAs $0,28\mu\text{M}/\text{mL}$ e Itraconazol $1\text{mg}/\text{mL}$). O valor em cada ponto corresponde à média entre as triplicatas. A variação entre as triplicatas foi ≤ 5 .

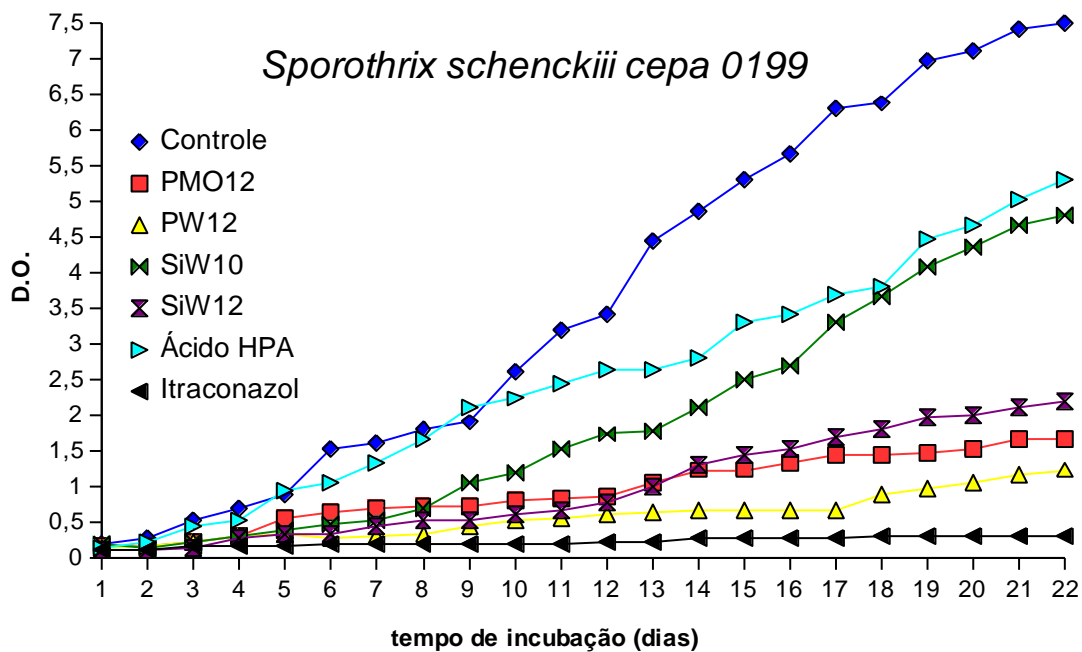


Gráfico 2: Curva de crescimento de células leveduriformes de *S. schenckii* (cepa 0199) na presença de sais de heteropoliácidos cultivados em caldo BHI. ($\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_6[\text{SiW}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$, Ácido HPA (HPAs $0,28\mu\text{M}/\text{mL}$ e Itraconazol $1\text{mg}/\text{mL}$). O valor em cada ponto corresponde à média entre as triplicatas. A variação entre as triplicatas foi ≤ 5 .

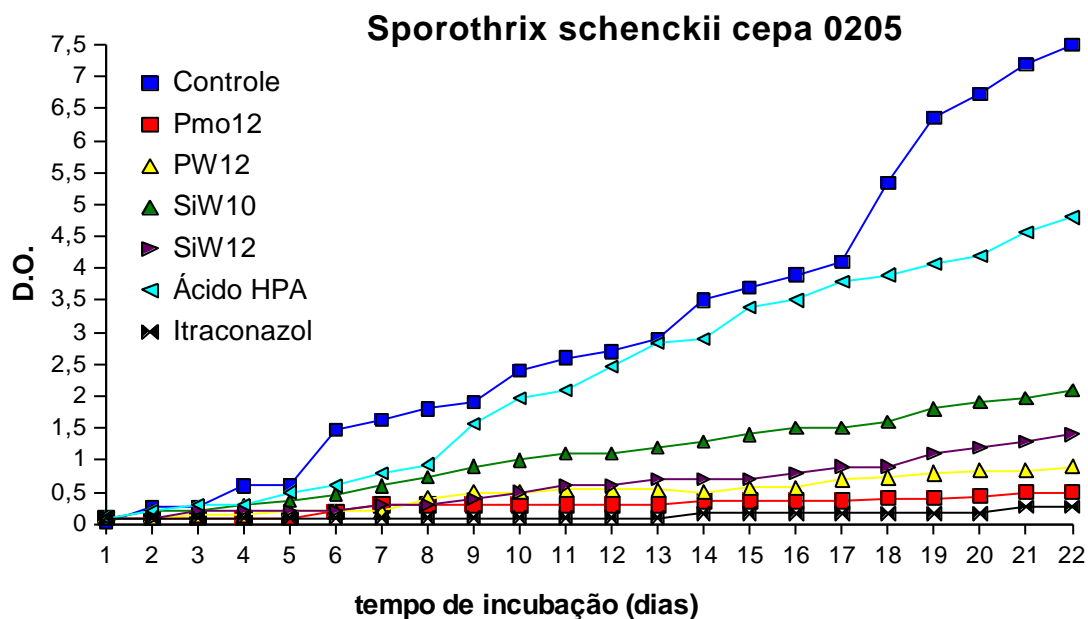


Gráfico 3: Curva de crescimento de células leveduriformes de *S. schenckii* (cepa 0205) na presença de sais de heteropoliácidos cultivados em caldo BHI. ($\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_6[\text{SiW}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$, Ácido HPA. (HPAs $0,28\mu\text{M}/\text{mL}$ e Itraconazol $1\text{mg}/\text{mL}$). O valor em cada ponto corresponde à média entre as triplicatas. A variação entre as triplicatas foi ≤ 5 .

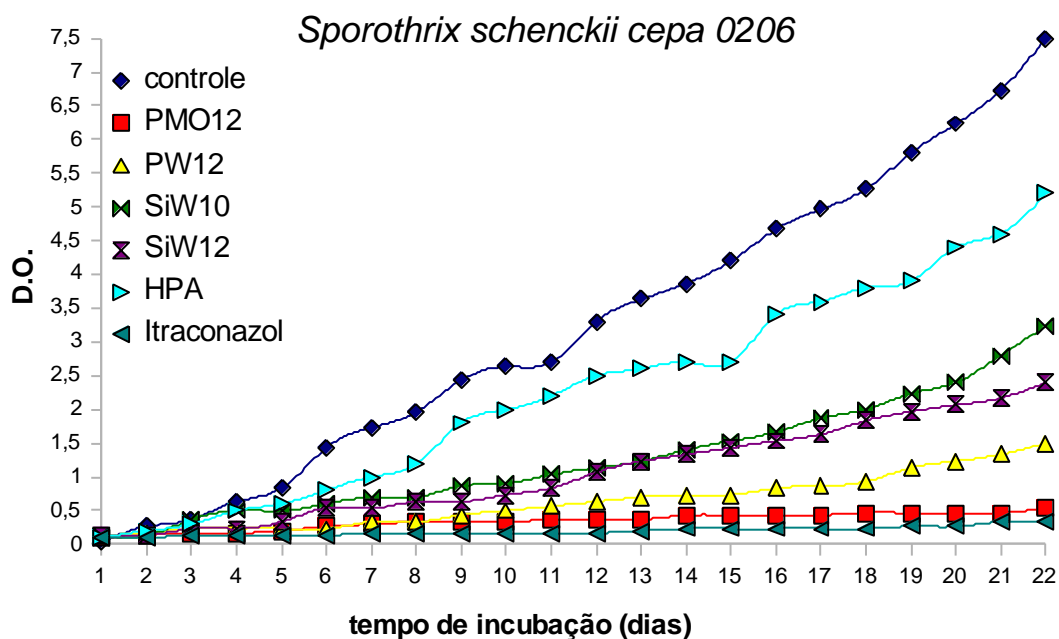


Gráfico 4: Curva de crescimento de células leveduriformes de *S. schenckii* (cepa 0206) na presença de sais de heteropoliácidos cultivados em caldo BHI. ($\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_6[\text{SiW}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$, Ácido HPA (HPAs $0,28\mu\text{M}/\text{mL}$ e Itraconazol $1\text{mg}/\text{mL}$). O valor em cada ponto corresponde à média entre as triplicatas. A variação entre as triplicatas foi ≤ 5 .

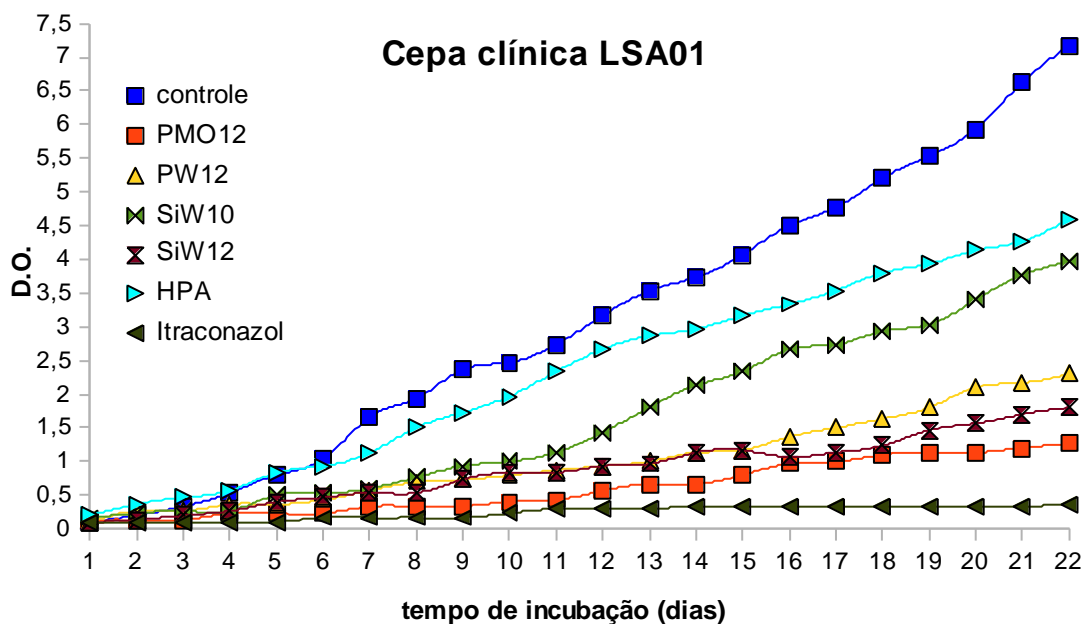


Gráfico 5: Curva de crescimento de células leveduriformes de *S. schenckii* (cepa clínica) na presença de sais de heteropoliácidos cultivados em caldo BHI. ($\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_6[\text{SiW}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$, Ácido HPA. (HPAs $0,28\mu\text{M}/\text{mL}$ e Itraconazol $1\text{mg}/\text{mL}$). O valor em cada ponto corresponde à média entre as triplicatas. A variação entre as triplicatas foi ≤ 5 .

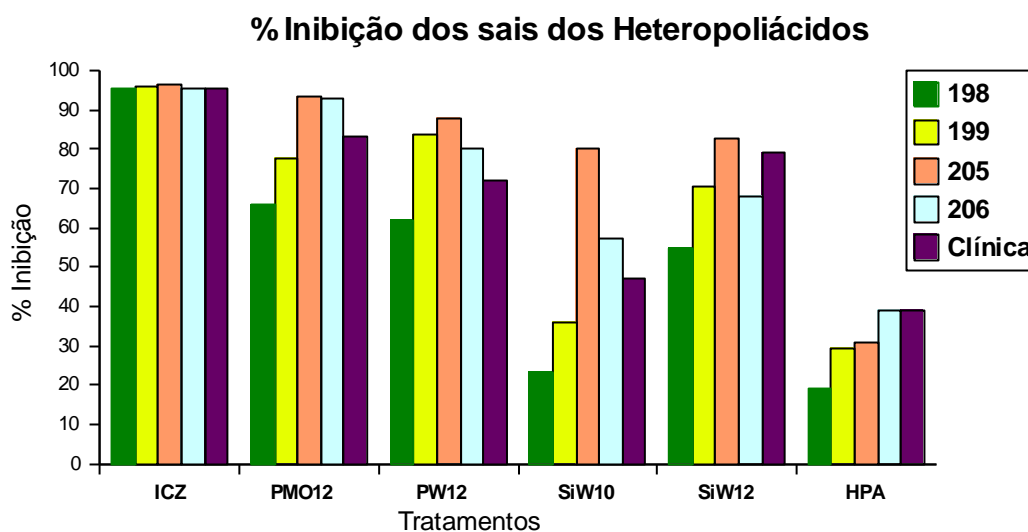


Gráfico 6: Percentual de inibição dos sais de HPAs sobre as cepas 0198,0199,0205,0206 e clinica LSA01 de *S. schenckii*.

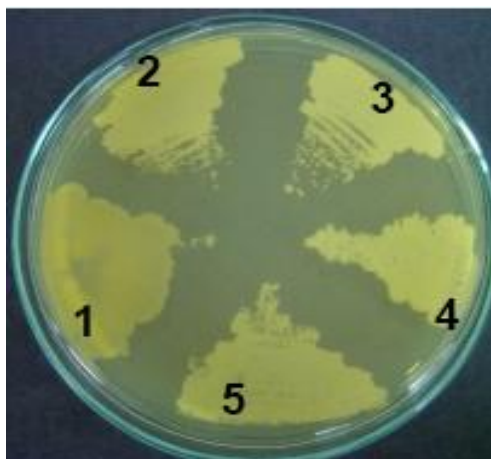


Figura 10: Crescimento de *S. schenckii* (cepa 0199) em ágar BHA a 37°C após 22 dias de incubação com os sais de HPAs demonstrando seu efeito fungistático: (1) controle, (2) tratamento com $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$, (3) tratamento com $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$, (4) tratamento com $\text{Ag}_6[\text{SiW}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]$ e (5) tratamento com $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$.

6.4 Ensaio de inibição do crescimento de *S. schenckii* pelos compostos de coordenação utilizando os metais zinco (Zn), cobre (Cu) e cobalto (Co) complexados ao ligante HPCINOL

Ambos os compostos apresentaram efeito inibitório frente às células leveduriformes de *S. schenckii*, entretanto esses efeitos foram diferenciados de acordo com a cepa e o metal testado. Como mostrado no gráfico 12, a maior inibição foi adquirida quando se testou o ligante HPCINOL sozinho com uma média de inibição de 95% entre as cepas, obtendo-se uma atividade similar ao antifúngico itraconazol para todas as cepas. Seu efeito fungicida foi comprovado quando uma alíquota de 20 µL do tratamento foi semeado em ágar BHA e incubado a 37°C (figura 11). Quanto aos três complexos com base zinco, cobre e cobalto, a cepa mais susceptível foi a 0199. A cepa mais resistente para o complexo com zinco foi a clínica, enquanto que a mais resistente para os complexos de cobre e cobalto foram respectivamente as cepas 0206 e 0205. A melhor atividade foi observada quando se utilizou o complexo com base zinco (ZnHP) sobre todas as cepas, com exceção da cepa clínica que apresentou melhor inibição pelos complexos com cobalto e cobre (72%, 65,7% respectivamente). A atividade do complexo com base cobre variou entre 60 e 70% entre as cepas, enquanto que com base cobalto a variação foi entre 60 e 80%.

Neste ensaio também foram avaliadas, como controle negativo, as atividades dos sais dos metais utilizados na síntese dos compostos de coordenação: cloretos de Zn, Cu e Co. O cloreto de zinco (ZnCl) mostrou um perfil de inibição de aproximadamente 55% para todas as cepas, enquanto que para os cloretos de cobre e cobalto a inibição foi maior para as cepas 0198/0206 e 0198/clínica, respectivamente (gráfico 12).

Os complexos ZnHPCINOL, CuHPCINOL e CoHPCINOL utilizados neste trabalho também apresentaram atividade antifúngica sobre *Candida albicans* (Assis et al., 2007) e *Malassezia pachydermatis*, causadora de otite em cães e gatos (Silva 2007). Sobre *M. pachydermatis*, os autores relataram que o complexo com base zinco apresentou melhor atividade do que os complexos de cobalto e cobre. No mesmo trabalho foi relatado que os cloretos de Zn, Cu e Co não inibiram o crescimento da levedura, o que não aconteceu com o *S. schenckii* no

presente trabalho.

Nos últimos anos os complexos de metais de transição têm despertado bastante interesse na área médica pelo fato de apresentarem atividade biológica frente a diferentes microrganismos patogênicos como *S. pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Candida albicans* e outros (Casas et al., 2000; Schwiertert Mc Cue, 1999). A atuação de íons metálicos na potencialização da atividade biológica de compostos orgânicos utilizados como fármacos sugere que os metais têm um efeito considerável no modo de ação de alguns medicamentos como, por exemplo, no antibiótico Sparfloxacina, o qual possui alta atividade sobre bactérias *Streptococcus pneumoniae* e *Mycobacterium tuberculosis* (Rocha 2008). No presente trabalho foi observado que a presença dos metais zinco, cobre e cobalto reduziram o efeito inibitório do ligante HPCINOL em quase 20%.

Em 2008 Assis e colaboradores observaram que compostos de coordenação com centros metálicos de zinco, cobre (II), cobalto (II) e ferro (III) complexados ao ligante H₂BPCINOL (N-(2-hidroxibenzil)-N-(2-metilpiridil)[3-cloro](2-hidroxi)]propilamina) apresentaram atividade biológica contra nove cepas da bactéria *S. aureus*, enquanto que os mesmos compostos de coordenação complexados com o ligante HPCINOL (1-bis-piridin-2-ilmetil-amino)-3-cloropropan-2-ol), utilizados neste trabalho frente a *S. schenckii*, não apresentaram atividade inibitória quando testados sobre a bactéria *S. aureus* LSA88, isolada de bovino e produtora das enterotoxinas C, D e TSST-1 (Rocha 2008).

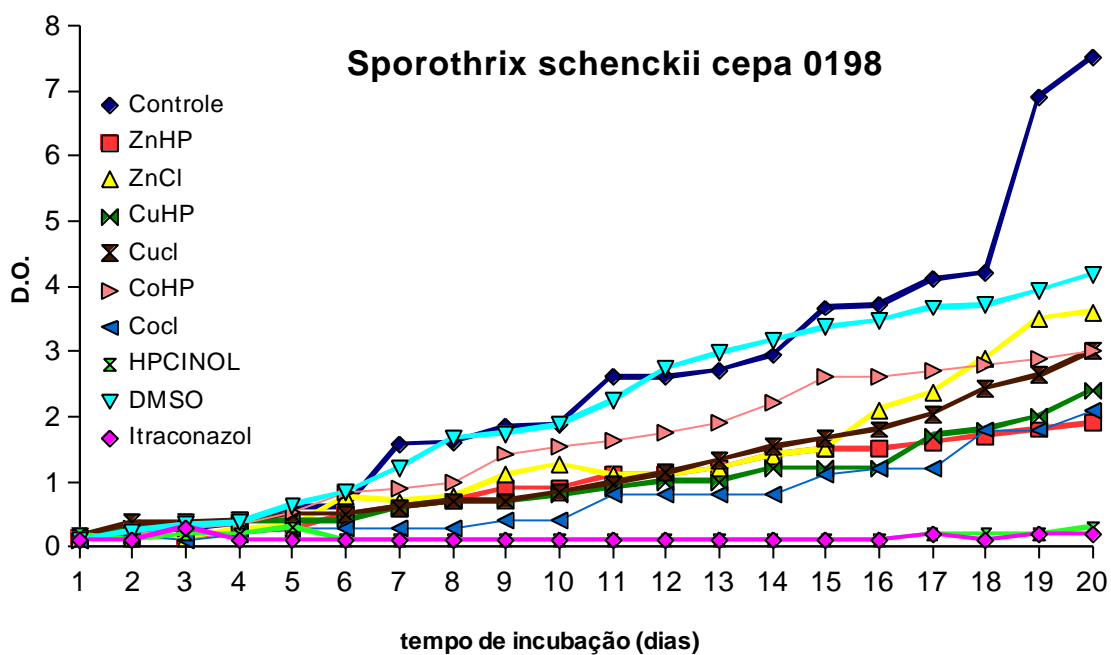


Gráfico 7: Curva de crescimento de células leveduriformes de *S. schenckii* (cepa 0198) na presença dos compostos de coordenação cultivados em caldo BHI. (ZnHPCINOL, ZnCl, CuHPCINOL, CuCl, CoHPCINOL, CoCl na concentração de 0,22mg/mL e Itraconazol 1mg/mL). O valor em cada ponto corresponde à média entre as triplicatas. A variação entre as triplicatas foi ≤ 5 .

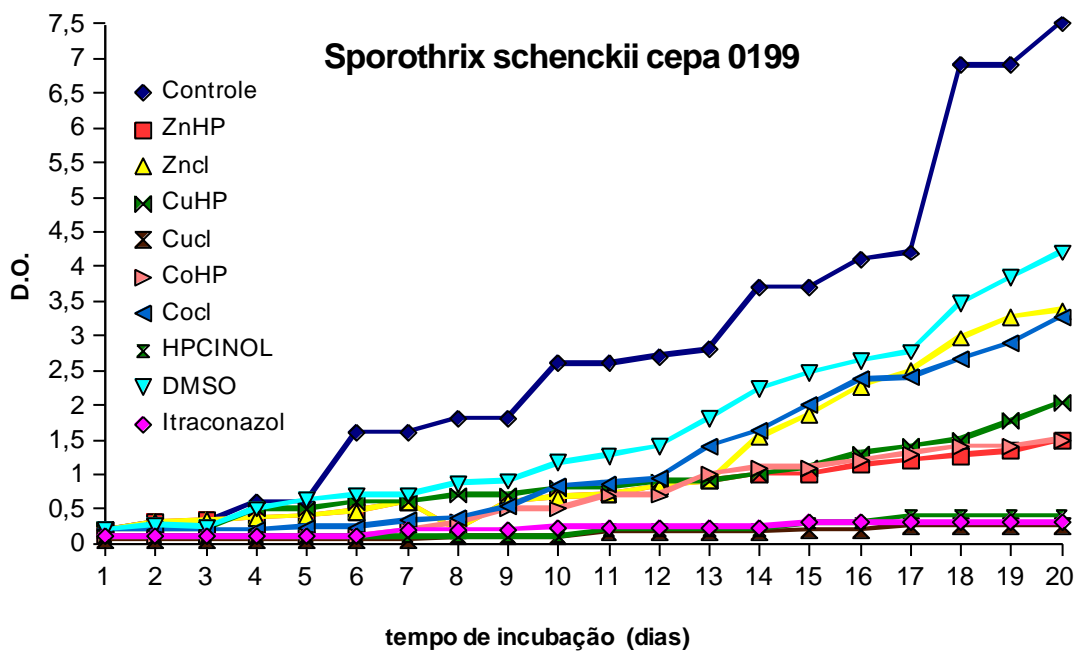


Gráfico 8: Curva de crescimento de células leveduriformes de *S. schenckii* (cepa 0199) na presença dos compostos de coordenação cultivados em caldo BHI. (ZnHPCINOL, ZnCl, CuHPCINOL, CuCl, CoHPCINOL, CoCl na concentração de 0,22mg/mL e Itraconazol 1mg/mL). O valor em cada ponto corresponde à média entre as triplicatas. A variação entre as triplicatas foi ≤ 5 .

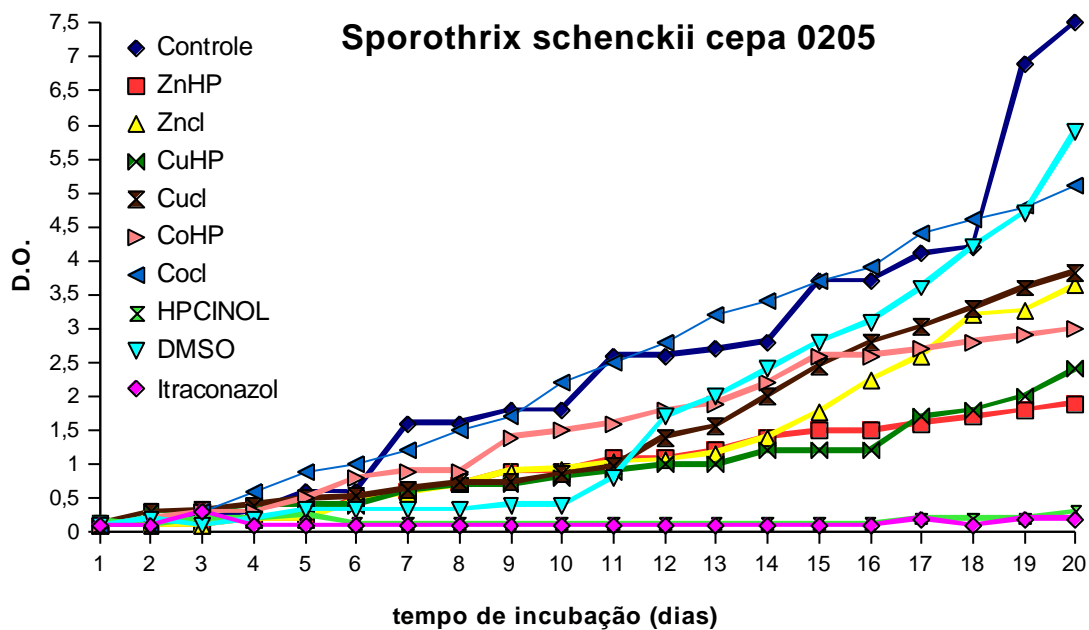


Gráfico 9: Curva de crescimento de células leveduriformes de *S. schenckii* (cepa 0205) na presença dos compostos de coordenação cultivados em caldo BHI. (ZnHPCINOL, ZnCl, CuHPCINOL, CuCl, CoHPCINOL, CoCl na concentração de 0,22mg/mL e Itraconazol 1mg/mL). O valor em cada ponto corresponde à média entre as triplicatas. A variação entre as triplicatas foi ≤ 5 .

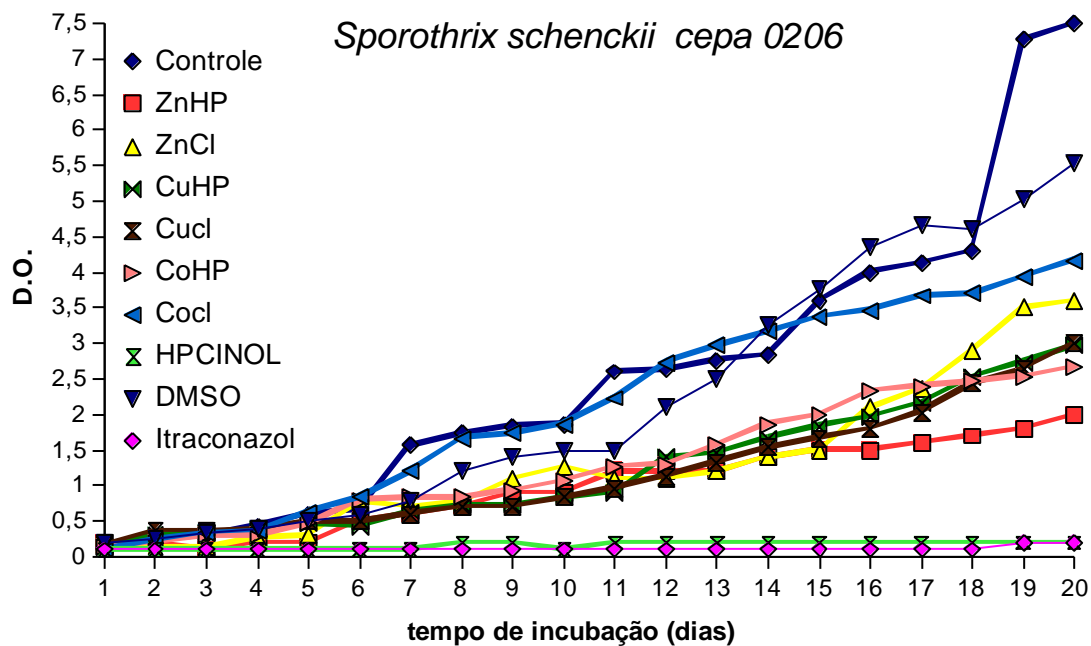


Gráfico 10: Curva de crescimento de células leveduriformes de *S. schenckii* (cepa 0206) na presença dos compostos de coordenação cultivados em caldo BHI. (ZnHPCINOL, ZnCl, CuHPCINOL, CuCl, CoHPCINOL, CoCl na concentração de 0,22mg/mL e Itraconazol 1mg/mL). O valor em cada ponto corresponde à média entre as triplicatas. A variação entre as triplicatas foi ≤ 5 .

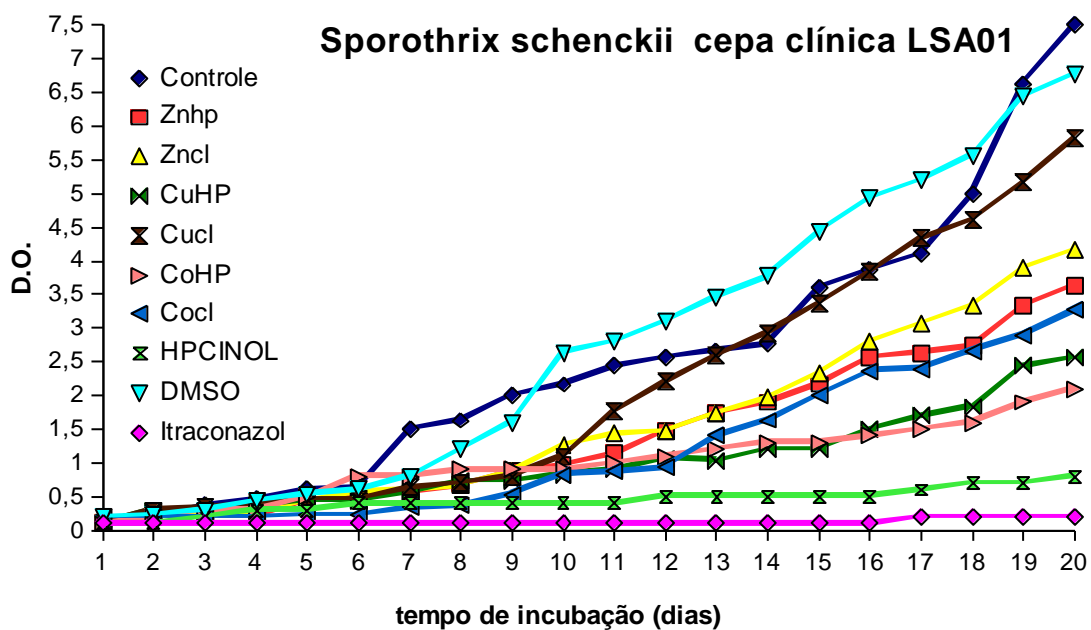


Gráfico 11: Curva de crescimento de células leveduriformes de *S. schenckii* (cepa clínica) na presença dos compostos de coordenação cultivados em caldo BHI. (ZnHPCINOL, ZnCl, CuHPCINOL, CuCl, CoHPCINOL, CoCl na concentração de 0,22mg/mL e Itraconazol 1mg/mL). O valor em cada ponto corresponde à média entre as triplicatas. A variação entre as triplicatas foi ≤ 5 .

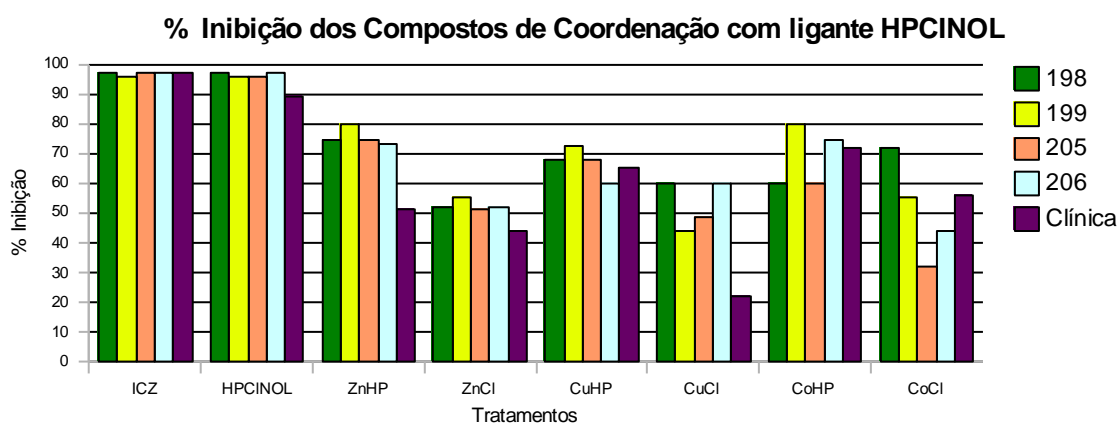


Gráfico 12: Percentual de inibição dos compostos de coordenação com o ligante HPCINOL complexado aos metais zinco, cobre e cobalto e seus respectivos sais metálicos utilizados como controles negativos sobre as células leveduriformes de *S. schenckii*. (CC: concentração de 0,22mg/mL e ICZ: 1 mg/mL).

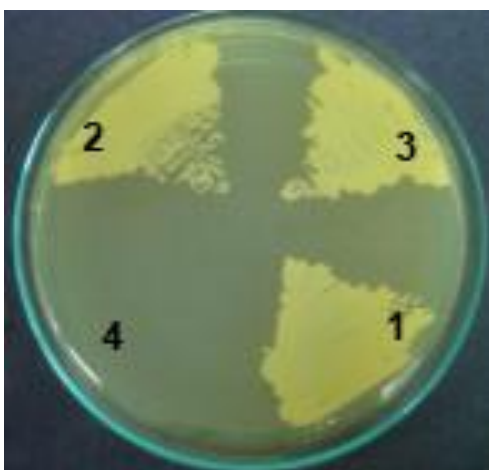


Figura 11: Crescimento de *S. schenckii* (cepa 0199) em ágar BHA a 37°C após 20 dias de incubação com os compostos de coordenação com o ligante HPCINOL demonstrando efeito fungicida e fungistático: (1) controle, (2) tratamento com ZnHP, (3) tratamento com ZnCl, (4) tratamento com HPCINOL.

6.5 Ensaio de inibição do crescimento de *S. schenckii* pelos compostos de coordenação utilizando o metal cobre (Cu) complexados aos ligantes BMPA, MBPA, BSA e BSE em meio de cultura líquido.

Os quatro compostos de coordenação com base cobre: CuBMPA, CuMBPA, CuBSA e CuBSE e seus ligantes, separadamente, apresentaram um grande efeito inibitório sobre as cepas de *Sporothrix schenckii* (gráficos 13 a 18) com perfis de inibição similares pelo teste em meio de cultura líquido. A cepa mais resistente foi a clínica LSASs01, enquanto que as demais apresentaram susceptibilidade variando entre 70 e 95% (gráfico 18). Apesar do grande efeito inibitório, nenhum dos compostos demonstrou característica fungicida sobre as cepas de *S. schenckii* como ocorreu com o ligante HPCINOL discutido anteriormente (figura 12).

Foi observado neste ensaio que a complexação do cobre aumentou o perfil de inibição dos ligantes BMPA, BSA e BSE em 7%, 15% e 5%, respectivamente, enquanto que o percentual de inibição do composto de coordenação CuMBPA e o ligante MBPA sozinho foi de 90% para ambos.

Os compostos de coordenação têm demonstrado diferentes efeitos sobre vários microrganismos de importância humana e veterinária, entre as quais as bactérias *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e fungos leveduriformes como *C. albicans* e fungos filamentosos como *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Penicillium expansum* e *Alternaria brassicola* (Namli et al., 2007). Alguns destes compostos de coordenação podem se comportar como nucleases sintéticas e mediar o rompimento da fita de DNA (Jiménez-Garrido et al., 2005).

A busca por novas drogas com função terapêutica que possuam amplos espectros de atuação que diminua os problemas como resistência antimicrobiana, toxicidade pelo uso prolongado e interação entre drogas é uma realidade. Compostos de coordenação complexados a metais de transição têm despertado o interesse dos pesquisadores devido às suas diferentes atividades biológicas sobre microrganismos de importância veterinária e humana.

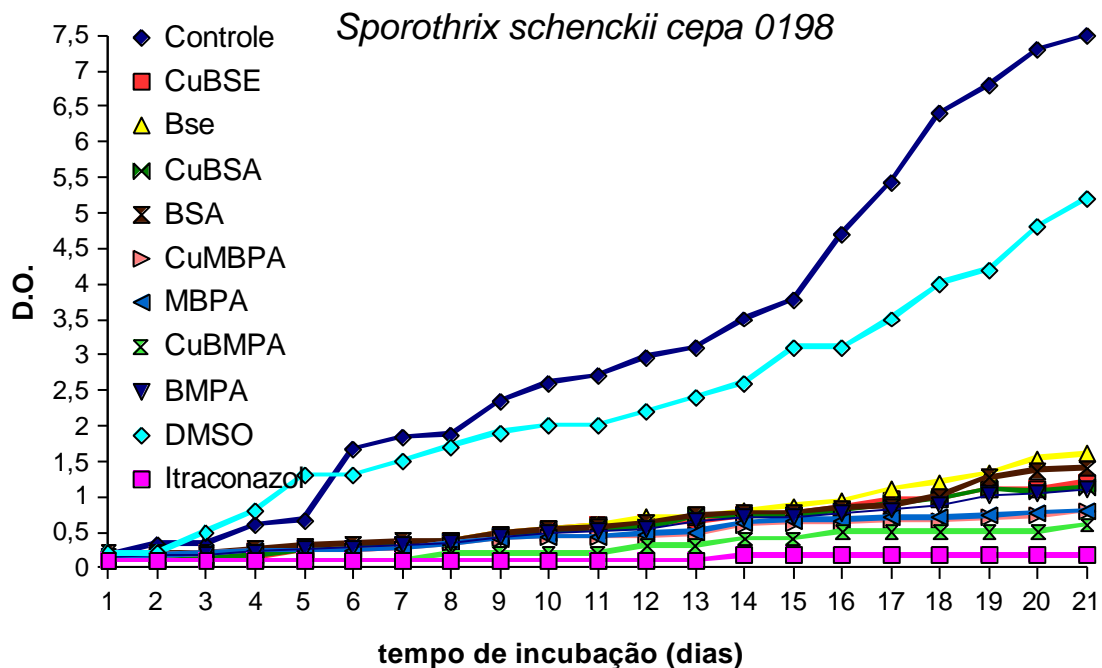


Gráfico 13: Curva de crescimento de células leveduriformes de *S. schenckii* (cepa 0198) na presença dos compostos de coordenação CuBMPA, CuMBPA, CuBSA, e CuBSE cultivados em caldo BHI (Concentrações: CC: 0,22mg/mL e ICZ 1mg/mL). O valor em cada ponto corresponde à média entre as triplicatas. A variação entre as triplicatas foi ≤ 5 .

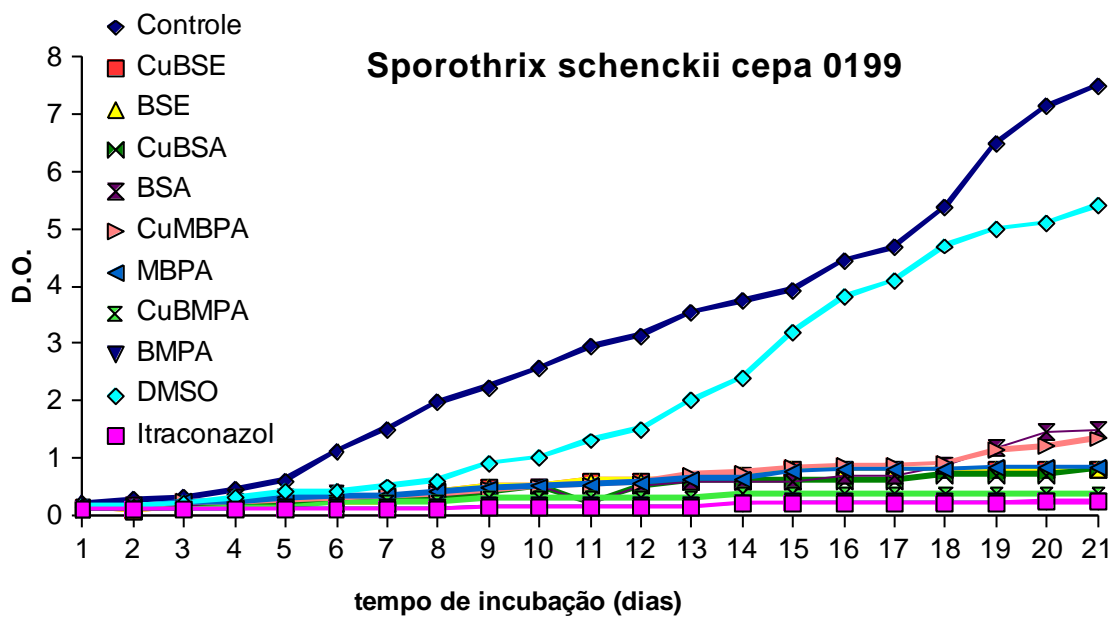


Gráfico 14: Curva de crescimento de células leveduriformes de *S. schenckii* (cepa 0199) na presença dos compostos de coordenação CuBMPA, CuMBPA, CuBSA, e CuBSE cultivados em caldo BHI (Concentrações: CC: 0,22mg/mL e ICZ 1mg/mL). O valor em cada ponto corresponde à média entre as triplicatas. A variação entre as triplicatas foi ≤ 5 .

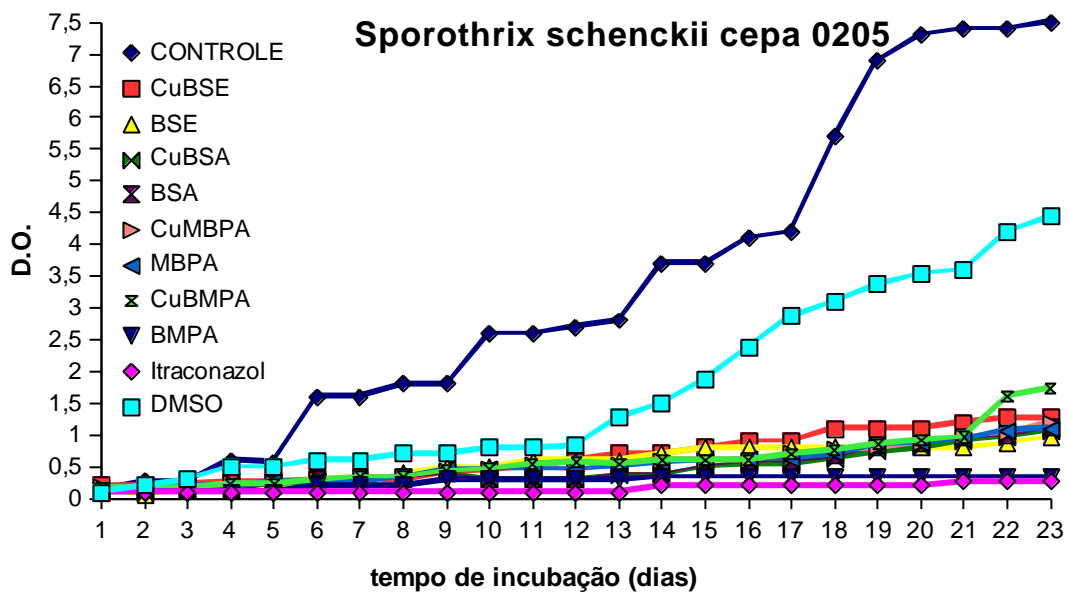


Gráfico 15: Curva de crescimento de células leveduriformes de *S. schenckii* (cepa 0205) na presença dos compostos de coordenação CuBMPA, CuMBPA, CuBSA, e CuBSE cultivados em caldo BHI (Concentrações: CC: 0,22mg/mL e ICZ 1mg/mL). O valor em cada ponto corresponde à média entre as triplicatas. A variação entre as triplicatas foi ≤ 5 .

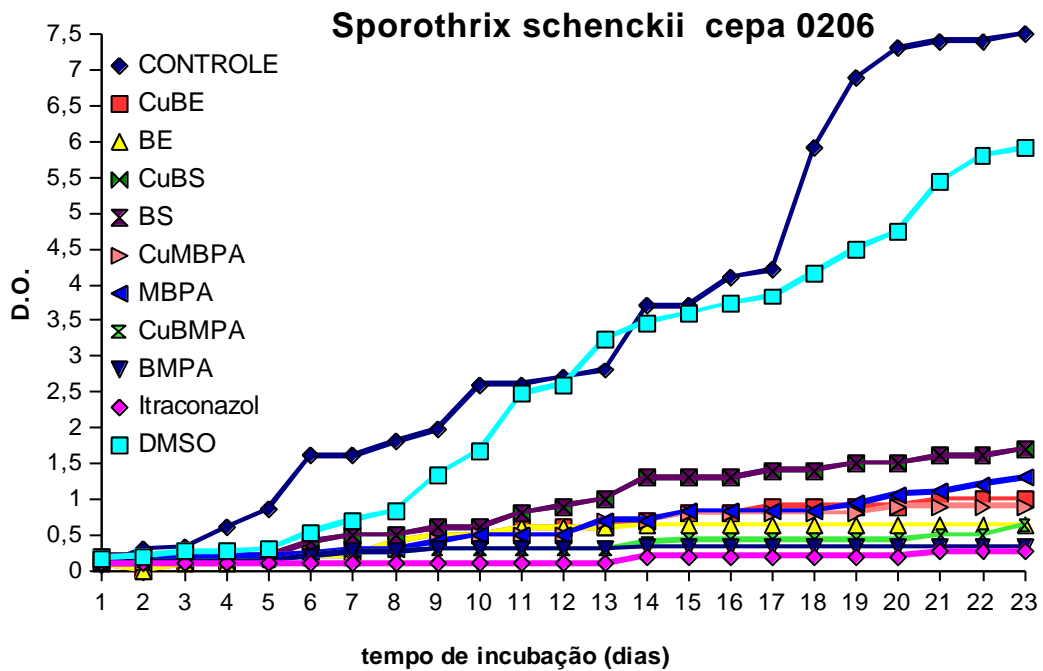


Gráfico 16: Curva de crescimento de células leveduriformes de *S. schenckii* (cepa 0206) na presença dos compostos de coordenação CuBMPA, CuMBPA, CuBSA, e CuBSE cultivados em caldo BHI (Concentrações: CC: 0,22mg/mL e ICZ 1mg/mL). O valor em cada ponto corresponde à média entre as triplicatas. A variação entre as triplicatas foi ≤ 5 .

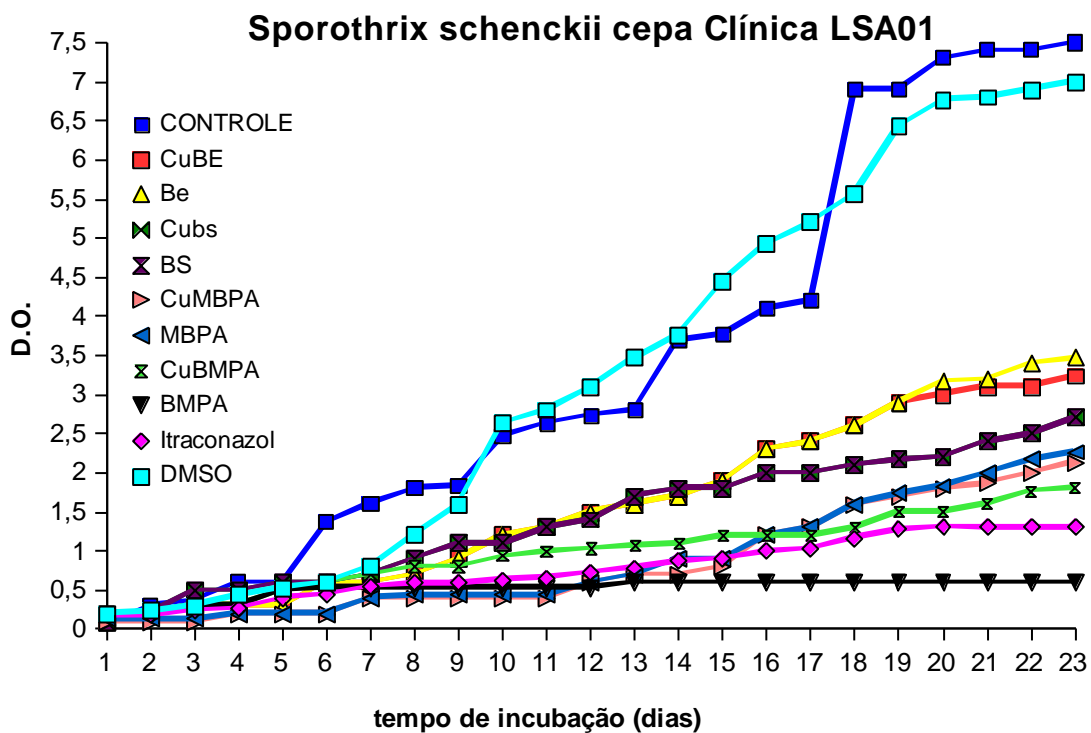


Gráfico 17: Curva de crescimento de células leveduriformes de *S. schenckii* (cepa clínica LSA01) na presença dos compostos de coordenação CuBMPA, CuMBPA, CuBSA, e CuBSE cultivados em caldo BHI (Concentrações: CC: 0,22mg/mL e ICZ 1mg/mL). O valor em cada ponto corresponde à média entre as triplicatas. A variação entre as triplicatas foi ≤ 5 .

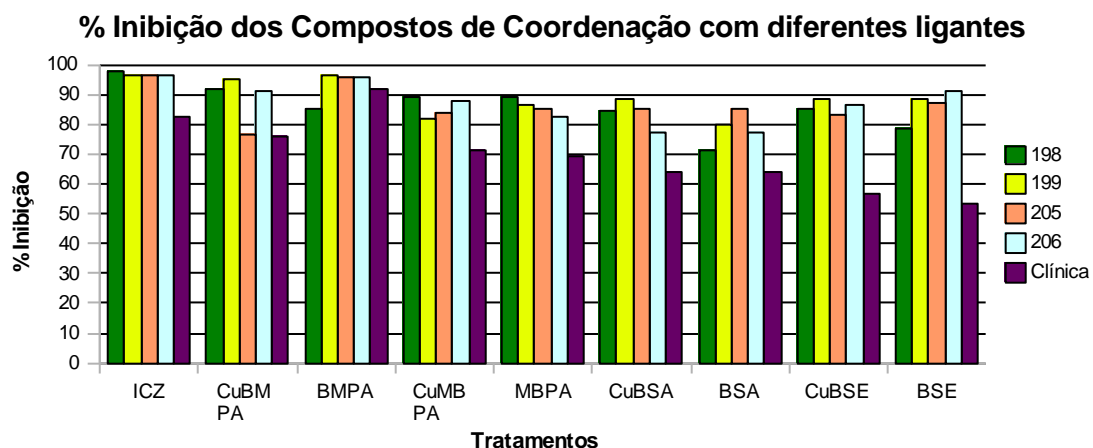


Gráfico 18: Percentual de inibição dos compostos de coordenação com base cobre e diferentes ligantes: CuBMPA, CuMBPA, CuBSA, e CuBSE cultivados em caldo BHI (CC 0,22mg/mL e ICZ 1mg/mL) sobre as células leveduriformes de *S. schenckii*. (CC: concentração de 0,22mg/mL e ICZ: 1mg/mL).

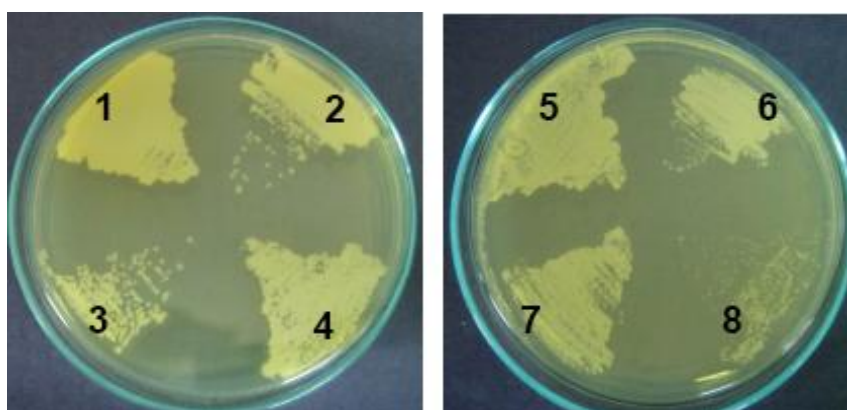


Figura 12: Crescimento de *S. schenckii* (cepa 0199) em ágar BHA a 37°C após 23 dias de tratamento com CC com base cobre complexados aos ligantes BMPA, MBPA, BSA e BSE demonstrando efeito fungistático (CC: 0,22mg/mL e ICZ: 1mg/mL): (1) controle, (2) CuBSE, (3) BSE, (4) CuBSA, (5) CuMBPA, (6)CuBMPA, (7) MBPA, (8) BMPA .

6. 6 Ensaio de inibição do crescimento de *S. schenckii* pelos extratos brutos e semi-sintéticos extraídos de “jatobá do cerrado” em meio de cultura líquido.

O efeito dos extratos de jatobá na concentração de 500 mg/mL em meio líquido foi consistente contra *S. schenckii*, sendo todos fungistáticos. Nos ensaios de microscopia eletrônica de transmissão e varredura foi possível observar alterações ultra-estruturais no fungo. Os gráficos 19 a 24 demonstram o efeito dos extratos. O grau de inibição alcançado contra as cepas testadas foi variado, com os extratos brutos PS3, PS5, P1 e isozato apresentando maior atividade inibitória, enquanto que o derivado semi-sintético S3A apresentou maior atividade contra todas as cepas testadas. Os extratos brutos que menos inibiram foram o PS1 e PS2 sobre todas as cepas.

Em 2009, Siqueira e colaboradores, avaliaram a atividade dos mesmos extratos sobre o fungo *C. neoformans*, observando atividade fungistática dos extratos brutos P5, PS2, PS3, PS5, S3B, ISO e fungicida dos produtos PS4 e PS5. Naqueles fungistáticos, observaram-se por microscopia óptica, alterações intracelulares, além de diminuição da cápsula fúngica.

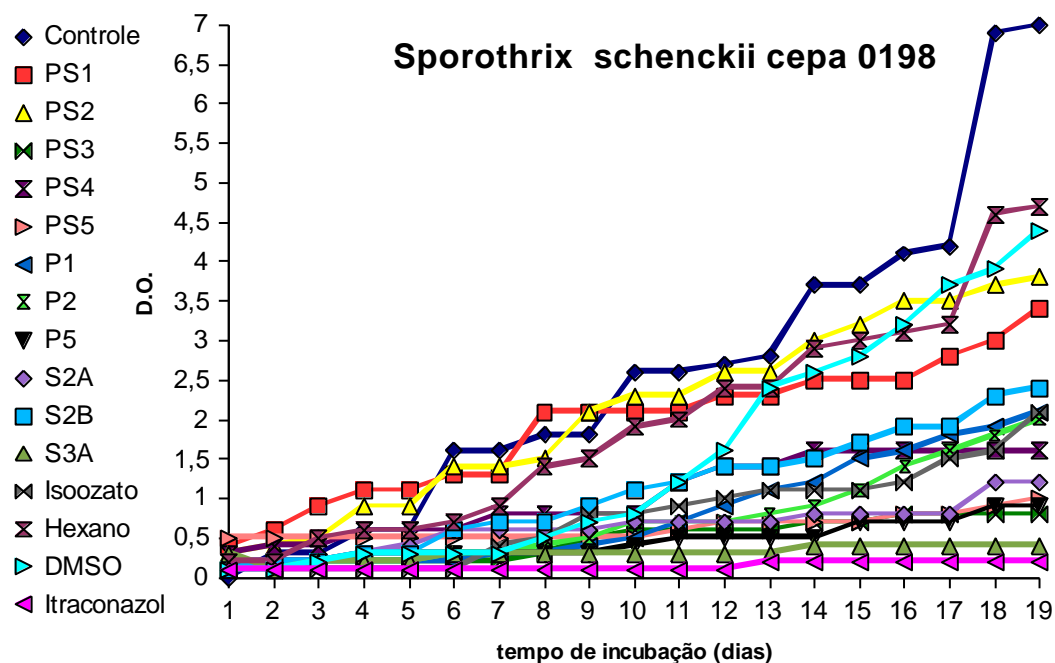


Gráfico 19: Curva de crescimento de células leveduriformes de *S. schenckii* (cepa 0198) na presença de extratos brutos (PS1, PS2, PS3, PS4, PS5, P1, P2, P5 e Isozato) e derivados semi-sintéticos (S2A, S2B e S3A) do “Jatobá”: (EP: 500mg/mL e ICZ 1mg/mL). O valor em cada ponto corresponde à média entre as triplicatas. A variação entre as triplicatas foi ≤ 5 .

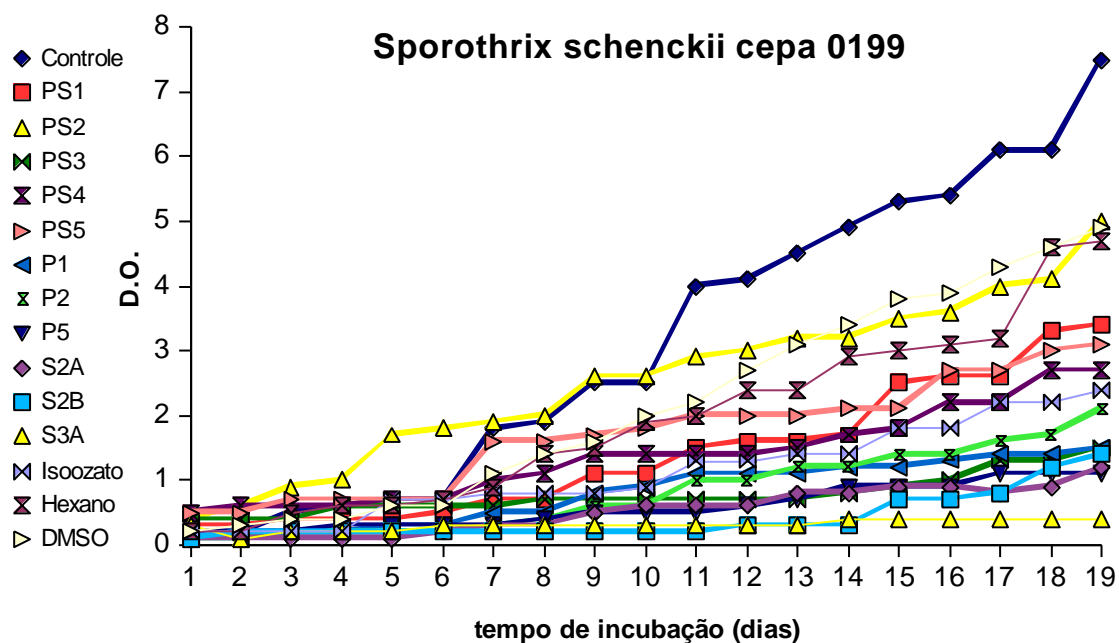


Gráfico 20: Curva de crescimento de células leveduriformes de *S. schenckii* (cepa 0199) na presença de extratos brutos (PS1, PS2, PS3, PS4, PS5, P1, P2, P5 e Isozato) e derivados semi-sintéticos (S2A, S2B e S3A) do “Jatobá”: (EP: 500mg/mL e ICZ 1mg/mL). O valor em cada ponto corresponde à média entre as triplicatas. A variação entre as triplicatas foi ≤ 5 .

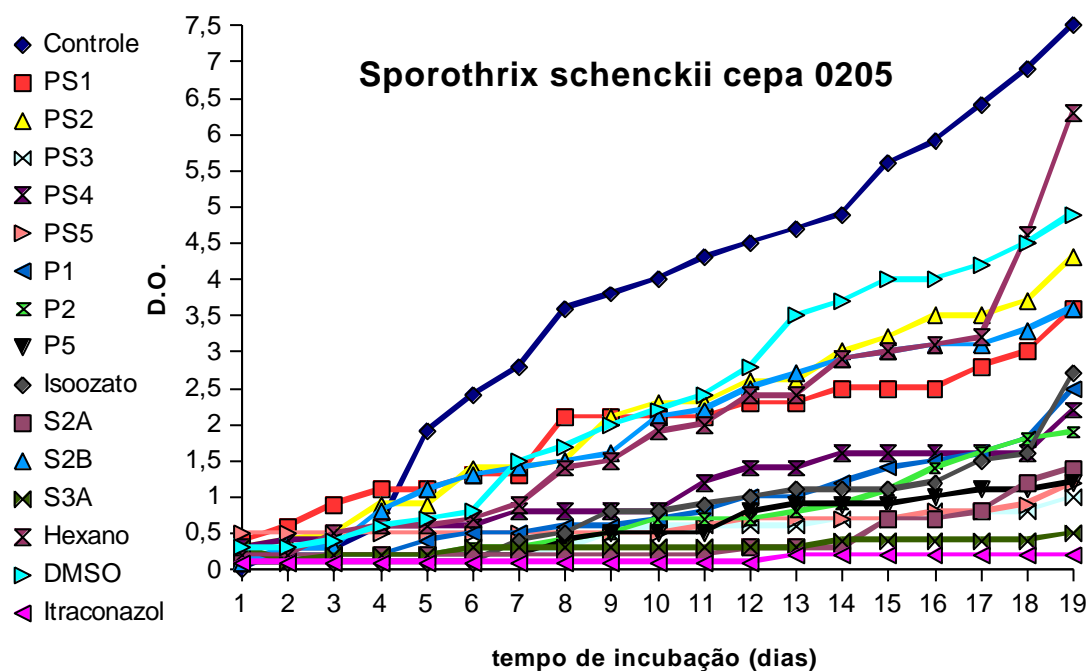


Gráfico 21: Curva de crescimento de células leveduriformes de *S. schenckii* (cepa 0205) na presença de extratos brutos (PS1, PS2, PS3, PS4, PS5, P1, P2, P5 e Isozato) e derivados semi-sintéticos (S2A, S2B e S3A) do “Jatobá”: (EP: 500mg/mL e ICZ 1mg/mL). O valor em cada ponto corresponde à média entre as triplicatas. A variação entre as triplicatas foi ≤ 5 .

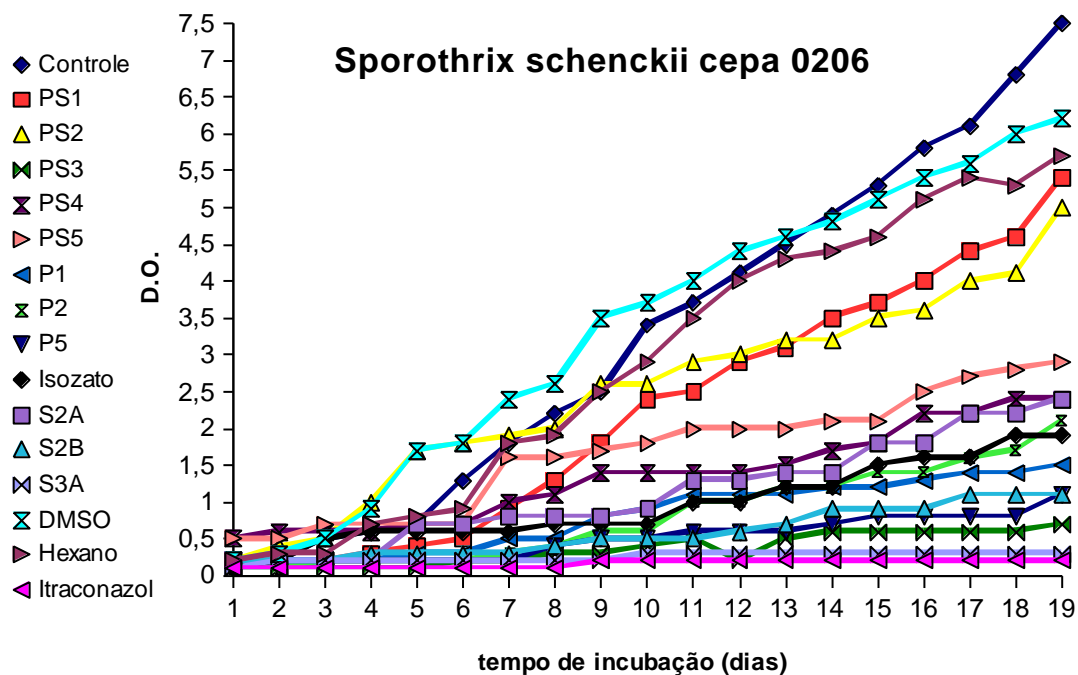


Gráfico 22: Curva de crescimento de células leveduriformes de *S. schenckii* (cepa 0206) na presença de extratos brutos (PS1, PS2, PS3, PS4, PS5, P1, P2, P5 e Isozato) e derivados semi-sintéticos (S2A, S2B e S3A) do “Jatobá”: (EP: 500mg/mL e ICZ 1mg/mL). O valor em cada ponto corresponde à média entre as triplicatas. A variação entre as triplicatas foi ≤ 5 .

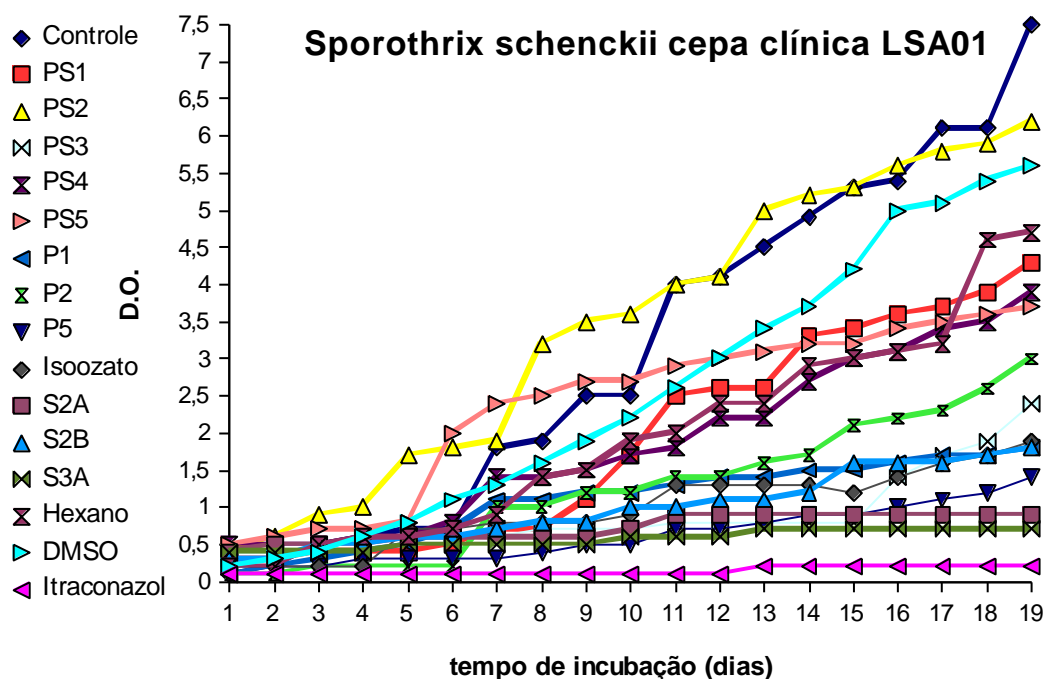


Gráfico 23: Curva de crescimento de células leveduriformes de *S. schenckii* (cepa clínica LSA01) na presença de extratos brutos (PS1, PS2, PS3, PS4, PS5, P1, P2, P5 e Isozato) e derivados semi-sintéticos (S2A, S2B e S3A) do “Jatobá”: (EP: 500mg/mL e ICZ 1mg/mL). O valor em cada ponto corresponde à média entre as triplicatas. A variação entre as triplicatas foi ≤ 5 .

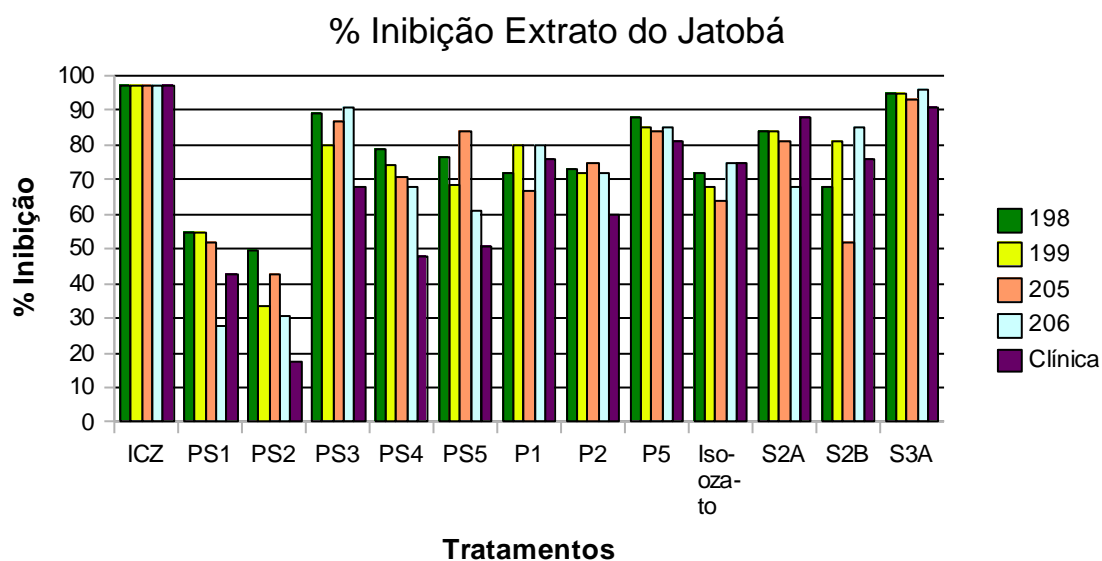


Gráfico 24: Percentual de inibição dos extratos brutos (PS1, PS2, PS3, PS4, PS5, P1, P2, P5 e Isozato) e derivados semi-sintéticos (S2A, S2B e S3A) do “Jatobá”: (EP: 500mg/mL e ICZ 1mg/mL) sobre as células leveduriformes de *S. schenckii*. (CC: concentração de 0,22mg/mL e ICZ: 1mg/mL).

6.7 Inibição do crescimento de *S. Schenckii* por heteropoliácidos em difusão em ágar.

Por difusão, todas as cepas mostraram-se sensíveis ao antifúngico itraconazol utilizado como controle positivo (quadro 1). Para o HPA $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$ apenas a cepa clínica LSA01 apresentou nível intermediário de sensibilidade. Para os HPAs $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$ e $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$ somente as cepas 0198 e 0199 foram sensíveis, enquanto que as cepas 0205, 0206 e clínica apresentaram nível intermediário para estes HPAs. Finalmente, para o HPA $\text{Ag}_6[\text{SiW}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]$ nenhuma das cepas testadas apresentou alguma sensibilidade, com exceção da cepa 0199 que apresentou grau intermediário. Dias et al. (2004), observaram que os HPAs na forma ácida não apresentaram atividade inibitória frente a *Candida albicans*. Enquanto que os sais dos HPAs $\text{Ag}_4[\text{SiMo}_{12}\text{O}_{40}]$ e $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$ inibiram o crescimento de cepas de *Candida spp.*, indicando que não é a acidez

proporcionada pelo composto que provoca a inibição, mas sim alguma propriedade química associada à estabilidade gerada pela formação do sal. Quanto ao menor efeito inibitório observado pela substituição de átomos de molibdênio por vanádio, os autores consideraram que tal substituição tenha levado à instabilidade do HPA na forma ácida.

Avaliando a atividade do sal $\text{Ag}_6[\text{SiW}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]$ testado sobre *S. schenckii* pode-se propor que a ausência de inibição possa estar relacionada à presença dos átomos de vanádio (V) na molécula, pois na sua ausência o efeito inibitório foi significativo como mostrado pelo composto $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$ por difusão em ágar com maior inibição da cepa 0199 (figura 13b) e em meio líquido sobre as cepas 0205 e clínica.

<i>S. schenckii</i>	Itraconazol 1mg/mL	$\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$ 56µg/mL	$\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$ 56µg/mL	$\text{Ag}_6[\text{SiW}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]$ 56µg/mL	$\text{Ag}_6[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$ 56µg/mL	HPA 56µg/mL
Cepa 0198	32 (S) a	23,3 (S) c	24 (S) c	ND d	27,7 (S) b	ND d
Cepa 0199	33 (S) a	26 (S) b	26 (S) b	12 (I) c	26 (S) b	ND d
Cepa 0205	38,5 (S) a	25,3 (S) b	18 (I) c	ND d	16 (I) c	ND d
Cepa 0206	32 (S) a	20 (S) b	15 (I) b	ND c	16 (I) b	ND c
Cepa clínica	25,3 (S) a	16 (I) c	19,3 (I) b	ND d	18,3 (I) bc	ND d

ND = Não Detectável; > 20 = Sensível; 12-19= Intermediário; < 11= Resistente.

Quadro 1: Halo de inibição de *Sporothrix schenckii* frente aos HPAs medidos em milímetros. Médias com letras diferentes diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

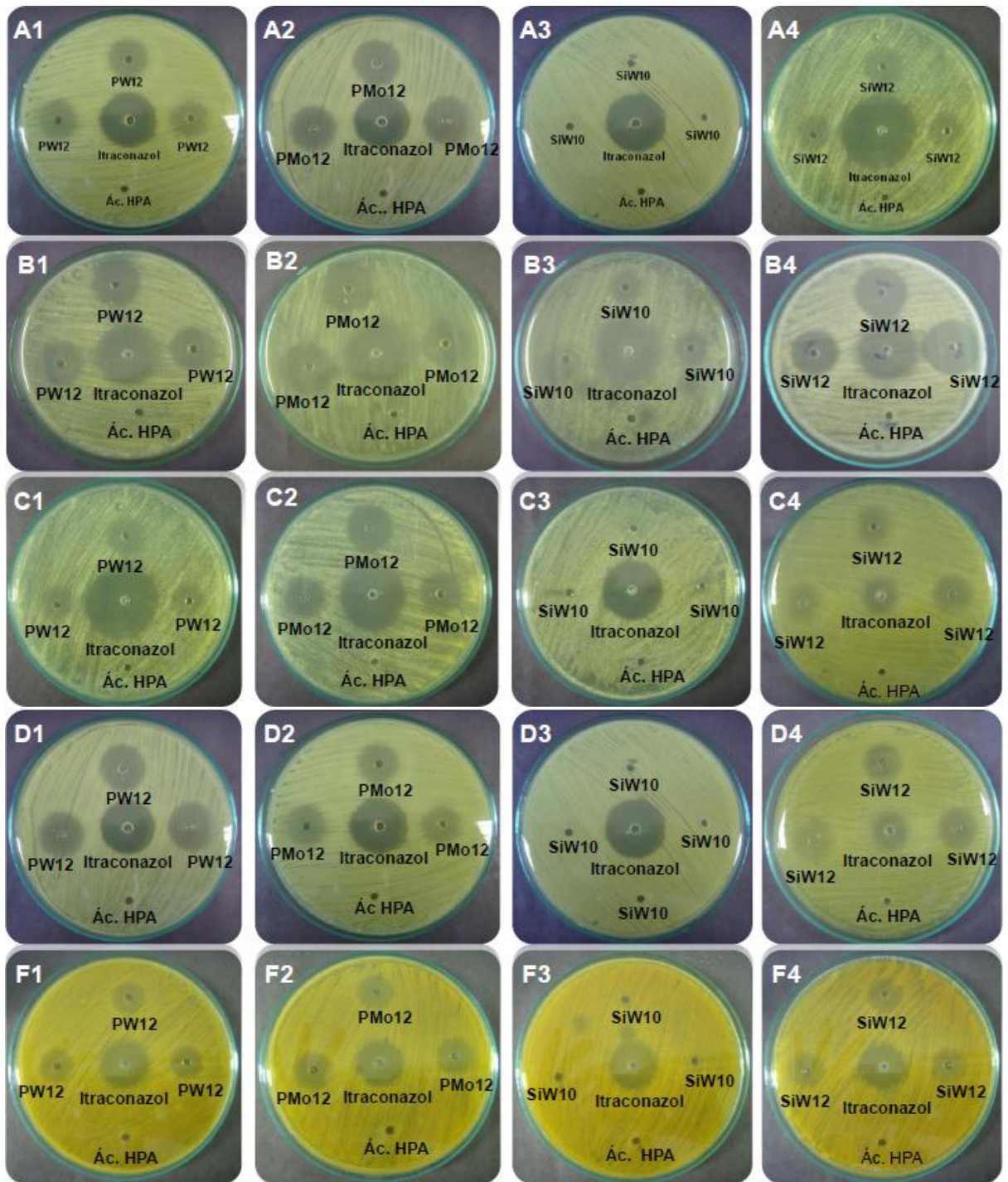


Figura 13: Difusão das substâncias em ágar mostrando o grau de sensibilidade de *S. schenckii* aos compostos sintéticos HPAs. (A) cepa 0198; (B) cepa 0199; (C) cepa 0205; (D) cepa 0206; (E) cepa clínica LSA01.

CEPA 0198						
	ITRA	Pmo12	PW12	SiW10	SiW12	HPA
REP 1	32	24	24	1	26	1
REP 2	32	24	24	1	31	1
REP 3	32	22	24	1	26	1
TOTAL	96	70	72	3	83	3
MÉDIA	32	23,33	24	1	27,67	1
S.D.	0	1,15	0	0	2,89	0
S.E.	0	0,67	0	0	1,67	0

CEPA 0199						
	ITRA	Pmo12	PW12	SiW10	SiW12	HPA
REP 1	33	25	25	12	26	1
REP 2	33	26	26	12	26	1
REP 3	33	27	27	12	26	1
TOTAL	99	78	78	36	78	3
MÉDIA	33	26	26	12	26	1
S.D.	0	1	1	0	0	0
S.E.	0	0,58	0,58	0	0	0

CEPA 0205						
	ITRA	Pmo12	PW12	SiW10	SiW12	HPA
REP 1	38	26	21	1	12	1
REP 2	38	26	18	1	14	1
REP 3	38	24	15	1	22	1
TOTAL	114	76	54	3	48	3
MÉDIA	38	25,33	18	1	16	1
S.D.	0	1,15	3	0	5,29	0
S.E.	0	0,67	1,73	0	3,06	0

CEPA 0206						
	ITRA	Pmo12	PW12	SiW10	SiW12	HPA
REP 1	31	16	15	1	15	1
REP 2	33	16	15	1	16	1
REP 3	32	16	15	1	17	1
TOTAL	96	48	45	3	48	3
MÉDIA	32	16	15	1	16	1
S.D.	1	0	0	0	1	0
S.E.	0,58	0	0	0	0,58	0

CEPA CLÍNICA LSA 01						
	ITRA	Pmo12	PW12	SiW10	SiW12	HPA
REP 1	26	16	20	1	18	1
REP 2	26	16	20	1	20	1
REP 3	24	16	18	1	17	1
TOTAL	76	48	58	3	55	3
MÉDIA	25,33	16	19,33	1	18,33	1
S.D.	1,15	0	1,15	0	1,53	0
S.E.	0,67	0	0,67	0	0,88	0

Quadro 2 : Estatística descritiva dos valores dos diâmetros dos halos obtidos no teste de difusão pelos HPAs.

ANOVA - CEPA 0198				
	SQ	GL	QM	F
TRATAMENTOS	2795,15	5	559,03	346,99***
RESÍDUO	19,33	12	1,61	
TOTAL	2814,5	17		
Desvio padrão residual <s>: 1,269		C.V. = 7,0%		
* 5% ** 1% *** 0,1%				

ANOVA - CEPA 0199				
	SQ	GL	QM	F
TRATAMENTOS	2098	5	419,6	1258,8***
RESÍDUO	4	12	0,33	
TOTAL	2102	17		
Desvio padrão residual <s>: 0,577		C.V. = 2,8%		
* 5% ** 1% *** 0,1%				

ANOVA - CEPA 0205				
	SQ	GL	QM	F
TRATAMENTOS	3069,78	5	613,96	96,10***
RESÍDUO	76,67	12	6,39	
TOTAL	3146,44	17		
Desvio padrão residual <s>: 2,528		C.V. = 15,3%		
* 5% ** 1% *** 0,1%				

ANOVA - CEPA 0206				
	SQ	GL	QM	F
TRATAMENTOS	2008,5	5	401,7	1205,1***
RESÍDUO	4	12	0,33	
TOTAL	2012,5	17		
Desvio padrão residual <s>: 0,577		C.V. = 4,3%		
* 5% ** 1% *** 0,1%				

ANOVA - CEPA CLÍNICA LSA01				
	SQ	GL	QM	F
TRATAMENTOS	1548,5	5	309,7	371,64***
RESÍDUO	10	12	0,83	
TOTAL	1558,5	17		
Desvio padrão residual <s>: 0,913		C.V. = 6,8%		
* 5% ** 1% *** 0,1%				

Quadro 3: Análise de variância (ANOVA) referente à estatística descritiva dos valores dos diâmetros dos halos obtidos no teste de difusão pelos HPAs.

CEPA 0198					
TUKEY 5%		DUNCAN 5%			
ITRA	32,000 a	ITRA	32,000 c		
SiW12	27,6667 b	SiW12	27,6667d	DMS 2	2,26
PW12	24,000 c	PW12	24,000 a	DMS 3	2,37
Pmo12	23,333 c	Pmo12	23,333 a	DMS 4	2,44
SiW10	1,000 d	SiW10	1,000 b	DMS 5	2,46
HPA	1,000 d	HPA	1,000 b	DMS 6	2,49
DMS: 3,481					

CEPA 0199					
TUKEY 5%		DUNCAN 5%			
ITRA	33,000 a		33,000 b		
Pmo12	26,000 b		26,000 a	DMS 2	1,03
PW12	26,000 b		26,000 a	DMS 3	1,08
SiW12	26,000 b		26,000 a	DMS 4	1,11
SiW10	12,000 c		12,000 c	DMS 5	1,12
HPA	1,000 d		1,000 d	DMS 6	1,13
DMS: 1,583					

CEPA 0205					
TUKEY 5%		DUNCAN 5%			
ITRA	38,000 a		38,000 c		
Pmo12	25,333 b		25,333 d	DMS 2	4,5
PW12	18,000 c		18,000 a	DMS 3	4,71
SiW12	16,000 c		16,000 a	DMS 4	4,86
SiW10	1,000 d		1,000 b	DMS 5	4,9
HPA	1,000 d		1,000 b	DMS 6	4,96
DMS: 6,932					

CEPA 0206					
TUKEY 5%		DUNCAN 5%			
ITRA	32,000 a		32,000 c		
Pmo12	16,000 b		16,000 a	DMS 2	1,03
SiW12	16,000 b		16,000 a	DMS 3	1,08
PW12	15,000 b		15,000 a	DMS 4	1,11
SiW10	1,000 c		1,000 b	DMS 5	1,12
HPA	1,000 c		1,000 b	DMS 6	1,13
DMS: 1,583					

CEPA CLÍNICA LSA01					
TUKEY 5%		DUNCAN 5%			
ITRA	25,333 a		25,333 c		
PW12	19,333 b		19,333 a	DMS 2	1,62
SiW12	18,333 bc		18,333 a	DMS 3	1,7
Pmo12	16,000 c		16,000 d	DMS 4	1,76
SiW10	1,000 d		1,000 b	DMS 5	1,77
HPA	1,000 d		1,000 b	DMS 6	1,79
DMS: 2,503					

Quadro 4: Testes de comparação múltipla entre as médias. Médias com letras diferentes diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey e Duncan ($p \leq 0,05$).

6.8 Inibição do crescimento de *S. schenckii* por compostos de coordenação utilizando os metais zinco (Zn), cobre (Cu) e cobalto (Co) complexados ao ligante HPCINOL em difusão em ágar.

Mais uma vez o ligante HPCINOL mostrou-se mais eficiente sozinho do que quando complexado aos metais zinco, cobre e cobalto. O ligante apresentou halo de sensibilidade superior a 40mm de diâmetro. O complexo com zinco foi mais eficiente sobre a cepa 0198, que mostrou um nível maior de sensibilidade do que as demais cepas que apresentaram resistência (0199 e 0205) e nível intermediário de sensibilidade (0206 e clínica). Os complexos com cobre e cobalto não provocaram sensibilidade significativa em nenhuma das cepas testadas por difusão em ágar (quadro 5 e figura 14).

O sais de zinco, cobre e cobalto utilizados na síntese dos compostos de coordenação também foram testados, mas não apresentaram atividade inibitória, diferentemente do que ocorreu quando testados em meio líquido.

<i>S. schenckii</i>	ICZ 1mg/mL	Zn HP (0,22mg/mL)	ZnCl (0,22mg/mL)	CuHP (0,22mg/mL)	CuCl (0,22mg/mL)	CoHP (0,22mg/mL)	CoCl (0,22mg/mL)	HPCINOL (0,22mg/mL)	DMSO (0,22mg/mL)
Cepa 0198	25(S) b	24 (S) b	ND e	17 (I) d	ND e	13 d	ND e	46 (S) a	ND e
Cepa 0199	31 (S) b	8 (R) c	ND e	13(I) d	ND e	9 (R) d	ND e	55 (S) a	ND d
Cepa 0205	36 (S) b	8 (R) c	ND e	12 (I) d	ND e	ND e	ND e	50 (S) a	ND d
Cepa 0206	24 (S) b	17 (I) c	ND e	15 (I) d	ND e	ND e	ND e	45 (S) a	ND e
Cepa clínica	25,3 (S) b	16 (I) c	ND e	19,3 (I) c	ND e	ND e	ND e	42 (S) a	ND d

ND = Não Detectável; > 20 = Sensível; 12-19= Intermediário; < 11= Resistente.

Quadro 5: Média dos halos de inibição de *Sporothrix schenckii* frente aos compostos de coordenação complexados ao ligante HPCINOL medidos em milímetros. Médias com letras diferentes diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

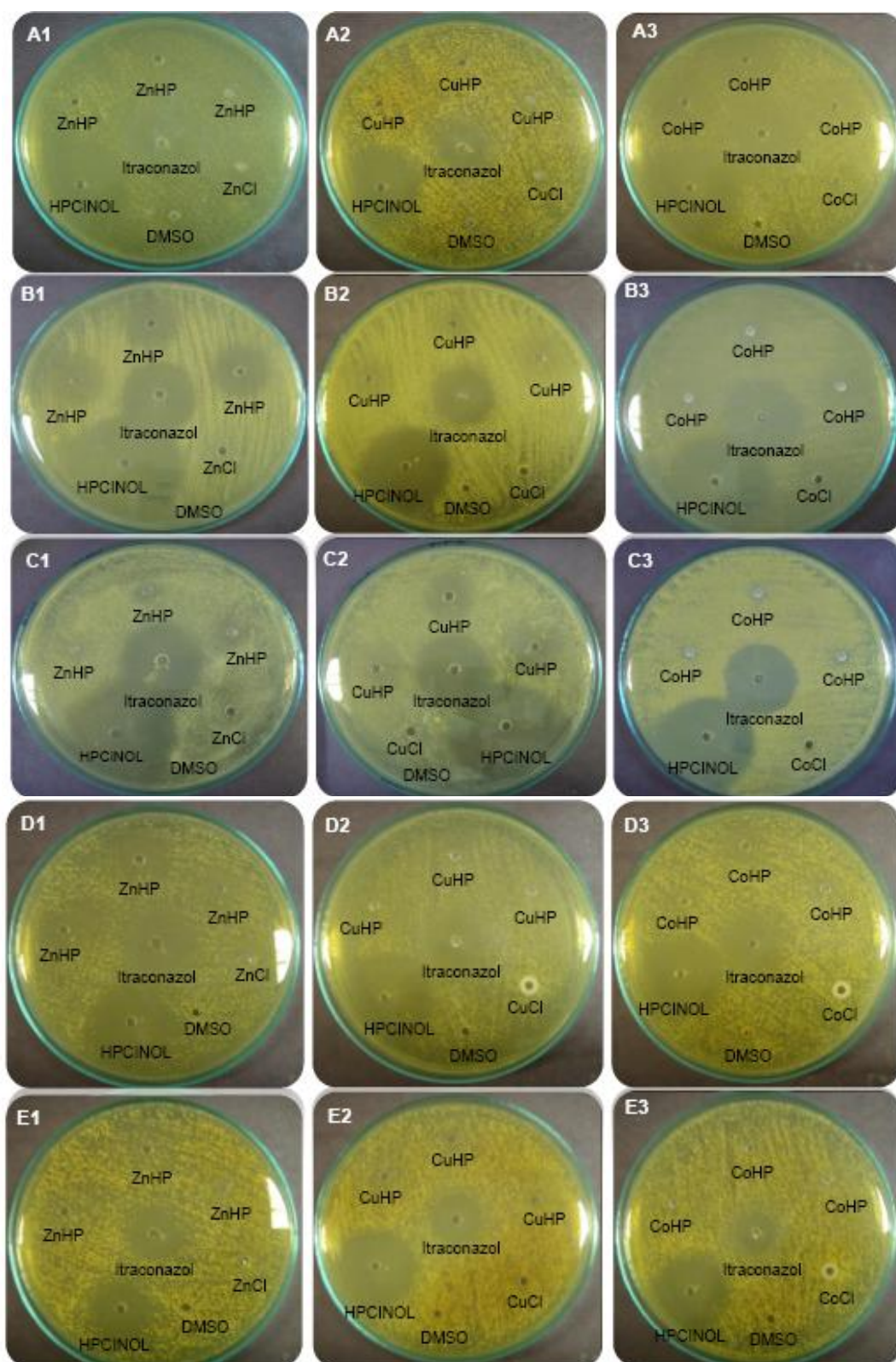


Figura 14: Difusão das substâncias em ágar mostrando o grau de sensibilidade de *S. schenckii* aos compostos de coordenação com base zinco, cobre e cobalto complexados ao ligante HPCINOL (CC: 0,22mg/mL e ICZ: 1mg/mL). (A) cepa 0198; (B) cepa 0199; (C) cepa 0205; (D) cepa 0206; (E) cepa clínica LSA01.

CEPA 0198								
	ITRA	ZnHP	ZnCl	CuHP	CuCl	CoHP	CoCl	HPCINOL
REP 1	26	24	1	16	1	12	1	48
REP 2	24	24	1	18	1	13	1	46
REP 3	24	24	1	18	1	13	1	45
TOTAL	74	72	3	52	3	38	3	139
MÉDIA	24,67	24	1	17,33	1	12,67	1	46,33
S.D.	1,15	0	0	1,15	0	0,58	0	1,53
S.E.	0,67	0	0	0,6667	0	0,33	0	0,88

CEPA 0199								
	ITRA	ZnHP	ZnCl	CuHP	CuCl	CoHP	CoCl	HPCINOL
REP 1	32	8	1	13	1	8	1	45
REP 2	30	7	1	13	1	8	1	45
REP 3	31	8	1	14	1	8	1	45
TOTAL	93	23	3	40	3	24	3	135
MÉDIA	31	7,67	1	13,33	1	8	1	45
S.D.	1	0,58	0	0,58	0	0	0	0
S.E.	0,58	0,33	0	0,33	0	0	0	0

CEPA 0205								
	ITRA	ZnHP	ZnCl	CuHP	CuCl	CoHP	CoCl	HPCINOL
REP 1	36	8	1	12	1	1	1	49
REP 2	36	8	1	12	1	1	1	50
REP 3	37	8	1	13	1	1	1	51
TOTAL	109	24	3	37	3	3	3	150
MÉDIA	36,33	8	1	12,33	1	1	1	50
S.D.	0,58	0	0	0,58	0	0	0	1
S.E.	0,33	0	0	0,33	0	0	0	0,58

CEPA 0206								
	ITRA	ZnHP	ZnCl	CuHP	CuCl	CoHP	CoCl	HPCINOL
REP 1	25	17	1	1	1	8	1	45
REP 2	24	16	1	1	1	8	1	45
REP 3	22	18	1	1	1	9	1	45
TOTAL	71	51	3	3	3	25	3	135
MÉDIA	23,67	17	1	1	1	8,33	1	45
S.D.	1,53	1	0	0	0	0,58	0	0
S.E.	0,88	0,58	0	0	0	0,33	0	0

CEPA CLÍNICA LSA01								
	ITRA	ZnHP	ZnCl	CuHP	CuCl	CoHP	CoCl	HPCINOL
REP 1	25	1	1	1	1	1	1	42
REP 2	27	1	1	1	1	1	1	41
REP 3	28	1	1	1	1	1	1	41
TOTAL	80	3	3	3	3	3	3	124
MÉDIA	26,67	1	1	1	1	1	1	41,33
S.D.	1,53	0	0	0	0	0	0	0,58
S.E.	0,88	0	0	0	0	0	0	0,33

Quadro 6: Estatística descritiva dos valores dos diâmetros dos halos obtidos no teste de difusão pelos compostos de coordenação.

ANOVA - CEPA 0198				
	SQ	GL	QM	F
TRATAMENTOS	5516,68	7	788,1	1182,16***
RESÍDUO	01/10/67	16	0,67	
TOTAL	5527,34	23		
Desvio padrão residual <s>: 0,816 C.V. = 5,2%				
* 5% ** 1% *** 0,1%				
ANOVA - CEPA 0199				
	SQ	GL	QM	F
TRATAMENTOS	5725,05	7	817,87	3925,56***
RESÍDUO	3,33	16	0,21	
TOTAL	5728,38	23		
Desvio padrão residual <s>: 0,456 C.V. = 3,5%				
* 5% ** 1% *** 0,1%				
ANOVA - CEPA 0205				
	SQ	GL	QM	F
TRATAMENTOS	7841,68	7	1128,24	5376,89***
RESÍDUO	3,33	16	0,21	
TOTAL	7845,01	23		
Desvio padrão residual <s>: 0,456 C.V. = 3,4%				
* 5% ** 1% *** 0,1%				
ANOVA - CEPA 0206				
	SQ	GL	QM	F
TRATAMENTOS	5516,88	7	788,13	1719,51***
RESÍDUO	7,33	16	0,46	
TOTAL	5524,22	23		
Desvio padrão residual <s>: 0,677 C.V. = 5,8%				
* 5% ** 1% *** 0,1%				
ANOVA - CEPA CLÍNICA LSA01				
	SQ	GL	QM	F
TRATAMENTOS	5524,36	7	789,19	2367,51***
RESÍDUO	5,33	16	0,33	
TOTAL	5529,69	23		
Desvio padrão residual <s>: 0,577 C.V. = 6,8%				
* 5% ** 1% *** 0,1%				

Quadro 7: Análise de variância (ANOVA) referente à estatística descritiva dos valores dos diâmetros dos halos obtidos no teste de difusão pelos compostos de coordenação ZnHPCINOL, CuHPCINOL e CoHPCINOL.

CEPA 0198					
TUKEY 5%		DUNCAN 5%			
HPCINOL	46,33 a	HPCINOL	46,33 c		
ITRA	24,667 b	ITRA	24,667 b	DMS 2	1,41
ZnHP	24 b	ZnHP	24 b	DMS 3	1,49
CuHP	17,33 c	CuHP	17,33 d	DMS 4	1,52
CoHP	12,67 d	CoHP	12,67 e	DMS 5	1,56
ZnCl	0,001 e	ZnCl	0,001 a	DMS 6	1,57
CuCl	0,001 e	CuCl	0,001 a	DMS 7	1,59
CoCl	0,001 e	CoCl	0,001 a	DMS 8	1,6
DMS: 2,31					
CEPA 0199					
TUKEY 5%		DUNCAN 5%			
HPCINOL	45 a	HPCINOL	45 c		
ITRA	31 b	ITRA	31 d	DMS 2	0,79
CuHP	13,33 c	CuHP	13,33 e	DMS 3	0,83
CoHP	8 d	CoHP	8 e	DMS 4	0,85
ZnHP	7,67 d	ZnHP	7,67 e	DMS 5	0,87
ZnCl	0,001 e	ZnCl	0,001 a	DMS 6	0,88
CuCl	0,001 e	CuCl	0,001 a	DMS 7	0,89
CoCl	0,001 e	CoCl	0,001 a	DMS 8	0,89
DMS: 1,291					
CEPA 0205					
TUKEY 5%		DUNCAN 5%			
HPCINOL	50 a	HPCINOL	50 b		
ITRA	36,33 b	ITRA	36,33 c	DMS 2	0,79
CuHP	12,33 c	CuHP	12,33 d	DMS 3	0,83
ZnHP	8 d	ZnHP	8 e	DMS 4	0,85
ZnCl	0,001 e	ZnCl	0,001 a	DMS 5	0,87
CuCl	0,001 e	CuCl	0,001 a	DMS 6	0,88
CoHP	0,001 e	CoHP	0,001 a	DMS 7	0,89
CoCl	0,001 e	CoCl	0,001 a	DMS 8	0,89
DMS: 1,291					
CEPA 0206					
TUKEY 5%		DUNCAN 5%			
HPCINOL	45 a	HPCINOL	45 b		
ITRA	23,67 b	ITRA	23,67 c	DMS 2	1,17
ZnHP	17 c	ZnHP	17 d	DMS 3	1,23
CoHP	8,33 d	CoHP	8,33 e	DMS 4	1,26
ZnCl	0,001 e	ZnCl	0,001 a	DMS 5	1,29
CuHP	0,001 e	CuHP	0,001 a	DMS 6	1,31
CuCl	0,001 e	CuCl	0,001 a	DMS 7	1,32
CoCl	0,001 e	CoCl	0,001 a	DMS 8	1,33
DMS: 1,915					
CEPA CLÍNICA LSA01					
TUKEY 5%		DUNCAN 5%			
HPCINOL	41,33 a	HPCINOL	41,33 b		
ITRA	26,67 b	ITRA	26,67 c	DMS 2	1
ZnHP	0,001 c	ZnHP	0,001 a	DMS 3	1,05
ZnCl	0,001 c	ZnCl	0,001 a	DMS 4	1,08
CuHP	0,001 c	CuHP	0,001 a	DMS 5	1,1
CuCl	0,001 c	CuCl	0,001 a	DMS 6	1,11
CoHP	0,001 c	CoHP	0,001 a	DMS 7	1,12
CoCl	0,001 c	CoCl	0,001 a	DMS 8	1,13
DMS: 1,633					

Quadro 8: Testes de comparação múltipla entre as médias referente ao teste de difusão em agar com os compostos de coordenação com base cobre, zinco e cobalto complexados ao ligante HPCINOL. Médias com letras diferentes diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey e Duncan ($p \leq 0,05$).

6.9 Inibição do crescimento de *S. schenckii* por compostos de coordenação utilizando o metal cobre (Cu) complexados aos ligantes BMPA, MBPA, BSA e BSE em difusão em ágar.

Por difusão em ágar o ligante BMPA demonstrou efeito inibitório superior aos outros ligantes e complexos, mas, sobretudo, superior ao antifúngico itraconazol (quadro 9 e figura 15), confirmando seu efeito em meio líquido acima de 90% (gráfico 18). Em contrapartida, somente as cepa 0198 e 0199 foram sensíveis ao complexo CuBMPA que em meio líquido também apresentou atividade sobre a cepa 0205. Outro ligante que apresentou efeito inibitório em difusão em ágar foi o ligante MBPA sobre as cepas 0198 e 0199, enquanto que todas as cepas apresentaram nível intermediário ou resistente quando o mesmo estava complexado com o cobre (quadro 9 e figura 15). Quanto aos complexos que apresentaram efeito inibitório significativo, somente as cepas 0198 e 0199 foram sensíveis aos complexos CuBSA e CuBSE.

S. <i>schenckii</i>	ICZ 1mg/mL	CuBMPA 0,22mg/mL	BMPA 0,22mg/mL	CuMBPA 0,22mg/mL	MBPA 0,22mg/mL	CuBSA 0,22mg/mL	BSA 0,22mg/mL	CuBSE 0,22mg/mL	BSE 0,22mg/mL	DMSO
Cepa 0198	31 (S) b	24 (S) c	60 (S) a	ND d	25 (S) c	26 (S) d	ND d	25 (S) c	0,83 (R)d	ND d
Cepa 0199	35 (S) b	31 (S) c	70 (S) a	12 (I) g	31 (S) c	25 (S) d	10 (R) g	21 (S) e	18 (I) f	ND h
Cepa 0205	35 (S) b	18 (I) c	50 (S) a	15 (I)	ND d	18 (I) c	15 (I)	15 (I) c	14 (I) c	ND d
Cepa 0206	33 (S) b	14 (I) d	51 (S) a	8 (R) e	ND f	9 (R) e	9 (R) e	13 (I) d	17 (I) c	ND f
Cepa clínica	31(S)b	9 (R) d	45 (S) a	10 (R) d	19 (I) c	ND e	ND e	ND e	8 (R) d	ND e

Quadro 9: Média dos halos de inibição de *Sporothrix schenckii* frente aos compostos de coordenação com base cobre complexados aos ligantes BMPA, MBPA, BSA e BSE medidos em milímetros. Médias com letras diferentes diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

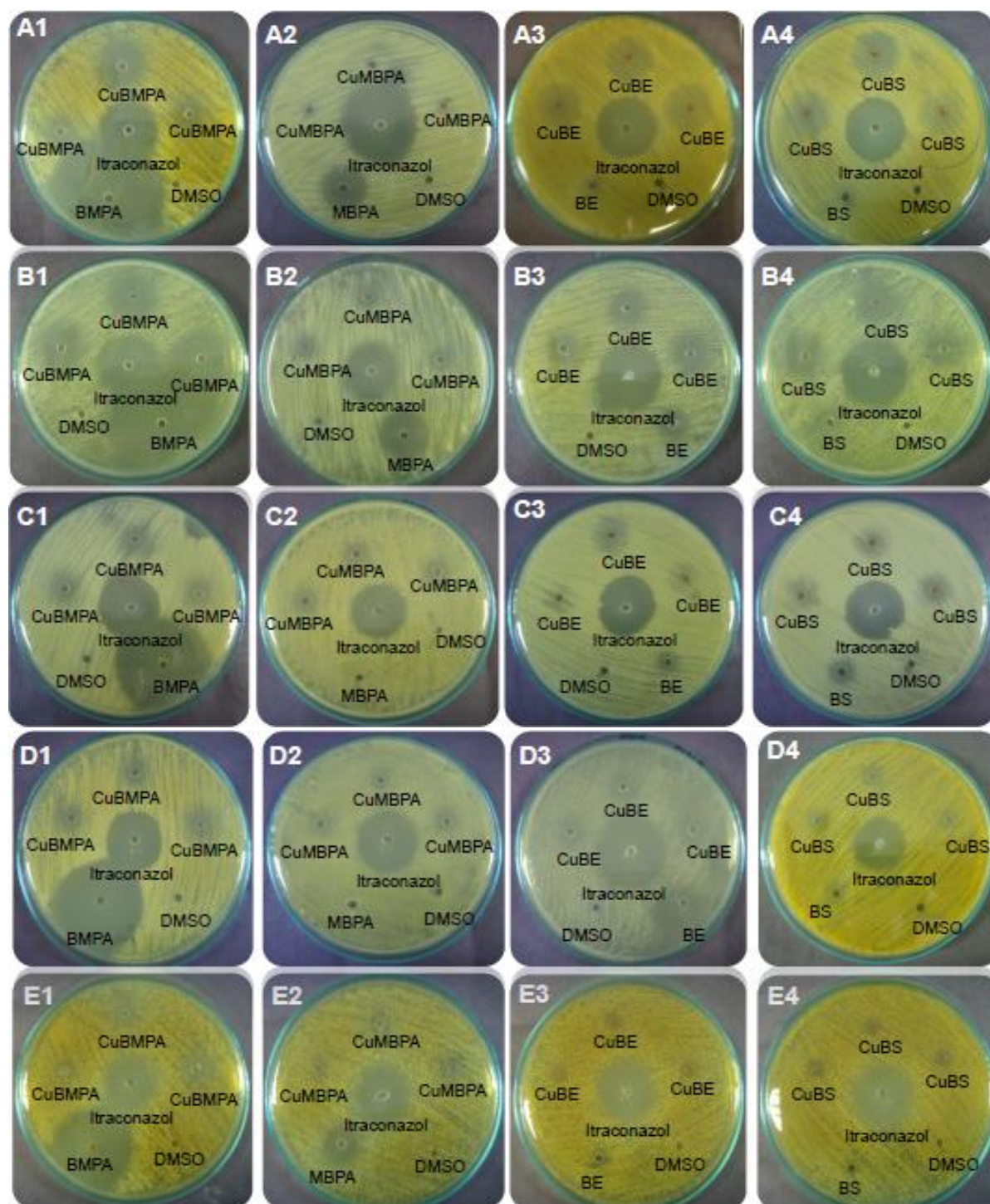


Figura 15: Difusão das substâncias em ágar mostrando o grau de sensibilidade de células leveduriformes de *S. schenckii* aos compostos de coordenação com base cobre complexados aos ligantes BMPA, MBPA, BSA e BSE (CC: 0,22mg/mL e ICZ: 1mg/mL). (A) cepa 0198; (B) cepa 0199; (C) cepa 0205; (D) cepa 0206; (E) cepa clínica LSA01.

CEPA 0198										
	ITRA	CuBM	BMPA	CuMB	MBPA	CuBS	BSA	CuBE	BSE	DMSO
REP 1	32	27	60	0	24	25	0	26	0,8	0
REP 2	30	23	59	0	25	25	0	25	0,8	0
REP 3	31	22	61	0	25	26	0	25	0,9	0
TOTAL	93	72	180	0	74	76	0	76	2,5	0
MÉDIA	31	24	60	0	24,67	25,58	0	25,33	0,83	0
S.D.	1	2,65	1	0	0,58	0,58	0	0,58	0,58	0
S.E.	0,58	1,53	0,58	0	0,33	0,33	0	0,33	0,03	0
CEPA 0199										
	ITRA	CuBM	BMPA	CuMB	MBPA	CuBS	BSA	CuBE	BSE	DMSO
REP 1	36	30	70	11	32	26	10	20	18	1
REP 2	36	31	71	12	32	25	11	21	18	1
REP 3	34	32	69	13	31	25	10	22	19	1
TOTAL	105	93	210	36	94	76	31	63	55	3
MÉDIA	35	31	70	12	31,33	25,33	10,33	21	18,33	0
S.D.	1	1	1	1	0,58	0,58	0,58	1	0,58	0
S.E.	0,5774	0,5774	0,5774	0,5774	0,33	0,33	0,33	0,58	0,33	0
CEPA 0205										
	ITRA	CuBM	BMPA	CuMB	MBPA	CuBS	BSA	CuBE	BSE	DMSO
REP 1	36	20	51	17	1	18	15	14	14	1
REP 2	38	18	50	15	1	17	15	16	15	1
REP 3	32	16	50	14	1	18	15	14	14	1
TOTAL	106	54	50,33	46	3	53	45	44	43	3
MÉDIA	35,33	18	0,58	15,33	0	17,67	15	14,67	14,33	0
S.D.	3,06	2	0,33	1,52	0	0,58	0	1,15	0,58	0
S.E.	1,76	1,15	0,5774	0,88	0	0,33	0	0,67	0,33	0
CEPA 0206										
	ITRA	CuBM	BMPA	CuMB	MBPA	CuBS	BSA	CuBE	BSE	DMSO
REP 1	32	13	51	8	1	8	8	15	18	1
REP 2	33	15	51	8	1	8	9	13	16	1
REP 3	33	15	50	9	1	10	9	12	18	1
TOTAL	98	43	151	25	3	26	26	40	52	3
MÉDIA	32,67	14,33	50,67	8,33	0	8,67	8,67	13,33	17,33	0
S.D.	0,58	1,15	0,58	0,58	0	0,58	0,58	1,53	1,15	0
S.E.	0,33	0,67	0,33	0,33	0	0,33	0,33	0,88	0,67	0
CEPA CLÍNICA LSA01										
	ITRA	CuBM	BMPA	CuMB	MBPA	CuBS	BSA	CuBE	BSE	DMSO
REP 1	32	8	46	10	20	1	1	1	6	1
REP 2	30	10	45	10	20	1	1	1	8	1
REP 3	32	8	45	9	18	1	1	1	9	1
TOTAL	94	26	136	29	58	3	3	3	23	3
MÉDIA	31,33	8,67	45,33	9,67	19,33	0	0	0	7,67	0
S.D.	1,15	1,15	0,58	0,58	1,15	0	0	0	1,53	0
S.E.	0,67	0,67	0,33	0,33	0,67	0	0	0	0,88	0

Quadro 10: Estatística descritiva dos valores dos diâmetros dos halos referente ao teste de difusão em agar com os compostos de coordenação com base cobre complexados a diferentes ligantes. Médias com letras diferentes diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey e Duncan ($p \leq 0,05$).

ANOVA - CEPA 0198				
	SQ	GL	QM	F
TRATAMENTOS	10125,33	9	1125,03	1124,54 ***
RESIDUO	20,01	20	1	
TOTAL	10145,34	29		
Desvio padrão residual <s>: 1,000		C.V.= 5,2%		
* 5% ** 1% *** 0,1%				
ANOVA - CEPA 0199				
	SQ	GL	QM	F
TRATAMENTOS	9806,55	9	1089,62	1720,4 ***
RESIDUO	12,67	20	0,633	
TOTAL	9819,22	29		
Desvio padrão residual <s>: 0,796		C.V.= 3,1%		
* 5% ** 1% *** 0,1%				
ANOVA - CEPA 0205				
	SQ	GL	QM	F
TRATAMENTOS	6103,65	9	678,18	376,77***
RESIDUO	36	20	1,8	
TOTAL	6139,65	29		
Desvio padrão residual <s>: 1,342		C.V.= 7,4%		
* 5% ** 1% *** 0,1%				
ANOVA - CEPA 0206				
	SQ	GL	QM	F
TRATAMENTOS	6497,68	9	721,96	941,68***
RESIDUO	15,33	20	0,77	
TOTAL	6513,01	29		
Desvio padrão residual <s>: 0,867		C.V.= 5,7%		
* 5% ** 1% *** 0,1%				
ANOVA - CEPA CLÍNICA LSA01				
	SQ	GL	QM	F
TRATAMENTOS	6448,5	9	716,5	1023,57***
RESIDUO	14	20	0,7	
TOTAL	6462,5	29		
Desvio padrão residual <s>: 0,837		C.V.= 6,9%		
* 5% ** 1% *** 0,1%				

Quadro 11: Análise de variância (ANOVA) referente à estatística descritiva dos valores dos diâmetros dos halos obtidos no teste de difusão pelos compostos de coordenação referente ao teste de difusão em Agar com os compostos de coordenação com base cobre complexados a diferentes ligantes.

CEPA 0198					
TUKEY 5%		DUNCAN 5%			
BMPA	60 a	BMPA	60 c		
ITRA	31 b	ITRA	31 d	DMS 2	1,7
CuBS	25,33 d	CuBS	25,33 a	DMS 3	1,79
CuBE	25,33 c	CuBE	25,33 a	DMS 4	1,84
MBPA	24,667 c	MBPA	24,667 a	DMS 5	1,88
CuBMPA	24 c	CuBMPA	24 a	DMS 6	1,91
BSE	0,833 d	BSE	0,833 b	DMS 7	1,93
CuMBPA	0,001 d	CuMBPA	0,001 b	DMS 8	1,94
BSA	0,001 d	BSA	0,001 b	DMS 9	1,95
DMSO	0,001 d	DMSO	0,001 b	DMS 10	1,96
DMS: 2,893					
CEPA 0199					
TUKEY 5%		DUNCAN 5%			
BMPA	70 a	BMPA	70 b		
ITRA	35 b	ITRA	35 c	DMS 2	1,36
MBPA	31,33 c	MBPA	31,33 a	DMS 3	1,42
CuBMPA	31 c	CuBM	31 a	DMS 4	1,46
CuBS	25,33 d	CuBS	25,33 d	DMS 5	1,49
CuBE	21 e	CuBE	21 e	DMS 6	1,52
BSE	18,33 f	BSE	18,33 f	DMS 7	1,54
CuMBPA	12 g	CuMB	12 g	DMS 8	1,54
BSA	10,33 g	BSA	10,33 h	DMS 9	1,55
DMSO	0,001 h	DMSO	0,001 i	DMS 10	1,56
DMS: 2,302					
CEPA 0205					
TUKEY 5%		DUNCAN 5%			
BMPA	50,33 a	BMPA	50,33 d		
ITRA	35,33 b	ITRA	35,33 e	DMS 2	2,29
CuBM	18 c	CuBM	18 b	DMS 3	2,4
CuBS	17,66 c	CuBS	17,66 b	DMS 4	2,46
CuMB	15,33 c	CuMB	15,33 a	DMS 5	2,52
BSA	15 c	BSA	15 a	DMS 6	2,56
CuBE	14,66 c	CuBE	14,66 a	DMS 7	2,59
BSE	14,33 c	BSE	14,33 a	DMS 8	2,6
MBPA	0,001 d	MBPA	0,001 c	DMS 9	2,62
DMSO	0,001 d	DMSO	0,001 c	DMS 10	2,63
DMS: 3,881					

Quadro 12: Testes de comparação múltipla entre as médias para as cepas 0198, 0199 e 0205 referente ao teste de difusão em Agar com os compostos de coordenação com base cobre complexados a diferentes ligantes. Médias com letras diferentes diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey e Duncan ($p \leq 0,05$).

CEPA 0206					
TUKEY 5%		DUNCAN 5%			
BMPA	50,667 a	BMPA	50,667 d		
ITRA	32,667 b	ITRA	32,667 e	DMS 2	1,49
BSE	17,333 c	BSE	17,333 f	DMS 3	1,57
CuBM	14,333 d	CuBM	14,333 b	DMS 4	1,61
CuBE	13,333 d	CuBE	13,333 b	DMS 5	1,64
CuBS	8,667 e	CuBS	8,667 a	DMS 6	1,67
BSA	8,667 e	BSA	8,667 a	DMS 7	1,69
CuMB	8,333 e	CuMB	8,333 a	DMS 8	1,7
MBPA	0,001 f	MBPA	0,001 c	DMS 9	1,71
DMSO	0,001 f	DMSO	0,001 c	DMS 10	1,72
DMS: 2,533					
CEPA CLÍNICA LSA01					
TUKEY 5%		DUNCAN 5%			
BMPA	45,33 a	BMPA	45,33 d		
ITRA	31,33 b	ITRA	31,33 e	DMS 2	1,43
MBPA	19,33 c	MBPA	19,33 f	DMS 3	1,5
CuMB	9,67 d	CuMB	9,67 b	DMS 4	1,54
CuBM	8,67 d	CuBM	8,67 bc	DMS 5	1,57
BSE	7,67 d	BSE	7,67 c	DMS 6	1,59
CuBS	0,001 e	CuBS	0,001 a	DMS 7	1,61
BSA	0,001 e	BSA	0,001 a	DMS 8	1,62
CuBE	0,001 e	CuBE	0,001 a	DMS 9	1,63
DMSO	0,001 e	DMSO	0,001 a	DMS 10	1,64
DMS: 2,42					

Quadro 13: Testes de comparação múltipla entre as médias para as cepas 0206 e clínica LSA01 referente ao teste de difusão em agar com os compostos de coordenação com base cobre complexados a diferentes ligantes. Médias com letras diferentes diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey e Duncan ($p \leq 0,05$)

6.10 Inibição do crescimento de *S. schenckii* pelos extratos brutos e semi-sintéticos extraídos do “jatobá do cerrado” em difusão em ágar.

O efeito dos extratos de jatobá na concentração de 500 mg/mL em meio sólido foi incipiente contra *S. schenckii*, o que não ocorreu em meio líquido (gráfico 24). Concentrações mais elevadas (até 1,5 g/mL) também não apresentaram resultado satisfatório (figuras 16 e 17). A única cepa que demonstrou algum tipo de sensibilidade foi a 0199 com formação de um halo insignificante. Os mesmos compostos quando testados sobre *C. albicans* e *E. coli* também não produziram halos indicativos de sensibilidade, enquanto que para *Candida tropicalis* os extratos brutos P1, P2, P5 E PS4 e derivados semi-sintéticos S2A, S2B e S3A produziram halos indicando sensibilidade intermediária (dados não mostrados).

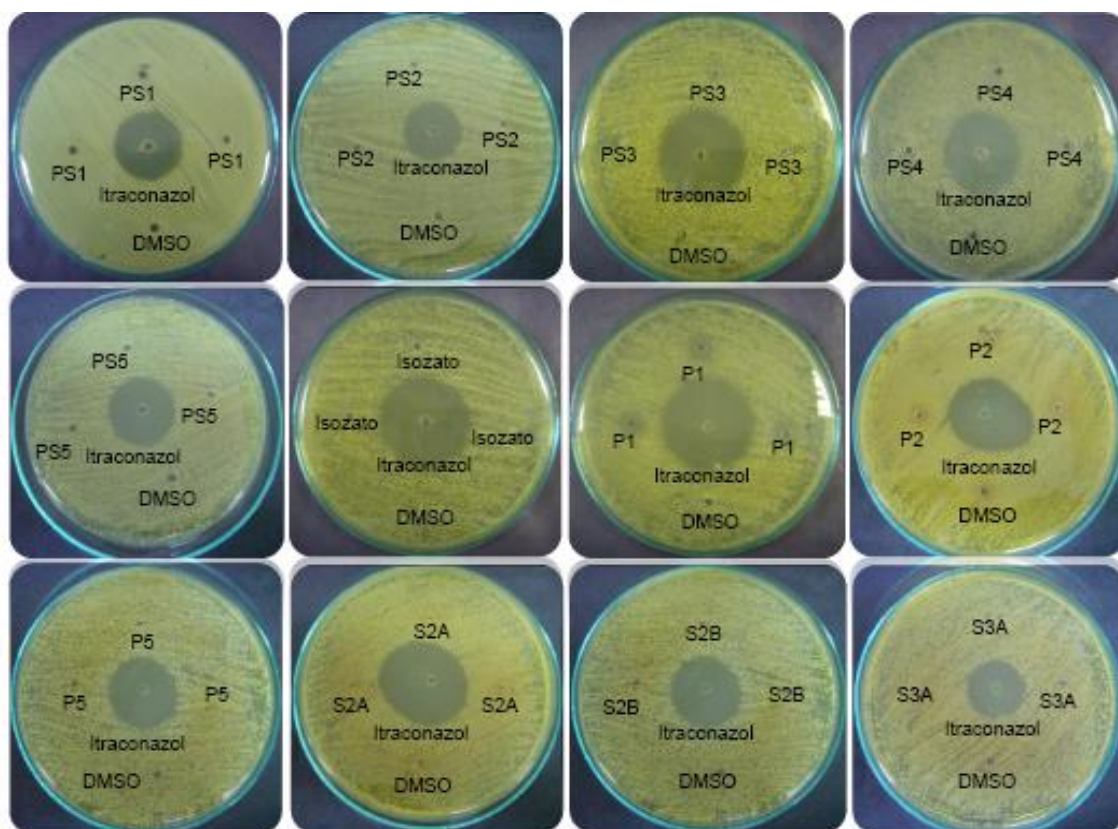


Figura 16: Difusão das substâncias em ágar mostrando a falta de sensibilidade de células leveduriformes de *S. schenckii* (cepa 0199) aos extratos brutos e semi-sintéticos extraídos do “jatobá do cerrado” (EP: 1,5g/mL e ICZ: 1mg/mL).

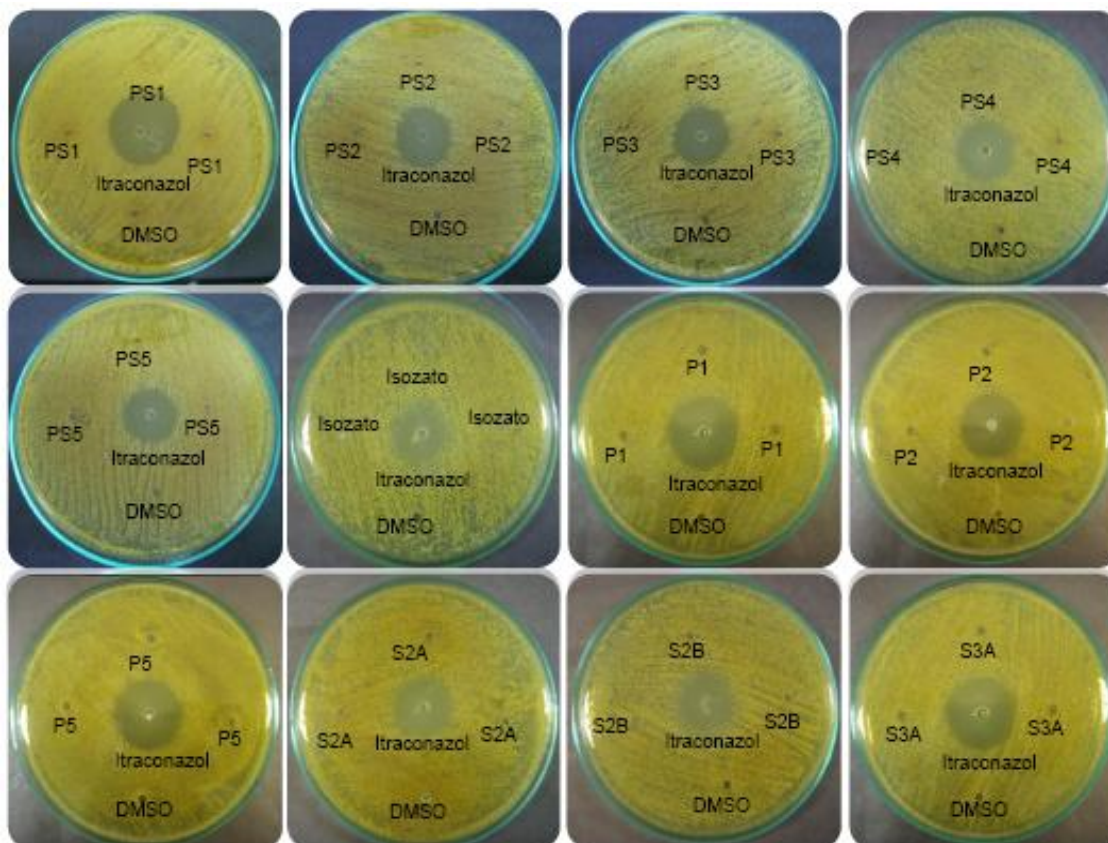


Figura 17: Difusão das substâncias em ágar mostrando a falta de sensibilidade de células leveduriformes de *S. schenckii* (cepa clínica) aos extratos brutos e semi-sintéticos extraídos do “jatobá do cerrado” (EP: 1,5g/mL e ICZ: 1mg/mL).

6.11 Antifungigrama para os sais de Heteropoliácidos

Nos ensaios de antifungigrama observou-se que o Itraconazol e anfotericina B demonstraram maior atividade sinérgica frente à cepa clínica na presença dos HPAs $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$ e $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$ em ambas as concentrações, enquanto que na presença do HPA $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$ o itraconazol mostrou maior efeito sinérgico somente para a cepa 0198. Já para os HPAs $\text{Ag}_6[\text{SiW}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]$ e $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$ a anfotericina B não apresentou sinergismo para as duas cepas, mas efeito antagonista frente às diferentes concentrações dos sais de HPA quando comparado ao controle (quadro 14). Outro efeito antagônico foi observado na presença do antifúngico fluconazol (figura 21 G e H) frente aos

quatro sais de HPAs para as duas cepas. Este ensaio também demonstrou que a cepa clínica apresentou um nível maior de sensibilidade para os antifúngicos anfotericina B, ketoconazol, fluconazol e miconazol, mas um nível intermediário para o itraconazol que é a droga de eleição para o tratamento da esporotricose tanto para animais quanto para humanos (quadro 14).

S. Schenckii cepa 0198		Ag₃[PW₁₂O₄₀]		Ag₃[PMo₁₂O₄₀]		Ag₆[SiW₁₀V₂O₄₀]		Ag₄[SiW₁₂O₄₀]	
Antifúngicos	Controle	350µg/mL	540µg/mL	240µg/mL	360µg/mL	370µg/mL	550µg/mL	370µg/mL	550µg/mL
Itraconazol	20 (S)	25 (S)	30 (S)	20 (S)	22 (S)	22 (S)	22 (S)	29 (S)	32 (S)
Anfotericina B	16 (S)	20 (S)	25 (S)	16 (S)	18 (S)	16 (S)	21 (S)	20 (S)	25 (S)
Ketoconazol	42 (S)	42 (S)	49 (S)	52 (S)	53 (S)	45 (S)	50 (S)	48 (S)	51 (S)
Fluconazol	20 (S)	ND (R)	6 (R)	6 (R)	8 (R)	ND (R)	ND (R)	11 (R)	15 (I)
Miconazol	45 (S)	51 (S)	54 (S)	40 (S)	60 (S)	48 (S)	50 (S)	56 (S)	61 (S)
S. schenckii cepa clínica		Ag₃[PW₁₂O₄₀]		Ag₃[PMo₁₂O₄₀]		Ag₆[SiW₁₀V₂O₄₀]		Ag₄[SiW₁₂O₄₀]	
Antifúngicos	Controle	350µg/mL	540µg/mL	240µg/mL	360µg/mL	370µg/mL	550µg/mL	370µg/mL	550µg/mL
Itraconazol	19 (I)	30 (S)	34 (S)	36 (S)	38 (S)	21 (S)	21 (S)	21 (S)	21 (S)
Anfotericina B	22 (S)	22 (S)	25 (S)	15 (S)	20 (S)	11 (S)	11 (S)	11 (S)	28 (S)
Ketoconazol	62 (S)	38 (S)	40 (S)	46 (S)	48 (S)	30 (S)	34 (S)	36 (S)	40 (S)
Fluconazol	40 (S)	15 (I)	26 (S)	10 (R)	11 (R)	ND (R)	ND (R)	ND (R)	ND (R)
Miconazol	41 (S)	39 (S)	43 (S)	43 (S)	62 (S)	40 (S)	40 (S)	42 (S)	49 (S)

ND = Não Detectável; ICZ ≥ 20 = Sensível; ICZ ≥ 12-19= Intermediário; ICZ ≤ 11= Resistente; AB > 10 = Sensível, AB ≤ 10 = Intermediário ou Resistente; KET > 20 = Sensível, KET 20-10= Intermediário, KET < 10 = Resistente; FLC > 19= Sensível, FLC 19-14= Intermediário, FLC < 14 = Resistente; MIC > 20 = Sensível, MIC 20-10 = Intermediário, MIC < 10 = Resistente.

Quadro 14: Avaliação do efeito sinérgico entre drogas antifúngicas e os compostos sintéticos (HPAs) pela medida em milímetros dos halos de inibição.

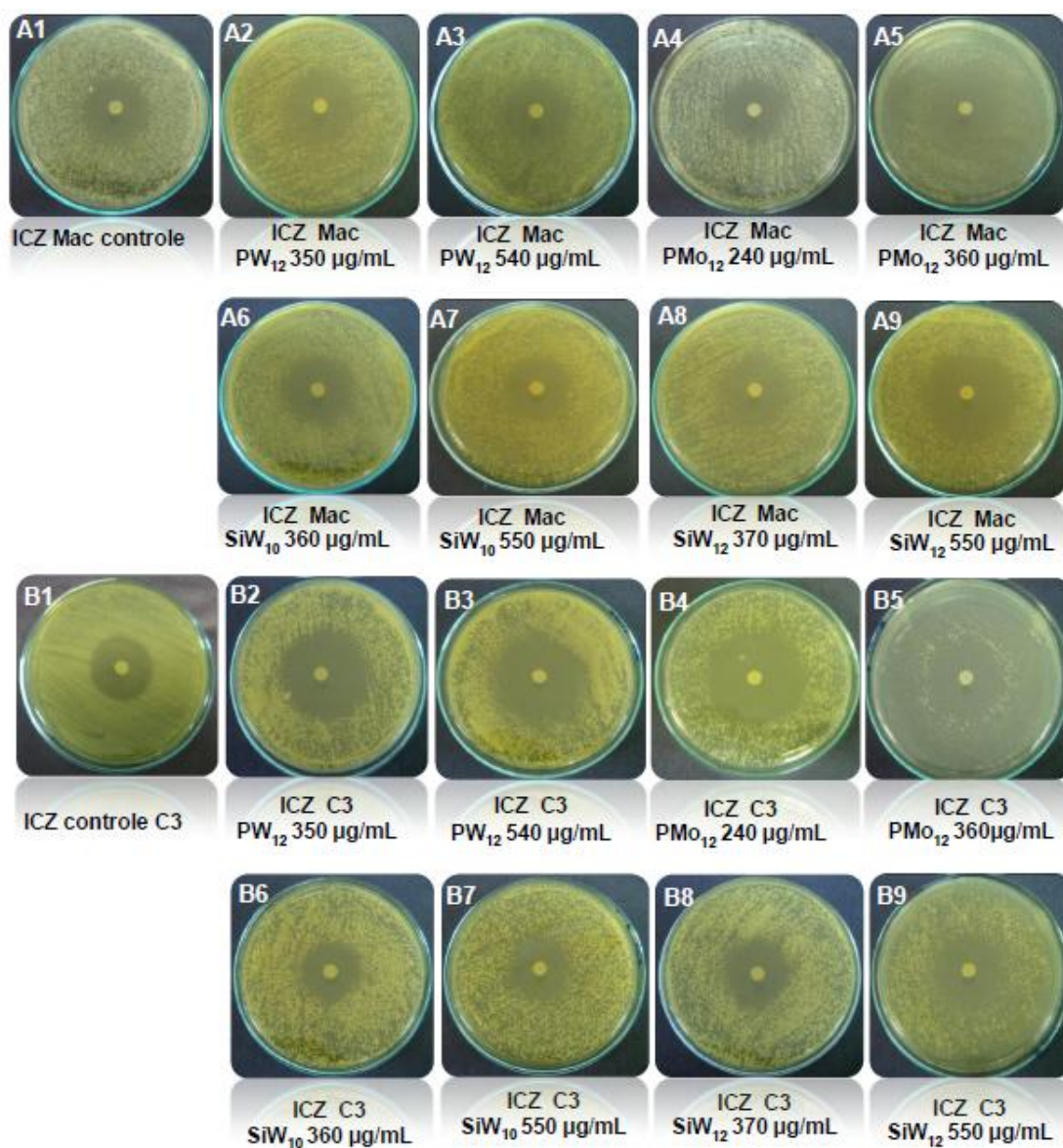


Figura 18: Ensaio de antifungigrama para avaliação de sinergismo: (A) Ilustração do resultado do antifungigrama com o antifúngico itraconazol (ICZ) frente aos HPAs sobre a cepa 0198 e (B) Ilustração do resultado do antifungigrama com o antifúngico itraconazol (ICZ) frente aos HPAs sobre a cepa clínica LSA01 na presença de diferentes concentrações dos HPAs (350 e 540 $\mu\text{g/mL}$ para $Ag_3[PW_{12}O_{40}]$, 240 e 360 $\mu\text{g/mL}$ para $Ag_3[PMo_{12}O_{40}]$, 360 e 550 $\mu\text{g/mL}$ para $Ag_6[SiW_{10}V_2O_{40}]$ e 370 e 550 para o HPA $Ag_4[SiW_{12}O_{40}]$.

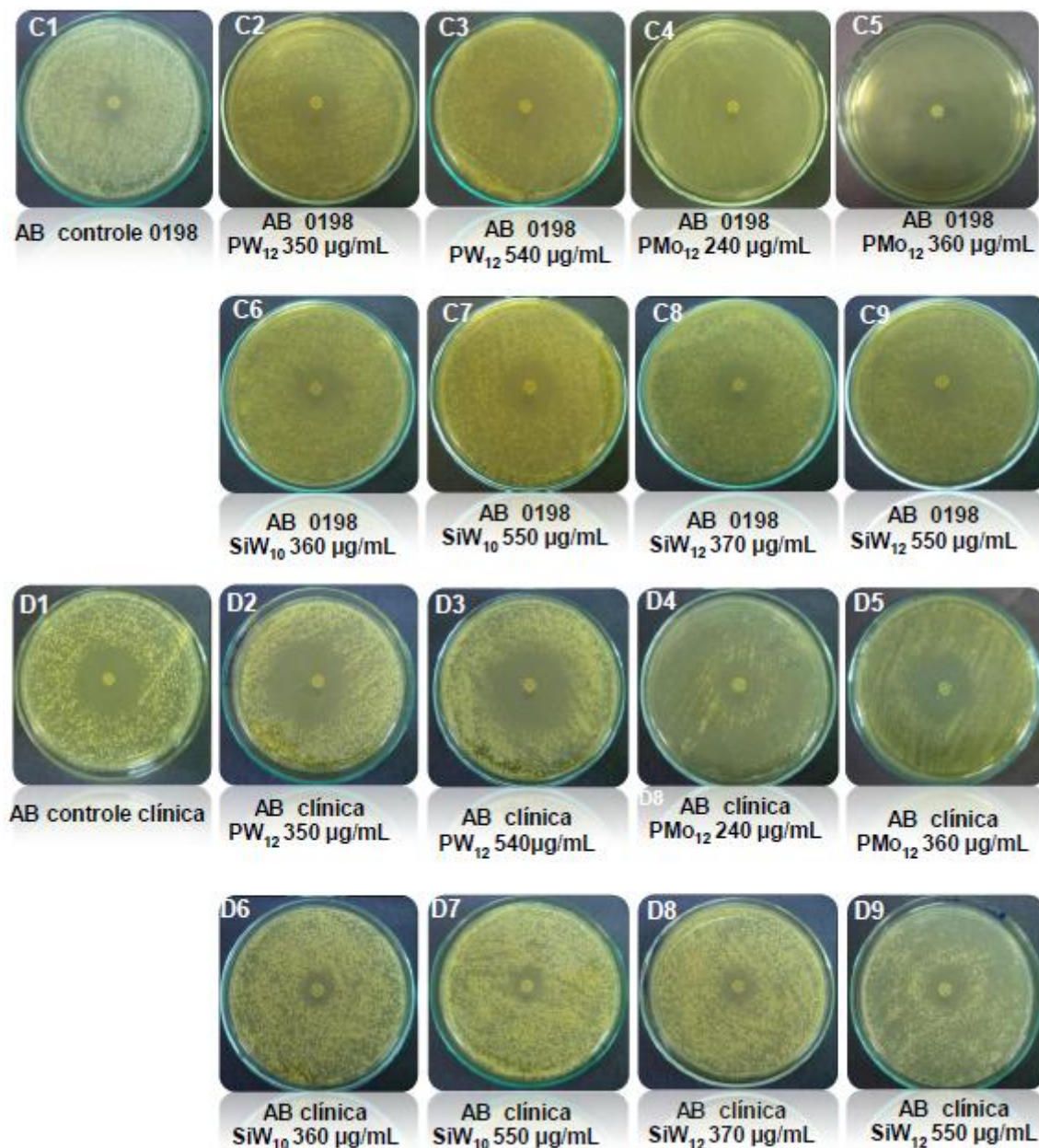


Figura 19: Ensaio de antifungigrama para avaliação de sinergismo: (C) Ilustração do resultado do antifungigrama com o antifúngico Anfotericina B (AB) frente aos HPAs sobre a cepa 0198 e (D) Ilustração do resultado do antifungigrama com o antifúngico Anfotericina B (AB) frente aos HPAs sobre a cepa clínica LSA01 na presença de diferentes concentrações dos HPAs (350 e 540 µg/mL para Ag₃[PW₁₂O₄₀], 240 e 360 µg/mL para Ag₃[PMo₁₂O₄₀], 360 e 550 µg/mL para Ag₆[SiW₁₀V₂O₄₀] e 370 e 550 para o HPA Ag₄[SiW₁₂O₄₀].

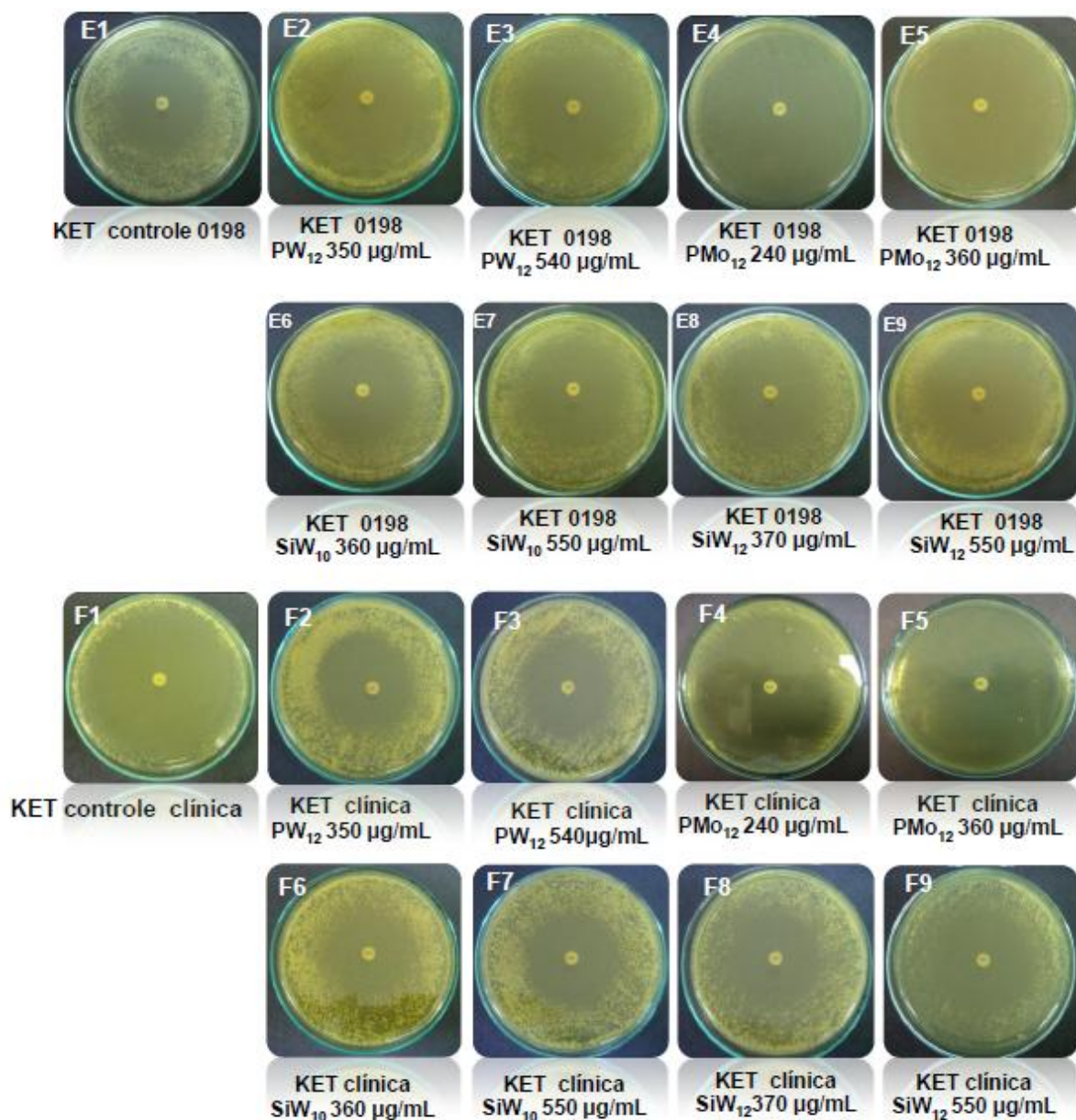


Figura 20: Ensaio de antifungigrama para avaliação de sinergismo: (E) Ilustração do resultado do antifungigrama com o antifúngico Cetoconazol (KET) frente aos HPAs sobre a cepa 0198 e (F) Ilustração do resultado do antifungigrama com o antifúngico Cetoconazol (KET) frente aos HPAs sobre a cepa clínica LSA01 na presença de diferentes concentrações dos HPAs (350 e 540 µg/mL para Ag₃[PW₁₂O₄₀], 240 e 360 µg/mL para Ag₃[PMo₁₂O₄₀], 360 e 550 µg/mL para Ag₆[SiW₁₀V₂O₄₀] e 370 e 550 para o HPA Ag₄[SiW₁₂O₄₀].

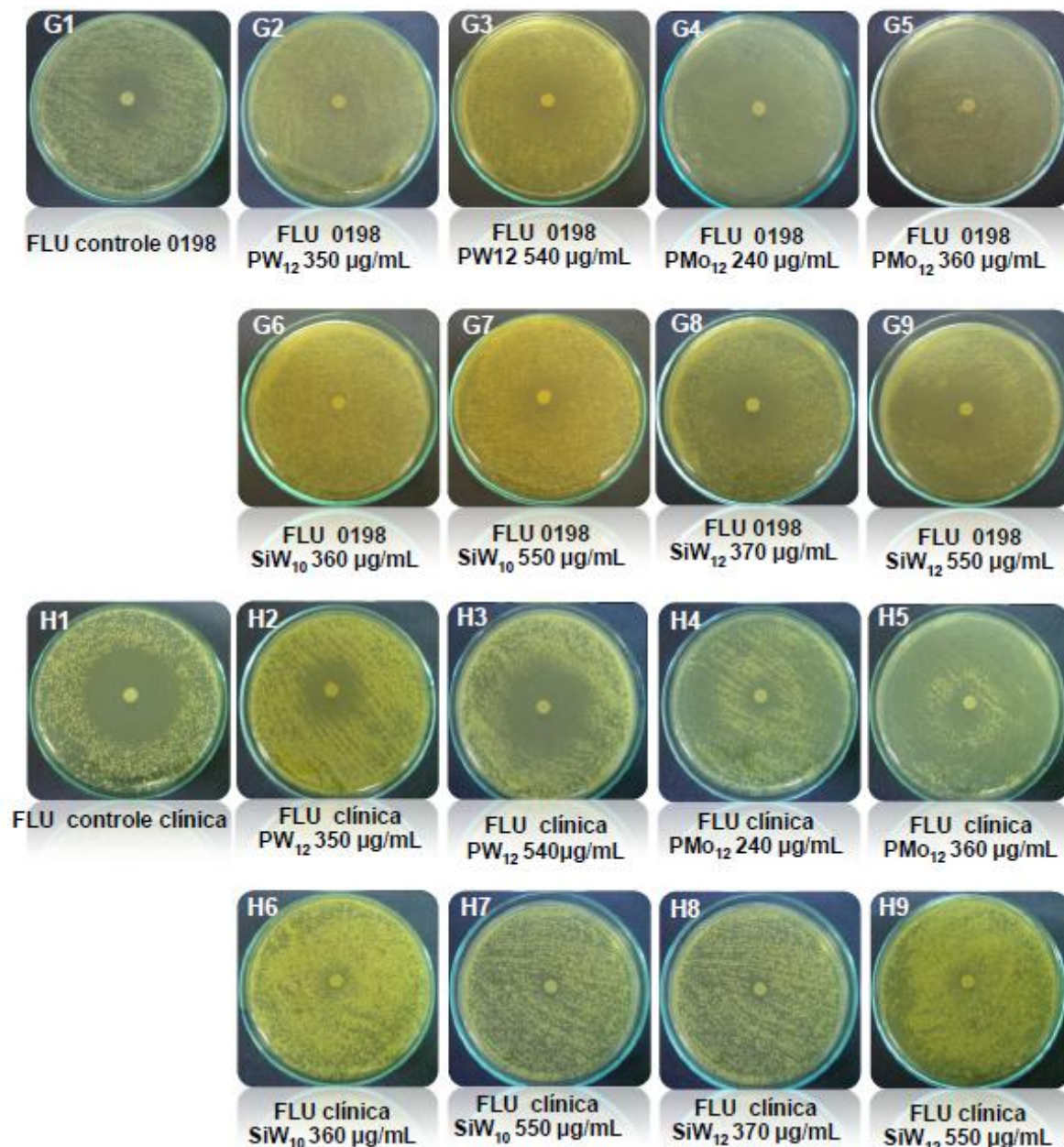


Figura 21: Ensaio de antifungigrama para avaliação de sinergismo: (G) Ilustração do resultado do antifungigrama com o antifúngico Fluconazol (FLU) frente aos HPAs sobre a cepa 0198 e (H) Ilustração do resultado do antifungigrama com o antifúngico Fluconazol (FLU) frente aos HPAs sobre a cepa clínica LSA01 na presença de diferentes concentrações dos HPAs (350 e 540 µg/mL para Ag₃[PW₁₂O₄₀], 240 e 360 µg/mL para Ag₃[PMo₁₂O₄₀], 360 e 550 µg/mL para Ag₆[SiW₁₀V₂O₄₀] e 370 e 550 para o HPA Ag₄[SiW₁₂O₄₀].

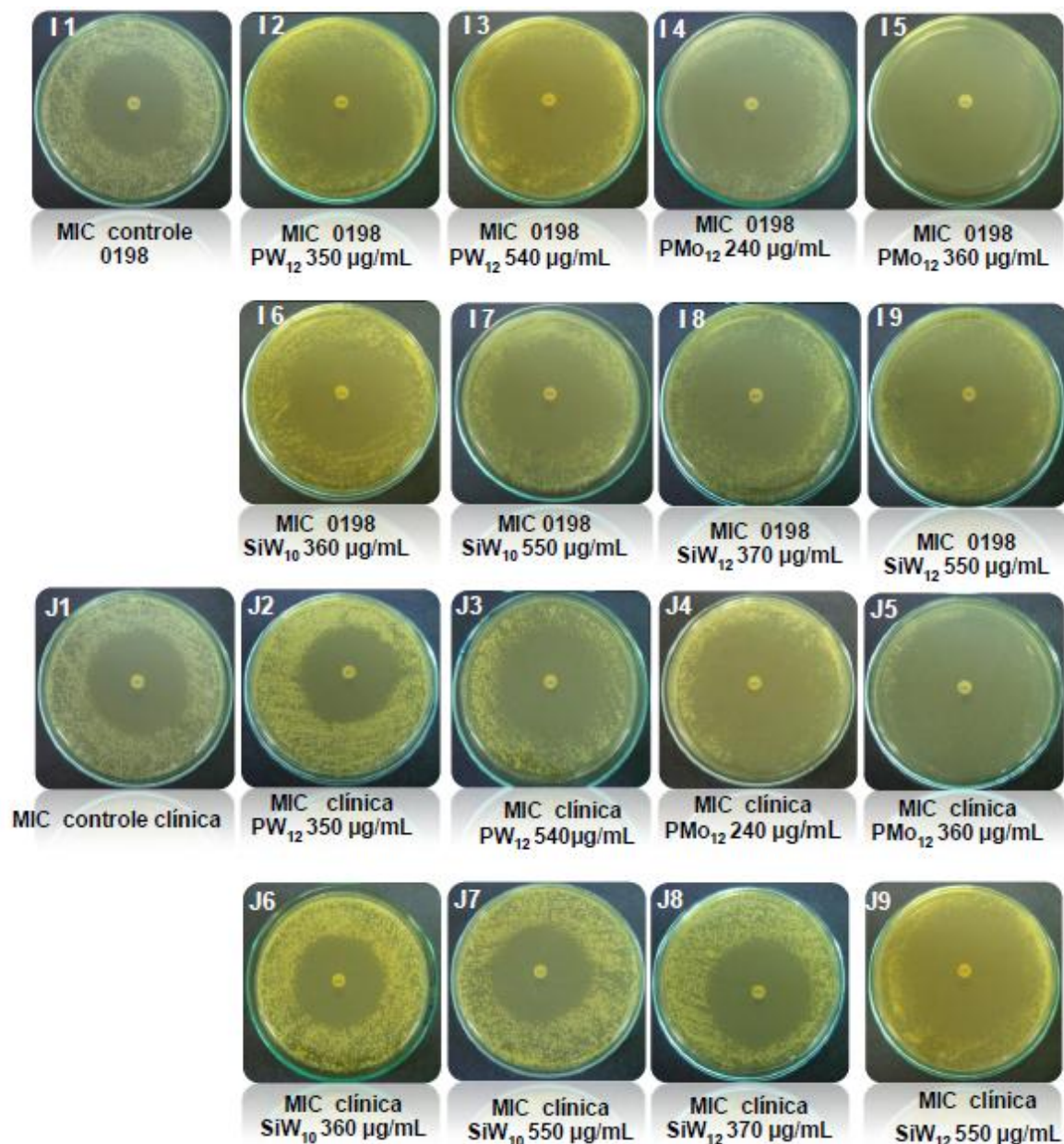


Figura 22: Ensaio de antifungigrama para avaliação de sinergismo: (I) Ilustração do resultado do antifungigrama com o antifúngico Miconazol (MIC) sobre a cepas de *S. schenckii* 0198 e (J) Ilustração do resultado do antifungigrama com o antifúngico Miconazol (MIC) sobre a cepa clínica LSA01 na presença de diferentes concentrações dos HPAs (350 e 540 $\mu\text{g/mL}$ para $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$, 240 e 360 $\mu\text{g/mL}$ para $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$, 360 e 550 $\mu\text{g/mL}$ para $\text{Ag}_6[\text{SiW}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]$ e 370 e 550 para o HPA $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$.

Os resultados dos efeitos dos sais de HPAs mostrados quando comparados com aqueles observados por outros autores (Silva et al., 2005; Dias et al., 2004) que trataram fungos e bactérias com formulações de HPAs semelhantes, mostram o potencial terapêutico destes compostos contra fungos e bactérias patogênicas para animais e humanos. Silva et al (2005) demonstraram que diferentes concentrações de HPAs foram eficazes na inibição do crescimento do fungo causador de otite e dermatite em animais, *Malassezia pachydermatis in vitro*, sendo que o heteropoliácido dodecamolibdofosfato $Ag_3[PMo_{12}O_{40}]$ molecular mostrou efeito inibitório mais proeminente sobre a levedura. Enquanto Dias et al., (2004a) demonstraram que a inibição sobre a levedura patogênica *Candida albicans* quando testaram HPAs em diferentes concentrações, sugerindo o potencial terapêutico destes compostos contra as leveduras. Dias et al., (2004b), ao tratarem *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), bactéria causadora de infecções severas em animais e humanos, mostraram que o HPA além de inibir o crescimento de diferentes cepas da bactéria também interferiu na resposta dos agentes frente a diversos antibacterianos, como demonstrado pelo aumento da zona de inibição em testes padronizados de antibiogramas.

No presente trabalho a inibição variou entre as cepas testadas, porém, com maior atividade sobre a cepa 0199 pelo teste em meio líquido, enquanto que o antifungigrama revelou que a cepa clínica possui um nível maior de resistência do que a cepa 0198 em relação ao itraconazol, que é a droga de escolha para o tratamento da esporotricose em animais e humanos. Os resultados apontam a versatilidade dos compostos para futuras aplicações terapêuticas nas áreas médicas, humana e veterinária.

6.12 Análise por Microscopia Óptica e Eletrônica

As células fúngicas após o cultivo de aproximadamente 23 dias em caldo BHI contendo 0,28 μ M de sais dos HPAs, 0,22mg/mL de compostos de coordenação e 500mg/mL de extratos brutos e semi-sintéticos de “jatobá” foram analisadas por microscopia óptica e processadas para microscopia eletrônica de transmissão e varredura. O efeito destes compostos sobre *S. schenckii* pode ser observado nas figuras 23 a 35.

Em preparações para microscopia óptica e eletrônica de varredura foi possível identificar algumas diferenças na superfície de *S. schenckii* tratados tanto com os compostos sintéticos quanto com os extratos de Jatobá, que podem justificar a atividade fungistática e fungicida demonstrada nos ensaios de inibição em meio líquido. Enquanto que para alguns tratamentos não foi possível identificar diferença significativa entre as células de *S. schenckii* tratadas e o controle sem os compostos.

Por microscopia eletrônica de transmissão, foi possível identificar diferenças significativas nas células fúngicas tratadas tanto com moléculas sintéticas quanto com os extratos da planta “Jatobá” que justificam suas atividades fungicidas e fungistáticas demonstradas nos ensaios de inibição em meio líquido. Nas células controle, sem tratamento, foi possível observar a célula com parede e membranas celulares bem preservadas, enquanto que em células tratadas, as mesmas encontravam-se com esvaziamento citoplasmático, aparente espessamento da parede celular e intensa vacuolização.

6.12.1 Células leveduriformes de *S. schenckii* tratadas com sais de heteropoliácidos

Por microscopia óptica já se pôde observar alterações nas células leveduriformes tratadas com os sais de HPAs (figura 23). Foi observado a produção de hifas a 37°C, que se mostraram mais prejudicadas após o tratamento com o sal de HPA contendo fósforo e molibdênio ($\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$ e $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$) mostrando hifas bastante deformadas (figura 23 B e C), enquanto que o tratamento das células fúngicas com os sais de HPA contendo silício e tungstênio ($\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$ e $\text{Ag}_6[\text{SiW}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]$) mostraram-se mais preservadas (figura 23 D e E).

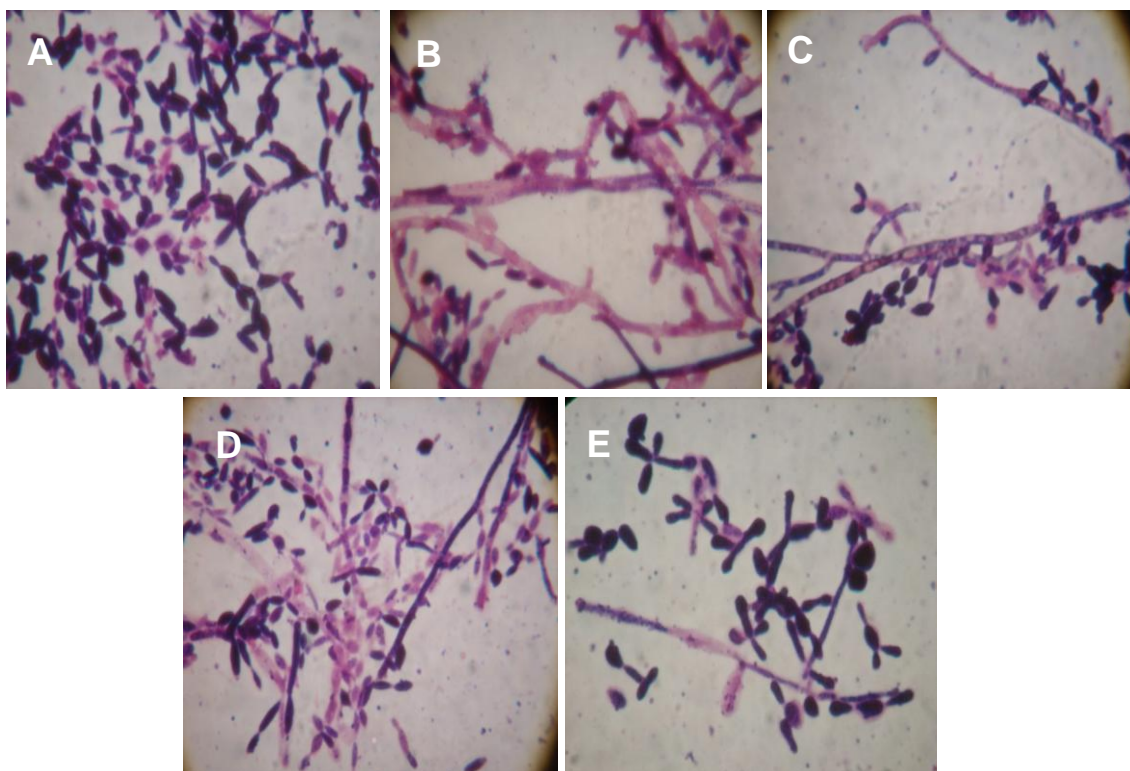


Figura 23: Microscopia óptica de células leveduriformes do fungo *S. schenckii* após tratamentos com sais de Heteropoliácidos: (A) Controle; (B) Células tratadas com o sal de HPA $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$; (C) Células tratadas com o sal de HPA $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$; (D) Células tratadas com o sal de HPA $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$; (E) Células tratadas com o sal de HPA $\text{Ag}_6[\text{SiW}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]$, (aumento 1000X).

A análise por microscopia de varredura mostraram que as células fúngicas tratadas com os sais de HPAs $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$ e $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$ apresentaram um aparente enrugamento de suas superfícies (figuras 23 B e C) e presença de muitas hifas e pouco brotamento quando tratadas pelo sal de HPA $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$ (figura 24D) em contraste com a superfície mais lisa e maior número de brotamento das células controle (figura 24 A). Em geral, as células de *S. schenckii* são caracterizadas por conidióforos terminais e intercalados que proliferam simpodialmente, dando origem a conídios ovóides ou elípticos (Benade et al, 1997).

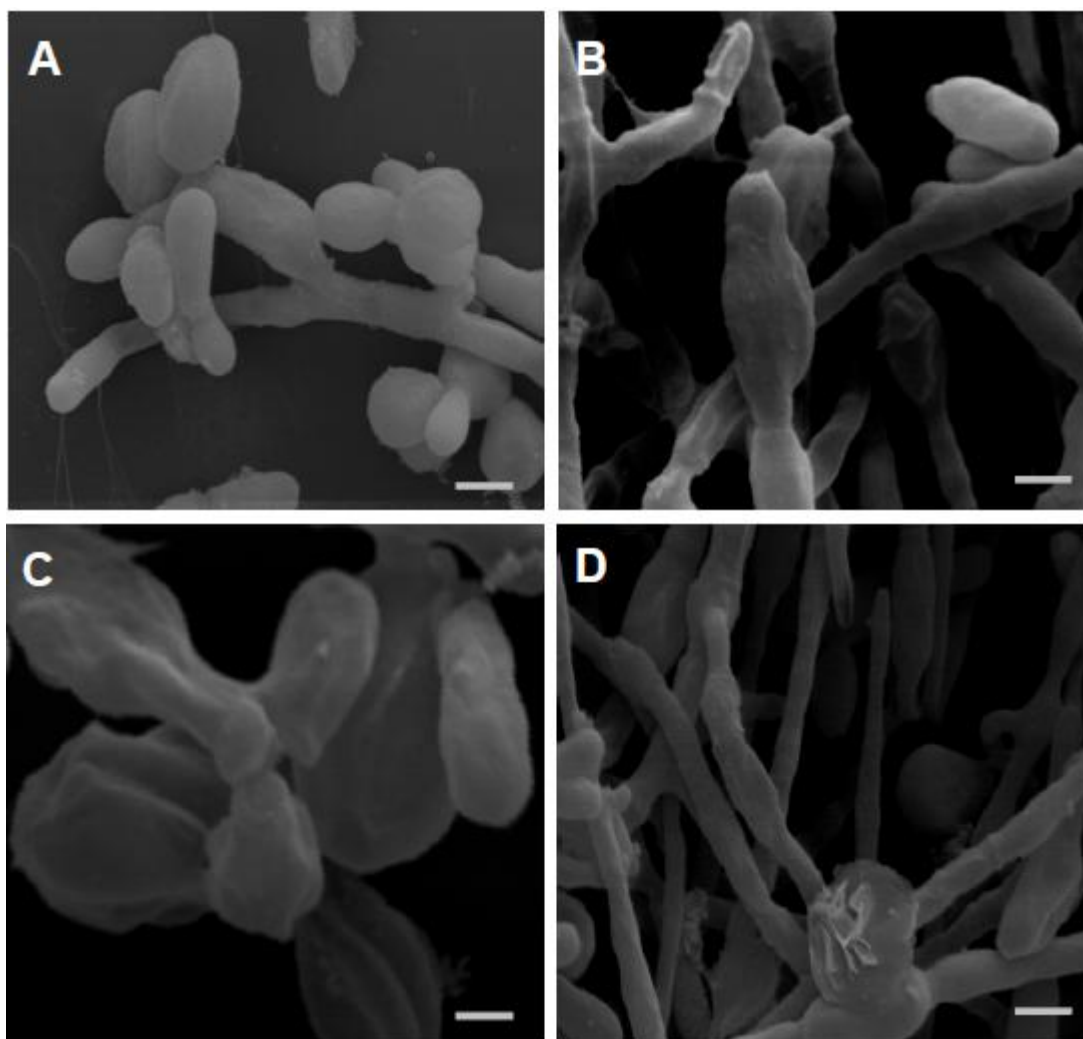


Figura 24: Micrografias Eletrônicas de Varredura de células leveduriformes do fungo *S. schenckii* (cepa 0198) tratadas ou não com sais de heteropoliácidos. (A) Células de *S. schenckii* controle na ausência de tratamento (aumento 10000X, barra= 2 μ m); (B) Células de *S. schenckii* tratadas com o sal de HPA Ag₃[PW₁₂O₄₀] mostrando hifas e conídios pouco deformados (aumento 5000X, barra=5 μ m); (C) Células de *S. schenckii* tratadas com o sal de HPA Ag₃[PMo₁₂O₄₀] mostrando enrugamento dos conídios (aumento 10000X, barra=2 μ m); (D) Células de *S. schenckii* tratadas com o sal de HPA Ag₄[SiW₁₂O₄₀] mostrando hifas bastante finas (aumento 5000X, barra= 5 μ m).

A análise ultra-estrutural das células fúngicas, na forma leveduriforme, tratadas com os sais de HPAs demonstraram diferenças significativas quando comparadas ao controle (figura 25 A). A ultra-estrutura de células leveduriformes de *S. schenckii* observada por Lane e colaboradores desde 1969 foi caracterizada por células ovóides ou fusiformes que apresentavam um ou múltiplos brotamentos, com parede celular espessa fragmentada e uma camada externa microfibrilar eletro-densa.

As células de *S. schenckii* tratadas com o sal de HPA $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$ apresentaram desestruturação da parede celular, formação de grandes vacúolos e camada externa microfibrilar preservada (figuras 25 B e C). Algumas células tratadas com o sal $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$ mostraram uma desestruturação da parede celular (figura 25 D), desorganização da membrana com formação de uma estrutura que lembra uma figura de mielina (figura 25 E), além da formação de vacúolos grandes e camada microfibrilar externa preservada (figura 25 F), enquanto que as células fúngicas tratadas com $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$ mostraram intensa vacuolização, desorganização (figura 25 G) e descolamento da membrana (figura 25 H).

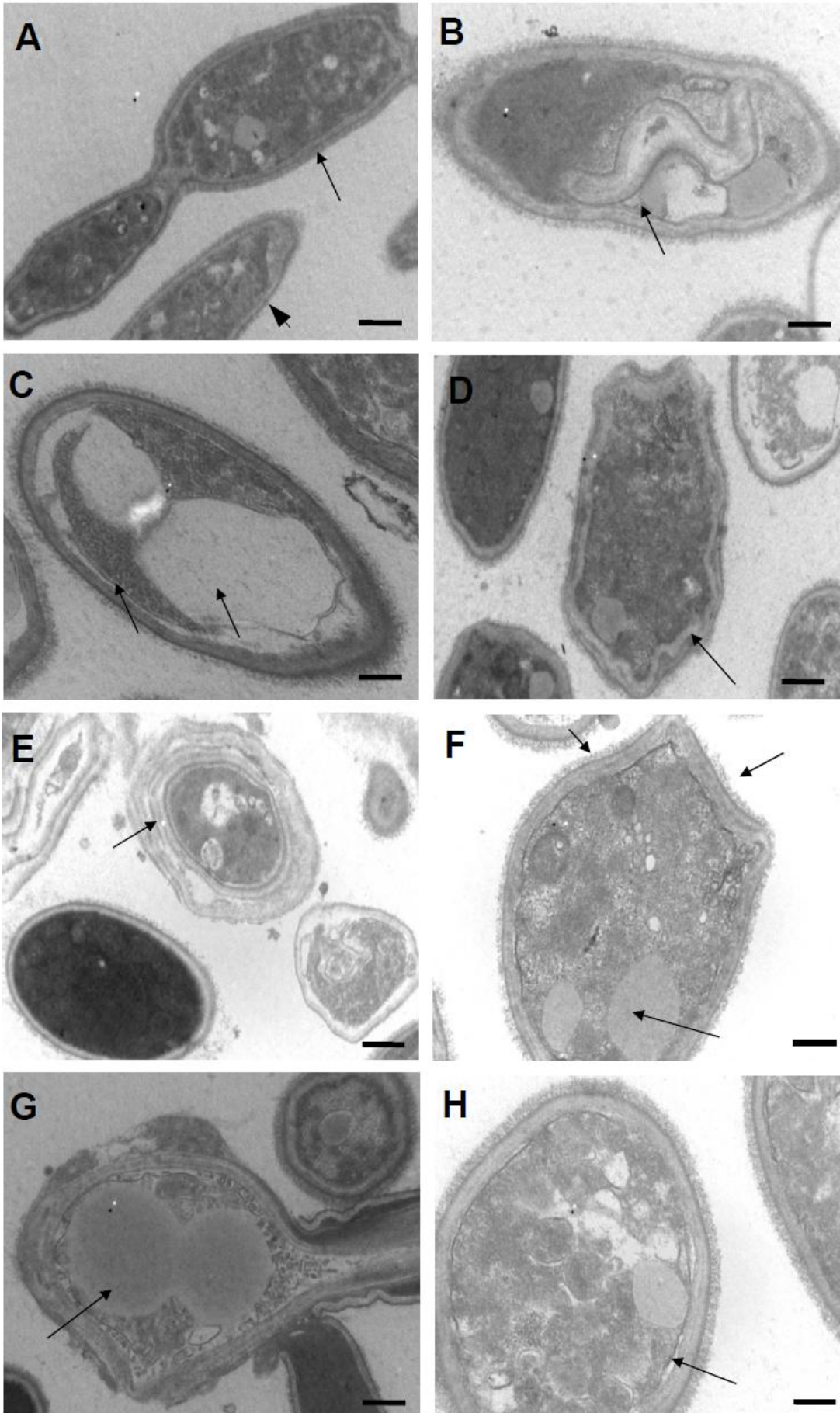


Figura 25: Micrografias eletrônicas de transmissão de células leveduriformes de *S. schenckii* (cepa 0198) tratadas ou não com sais de HPAs. (A) Célula de *S. schenckii* controle na ausência de tratamento (aumento 7000X, barra=1 μ m); (B) Células de *S. schenckii* tratadas com $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$ apresentando desestruturação da parede celular e formação de grandes vacúolos (aumento 7000X, barra=1 μ m) e em (C) Células de *S. schenckii* tratadas com $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$ apresentando descolamento da membrana plasmática (aumento 12000X, barra=500nm). (D) Células de *S. schenckii* tratadas com $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$ apresentando desorganização da membrana (aumento de 7000X, barra=1 μ m), (E) Células de *S. schenckii* tratadas com $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$ mostrando a desestruturação da parede celular e formação de uma estrutura que lembra uma figura de mielina (aumento de 7000X, barra=1 μ m) e (F) Células de *S. schenckii* tratadas com $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$ mostrando formação de vacúolos grandes e camada microfibrilar preservada (aumento de 12000X, barra=1 μ m); (G) Células de *S. schenckii* tratadas com $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$ mostrando a formação de grandes vacúolos (aumento 7000X, barra=1 μ m) e (H) descolamento da membrana (aumento 12000X, barra=500nm).

6.12.2 Células leveduriformes de *S. schenckii* tratadas com compostos de coordenação com base zinco, cobre e cobalto complexados ao ligante HPCINOL

Por microscopia óptica, as células tratadas com os compostos de coordenação com base zinco, cobre e cobalto apresentaram mudanças na sua forma tornando-se mais ovaladas quando comparadas com o controle que apresentaram células em forma de “charuto”, mais alongadas e formação de hifas a 37°C (figura 26). Após o tratamento com o complexo ZnHPCINOL (figura 26 B) foi observado a deformação das hifas e pouco brotamento em contraste com as células tratadas com o complexo CoHPCINOL que mostrou grande quantidade de brotamento.

A microscopia óptica das células fúngicas tratadas apenas com o ligante HPCINOL (figura 26 E) mostrou apenas resíduos celulares comprovando o efeito fungicida do composto mostrado pelos testes de inibição em meio líquido discutido anteriormente.

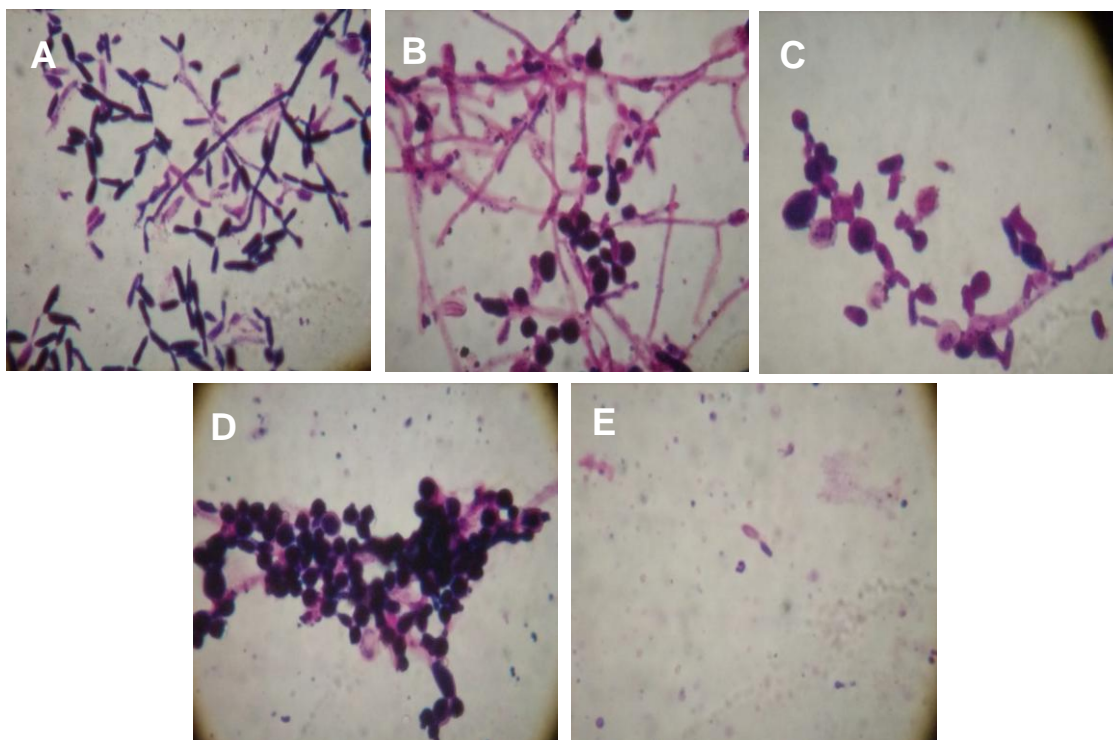


Figura 26: Microscopia óptica de células leveduriformes do fungo *S. schenckii* após tratamentos com compostos de coordenação com base zinco, cobre e cobalto complexados ao ligante HPCINOL: (A) Controle, mostrando células fusiformes e com brotamento; (B) Células tratadas com o composto de coordenação ZnHPCINOL, mostrando hifas deformadas e células mais ovaladas; (C) Células tratadas com o composto de coordenação CuHPCINOL mostrando células ovaladas; (D) Células tratadas com o composto de coordenação CoHPCINOL mostrando células ovaladas e com bastante brotamento; (E) Tratamento com o ligante HPCINOL mostrando apenas os resíduos celulares; (aumento 1000X).

A análise por microscopia eletrônica de varredura das células fúngicas tratadas com os complexos de coordenação ZnHPCINOL mostrou que as células apresentaram-se um pouco enrugadas em relação ao controle e presença de brotamentos (figuras 27 A e B), enquanto que as células tratadas com o CuHPCINOL e CoHPCINOL mostraram conídios mais deformados e com menor quantidade de brotamento, apesar de mostrarem uma atividade inibitória um pouco menor (68% e 60% respectivamente) em relação ao zinco (75%) em meio de cultura líquido (figura 27 C e D).

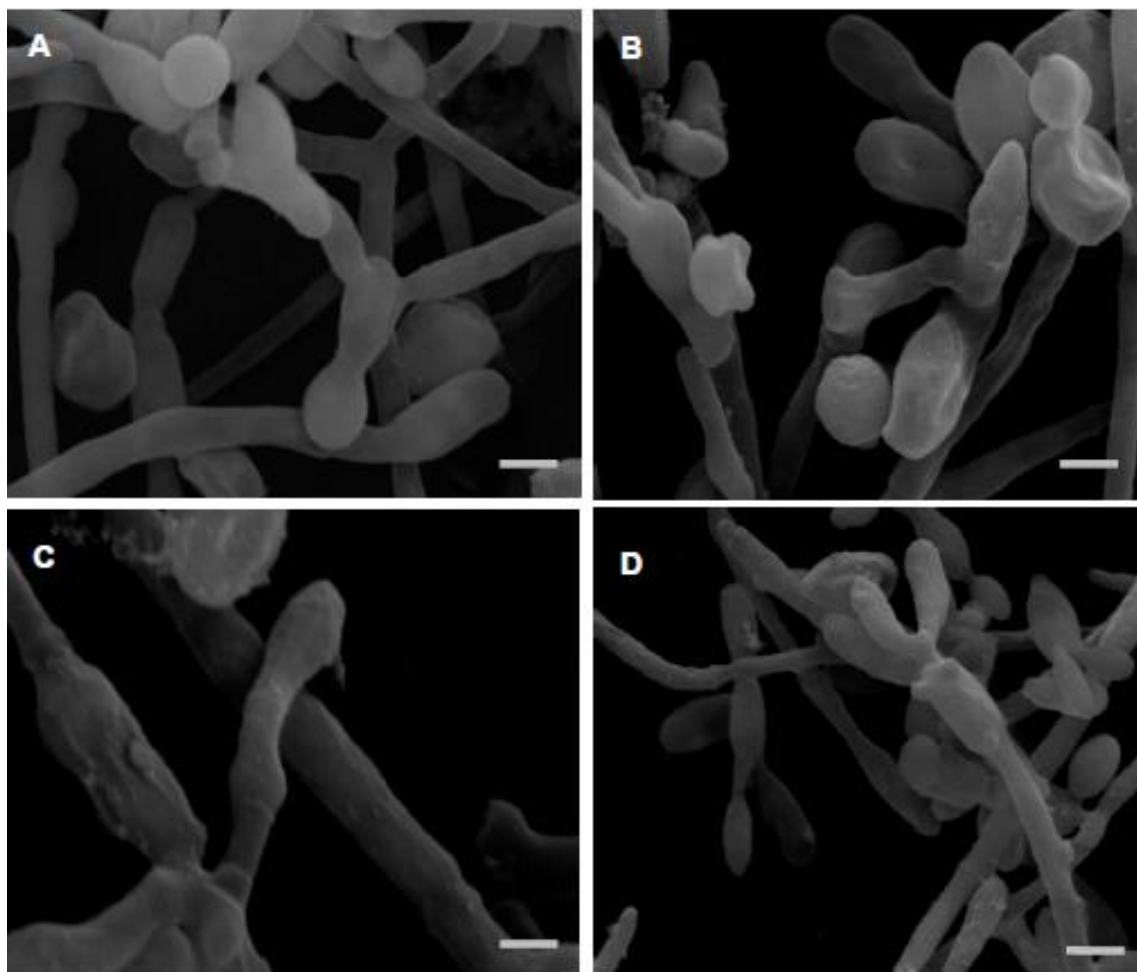


Figura 27: Micrografias Eletrônicas de Varredura de células leveduriformes do fungo *S. schenckii* (cepa 0198) tratadas ou não com compostos de coordenação com base zinco, cobre e cobalto complexados ao ligante HPCINOL: (A) Células de *S. schenckii* controle na ausência de tratamento (aumento 10000X, barra= 2 μ m); (B) Células de *S. schenckii* tratadas com ZnHPCINOL apresentando conídios um pouco enrugados (aumento de 10000X, barra =2 μ m); (C) Células tratadas com o complexo de coordenação CuHPCINOL; (D) Células de *S. schenckii* tratadas com o composto de coordenação CoHPCINOL (aumento de 5000X, barra =5 μ m).

O estudo por microscopia eletrônica de transmissão de células leveduriformes de *S. schenckii* tratadas com o complexo de coordenação ZnHPCINOL demonstraram espessamento da parede celular e presença de vacúolos mais densos (figuras 28 B e C).

O complexo CuHPCINOL que em meio líquido demonstrou efeito antimicrobiano inferior ao complexo com base zinco, também causou mudanças ultra-estruturais sobre *S. schenckii* demonstrando espessamento e desestruturação da parede celular (figuras 28 C e D). As células leveduriformes de *S. schenckii* tratadas com o complexo de coordenação CoHPCINOL apresentaram a presença de grânulos mais densos ao redor da parede celular espessa e desorganização do citoplasma (figuras 28 E e F).

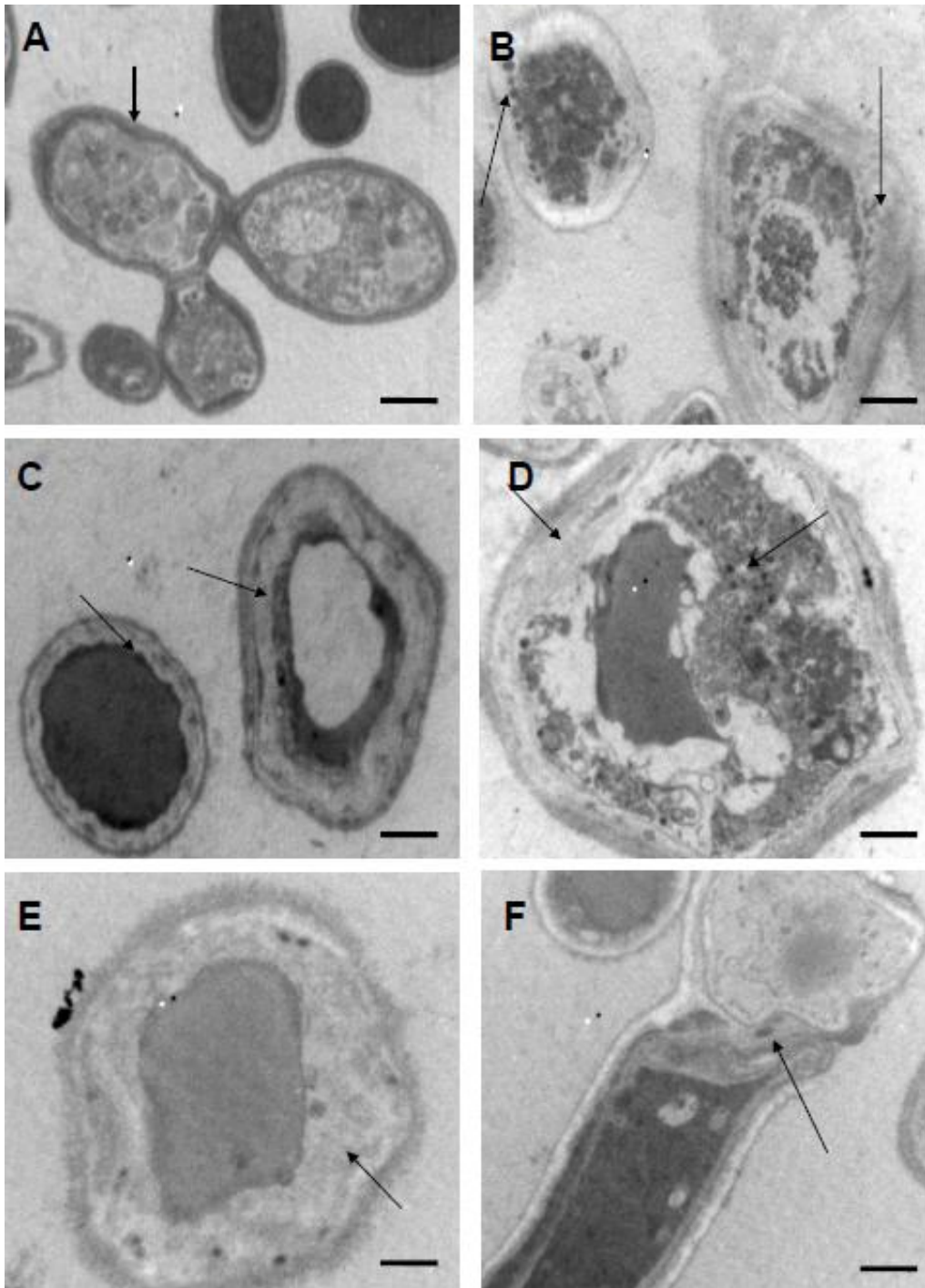
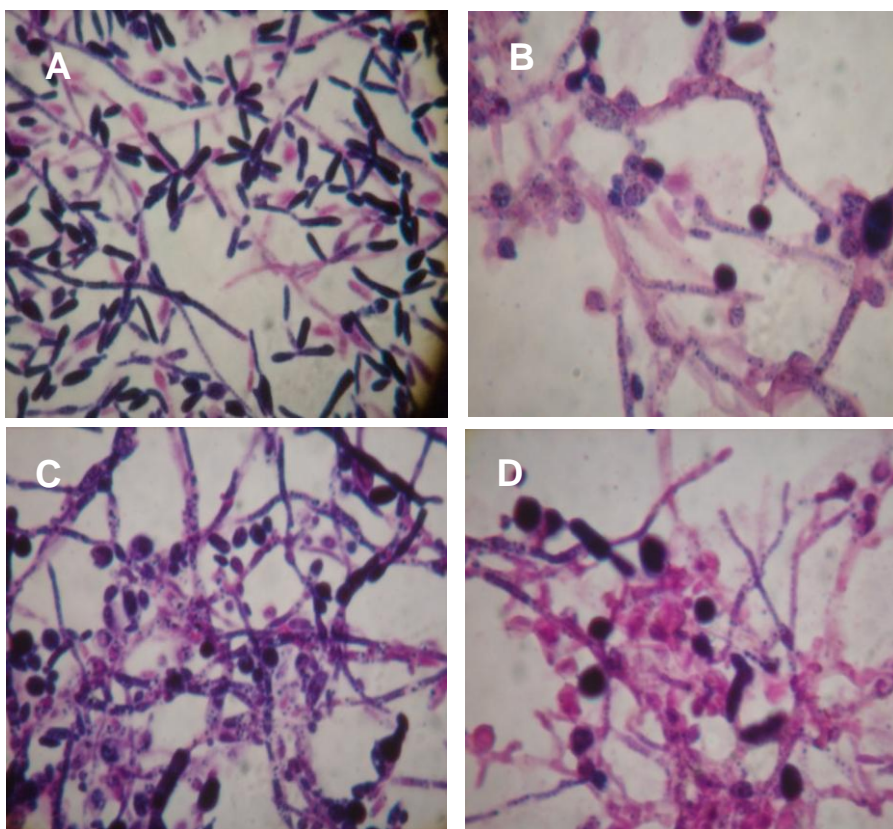


Figura 28: Micrografias eletrônicas de transmissão de células leveduriformes de *S. schenckii* (cepa 0198) tratadas ou não com compostos de coordenação com base zinco, cobre e cobalto complexados ao ligante HPCINOL. (A) Célula de *S. schenckii* controle na ausência de tratamento (aumento 3000X, barra=2 μ m); (B) Células de *S. schenckii* tratadas com o composto de coordenação ZnHPCINOL apresentando um espessamento da parede celular e presença de vacúolos mais densos (aumento 44000X, barra=2 μ m); (C) Células de *S. schenckii* tratadas com o composto de coordenação CuHPCINOL demonstrando espessamento da parede celular (aumento 44000X, barra=2 μ m); (D) Células de *S. schenckii* tratadas com o composto de coordenação CuHPCINOL demonstrando uma desestruturação da parede (aumento 7000X, barra=1 μ m); (E e F) Células de *S. schenckii* tratadas com o composto de coordenação CoHPCINOL demonstrando desorganização do citoplasma e pouco contraste (aumento 12000X, barra=500nm e 7000X, barra=1 μ m, respectivamente).

6.12.3 Células leveduriformes de *S. schenckii* tratadas com compostos de coordenação com base cobre complexados aos ligantes BMPA, MBPA, BSA e BSE

Por microscopia óptica, as células tratadas com os compostos de coordenação com base cobre complexados a diferentes ligantes demonstraram mudanças na sua morfologia tornando-se ovaladas quando comparadas ao controle (figuras 29 B,C,D,E,G,H,I e J) com exceção das células fúngicas tratadas com o complexo CuBSE que permaneceram um pouco alongadas após o tratamento (figura 29 F) quando comparamos com o controle e com as células tratadas somente com o ligante BSE (figura 29 J). Por microscopia óptica, as alterações mais significativas após o tratamento com os ligantes foram observados quando foram utilizados os ligantes BMPA e BSA por (figuras 29 B e I).



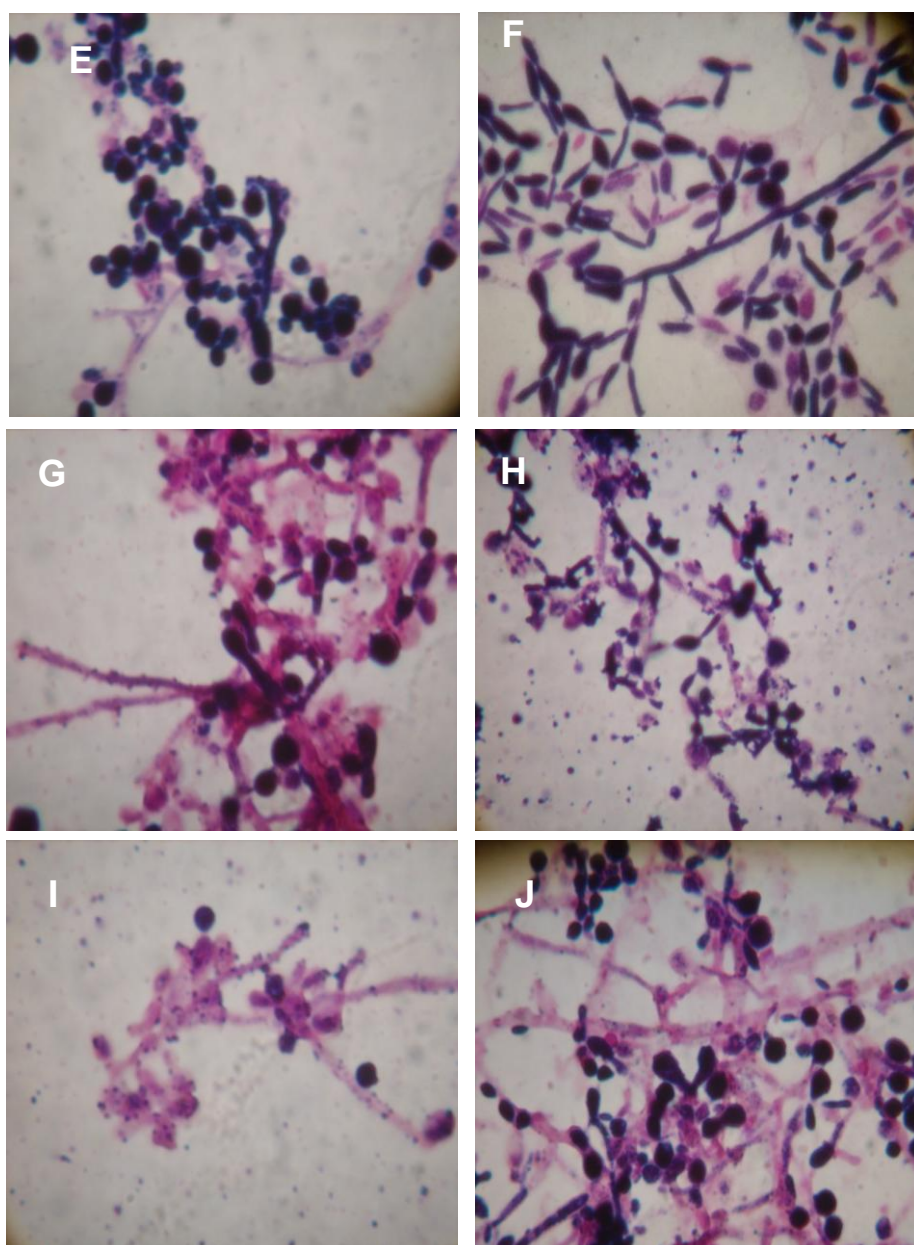


Figura 29: Microscopia óptica de células leveduriformes do fungo *S. schenckii* após tratamentos com compostos de coordenação com base cobre complexados a diferentes ligantes: (A) Controle; (B e C) Células tratadas com o complexo de coordenação CuBMPA; (D) Células tratadas com o complexo de coordenação CuMBPA; (E) Células tratadas com o complexo de coordenação CuBSA; (F) Células tratadas com o complexo de coordenação CuBSE; (G) Células tratadas com o ligante BMPA; (H) Células tratadas com o ligante MBPA; (I) Células tratadas com o ligante BSA; (J) Células tratadas com o ligante BSE.

As células fúngicas tratadas com os complexos de coordenação CuBMPA demonstraram por microscopia eletrônica de varredura um aparente enrugamento de sua superfície (figura 30 B) em contraste com a superfície lisa das células controle na ausência dos compostos. Após o tratamento com o complexo CuMBPA pôde ser observado um maior alongamento das células e pouco brotamento (figura 30 C) e após o tratamento com o ligante BSE foi observado enrugamento da superfície celular e pequenos brotamentos (figura 30 E).

Apesar do ótimo efeito inibitório destes compostos de coordenação, com base cobre, complexados aos ligantes BMPA, MBPA, BSA e BSE (acima de 85%), em meio de cultura líquido, foi observado pela técnica de microscopia, que as células continuaram um pouco viáveis, mostrando que os mesmos foram fungistáticos e não fungicida como ocorreu com o ligante HPCINOL.

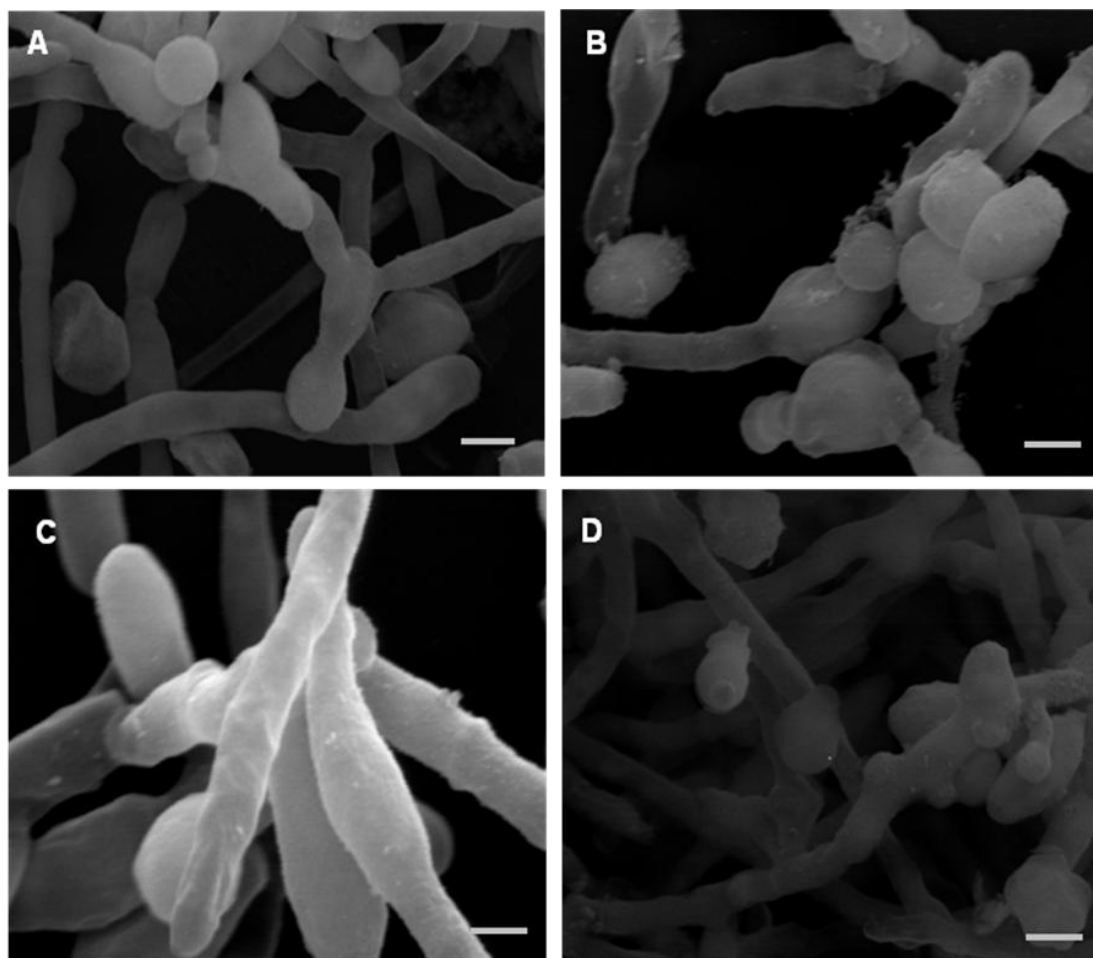


Figura 30 Micrografias Eletrônicas de Varredura de células leveduriformes do fungo *S. schenckii* (cepa 0198) tratadas ou não com compostos de coordenação com base cobre complexados a diferentes ligantes: (A) Células de *S. schenckii* controle na ausência de tratamento (aumento 10000X, barra= 2 μ m); (B) Células de *S. schenckii* tratadas com o complexo de coordenação CuBMPA mostrando pouco enrugamento da superfície celular (aumento de 10000X, barra= 2 μ m); (C) Células de *S. schenckii* tratadas com o complexo de coordenação CuMBPA apresentando hifas bastante alongadas que diferem do controle (aumento 10000X, barra=2 μ m); (D) Células de *S. schenckii* tratadas com o ligante BSE apresentando enrugamento celular e pouco brotamento (aumento 5000X, barra=5 μ m).

A análise ultra-estrutural das células leveduriformes de *S. schenckii* tratadas com o complexo de coordenação CuBMPA demonstrou um certo descolamento da membrana e acúmulos de grânulos eletro-densos do lado interno da membrana (figura 31 B). Após tratamento com o complexo CuMBPA foi observado um esvaziamento do conteúdo citoplasmático e acúmulo de material eletro-denso por toda a parede celular (figuras 31 C e D).

Para o complexo de coordenação CuBSA, além da intensa presença de grânulos eletro-densos, houve intensa vacuolização e suposto transporte de material entre os vacúolos (figuras 31E e F). As células leveduriformes de *S. schenckii* tratadas com o complexo CuBSE mostraram intensa vacuolização (figuras 31 G e H) e um aparente condensação da cromatina (figura 31 H).

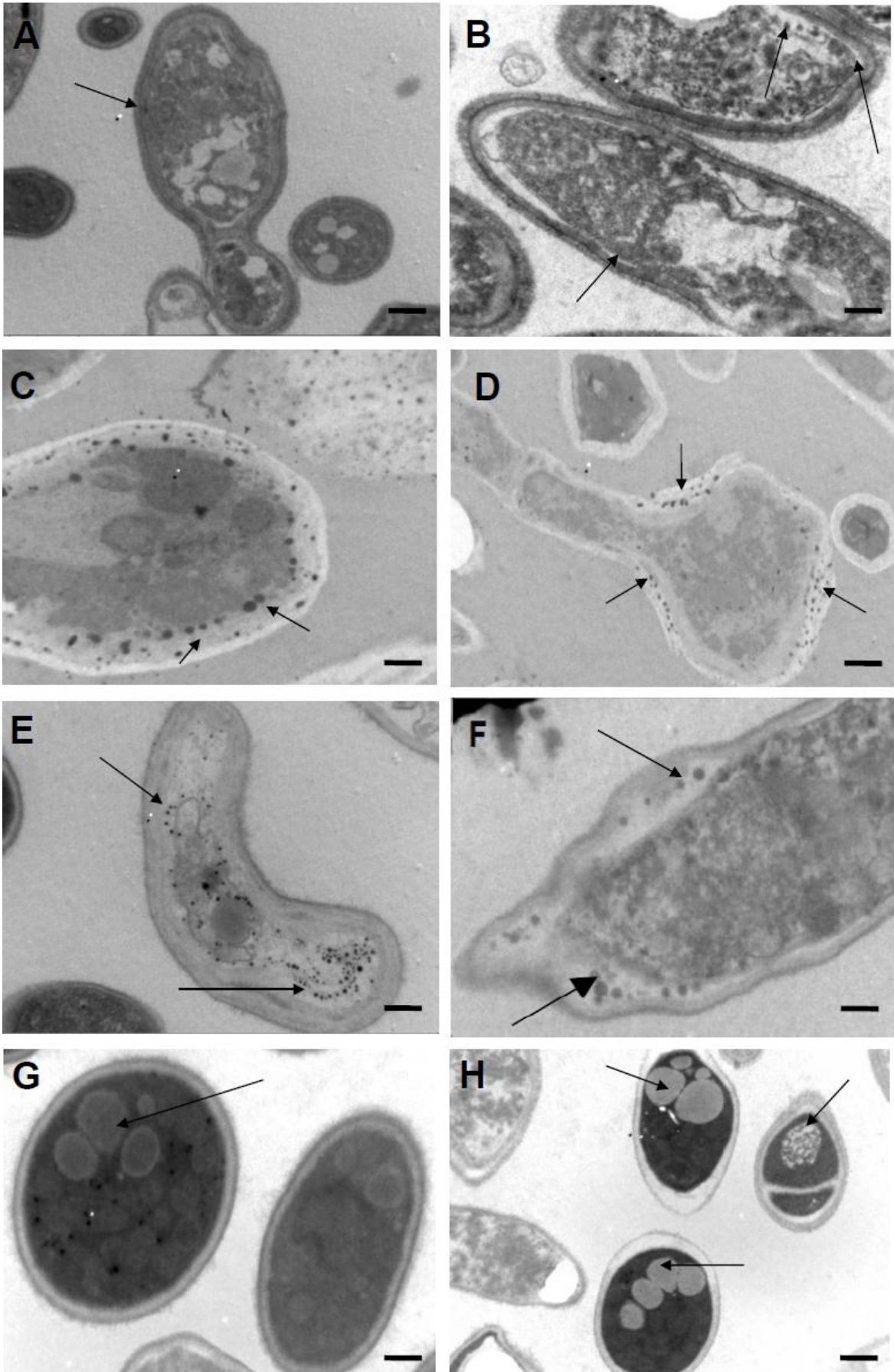


Figura 31: Micrografias eletrônicas de transmissão de células leveduriformes de *S. schenckii* tratadas ou não com compostos de coordenação com base cobre complexados a diferentes ligantes. (A) Célula de *S. schenckii* controle na ausência de tratamento; (B) Células de *S. schenckii* tratadas com CuBMPA apresentando descolamento da membrana e acúmulo de grânulos eletro-densos no lado interno da membrana plasmática (aumento 7000X, barra=1 μ m) e (C) Células de *S. schenckii* tratadas com CuMBPA mostrando esvaziamento do citoplasma e acúmulo de material na face interna da membrana (aumento 12000X, barra=500nm) e (D) mostrando o acúmulo de material eletro-denso ao redor a parede (aumento 3000X, barra=2 μ m); (E) Células de *S. schenckii* tratadas com CuBSA demonstrando uma desorganização citoplasmática, acúmulo de material eletro-denso e suposta comunicação e transporte entre os vacúolos (aumento 12000X, barra=500nm) e (F) Células de *S. schenckii* tratadas com CuBSA demonstrando acúmulo de material eletro-denso no lado interno da parede celular (aumento 7000X, barra=1 μ m); (G) Células de *S. schenckii* tratadas com CuBSE mostrando intensa vacuolização (aumento 7000X, barra=1 μ m) e (H) Células de *S. schenckii* tratadas com CuBSE mostrando intensa vacuolização e aparente condensação da cromatina (aumento 4400X, barra=2 μ m).

6.12.4 Células leveduriformes de *S. schenckii* tratadas com os extratos brutos e semi-sintéticos de *Hymenaea stigonocarpa*

O tratamento com os extratos de jatobá não foram significativos pelo ensaio de difusão em ágar, mas em meio líquido os extratos mostraram seus efeitos sobre as células leveduriformes de *S. schenckii* que puderam ser confirmadas pelas técnicas de microscopia. Por microscopia óptica foi observado que as células tratadas com os extratos brutos PS3, PS1 e Isozato apresentaram hifas bastante danificadas e com com muito pouco brotamento (figura 32 C, D e E) quando comparada às células controle não tratadas (figura 32 A).

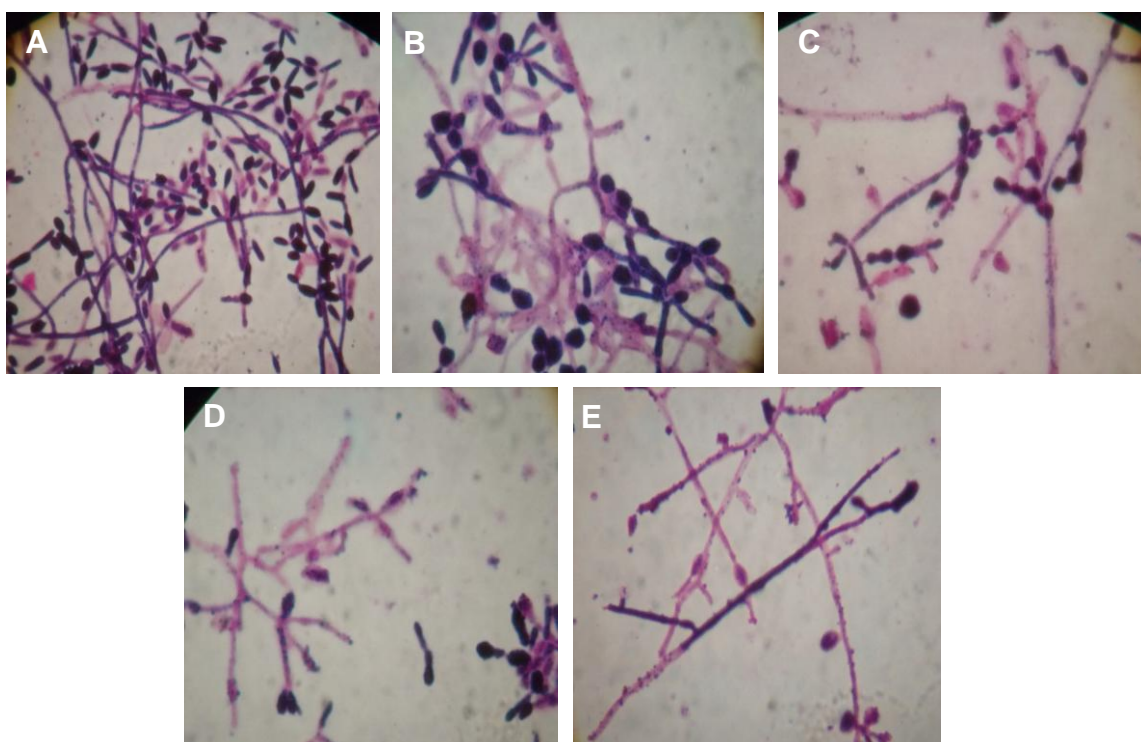


Figura 32: Microscopia óptica de células leveduriformes do fungo *S. schenckii* após tratamentos com extratos de plantas: (A) Controle; (B) Células tratadas com o extrato bruto de “Jatobá” P5; (C) Células tratadas com o extrato bruto de “Jatobá” PS3; (D) Células tratadas com o extrato bruto de “Jatobá” PS1 e (E) Células tratadas com o extrato bruto de “Jatobá” Isozato (aumento 1000X).

A análise por microscopia eletrônica de varredura demonstrou que as células tratadas com os extratos brutos PS1 e P5 apresentaram pouco enrugamento, mas com células em brotamento. A superfície das células tratadas com os extratos brutos Isozato e PS3 (figuras 33 D e E) ficou mais danificada do que quando tratadas com o derivado isolado semi-sintético S3A (figura 33 F), não correspondendo com o que de fato ocorreu pelo teste em meio de cultura líquido, onde o composto isolado S3A apresentou um percentual de 94% de inibição em relação aos extratos brutos isozato e PS3 que apresentaram 71% e 88%, respectivamente.

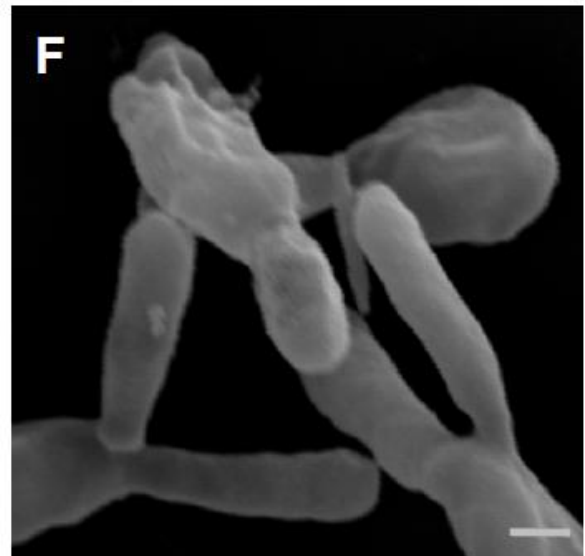
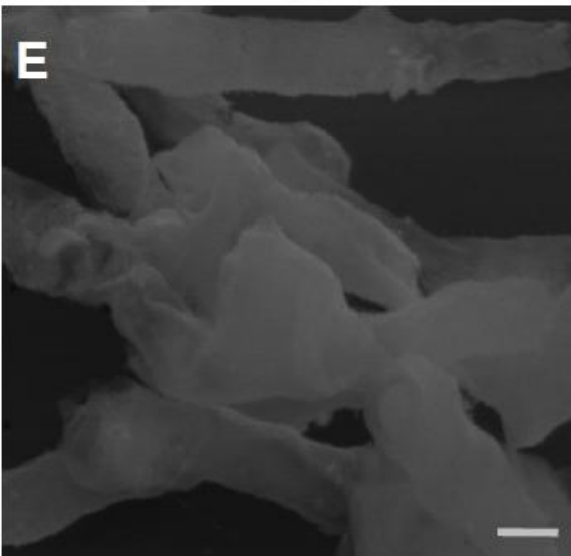
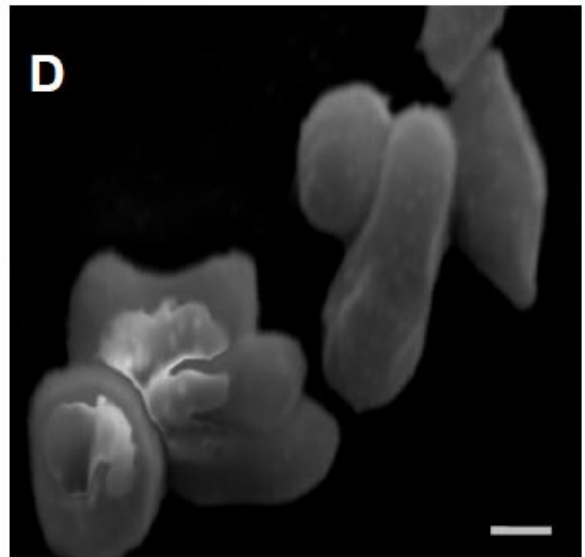
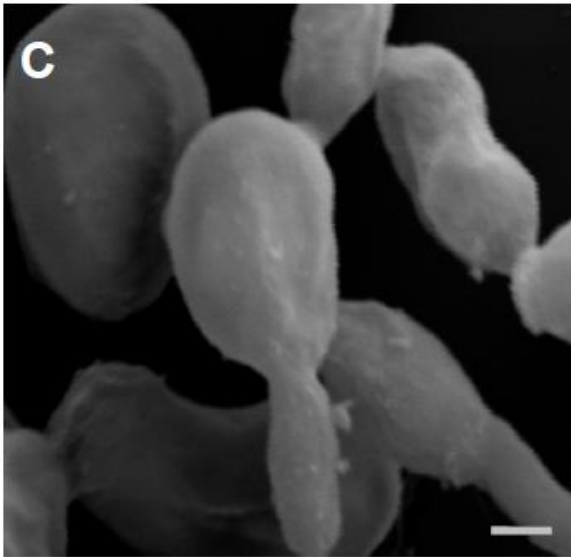
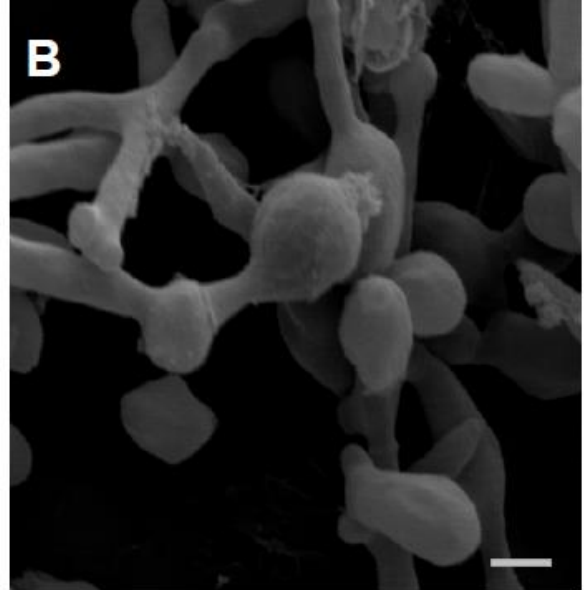
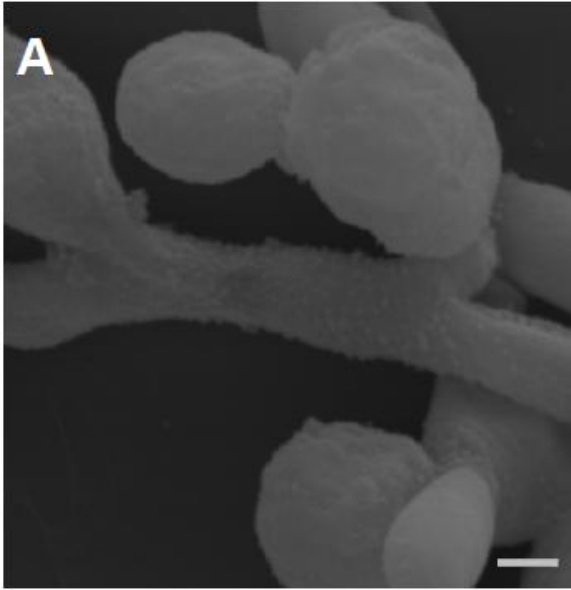


Figura 33: Micrografias Eletrônicas de Varredura de células leveduriformes do fungo *S. schenckii* (cepa 0198) tratadas ou não com extratos brutos e semi-sintéticos de “jatobá”:

(A) Células de *S. schenckii* controle na ausência de tratamento (aumento de 10000X, barra 2 μ m); (B) Células de *S. schenckii* tratadas com o extrato bruto PS1 (aumento de 5000X, barra 5 μ m); (C) Células de *S. schenckii* tratadas com o extrato bruto P5 mostrando conídios um pouco enrugados (aumento de 6000X, barra 5 μ m); (D) Células de *S. schenckii* tratadas com o extrato bruto Isozato demonstrando conídios deformados (aumento de 6000X, barra 5 μ m); (E) Células de *S. schenckii* tratadas com o extrato bruto PS3 (aumento de 6000X, barra 5 μ m) e (F) Células de *S. schenckii* tratadas com o extrato semi-sintético S3A demonstrando conídios pouco deformados (aumento de 6000X, barra 5 μ m).

A avaliação da ultra-estrutura das células de *S. schenckii* tratadas com os extratos brutos P1, P5, PS1 e PS3 demonstraram espessamento da parede celular, descolamento da membrana e presença de hifas (figuras 34 B, C, D e E) enquanto que o tratamento com o extrato bruto Isozato demonstrou a presença de vacúolos ao redor da célula possivelmente indicando a deposição do pigmento semelhante à melanina (figuras 34 G e H).

Uma micrografia eletrônica de transmissão semelhante à figura 34 H foi observada por Romero-Martinez et al (2000) ao tratarem conídios não pigmentados (albinos) com o precursor *scytalone* para a produção de melanina (figura 35). Neste estudo foi observado que tanto conídios selvagens que produzem o pigmento quanto os conídios albinos crescidos em meio suplementado com o *scytalone* foram menos susceptíveis à radiação ultravioleta e radicais reativos de oxigênio e nitrogênio, além de serem mais resistentes à fagocitose em modelo murino, demonstrando que o pigmento provavelmente protege a célula fúngica contra certos antimicrobianos oxidativos e ao ataque de macrófagos.

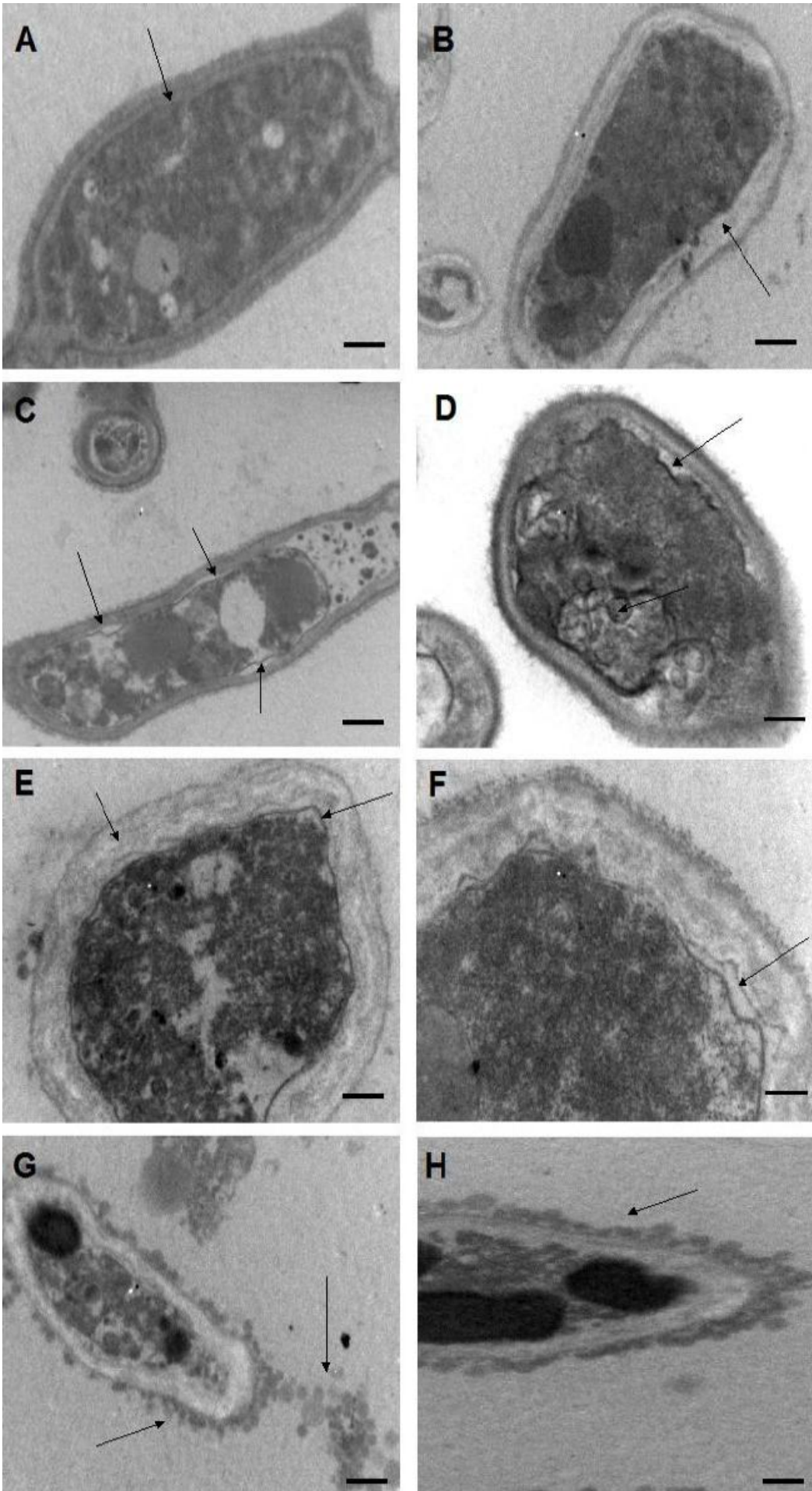


Figura 34: Micrografias eletrônicas de transmissão de células leveduriformes de *S. schenckii* tratadas ou não com compostos naturais isolados da planta *Hymenaea stigonocarpa*. (A) Célula de *S. schenckii* controle na ausência de tratamento (aumento 4400X, barra=2 μ m); (B) Células de *S. schenckii* tratadas com o extrato bruto P1 demonstrando espessamento da parede celular (aumento 7000X, barra=1 μ m); (C) Células de *S. schenckii* tratadas com o extrato bruto P5 demonstrando descolamento da membrana e presença de hifas (aumento 7000X, barra=1 μ m); (D) Células de *S. schenckii* tratadas com o extrato bruto PS1 demonstrando descolamento da membrana e desorganização do citoplasma (aumento 20000X, barra=500nm); (E e F) Células de *S. schenckii* tratadas com o extrato bruto PS3 demonstrando intenso espessamento da parede celular (aumento 20000X, barra=500nm); (G e H) Células de *S. schenckii* tratadas com o extrato bruto Isozato demonstrando a presença de vacúolos eletro-densos ao redor da célula.

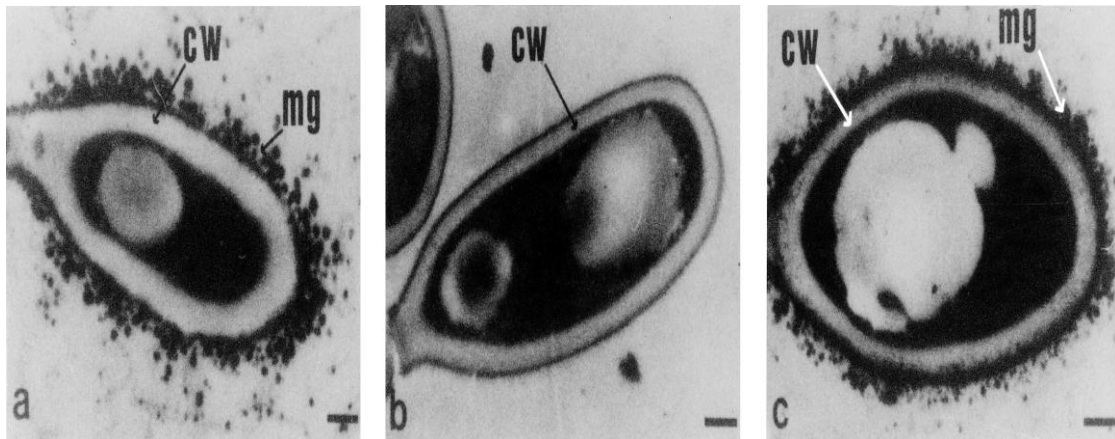


Figura 35: Micrografia eletrônica de transmissão mostrando a produção de grânulos eletrodensos semelhantes à melanina após tratamento de conídios albinos com *scytalone*. (A) tipo selvagem Mel^+ ; (B) albino Mel^- 14 e (C) albino Mel^- 14 em meio suplementado com *scytalone* (Romero-Martinez et al., 2000).

7. CONCLUSÕES

- As análises dos resultados da aplicação das duas classes de compostos utilizados neste trabalho, compostos sintéticos e extratos naturais de plantas, provaram sua atividade sobre o crescimento de *Sporothrix schenckii*;
- Nos ensaios com heteropoliácidos foi demonstrado maior inibição pelos sais de HPA $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$ e $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$, tanto em meio líquido quanto por difusão em ágar e no ensaio de antifungigrama, onde foi demonstrado o poder de sinergismo entre os compostos sintéticos e drogas antifúngicas disponíveis para o tratamento da esporotricose;
- Quanto aos compostos de coordenação, foi observado que nos ensaios em meio de cultura líquido, o ligante HPCINOL apresentou efeito fungicida sobre os cultivos de *S. schenckii*, enquanto que os ligantes BMPA, MBPA, BSA e BSE foram todos fungistáticos;
- Os compostos de coordenação com os metais zinco, cobre e cobalto reduziram a atividade do ligante HPCINOL tanto nos ensaios em meio de cultura líquido quanto por difusão em Ágar. Enquanto que os compostos de coordenação com base cobre complexados aos ligantes BMPA, MBPA, BSA e BSE potencializou a atividade dos ligantes;
- Os extratos de “Jatobá” apresentaram atividade inibitória frente à *Sporothrix schenckii* somente em meio de cultura líquido. Por difusão em ágar os mesmos não apresentaram atividade mesmo em concentrações maiores;
- Micrografias eletrônicas das células fúngicas tratadas com os compostos sintéticos e naturais confirmaram o efeito inibitório dos mesmos através de

intensa vacuolização, desestruturação da parede celular e desorganização do citoplasma.

- Entre os compostos sintéticos utilizados neste trabalho, os que apresentaram melhores efeitos sobre a forma leveduriforme do fungo dimórfico *Sporothrix schenckii* foram o sal de HPA $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$, os ligantes HPCINOL e BMPA dos compostos de coordenação e os extratos brutos e derivados de Jatobá PS3, Isozato e S3A, respectivamente.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agarwal, S., Gopal, K., Kumar, B. (2008) Sporotrichosis in Uttarakhand (India): a report of nine cases. Tropical medicine rounds. *Internat J Dermatol*, 47:367–371.

Agizzio, A.P., Carvalho, A.O., Ribeiro, S.F.F., Machado, O.L.T., Alves, E.W., Okorokov, L.A., Samarão, S.S., Bloch Jr, C., Prates, M.V., Gomes, V.M. (2003) A 2S albumin-homologous protein from passion fruit seeds inhibits the fungal growth and acidification of the medium by *Fusarium oxysporum*. *Arch Biochem Biophys*, 416: 188-195.

Al-Tawfic, J.A. & Wools, K.K. (1998) Disseminated sporotrichosis and *Sporothrix schenckii* fungemia as the initial presentation of human immunodeficiency virus infection. *Clin Infect Dis*, 26: 1403-1406.

Amaral, K.A.S., Carlos, L.A., Vieira, I.J.C., Mathias, L., Brás-Filho, R., Vieira-da-Motta, O. (2007) Efeito antimicrobiano de extrato metanólico de *Rauvolfia grandiflora* Mart. ex A. DC sobre estirpes patogênicas de *Staphylococcus* spp. *Rev Univ Rural Ciên Vida*, 27:182-184.

Araújo, R., Rodrigues, A.G., Pina-Vaz, C. (2004) A fast, practical and reproducible procedure for the standardization of the cell density of an *Aspergillus* suspension. *J Med Microbiol*, 53: 783–786.

Assis, V.M., Parrilha, G.L., Fernandes, C., Horn Jr, A., Silva, M.J.R., Vieira-da-Motta, O. (2007) Avaliação antimicrobiana dos complexos $Zn[(H_2BPCINOL)Cl_2]$ e $Co[(H_2BPCINOL)Cl_2]$ frente a *S. aureus* e *C. albicans*. 30ª Reunião anual da Sociedade Brasileira de Química, 31 de maio a 03 de junho, Centro de Convenções do Hotel Monte Real Resort em Águas de Lindóia - SP.

Assis, V.M. (2008) Síntese, caracterização e atividade frente à *Staphylococcus aureus* de compostos de cobalto e zinco. Trabalho de conclusão de curso em Química. Universidade Estadual do Norte Fluminense-RJ. 53p.

Barbosa, L.F., Carlos, L.A., Mathias, L., Brás-Filho, R., Vieira-da-Motta, O., Vieira, I.J.C. (2007) Atividade antimicrobiana de extratos de *Aspidosperma* e *Rauvolfia*. Anais da 30^a Reunião da Sociedade Brasileira de Química. Salvador, Ba.(Resumo).

Barrero, A. F., Sánchez, J. F., Altarejos, J. (1989) Selective Ozonolysis of Methyl Transcommunate, Synthesis of Drimanes. *Tetrahedron Lett.* 30:5515-5518.

Barros, M.B.L., Schubach, T.M.P., Galhardo, M.C.G., Schubach, A., O., Monteiro, P.C.F., Reis, R.S., Zancoppe-Oliveira, R.M., Lazera, M.S. Cuzzi-Maya, T., Blanco, T.C.M., Marzochi, K.B.F., Wanke, B., Valle, A.C.F. (2001) Sporotrichosis: an Emergent Zoonosis in Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 96(6): 777-779.

Barros, M.B.L., Schubach, A.O., Francisconi Do Valle, A.C., Gutierrez Galhardo, M.C., Conceição-Silva, F., Schubach, T.M.P., Reis, R.S., Wank, B., Marzochi, K.B.F., Conceição, M.J. (2004) Catt-transmitted sporotrichosis endemic in Rio de Janeiro, Brazil: description of a series of cases. *Clin. Infect. Dis.* 38(4):529-535.

Barros, M.B.L., Schubach, A.O., do Valle, A.C.F., Galhardo, M.C.G., Schubach, T.M.P., Conceição-Silva, F. (2005) Positive Montenegro skin test among patients with sporotrichosis in Rio de Janeiro. *Acta Trop.* 93:41–7.

Benade, E., Wingfield, M.J., Van Wyk, P.S. (1997) Conidium development in *Sporothrix* anamorphs of *Ophiostoma*. *Mycol. Res.*, 9:1108-1112.

Bernstein, J.A., Cook, H.E., Gill, A. F., Ryan, K.A., Sirninger, J. (2007) Cytologic diagnosis of generalized cutaneous sporotrichosis in a hunting hound. *Vet Clin Pathol*, 36 (1):94-96.

Brum, L. C., Conceição, L. G., Ribeiro, V. M., Haddad Júnior, V. (2007) Principais dermatoses zoonóticas de cães e gatos. *Clín Vet*, 69:29-46.

Buchanan, R. L., Shepherd, A.J. (1981) Inhibition of *Aspergillus parasiticus* by timol. *J. Food Sci.*, 46:976-977.

Bustamante, B. & Campos, P.E. (2001) Endemic Sporotrichosis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 14(2):145-149.

Bustamante, B. & Campos, P.E. (2004) Sporotrichosis: a forgotten disease in the drug research agenda. *Expert rev infect Ther*, 2:85-94.

Campbell, I. (1998) Esporotricose. In Zaitz, D. Compêndio de Micologia Médica. Rio de Janeiro. *Editora Médica Científica*, 123-137.

Carlos, I.Z., Sassá, M.F., Sgarbi, D.B..G., Placeres, M.C.P., Maia, D.C.G. (2009) Current Research on the Immune Response to Experimental Sporotrichosis. *Mycopathol*, 168:1–10.

Carvalho, M.T.M., de Castro, A.P., Baby, C., Werner, B., Neto, J.F., Queiroz-Telles, F. (2002) Disseminated cutaneous *sporotrichosis* in a patients with AIDS: Report a case. *Rev Soc Bras Med Trop* 35(6):655-659.

Cavani, F. (1998) Heteropolycompound-based catalysts: A blend of acid and oxidizing properties. *Catal Today*, 41:73-86.

Chami, F., Chami, N., Bennis, S. (2004) Evaluation of carvacrol and eugenol as prophylaxis and treatment of vaginal candidiasis in an immunosuppressed rat model. *J. Antimicrob. Chemother.*, 54:909-914.

Cleff, M.B., Meinerz, A.R.M., Schuch, L.F.D., Rodrigues, M.R.A., Meireles, M.C.A., Mello, J.R.B. (2008) Atividade *in vitro* do óleo essencial de *Origanum vulgare* frente à *Sporothrix Schenckii*. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 60(2):513-516.

Coetzer, J.A.W., Thomson, G.R., Tustin R.C. (1994) Infectious diseases of livestock with special reference southern Africa. v. 2. New York: *Oxf Acad Press*, 1519-1535.

Conegero, L.S., Ide, R.M., Nazari, A.S., Sarragiotto, M.H., Filho, B.P.D., Nakamura, C.V. (2003) Constituintes químicos de *Alchomea glandulosa* (Euphorbiaceae). *Quimica Nova*, 26(6): 825-827.

Conti Diaz, I.A. (1989) Epidemiology of sporotrichosis in Latin America. *Mycopathol*, 108: 113-116.

Copetti, M. V., Santurio, J.M., Argenta, J.S., Leal, A.B.M., Gonçalves, L.M., Alves, S.H. (2002) Esporitocose eqüina. *Act Scient Vet*, 30: 135- 138.

Costa, E.O., Diniz, E.S., Netto, C.F., Arruda, C., Dagli, M.L. (1994) Epidemiological Estudy of sporotrichosis and histoplasmoses in captive Latin American wild mammalian, São Paulo, Brazil. *Mycopathol* 125(1): 19-22.

Cowan, J. A. (2001) Chemical nucleases. *Curr Opin Chem Biol*, 5(6): 634-642.

Da Rosa, A.C.M., Scroferneker, M.L., Vettorato, R., Gervini, R.L., Vettorato, G., Weber, A. (2005) Epidemiology of sporotrichosis: a study of 304 cases in Brazil. *J Am Acad Dermatol.* 52:451–9.

Daouk, R.K., Dagher, S., Sattout, E. (1995) Antifungal activity of essential oil of *Origanum syriacum* L. *J. Food Prot.*, 58:1147-1149.

Davis, H.H., Worthington, W.E. (1964) Equine sporotrichosis *J Am Vet Med Assoc*, 145(7): 692-3.

De Aquino, E.M., Moreno, P.R.H., Ohara, M.T., Moreno, A.C.R. (2001) Atividade antimicrobiana dos extratos de alcalóides totais de *Aspidosperma tomentosum* e *Aspidosperma ramiflorum*. In: 9º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto-SP. V.1, p. 342.

de Assis, V.M. (2008) Síntese, caracterização e atividade frente à *Staphylococcus aureus* de compostos de cobalto e zinco. Trabalho de conclusão de curso em química. Universidade Estadual do Norte Fluminense.

de Lima Barros, M. B., Schubach, A., Francesconi-do-Valle, A.C., Gutierrez-Galhardo, M.C., Schubach, T.M.P., Conceição-Silva, C., Salgueiro, M.M., Mouta-Confort, E., Reis, R.S., Madeira, M.F., Cuzzi., Quintella, L.P., Passos, J.P.S., Conceição, M.J., Marzochi, M.C.A. (2005) Positive Montenegro skin test among patients with sporotrichosis in Rio De Janeiro. *Act Trop*, 93: 41–47.

Dempsey, D.A., Silva, H., Klessig, D.F. (1998) Engineering disease and pest resistance in plants. *Trends Microbiol*, 6(2): 54-56.

Dias, A.D., Vieira-da-Motta, O., Passoni L.C. (2004a) Atividade de heteropoliácidos sobre *Candida albicans*. *Anais 27ª Reunião Anual da Sociedade*

Brasileira de Química e 26º Congresso Latino-americano de Química, Salvador, Bahia, p.15. (Resumo).

Dias, A.D., Vieira-da-Motta, O., Passoni, L.C. (2004b) Atividade de heteropoliácidos sobre *Staphylococcus aureus*. *Anais 27ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química e 26º Congresso Latino-americano de Química*, Salvador, Bahia, p.15. (Resumo).

DiNubile, M.J. (2008) Nodular Lymphangitis: A Distinctive Clinical Entity With Finite Etiologies, *Current Infectious Disease Reports*, 10: 404 – 410.

Dixon, D.M., Salkin, I.F., Duncan, R.A., Hurd, N.J., Haines, J.H., Kemna, M.E., Coles, F.B. (1991) Isolation and characterization of *Sporothrix schenckii* from clinical and *environmental* sources associated with the largest U.S. epidemic of sporotrichosis. *J Clin Microbiol*, 29: 1106-1113.

Dong, J. A., Chren, M.M. & Elewski, B.E., Ohio, C. (1995) Bonsai tree: Risk factor for disseminated sporotrichosis. *J. Am. Acad. Dermat.* 33(5): 839-840.

Domingo, D., López-Brea, M. (2003) Plantas con acción antimicrobiana. *Rev. Esp. Quimioterap.* 16: 385-393.

dos Santos, I.B., Schubach, T.M.P., Leme, L.R.P., Okamoto, T., Figueiredo, F.B., Pereira, S.P., Quintella, L.P., Madeira, M.F., Coelho, F., Reis, R.S., Schubach, A.O. (2007) Sporotrichosis—The main differential diagnosis with tegumentary leishmaniosis in dogs from Rio de Janeiro, Brazil. *Vet Parasitol* 143:1–6.

Ferreira, G. F., Do Amaral, C.C., Sasaki, A., Godoy-Martinez, P., De Camargo, Z.P. (2009a) Heterogeneity of proteins expressed by Brazilian *Sporothrix schenckii* isolates. *Med. Mycol.*: 1-7.

Ferreira, G. F., Santos, P.O., Do Amaral, C.C., Sasaki, A. A., Godoy-Martinez, P., De Camargo, Z.P. (2009b) Characteristics of 151 Brazilian *Sporothrix schenckii* Isolates from 5 Different Geographic Regions of Brazil: A Forgotten and Re-Emergent Pathogen. *The Op Mycol J.*, 3: 48-58.

Figueiredo, C.C., De Lima, O. C., De Carvalho, L., Lopes-Bezerra, L. M., Morandi, V. (2004) The in vitro interaction of *Sporothrix schenckii* with human endothelial cells is modulated by cytokines and involves endothelial surface molecules. *Microb Pathog*, 36(4): 177-88.

Filgueira, K. D. (2009) Esporotricose na Espécie canina: um relato de caso na cidade de Mossoró, RN. *Ciêñ Anim Bras*, 10(2):673-677.

Franklin, S. J. (2001) Lanthanide-mediated DNA hydrolysis. *Curr Opin Chem Biol*, 5(2): 201-208.

Freitas, D., Moreno, G., Saliba, A., Bottino, J., Mós, E. (1965) Esporotricose em cães e gatos. *Rev Fac Med Vet São Paulo*, 7: 381-387.

Fung-Tomc, J. C., Huczko, E., Minassian, B., Bonner, D. P. (1998) In vitro activity of a new oral triazole, BMS-207147 (ER-30346). *Antimicrob Agents Chemother*, 42(2): 313-8.

Gadelha, A.R., Talhari, S. (1982) Demonstração do *Sporothrix schenckii* em cortes histológicos. *Med Cutan Ibero Lat Am*. 10(6):355–60.

Garrison, R.G.; Boyd, K.S.; Mariat, F. (1975) Ultrastructural Studies of the mycelium-to-yeast Transformation of *Sporothrix schenckii*. *J of Bact*, 959-968.

Gonçalves, D.S., Silva, M.J.R., Deus, M.F., Santos, A.V., Samuels, R.I., Vieira-da-Motta, O. (2005) Aplicabilidade de metabólitos bacterianos sobre leveduras do gênero *Candida*. Anais do XXII Congresso Brasileiro de Microbiologia. Santos, SP.

Gonçalves, D.S. (2007) Desenvolvimento de anticorpos contra o fungo *Candida albicans* e sua susceptibilidade a metabólitos secundários e anticorpos anti-*Bukholderia* spp. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Campos dos Goytacazes-RJ. 2007. 87p.

Greydanus-van der Putten, S.W., Klein, W.R., Blankenstein, B., de Hoog, G.S., Koeman, J. (1994) Sporotrichosis bij een paard. *Tijdschr Diergeneeskd.* 119: 500-502.

Guarim Neto, G.; Moraes, R. G. (2003) Recursos medicinais de espécies do cerrado de Mato Grosso: um estudo bibliográfico. *Acta Bot. Bras.*, 17(4):561-584.

Hegg, E. L. & Burstyn, J. N. (1998) Toward the Development of metal-based synthetic nucleases and peptidases: A rationale and Progress Report in Applying the Principles of Coordination Chemistry. *Coord Chem Rev* 173: 133-165.

Heller, H.M. & Swartz, M.N. (1994) Nodular lymphangitis: clinical features, differential diagnosis and management. *Curr Clin Top Infect Dis*, 14: 142– 158.

Helmerhorst, E.J., Reijnders, I.M., van't Hof, W., Veerman, E.C.I. & Amerongen, A.V.N. (1999) A critical comparison of the hemolytic and fungicidal activities of cationic antimicrobial peptides. *FEBS Letters* 449:105-110.

Hili, P., Evans, C. S., & Veness, R. G. (1997). Antimicrobial action of essential oils: the effect of dimethylsulphoxide on the activity of cinnamon oil. *Letters in Applied Microbiology*, 24: 269–275.

Hiruma, M. & Kagawa, S. (1987) Ultrastructure of *Sporothrix schenckii* treated with iodine-potassium iodide solution. *Mycopathol.* 97:121-127.

Hiruma, M., Kawada, A., Yamamoto, I., Kagawa, S. (1987) Local hyperthermia in the treatment of sporotrichosis. *Mycoses*, 30:315-321.

Hogan, L.H., Klein, B.S., Levitz, S.M. (1996) Virulence factors of medically important fungi. *Clin Microbiol Rev*, 9 (4):469-488.

Holmes, C. E., Abraham, A. T., Hecht, S. M., Florentz, C., Giege, R. (1996) Febleomycin as a probe of RNA conformation. *Nucleic Acids Res*, 24(17): 3399-406.

Hufford, C. D., Funderburk, M. J., Morgan, J. M., Robertson, L. W. (1975) Two antimicrobial alkaloids from heartwood of *Liriodendron tulipifera* L. *J. Pharm. Sci.*, 64: 789-792.

Jacobson, E.S. (2000) Pathogenic roles for fungal melanins. *Clin Microbiology Rev*, 13(4):708-717.

Jansen, R.J.J. (1994) Recent (1987-1993) developments in heteropolyacid catalysts in acid catalyzed reactions and oxidatin catalysis. *Recueil des travaux Chimiques des Pays-Bas*, 113: 116-120.

Jungerman, P.F. & Schwartzman, R.M. (1972) Sporotrichosis. In: *Veterinary Medical Mycology*. Philadelp: Lea & Febiger, 31-39.

Kauffman, C.A. (1999) Sporotrichosis. *Clin Infect Dis*, 29: 231-237.

Keele, D.J. (2001) Evaluation of amphotericin B e flucytosine in combination against *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans* using time-kill methodology. *Diagnost Microbiol and Infect Dis*, 4: 121-126.

Kozhevnikov IV. Catalysis by heteropoly acids and multicomponent polyoxometalates in liquid-phase reactions. *Chem Rev.* 1998;**98**:171–198.

Kostman, J.R. & DiNubile, M.J. (1993) Nodular lymphangitis: a distinctive but often unrecognized syndrome. *Ann Intern Med*, 118: 883– 888.

Kwon-Chung, K., Bennet, J. (1992) Sporotrichosis. In K Kwon-Chung, J Bennet (eds), *Medical Mycology - The Pathogenic Fungi and the Pathogenic Actinomycetes*, Lea & Febiger, *Philadelp*, 707-729.

Lacaz, C.S., Porto, E., Heins-Vaccari, Melo, N.T. (1998) Guia para identificação: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico. Sarvier, São Paulo.

Lane, R.F. (2003) Diagnostic testing for fungal diseases. *Vet Clin Exot Anim* 6: 301–314.

Langfelder, K., Streibel, M., Jahn, B., Haase, G., Brakhage, A.A. (2003) Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. *Fungal Gen Biol*, 38:143–158.

Larsson, C.E. (2000) Esporotricose. In: *Anais do I Simpósio Brasileiro de Micoses Animais*. Porto Alegre, Brasil. 66-71.

Lavalle, P., Mariat, F. (1983) Sporotrichosis. *Bull Inst Pasteur*, 81: 295-322.

Lee, Y.T., Langenheim, J. H. (1975) Systematics of the *Genus Hymenaea* L. 1ª edição, University of California: Publications in Botany p. 1-109.

Lemos, G.C.S., Oliveira, L.O., Eberli, B.B., Motta, O.V., Folly, M. M. (2000) Bactericidal activity of *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. and *Piper aducum* L. towards strains of *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis. *Rev Bras Plantas Med*, 3:67-72.

Lopes, J., Alves, S., Mari, C., Brum, L., Westphalen, J., Altermann, M., Prates, F. (1999) Epidemiology of sporotrichosis in the central region of Rio Grande do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop*, 32: 541-545.

Lopes-Bezerra, L.M., Schubach, A., Costa, R.O. (2006) *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. *Anais da Acad Bras Ciênc*, 78(2):293-308.

Londero, A., Ramos, C. (1998) Esporotricose no Rio Grande do Sul: três décadas de observação. *Bras. Dermatol.* 64(6):307-310.

Lurie, H.I. (1963) Histopathology of sporotrichosis-notes of the nature of the asteroid body. *Arch Path.* 75:421-37.

Machado Neto, J. F., Lessa, S. S., Samuels, R.I., Passoni, L.C., Horn Junior, A., Fernandes, C., Vieira-da-Motta, O. (2007) Atividade inibitória de moléculas sintéticas e subprodutos bacterianos sobre o fungo *Sporothrix schenckii*. In: 24º Congresso Brasileiro de Microbiologia, Brasília. Anais do 24º Congresso Brasileiro de Microbiologia. São Paulo: Sociedade Brasileira de Microbiologia (Resumo).

Madrid, I.M. (2007) Estudo de casos espontâneos de esporotricose canina e felina, e avaliação da melanina em células de *Sporothrix schenckii* em modelo murino. Dissertação do Programa de Pós-Graduação em Veterinária, da Universidade Federal de Pelotas, Ciências (Veterinária Preventiva).

Madrid, I. M., Santos Júnior, R., Sampaio Júnior, D. P., Mueller, E. N., Dutra, D., Nobre, M. O., Meirelles, M. C. (2007) Esporotricose canina: relato de três casos. *Act Scient Vet*, 35(1):105- 108.

Maksimov, G.M. (1995) Advances in the syntesis of polyoxometalates and in the study of heteropolyacids. *Russ Chem Rev*, 64: 445-456.

Manohar, V., Ingram, C., Gray, J. (2001) Antifungal activities of Origanum oil against *Candida albicans*. *Mol. Cel. Biochem.* 228:111-117.

Marimon, R., Gene, J., Cano, J., Trilles, L., Dos Santos Lazera, M., Guarro, J. (2006) Molecular phylogeny of *Sporothrix schenckii*. *J. Clin. Microbiol.* 44:3251–3256.

Marimon, R., Cano, J., Gene, J., Sutton, D.A., Kawasaki, M., Guarro, J. (2007) *Sporothrix schenckii*, *S. globosa* and *S. Mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest. *J Clin Microbiol*, 45: 3198- 3206.

Marques, S.A., Franco, S.R.V.S., Camargo, R.M.P., Dias, L.D.F., Haddad Júnior, V., Fabris, V.E. (1993) Esporotricose do gato doméstico (*Felis catus*): transmissão humana. *Rev Inst Trop S Paulo*, 35(4): 327-330.

Meinerz, R.M., Nascente, P.S., Schuch, L.F.D., Faria, R.O., Santin, R., Cleff, M.B., Madrid, I.M., Martins, A.A., Nobre, M.O., Meireles, M.C.A., Mello, J.R.B. (2007) A Esporotricose Felina – relato de casos. *Ciên Anim Bras*, 8(3): 575-577.

Melgo, M.S. (2004) Oxidação do cicloexeno a cicloexanona pelo processo “Wacker”. Dissertação de Mestrado em Química. Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.

Minassian, B., Huczko, E., Washo, T., Bonner, D., Fung-Tomc, J.(2003). *In vitro* activity of ravuconazole against Zygomycetes, *Scedosporium* and *Fusarium* isolates. *Clin Microbiol Infect* 9:1250–1252.

Miranda, L. H. M., Quintella, L. P., dos Santos, I. B., Menezes, R. C., Figueiredo, F. B., Gremião, I. D. F., Okamoto, T. de Oliveira, R. V. C., Pereira, S. A., Tortelly, R., Schubach, T. M. P. (2009) Histopathology of Canine Sporotrichosis: A Morphological Study of 86 Cases from Rio de Janeiro (2001–2007). *Mycopath*, 168:79–87.

Mizono, M., Ono, N., Koyano, G., Aoshima, A. (2000) *Pure Apple, Chem* 72.

Moore, M., Ackerman, L.V. (1946) Sporotrichosis with radiate formation in tissue: report of a case. *Arch Derm Syphilol*. 53:253–64.

Moraes, M.A.P., Miranda, E.V. (1964) On the presence of radiate (asteroid) formations in sporotrichosis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 6(1):5–11.

Moriello, K.A. (2004) Treatment of dermatophytosis in dogs and cats: review of publish studies. *Vet. Dermatol.*, 15:.99-107.

Morris-Jones, R., Youngchim, S., Gomez, B. L., Aisen, P., Hay, R. J., Nosanchuk, J. D., Casadevall, A., Hamilton, A. J. (2003) Synthesis of melanin-like pigments by *Sporothrix schenckii* in vitro and during mammalian infection. *Infect Immun*, 71(7): 4026-33.

Mohaghehpour, N.; Waleh, N.; Garger, S.J.; Dousman, L.; Grill, L.; Tusé, D. (2000) Synthetic melanin suppresses production of proinflammatory cytokines. *Cel Immun*, 199:25-36.

Muller, G.H., Kirk, R.W. (1996) *Dermatologia de pequenos animais*. Rio de Janeiro: Interlivros, p.88-103.

Naqvi, S.H., Becherer, P., Gudipati, S. (1993) Ketoconazole treatment of a family with zoonotic sporotrichosis. *Scand J Infect Dis*, 25: 543-545.

Neto, R.J., Machado, A.A., Castro, G., Quaglio, A.S., Martinez, R. (1999) Disseminated cutaneous sporotrichosis as the initial manifestation of acquired immunodeficiency syndrome-case report. *Rev Soc Bras Med Trop*, 32: 57-61.

Nogueira, R.H.G., Guedes, R.M.C., Cassali, G.D. (1995) Relato de esporotricose felina (*Sporothrix scenckii*) com transmissão para o homem: aspectos clínicos, microbiológicos e anatomopatológicos. *Arq Bras Med Vet Zoot*, 27(1):43-51.

Nosanchuk, J.D., Ovalle, R., Casadevall, A. (2001) Glyphosate inhibits melanization of *Cryptococcus neoformans* and prolongs survival of mice after systemic infection. *J Inf Dis*, 183: 1093-1099.

Nosanchuk, J.D.; Casadevall, A. (2003) The contribution of melanin to microbial pathogenesis. *Cel Micr*, 5(4):203-223.

Nunes, C. F., Escosteguy, C. C. (2005) Esporotricose humana associada à transmissão por gato doméstico. Relato de caso e revisão de literatura. *Revista de Educação Continuada do Clínico Veterinário de Pequenos Animais*, 54: 66-68.

Paixão, G.C., Sidrim, J.J.C., Campos, G.M.M. (2001) Dermatophytes and saprobe fungi isolated from dogs and cats in the city of Fortaleza, Brazil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 53:568-573.

Park, J.M., Jung, J.R., lee, B.J. (1994) Antimicrobial peptides from the skin of a Korean frog. *Rana rugosa*. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 205 (1): 948-954.

Paster, N., Juvent,B.J., Shaaya, (1990) Inhibitory effect of oregano and thyme essential oils on mould and foodborne bacteria. *Lett. Applied Microbiol.*, 11:33-37.

Pereira, J.C.B., Grijó, A., Pereira, R.R.M., Oliveira, A.N.S., Andrade, A.C., Ferreira, A.C.M., Machado, C.C.B., Coutinho, D.V., Rios, D.V., Pires, B.P. (2008) Esporotricose disseminada – Caso clínico e discussão. *Rev Port Pneumol*, 14(3): 443-449.

Perlroth, J., Choi, B., Spellberg, B. (2007) Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. *Med Mycol*, 45: 321-346.

Pinkus, H., Grekin, J.N. (1950) Sporotrichosis with asteroid tissue forms—report of a case. *Arch Derm Syphilol*. 61: 813–9.

Ramadinha, R. H. R., Azevedo, S. C. S., Souza, C. P., Campos, S. G. (2006) Esporotricose em cães: relato de 2 casos. In: *Congresso Brasileiro da Anclipeva*, 27., 2006, Vitória. *Anais...* Vitória: Anclivepa-ES, p. 46.

Ramos e Silva, J. (1972) Sporotrichosis in Brazil. Essays on Tropical Dermatology. *J. Marshall. Amsterdã. Excerpta Med*, 3: 3370-386.

Ramos-e-Silva, M., Vasconcelos, C., Carneiro, S., Cestari, T. (2007) Sporotrichosis. *Clinics in Dermatology* 25:181–187.

Read, S.I., Sperling, L.C. (1982) Feline sporotrichosis. Transmission to man. *Arch Dermatol*, 118: 429-431.

Reed, K.D., Moore, F.M., Geiger, G.E., Stemper, M.E. (1993) Zoonotic transmission of sporotrichosis: case report and review. *Clin Infect Dis*, 16: 384-387.

Rex, J.H., Bennett, J.E. (1990) Administration of potassium iodide to normal volunteers does not increase killing of *Sporothrix schenckii* by their neutrophils or monocytes. *J Med Vet Mycol*, 28: 185-189.

Rhule, J.T., Hill, C.L., Judd, D.A. (1998) Polyoxometalates in medicine. *Chem Rev*, 98:327-357.

Richter, R.K. (2004) Differential Modulation of the Antifungal activity of amphotericin B by natural and ent-cholesterol. *Bioorganic & medicinal Chemistry Letters*, 14: 115-118.

Rippon, J. (1988) Sporotrichosis. Medical Mycology – The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes. J. Rippon. Philadelphia, W.B. Saunders Company 325-352.

Rivitti, E.A. & Aoki, V. (1999) Deep fungal infections in tropical countries. *Clin Dermatol*.17:171–90.

Roberts, M.F., Wink, M. (1998) Alkaloids: Biochemistry, ecology and medicinal applications. *Plenum Press*, New York. 486p.

Rochette, F., Engelen, M., Vanden Bossche, H. (2003) Antifungal agents of use in animal health – practical applications. *J Vet Pharmacol Therap*, 26:31-53.

Rocha, M.M., Dassin, T., Lira, R., Lima, E.L., Severo, L.C., Londero, A.T. (2001) Sporotrichosis in patient with AIDS: report of a case and review. *Rev Iberoam Micol*, 18: 133-136.

Rocha, M.R. (2008) Síntese, caracterização e atividade biológica frente a bactéria *Staphylococcus aureus* de compostos de coordenação de cobalto, cobre, ferro, vanádio e zinco. Trabalho de conclusão de curso em química. Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes-RJ. 69p.

Rodríguez, G., Sarmiento, L. (1998) The asteroid bodies of sporotrichosis. *Am J Dermatopathol*. 20:246–9.

Romero-Martinez, R., Wheeler, M., Guerrero-Plata, A., Rico, G., Torres-Guerrero, H. (2000) Biosynthesis and functions of melanin in *Sporothrix schenckii*. *Infect and Immunity*, 68(6):3696-3703.

Rook, G. (1994) Imunidade a vírus, bactérias e fungus. In: Roitt, I; Brostoff, J; Male, D. *Imunologia*. 3ª ed. Editora Manole Ltda. São Paulo, p.15.1-15.2.

Rosser, E., Dunstan, R. (1990) Sporotrichosis. In C Greene, *Infectious Diseases of the Dog and Cat*, WB Saunders Co., *Philadelp*, 707-710.

Santos, I. B., Okamoto, T., Schubach, T. M. P., Figueiredo, F. B., Quintella, L. P., Pereira, S. A., Leme, L. R. P., Honse, C. O., Reis, R. S., Tortelly, R., Schubach, A. O. (2005) Esporotricose espontânea em cães: aspectos histopatológicos e micológicos. *Arq Bras Med Vet Zoot*, 57:76-77.

Sampaio, S.A.P. & Rivitti, E. (2000) Micoses. In: *Dermatologia*. 2. ed. São Paulo: Artes Médicas, 548-552.

Samuels, R. I., Santos, A.V., Vieira-da-Motta, O., Silva, L.G., Deus, M.F., Silva, M.J.R. (2005) Antimicrobial proteins secreted by *Burkholderia cepacia*. In: XXXIV Sbbq, Águas de Lindóia, SP. 29: F8 (Resumo).

Schubach, T. M. P.; Schubach, A. O. (2000) Esporotricose em gatos e cães: revisão. *Clín Vet*, 29:21-24.

Schubach, T., Valle, A., Gutierrez-Galhardo, M., Monteiro, P., Reis, R., Zancopé-Oliveira, R., Marzochi, K., Schubach, A. (2001). Isolation of *Sporotrix schenckii* from the nails of domestic cats (*Felis catus*). *Med Mycol*, 39: 147-149.

Schubach, T.M., Schubach, A., Okamoto, T., Barros, M., Figueiredo, F.B., Cuzzi, T., Fialho-Monteiro, P.C., Perez, R.S., Wanke, B. (2004a) Evaluation of an epidemic of sporotrichosis in cats: 347 cases (1998–2001). *J Am Vet Med As*, 224(10):1623-1629.

Schubach, T.M., Schubach, A.O., Okamoto, T., Figueiredo, F.B., Pereira, S.A., Leme, L.R.P., Santos, I.B., Reis, R.S., Paes, R.A., Perez, M.A., Marzochi, M.C.A., Francesconi-Do-Valle, Wanke, B. (2004b) Utilidade do coágulo sanguíneo para o isolamento de *Sporothrix schenckii* de gatos naturalmente infectados. *Braz J of Vet Res and An Science*, 41:404-408.

Schubach, T.M.P., Schubach, A., Okamoto, T., Barros, M.B.L., Figueiredo, F.F., Cuzzi-Maya, T., Pereira, S.A., Santos, I.B., Paes, R.A., Paes-Leme, L.R., Wanke, B. (2006) Canine sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: clinical presentation, laboratory diagnosis and therapeutic response in 44 cases (1998-2003). *Medical Micology*, 44:87-92.

Scout, D. W., Miller, W. H., Griffin, C. E. (1996) Doenças fúngicas da pele: esporotricose. In: Scout, D. W., Miller, W. H., Griffin, C. E., Muller & Kirk: dermatologia de pequenos animais. 5. ed. Rio de Janeiro: Interlivros, p. 333-336.

Sgarbi, D.B.G., Silva, A.J.R., de Carlos, I.Z., Silva, C.L., Angluster, J., Alviano, C.S. (1997) Isolation of ergosterol peroxide and its reversion to ergosterol in the pathogenic fungus *Sporothrix schenckii*. *Mycopathol* 139: 9–14.

Silva, M.B., Marques, A.F., Nosanchuk, J.D., Casadevall, A., Travassos, L.R., Taborda, C.P. (2006) Melanin in the dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*: effects on phagocytosis, intracellular resistance and drugs susceptibility. *Microb and Infect*, 8:197-205.

Silva, M. J. R., Parrilha, G. L., Horn Jr., A., Vieira-da-Motta, O., Fernandes, C. (2006) Efeito inibitório de um complexo de ferro sobre *Staphylococcus aureus* toxigênicos. In: *Resumo apresentado na XXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, 2006. SBQ, 033.

Silva, M.J.R. (2007) *Malassezia pachydermatis*: suscetibilidade a compostos alternativos naturais e sintéticos. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Campos dos Goytacazes-RJ. 81p.

Silva, M.J.R., Deus, M.F., Samuels, R.I., Mathias, L.S., Almeida, J.C.A., Guimarães, E.V., Moraes Neto, A.H.A., Vieira-da-Motta, O. (2008) Atividade in vitro dos metabólitos secundários de *Burkholderia* sp. (Burkholder 1950) sobre a levedura *Malassezia pachydermatis*. *Rev Ciên An Bras*.

Siqueira, L.O.F., Mathias, L.S., Andreão, P.S., Miranda, P.C.M.L., Vieira-da-Motta, O. Atividade de moléculas sintéticas e naturais derivadas de “Jatobá” (*Hymenaea Stigonocarpa*) sobre *Cryptococcus neoformans*. In 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia, Porto de Galinhas-PE (Resumo).

Sonoda, M. C., Otsuka, M., Ferrer, L. C., Fondvilla, D., Michalany, N. S., Vieira, S. A. M., Gambale, W., Larsson, C. E. (2006) Esporotricose canina: relato de caso insólito em São Paulo. In: *Congresso Brasileiro de Anclivepa*, 27., Vitória. Anais... Vitória: Anclivepa-ES, 2006. p. 21.

Souza, L.L., Nascente, P.S., Nobre, M.O., Meinerz, A.R.M., Meireles, M.C.A. (2006) Isolation of *Sporothrix schenckii* from the nails of healthy cats. *Braz J Microbiol*, 37: 372-374.

Souza, N.T., Nascimento, A.C.B.M., Souza, J.O.T., Santos, F.C.G.C.A., Castro, R.B. (2009) Esporotricose canina: relato de caso. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*,

61(3):572-576.

Tantaoui-Elaraki, A., Ferhout, H., Errifi, A. (1993) Inhibition of the fungal asexual reproduction stages by three *Moroccan* essential oils. *J. Essen. Oils Res.*, 5:535-543.

Terrel, C.L., Hughes, C.E. (1992) *Antifungal agents used for deep-seated mycotic infections. Mayo Clin Proc.*, 67: 69-91.

Tlougan, B. E., Podjasek, J. O., Patel, S.P., Nguyen, X.H., Hansen, R.C. (2009) Neonatal Sporotrichosis. *Pediatric Dermatol*, 26 (5): 563–565.

Torrealba, J.R., Carvalho, J., Corliss, R., England, D. (2005) Laryngeal granulomatous infection by *Sporothrix schenckii*. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 132: 339-340.

Towersey, L.; Moreira, L. H., Rivera, R., Soares, D.B., Gompertz, O.F., Bentubo, H.D.L., Azevedo, A.C.A., Schechtman, R.C., Soares Filho, P.J. (2007) Infecção polimórfica por *Sporothrix schenckii* com resistência in vivo e in vitro ao itraconazol.. In: 24o. Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2007, Brasília, DF. Anais do 24o. Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2007.

Tsigdinos, G.A. (1978) Heteropoly Compounds of Molybdenum and Tungsten. *Top. Curr. Chem.*, 76(1).

Urabe, H. & Nagashima, T. (1969) Mechanism of antifungal action of potassium iodide on sporotrichosis. *Intern J Dermatol*, 8:36-39.

van Duin, D., Cleare, W., Zaragoza, O., Casadevall, A., & Nosanchuk, J.D (2004) Effects of Voriconazole on *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob. Agents Chemother*, 48:2014–2020.

Vieira-da-Motta, O., Silva, M.J.R., de Deus, M.F., Samuels, R.I., Mathias, L.S., Almeida, J.A., Guimarães, E.V., Moraes-Neto, A.H.A. (2008) Atividade *in vitro* dos metabólitos secundários de *Burkholderia sp.* (Burkholder 1950) sobre a levedura *Malassezia pachydermatis*. *Cien. Ani. Bras.*, 9(2):410-417.

Vilela, R.; Souza, G.F.; Cota, G.F. Mendoza, L. (2007) Cutaneous and meningeal sporotrichosis in a HIV patient. *Rev Iberoam Micol*, 24: 161-163.

Xavier, M.O., Antunes, T.A., Nobre, M.O., Nascente, P.S., Meireles, M.C.A., Junior, D.P.S., de Araújo Sória, F.B. (2004) Esporotricose felina com envolvimento humano na cidade de pelotas, RS, Brasil. *Cien. Rur*, 34(6):1961-1963.

Ware, A.J., Cockerell, C.J., Skiest, D.J., Kussman, H.M. (1999) Disseminated sporotrichosis with extensive cutaneous involvement in a patient with AIDS. *J. Am. Acad. Dermat.*, 40(2):351-355.

Werner, A. H. & Werner, B. E. (1993) Feline sporotrichosis. *Small animal.*, 15 (9): 1189-1197.

Werner, A.H., Werner, B.E. (1994) Sporotrichosis in man and animal. *Int J Dermatol*; 33(10):692-700.

Whittemore, J.C. & Webb, C.B. (2007) Successful treatment of nasal sporotrichosis in a dog. *Can. Vet. J.*, 48:411-414.

Wliebe, V. & Karriker, M. (2005) Therapy of systemic fungal infections: A pharmacologic perspective. *Clin. Tech. Small Anim. Pract.*, 20:250-257.

Wroblewska, W., Swoboda-Kopec, E., Kawecki, D., Sawicka-Grzelak, A., Stelmach, E., Luczak, M (2005) Infection by a Dimorphic Fungus *Sporothrix schenckii* in an Immunocompromised Patient. *Infection* 33: 289-291.