

***Sporothrix* spp. e a bioatividade do extrato de *Capsicum annuum* L. e moléculas sintéticas não convencionais: multi-avaliação de resposta *in vitro* e em modelo invertebrado.**

**LUCIANA DA SILVA MATHIAS**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES/RJ**

**NOVEMBRO - 2014**

***Sporothrix* spp. e a bioatividade do extrato de *Capsicum annuum* L. e moléculas sintéticas não convencionais: multi-avaliação de resposta *in vitro* e em modelo invertebrado.**

LUCIANA DA SILVA MATHIAS

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal na área de Doenças Infecto-contagiosas e Parasitárias dos animais, do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

ORIENTADOR: OLNEY VIEIRA DA MOTTA

Campos dos Goytacazes – RJ

Novembro de 2014


*Sporothrix* spp. e a bioatividade de extrato de *Capsicum annuum* L. e moléculas sintéticas não convencionais: multiavaliação de resposta *in vitro* e em modelo invertebrado.

LUCIANA DA SILVA MATHIAS

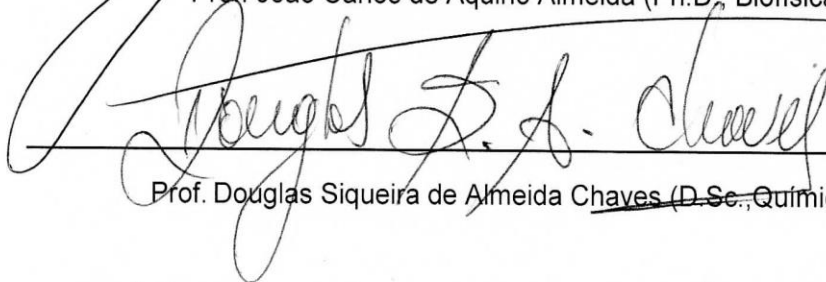
Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da área de Doenças Infecto-contagiosas e Parasitárias dos animais, do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Campos dos Goytacazes, 18 de novembro de 2014

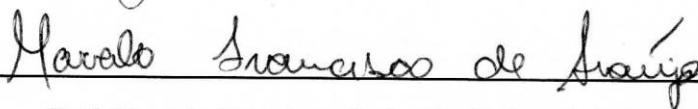
Comissão Examinadora:



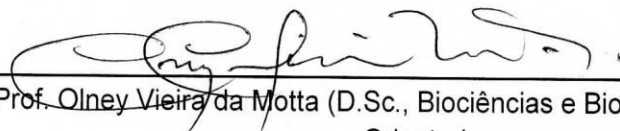
Prof. João Carlos de Aquino Almeida (Ph.D., Biofísica) – UENF



Prof. Douglas Siqueira de Almeida Chaves (D.Sc., Química) – UFRRJ



Prof. Marcelo Francisco de Araújo (D.Sc., Química Orgânica) - IFF



Prof. Olney Vieira da Motta (D.Sc., Biociências e Biotecnologia) – UENF  
Orientador

**APOIO FINANCEIRO:**

**MCT 70/2009 - CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO  
E TECNOLÓGICO (CNPq)**

**Processo: 147407/2010-2**

**DOENÇAS EMERGENTES NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - FUNDAÇÃO  
CARLOS CHAGAS FILHO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DO RIO  
DE JANEIRO (FAPERJ)**

**Processo: E-26/110.611/2012**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO  
(UENF)**



## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho...

*Principalmente a Deus que me concedeu a graça de poder viver momentos e conquistas.*

*A minha mãe Nely da Silva Mathias por todo esforço e dedicação a mim.*

Minha gratidão!!!!

*“Cada um que passa em nossa vida, passa só, pois cada  
pessoa é única, e nenhuma substitui a outra.*

*Cada uma que passa em nossa vida, passa sozinha, mas  
não vai só, nem deixa só, leva um pouco de nós, deixa um  
pouco de si. Há os que levam muito, mas não há os que  
não deixaram nada. Esta é a nossa vida e a prova de  
que as pessoas não se encontram por acaso...”*

*(Saint-Exupéry)*

Aqui deixo por escrito a gratidão aos que me ajudaram a chegar a esta fase. A vocês dedico esta tese e todo o meu trajeto acadêmico até aqui. Pelo que me ensinaram, mas muito mais pelo que me deixaram que aprendesse sozinha, pelo apoio e compreensão ou ainda pelas várias chamadas à realidade.

Muito obrigada...

*A DEUS toda honra e glória por tudo que me proporcionou e que me ensinou.*

*Ao Professor Olney Vieira da Motta, por toda dedicação, amizade, confiança, respeito e preocupação com a execução deste trabalho. Muito obrigada por tudo!*

*Ao Professor João Carlos de Aquino Almeida pela colaboração e auxílios prestados durante toda minha vida acadêmica na observação de imagens de microscopia, mas, sobretudo por toda amizade, confiança e respeito.*

*Aos Professores e colaboradores Christiane Fernandes, Luis César Passoni, Edmilson José Maria, Moema Mocaiber Peralva dos Santos e Rosana Rodrigues pelo fornecimento dos compostos sintéticos, extrato natural e padrões sintéticos para execução deste trabalho.*

*A técnica Cláudia Almeida pelos ensinamentos de cultura de células.*

*Ao prof Arthur Giraldi e suas alunas Bárbara e Gisela por gentilmente permitir a utilização de seu laboratório para o cultivo celular.*

*Ao prof Clóvis de Paula e sua doutoranda Letícia pelo fornecimento e ensinamento de cultura de nematoides.*

*A todos os meus amigos e companheiros do Laboratório de Sanidade Animal: Maria Fabíola, Fernanda Eni, Luize, Marcella, Mariane, Indiara, Elisabete e Leonardo.*

*A todos os colegas e amigos dos laboratórios de química e biologia celular: Samila, Rafaela, Érica, Josimara e Letícia.*

*As técnicas Giovana Moraes, Beatriz Ferreira e Márcia Adriana do Laboratório de Biologia Celular e Tecidual pela grande amizade e auxílios no preparo e observação das amostras para microscopia eletrônica desde o tempo da minha graduação.*

*Ao técnico Marcelo do Laboratório de Ciências Químicas pelo auxílio na análise de infravermelho.*

*As técnicas Gina Teixeira, Maria de Lourdes, Solange Samarão, Sueli Marins do Laboratório de Sanidade Animal pelos auxílios prestados durante a execução deste trabalho.*

*A bolsista de extensão Zuleica pela ajuda nos preparos dos meios de cultura e com as vidrarias.*

*A todos que informalmente fizeram alguma colaboração.*

*Ao CNPq pela bolsa de doutorado concedida.*

*A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro pela oportunidade desta conquista.*

## LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC - American Type Culture Collection

Ag<sub>3</sub>[PW<sub>12</sub>O<sub>40</sub>] - 12-tungstofosfato de Prata

Ag<sub>3</sub>[PMo<sub>12</sub>O<sub>40</sub>] - dodecamolibdofosfato de Prata

Ag<sub>6</sub>[SiW<sub>10</sub>V<sub>2</sub>O<sub>40</sub>] - 12-vanadotungstosilicato de Prata

Ag<sub>4</sub>[SiW<sub>12</sub>O<sub>40</sub>] - 12-tungstosilicato de Prata

AMB - Anfotericina B

ANOVA - Análise de variância

BDA- Ágar Batata Dextrose

BHIA - Ágar Infusão de Cérebro e Coração

BHI - Infusão de Cérebro e Coração

BMPA - bis-(2-metilpiridil)amina

BS - 2-[piridin-2-ilmetilamino]etanol

BE - 1[(piridin-2-ilmetil)amino]propan-2-ol

HBPA - (2-hidroxibenzil) (2-piridilmetil) amina

HPCINOL - 1-(bis-piridin-2-ilmetil-amino)-3-cloropropan-2-ol

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute

CC - Complexos de coordenação

Cu - Cobre

CuBMPA - Cobre bis-(2-metilpiridil)amina

CuBSA - Cobre 2-[piridin-2-ilmetilamino]etanol

CuBSE - Cobre 1[(piridin-2-ilmetil)amino]propan-2-ol

CuHBPA - Cobre (2-hidroxibenzil) (2-piridilmetil) amina

CuHPCINOL – Cobre 1-(bis-piridin-2-ilmetil-amino)-3-cloropropan-2-ol

CIM - Concentração Inibitória Mínima

DMSO - Dimetilsulfóxido

EPR – Ressonância Paramagnética Eletrônica

FLU - Fluconazol

HPA – Heteropoliácido

ICZ – Itraconazol

IPAs – Isopoliácidos

IPEC - Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas

IV – Infravermelho

L-DOPA- Diidroxi-L-fenilalanina

MET- Microscopia Eletrônica de Transmissão

MEV- Microscopia Eletrônica de Varredura

PBS – Salina Tamponada com Fosfato

POMs – Polioxometalatos

TBF- Terbinafina

TBS- Tryptical Soy Broth

## RESUMO

Mathias, Luciana da Silva. *Sporothrix* spp. e a bioatividade de extrato de *Capsicum annuum* L., análogos sintéticos da capsaicina e moléculas sintéticas não convencionais: multiavaliação de resposta *in vitro* e em modelo invertebrado. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes-RJ.

A esporotricose é uma infecção crônica subcutânea de humanos e animais que se revelou como uma zoonose reemergente de saúde pública no Estado do Rio de Janeiro e adjacências. O uso de compostos naturais de plantas e dos metais e seus complexos como compostos bioativos tem despertado um interesse cada vez maior destes agentes como potenciais drogas para intervenção terapêutica para diversas doenças. Esse trabalho teve como objetivo avaliar a citotoxicidade e atividade antifúngica do extrato etanólico do fruto de *Capsicum annuum* L. e análogos estruturais da capsaicina e diidrocapsaicina (SA1, SA2 e SA3), sais de heteropoliácidos de prata (HPAs) ( $Ag_3[PW_{12}O_{40}]$ ,  $Ag_6[SiW_{10}V_2O_{40}]$ ,  $Ag_4[SiW_{12}O_{40}]$  e  $Ag_3[PMo_{12}O_{40}]$ ) e complexos de coordenação com cobre, ferro e manganês (BMPA, CuBMPA, FeBMPA, HBPA, CuHBPA, FeHBPA, BS, CuBS, FeBS, BE, CuBE, FeBE, HPCINOL, CuHPCINOL, FeHPCINOL e MnHPCINOL) contra cepas de *Sporothrix* (n=12) na forma leveduriforme e filamentosa, bem como seus efeitos sobre a morfologia do fungo em sua principal forma infectante por microscopia eletrônica. Além disso, células fúngicas tratadas foram marcadas com o corante vital Sytox Green™ para investigar a permeabilização de membranas e analisadas quanto a produção do fator de virulência melanina. O nematoide *P. redivivus* também foi utilizado para avaliar a bioatividade dos compostos e como modelo de infecção para o fungo *Sporothrix*. Os compostos naturais e sintéticos demonstraram média citotoxicidade em cultura de células VERO e capacidade de permear as membranas das células fúngicas tratadas. Os testes de sensibilidade revelaram que o extrato etanólico de *C. annuum* L. e análogos capsaicinoides apresentaram CIM entre 0,5 - >4 µg/mL para a forma leveduriforme e entre 2 - >4 µg/mL para a forma filamentosa. Quanto aos compostos metálicos, os sais de HPAs de prata apresentaram CIM entre 8-128 µg/mL para a forma leveduriforme e

entre 32 - >512 µg/mL para o crescimento filamentosos, e os complexos de coordenação entre 1- 256 µg/mL para a forma leveduriforme e entre 128 - >512 para a forma filamentosos de crescimento. Por microscopia eletrônica foi observado que a incubação dos compostos em concentrações subinibitórias durante 48 horas causou diferentes alterações morfológicas como: perda da integridade da membrana, desorganização citoplasmática, vacuolização, variação na espessura da parede celular e da camada microfibrilar e de produção de grânulos eletrondensos no entorno da parede celular. A análise de produção de melanina na presença dos compostos mostrou que alguns compostos foram capazes de inibir a produção deste pigmento mesmo na presença de L-DOPA. No ensaio de infecção com o nematoide *P. redivivus* foi observado que *Sporothrix* não coloniza seu intestino, mas se acumula no tecido próximo à cavidade bucal e os compostos Ag<sub>3</sub>[PMo<sub>12</sub>O<sub>40</sub>], Ag<sub>3</sub>[PW<sub>12</sub>O<sub>40</sub>], Ag<sub>4</sub>[SiW<sub>12</sub>O<sub>40</sub>], BMPA, CuBMPA, FeHBPA, CuBS, CuBE, MnHPCINOL e itraconazol significativamente prolongaram a sobrevivência dos vermes infectados quando comparado com o controle e os demais tratamentos. Os resultados deste trabalho demonstraram que o extrato etanólico de *C. annuum* L. e análogos da capsaicina, bem como os compostos metálicos de prata Ag<sub>3</sub> [PMo<sub>12</sub>O<sub>40</sub>] e complexos de coordenação BMPA, FeHBPA, CuBS e MnHPCINOL foram os compostos que apresentaram maior potencial antifúngico contra as cepas de *Sporothrix* testadas com valores de CIM melhores que os antifúngicos comerciais itraconazol e anfotericina B, que são os fármacos de escolha para o tratamento da esporotricose.

Palavras-chave: antifúngico, zoonose, capsaicina, sais de heteropoliácidos de prata; complexos de coordenação; *Panagrellus redivivus*.



## ABSTRACT

Mathias, Luciana da Silva. *Sporothrix* spp. e a bioatividade de extrato de *Capsicum annuum* L., análogos sintéticos da capsaicina e moléculas sintéticas não convencionais: multiavaliação de resposta *in vitro* e em modelo invertebrado. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes-RJ.

Sporotrichosis is a chronic subcutaneous infection of humans and animals that has revealed itself as a re-emergent zoonosis of public health in the State of Rio de Janeiro and surrounding areas. The use of natural plant compounds and metals and their complexes such as bioactive compounds has attracted an increasingly greater interest in such agents as potential drugs for therapeutic intervention for various diseases. This study aimed to evaluate the cytotoxicity and antifungal activity of ethanol extract of fruit of *Capsicum annuum* L. and structural analogues of capsaicin and dihydrocapsaicin (SA1, SA2 and SA3), silver heteropolyacids salts (HPAs) ( $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$ ,  $\text{Ag}_6[\text{SiW}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]$ ,  $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$  and  $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$ ) and coordination complexes with copper, iron and manganese (BMPA, CuBMPA, FeBMPA, HBPA, CuHBPA, FeHBPA, BS, Cubs, FEBS, BE, Cube, Phoebe, HPCINOL, CuHPCINOL, FeHPCINOL and MnHPCINOL) against strains of *Sporothrix* ( $n = 12$ ) in the yeast and filamentous form, as well as its effects on the morphology of the fungus in its main infective form by electron microscopy. Moreover, treated fungal cells were stained with Sytox Green™ to investigate permeability of membranes and assayed for production of the virulence factor melanin. The nematode *P. redivivus* was also used to evaluate the bioactivity of the compounds and as a model of infection for *Sporothrix* yeast. Natural and synthetic compounds showed average cytotoxicity in VERO cell culture and ability to permeate the membranes of the treated yeast cells. Sensitivity testing revealed that the ethanol extract of *C. annuum* L. and similar capsaicinoids had MICs between 0.5 -> 4 mg / mL for yeast form and from 2 - >4 mg / mL for filamentous form. As to the metal compounds, silver HPA salts showed MICs between 8 - 128 mg / mL for yeast-like form and between 32 - >512 mg / mL for filamentous growth, and coordination complexes showed MICs of 1- 256 g / mL for the yeast form and between 128 - > 512 to filamentous form of growth. By electron

microscopy it observed that the incubation of the compounds in sub-inhibitory concentrations for 48 hours caused various morphological changes such as: loss of membrane integrity, cytoplasmic disorganization, vacuolization, change in cell wall thickness and microfibrillar layer and production of electron-dense granules surrounding the cell wall. The analysis of melanin production in the presence of the compounds showed that some compounds were able to inhibit the production of the pigment even in the presence of L-DOPA. In the infection assay with the nematode *P. redivivus* it was observed that *Sporothrix* does not colonize their intestine, but accumulates in the tissue near the mouth that the compounds  $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$ ,  $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$ ,  $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$ , BMPA, CuBMPA, FeHBPA, CuBS, CuBE, MnHPCINOL and itraconazole prolonged the survival of the worms infected when compared with the control group and the other compounds. These results demonstrate that the ethanol extract of *C. annuum* L. and capsaicin analogues, as well as metallic compounds of silver  $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$  and coordination complexes BMPA, FeHBPA, CuBS and MnHPCINOL were compounds that presented most potent antifungal activity against *Sporothrix* strains tested with MIC values better than the commercial antifungal agents itraconazole and amphotericin B, that are drugs of choice for the treatment of sporotrichosis.

Keywords: antifungal; zoonosis; capsaicin; silver heteropolyacids salts; coordination complexes; *Panagrellus redivivus*.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Morfologia das fases de crescimento do fungo *Sporothrix* spp. (A) Fase micelial ou filamentosa após 30 dias de crescimento a 28°C em Ágar Batata Dextrose mostrando colônia pigmentada; (B) Microscopia óptica do crescimento filamentoso corado com azul de algodão mostrando delicadas hifas septadas com conídios simpodiais (aumento 1000X); (C) Fase micelial após 15 dias de crescimento a 28°C em Ágar Batata dextrose mostrando colônia pigmentada; (D) Microscopia óptica do crescimento filamentoso corado com azul de algodão mostrando delicadas hifas septadas com conídios demáceos (aumento 1000X); (E) Crescimento na fase leveduriforme a 37°C em Ágar Brain Heart Infusion; (D) Microscopia óptica de células leveduriformes coradas pelo método de Gram mostrando células alongadas em forma de “charuto” .....6
- Figura 2.** Desenho esquemático da dinâmica de transmissão da esporotricose (Adaptado de Tavares da Silva, 2010). O fungo na forma filamentosa presente no solo ou vegetais pode ser inoculado no hospedeiro através de um trauma e após sua conversão para a forma leveduriforme, as manifestações da esporotricose dependerá da imunidade do hospedeiro e do grau de patogenicidade da cepa. Gatos e outros animais contaminados participam da transmissão zoonótica da doença. As leveduras presentes nas lesões dos gatos infectados favorecem a transmissão para outros animais sadios (gatos e cães) e seres humanos através de arranhões, mordidas ou secreções.....7
- Figura 3.** Manifestações clínicas da esporotricose humana. (A-C) Esporotricose cutânea fixa .....11
- Figura 4.** Manifestações extracutâneas da esporotricose humana. (A) Esporotricose pulmonar.....12
- Figura 5.** Manifestações clínicas da esporotricose nas espécies felina .....14
- Figura 6.** Características anatômicas básicas de *C. elegans*.....24

<b>Figura 7.</b> Defesas do corpo de <i>C. elegans</i> . Os micróbios induzem danos celulares e são detectados por receptores específicos. Estes eventos específicos são sinalizados por vias que levam a produção de uma variedade de proteínas e/ou peptídeos antimicrobianos (AMPs) específicos. Dependendo do patógeno, estes AMPs são expressos especificamente em tecidos particulares, assim como na faringe, intestino ou na epiderme.....	25
<b>Figura 8.</b> Pimentas da espécie <i>Capsicum annuum</i> L.....	28
<b>Figura 9.</b> Via biossintética da capsaicina.....	30
<b>Figura 10.</b> Estrutura molecular do HPA com estrutura de Keggin.....	31
<b>Figura 11.</b> Análogos sintéticos da capsaicina (A, B e C) (Gonçalves, 2009) e as substâncias padrão capsaicina (D) e diidrocapsaicina (E) (Sigma Aldrich, USA) utilizadas como controles positivos para os testes de susceptibilidade.....	39
<b>Figura 12.</b> Fórmulas estruturais do Ligante bis-(2-metilpiridil)amina (BMPA) (A); Complexo mononuclear Cobre bis-(2-metilpiridil)amina (CuBMPA) (B); Complexo mononuclear Ferro bis-(2-metilpiridil)amina (FeBMPA) (C).....	41
<b>Figura 13.</b> Fórmulas estruturais do Ligante 1-(bis-piridin-2-ilmetil-amino)-3-cloropropan-2-ol (HPCINOL) (A); Complexo mononuclear Cobre-1-(bis-piridin-2-ilmetil-amino)-3-cloropropan-2-ol (CuHPCINOL) (B); Complexo binuclear Ferro-1-(bis-piridin-2-ilmetil-amino)-3-cloropropan-2-ol (FeHPCINOL) (C); Complexo mononuclear Manganês-1-(bis-piridin-2-ilmetil-amino)-3-cloropropan-2-ol (MnHPCINOL) (D).....	42
<b>Figura 14.</b> Fórmulas estruturais do Ligante 2-hidroxibenzil- (2-piridilmetil) amina (HBPA) (A); Complexo mononuclear Cobre-(2-hidroxibenzil) (2-piridilmetil) amina (CuHBPA) (B); Complexo mononuclear Ferro-(2-hidroxibenzil) (2-piridilmetil) amina (FeHBPA) (C).....	43
<b>Figura 15.</b> Fórmulas estruturais do Ligante 2-[piridin-2-ilmetilamino]etanol (BS) (A); Complexo mononuclear Cobre-2-[piridin-2-ilmetilamino]etanol (CuBS) (B); Complexo mononuclear Ferro-2-[piridin-2-ilmetilamino]etanol (FeBS) (C).....	44

<b>Figura 16.</b> Fórmulas estruturais do Ligante 1[(piridin-2-ilmetil)amino]propan-2-ol (BE) (A); Complexo mononuclear cobre-1[(piridin-2-ilmetil)amino]propan-2-ol (CuBE) (B); Complexo mononuclear Ferro-1[(piridin-2-ilmetil)amino]propan-2-ol (FeBE) (C).....	45
<b>Figura 17.</b> Fórmulas estruturais dos antifúngicos (A) Itraconazol (azol), (B) Terbinafina (alilamina); e (C) Anfotericina B (poliênico).....	46
<b>Figura 18.</b> Microscopia óptica de campo claro e de fluorescência de células leveduriforme de <i>Sporothrix</i> spp. marcadas com Sytox Green™ após 24h de incubação com sais de HPAS de prata.....	73
<b>Figura 19.</b> Microscopia óptica de campo claro e de fluorescência de células leveduriforme de <i>Sporothrix</i> spp. marcadas com Sytox Green™ após 24h de incubação com complexos de coordenação formados com os ligantes HBPA e BMPA.....	74
<b>Figura 20.</b> Microscopia óptica de campo claro e de fluorescência de células leveduriforme de <i>Sporothrix</i> spp. marcadas com Sytox Green™ após 24h de incubação com complexos de coordenação formados com os ligantes BS e BE.....	75
<b>Figura 21.</b> Microscopia óptica de campo claro e de fluorescência de células leveduriforme de <i>Sporothrix</i> spp. marcadas com Sytox Green™ após 24h de incubação com complexos de coordenação como o ligante HPCINOL.....	76
<b>Figura 22.</b> Microscopia óptica de campo claro e de fluorescência de células leveduriforme de <i>Sporothrix</i> spp. marcadas com Sytox Green™ após 24h de incubação com extrato etanólico de <i>C. annuum</i> L. e análogos sintéticos da capsaicina e diidrocapsaicina.....	77
<b>Figura 23.</b> MEV da forma leveduriforme do isolado de <i>Sporothrix</i> LSASs01 sem tratamento mostrando leveduras mais alongadas e em brotamento (A) e leveduras isoladas demonstrando a camada de microfibrilas (B). Leveduras tratadas com ICZ demonstraram bastante brotamentos (C); leveduras tratadas com TBF apresentaram células em brotamento e com morfologia semelhante a pseudo-	

hifas (D); leveduras tratadas com anfotericina B mostraram células com formas ovaladas, alongadas e semelhante a pseudo-hifas e indícios de descolamento da camada microfibrilar (E).....79

**Figura 24.** MEV da forma leveduriforme do isolado de *Sporothrix* LSASs01 após tratamento com  $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$  (A);  $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$ ; (B);  $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]$  (C);  $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$  (D).....80

**Figura 25.** MEV de leveduras de *Sporothrix* spp LSASs01 tratadas com o ligante BMPA (A); tratadas com o complexo CuBMPA (B); tratadas com o complexo FeBMPA (C); tratadas com o ligante HBPA (D); tratadas com o complexo CuHBPA (E); tratadas com o complexo FeHBPA (F).....82

**Figura 26.** MEV de leveduras de *Sporothrix* spp LSASs01 tratadas com o ligante BS (A); tratadas com o complexo CuBS (B); tratadas com o complexo FeBS (C); tratadas com o ligante BE (D); tratadas com o complexo CuBE (E); tratadas com o complexo FeBE (F).....83

**Figura 27.** MEV de leveduras de *Sporothrix* spp LSASs01 tratadas com o ligante HPCINOL (A); tratadas com o complexo CuHPCINOL (B); tratadas com o complexo FeHPCINOL (C); tratadas com o complexo MnHPCINOL (D).....84

**Figura 28.** MEV de leveduras de *Sporothrix* spp LSASs01 tratadas com o extrato etanólico de *Capsicum annuum* L (A); leveduras tratadas com o análogo sintético SA-01 (B); leveduras tratadas com o análogo sintético SA-02 (C); leveduras tratadas com o análogo sintético SA-03 (D); leveduras tratadas o padrão Capsaicina (Sigma Aldrich, USA) (E) e levedura tratada com o padrão diidrocapsaicina (Sigma Aldrich, USA) (F).....85

**Figura 29.** Microscopia eletrônica de transmissão da cepa LSASs01 de *Sporothrix* cultivada em meio BHI (A, B, C e D) e em BHI + L-DOPA (E, F, G e H). Em (A e E) Leveduras não tratadas, (B e F) tratadas com itraconazol, (C e G) tratadas com terbinafina e (D e H) tratadas com anfotericina B por 48h a 37°C. Leveduras não tratadas apresentaram morfologia normal, com membrana em íntimo contato à parede celular e presença de camada microfibrilar mais eletrônica e contendo grânulos de pigmento em leveduras crescendo na presença de

L-DOPA. Tratamento com ICZ e TBF levou a formação de grandes vacúolos e aumento da espessura da parede celular.....88

**Figura 30.** Microscopia eletrônica de transmissão da cepa LSASs01 de *Sporothrix* cultivada em meio BHI (A, B, C e D) e em BHI + L-DOPA (E, F, G e H). Em (A e E) células tratadas com  $Ag_3[PMo_{12}O_{40}]$ , (B e F) tratadas com  $Ag_3[PW_{12}O_{40}]$ , (C e G) tratadas com  $Ag_4[SiW_{10}V_2O_{40}]$  e (D e H) tratadas com  $Ag_4[SiW_{12}O_{40}]$ . Leveduras tratadas com os sais de HPA apresentaram a formação de grandes vacúolos vesiculares e eletrondensos, espessamento ou duplicidade da parede celular e redução da camada microfibrilar.....90

**Figura 31.** Microscopia eletrônica de transmissão da cepa LSASs01 de *Sporothrix* cultivada em meio BHI (A, B, C) e em BHI + L-DOPA (D, E e F). Em (A e D) células tratadas com o ligante BMPA, (B e E) tratadas com complexo CuBMPA, (C e F) tratadas com o complexo FeBMPA. Leveduras tratadas com estes compostos apresentaram perda da camada de microfibrilas, vacúolos eletrondensos, espessamento ou duplicidade da parede celular.....92

**Figura 32.** Microscopia eletrônica de transmissão da cepa LSASs01 de *Sporothrix* cultivada em meio BHI (A, B, C) e em BHI + L-DOPA (D, E e F). Em (A e D) células tratadas com o ligante HBPA, (B e E) tratadas com complexo CuHBPA, (C e F) tratadas com o complexo FeHBPA. Leveduras tratadas com estes compostos apresentaram perda da camada de microfibrilas, vacúolos eletrondensos, esvaziamento citoplasmático, acúmulo de grânulos eletrondensos e espessamento ou duplicidade da parede celular.....94

**Figura 33.** Microscopia eletrônica de transmissão da cepa LSASs01 de *Sporothrix* cultivada em meio BHI (A, B, C) e em BHI + L-DOPA (D, E e F). Em (A e D) células tratadas com o ligante BS, (B e E) tratadas com complexo CuBS, (C e F) tratadas com o complexo FeBS. Leveduras tratadas com estes compostos apresentaram perda da camada de microfibrilas, vacúolos eletrondensos, esvaziamento citoplasmático, acúmulo de grânulos eletrondensos e espessamento da parede celular.....96

**Figura 34.** Microscopia eletrônica de transmissão da cepa LSASs01 de *Sporothrix* cultivada em meio BHI (A, B, C) e em BHI + L-DOPA (D, E e F). Em (A e D)

células tratadas com o ligante BE, (B e E) tratadas com complexo CuBE, (C e F) tratadas com o complexo FeBE. Leveduras tratadas com estes compostos apresentaram desorganização citoplasmática e acúmulo de grânulos eletrondensos no citoplasma e na face interna da parede celular.....98

**Figura 35.** Microscopia eletrônica de transmissão da cepa LSASs01 de *Sporothrix* cultivada em meio BHI (A, B, C e D) e em BHI + L-DOPA (E, F, G e H). Em (A e D) células tratadas com o ligante HPCINOL, (B e E) tratadas com complexo CuHPCINOL, (C e F) tratadas com o complexo FeHPCINOL, (D e H) tratadas com o complexo MnHPCINOL. Leveduras tratadas com estes compostos apresentaram perda da camada de microfibrilas, vacúolos eletrondensos, esvaziamento citoplasmático, acúmulo de grânulos eletrondensos e espessamento ou duplicidade da parede celular.....100

**Figura 36.** Microscopia eletrônica de transmissão da cepa LSASs01 de *Sporothrix* cultivada em meio BHI (A, B, C, D, E e F) e em BHI + L-DOPA (G, H, I, J, K e L). Em (A e G) células tratadas com o extrato etanólico de *C. annuum* L., (B e H) tratadas com análogo SA1, (C e I) tratadas com o análogo SA2, (D e J) tratadas com o análogo SA3; (E e K) controle positivo tratadas com a capsaicina padrão; e (F e L) controle positivo tratadas com diidrocapsaicina padrão. Leveduras tratadas com estes compostos apresentaram perda da camada de microfibrilas, vacúolos eletrondensos, esvaziamento citoplasmático, acúmulo de grânulos eletrondensos e espessamento da parede celular.....104

**Figura 37.** Padrão de melanização das colônias de diferentes linhagens de *Sporothrix* spp. após 30 dias de crescimento em placas com Ágar Batata Dextrose (PDA) suplementado com cloranfenicol (50mg/mL) e cicloeximide (400mg/mL) mantidos a 28°C.....107

**Figura 38.** Diferenças no grau de melanização da cepa ATCC 32285 do fungo *Sporothrix* após tratamento com diferentes compostos na ausência e presença do indutor de melanização L-DOPA.....109



<b>Figura 39.</b> Diferenças no grau de melanização da cepa CMDB/IOC 01990699 do fungo <i>Sporothrix</i> após tratamento com diferentes compostos na ausência e presença do indutor de melanização L-DOPA. ....	111
<b>Figura 40.</b> Diferenças no grau de melanização da cepa CMDB/IOC 02050799 do fungo <i>Sporothrix</i> após tratamento com diferentes compostos na ausência e na presença de L-DOPA após tratamento com diferentes compostos.....	112
<b>Figura 41.</b> Diferenças no grau de melanização da cepa clínica LSASs02 do fungo <i>Sporothrix</i> em Ágar BDA adicionado de L-DOPA após tratamento com compostos.....	113
<b>Figura 42.</b> Diferenças no grau de melanização da cepa clínica LSASs04 do fungo <i>Sporothrix</i> em Ágar BDA adicionado de L-DOPA após tratamento com compostos.....	114
<b>Figura 43.</b> Partículas de melanina da forma leveduriforme de <i>Sporothrix</i> spp LSASs01 cultivadas em Meio mínimo (A); Meio Mínimo + 1 mM L-DOPA (B); Meio Mínimo + 8,0 mg/L TCZL (C); Meio Mínimo + 1 mM L-DOPA + 8,0 mg/L TCZL (D). (TCZL: Triciclazol). Aumento 400X.....	115
<b>Figura 44.</b> Partículas de melanina da forma leveduriforme de <i>Sporothrix</i> spp. LSASs01 cultivadas em MM + Ag <sub>3</sub> [PMo <sub>12</sub> O <sub>40</sub> ] (A); MM + Ag <sub>3</sub> [PW <sub>12</sub> O <sub>40</sub> ] (B); MM + Ag <sub>4</sub> [SiW <sub>10</sub> V <sub>2</sub> O <sub>40</sub> ] (C); MM + Ag <sub>4</sub> [SiW <sub>12</sub> O <sub>40</sub> ] (D). (MM: Meio Mínimo). Aumento 400X.....	116
<b>Figura 45.</b> Partículas de melanina da forma leveduriforme de <i>Sporothrix</i> spp. LSASs01 cultivadas em MM + BMPA (A); MM + CuBMPA (B); MM + FeBMPA (C); MM + HBPA (D); MM + CuHBPA (E); MM + FeHBPA (F). Aumento 400X.....	117
<b>Figura 46.</b> Partículas de melanina da forma leveduriforme de <i>Sporothrix</i> spp. LSASs01 cultivadas em MM + BS (A); MM + CuBS (B); MM + FeBS (C); MM + BE (D); MM + CuBE (E); MM + FeBE (F). (MM: Meio Mínimo). Aumento 400X.....	118

<b>Figura 47.</b> Partículas de melanina da forma leveduriforme de <i>Sporothrix</i> spp. LSASs01 cultivadas em MM + HPCINOL (A); MM + CuHPCINOL (B); MM + FeHPCINOL (C); MM + MnHPCINOL (D). (MM: Meio Mínimo). Aumento 400X.....	119
<b>Figura 48.</b> Partículas de melanina da forma leveduriforme de <i>Sporothrix</i> spp. LSASs01 cultivadas em MM + Extrato etanólico de <i>C. annuum</i> L. (A); MM + SA1 (B); MM + SA2 (C); MM + SA3 (D); MM + CAP (E); MM + DCAP (F). (MM: Meio Mínimo; ExEt: Extrato Etanólico; CAP: Capsaicina; DCAP: Diidrocapsaicina). Aumento 400X.....	120
<b>Figura 49.</b> Estrutura molecular da 3,4-Diidroxi-L-fenilalanina (L-DOPA - Sigma Aldrich, EUA) (A) e seu perfil no espectro do Infravermelho mostrando os grupamentos majoritários e de menor intensidade presentes em sua molécula (B).....	122
<b>Figura 50.</b> Perfil do espectro no infravermelho das partículas de melanina coletadas após tratamento enzimático, desnaturante e ácido quente a partir do fungo <i>Sporothrix</i> LSASs01 não tratado.....	124
<b>Figura 51.</b> Perfil do espectro no Infravermelho do pigmento isolado do fungo não tratado na presença de L-DOPA.....	124
<b>Figura 52.</b> Perfil do espectro no Infravermelho do pigmento isolado do fungo após tratamento com o ligante BS.....	125
<b>Figura 53.</b> Perfil do espectro no Infravermelho do pigmento isolado do fungo após tratamento com o complexo de coordenação CuBE.....	125
<b>Figura 54.</b> Perfil do espectro no Infravermelho do pigmento isolado do fungo após tratamento com o ligante HPCINOL.....	126
<b>Figura 55.</b> Perfil do espectro no Infravermelho do pigmento isolado do fungo após tratamento com o sal fosfomolibdato de prata $Ag_3[PMo_{12}O_{40}]$ .....	126
<b>Figura 56.</b> Perfil do espectro no Infravermelho do pigmento isolado do fungo após tratamento com o análogo sintético da capsaicina SA2.....	127

<b>Figura 57.</b> Perfil do espectro no Infravermelho do pigmento isolado do fungo após tratamento com o análogo sintético da capsaicina SA3.....	127
<b>Figura 58.</b> Perfil do espectro no Infravermelho do pigmento isolado do fungo após tratamento com o padrão Diidrocapsaicina.....	128
<b>Figura 59.</b> Aparência de <i>P. redivivus</i> em caldo BHI a 37°C.....	141
<b>Figura 60.</b> MEV de <i>P. redivivus</i> . (A e A') <i>P. redivivus</i> não infectado; (B e C) <i>P. redivivus</i> infectado com a forma leveduriforme de <i>Sporothrix</i> spp.....	142
<b>Figura 61.</b> Microscopia óptica e eletrônica de transmissão de <i>P. redivivus</i> . Seção longitudinal de <i>P. redivivus</i> infectado com <i>Sporothrix</i> spp LSASs01 a 37°C demonstrando leveduras intactas alojadas no tecido muscular do nematoide. (A e B) Microscopia óptica; (C e D) Microscopia eletrônica de transmissão.....	143

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Códigos dos isolados, forma clínica da doença e origem das cepas de *Sporothrix* spp. adquiridas da Fiocruz e isoladas de animais doentes pelo Laboratório de Sanidade Animal da UENF.....37
- Tabela 2.** Concentração inibitória mínima ( $\mu\text{g/mL}$ ) de drogas antifúngicas comerciais (itraconazol, terbinafina e anfotericina B) frente aos isolados de *Sporothrix* melanizados e não melanizados nas formas leveduriforme e filamentosa de crescimento.....57
- Tabela 3.** Concentração inibitória mínima ( $\mu\text{g/mL}$ ) do extrato etanólico de *Capsicum annuum L.*, derivados sintéticos capsaicinoides (SA1, SA2 e SA3), capsaicina e dihidrocapsaicina sobre isolados de *Sporothrix* melanizados e não melanizados nas formas leveduriforme e filamentosa de crescimento.....59
- Tabela 4.** Concentração inibitória mínima ( $\mu\text{g/mL}$ ) dos sais de heteropoliácidos de prata frente aos isolados de *Sporothrix* melanizados e não melanizados nas formas leveduriforme e filamentosa de crescimento.....61
- Tabela 5.** Concentração inibitória mínima ( $\mu\text{g/mL}$ ) do ligante BMPA e seus complexos com cobre e ferro sobre isolados de *Sporothrix* melanizados e não melanizados nas formas leveduriforme e filamentosa de crescimento.....63
- Tabela 6.** Concentração inibitória mínima ( $\mu\text{g/mL}$ ) do ligante HBPA e seus complexos com cobre e ferro sobre isolados de *Sporothrix* melanizados e não melanizados nas formas leveduriforme e filamentosa de crescimento.....65
- Tabela 7.** Concentração inibitória mínima ( $\mu\text{g/mL}$ ) do ligante BS e seus complexos com cobre e ferro sobre isolados de *Sporothrix* melanizados e não melanizados nas formas leveduriforme e filamentosa de crescimento.....67
- Tabela 8.** Concentração inibitória mínima ( $\mu\text{g/mL}$ ) do ligante BE e seus complexos com cobre e ferro sobre isolados de *Sporothrix* melanizados e não melanizados nas formas leveduriforme e filamentosa de crescimento.....69
- Tabela 9.** Concentração inibitória mínima ( $\mu\text{g/mL}$ ) do ligante HPCINOL e seus complexos com cobre, ferro e manganês sobre isolados de *Sporothrix*

melanizados e não melanizados nas formas leveduriforme e filamentosa de crescimento.....71

**Tabela 10.** Atividade urease de cepas de *Sporothrix* determinada através da incubação em Ágar Christensen urease após tratamento com o extrato etanólico de *C. annuum* L., análogos sintéticos da capsaicina, sais de HPAs e complexos de coordenação.....105

**Tabela 11.** Frequências observadas no espectro de infravermelho da melanina sintética padrão e dos pigmentos isolados do fungo *Sporothrix* com suas respectivas atribuições.....123

**Tabela 12.** Citotoxicidade do extrato etanólico de *C. annuum* L., análogos sintéticos da capsaicina, sais de HPA de prata e complexos de coordenação...138

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1.** Avaliação do efeito citotóxico dos Antifúngicos Itraconazol, Terbinafina, Miconazol e Anfotericina B frente às células VERO após 48 horas de incubação através do microensaio colorimétrico utilizando MTT. Como controle negativo (C-) foi usado cultura sem tratamento, e como controle positivo o meio DMEM-F12.....129
- Gráfico 2.** Avaliação do efeito citotóxico dos sais de HPAs de prata frente às células VERO após 48 horas de incubação através do microensaio colorimétrico utilizando MTT. Como controle negativo (C-) foi usado cultura sem tratamento, e como controle positivo o meio DMEM-F12.....130
- Gráfico 3.** Avaliação do efeito citotóxico dos complexos de coordenação: ligante BMPA e complexos CuBMPA e FeBMPA frente às células VERO após 48 horas de incubação através do microensaio colorimétrico utilizando MTT. Como controle negativo (C-) foi utilizado cultura sem tratamento com os compostos.....131
- Gráfico 4.** Avaliação do efeito citotóxico dos complexos de coordenação: ligante HBPA e complexos CuHBPA e FeHBPA frente às células VERO após 48 horas de incubação através do microensaio colorimétrico utilizando MTT. Como controle negativo (C-) foi utilizado cultura sem tratamento com os compostos.....132
- Gráfico 5.** Efeito citotóxico dos complexos de coordenação: ligante BS e complexos CuBSA e FeBS frente às células VERO após 48 horas de incubação através do microensaio colorimétrico utilizando MTT. Como controle negativo (C-) foi utilizado cultura sem tratamento com os compostos.....133
- Gráfico 6.** Efeito citotóxico dos complexos de coordenação: ligante BE e complexos CuBE e FeBE frente às células VERO após 48 horas de incubação através do microensaio colorimétrico utilizando MTT. Como controle negativo (C-) foi utilizado cultura sem tratamento com os compostos.....134
- Gráfico 7.** Efeito citotóxico dos complexos de coordenação: ligante HPCINOL e complexos CuHPCINOL e FeHPCINOL frente às células VERO após 48 horas de

incubação através do microensaio colorimétrico utilizando MTT. Como controle negativo (C-) foi utilizado cultura sem tratamento com os compostos.....135

**Gráfico 8.** Efeito citotóxico do extrato etanólico de *C. annuum L.* e análogos da capsaicina através do microensaio colorimétrico utilizando MTT. Como controle negativo (C-) foi utilizado cultura sem tratamento com os compostos.....136

**Gráfico 9.** Tempo de morte do nematoide *P. redivivus* após a exposição às cepas CMDDB/IOC 0199 e clínica LSASs01 de *Sporothrix* spp. a 25°C em meio de cultura sólido (Ágar BHI) e meio de cultura líquido (caldo BHI). (ml: meio de cultura líquido; ms: meio de cultura sólido). Os valores correspondem às médias de três experimentos independentes.....140

**Gráfico 10.** Tempo de morte do nematoide *P. redivivus* após a exposição às cepas CMDDB/IOC 0199 e clínica LSASs01 de *Sporothrix* spp. a 37°C em meio de cultura sólido (Ágar BHI) e meio de cultura líquido (caldo BHI). (ml: meio de cultura líquido; ms: meio de cultura sólido). Os valores correspondem às médias de três experimentos independentes.....140

**Gráfico 11.** Concentrações dos compostos requeridas para promover a desinfecção dos vermes infectados por *Sporothrix* spp. LSASs01.....144

**Gráfico 12.** Sobrevivência dos vermes infectados com *Sporothrix* spp. quando na presença dos compostos de coordenação de cobre e ferro (32, 128 e 512 µg/mL).....145

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
LISTA DE FIGURAS.....	xv
LISTA DE TABELAS.....	xxiv
LISTA DE GRÁFICOS.....	xxvi
1. Introdução.....	1
2. Revisão Bibliográfica.....	3
2.2 Esporotricose.....	8
2.3 Fatores de Patogenicidade.....	15
2.4 Tratamento da esporotricose.....	19
2.6 <i>Capsicum annuum L.</i> .....	27
2.7 Heteropoliácidos (HPAs).....	31
2.8 Complexos de Coordenação.....	33
3. Justificativa.....	35
4. Objetivos.....	36
4.1 Objetivo Geral.....	36
4.2 Objetivos Específicos.....	36
5. Material e Métodos.....	37
5.1 Linhagens de microrganismos.....	37
5.2 Amostras testadas.....	38
5.2.1 Extrato etanólico de <i>Capsicum annuum L.</i> e análogos sintéticos capsaicinoides.....	38
5.2.3 Complexos de Coordenação.....	40
5.3 Fármacos de Referência.....	45
5.4 Atividade Antimicrobiana – Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	46
5.5 Ensaio para verificação da permeabilização de membranas de <i>Sporothrix spp.</i> .....	48
5.6 Efeito dos compostos sobre a ultraestrutura de <i>Sporothrix spp.</i> .....	48
5.6.1. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	49
5.6.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	49
5.7 Avaliação da melanização.....	50



<b>5.7.1 Potenciais de melanização de leveduras tratadas com os compostos</b> .....	50
<b>5.7.2 Extração das partículas de melanina</b> .....	50
<b>5.7.3 Análise das melaninas extraídas de células fúngicas tratadas</b> .....	51
5.8 Avaliação do efeito citotóxico do extrato etanólico de <i>C. annuum L.</i> e seus análogos sintéticos, dos heteropoliácidos e complexos de coordenação .....	51
5.9 Ensaio utilizando nematoide de vida livre .....	52
<b>5.9.1 Ensaio de toxicidade dos compostos sobre nematoide de vida livre <i>P. redivivus</i></b> .....	52
<b>5.9.2 Infecção fúngica do nematoide <i>P. redivivus</i> (Laws et al., 2005)</b> .....	53
<b>5.9.2.1 Ensaio de morte de <i>P. redivivus</i> em meio de cultura sólido</b> .....	53
<b>5.9.2.2 Ensaio de morte e resgate de sobrevivência em meio de cultura líquido</b> .....	54
5.10 Análise Estatística.....	54
<b>6. Resultados</b> .....	<b>55</b>
6.1 Testes de susceptibilidade: Concentração Inibitória Mínima (CIM) .....	55
<b>6.1.1 Concentração Inibitória Mínima dos antifúngicos comerciais</b> .....	55
<b>6.1.2. Conce ntração Inibitória Mínima do extrato etanólico de <i>C. annuum L.</i> e derivados capsaicinoides</b> .....	58
<b>6.1.3 Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos sais de heteropoliácidos de prata</b> .....	60
<b>6.1.4. Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos complexos de coordenação</b> .....	62
6.2. Efeito dos compostos sobre a permeabilidade da membrana plasmática das células fúngicas .....	72
6.3. Efeitos dos compostos sobre a ultraestrutura de <i>Sporothrix spp.</i> .....	77
<b>6.3.1. Microscopia Eletrônica de Varredura</b> .....	77
<b>6.3.1.1. Controles negativo e positivos</b> .....	77
<b>6.3.1.2 Sais de Heteropoliácidos de Prata</b> .....	78
<b>6.3.1.3 Complexos de Coordenação</b> .....	80
<b>6.3.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão</b> .....	86
<b>6.3.2.1. Controles negativo e positivos</b> .....	86
<b>6.3.2.2 Sais de Heteropoliácidos de Prata</b> .....	89

6.3.2.3 Complexos de Coordenação .....	91
6.3.2.4. Extrato etanólico de <i>Capsicum annuum</i> L. e análogos sintéticos capsaicinoides .....	101
6.4 Avaliação de fatores de virulência .....	105
6.4.1. Atividade Urease .....	105
6.4.2. Melanização .....	107
6.4.2.1 Análise das melaninas por microscopia óptica.....	114
6.4.2.2 Análise por Infravermelho.....	121
6.5. Avaliação do efeito citotóxico do extrato etanólico de <i>C. annuum</i> L., dos análogos sintéticos capsaicinoides, dos heteropoliácidos e dos complexos de coordenação .....	128
6.6. Ensaio utilizando nematoide de vida livre .....	136
6.6.1 Ensaio de toxicidade dos compostos sobre o nematoide de vida livre <i>P. redivivus</i> .....	136
6.6.2. Sobrevivência e morte de <i>P. redivivus</i> após infecção pelo fungo <i>Sporothrix</i> .....	139
<b>Gráfico 12. Sobrevivência dos vermes infectados com <i>Sporothrix</i> spp. quando na presença dos compostos de coordenação de cobre e ferro (32, 128 e 512 µg/mL).....</b>	<b>145</b>
7. Discussão .....	145
8. Conclusões .....	163
9. Perspectivas Futuras .....	164
10. Referências Bibliográficas .....	165
11. APÊNDICE A .....	199
12. APÊNDICE B .....	200
13. APÊNDICE C .....	201
14. APÊNDICE D .....	202
15. APÊNDICE E .....	203
16. APÊNDICE F.....	204

## 1- INTRODUÇÃO

A evolução em diversas áreas da ciência tem ajudado a prolongar a vida dos seres humanos e animais com a cura de várias doenças. A descoberta e o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos para o uso clínico foram um dos maiores progressos no século 20. No entanto, o uso indiscriminado de antimicrobianos tem corroborado para a propagação e seleção de microrganismos patogênicos resistentes, tornando as infecções mais graves principalmente para os indivíduos imunodeprimidos que sobrevivem à base de tratamentos imunossupressivos, e acabam predispondo esta categoria a várias doenças oportunistas causadas principalmente por fungos.

As plantas são tradicionalmente utilizadas por populações de todos os continentes no controle de diversas doenças e pragas e representam uma importante fonte de produtos naturais biologicamente ativos (Cragg et al., 2014; Balunas & Kinghorn, 2005). Fármacos baseados em produtos naturais correspondem à quase 70% de todos os fármacos aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) para tratamento de doenças infecciosas e anticâncer (Cragg et al., 2014; Ojima, 2008; Newman, 2007). Substâncias bioativas isoladas de pimentas do gênero *Capsicum* e os análogos capsaicinoides podem representar uma valiosa alternativa terapêutica contra microrganismos patogênicos para o homem e animais. Além disso, compostos sintéticos provenientes da química orgânica e/ou inorgânica contendo metais em sua composição representam uma nova abordagem na busca de novos fármacos promovendo uma autêntica revolução na forma de concepção praticada pela indústria farmacêutica (Viegas et al., 2006; Yunes & Cechinel Filho, 2001). Nesse contexto, moléculas inorgânicas conhecidas como heteropoliácidos e complexos de coordenação podem representar uma nova classe de compostos com diferentes atividades biológicas de acordo com os metais presentes em suas estruturas.

A esporotricose é uma micose subaguda ou crônica causada por fungos dimórficos do complexo *Sporothrix*, caracterizada pelo desenvolvimento de lesões ou nódulos que afetam os tecidos cutâneo, subcutâneo e linfático e que pode se disseminar para alguns órgãos do corpo, principalmente em indivíduos imunocomprometidos, desencadeando formas exóticas da doença (Borrego et al.,

2009; Rocha et al., 2001). Apresenta distribuição mundial, sendo considerada endêmica principalmente nas regiões tropicais e subtropicais. Devido ao aumento da incidência da esporotricose, estudos relacionados a epidemiologia e fatores de virulência de *Sporothrix* spp. têm sido desenvolvidos para melhor compreender a dinâmica e os efeitos de sua patogênese (Freitas et al., 2012; Almeida-Paes et al., 2009; Morris-Jones et al., 2003). O fungo pode produzir enzimas extracelulares como proteinases e fosfatases, além de apresentar termotolerância e síntese de melanina (Madrid et al., 2010; Almeida-Paes et al., 2007; Lima et al., 2003). Também pode expressar diferentes proteínas ao ser cultivado em diferentes meios de cultura, fato que pode auxiliar na exploração de exoantígenos para fins diagnósticos e terapêuticos, bem como na diferenciação de cepas presentes em áreas geograficamente distintas (Fernandes et al., 2009).

Dentre os medicamentos disponíveis para o tratamento da esporotricose, o iodeto de potássio foi utilizado por muitas décadas, principalmente por causa do seu baixo custo, mas devido a sua toxicidade, sua utilização tornou-se bastante restrita. O itraconazol tem sido o fármaco de escolha para o tratamento desta micose tanto para os humanos quanto para os animais (Gremião et al., 2011; Pereira et al., 2010; Barros et al., 2004), no entanto, estudos de susceptibilidade *in vitro* aos antifúngicos demonstraram que isolados de formas disseminadas da esporotricose são menos susceptíveis ao tratamento com itraconazol do que isolados de formas mais brandas da doença, evidenciando os casos de falha terapêutica em pacientes com manifestações clínicas mais graves (Trilles et al., 2005). Nestes casos, os pacientes são tratados com anfotericina B, um derivado poliênico que também se torna tóxico pelo uso prolongado (Kohler et al., 2007). Esses fatores fortalecem a necessidade de descobrir novas substâncias biologicamente ativas com novos mecanismos de ação que auxiliem no tratamento da esporotricose.

Além dos ensaios antimicrobianos *in vitro* em laboratório é preciso confirmar se esses mesmos compostos candidatos a fármacos apresentam o mesmo perfil antimicrobiano *in vivo* e, para isso, vários grupos de animais de pequeno porte são requeridos para este tipo de experimentação e os resultados

muitas vezes não são significativos. Isso levou alguns pesquisadores a procurarem meios alternativos de rastrear a atividade biológica *in vivo* de uma gama de compostos sem sacrificar um grande número de animais. Pesquisas têm demonstrado que muitos fungos e bactérias patogênicas podem infectar e causar doença em simples hospedeiros não-vertebrados que possuem características genotípicas conhecidas, assim como a mosca de fruta *Drosophila melanogaster*, o nematoide *Caenorhabditis elegans* e a planta *Arabidopsis thaliana* (Vodovar et al., 2004; Mahajan-Miklos et al., 1999; Rahme et al., 1995; Pandey & Nichols, 2011). O nematoide *Caenorhabditis elegans* tem sido utilizado como modelo de infecção *in vivo* para vários patógenos importantes incluindo os fungos *Cryptococcus neoformans* (Aballay & Ausubel 2002) e *Candida albicans* (Pukkila-Worley et al., 2009) e as bactérias *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* (Zhou et al., 2011; Kirienko et al., 2013), *Staphylococcus aureus*, *Salmonella entérica* (Aballay et al., 2000) e *Enterococcus faecalis* (Maadani et al., 2007). Foi demonstrado que estes patógenos provocam a morte dos nematoides, evidenciando a influência de seus fatores de virulência produzidos durante a infecção e validando o uso do modelo de hospedeiro invertebrado para o estudo da patogênese destes microrganismos *in vivo* (Arvanitis et al., 2013; Ewbank & Zugasti, 2011; Bhavsar & Ségalat, 2007; Brown, 2006; Moy et al., 2006; Mylonakis et al., 2002).

## 2. Revisão Bibliográfica

### 2.1 *Sporothrix schenckii*

*S. schenckii* é o agente etiológico da esporotricose, uma micose subcutânea subaguda ou crônica distribuída principalmente em países da América Latina com climas tropicais e temperados (Freitas et al., 2012). Este fungo está classificado na subdivisão Deuteromycotina, classe Hyphomycetes, ordem Moniliales, família Moniliaceae, gênero *Sporothrix* e espécie *schenckii* (Kwon-Chung & Bennett, 1992). *Sporothrix schenckii* era considerado a única espécie do gênero patogênica para o homem e animais. No entanto, nos últimos

anos, vários estudos moleculares têm sido realizados utilizando numerosos isolados de diferentes regiões geográficas que anteriormente foram identificados apenas de acordo com suas características morfológicas (fenotípicas) como *Sporothrix schenckii*. Estes estudos demonstraram uma alta diversidade genética dentro desta espécie e a existência de várias linhagens filogenéticas que conseqüentemente levaram à reclassificação destes isolados de *S. schenckii* em um complexo de numerosas espécies crípticas responsáveis pelas manifestações clínicas da esporotricose (Marimon et al., 2008). Através de análises fenotípicas (características macroscópicas, assimilação de sacarose e rafinose, crescimento a 37°C) e genotípicas (sequência parcial do gene nuclear da calmodulina) fazem parte do complexo *Sporothrix* as seguintes espécies: (i) *S. globosa*, uma espécie pouco virulenta e mundialmente distribuída (Madrid et al., 2009; Oliveira et al., 2010); (ii) *S. brasiliensis*, relacionada com a epidemia zoonótica de esporotricose no estado do Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul, Brasil (Marimon et al., 2006; 2007, Oliveira et al., 2011); (iii) *S. mexicana*, encontrada em certas amostras ambientais do México e em casos autóctones de esporotricose na Europa (Marimon et al., 2007; Dias et al., 2011); e (iv) *S. luriei*, anteriormente classificada como *S. schenckii* var. *luriei* (Marimon et al., 2008), diferindo de *S. schenckii* principalmente na sua forma de apresentação no tecido pela produção de leveduras grandes, muitas vezes septadas, incapaz de assimilar creatinina ou creatina (de Hoog & Guarro, 1995). Também foram descritas por de Meyer et al. (2008), três outras espécies ambientais do gênero *Sporothrix*: *S. stylites*, *S. humicola* e *S. lignivora*. As duas primeiras espécies diferem de *S. schenckii* pela incapacidade de produzir conídios melanizados. *S. lignivora* tem conídios distintos que não correspondem em tamanho nem em forma com *Sporothrix*. Isolados classificados como *S. humicola* eram anteriormente referidos como isolados ambientais de *S. schenckii*.

Membros do complexo *S. schenckii* são saprófitas e possuem dimorfismo térmico. Na temperatura ambiente ou em cultivo a 25°C, crescem na forma micelial ou filamentosa formando, macroscopicamente, micélios muito curtos e pouco evidentes, inicialmente de coloração branca de aspecto sedoso e membranoso que com o passar do tempo podem se tornar castanhos ou negros devido à produção do pigmento melanina. Microscopicamente observam-se hifas

finas hialinas e delicadas, septadas e ramificadas, podendo medir de 1-2 $\mu$ m de diâmetro de onde partem conidióforos alongados, simpodiais, em cuja extremidade se desenvolvem conídios piriformes, elípticos ou ovais dispostos em forma de “bouquet” ou margaridas (Know-Chung & Bennet, 1992) (Figura 1A e 1B). Conídios de parede celular escura auxiliam na distinção fenotípica de *S. schenckii* de outras espécies não patogênicas do gênero *Sporothrix* (de Meyer et al., 2008). Portanto, o tamanho e a forma dos conídios demáceos (pigmentados) podem variar dentro das novas espécies descritas no complexo *Sporothrix* (Marimon et al., 2007) (Figura 1C e 1D).

Quando cultivado a 37°C, *Sporothrix* apresenta-se na forma leveduriforme, que é considerada a forma parasitária deste agente. Macroscopicamente apresenta colônias pequenas, brancas, creme ou amareladas, de superfície lisa com micro-morfologia caracterizada por células unicelulares em forma de “charuto”, ovaladas ou arredondadas, dependendo da espécie. Nesta temperatura o fungo se reproduz por brotamento simples ou múltiplo e suas células podem medir de 4-6  $\mu$ m de diâmetro (Carlos et al., 2009; Lacaz et al., 2002; Know-Chung & Bennet, 1992) (Figura 1E e F).

A transição da forma filamentosa para leveduriforme em *S. schenckii* pode ser obtida através da cultura de fragmentos do micélio em meios de cultura “ricos” em nutrientes como o Ágar Infusão de Cérebro e Coração (BHI), a 37°C (Morris-Jones, 2002; Zancopé-Oliveira et al., 2011). A mudança morfológica em nível ultraestrutural ocorre pela formação direta de brotamentos nas extremidades e ao longo das hifas simultaneamente com a formação de células arredondadas após septação das hifas, sem alterações visíveis do conteúdo citoplasmático da célula-mãe (Garrison et al., 1975). A transição da forma leveduriforme para filamentosa se inicia a partir de uma divisão nuclear, seguida pela formação de um tubo germinativo que se origina a partir da célula da levedura parental e um septo é formado no ponto de ligação da célula-mãe com o tubo germinativo (Betancourt et al., 1985; Rodriguez-del Valle & Rodriguez-Medina, 1993).

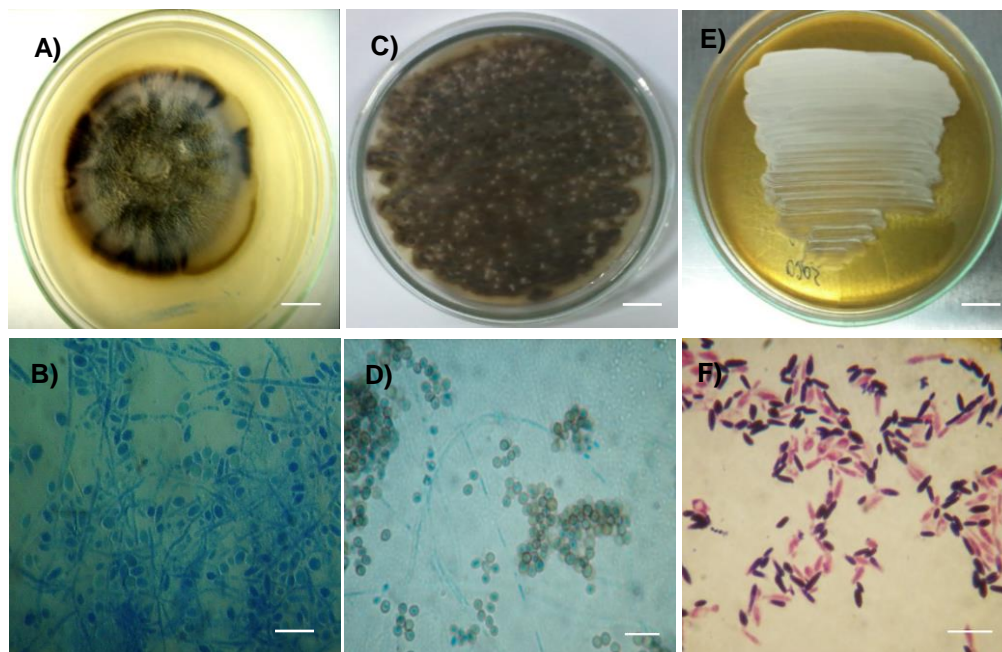


Figura 1. Morfologia das fases de crescimento do fungo *Sporothrix* spp. (A) Fase micelial ou filamentosa após 30 dias de crescimento a 28°C em Ágar Batata Dextrose mostrando colônia pigmentada; (B) Microscopia óptica do crescimento filamentoso corado com azul de algodão mostrando delicadas hifas septadas com conídios simpodiais; (C) Fase micelial após 15 dias de crescimento a 28°C em Ágar Batata dextrose mostrando colônia pigmentada; (D) Microscopia óptica do crescimento filamentoso corado com azul de algodão mostrando delicadas hifas septadas com conídios demáceos; (E) Crescimento na fase leveduriforme a 37°C em Ágar Brain Heart Infusion; (F) Microscopia óptica de células leveduriformes coradas pelo método de Gram mostrando células alongadas em forma de “charuto”.

A transmissão clássica da esporotricose ocorre através do implante traumático e/ou acidental do agente pelo contato com solo, matéria orgânica, instrumentos de trabalho contaminados, arranhões, mordidas ou até mesmo por contato com soluções cutâneas preexistentes do hospedeiro infectado (Barros et al., 2008; Meinerz et al., 2008; Marques et al., 1993). Apesar de raro, a transmissão também pode ocorrer através da inalação de conídios no ambiente, haja vista que este fungo é saprófita, onipresente no solo, na vegetação e nas 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) (Figura 2). *Sporothrix* pode infectar diversas espécies de animais e já foi



descrita em felinos, equinos, cães, bovinos, suínos, camelos, ratos, primatas e no homem (Crothers et al., 2009; Costa et al., 1994).

Fungos saprófitas são capazes de degradar todo tipo de resto orgânico e causam doença nos seres vivos de forma direta ou indireta pelo contato ou ingestão dos metabólitos produzidos por eles. Os fungos saprófitos dimórficos, como *Sporothrix* modificaram sua morfologia de forma a se adaptarem ao ciclo de vida parasitário no seu hospedeiro (Wanke et al., 2005). Fungos saprófitas como *S. schenckii*, quando passam a ter contato com animais, como os gatos que possuem o hábito de remexer a terra e “afiar” as unhas nos troncos das árvores, perdem a sua função decompositora e se adaptam ao novo ambiente, desenvolvendo a função de parasita. Com a domesticação destes gatos e o contato domiciliar afetivo, houve uma facilidade no estabelecimento e na propagação desta zoonose.

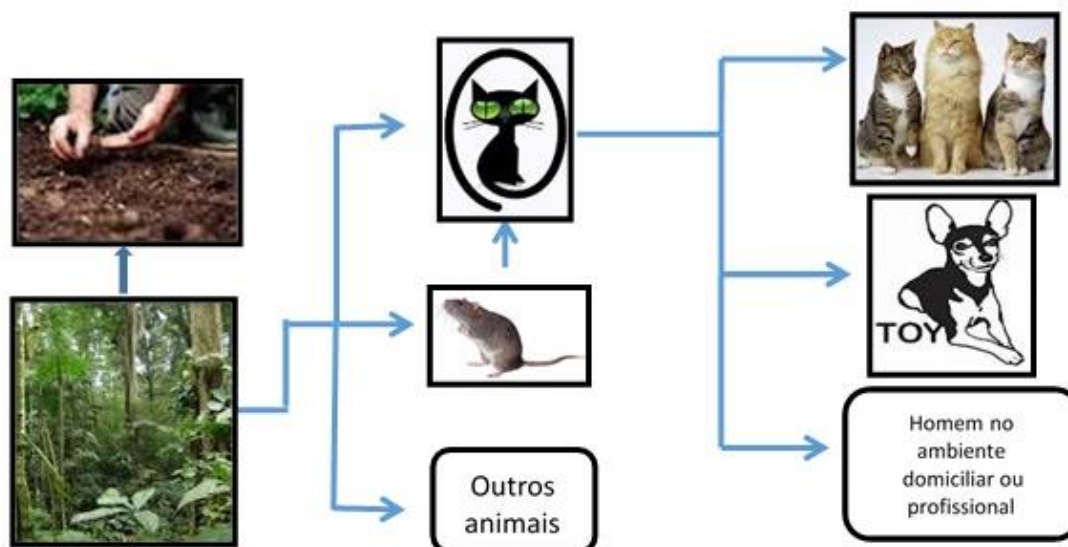


Figura 2. Desenho esquemático da dinâmica de transmissão da esporotricose (Adaptado de Tavares da Silva, 2010). O fungo na forma filamentosa presente no solo ou vegetais pode ser inoculado no hospedeiro através de um trauma e após sua conversão para a forma leveduriforme, as manifestações da esporotricose dependerá da imunidade do hospedeiro e do grau de patogenicidade da cepa. Gatos e outros animais contaminados participam da transmissão zoonótica da doença. As leveduras presentes nas lesões dos gatos infectados favorecem a transmissão para outros animais saudáveis (gatos e cães) e seres humanos através de arranhões, mordidas ou secreções (da Rosa et al., 2005).

## 2.2 Esporotricose

A esporotricose é uma micose subcutânea causada por membros do complexo do *Sporothrix* (Lopez-Romero et al., 2011). Descrita em 1896 pelo estudante de medicina Benjamim Schenck, nos Estados Unidos, após isolamento do agente de um paciente com lesões no membro superior direito. Em 1900, Hektoen & Perkins relataram o segundo caso da micose e denominaram o fungo isolado de *Sporothrix schenckii* (Hekton & Perkins, 1900). No Brasil, o primeiro caso de infecção natural em animais foi relatado por Lutz e Spendlore em 1907.

A esporotricose é uma doença rara na Europa, mas comum na África, no Japão, na Austrália e nas Américas. Trata-se da micose subcutânea mais vulgarmente diagnosticada na América Latina (Schubach et al., 2008; Schechtman, 2010). No Brasil, a doença foi diagnosticada nas regiões sul e sudeste. Na região sul, a micose é comumente diagnosticada no estado do Rio Grande do Sul (Nobre et al., 2002a; Xavier et al., 2004; Souza et al., 2006), enquanto que na região sudeste o estado mais acometido é o do Rio de Janeiro (Barros et al., 2004, 2005, 2008; Freitas et al., 2010, 2012, 2014), seguido por São Paulo (Larsson et al., 1989; Otsuka & Larsson et al., 2004; Silva et al., 2013) e Minas Gerais (Nogueira et al., 1995; de Souza Barros et al., 2012), onde os surtos epidêmicos de esporotricose comumente afetam os gatos, cães e seres humanos (Barros et al., 2010).

Entre 2011 e 2012, um surto epizootico/epidêmico de esporotricose felina surgiu em Itaquera, bairro da zona leste da cidade de São Paulo, afetando 98 gatos e 11 humanos que haviam entrado em contato com estes animais (Silva et al., 2013). Os autores observaram que a região estudada era constituída predominantemente por pessoas de baixo poder aquisitivo, com pouco acesso a cuidados de saúde e um baixo nível de escolaridade. No final de 2012, um novo surto de esporotricose felina foi diagnosticado no município de Diadema, sudeste de São Paulo.

Por muitos anos, a ocorrência desta micose estava predominantemente restrita à ocupação profissional, afetando pessoas que lidavam com a terra, particularmente em áreas rurais como fazendeiros, horticultores, floricultores, mineradores, e aos médicos veterinários e auxiliares de laboratório durante o

atendimento de animais doentes ou carreadores do fungo. Porém, desde 1998 tem sido observado um aumento do número de casos de indivíduos infectados em ambiente domiciliar e/ou lazer devido à arranhadura e/ou mordedura por gatos domésticos, levando a surtos familiares (Barros et al., 2010; Carlos et al., 2009; Schubach et al., 2008; Cordeiro et al., 2011). Em 2012 um estudo descreveu a ocorrência da epidemia de esporotricose humana em residentes de área urbana no Estado do Rio de Janeiro no período de 1997-2007 e foi observado que mil duzentos e vinte seis casos da doença relataram o trauma com gato como fonte de infecção (66,34%); entre esses, 965 casos (78,71%) estavam relacionados ao gato doméstico; 99 casos (8,07%), ao gato de rua e 162 casos (13,21%) não especificaram a procedência do animal (Silva et al., 2012). Freitas et al. (2014) ao realizarem uma retrospectiva dos casos de esporotricose registrados pelo IPEC-FIOCRUZ (Instituto de Pesquisa Clínica da Fundação Oswaldo Cruz) entre os anos de 1987 a 2013, observaram que neste período foram diagnosticados 3618 casos de esporotricose, sendo que 48 pacientes estavam co-infectados com HIV (Vírus da Imunodeficiência Adquirida). Atualmente, a dimensão da endemia de esporotricose no Estado do Rio de Janeiro é praticamente impossível de ser estimada porque além da falta de notificações, há pacientes em condições socioeconômicas bastante precárias que não buscam seus tratamentos e muito menos de seus animais. Além disso, há o costume de criar gatos para controle de ratos, descarte de animais doentes em terrenos abandonados, prática que culmina com o fechamento do ciclo de vida deste fungo com sua perpetuação na natureza e que evidencia total desconhecimento por parte da população em relação à transmissão e ao controle da esporotricose. Segundo Barros et al. (2010), é preciso orientar a população quanto aos riscos de transmissão e disseminação da infecção e educá-los quanto a posse responsável de animais domésticos, principalmente de felinos.

As manifestações clínicas da esporotricose podem depender de fatores como o tamanho do inóculo, da profundidade da inoculação traumática, da tolerância térmica da cepa e da condição imune do hospedeiro (Arrillaga-Moncrieff et al., 2009; Fernandes et al., 2013). As lesões costumam ser restritas à pele e aos vasos linfáticos adjacentes. Em raras ocasiões, pode se disseminar

para outros órgãos, ou ainda ser primariamente sistêmica resultante da inalação de esporos. As formas clínicas de esporotricose são classificadas em cutâneas (fixa ou localizada, linfática e disseminada) (Figura 3), mucosa e extracutânea ou sistêmica (pulmonar, ocular, hematógena, óssea e articular) (Appenzeller et al., 2006; Kong et al., 2006; Morris-Jones, 2002) (Figura 4).

A forma linfocutânea é a manifestação clínica mais frequente da esporotricose (cerca de 80% dos casos), que se inicia com uma lesão nodular ou ulcerada no local da inoculação fúngica e segue o trajeto linfático caracterizado por lesões nodulares que ulceram e fistulam (Bonifaz & Vazquez-Gonzalez, 2010). A forma cutânea fixa é caracterizada por lesões nodulares, ulceradas ou eritematosas localizadas no local da inoculação fúngica (Schechtman, 2010). A forma sistêmica pode envolver uma lesão cutânea inicial ou estar associada com a inalação de conídios no ambiente (Gutierrez-Galhardo et al., 2010). A forma mais severa desta doença em humanos está associada com pacientes imunocomprometidos, assim como pacientes HIV positivos, onde formas exóticas se manifestam (Galhardo et al., 2010; Freitas et al., 2014). A disseminação secundária para articulações, músculos e ossos é rara, assim como as manifestações viscerais da doença de origem respiratória (Lopes et al., 1999).

Geralmente, os sintomas da esporotricose só aparecem três semanas após a inoculação quando um nódulo subcutâneo se desenvolve no local onde o fungo foi inoculado, podendo ulcerar e se abrir. Quando o agente alcança a circulação linfática, há a formação de nódulos menores a partir da lesão primária que são distribuídos ao longo do trajeto linfático que ulceram liberando pus e, revelando um quadro de linfadenopatia (Lupi et al., 2005; Pang et al., 2004).



Figura 3. Manifestações clínicas da esporotricose humana. **(A-C)** Esporotricose cutânea fixa (Carrada, 2012; Saúl & Bonifaz, 2011; Song et al, 2011); **(D e E)** Esporotricose linfocutânea (García-Vargas et al., 2008); **(F-H)** Esporotricose disseminada (Carrada, 2011; Schechtman et al., 2011; Tang et al., 2012).



Figura 4. Manifestações extracutâneas da esporotricose humana. **(A)** Esporotricose pulmonar (Carrada, 2012); **(B)** Esporotricose articular (monoartrite) (Xavier et al., 2013); **(C)** Esporotricose hematogênica (Vega-Morquecho et al., 2002); **(D)** Esporotricose ocular (de Abreu Ribeiro et al., 2010); **(E)** Esporotricose osteoarticular (Carrada, 2012).

A esporotricose felina apresenta um amplo espectro clínico, variando desde uma infecção subclínica, que pode evoluir para lesão cutânea única ou formas múltiplas, acompanhadas ou não de sinais extracutâneos (respiratório) e envolvimento sistêmico fatal. Nódulos subcutâneos e úlceras são as lesões cutâneas mais frequentes nos gatos doentes e podem ser encontrados geralmente na região cefálica e nos membros (Gremião et al., 2009) (Figura 5).

Embora a esporotricose seja pouco frequente em cães, vários casos já foram diagnosticados nas regiões Sul (Schubach & Schubach, 2000; Madrid et al., 2007; Matos et al., 2012; Guterres et al., 2014) e Sudeste do Brasil (Souza et al., 2009). Na região Sudeste, mais de 44 casos foram descritos entre 1998 e 2006 no Rio de Janeiro (Souza et al., 2006; Schubach et al., 2006). Nesta espécie, a forma cutânea é a mais relatada, caracterizada por nódulos firmes e múltiplos, lesões ulceradas com bordas elevadas ou crostosas, áreas alopecias principalmente no tronco, na cabeça, nas orelhas e no plano nasal (Scoot et al., 1996; Souza et al., 2009). Os nódulos ainda podem ulcerar ou desenvolver trajetos drenantes. Existe também a forma linfocutânea, com nódulos na face distal de um membro e infecção ascendente via linfática. A forma disseminada ocorre com pouca frequência em animais imunocompetentes e é caracterizada por letargia, febre, anorexia além da formação de nódulos (Muller & Kirk, 1996; Whittemore & Webb, 2007) (Figura 5).



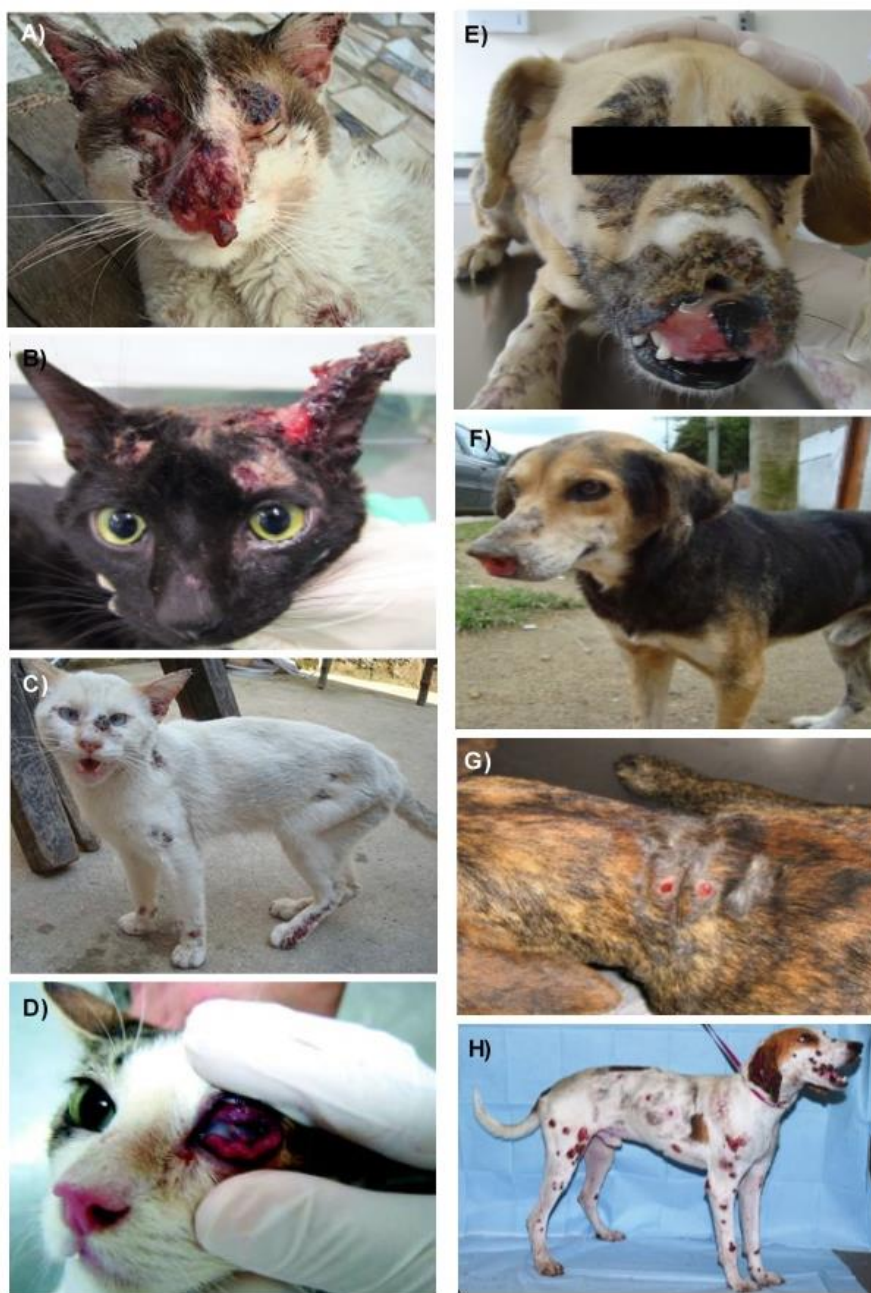


Figura 5. Manifestações clínicas da esporotricose nas espécies felina (A-D) e canina (E-H). (Borges et al., 2013; Torres da Silva et al., 2008; Souza et al., 2009; Guterres et al., 2014; Filgueira, 2009).



### 2.3 Fatores de Patogenicidade

Os fatores de patogenicidade são responsáveis pelo aumento da virulência de um agente microbiano durante a infecção e por isso a origem destes mecanismos tem sido alvo de vários estudos. Microrganismos em geral, quando em contato com o solo adquirem condições que facilitam sua sobrevivência e conseqüentemente aumentam seu poder de infecção e virulência (Casadevall, 2006). Estudos demonstraram que fatores como dimorfismo, termotolerância, enzimas extracelulares, componentes da parede celular e presença de melanina estejam envolvidos na patogenicidade de *S. schenckii* (Barros et al., 2010). Foi descrito que isolados incapazes de crescer a temperaturas superiores a 35-37°C estariam associados à forma cutânea da micose, enquanto que os mais termotolerantes estariam aptos a se desenvolver nos órgãos internos, desenvolvendo a forma sistêmica da esporotricose (Kong et al., 2006; Kaufman, 1999).

O dimorfismo fúngico é comum em espécies que causam enfermidades em humanos e em outros animais. Muitos desses organismos crescem como hifas fora de seus hospedeiros, mas assumem uma forma leveduriforme dentro dos mesmos. *S. schenckii*, *P. brasiliensis*, *F. pedrosoi*, *C. neoformans* e *W. dermatitidis* são fungos dimórficos que alteram sua morfologia de acordo com a temperatura, formando colônias filamentosas em temperatura ambiente (25°C) e mudando para a forma leveduriforme, geralmente relacionada ao parasitismo, com o aumento da temperatura para 37°C.

As melaninas são polímeros hidrofóbicos de alto peso molecular, carregados negativamente, formadas através da polimerização oxidativa de compostos fenólicos e indólicos (Nosanchuk & Casadevall, 2006; Gomez et al., 2003). São produzidas por animais, plantas e por diferentes microrganismos presentes na natureza e têm sido descritas como um importante fator de virulência de fungos patogênicos (Franzen et al., 2008). Podem apresentar coloração marrom-escuro ou negra, são insolúveis em água, ácidos e solventes orgânicos (Butler & Day, 1998) e susceptíveis a agentes oxidantes (Nosanchuk & Casadevall, 2006). Sua síntese em fungos pode ocorrer a partir de dois

precursores: dihidroxifenilalanina, chamada de melanina-dopa produzida pela via polifenoloxidase (ou lacases e tirosinases) e a melanina dihidroxinaftaleno chamada de melanina-DHN produzida pela via penta-acetato (Einseman & Casadevall, 2011).

Para a síntese da melanina do tipo DHN, as moléculas precursoras, acetil-CoA ou malonil CoA redutase, são produzidas endogenamente. Isso significa que o fungo utiliza moléculas comuns que alimentam vias metabólicas essenciais como a glicólise e vias das pentoses. O primeiro passo, é a formação de 1,3,6,8-tetrahidroxinaftaleno (1,3,6,8-THN) que é catalisada pela policetideo-sintase (PKS), seguida por uma série de reações de redução e desidratação que geram os intermediários scitalone, 1,3,8-tri-hidroxinaftaleno, vermelone, e o 1,8-dihidroxinaftaleno (DHN) e, finalmente, a polimerização deste último leva à formação da melanina. As vias de redução podem ser inibidas pelo triciclazol (5-metil-1,2,4-triazol[3,4-b]benzotiazol) (Langfelder et al., 2003; Mares et al., 2004; Pihet et al., 2009).

Para a síntese da melanina DOPA há duas opções de pontos de partida: L-DOPA (L-3,4-dihidroxifenilalanina) ou tirosina. Quando L-DOPA é a molécula precursora, esta é oxidada para dopaquinona pela enzima lacase. Quando a tirosina é o precursor, ela é convertida primeiro em L-DOPA e, em seguida, em dopaquinona. A mesma enzima, a tirosinase, realiza as duas etapas. Então, depois de uma série de reações de ciclização, oxidação, tautomerização e polimerização, a eumelanina é produzida (Langfelder et al., 2003). Esta via pode ser inibida pelo glifosato (Nosanchuk et al., 2001).

Vale ressaltar que ambas as vias de síntese de melanina podem ser encontradas em ascomicetos como os fungos como *Sporothrix schenckii*, *Aspergillus fumigatus* e outros (Almeida-Paes et al. 2009). Enquanto que em basidiomicetos, como o fungo *C. neoformans*, o pigmento é produzido exclusivamente pela via L-DOPA. O fato de *C. neoformans* produzir melanina apenas pela via L-DOPA combinada com a dependência absoluta de substratos exógenos para a síntese deste pigmento fez deste fungo um importante “organismo sistema” para o estudo da melanização fúngica (Einseman & Casadevall, 2011).

No geral, as melaninas conferem resistência à célula fúngica frente às células efectoras do sistema imune reduzindo o processo fagocítico, a proteção contra derivados reativos de oxigênio e nitrogênio, e contra enzimas hidrolíticas como quitinase e glucanases (Nosanchuk & Casadevall, 2003; Jacobson, 2000; Romero-Martinez et al., 2000). Romero-Martinez et al. (2000) demonstraram que a síntese de pigmentos semelhantes à melanina em *S. schenckii* ocorre pela via 1,8-DHN penta-acetato 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 susceptíveis à fagocitose. Observações ultraestruturais demonstraram que *S. schenckii* sintetiza este pigmento na forma leveduriforme (37°C) favorecendo a infecção e na forma filamentosas, onde conídios pigmentados (25 °C) perdem sua camada de melanina durante sua fase de transição (Madrid, 2007). Esses pigmentos normalmente estão localizados na parede da célula fúngica ou no entorno da parede através de grânulos eletrondensos associados à matriz fibrilar (Lane et al., 1969; Romero-Martinez et al., 2000; Jacobson, 2000; Langfelder al., 2003). Outros fungos como *F. pedrosoi* sintetizam a melanina no interior da membrana em estruturas conhecidas como melanossomas (Franzen et al., 2008; Alviano et al., 1991).

Em pesquisas realizadas por Bocca et al (2006) foi demonstrado que a melanina produzida pelo fungo *Fonsecaea pedrosoi* inibiu a produção de óxido nítrico por macrófagos, demonstrando a importância da melanização na modulação da resposta imune do hospedeiro. A produção de melanina *in vitro* e *in vivo* também foi demonstrada em outros fungos dimórficos patogênicos de humanos, como *Blastomyces dermatitidis* (Nosanchuk et al., 2004), *P. brasiliensis* (Gomez et al., 2001), *Penicillium marneffeii* (Youngchim et al., 2005), *Histoplasma capsulatum* (Nosanchuk et al., 2002) e *Coccidioides posadasii* (Nosanchuk & Casadevall, 2006).

Devido à complexidade, dificuldade de isolamento, extração e diversidade das melaninas, sua exata composição estrutural ainda permanece desconhecida (Almeida-Paes et al., 2009; Franzen et al., 2008; Nosanchuk & Casadevall, 2006). A detecção de pigmentos semelhantes à melanina em células fúngicas de *P. brasiliensis*, *F. pedrosoi*, *C. neoformans* e *S. schenckii* já foram analisadas por

ressonância paramagnética eletrônica (EPR), onde foi demonstrado que estas partículas produziram um sinal em formato sigmoidal indicando a presença de radicais livres com intensidades dependentes de sua capacidade melanogênica (Almeida-Paes et al., 2012; 2009; Nosanchuk et al., 2001). Além da EPR, outras técnicas como Infravermelho, ressonância magnética nuclear (RMN) e difração de Raio-X têm sido utilizadas na tentativa de decifrar a completa estrutura deste pigmento (Zhong et al., 2008; Cunha et al., 2010; Bridelli e Crippa, 2010; Chatterjee et al., 2012).

A habilidade da melanina se ligar a metais de transição e se livrar dos radicais livres confere ao fungo um importante mecanismo de escape das defesas do hospedeiro (Langfelder et al., 2003; Jacobson, 2000). O ferro é essencial para as reações de óxido-redução (Byers & Arceneaux, 1998) e tem sido descrito como um constituinte essencial da melanina fúngica e responsável por oferecer proteção contra mecanismos oxidativos (Henson et al., 1999). Em *C. neoformans*, foi observado que pequenas concentrações de ferro e cobre no meio de crescimento podem influenciar na expressão de genes regulados por TUP1 tanto para a produção de cápsula, importante fator de virulência deste fungo, quanto para a manutenção da homeostase cobre/ferro (Lee et al., 2009). A importância da homeostase do cobre em *C. neoformans* é sugerida pela dependência deste metal como cofator pelas enzimas superóxido-dismutase Cu/Zn e laccase, uma enzima chave para a produção de melanina (Lee et al., 2009; Cox et al., 2003; Salas et al., 1996).

A relação do pigmento com substâncias antifúngicas ainda não está bem elucidada. Estudos realizados com os fungos *H. capsulatum*, *P. brasiliensis* e *C. neoformans* mostraram que a melanina proporcionou resistência à ação da anfotericina B e à caspofungina pela diminuição da permeabilidade celular ao antifúngico ou escapando da ação dos radicais livres (Silva et al., 2006; Van Dium et al., 2002), enquanto que no fungo *Wangiella dermatitidis*, a presença do pigmento não influenciou na sua susceptibilidade ao antifúngico. Outro trabalho realizado com *C. neoformans* demonstrou que a presença do pigmento neste

microrganismo protegeu as células frente ao fluconazol, itraconazol e flucitosina (Nosanchuk & Casadevall, 2003; Jacobson, 2000).

A urease é uma metaloenzima que catalisa a hidrólise de ureia à amônia e ao carbamato, que em condições fisiológicas, provoca o aumento do pH. A importância desta enzima como fator de virulência foi demonstrada nos fungos *C. neoformans*, *Coccidioides immitis*, *H. capsulatum*, *S. schenckii* e espécies de *Trichosporon* e *Aspergillus* (Cox et al., 2000). Foi observado que a atividade da urease está relacionada com a patogênese da criptococose, mas essa atividade pode ser espécie-específica, porque a presença de urease somente corroborou com a infecção quando testada em modelo murino. Em 2004, Olszewsk et al. observaram que ao inocular *C. neoformans* via endovenosa em camundongos selvagens, mutantes ou reconstituídos para o gene urease, a disseminação do fungo *C. neoformans* para o cérebro foi mais branda no mutante do que para os demais, sugerindo que esta enzima facilita a invasão do fungo no sistema nervoso dependendo da via de inoculação, pois quando o fungo foi inoculado diretamente no cérebro não foi observado diferenças na colonização deste órgão.

## **2.4 Tratamento da esporotricose**

Os fármacos antifúngicos utilizados para o tratamento da esporotricose humana compreendem iodeto de potássio, anfotericina B, itraconazol, terbinafina e fluconazol. A escolha terapêutica é dependente da forma clínica, da extensão das lesões cutâneas, dos efeitos colaterais e do envolvimento sistêmico da micose (Schubach et al., 2006; Nobre et al., 2002b). O tratamento pode ser difícil, principalmente devido à adesão do paciente ao tratamento de longa duração, mas também devido ao custo dos medicamentos. Iodeto de potássio, agentes antifúngicos como cetoconazol, itraconazol, anfotericina B, terbinafina, terapia térmica local e cirurgias para a remoção das lesões são as opções de tratamento disponíveis para os gatos com esporotricose (Pereira et al., 2009). Mas, a prescrição dos tratamentos representa um desafio para os veterinários, já que as

opções terapêuticas são limitadas e os fármacos apresentam efeitos adversos como nefrotoxicidade (Barros et al., 2004; Welsh, 2003).

O iodeto de potássio em solução saturada foi um dos primeiros e o mais tradicional tratamento utilizado na terapia da esporotricose desde 1907 por De Beurmann (Yamada et al., 2011) com comprovada eficácia contra as formas cutânea fixa e linfocutânea da doença (Bustamante & Campos, 2004; Lopes-Bezerra et al., 2006; Kauffman et al., 2007). Representa até o momento uma das primeiras alternativas de escolha para o tratamento, especialmente quando os recursos são limitados (Xue & Li, 2009), mas seu mecanismo de ação ainda é desconhecido. Embora seu uso seja restrito devido a vários efeitos colaterais como o iodismo caracterizado por vômitos, anorexia, depressão, icterícia, tremores, corrimento nasal e ocular, hipotermia e insuficiência cardíaca (Cruz, 2013), principalmente na espécie felina (Coskun et al., 2004), outros autores acreditam que estes efeitos ocorrem com baixa frequência e que as desvantagens do uso de iodeto de potássio estão relacionadas com a superdosagem, o tempo de tratamento e a eficácia limitada contra a forma sistêmica (Yamada et al., 2011). Por esse motivo, em casos de resistência frente ao itraconazol, o iodeto de potássio vem sendo reconsiderado para o uso nos felinos em doses de 20mg/animal/dia (Cruz, 2013).

Devido às suas propriedades farmacológicas, o itraconazol vem sendo amplamente empregado na terapêutica das micoses superficiais e sistêmicas inclusive em pacientes imunocomprometidos. O itraconazol pertence à classe dos azóis, sendo um triazol com capacidade de inibir a 14 $\alpha$ -demetilação da molécula de lanosterol através da interação com a enzima C14  $\alpha$ -lanosterol demetilase. Sua atividade é fungistática e consiste em alterar a permeabilidade da membrana plasmática pela inibição da síntese de ergosterol e impedindo a replicação do fungo (Odds et al., 2003). O itraconazol tem demonstrado ser bastante eficaz no tratamento da esporotricose humana nas diferentes formas da doença, e em animais, principalmente em felinos, e é, portanto, o fármaco eleito de primeira escolha para o tratamento desta micose em humanos e em animais (Freitas et al., 2010; Pereira et al., 2010), especialmente em situações onde o custo não é um obstáculo para a continuidade do tratamento (Morris-Jones, 2002). No entanto,

seu uso de forma indiscriminada tem resultado no surgimento de isolados resistentes e conseqüentemente eventos de falha terapêutica e recidivas da doença foram observados em animais e humanos (Rochette et al., 2003; Schubach et al., 2004a; Antunes et al., 2009; Gremião et al., 2009, 2011; Guterres et al., 2014).

Para a esporotricose, o fármaco demonstrou boa atividade em estudos *in vitro* e *in vivo*, em pacientes apresentando as formas cutâneas, linfocutâneas e extracutâneas da micose em doses variando de 100 a 400mg/dia (Ávila-Antunes et al., 2009; Alvarado-Ramirez & Torres-Rodriguez, 2007; Meinerez et al., 2007a; Bustamante & Campos, 2004). Porém, em alguns casos a resposta clínica não é satisfatória, embora o tratamento tenha provada eficácia em gatos (Schubach et al., 2004; Pereira et al., 2008).

A terbinafina, é um antifúngico do grupo das alilaminas e seu mecanismo de ação ocorre através da inibição da enzima esqualeno epoxidase da via de síntese do ergosterol. Por inibir um passo inicial nesta via biossintética, muitas vezes provoca efeito fungicida decorrente da depleção do ergosterol da membrana e acúmulo do esqualeno pela célula fúngica (Odds et al., 2003). Esse antifúngico tem sido considerado uma alternativa para o tratamento da esporotricose. Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram boa atividade da terbinafina frente ao *S. schenckii*, assim como boa tolerabilidade de ação no tratamento da esporotricose cutânea e linfocutânea (Silveira, et al., 2009; Meinerz et al., 2007a; Kholer et al., 2006; Trilles et al., 2005). Em contrapartida, este fármaco mostrou-se pouco eficaz quando avaliado sobre ratos *Wistar* em modelo de esporotricose cutânea (Ávila-Antunes et al., 2009). Os principais efeitos colaterais descritos para terbinafina e itraconazol envolvem, principalmente, o sistema gastrointestinal, sendo os mais comumente relatados náuseas, vômitos, dor e desconforto abdominal. Devido aos fármacos serem metabolizados no fígado, podem ser observadas alterações nas enzimas hepáticas. Estudos demonstraram que a concentração hepática do itraconazol é até três vezes maior que os níveis plasmáticos, sendo recomendada a monitoração das enzimas hepáticas durante o tratamento com o fármaco (Catalán & Montejo, 2006; Meinerz et al., 2007a).

A anfotericina B, por sua vez, foi introduzida em 1956 e permanece sendo um fármaco muito utilizado para as formas sistêmicas da enfermidade e em casos de recidivas (Gremião et al., 2012). Pertence à classe dos poliênicos e o seu mecanismo de ação se dá através da sua ligação à molécula de ergosterol, provocando a desestabilização da membrana plasmática da célula fúngica e induz a formação de poros que podem causar o extravasamento do conteúdo celular (Odds et al., 2003). Mas, devido à sua toxicidade, principalmente renal, tem seu uso restrito nos animais domésticos. Anfotericina B tem sido indicada para o tratamento de progressão rápida ou sistêmica de micoses graves, como formas disseminadas da esporotricose (Peaston 1994), apesar de seu uso ser limitado por nefrotoxicidade (Erner & Werner, 1994). Relatórios sobre a aplicação da anfotericina B para o tratamento de esporotricose felina são escassos. A administração intravenosa de anfotericina B para o tratamento de gatos com esporotricose foi descrita em três casos, mas os resultados foram insatisfatórios (Nusbaum et al., 1983). Em casos de esporotricose felina refratária ao itraconazol, a administração subcutânea ou intralesional de anfotericina B combinada à administração oral de itraconazol pode ser uma alternativa (Gremião et al., 2009; Pereira et al., 2009; Gremião et al. 2012).

## **2.5 Modelo invertebrado de infecção e de seleção de compostos bioativos**

Os ensaios *in vivo* em modelo animal tratam-se de uma metodologia largamente adotada em estudos de interação parasita-hospedeiro, toxicológicos e de susceptibilidade aos antimicrobianos, pois é uma importante forma de detectar alterações bioquímicas e histológicas provocadas pela exposição do hospedeiro ao agente infeccioso e/ou validando a ação de um fármaco obtido inicialmente em testes *in vitro* e permitindo a determinação da dose letal destes fármacos candidatos (Chen et al., 2006). Porém, apesar destes ensaios permitirem a avaliação do efeito de novas moléculas em um contexto metabólico e fisiológico normal, apresentam algumas desvantagens, pois envolvem o manuseio e o sacrifício de vários animais.



Em pesquisas científicas, a utilização de animais de laboratório representa um dos dilemas mais conflitantes no debate bioético (Rezende et al., 2008). Em 1959, a publicação do livro “*Principles of Human Experimental Technique*”, expôs uma nova alternativa na utilização de animais para experimentação. Os autores estabeleceram o conceito dos três “Rs”: Replace (substituir), Reduce (reduzir) e Refine (refinar) com o objetivo de propor uma redução do número de animais utilizados em cada experimento, o refinamento das técnicas objetivando evitar a dor e o sofrimento desnecessários, e a substituição, do inglês replacement, por métodos alternativos deve ser imperativo. Ainda, o refinamento tecnológico na geração de modelos experimentais também tem levado à redução do número de animais/grupo experimental, por reduzir de maneira importante a variabilidade observada em cada experimento.

Desta forma, a reflexão sobre a necessidade de um modelo biológico e a relevância do estudo devem ser aspectos fundamentais para a decisão de um pesquisador realizar um projeto utilizando animais (Damy et al., 2010). Esse fato fez com que novas abordagens fossem exploradas pelos pesquisadores para suprir a demanda de ensaios *in vivo*, como por exemplo, o uso de organismos geneticamente conhecidos como *Artemia salina*, *Drosophilla melanogaster*, *Danio rerio* (zebrafish) e *Caenorhabditis elegans*, que têm sido utilizados como modelos de hospedeiros para vários patógenos caracterizando novos métodos de ensaios biológicos *in vivo* (Ségalat, 2007).

O nematoide de vida livre, especialmente *Caenorhabditis elegans*, constitui um modelo de infecção simples que pode ser letalmente infectado por diferentes patógenos de humanos e animais através da substituição da sua fonte de alimento usual (bactérias) pelo microrganismo patogênico de interesse (Breger et al., 2007; Moy, 2006; Sifri et al., 2005). Esse modelo também pode servir como instrumento de triagem para avaliar a toxicidade de uma gama de compostos *in vivo*. E, de acordo com o tempo de sobrevivência deste organismo infectado na presença dos compostos, pode-se estimar o mecanismo de ação deste novo candidato a agente antimicrobiano (Moy et al., 2006; Breger et al., 2007; Ségalat, 2007).

*C. elegans* é um nematoide de vida livre que pode ser encontrado no solo de diferentes regiões do mundo. Este verme alimenta-se de bactérias e possui um ciclo de vida de cerca de 3 dias sob condições apropriadas em laboratório. Podem ser encontrados como hermafroditas ou machos, medindo aproximadamente 1 mm de comprimento. Este nematoide possui um corpo plano e simples, consistindo de dois tubos cilíndricos e concêntricos. O tubo externo contém a hipoderme, o sistema nervoso, a musculatura e o sistema excretor-secretor, enquanto que o tubo interno inclui uma faringe bilobada, o trato intestinal e o ânus. O espaço fluido que separa os tubos é chamado de pseudoceloma, que contém as gônadas e age como esqueleto hidrostático para manter o formato do corpo. As barreiras físicas do verme incluem a faringe, que mecanicamente destrói os micróbios que normalmente fazem parte da dieta e uma cutícula que envolve todo o corpo do verme (Sifri et al., 2005) (Figura 6).

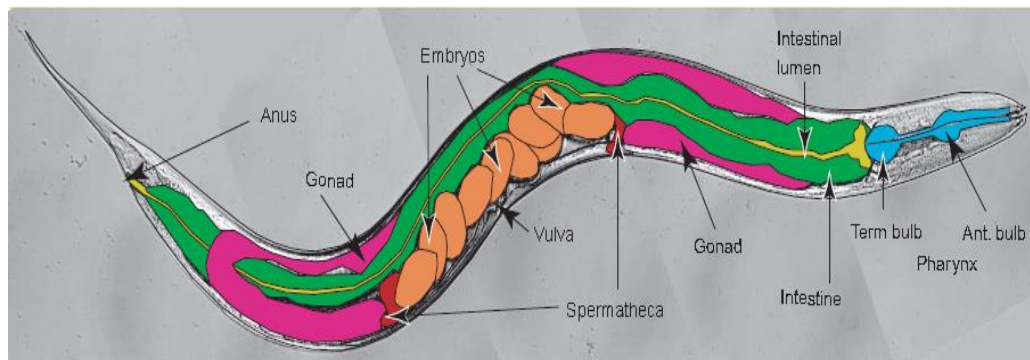


Figura 6. Características anatômicas básicas de *C. elegans* (Sifri et al., 2005).

Os micróbios patogênicos para o nematoide induzem danos celulares e são detectados por receptores específicos. Estes eventos são sinalizados por vias que levam à produção e liberação de moléculas de defesa. Como *C. elegans* não possui um sistema imunológico adaptativo, sua defesa imune se baseia exclusivamente no sistema imune inato, que é notavelmente preservado entre animais invertebrados e vertebrados. Sua defesa inata é composta de receptores que detectam agentes patogênicos através de uma complexa rede de vias de sinalização e moléculas efetoras (Bogaerts et al., 2010). Entre estes efetores

imunes estão uma variedade de peptídeos antimicrobianos (AMPs) e proteínas específicas como lectinas e lisozimas. Os AMPs são definidos como pequenas moléculas de baixo peso molecular, frequentemente contendo entre 10 e 150 aminoácidos e podem ser expressos constitutivamente ou induzidos por patógenos nos tecidos, assim como na faringe, no intestino ou na epiderme (Figura 7) (Ewbank & Jugasti, 2011; Bogaerts et al., 2010). Essas moléculas possuem atividade antimicrobiana natural devido à sua estrutura anfipática catiônica que facilita o rompimento das paredes de células aniônicas e de fosfolípidos das membranas de micróbios, embora outros mecanismos microbicidas também têm sido propostos (Bogaerts et al., 2010; Bulet et al, 2004; Brogden, 2005).

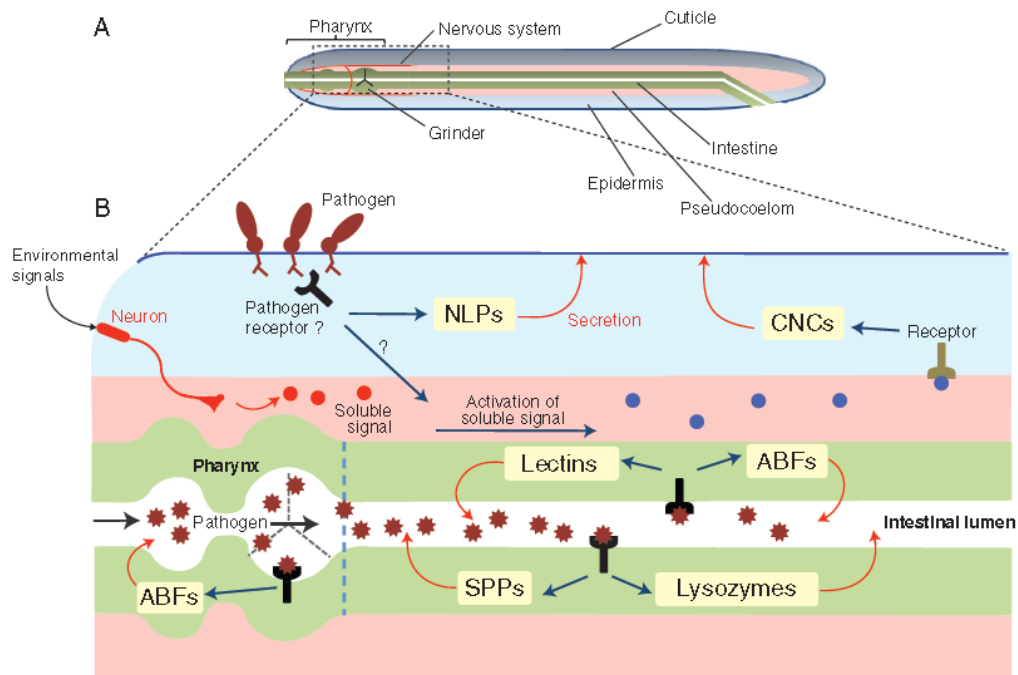


Figura 7. Defesas do corpo de *C. elegans*. Os micróbios induzem a produção de uma variedade de efetores da imunidade inata como peptídeos antimicrobianos (AMPs) específicos e proteínas (Ewbank & Jugasti, 2011).

Os patógenos de *C. elegans* usualmente utilizam duas principais rotas de infecção: através da faringe ou da epiderme. Muitas bactérias gram-negativas e positivas, bem como leveduras, infectam os vermes após a sua ingestão durante

a alimentação via colonização do trato alimentar, que é necessariamente o tecido mais vulnerável. Estes patógenos resistem à ação mecânica do triturador e sobrevivem a passagem através dele até atingir o lúmen intestinal, onde colonizam e estabelecem a infecção. Em outros casos, tem sido mostrado que o patógeno pode destruir o triturador, penetrar e se multiplicar dentro de células do hospedeiro, formar biofilme na cavidade bucal, secretar toxinas, invadir as células intestinais, colonizar o útero e se aderir à cutícula da região terminal do intestino e causar inflamação no reto (Sodehall, 2010).

*C. elegans* foi o primeiro microrganismo a ser utilizado como modelo nematoide para o estudo de neurobiologia por Sydney Brenner desde 1974 (Sengupta & Samuel, 2009; Brenner, 1974). Seu pequeno genoma e a facilidade de se cultivar em laboratório o tornaram apropriado para análises genéticas. A partir da utilização em estudos neurológicos e de desenvolvimento, *C. elegans* também tem sido utilizado como um hospedeiro modelo para patógenos oportunistas como as bactérias *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella entérica* e fungos como *C. neoformans* (Mylonakis et al., 2007) e *Candida albicans* (Breger et al., 2007).

As vantagens da utilização de *C. elegans* como modelo de hospedeiro para patógenos estão relacionadas ao tempo de duração dos experimentos, ao baixo custo quando comparado com os modelos mamíferos (Kurz & Ewbank, 2000), com a facilidade de manutenção em laboratório, facilidade de manipulação, mas, sobretudo às informações obtidas após seu sequenciamento genético que revelaram que este nematoide possui mecanismos biológicos conservados e sua alta homologia com o ser humano permite que informações obtidas a partir de sua manipulação também contribuam na descoberta acerca de algumas peculiaridades do genoma humano. No entanto, este nematoide possui uma limitação crucial que é sua incapacidade de sobreviver a temperaturas superiores a 25°C (Laws et al., 2005) e produzir progênes viáveis (Klass, 1977). Este fator determinante para o seu ciclo de vida acaba inviabilizando a avaliação de determinados mecanismos de virulência que somente são expressos por alguns patógenos quando em hospedeiro mamífero a 37°C podendo não ser expressos em *C. elegans* limitando, dessa forma, a descoberta de importantes fatores de

virulência. De acordo com Konkel & Tilly (2000), o fator temperatura é crucial para alguns patógenos bacterianos ativar a regulação de determinados genes de virulência.

*Panagrellus redivivus* é outro nematoide de vida livre encontrado no solo e tem sido demonstrado sua aplicação como fonte alternativa de alimento para larvas de peixes devido ao seu baixíssimo custo (Ricci et al., 2003) e em ensaios com fungos nematófagos visando o controle biológico de nematoides gastrintestinais (Paraud et al., 2005; Araújo et al., 2004). Em 2005, foi publicado o primeiro trabalho utilizando *P. redivivus* como modelo de infecção justificando que esse nematoide oferece a vantagem sobre o modelo *C. elegans* de sobreviver a 37°C proporcionando um melhor estudo de certos mecanismos de virulência causados por patógenos de animais ou humanos e prover informações sobre interação patógeno-hospedeiro que *C. elegans* não pode oferecer devido ao fator temperatura.

## **2.6 *Capsicum annuum* L.**

O gênero *Capsicum* pertence à ordem Solanales e à família Solanaceae e é popularmente conhecido por constituir as pimentas e os pimentões (Aggarwal et al. 2008; Moreira et al., 2006). Plantas deste gênero são arbustos típicos possuindo de 20 a 25 espécies, normalmente classificadas de acordo com o nível de domesticação (Figura 8). As pimentas já disseminadas pelos continentes são classificadas pelos botânicos em cinco espécies: *Capsicum baccatum*, *C. pubescens*, *C. annuum*, *C. chinense* e *C. frutescens*. Essas três últimas passaram a liderar a comercialização atual (Carvalho & Biachetti, 2004). No Brasil, os principais produtores de pimenta estão mais concentrados nas regiões Sudeste e Centro-Oeste, sendo a espécie *C. annuum* L. mais cultivada em São Paulo, Minas Gerais e Goiás (Pinto et al., 2006).

No início do século XXI, a produção de pimentas *Capsicum* no Brasil atingiu 40 mil toneladas anuais, em cerca de 2 mil hectares cultivados em quase todas as regiões do país. Os negócios de pimentas representam um expressivo

segmento do mercado agrícola brasileiro, com forte mercado para aplicações industriais dos setores alimentício, farmacêutico e cosmético (Carvalho et al., 2006; Souza & Rossi, 2014). As pimentas (*Capsicum* spp.) como habanero, pimenta de caiena, jalapeño e serrano, são boas fontes de diferentes compostos bioativos como a vitamina C, vitamina E, carotenoides e flavonoides, que desempenham um papel importante na saúde humana (Alvarez-Parrilha et al., 2011).

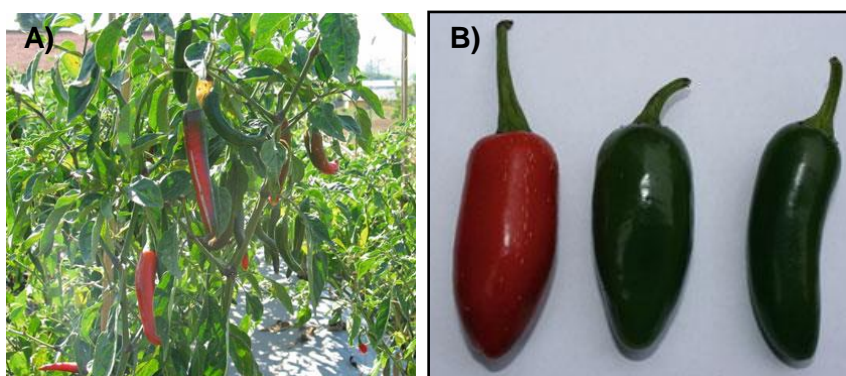


Figura 8. Pimentas da espécie *Capsicum annuum*. (A) Arbusto da espécie caiena; (B) pimenta da espécie jalapeño (Lim, 2013).

A pungência ou picância das pimentas deve-se à presença de amidas chamadas capsaicinoides, sendo que a capsaicina (8-metil-N-vanilil-1-6-nonamida) e diidrocapsaicina representam cerca de 90% dos capsaicinoides comumente encontrados nestas espécies. Tais compostos se acumulam na vesícula da epiderme, na parte interna dos frutos e nas sementes em níveis que variam com o genótipo, a maturidade e as condições de crescimento, sendo liberados naturalmente quando o fruto sofre algum dano físico e reduzidos após etapas de processamento (Zewde & Bosland, 2001; Reifschneider, 2000; Salazar-Olivo & Silva-Ortega, 2004). Os capsaicinoides são biossintetizados através da convergência de duas vias metabólicas: a via fenilpropanoide e a via dos ácidos graxos de cadeia ramificada que utilizam como precursores a fenilalanina e a valina ou leucina, respectivamente (Aza-González et al., 2011). O processo de síntese da capsaicina é catalisado pela enzima capsaicina sintase através da

condensação da vanilamina (Figura 9) (Prasad et al, 2006). Estes compostos conferem pungência aos frutos e às sementes e também correspondem aos principais agentes terapêuticos naturais com ação anestésica, analgésica e também atuam como psicoestimulantes e neurodepressores (Souza & Rossi, 2014). Além disso, os capsaicinoides são substâncias que causam irritação para os mamíferos, incluindo os humanos, e produzem sensação de queimação quando em contato com a pele (Perucka & Materska, 2001). Uma formulação de oleorresina *in natura* de pimenta é usada em sprays ou bombas de efeito moral contendo óleos sintéticos que dificultam a remoção do produto. O gás de pimenta atua nas mucosas de olhos, nariz e boca causando irritação, ardor e sensação de pânico (Vesaluoma et al., 2000).

Extratos de *Capsicum*, capsaicinoides e carotenoides já demonstraram atividade antimicrobiana, antioxidante e anticâncer suprimindo o crescimento de várias células tumorais humanas, incluindo leucêmicas (Zhang et al., 2003), gástrica (Kim et al., 1997), hepática (Jung et al., 2001), glioma (Qiao et al., 2005), e de próstata (Mori et al., 2006).

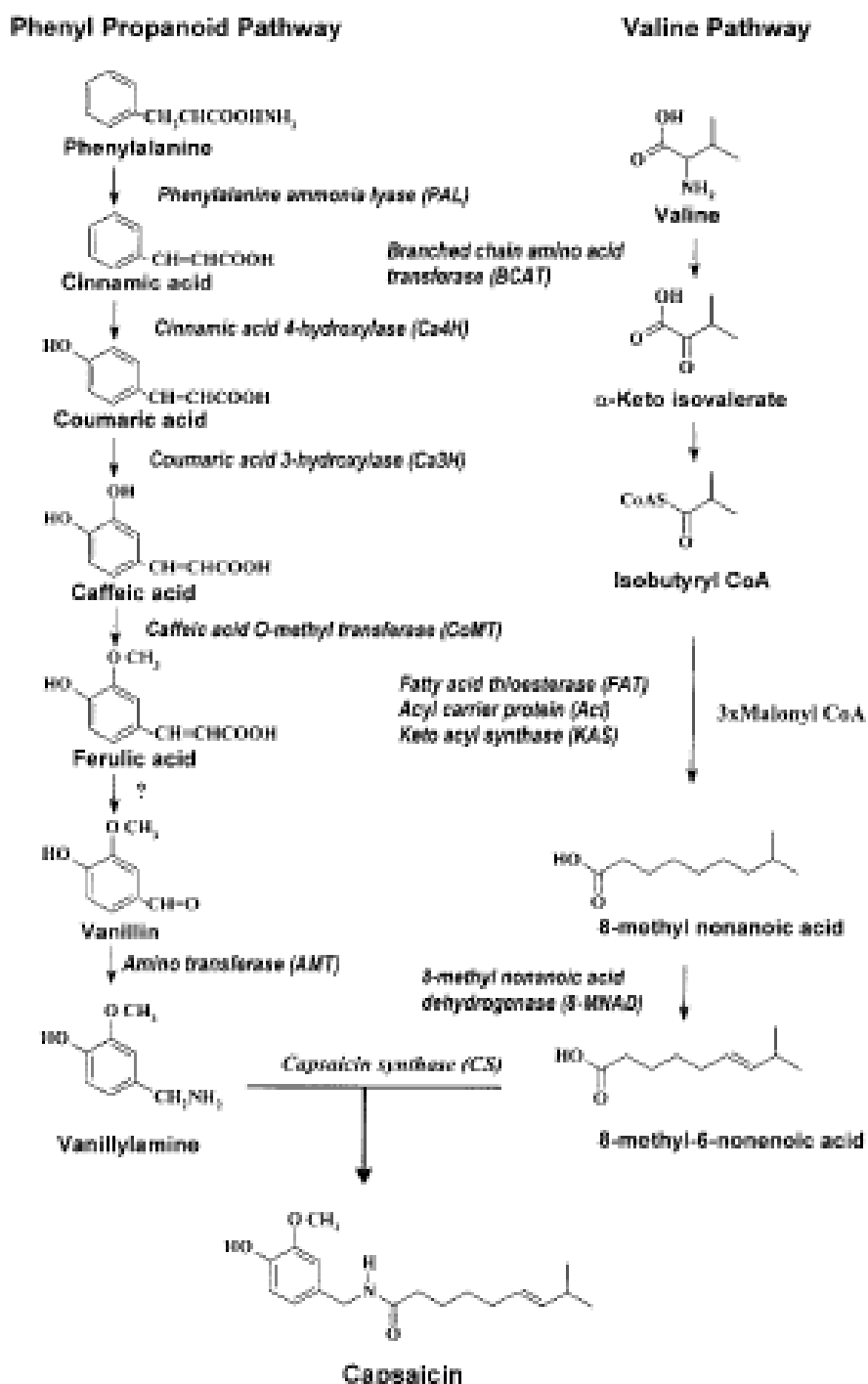


Figura 9. Via biossintética da capsaicina. (PAL, fenilalanina amônia liase; Ca4H, ácido cinâmico 4 hidroxilase; Ca3H, ácido cumárico 3 hidroxilase; CoMT, Ácido cafeico O metiltransferase; pAMT, amino transferase putativo; CS, capsaicina sintase; KAS, ceto acil sintase) (Prasad et al., 2006).



## 2.7 Heteropoliácidos (HPAs)

Os polioxometalatos (POMs) são aglomerados aniônicos metal-óxido que compreendem uma classe versátil de compostos inorgânicos que possuem uma variedade de estruturas, tamanhos, combinações de metais, possuindo atividade eletroquímica e alta solubilidade (Miras et al., 2012; Tan et al., 2012; Yamase, 2005; Tsigdinos, 1978). Estas estruturas podem conter ou não heteroátomos, o que divide esta classe de compostos em dois grupos: (1) os isopoliânions de fórmula  $(M_mO_y)^x$  e (2) heteropoliânions de fórmula  $(X_nM_mO_y)^x$  (Maksimov, 1995). Esta última classe pode ser dividida em heteropoliácido (forma ácida) e heteropolissais (ou sais de heteropoliácidos).

Os HPAs tipo Keggin são compostos ácidos, constituídos por ânions polioxometalatos, que correspondem a octaedros de metal-oxigênio ( $MO_6$ ) ligados a um heteroátomo de silício (Si), fósforo (P), germânio (Ge) ou selênio (Sn), sendo os átomos de Si e P os mais utilizados. Quatro tríades partilham um octaedro de metais de transição ( $4M_3O_{10}$ ) e estão ao redor do tetraedro central, seguindo a fórmula genérica  $H_n [XM_{12}O_{40}]$ , onde M é o metal de transição em seu maior estado de oxidação, usualmente de molibdênio (Mo) (VI), tungstênio (W) (VI), vanádio (V) ou uma mistura destes metais em diferentes proporções (Bennardi et al., 2010) (Figura 10).

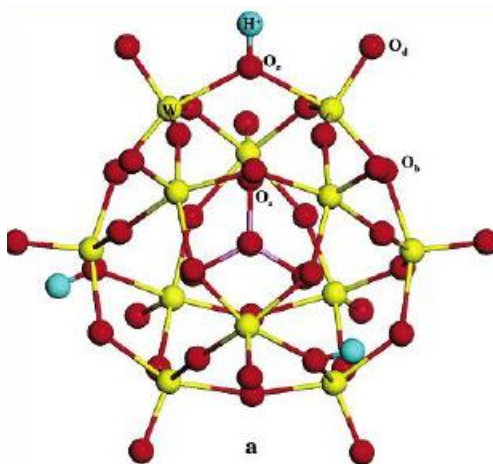


Figura 10. Estrutura molecular do HPA com estrutura de Keggin.

Mesmo mantendo a sua estrutura, é possível alterar as propriedades físicas e químicas dos HPAs, alterando seus elementos constituintes, o que amplia a gama de aplicações destes compostos (Bennardi et al., 2010; Sathicq et al., 2008). 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).

O maior campo de aplicação dos HPAs é no processo catalítico de várias reações orgânicas (Heravi & Sadjadi, 2009) como oxidação seletiva (Timofeeva, 2004), incluindo a síntese de imidazoles (Rafiee et al., 2011; Sadjadi et al., 2009a), flavonas (Bennardi et al., 2011), hidrazonas (Sadjadi et al., 2009b) e cumarinas (Romanelli et al., 2004). Os POMs foram primeiramente relatados em 1972 na França quando o polioxotungstato  $[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]^{4-}$  exibiu atividade contra vários vírus DNA e RNA *in vitro* e *in vivo* (Tan et al., 2012; Raybaud et al., 1972; Jasmin et al., 1973; Haapala et al., 1973). POMs com estrutura de Keggin têm uma longa história de uso como antiviral (Liu et al., 2008; Liu et al., 2004; Take et al., 1991). O HPA PM-19 ( $[\text{K}_7\text{PTi}_2\text{W}_{10}\text{O}_{40}]$ ) foi relatado ser o mais potente inibidor *in vitro* da replicação do vírus da imunodeficiência humana (HIV), da herpes simplex (HSV), do citomegalovírus humano (HCMV) e contra o vírus *Herpes simplex* tipo 2 em uma concentração não citotóxica, exibindo atividade superior ao aciclovir em camundongos (Ikeda et al., 1993). Além disso, outros heteropolioxotungstatos também tiveram suas atividades biológicas testadas (Inoue et al., 1990; Fukuma et al., 1991; Take et al., 1991; Ikeda et al., 1993).

Diversos HPAs apresentaram potente ação contra células tumorais (Zhai et al., 2008; Yanagie et al., 2006). O uso combinado dos HPAs  $\text{H}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$  e  $\text{H}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$  com cafeína alterou o crescimento de células do carcinoma intestinal em quatro pacientes (Reynaud, 1971; Mukherjee et al., 1998; Hill, 1998). O polioxometalato dimérico  $\text{Na}_5\text{K}_7\{[\beta\text{-SiCo}_2\text{W}_{10}\text{O}_{36}(\text{OH})_2(\text{H}_2\text{O})]_2\} \cdot 39.5\text{H}_2\text{O}$  exibiu atividade antitumor *in vitro* sobre células de câncer de fígado e ovário (Tan et al., 2012). Também tem sido mostrado um potente efeito sinérgico dos HPAs com antibióticos  $\beta$ -lactâmicos contra *S. aureus* resistentes à meticilina e vancomicina (MRSA e VRSA) (Inoue et al., 2006a; Inoue et al., 2006b; Yamase et al., 1996).

Em 2007, Curticãpean et al., avaliaram a sensibilidade de algumas bactérias gram-negativas e gram-positivas e de fungo para a ação do fosfotungstato de sódio ( $\beta\text{-Na}_6[\text{P}_2\text{W}_{18}\text{O}_{62}]\cdot 18\text{H}_2\text{O}$ ) utilizando métodos qualitativos e quantitativos, mas somente as bactérias foram sensíveis ao POM testado.

## 2.8 Complexos de Coordenação

Complexos de coordenação são substâncias que possuem íons metálicos em sua estrutura. Esses complexos contêm íons metálicos ligados a vários ânions ou moléculas chamadas de ligantes. O átomo do ligante que se liga ao íon metálico é o átomo doador e o número de átomos doadores ligados ao íon metálico corresponde ao número de coordenação deste íon (Brown et al., 2005). Atualmente muitos compostos de coordenação têm sido sintetizados com o objetivo de simularem a ação de nucleases naturais com diferentes aplicações.

O desenvolvimento de substâncias antitumorais baseadas em metais foi estimulado pelo sucesso clínico do composto de coordenação cisdiaminodicloroplatina (II) ( $\text{cis-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$ , cisplatina) e seus análogos (Brabec, 2002). Com a descoberta de que este composto 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.

Vários complexos de coordenação têm demonstrado atividade biológica sobre células tumorais, fungos e bactérias patogênicas. Os complexos de platina são importantes no desenvolvimento de substâncias anticancerígenas. Em 2010 foi investigada a atividade antitumoral de complexos de platina com derivados de cloreto e etilenodiamina e foi observado que o tamanho da cadeia carbônica interferiria na citotoxicidade dos compostos, sendo o complexo contendo oxalato menos tóxico do que seus análogos com cloretos (Silva et al., 2010).

O efeito da complexação de metais sobre alguns agentes antimicrobianos tem sido mencionado na literatura. As tetraciclinas, por exemplo, perdem sua atividade antimicrobiana quando coordenadas com metais (Brandelli et al., 2004; Chopra et al., 1991), enquanto que testes de suscetibilidade antimicrobiana revelaram que o composto 5-amino-8-hidroxi-1,4-naftoquinona complexado ao níquel potencializou sua atividade contra as bactérias gram-positivas *S. aureus*, *Streptococcus uberis* e *Bacillus cereus* do que frente às bactérias gram-negativas *E. coli*, *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas fluorescens* (Brandelli et al., 2004).

Com relação às estratégias utilizadas para contornar o mecanismo da resistência, a coordenação de metais a antibióticos foi uma estratégia de reversão da resistência, além de servir como uma plataforma para a produção de novos fármacos. Com isso, vários grupos de pesquisa têm demonstrado que complexos metálicos contendo antibióticos são frequentemente mais ativos do que o fármaco livre e, em alguns casos, os complexos possuem mais propriedades terapêuticas do que o antibiótico não coordenado ao metal. O envolvimento destes compostos na medicina, principalmente aqueles contendo metais de transição, foi muito limitado até 1965, quando houve a clássica demonstração da atividade antitumoral da cisplatina,  $[PtCl_2(NH_3)_2]$ , por Rosenberg (Cohen, 2007) contra câncer de ovário e testículo. Devido ao sucesso dos compostos de platina no tratamento do câncer, muitos pesquisadores têm direcionado esforços no sentido de desenvolver novos fármacos à base de metais e, como consequência, atualmente há vários compostos inorgânicos sendo utilizados na clínica médica, dentre os quais pode citar os complexos de ouro, empregados no tratamento da artrite reumatoide; o nitroprussiato de sódio, um complexo de ferro(III) eficaz no tratamento da hipertensão; o carbonato de lítio, que tem ação antidepressiva; a sulfadiazina de prata, que previne e trata infecções em pacientes queimados e os compostos de bismuto utilizados na erradicação do *Helicobacter pylori* (Cohen, 2007). Outros exemplos importantes são os complexos de gadolínio(III), utilizados como agentes de contraste em ressonância magnética e os de tecnécio-99, usados na obtenção de imagens cardiovasculares (Zhang & Lippard, 2003).

A coordenação de metais às moléculas orgânicas representa um potencial considerável para aumentar o arsenal de fármacos disponíveis para tratamento de

uma série de enfermidades. A interação entre um íon metálico e um ligante dá a possibilidade de obter compostos com ampla variedade de números de coordenação, estados de oxidação e geometrias. Além disso, as características intrínsecas ao íon metálico adicionadas aos aspectos cinéticos e termodinâmicos do composto obtido, permitem obter estruturas moleculares que possuem um amplo espectro de reatividade (Rocha et al., 2011).

### **3. Justificativa**

O aumento de indivíduos imunodeprimidos e a limitação de agentes antifúngicos devido a ocorrência de toxicidade e desenvolvimento de resistência estão se tornando cada vez mais comuns na prática clínica. Encontrar novos agentes que não sejam reconhecidos pelos mecanismos de defesa microbiano, além de ser extremamente desafiador, é muito importante devido à crescente emergência em descobrir alternativas para combater as infecções. Tendo em vista o potencial dos capsaicinoides e dos compostos metálicos como agentes quimioterápicos contra células leucêmicas e cancerígenas, suas propriedades biológicas devem continuar sendo exploradas e aplicadas frente a patógenos de caráter zoonótico como o fungo *Sporothrix* spp. Assim, estudos de susceptibilidade de novos compostos, bem como informações sobre as alterações morfológicas e fatores de patogenicidade resultantes de sua interação com o fungo *Sporothrix* spp. podem contribuir para a descoberta de novos agentes antifúngicos eficazes para o tratamento da esporotricose em animais, especialmente os de criação, que representam um risco aos seus proprietários e às crianças, os quais são o principal alvo para a doença em regiões economicamente menos favorecidas, devido aos hábitos higiênicos e às precárias condições de vida.

## 4. Objetivos

### 4.1 Objetivo Geral

Estudar o efeito do extrato etanólico de *Capsicum annuum L.* e análogos sintéticos da capsaicina e de moléculas sintéticas como sais de heteropoliácidos de prata e complexos de coordenação com ferro e cobre sobre o crescimento, viabilidade e a ultraestrutura de *Sporothrix* spp. nas suas formas leveduriforme e micelial e a influência destas substâncias sobre o processo de melanização fúngica durante o crescimento *in vitro* e durante a infecção *in vivo* utilizando o nematóide de vida livre como modelo de infecção.

### 4.2 Objetivos Específicos

- Investigar a susceptibilidade de isolados de *Sporothrix schenckii* e spp. nas formas filamentosa e leveduriforme frente a: (i) antifúngicos comerciais; (ii) extrato etanólico de *Capsicum annuum L.*; (iii) análogos da capsaicina; (iv) sais de heteropoliácidos de prata; (v) complexos de coordenação com cobre e ferro e seus ligantes livres pelo teste de microdiluição em meio líquido de acordo com os documentos NCCLS-M27A2 (2002) e NCCLS-M38, respectivamente para as formas leveduriforme e filamentosa, com algumas modificações;
- Analisar qualitativamente o efeito dos compostos sobre integridade das membranas das células fúngicas por microscopia óptica utilizando como marcador o corante vital SYTOX Green™;
- Verificar as alterações na morfologia e ultraestrutura de leveduras de *Sporothrix* spp. tratadas com os compostos naturais e sintéticos por microscopia eletrônica de transmissão e varredura.
- Verificar a capacidade de melanização das cepas de *Sporothrix* spp. após os tratamentos com os compostos na presença ou ausência do indutor de melanização (L-DOPA);

- Extrair e analisar por Infravermelho se os pigmentos produzidos na presença dos tratamentos com os compostos correspondem ao padrão de melaninas fúngicas;
- Avaliar o efeito citotóxico dos compostos sintéticos sobre cultura de células VERO e do nematoide de vida livre *Panagrellus redivivus*;
- Infecção do nematoide *P. redivivus* com *Sporothrix* spp e sua desinfecção com os compostos naturais e sintéticos.

## 5. Material e Métodos

### 5.1 Linhagens de microrganismos

Foram utilizadas cepas clínicas de *Sporothrix* spp. isoladas de felinos das cidades de Macaé e Campos dos Goytacazes, RJ, pelo Laboratório de Sanidade Animal do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, além de cepas clínicas obtidas de biópsia de pele de gato doméstico, aspirado de nódulo de humano, unha de gato doméstico e suabe nasal de gato doméstico pós-tratamento com itraconazol da Fundação Oswaldo Cruz –RJ (FIOCRUZ-RJ), todas gentilmente cedidas pelo Dr. Mário Jorge Gatti, curador da Coleção Micológica do Departamento de Biologia do Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental – IOC/FIOCRUZ, RJ (tabela1).

Tabela 1. Códigos dos isolados, forma clínica da doença e origem das cepas de *Sporothrix* spp. adquiridas da Fiocruz e isoladas de animais doentes pelo Laboratório de Sanidade Animal da UENF.

ISOLADOS	HOSPEDEIRO	FORMA CLÍNICA	LOCAL/CIDADE	ESTADO
CMDB/IOC 01970599	Gato	Linfocutânea	Fiocruz /RJ	RJ
CMDB/IOC 01980599	Gato	Linfocutânea	Fiocruz /RJ	RJ
CMDB/IOC 01990699	Humano	Fixa	Fiocruz /RJ	RJ

CMDB/IOC 02050799	Gato	Linfocutânea	Fiocruz /RJ	RJ
CMDB/IOC 02020699	Gato	Linfocutânea	Fiocruz /RJ	RJ
ATCC 32285	Gato	Linfocutânea	-	RS
LSASC01	Gato	Linfocutânea	UENF/Macaé	RJ
LSASC02	Gato	Linfocutânea	UENF/Macaé	RJ
LSASC03	Gato	Linfocutânea	UENF/Macaé	RJ
LSASC04	Gato	Linfocutânea	UENF/Campos	RJ
LSASC05	Gato	Linfocutânea	UENF/Campos	RJ
LSASC 06	Gato	Linfocutânea	UENF/Campos	RJ

Os isolados de *Sporothrix* spp. foram mantidos na forma filamentosa em Ágar Sabouraud Dextrose (SAB) (HIMEDIA) e/ou Ágar Batata dextrose (BDA) (HIMEDIA) acrescidos de cloranfenicol (50 mg/mL) e cicloheximide (400 mg/mL) a 28°C. Estes mesmos isolados foram revertidos para a fase leveduriforme semeando-os em Ágar Brain Heart Infusion (BHA) (HIMEDIA) e/ou Extrato de Levedura Peptona e Dextrose (YEPD) a 37°C e mantidos com repiques a cada 12 dias.

Os nematoides *Panagrellus redivivus* foram obtidos com Dr. Clóvis de Paula Santos do setor de Parasitologia do Laboratório de Biologia Celular e Tecidual da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro para serem utilizados como modelo de infecção com o fungo *Sporothrix* spp. Os nematoides foram mantidos a 28°C em frascos tipo erlenmeyer de 300 mL contendo meio Ágar flocos de Aveia (0,75 g Aveia em flocos finos, 0,3g de Ágar Ágar e 20mL de água destilada).

## 5.2 Amostras testadas

### 5.2.1 Extrato etanólico de *Capsicum annuum* L. e análogos sintéticos capsaicinoides



O extrato etanólico do fruto de *C. annuum L.* e os análogos sintéticos da capsaicina (SA1, SA2 e SA3) foram gentilmente cedidos pelos colaboradores D<sup>o</sup> Moema Mocaiber Peralva dos Santos e Professor Edmilson José Maria, ambos do Laboratório de Ciências Químicas (LCQUI) da UENF. Os padrões sintéticos capsaicina e dihidrocapsaicina (Sigma Aldrich - EUA) foram cedidos pela Professora Rosana Rodrigues do Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal (LMGV) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Na figura 11 podem ser observadas as estruturas dos análogos sintéticos testados e das substâncias padrão (capsaicina e dihidrocapsaicina – Sigma Aldrich –USA).

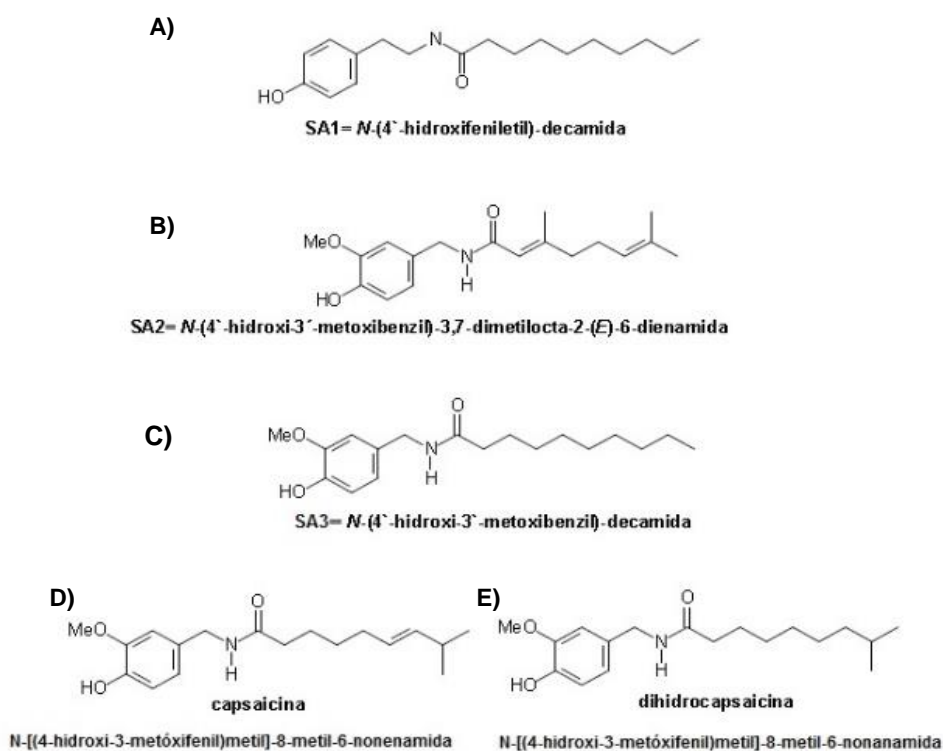


Figura 11. Análogos sintéticos da capsaicina (A, B e C) (Gonçalves, 2009) e as substâncias padrão capsaicina (D) e dihidrocapsaicina (E) (Sigma Aldrich, USA) utilizadas como controles positivos para os testes de susceptibilidade.

### 5.2.2 Sais de Heteropoliácidos de Prata

Os sais de heteropoliácidos de prata foram cedidos pelo professor Dr. Luis César Passoni do Departamento de Química Inorgânica do Laboratório de

Ciências Químicas (LCQUI) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro– UENF/Campos dos Goytacazes. Foram analisados quatro sais de heteropoliácidos:

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

Foram preparadas soluções estoque dos sais de HPAs de prata em água destilada estéril na concentração de 51,2 mg/mL e armazenados à temperatura ambiente.

### 5.2.3 Complexos de Coordenação

Os complexos contendo cobre e ferro foram sintetizados e cedidos pelo grupo de Química Inorgânica do Laboratório de Ciências Químicas (LCQUI) da Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF/Campos dos Goytacazes sob orientação da Professora Dr<sup>a</sup>. Christiane Fernandes Horn e Adolfo Horn Júnior. Foram analisados 18 compostos, sendo 5 ligantes livres (HPCINOL, BMPA, HBPA, BS e BE) e 11 complexos formados com estes ligantes utilizando os metais cobre e ferro, e manganês para o HPCINOL (Figuras 12-16).

Soluções estoque dos complexos de coordenação foram preparadas solubilizando-os em dimetilsulfóxido (DMSO-Sigma Aldrich, USA) na concentração de 51,2 mg/mL e armazenados a 4°C.

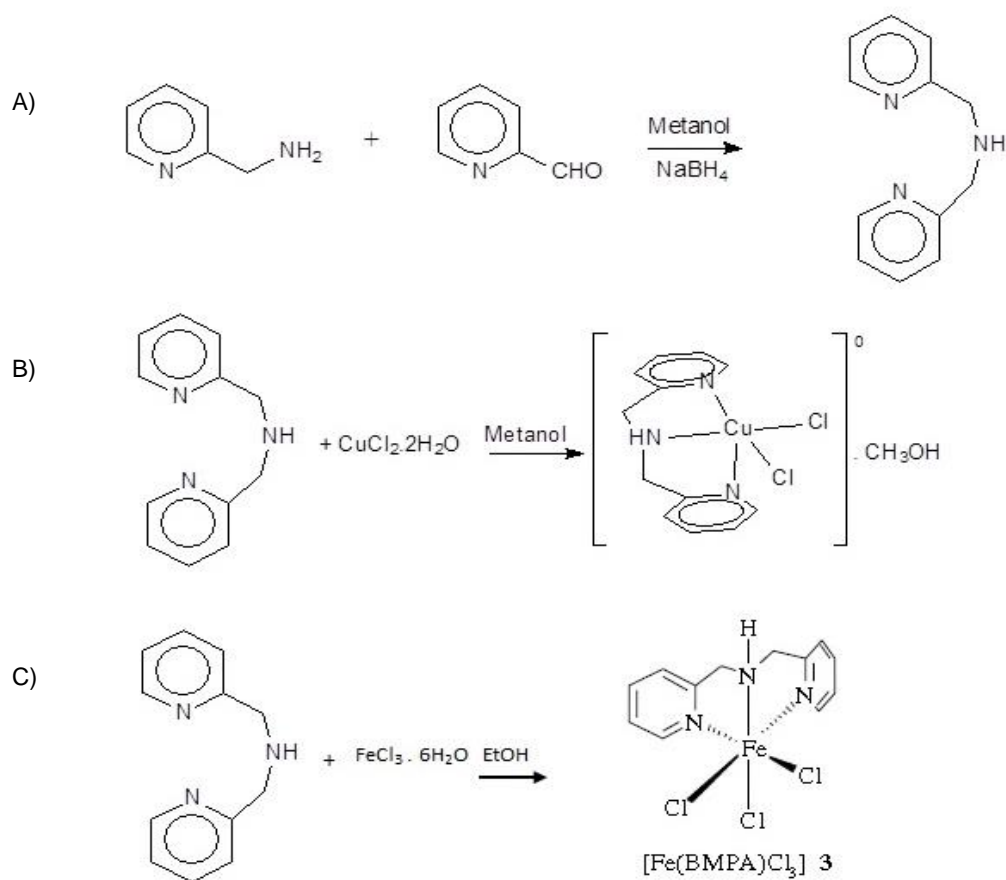


Figura 12. Fórmulas estruturais do Ligante bis-(2-metilpiridil)amina (BMPA) (A); Complexo mononuclear Cobre bis-(2-metilpiridil)amina (CuBMPA) (B); Complexo mononuclear Ferro bis-(2-metilpiridil)amina (FeBMPA) (C).

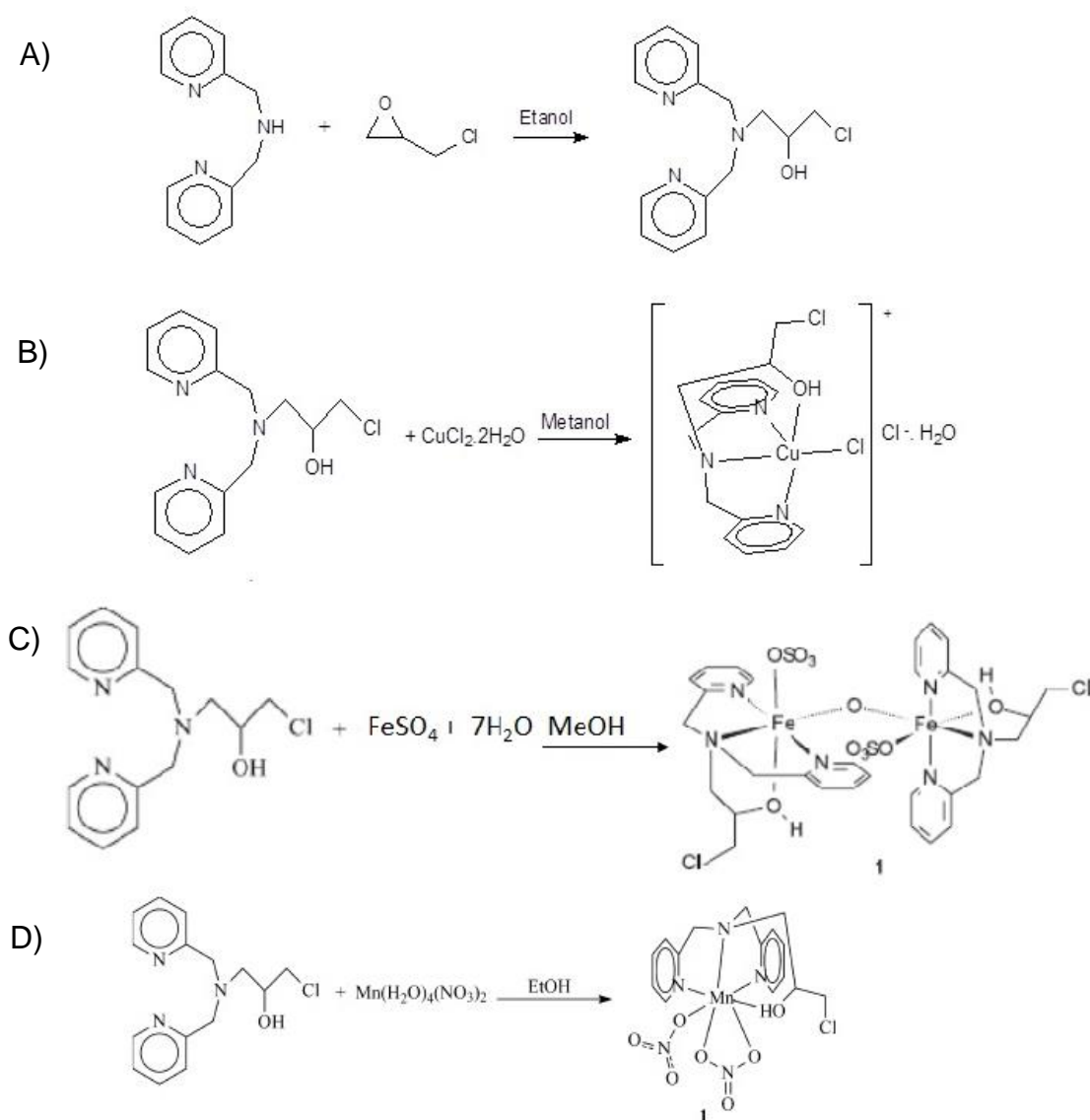


Figura 13. Fórmulas estruturais do Ligante 1-(bis-piridin-2-ilmetil-amino)-3-cloropropan-2-ol (HPCINOL) (A); Complexo mononuclear Cobre-1-(bis-piridin-2-ilmetil-amino)-3-cloropropan-2-ol (CuHPCINOL) (B); Complexo binuclear Ferro-1-(bis-piridin-2-ilmetil-amino)-3-cloropropan-2-ol (FeHPCINOL) (C); Complexo mononuclear Manganês-1-(bis-piridin-2-ilmetil-amino)-3-cloropropan-2-ol (MnHPCINOL) (D).

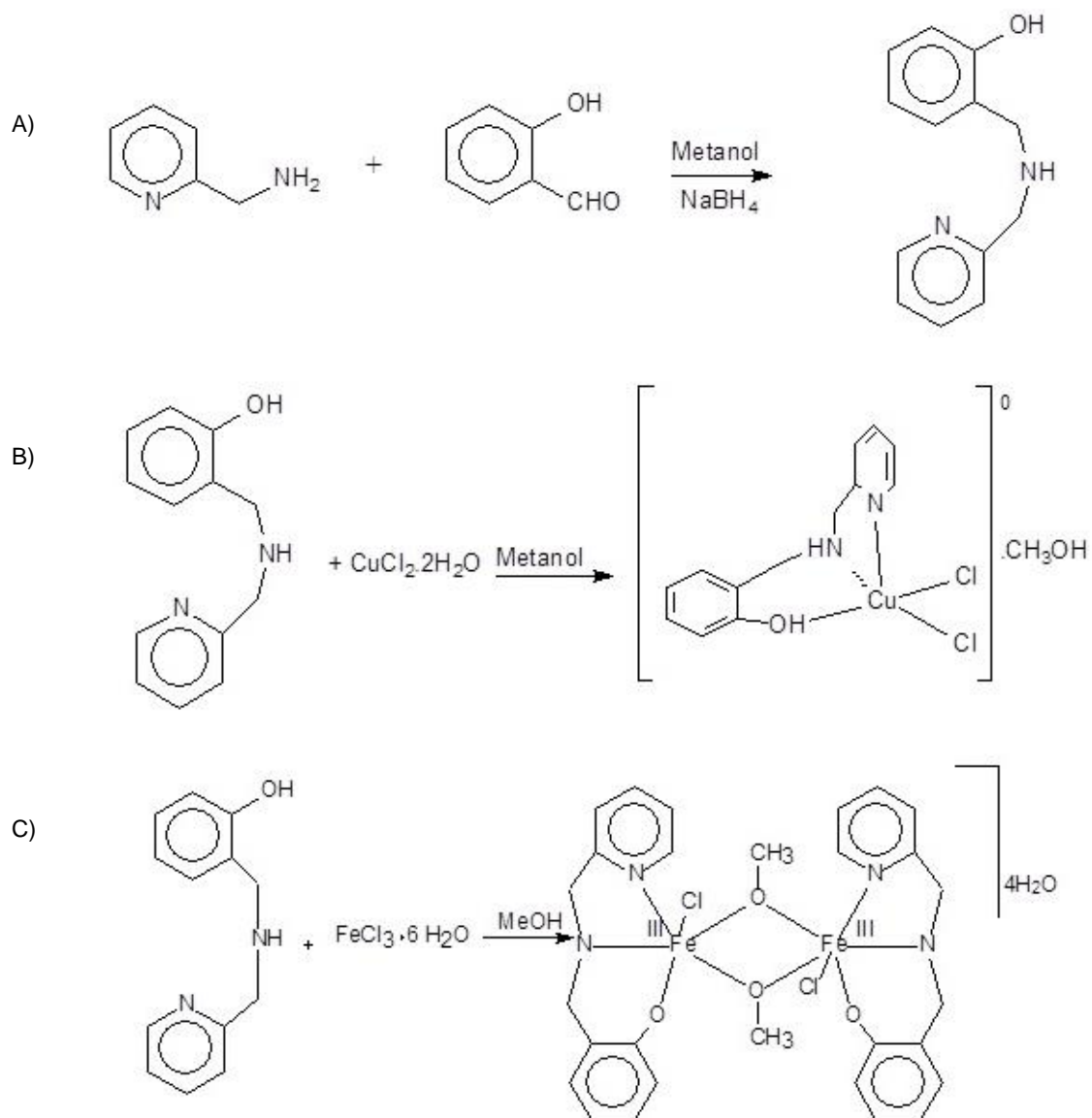


Figura 14. Fórmulas estruturais do Ligante 2-hidroxi-benzil-(2-piridilmetil)amina (HBPA) (A); Complexo mononuclear Cobre-(2-hidroxi-benzil) (2-piridilmetil) amina (CuHBPA) (B); Complexo mononuclear Ferro-(2-hidroxi-benzil) (2-piridilmetil) amina (FeHBPA) (C).

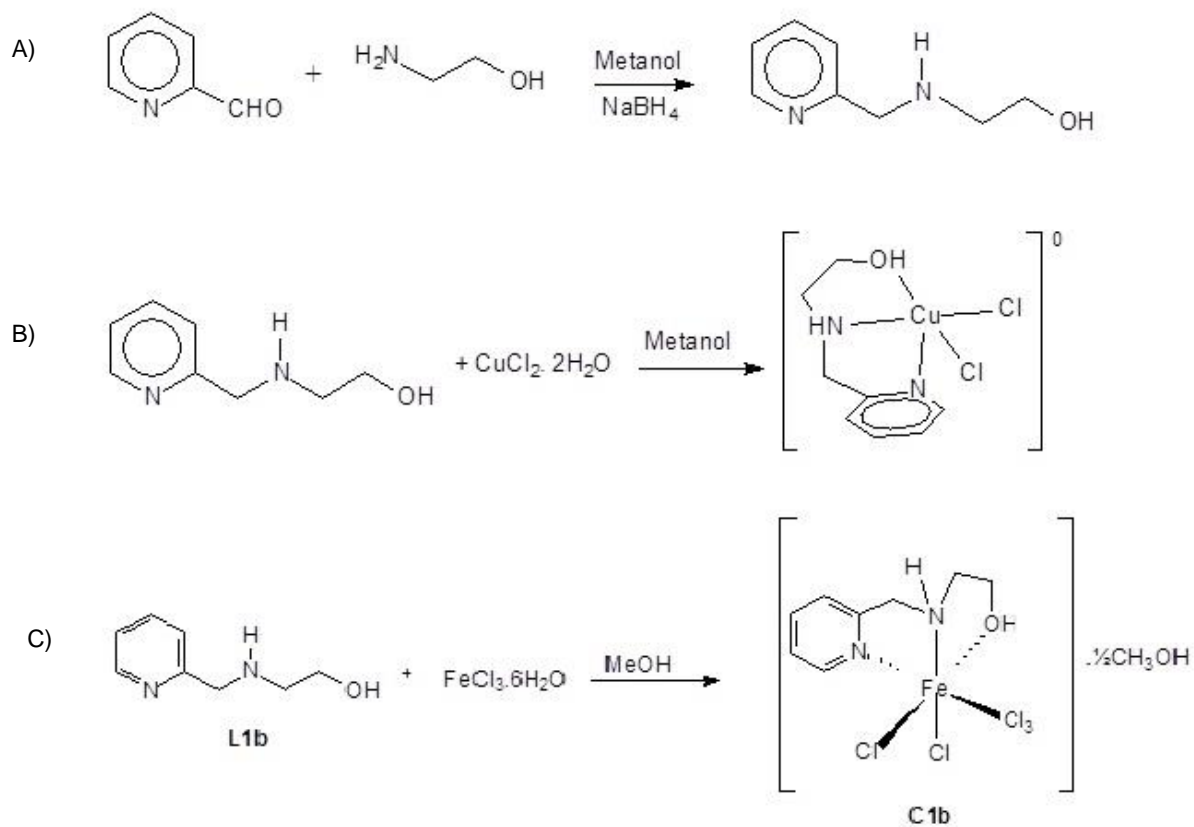


Figura 15. Fórmulas estruturais do Ligante 2-[piridin-2-ilmetilamino]etanol (BS) (A); Complexo mononuclear Cobre-2-[piridin-2-ilmetilamino]etanol (CuBS) (B); Complexo mononuclear Ferro-2-[piridin-2-ilmetilamino]etanol (FeBS) (C).

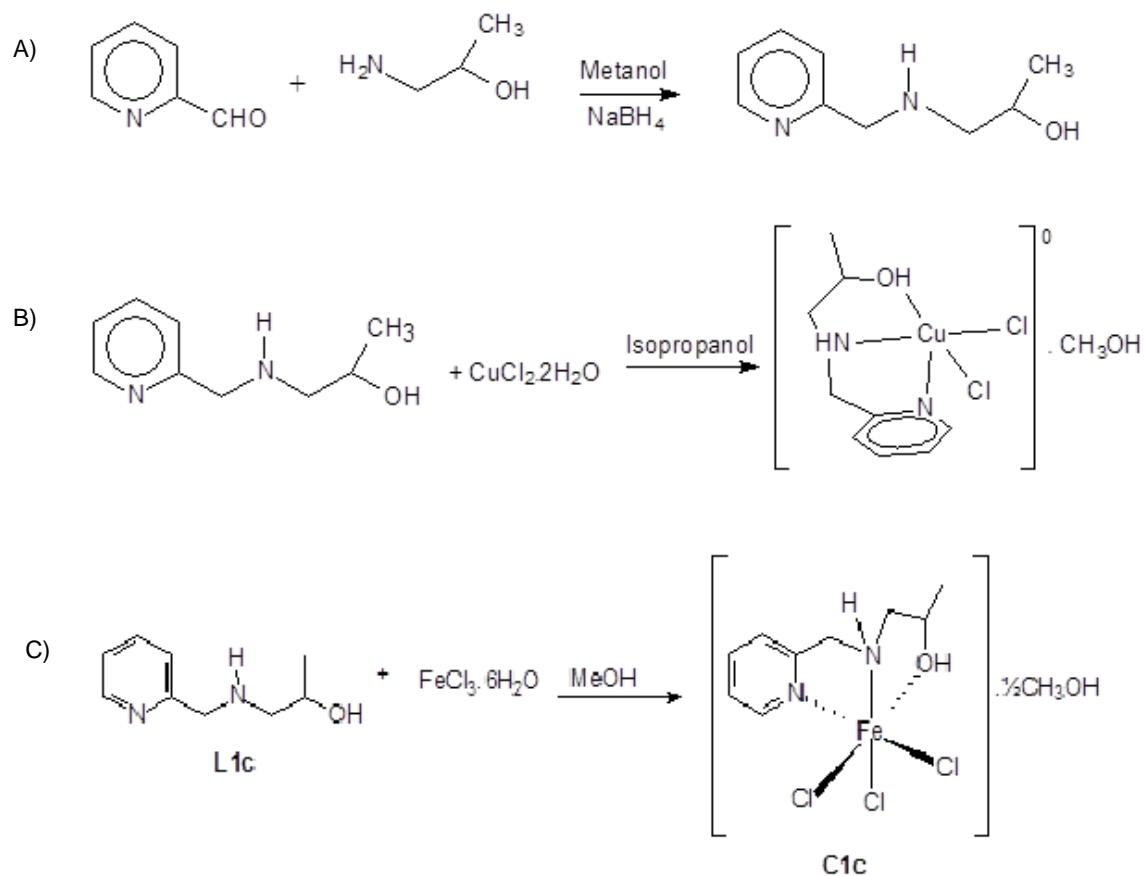


Figura 16. Fórmulas estruturais do Ligante 1[(piridin-2-ilmetil)amino]propan-2-ol (BE) (A); Complexo mononuclear cobre-1[(piridin-2-ilmetil)amino]propan-2-ol (CuBE) (B); Complexo mononuclear Ferro-1[(piridin-2-ilmetil)amino]propan-2-ol (FeBE) (C).

### 5.3 Fármacos de Referência

Foram utilizadas soluções estoque dos antifúngicos comerciais itraconazol, terbinafina e anfotericina B (Sigma Aldrich, EUA) na concentração de 12,8 mg/mL. Todos O itraconazol e a terbinafina foram diluídos em 100% de dimetilssulfóxido (DMSO - Sigma Aldrich, EUA) e a anfotericina B foi diluída em

água destilada estéril na mesma concentração e armazenada a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Na figura 17 podem ser observadas as estruturas moleculares dos antifúngicos comerciais utilizados como controles positivos nos ensaios de inibição.

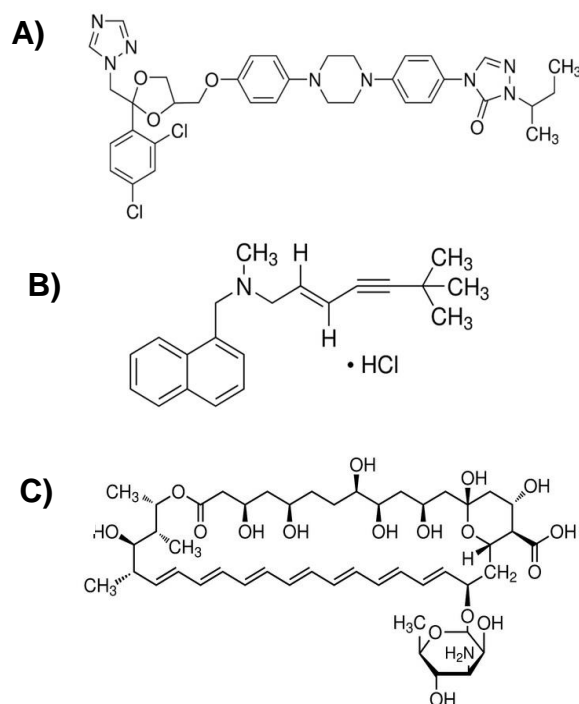


Figura 17. Fórmulas estruturais de três classes de antifúngicos: (A) Itraconazol (azol), (B) Terbinafina (alilamina); e (C) Anfotericina B (poliênico).

#### 5.4 Atividade Antimicrobiana – Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Para a avaliação da atividade antifúngica do extrato etanólico de *C. annuum L.* e dos compostos sintéticos foi empregado o método de microdiluição em caldo de acordo com o protocolo descrito nos documentos NCCLS M27-A2 e M38-A (2002), respectivamente para as formas leveduriforme e filamentosa.

A solução de inóculo para fase leveduriforme de *Sporothrix spp.* foi preparada a partir de colônias jovens (72-96h) que foram ressuspensas em tubos contendo solução salina estéril (0,85%), homogeneizadas em agitador e ajustadas à turbidez 0,5 na escala McFarland (equivalente a  $10^8$  células/mL), seguindo leitura realizada pelo fotômetro Densimat (bioMérieux, França) no



comprimento de onda de 550nm. Em seguida, a suspensão fúngica foi diluída em solução salina na proporção de 1:50, homogeneizada e diluída novamente em meio RPMI 1640 (Gibco®) na proporção de 1:20 e finalmente distribuída em volumes de 100 µL nas microplacas de 96 poços.

Para a produção do inóculo da fase filamentosa, colônias crescidas durante 7 dias em Ágar batata dextrose foram cobertas com 1mL de solução salina estéril 0,85% adicionada de 0,01mL de Tween 20. Delicadamente as colônias foram raspadas com a ponta de uma pipeta estéril. A suspensão resultante de conídios e fragmentos de hifas foi transferida para um tubo estéril e após sedimentação (aproximadamente 5 minutos), o sobrenadante foi transferido para outro tubo estéril, homogeneizado e sua densidade óptica ajustada para 0.5 McFarland. Em seguida, essa suspensão foi diluída na proporção de 1:50 em meio RPMI 1640 (Gibco®) para finalmente ser distribuída em microplacas de 96 poços em volumes de 100 µL.

Os testes de susceptibilidade foram realizados em triplicata, sendo uma coluna da microplaca utilizada para o controle positivo (meio RPMI 1640 + inóculo fúngico) e outra coluna para o controle negativo (meio RPMI 1640) e nas demais colunas foram depositados simultaneamente 100 µL das diluições dos compostos propostos e 100 µL da solução de inóculo. As concentrações finais testadas nos poços foram de 512 – 0,5 µg/mL para os sais de heteropoliácidos e complexos de coordenação; 4 - 0,125 µg/mL para o extrato etanólico de *C. annuum* L. e análogos sintéticos da capsaicina; 128 – 0,03 µg/mL para os antifúngicos itraconazol, terbinafina e anfotericina B. As microplacas foram incubadas a 37°C sob agitação branda durante 96 horas, quando foi realizada a leitura da concentração inibitória mínima (CIM), que foi obtida pela comparação visual do crescimento do agente na presença de diferentes concentrações dos compostos com o crescimento no controle positivo. A CIM de cada composto foi identificada como a menor concentração capaz de produzir proeminente inibição do crescimento do agente em relação ao controle positivo. Para comprovar o resultado da leitura visual, 30 µL de resazurina (100 µg/mL) (Sigma Aldrich, USA) foram adicionados a cada poço e incubados a 37° por 1 h. Este reagente sofre

redução na presença de células metabolicamente viáveis e a reação é visualizada pela mudança de coloração de azul para rosa.

### **5.5 Ensaio para verificação da permeabilização de membranas de *Sporothrix* spp.**

Este ensaio qualitativo permitiu observar o dano causado pelos compostos testados sobre a permeabilidade da membrana plasmática como descrito por Therissen et al (1999), com algumas modificações. O “SYTOX Green” é um corante vital que possui alta afinidade para ácidos nucleicos e penetra em células apenas quando sua membrana está danificada. Células em fase logarítmica de crescimento foram incubadas na presença dos compostos durante 48h. Imediatamente após o ensaio, uma alíquota de 100 µL contendo  $2 \times 10^8$  células/mL de leveduras foi incubada, sob constante agitação por uma hora com o corante fluorescente “SYTOX Green” a uma concentração final de 0.2 M. Após este período, 10 µL das células fúngicas foram transferidas para lâminas cobertas com lamínula e analisadas em microscópio óptico com filtro para a detecção de fluoresceína (Zeiss, German). Como controle negativo foram utilizadas leveduras sem tratamento e como controle positivo leveduras tratadas com o antifúngico itraconazol.

### **5.6 Efeito dos compostos sobre a ultraestrutura de *Sporothrix* spp.**

Para a avaliação das alterações morfológicas e ultraestruturais, técnicas de microscopia óptica e eletrônica foram utilizadas. Nestes ensaios foi utilizado o isolado clínico LSASs01. Leveduras foram tratadas com as concentrações subinibitórias (0,5 x CIM) dos compostos naturais e sintéticos, sendo que o tratamento foi realizado com o inóculo em fase exponencial de crescimento. Leveduras de *Sporothrix* crescidas em meio Brain Heart Infusion com e sem L-DOPA submetidas aos tratamentos com os diferentes compostos foram processadas para a análise por microscopia eletrônica de transmissão e varredura para verificação da susceptibilidade deste fungo aos tratamentos.

### 5.6.1. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

As amostras foram fixadas por duas horas à temperatura ambiente em glutaraldeído 2,5% grau II (Sigma®, EUA), diluído em tampão cacodilato 0,1M pH 7.4. Após a fixação, as amostras foram lavadas 3 vezes por 5 min no mesmo tampão e pós-fixadas por 20 minutos em tetróxido de ósmio 1% (OsO<sub>5</sub>, Sigma®, EUA) adicionado de 0,8% de ferrocianeto de potássio (Sigma®, EUA). Em seguida, as células foram lavadas com o mesmo tampão e desidratadas por 20 minutos em séries crescentes de acetona (Merck): 15%, 30%, 50%, 70%, 90% e 100% por três vezes. Logo depois as amostras foram infiltradas lentamente em séries crescentes de acetona e resina Spurr (Sigma Aldrich, EUA) iniciando em concentrações decrescentes de acetona:spurr 3:1, 2:1, 1:1, e depois crescentes 1:2, 1:3 e finalmente incluídas em resina pura. Após o emblocamento das amostras, as mesmas foram colocadas em estufa a 60°C para polimerização por 48 horas e os blocos obtidos foram cortados em Ultramicrótomo (Reichert Ultracut, Leica®, Suíça). Os cortes ultrafinos (nm) foram coletados em grades de cobre (300 mesh), contrastados em acetato de uranila e citrato de chumbo durante 20 e 5 minutos, respectivamente. Depois de secos, os cortes ultrafinos foram observados em Microscópio Eletrônico de Transmissão Zeiss 900, a 80 KV.

### 5.6.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Leveduras tratadas foram fixadas da mesma forma como descrito para microscopia de transmissão. As amostras na etapa da segunda lavagem foram aderidas em lamínulas contendo poli-L-lisina (Sigma Aldrich, USA) durante 20 minutos, pós-fixadas em solução contendo 1% OsO<sub>4</sub> e 0,4% de ferrocianeto de potássio diluídos em tampão cacodilato 0,1M por 40 minutos. As amostras foram lavadas em tampão cacodilato 0,1M pH 7,2 e desidratadas com concentrações crescentes de etanol (15%, 30%, 50%, 70%, 90% e 100% três vezes). As amostras foram secas em ponto crítico de CO<sub>2</sub> (Bal-tec, CP030), montadas em suporte metálico utilizando fita de carbono, metalizadas com paládio e observadas em Microscópio Eletrônico de Varredura Zeiss DSM 912, a 15 KV.

## 5.7 Avaliação da melanização

### 5.7.1 Potenciais de melanização de leveduras tratadas com os compostos

Para checar o potencial de melanização das células fúngicas, uma alíquota de 100 µL de cada cepa de *Sporothrix* tratada por 48h com os compostos foi semeada em placas contendo Ágar Batata dextrose suplementado ou não de L-3,4-diidroxifenilalanina (L-DOPA). As placas foram incubadas a 25°C protegidas da luz e observadas após 15 a 30 dias para a produção de melanina.

### 5.7.2 Extração das partículas de melanina

Partículas de melanina foram extraídas de culturas de *Sporothrix* spp. crescidas em meio mínimo (15mM de glicose, 10mM MgSO<sub>4</sub>, 29,4mM K<sub>2</sub>HP<sub>4</sub>, 13mM glicina, 3,0mM tiamina, pH 5.5) na presença dos compostos propostos e do indutor L-DOPA (1mM) e do inibidor da síntese de melanina DHN, o Triciclazol (8 µg/mL). As leveduras foram incubadas a 37°C durante 15 dias com agitação constante de 150 rpm. As partículas de melanina foram isoladas utilizando agentes desnaturantes e ácido quente de acordo com o protocolo descrito por Alviano et al (2004) e Rosas et al (2000): (i) Centrifugação das células leveduriformes a 1200 x g por 30 minutos; (ii) Lavagem com PBS (0.1 M, pH 7.5); (iii) Ressuspender em uma solução contendo Sorbitol (0.1M) e citrato de sódio (0.1 M, pH 5.5); (iv) Centrifugar e adicionar a enzima de lise de *Trichoderma harzianum* (1mg/mL) e incubar por uma noite a 30°C para gerar protoplastos; (v) Coletar os protoplastos por centrifugação e lavar com PBS; (vi) Incubar com o desnaturante Tiocianato de guanidina (4.0M) por uma noite à temperatura ambiente; (vii) Coletar os debris celulares por centrifugação; (viii) Lavar 3X com PBS; (ix) Tratar com solução de proteinase k (1mg/mL) e tampão TRIS por uma noite a 37°C; (x) Lavar com PBS; (xi) Ferver o material em HCl 6.0M por 1 h; (xii) Centrifugar (10.000 x g); (xiii) Lavar o material exaustivamente com PBS; (xiv) Dializar com água destilada durante 3 dias.

### **5.7.3 Análise das melaninas extraídas de células fúngicas tratadas**

As partículas de melanina extraídas foram observadas por microscopia óptica e por espectroscopia de infravermelho para fins de comparação com o perfil padrão de melaninas fúngicas.

Para a análise de infravermelho pesou-se 1 mg das partículas de pigmento isoladas de *Sporothrix* e adicionou-se 100 mg de KBr. Desta mistura foram feitas pastilhas de KBr em uma pastilhadora com 8 toneladas por cm<sup>2</sup> de pressão. Como controle positivo foi utilizado 1mg da substância purificada 1,3-diidroxi-L-fenilalanina (Sigma Aldrich, USA). Os espectros na região do infravermelho foram obtidos em um espectrofotômetro Shimadzu FT IR 8300, com sistema de registro computadorizado, na região de 4000 a 400 cm<sup>-1</sup>, no Laboratório de Ciências Químicas da UENF.

### **5.8 Avaliação do efeito citotóxico do extrato etanólico de *C. annuum* L. e seus análogos sintéticos, dos heteropoliácidos e complexos de coordenação**

Os ensaios de viabilidade celular foram realizados para avaliar o potencial citotóxico dos compostos naturais e sintéticos sobre cultura de células VERO pelo método colorimétrico, de acordo com Zairi et al. (2008) com algumas modificações.

Neste ensaio foram utilizadas células VERO, uma linhagem celular fibroblástica estabelecida a partir de células renais do macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*). Estas células foram cedidas pelo setor de virologia do Laboratório de Sanidade Animal da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro e mantidas em garrafas plásticas (75 cm<sup>2</sup>) contendo meio DMEM-F12 (Gibco®) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco®) e 5 µg/mL de gentamicina (Sigma Aldrich, USA) em estufa a 37°C com atmosfera de 95% O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>. As trocas do meio de cultura foram feitas sempre que houve a acidificação do mesmo e os repiques foram periodicamente efetuados na medida em que houve a confluência do tapete celular. Para

obtenção de células em suspensão, primeiramente a cultura foi lavada com 3 mL de tampão fosfato de sódio 0,05M (PBS), pH 7.2, por duas vezes. Após este processo, foi adicionado 2 mL de tripsina bovina 0,25% (Gibco®) e deixada agir aproximadamente por 1 minuto ou até completa individualização celular. Em seguida, 4 mL de meio de cultura suplementados com 5% de soro fetal bovino (SFB) foram adicionados à cultura para neutralizar a ação da tripsina. Para a contagem de células para a execução dos experimentos, uma alíquota de 100 µL das células neutralizadas foi adicionada a 100 µL do corante azul tripan, homogeneizadas e aplicadas em um hemocitômetro (câmara de Neubauer).

Células VERO diluídas em meio DMEM-F12 ( $1 \times 10^6$  céls/mL) foram semeadas (100 µL) em placas de 96 poços. Após 24 horas de incubação a 37°C, o meio foi retirado e substituído por 100 µL de um novo meio (DMEM-F12 suplementado com 10% SFB) contendo diferentes concentrações dos compostos e incubadas novamente a 37°C. Após 48h de incubação foram adicionados 20 µL de solução de MTT (brometo 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolium) (5mg/mL) diluído em PBS e a cultura foi novamente incubada durante 4 horas a 37°C para ocorrer a reação tetrazolium/formazan. Poços contendo somente meio de cultura e MTT foram usados como controle negativo, enquanto que poços contendo células não tratadas foram usados como controle positivo. Após esse período, 100µL do sobrenadante de cada poço foi retirado e adicionado 100 µL do tampão de solubilização (álcool isopropílico e 0,0014% de ácido clorídrico fumegante) para dissolução dos sais formados. Após 30 minutos de incubação a 37°C, as placas foram analisadas através da absorbância no comprimento de onda de 570nm. Os experimentos foram realizados em triplicata e em três experimentos independentes.

## **5.9 Ensaios utilizando nematoide de vida livre**

### **5.9.1 Ensaio de toxicidade dos compostos sobre nematoide de vida livre *P. redivivus***

Para o ensaio de toxicidade dos compostos, os nematoides no estágio L4 de desenvolvimento foram lavados exaustivamente em água destilada e deixados por 24h em caldo Brain Heart Infusion (Himedia, USA) suplementado com 50 µg/mL de gentamicina (Sigma Aldrich, USA) para eliminar as bactérias provenientes do intestino e da cutícula dos nematoides. Em seguida, os nematoides foram lavados duas vezes em meio K (3,075g NaCl, 2,42g KCl, 1L água destilada) e diluídos em caldo Brain Heart Infusion para obter 10 nematoides/mL. Então, 100 µL da solução com nematoides foram distribuídos em placas de 96 poços contendo 100 µL de concentrações crescentes do extrato etanólico de *C. annuum* L., análogos sintéticos da capsaicina (0,250 - 8 µg/mL), heteropoliácidos, compostos de coordenação e antifúngicos (2- 1024 µg/mL) e incubados por até 120h a 28 e 37°C. A cada 24h os vermes mortos foram contados e removidos. Água destilada estéril serviu como controle negativo.

### **5.9.2 Infecção fúngica do nematoide *P. redivivus* (Laws et al., 2005)**

#### **5.9.2.1 Ensaio de morte de *P. redivivus* em meio de cultura sólido**

Culturas de *Sporothrix* (LSASs01) foram crescidas em confluência em Ágar Brain Heart Infusion (BHI) a 37°C por 72 h para realizar o ensaio com os nematoides. Concomitantemente, os nematoides foram sincronizados isolando os vermes em estágio L1 e incubando os mesmos por 48 a 72h em placas contendo meio NGM acrescido 100 µg/mL de gentamicina (Sigma Aldrich, USA) até atingirem o estágio L4 (adultos jovens). Estes vermes foram lavados das placas com tampão M9 acrescido de gentamicina (100 µg/mL) e ressuspendido por duas vezes com o mesmo tampão. Aproximadamente 30 vermes foram depositados sobre placas de petri contendo um crescimento confluyente de *S. schenckii* sobre o Ágar BHI contendo 100 µg/mL de gentamicina para prevenir o crescimento de bactérias provenientes do intestino dos vermes. As placas foram incubadas a 37°C e observadas quanto à sobrevivência dos vermes em intervalos de 12h

durante 5 dias. Os vermes foram considerados mortos quando não se movimentavam ou quando não exibiam tônus muscular.

(Meio NGM: Esterilizar a 121°C: 3g NaCl, 17g Ágar, 2,5g peptona e 975mL água destilada. Quando esfriar adicionar 1mL CaCl<sub>2</sub> 1M, 1mL MgSO<sub>4</sub> 1M, 1mL colesterol 5mg/mL, 25mL KPO<sub>4</sub> 1M, 100µg/mL de gentamicina).

### 5.9.2.2 Ensaio de morte e resgate de sobrevivência em meio de cultura líquido

Neste ensaio o intuito foi observar se os compostos aumentam a taxa de sobrevivência dos vermes infectados comparado com o controle. *P. redivivus* no estágio adulto jovem foram infectados da mesma forma como descrito na seção anterior. Após a lavagem para a retirada dos nematoides da placa, os vermes foram ressuspensos em meio completo (10% Brain Heart Infusion, 100 µg de gentamicina e 90% tampão M9). Aproximadamente 20 vermes em um volume de 100 µL foram transferidos para placas de 96 poços contendo igual volume dos compostos em diferentes concentrações ou caldo BHI como controle negativo. A concentração final dos compostos nos poços foi de 512 – 1 µg/mL para os sais de HPAs e complexos de coordenação e de 5 - 0,3 µg/mL para o extrato etanólico de *C. annuum* L. e análogos da capsaicina diluídos no mesmo meio de cultura. A sobrevivência dos vermes foi observada durante 120h de incubação a 37°C.

Tampão M9: (Solução 2X: 25,6g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 6g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1g NaCl, 2g NH<sub>4</sub>Cl, 1L água destilada, pH final 7.0)

## 5.10 Análise Estatística

Todos os resultados numéricos foram expressos como a média ± desvio padrão (ME ± DP). As comparações entre os grupos foram realizadas através de uma análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey para múltiplas comparações e para detectar diferenças entre as médias dos grupos individuais. O nível de probabilidade de 5% ( $p < 0,05$ ) foi considerado significativo. Para



avaliar a toxicidade dos compostos sobre os nematóides foi utilizada a seguinte fórmula (Styer et al., 2005):

$$\% \text{ mortalidade} = \left[ \frac{\sum (\text{mortalidade tratamento} - \text{mortalidade controle})}{n} \right] \times 100\%$$

## 6. Resultados

### 6.1 Testes de susceptibilidade: Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A concentração inibitória mínima dos antifúngicos, extrato etanólico de *C. annuum L.*, análogos sintéticos da capsaicina, sais de HPA de prata e complexos de coordenação foi realizada sobre o fungo melanizado e não melanizado nas formas leveduriforme e filamentosa de crescimento.

#### 6.1.1 Concentração Inibitória Mínima dos antifúngicos comerciais

A concentração inibitória mínima (CIM) dos antifúngicos itraconazol, terbinafina e anfotericina B frente aos isolados de *Sporothrix* spp. está disposta na tabela 2. Foi observado que 100% (12/12) das cepas testadas foram resistentes ao itraconazol (CIM  $\geq 1\mu\text{g/mL}$ ) tanto na forma leveduriforme quanto na forma filamentosa de crescimento. Para a anfotericina B, verificou-se que 50% das cepas (6/12) na forma leveduriforme apresentaram sensibilidade (CIM  $< 1\mu\text{g/mL}$ ) e outros 50% apresentaram resistência (CIM  $\geq 1\mu\text{g/mL}$ ) para este derivado poliênico, enquanto que na forma filamentosa foi observado que 67% das cepas (8/12) foram sensíveis. Quanto a terbinafina, 92% (11/12) das cepas na forma leveduriforme apresentaram CIM entre 0,125-0,5  $\mu\text{g/mL}$ , sendo, portanto sensíveis a este antifúngico. Na forma filamentosa, 100% das cepas (n=12) foram sensíveis para a terbinafina.

Na tabela 2 também pode ser observado que a CIM das leveduras cultivadas na presença de L-DOPA apresentou valores menores ou maiores do que os valores obtidos para as leveduras cultivadas sem o indutor de melanização e variou de acordo com a cepa testada. Para o itraconazol a variação da CIM continuou entre 1-32  $\mu\text{g/mL}$  e 1-8  $\mu\text{g/mL}$  para as formas leveduriforme e filamentosa, respectivamente, embora 42% (5/12) e 17% (2/12) tenham se tornado resistentes quando cultivados com L-DOPA. Frente à anfotericina B, houve aumento de uma concentração da CIM de 33% das cepas (4/12) na forma leveduriforme e de 50% na forma filamentosa quando cultivadas na presença de L-DOPA. Para a terbinafina, 92% das cepas de ambas as formas de crescimento permaneceram sensíveis a este antifúngico quando cultivadas em meio com L-DOPA, entretanto, houve aumento da CIM de 67% (8/12) e 75% (9/12) para as formas leveduriformes e filamentosa, respectivamente.

Tabela 2. Concentração inibitória mínima ( $\mu\text{g/mL}$ ) dos antifúngicos comerciais (itraconazol, terbinafina e anfotericina B) frente aos isolados de *Sporothrix* melanizados e não melanizados nas formas leveduriforme e filamentosa de crescimento.

Cepas	Forma Leveduriforme						Forma Filamentosa					
	CIM <sub>90</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )			CIM <sub>90</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ ) + L-DOPA			CIM <sub>90</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )			CIM <sub>90</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ ) + L-DOPA		
	ICZ	AMB	TRB	ICZ	AMB	TRB	ICZ	AMB	TRB	ICZ	AMB	TRB
IOC 0197	1	0,125	0,125	2	0,25	0,25	1	0,5	0,06	1	0,5	0,5
IOC 0198	1	2	0,5	1	2	0,5	2	0,5	0,5	2	0,5	0,5
IOC 0199	16	1	0,5	8	1	1	1	0,5	0,25	2	0,5	0,5
IOC 0205	32	4	2	32	4	2	4	2	1	2	2	1
IOC 0206	16	4	0,5	16	2	1	2	2	0,25	2	2	0,5
ATCC 32285	4	1	0,5	4	0,5	0,25	1	0,25	0,06	2	0,5	0,5
LSASc01	16	8	0,5	16	8	1	8	2	2	8	4	2
LSASc02	4	8	0,5	4	4	0,5	2	2	0,25	4	4	1
LSASc03	4	4	0,5	8	8	1	4	0,5	0,5	4	1	1
LSASc04	2	0,25	0,25	4	0,5	1	2	0,5	0,25	2	1	0,5
LSASc05	4	1	0,125	8	2	0,5	2	1	0,06	2	1	0,5
LSASc06	2	0,25	0,25	8	0,5	1	2	0,5	0,5	1	1	1
Varição	1-32	0,125-8	0,125-2	1-32	0,25-8	0,25-2	1-8	0,25-2	0,06-2	1-8	0,5-4	0,5-2
Média Geométrica	4,76	1,66	0,41	5,99	1,76	0,73	2,27	0,87	0,32	2,42	1,21	0,76

\* (ICZ): Itraconazol; (TRB): Terbinafina; (AMB): Anfotericina B; (L-DOPA): 3,4-diidroxi-L-fenilalanina.

### **6.1.2. Concentração Inibitória Mínima do extrato etanólico de *C. annuum L.* e derivados capsaicinoides**

Na tabela 3 podem ser observados os resultados adquiridos para o teste da CIM com o extrato etanólico de pimenta da espécie *C. annuum L.* e para os análogos sintéticos da capsaicina. Para o crescimento leveduriforme, a CIM do extrato etanólico e do derivado sintético capsaicinoide (SA3) foi de 0,5 µg/mL para as cepas ATCC 32285 e CMDDB 01990599 e de 2 µg/mL para cepa clínica LSASs01. O derivado sintético SA1 apresentou CIM de 1 µg/mL para a cepa CMDDB 01990599 e de 2 µg/mL para ATCC 32282 e LSASs01, enquanto que o capsaicinoide sintético SA2 apresentou CIM superior a 4 µg/mL. Os padrões sintéticos purificados utilizados como controles positivos (capsaicina e diidrocapsaicina) apresentaram o mesmo valor de CIM (0,5 µg/mL) que o extrato etanólico para as cepas ATCC32285 e CMDDB01990599 e maior que 4 µg/mL para a cepa clínica LSASs01. Células leveduriformes das três cepas melanizadas devido ao crescimento na presença de L-DOPA antes da realização do teste, apresentaram redução da sensibilidade para todos os tratamentos de pelo menos uma concentração. Para o crescimento na forma filamentosa, o extrato etanólico apresentou CIM de 2 µg/mL para as cepas ATCC32285 e CMDDB 01990599 e maior que 4 µg/mL para cepa clínica, melanizadas ou não. Para o derivado sintético SA1, a inibição foi na concentração de 2 µg/mL para as três cepas, enquanto que para os demais tratamentos os valores da CIM foram superiores a maior concentração testada (4 µg/mL).

Tabela 3. Concentração inibitória mínima ( $\mu\text{g/mL}$ ) do extrato etanólico de *Capsicum annuum* L., derivados sintéticos capsaicinoides (SA1, SA2 e SA3), capsaicina e diidrocapsaicina sobre isolados de *Sporothrix* melanizados e não melanizados nas formas leveduriforme e filamentosa de crescimento.

Forma Leveduriforme													
Cepas	CIM <sub>90</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )						CIM <sub>90</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ ) + L-DOPA						
	Eet	SA3	SA2	SA1	CAP	DCAP	Eet	SA3	SA2	SA1	CAP	DCAP	
ATCC 32285	0,5	0,5	> 4	2	0,5	0,5	1	1	> 4	4	1	1	
IOC 0199	0,5	0,5	> 4	1	0,5	0,5	1	> 4	> 4	> 4	1	1	
LSASs01	2	2	> 4	2	> 4	> 4	2	> 4	> 4	4	> 4	> 4	
Variação	0,5-2	0,5-2	>4	1-2	0,5- >4	0,5 - >4	1-2	1->4	>4	> 4	1-> 4	1->4	
Média Geométrica	0,79	0,79	>4	1,59	0,5	0,5	1,26	1	> 4	>4	1	1	

Forma Filamentosa													
Cepas	CIM <sub>90</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )						CIM <sub>90</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ ) + L-DOPA						
	Eet	SA3	SA2	SA1	CAP	DCAP	Eet	SA3	SA2	SA1	CAP	DCAP	
ATCC 32285	2	> 4	> 4	2	> 4	> 4	2	> 4	> 4	> 4	> 4	> 4	
IOC 0199	2	> 4	> 4	2	> 4	> 4	2	> 4	> 4	> 4	> 4	> 4	
LSASs01	> 4	> 4	> 4	2	> 4	> 4	> 4	> 4	> 4	> 4	> 4	> 4	
Variação	2-> 4	> 4	> 4	2	> 4	> 4	2-> 4	> 4	> 4	> 4	> 4	> 4	
Média Geométrica	2	> 4	> 4	2	> 4	> 4	2	> 4	> 4	> 4	> 4	> 4	

\* (Eet): Extrato etanólico de *C. annuum*; (SA1, SA2 e SA3) análogos estruturais da capsaicina; (CAP): Capsaicina padrão Sigma Aldrich; (DCAP): Diidrocapsaicina padrão Sigma Aldrich; (L-DOPA): 3,4-dihidroxi-L-fenilalanina.

### 6.1.3 Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos sais de heteropoliácidos de prata

A concentração inibitória mínima (CIM) dos sais de heteropoliácidos de prata contendo tungstênio e molibdênio contra os isolados de *Sporothrix* está disposta na Tabela 4. Entre os sais de HPA de prata, os resultados mais expressivos frente à forma leveduriforme das cepas de *Sporothrix* spp. testadas foram observados para o sal de prata dodecamolibdofosfato ( $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$ ) com CIM variando de 4-16  $\mu\text{g/mL}$ . Os sais de prata dodecatungstosilicato ( $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$ ) e dodecatungstosilicato ( $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$ ) também apresentaram bons resultados com CIM variando de 4-32  $\mu\text{g/mL}$  e 8-32  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Enquanto que o sal decavanadotungstosilicato de prata ( $\text{Ag}_6[\text{SiW}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]$ ) apresentou CIM entre 16-128  $\mu\text{g/mL}$ . Para a forma filamentosa foi observado que os sais  $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$  e  $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$  apresentaram CIM variando entre 16-128  $\mu\text{g/mL}$ . O sal  $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$  apresentou CIM variando entre 8-64  $\mu\text{g/mL}$ , enquanto que o sal de prata  $\text{Ag}_6[\text{SiW}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]$  apresentou uma CIM entre 64->512  $\mu\text{g/mL}$ .

A CIM dos sais de HPAs de prata frente às cepas na forma leveduriforme cultivadas em meio contendo L-DOPA foi de 8-64  $\mu\text{g/mL}$  para  $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$  e para  $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$ , sendo que 67% (8/12) e 33% (4/12) das cepas, respectivamente, se tornaram mais resistentes. Para o sal de prata  $\text{Ag}_6[\text{SiW}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]$  a CIM variou entre 16-128  $\mu\text{g/mL}$  com aumento de 42% (5/12) de resistência das cepas. E para o sal de prata  $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$ , a variação da CIM foi de 16-64  $\mu\text{g/mL}$  com aumento de 25% (3/12) de cepas resistentes. Quanto a forma filamentosa, foi observado que 42% (5/12) das cepas se tornaram mais resistentes para os sais  $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$  e  $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$  com CIM variando entre 32-128  $\mu\text{g/mL}$  e 32-64  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Para os sais  $\text{Ag}_6[\text{SiW}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]$  e  $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$  houve aumento de 33% (4/12) de resistência das cepas, com CIM variando entre 128->512  $\mu\text{g/mL}$  e 32->512  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente.

Tabela 4. Concentração inibitória mínima ( $\mu\text{g/mL}$ ) dos sais de heteropoliácidos de prata frente aos isolados de *Sporothrix* melanizados e não melanizados.

Cepas	Forma Leveduriforme								Forma Filamentosa							
	CIM <sub>90</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )				CIM <sub>90</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ ) + L-DOPA				CIM <sub>90</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )				CIM <sub>90</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ ) + L-DOPA			
	PMo12	PW12	SiW10	SiW12	PMo12	PW12	SiW10	SiW12	PMo12	PW12	SiW10	SiW12	PMo12	PW12	SiW10	SiW12
IOC 0197	8	8	16	16	64	64	64	16	32	8	64	16	32	8	256	64
IOC 0198	8	8	16	16	8	64	64	16	16	8	64	32	32	8	128	32
IOC 0199	8	8	16	32	8	8	16	16	32	8	64	16	32	8	128	16
IOC 0205	16	32	32	16	64	32	32	16	32	8	> 512	16	32	16	> 512	128
IOC 0206	16	32	16	16	16	64	32	16	32	16	> 512	64	32	64	> 512	64
ATCC32285	16	16	32	16	16	16	16	16	16	4	64	16	32	8	128	16
LSASc01	16	32	64	16	64	32	128	64	128	64	> 512	128	128	64	> 512	> 512
LSASc02	16	32	128	16	64	32	128	64	64	16	> 512	128	128	16	> 512	128
LSASc03	8	32	64	16	64	32	64	16	64	16	> 512	128	64	32	> 512	128
LSASc04	16	16	128	16	64	16	64	16	32	64	> 512	128	128	32	> 512	> 512
LSASc05	4	8	64	8	64	8	64	16	64	8	> 512	128	64	8	> 512	128
LSASc06	4	4	64	16	64	64	128	16	64	16	> 512	128	128	32	> 512	128
Variação	4-16	4-32	16-128	8-32	8-64	8-64	16-128	16-64	16-128	8-64	64->512	16-128	32-128	8-64	128->512	32->512
Média Geométrica	10,1	15,1	40,3	16	35,9	28,5	53,8	20,1	40,3	13,5	64	53,8	57,0	17,96	152,2	90,5

\* (ICZ): Itraconazol; (TRB): Terbinafina; (AMB): Anfotericina B; (L-DOPA): 3,4-diidroxi-L-fenilalanina.

#### 6.1.4. Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos complexos de coordenação

A CIM dos ligantes e complexos de coordenação está disposta nas tabelas de 5 a 9. Na tabela 5 pode ser observado o perfil de sensibilidade das cepas de *Sporothrix* spp. frente ao ligante BMPA e seus complexos com cobre e ferro. Foi observado que a CIM do ligante BMPA variou entre 1-16  $\mu\text{g/mL}$  para a fase leveduriforme e de 2-32  $\mu\text{g/mL}$  para a fase filamentosa de crescimento. O complexo CuBMPA apresentou variação da CIM entre 2-64  $\mu\text{g/mL}$  para a fase leveduriforme e de 4-64  $\mu\text{g/mL}$  para filamentosa, enquanto que o complexo com ferro (FeBMPA) apresentou variação da CIM entre 16-128  $\mu\text{g/mL}$  e 16-64  $\mu\text{g/mL}$ , para as fases leveduriforme e filamentosa, respectivamente.

A CIM dos complexos frente às cepas na forma leveduriforme cultivadas em meio contendo L-DOPA foi de 2-32  $\mu\text{g/mL}$  para o ligante BPMA, com aumento de resistência de 42% (5/12) das cepas. Para o complexo CuBMPA a variação da CIM ficou entre 4-64  $\mu\text{g/mL}$  com aumento de resistência de 67% (8/12) das cepas, enquanto que para o complexo FeBMPA a variação da CIM foi entre 16-256  $\mu\text{g/mL}$ , com aumento de 42% (5/12) de resistência das cepas testadas. Na forma filamentosa foi observado que 42% (5/12) das cepas tratadas com o ligante BMPA e o complexo com cobre (CuBMPA) apresentaram aumento da resistência, com CIM variando entre 4-64  $\mu\text{g/mL}$  e 16-64  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Enquanto que o tratamento com o complexo com ferro (FeBMPA) a variação da CIM foi entre 16-64  $\mu\text{g/mL}$  com aumento de 17% (2/12) de resistência das cepas.

Ao converter os valores das CIMs destes compostos para nanomolar, foi observado que BMPA, CuBMPA e FeBMPA apresentaram valores da CIM mais baixos do que o itraconazol, terbinafina e anfotericina B frente a todas as cepas, exceto para a comparação entre os complexos CuBMPA e FeBM com a anfotericina, onde as cepas clínicas LSASs04 e LSASs05 apresentaram valores mais baixos para o antifúngico (Apêndice B).



Tabela 5. Concentração inibitória mínima ( $\mu\text{g/mL}$ ) do ligante BMPA e seus complexos com cobre e ferro sobre isolados de *Sporothrix* melanizados e não melanizados nas formas leveduriforme e filamentosa de crescimento.

Cepas	Forma Leveduriforme						Forma Filamentosa					
	CIM <sub>90</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )			CIM <sub>90</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ ) + L-DOPA			CIM <sub>90</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )			CIM <sub>90</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ ) + L-DOPA		
	BMPA	CuBMPA	FeBMPA	BMPA	CuBMPA	FeBMPA	BMPA	CuBMPA	FeBMPA	BMPA	CuBMPA	FeBMPA
IOC 0197	2	2	16	4	4	32	4	8	16	4	32	32
IOC 0198	2	2	16	2	4	32	2	4	16	4	8	16
IOC 0199	2	2	32	2	4	32	2	2	16	2	4	16
IOC 0205	2	32	16	8	32	32	4	32	32	8	32	32
IOC 0206	2	32	16	2	32	32	4	32	32	4	32	32
ATCC 32285	1	16	16	2	32	16	4	8	32	4	8	32
LSASc01	16	32	128	32	64	128	32	32	64	64	64	64
LSASc02	16	32	128	16	64	128	32	32	64	64	32	64
LSASc03	8	32	64	6	64	64	16	32	32	16	32	64
LSASc04	16	64	128	16	64	256	8	64	64	16	64	64
LSASc05	16	32	64	16	64	64	16	32	64	16	32	64
LSASc06	16	32	128	32	32	128	16	32	64	16	64	64
Variação	1-16	2-64	16-128	2-32	4-64	16-256	2-32	4-64	16-64	2-64	8-64	16-64
Média Geométrica	5,04	16	42,7	6,96	25,4	57,0	7,55	17,9	35,9	10,0	25,4	38,0

\* (ICZ): Itraconazol; (TRB): Terbinafina; (AMB): Anfotericina B; (L-DOPA): 3,4-diidroxi-L-fenilalanina.

Na tabela 6 estão apresentados o perfil de sensibilidade das cepas de *Sporothrix* spp. frente ao ligante HBPA e seus complexos de coordenação formados com cobre e ferro (CuHBPA e FeHBPA). Foi observado que o ligante apresentou uma CIM variando entre 32-128  $\mu\text{g/mL}$  para a forma leveduriforme e de 32-256  $\mu\text{g/mL}$  para a forma filamentosa de crescimento. O complexo CuHBPA apresentou uma CIM que variou entre 4-32  $\mu\text{g/mL}$  para a forma leveduriforme e entre 8-32  $\mu\text{g/mL}$  para filamentosa, enquanto que o complexo FeHBPA apresentou CIM variando entre 8-128  $\mu\text{g/mL}$  para forma leveduriforme e entre 16-128  $\mu\text{g/mL}$  para a forma filamentosa.

Leveduras cultivadas em meio contendo L-DOPA apresentaram um aumento da resistência a estes compostos. Foi observado que a CIM do ligante HBPA variou entre 128 - >512  $\mu\text{g/mL}$  com aumento de resistência de 25% das cepas (3/12) na fase leveduriforme, enquanto que na forma micelial este ligante apresentou CIM >512  $\mu\text{g/mL}$  com aumento de resistência de 8% (1/12) das cepas. O tratamento com o complexo CuHBPA apresentou um aumento de 17% (2/12) e 33% (4/12) de resistência das cepas com CIM variando entre 8-32  $\mu\text{g/mL}$  e de 16-64  $\mu\text{g/mL}$  para as fases leveduriforme e filamentosa, respectivamente. Com o complexo FeHBPA houve um aumento de resistência de 58% (7/12) para a forma leveduriforme e 17% (2/12) para a forma filamentosa das cepas testadas, com CIM variando entre 16-128  $\mu\text{g/mL}$  para ambas.

Ao converter os valores das CIMs destes compostos para nanomolar, foi observado que HBPA, CuHBPA e FeHBPA apresentaram valores da CIM mais baixos do que os valores encontrados para os três antifúngicos (itraconazol, terbinafina e anfotericina B), com exceção do ligante HBPA frente às cepas CMDB/IOC 0197 e cepas clínicas LSASs04 e LSASs05 que apresentaram valores de CIM maiores do que para a anfotericina B (Apêndice C).

Tabela 6. Concentração inibitória mínima ( $\mu\text{g/mL}$ ) do ligante HBPA e seus complexos com cobre e ferro sobre isolados de *Sporothrix* melanizados e não melanizados nas formas leveduriforme e filamentosa de crescimento.

Cepas	Forma Leveduriforme						Forma Filamentosa					
	CIM <sub>90</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )			CIM <sub>90</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ ) + L-DOPA			CIM <sub>90</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )			CIM <sub>90</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ ) + L-DOPA		
	HBPA	CuHBPA	FeHBPA	HBPA	CuHBPA	FeHBPA	HBPA	CuHBPA	FeHBPA	HBPA	CuHBPA	FeHBPA
IOC 0197	64	8	8	64	8	32	> 512	16	32	> 512	32	128
IOC 0198	32	8	16	32	8	16	> 512	16	32	> 512	16	32
IOC 0199	32	4	8	32	8	16	128	16	16	> 512	16	16
IOC 0205	32	16	16	64	32	16	> 512	16	32	> 512	32	16
IOC 0206	32	32	32	32	32	32	> 512	32	32	> 512	32	16
ATCC 32285	32	8	16	32	8	32	> 512	16	16	> 512	32	32
LSASc01	256	32	128	256	32	128	> 512	32	128	> 512	64	128
LSASc02	128	32	64	128	32	128	> 512	32	64	> 512	32	64
LSASc03	64	32	64	128	32	128	> 512	32	64	> 512	32	64
LSASc04	128	32	128	128	32	128	> 512	64	128	> 512	32	128
LSASc05	128	32	64	128	32	128	> 512	32	128	> 512	32	128
LSASc06	128	32	64	256	32	128	> 512	32	128	> 512	32	128
Varição	32-128	4-32	8-128	32-256	8-32	16-128	128-> 512	16-64	16-128	> 512	16-64	16-128
Média Geométrica	67,8	17,9	33,9	80,6	20,2	53,8	128	25,4	50,8	> 512	30,2	53,8

\* (ICZ): Itraconazol; (TRB): Terbinafina; (AMB): Anfotericina B; (L-DOPA): 3,4-diidroxi-L-fenilalanina.

Na tabela 7 estão dispostos os valores da CIM do ligante BS e dos complexos CuBS e FeBS. Pode ser observado que a CIM do ligante BS variou entre 128->512  $\mu\text{g}\text{mL}$  para a fase leveduriforme e filamentosa de crescimento. O complexo CuBS apresentou variação de CIM entre 4-64  $\mu\text{g}\text{mL}$  para a fase leveduriforme e de 16-64  $\mu\text{g}\text{mL}$  para filamentosa, enquanto que o complexo com ferro (FeBS) apresentou variação de CIM entre 16-64  $\mu\text{g}\text{mL}$  para ambas as fases de crescimento.

A CIM dos complexos frente às cepas na forma leveduriforme cultivadas em meio contendo L-DOPA foi de 128->512  $\mu\text{g}\text{mL}$  para o ligante BS, não havendo aumento de resistência entre as cepas. Para o complexo CuBS a variação da CIM ficou entre 8-64  $\mu\text{g}\text{mL}$  com aumento de resistência de 25% (3/12) das cepas, enquanto que para o complexo FeBS a variação da CIM foi entre 16-64  $\mu\text{g}\text{mL}$ , com aumento de 42% (5/12) de resistência das cepas testadas. Na forma filamentosa foi observado que a CIM do complexo com cobre (CuBS) apresentou aumento da resistência, com CIM variando entre 16-128  $\mu\text{g}\text{mL}$  e 16-64  $\mu\text{g}\text{mL}$ , respectivamente. Enquanto que no tratamento com o complexo com ferro (FeBS) a variação da CIM foi entre 4-64  $\mu\text{g}\text{mL}$  com aumento de 17% (2/12) de resistência das cepas.

Ao converter os valores das CIMs destes compostos para nanomolar, foi observado que os três antifúngicos testados neste trabalho frente a *Sporothrix* apresentaram valores de CIM inferior aos complexos de cobre e ferro CuBS e FeBS. No entanto, esta conversão não foi válida para a molécula ligante BS, quando comparados os valores da CIM deste ligante com os antifúngicos terbinafina e anfotericina B frente às cepas CMDDB 01970599, CMDDB 02020699, ATCC 32285 e cepas clínicas LSASs01, LSASs04, LSASs05 e LSASs06 (Apêndice D).

Tabela 7. Concentração inibitória mínima ( $\mu\text{g/mL}$ ) do ligante BS e seus complexos com cobre e ferro sobre isolados de *Sporothrix* melanizados e não melanizados nas formas leveduriforme e filamentosa de crescimento.

Cepas	Forma Leveduriforme						Forma Filamentosa					
	CIM <sub>90</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )			CIM <sub>90</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ ) + L-DOPA			CIM <sub>90</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )			CIM <sub>90</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ ) + L-DOPA		
	BS	CuBS	FeBS	BS	CuBS	FeBS	BS	CuBS	FeBS	BS	CuBS	FeBS
IOC 0197	128	32	16	128	32	32	128	64	64	256	64	128
IOC 0198	128	16	32	128	16	32	128	16	32	256	16	32
IOC 0199	128	16	16	128	16	16	128	16	16	256	16	32
IOC 0205	256	16	32	256	16	32	256	64	64	256	128	64
IOC 0206	> 512	4	16	> 512	8	16	> 512	64	64	> 512	64	64
ATCC 32285	> 512	4	16	> 512	8	16	> 512	16	16	> 512	64	16
LSASc01	256	64	64	256	64	64	> 512	64	64	> 512	128	128
LSASc02	128	64	64	128	64	64	> 512	64	64	> 512	64	64
LSASc03	128	64	64	128	64	64	> 512	64	64	> 512	64	128
LSASc04	256	64	64	256	64	64	> 512	64	64	> 512	64	128
LSASc05	128	64	64	128	64	64	> 512	64	64	> 512	64	64
LSASc06	256	64	64	256	64	64	> 512	64	64	> 512	64	64
Variação	128->512	4-64	16-64	128->512	8-64	16-64	128->512	16-64	16-64	256->512	16-128	32-128
Média Geométrica	168,9	26,9	35,9	168,9	30,2		152,1	45,3	47,9	256	57,0	64

\* (ICZ): Itraconazol; (TRB): Terbinafina; (AMB): Anfotericina B; (L-DOPA): 3,4-diidroxi-L-fenilalanina.

Na tabela 8 pode ser observado o perfil de sensibilidade das cepas de *Sporothrix* spp. frente ao ligante BE e seus complexos com cobre (CuBE) e ferro (FeBE). Foi observado que a CIM do ligante BE variou entre 16-256  $\mu\text{g}\backslash\text{mL}$  para a fase leveduriforme e de 64-512  $\mu\text{g}\backslash\text{mL}$  para a fase filamentosa de crescimento. O complexo CuBE apresentou variação de CIM entre 8-64  $\mu\text{g}\backslash\text{mL}$  para a fase leveduriforme e de 16-64  $\mu\text{g}\backslash\text{mL}$  para filamentosa, enquanto que o complexo com ferro (FeBE) apresentou variação de CIM entre 32-128  $\mu\text{g}\backslash\text{mL}$  e 64-128  $\mu\text{g}\backslash\text{mL}$ , para as fases leveduriforme e filamentosa, respectivamente.

A CIM dos complexos frente às cepas na forma leveduriforme cultivadas em meio contendo L-DOPA foi de 32-512  $\mu\text{g}\backslash\text{mL}$  para o ligante BE, com aumento de resistência de 25% (3/12) das cepas. Para o complexo CuBE a variação da CIM ficou entre 8-64  $\mu\text{g}\backslash\text{mL}$  com aumento de resistência de 42% (5/12) das cepas, enquanto que para o complexo FeBE a variação da CIM entre 16-128  $\mu\text{g}\backslash\text{mL}$ , com aumento de 17% (2/12) de resistência das cepas testadas. Na forma filamentosa foi observado que 17% (2/12) das cepas tratadas com o ligante BE e com o complexo com ferro (FeBE) apresentaram aumento da resistência, com CIM variando entre 64-512  $\mu\text{g}\backslash\text{mL}$  e 32-128  $\mu\text{g}\backslash\text{mL}$ , respectivamente. Enquanto que tratamento com o complexo com cobre (CuBE) a variação da CIM foi entre 32-128  $\mu\text{g}\backslash\text{mL}$  com aumento de 33% (4/12) de resistência das cepas.

Ao converter os valores da CIM dos complexos de cobre e ferro (CuBE e FeBE) para nanomolar, também foi observado que estes compostos apresentaram valores da CIM mais baixos do que os antifúngicos itraconazol, terbinafina e anfotericina B frente a todas as cepas. A exceção novamente ficou para a molécula ligante deste grupo, onde BE apresentou CIM maiores que a terbinafina e anfotericina B frente às cepas clínicas LSASs04, LSASs05 e LSASs06 (Apêndice E).

Tabela 8. Concentração inibitória mínima ( $\mu\text{g/mL}$ ) do ligante BE e seus complexos com cobre e ferro sobre isolados de *Sporothrix* melanizados e não melanizados nas formas leveduriforme e filamentosa de crescimento.

Cepas	Forma Leveduriforme						Forma Filamentosa					
	CIM <sub>90</sub> ( $\mu\text{mol/mL}$ )			CIM <sub>90</sub> ( $\mu\text{mol/mL}$ ) + L-DOPA			CIM <sub>90</sub> ( $\mu\text{mol/mL}$ )			CIM <sub>90</sub> ( $\mu\text{mol/mL}$ ) + L-DOPA		
	BE	CuBE	FeBE	BE	CuBE	FeBE	BE	CuBE	FeBE	BE	CuBE	FeBE
IOC 0197	16	8	32	32	8	32	128	32	64	64	64	128
IOC 0198	64	16	32	64	16	32	128	16	64	128	32	64
IOC 0199	64	8	32	64	16	16	128	32	64	64	32	32
IOC 0205	64	32	64	64	64	128	256	32	64	128	32	64
IOC 0206	32	16	32	64	32	32	256	64	64	256	64	64
ATCC 32285	32	16	32	32	32	32	64	32	64	64	64	64
LSASc01	128	64	64	128	64	128	128	64	128	128	64	64
LSASc02	128	64	64	128	64	64	> 512	64	64	> 512	64	128
LSASc03	64	32	64	64	32	64	> 512	32	64	> 512	32	64
LSASc04	256	32	128	□ 512	64	128	256	64	128	> 512	128	64
LSASc05	128	32	64	128	32	32	128	32	64	256	32	64
LSASc06	256	32	64	256	64	64	128	64	64	128	64	64
Variação	16-256	8-64	32-128	32-> 512	8-64	16-128	64-> 512	16-64	64-128	64-> 512	32-128	32-128
Média Geométrica	76,1	23,9	50,7	77,3	33,9	50,8	147,0	40,3	71,8	118,5	50,8	67,8

\* (ICZ): Itraconazol; (TRB): Terbinafina; (AMB): Anfotericina B; (L-DOPA): 3,4-diidroxi-L-fenilalanina.

Na tabela 9 pode ser observado o perfil de sensibilidade das cepas de *Sporothrix* spp. frente ao ligante HPCINOL e seus complexos com cobre, ferro e manganês. Foi observado que a CIM do ligante HPCINOL variou entre 64-512  $\mu\text{g}\text{mL}^{-1}$  para a fase leveduriforme e de 128-256  $\mu\text{g}\text{mL}^{-1}$  para a fase filamentosa de crescimento. O complexo CuHPCINOL apresentou variação da CIM entre 16-128  $\mu\text{g}\text{mL}^{-1}$  para a fase leveduriforme e de 32-64  $\mu\text{g}\text{mL}^{-1}$  para filamentosa, enquanto que o complexo com ferro (FeHPCINOL) apresentou variação da CIM entre 32-256  $\mu\text{g}\text{mL}^{-1}$  e 32-128  $\mu\text{g}\text{mL}^{-1}$  para as fases leveduriforme e filamentosa, respectivamente. Finalmente, o complexo MnHPCINOL apresentou variação da CIM entre 16-256  $\mu\text{g}\text{mL}^{-1}$  e 16-64  $\mu\text{g}\text{mL}^{-1}$  para as fases leveduriforme e filamentosa, respectivamente.

A CIM dos complexos frente às cepas na forma leveduriforme cultivadas em meio contendo L-DOPA foi de 64-512  $\mu\text{g}\text{mL}^{-1}$  para o ligante, com aumento de resistência de 33% (4/12) das cepas. Para o complexo CuHPCINOL a variação da CIM ficou entre 16-256  $\mu\text{g}\text{mL}^{-1}$  com aumento de resistência de 42% (5/12) das cepas, enquanto que para o complexo FeHPCINOL a variação da CIM foi entre 32-128  $\mu\text{g}\text{mL}^{-1}$ , com aumento de 25% (3/12) de resistência das cepas testadas. Para o complexo com manganês (MnHPCINOL), a variação da CIM foi entre 64-256  $\mu\text{g}\text{mL}^{-1}$  com aumento de resistência de 42% das cepas. Na forma filamentosa foi observado que 33% (4/12) das cepas tratadas com o ligante HPCINOL e o complexo FeHPCINOL apresentaram aumento da resistência, com CIM variando entre 128-256  $\mu\text{g}\text{mL}^{-1}$  e 32-128  $\mu\text{g}\text{mL}^{-1}$ , respectivamente. O tratamento com o complexo CuHPCINOL apresentou uma variação da CIM entre 32-128  $\mu\text{g}\text{mL}^{-1}$  com aumento de 42% (5/12) de resistência das cepas, enquanto que o complexo MnHPCINOL apresentou uma variação da CIM entre 64-256  $\mu\text{g}\text{mL}^{-1}$  com aumento 25% (3/12) de resistência das cepas.

Os valores das CIMs destes complexos quando convertidos para nanomolar e comparados com os valores das CIMs dos antifúngicos testados, mostraram que nesta unidade seus valores de CIM foram menores para determinadas cepas de *Sporothrix* do que para outras. Estes resultados podem ser observados no Apêndice F.



Tabela 9. Concentração inibitória mínima ( $\mu\text{g/mL}$ ) do ligante HPCINOL e seus complexos com cobre, ferro e manganês sobre isolados de *Sporothrix* melanizados e não melanizados nas formas leveduriforme e filamentosa de crescimento.

Cepas	Fase Leveduriforme								Fase Filamentosa							
	CIM <sub>90</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )				CIM <sub>90</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ ) + L-DOPA				CIM <sub>90</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )				CIM <sub>90</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ ) + L-DOPA			
	HP	CuHP	FeHP	MnHP	HP	CuHP	FeHP	MnHP	HP	CuHP	FeHP	MnHP	HP	CuHP	FeHP	MnHP
IOC 0197	256	64	128	256	128	128	128	256	128	32	64	32	256	32	128	32
IOC 0198	128	64	64	64	128	64	64	64	128	32	64	32	128	32	128	64
IOC 0199	128	16	32	16	128	16	32	64	128	32	32	32	128	32	32	32
IOC 0205	256	64	64	64	512	64	128	128	256	32	64	32	>512	64	64	64
IOC 0206	256	64	128	64	512	128	128	64	256	64	64	64	256	128	64	32
ATCC 32285	64	32	64	64	64	32	64	64	128	32	64	16	128	32	64	32
LSASc01	256	128	64	32	>512	128	64	64	256	32	64	32	>512	32	64	32
LSASc02	256	64	64	128	>512	128	128	128	256	64	64	64	256	128	64	32
LSASc03	>512	32	256	256	>512	32	128	128	128	16	128	32	128	64	128	32
LSASc04	256	64	64	16	256	128	128	64	256	32	64	32	>512	64	128	32
LSASc05	256	64	128	128	256	64	128	128	128	64	128	32	128	64	128	32
LSASc06	>512	128	128	32	>512	256	128	64	128	64	64	32	128	64	128	32
<b>Variação</b>	64- >512	16- 128	32- 256	16- 256	64- >512	16- 256	32- 128	64- 256	128- 256	32-64	32- 128	16-64	128-256	16-64	32-128	32-64
<b>Média Geométrica</b>	194,0	57,0	85,4	64	197,4	76,1	95,9	90,5	170,8	38,0	67,8	33,9	161,3	53,8	85,4	35,9

\* (ICZ): Itraconazol; (TRB): Terbinafina; (AMB): Anfotericina B; (L-DOPA): 3,4-diidroxi-L-fenilalanina.

## **6.2. Efeito dos compostos sobre a permeabilidade da membrana plasmática das células fúngicas**

Após a incubação das leveduras em fase exponencial durante 48 h com os compostos, as células tratadas e não tratadas do fungo *Sporothrix* spp. foram avaliadas qualitativamente quanto a capacidade dos compostos em danificar a integridade da membrana plasmática através da marcação com o corante vital SYTOX Green.

No controle negativo representado pelas células leveduriformes não tratadas (Figura 18 A) nenhuma fluorescência foi observada, indicando que as membranas das células encontravam-se íntegras, enquanto que o tratamento com o antifúngico itraconazol, utilizado como controle positivo promoveu a perda da integridade da membrana plasmática das leveduras demonstrada pela marcação do material genético das leveduras incubadas com Sytox Green (Figura 18 B).

Em células tratadas com os sais de heteropoliácidos de prata (Figuras 18 C, D, E e F) também foi observada a marcação das células previamente tratadas em concentrações subinibitórias indicando que estes compostos interferiram na integridade da membrana e permitiram a permeabilização e marcação do material genético pelo corante SYTOX Green.

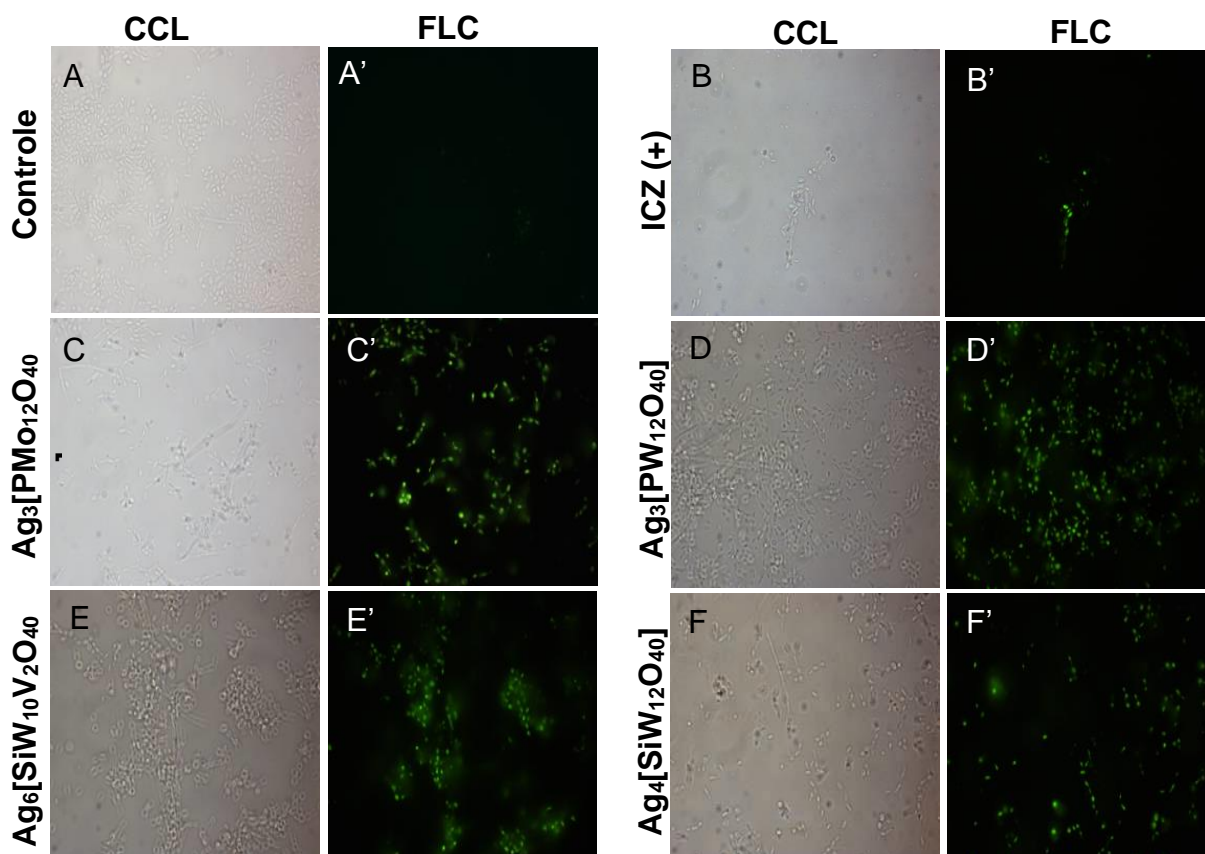


Figura 18. Microscopia óptica de campo claro e de fluorescência de células leveduriforme de *Sporothrix* spp. marcadas com Sytox Green™ após 24h de incubação com sais de HPAs de prata. (A) Células controle negativo (ausência de tratamento) visualizadas por campo claro; (A') células controle negativo (ausência de tratamento) visualizadas por fluorescência; (B) Células controle positivo (presença de ICZ) visualizadas por campo claro; (B') Células controle positivo (presença de ICZ) visualizadas por fluorescência; (C, D, E e F) Células tratadas com sais de HPAs de prata visualizadas por campo claro. (C', D', E' e F') Células tratadas com sais de HPAs de prata visualizadas por fluorescência. (Todas as células foram visualizadas com um aumento de 630X. (CCL: Campo claro; FLC: Fluorescência; ICZ: Itraconazol).

Nas figuras 19, 20 e 21 podem ser observados os resultados obtidos sobre a permeabilização de membranas das leveduras de *Sporothrix* quando incubadas na presença dos complexos de coordenação formados pelos ligantes BMPA, HBPA, BS e BE com os metais cobre e ferro e o ligante HPCINOL com os metais cobre, ferro e manganês. Verificou-se que em todos os tratamentos com os complexos metálicos e de seus ligantes livres em concentrações subinibitórias houve marcação do material genético pelo corante SYTOX Green indicando que estes compostos sintéticos promoveram a perda da integridade das membranas das células leveduriformes de *Sporothrix*.

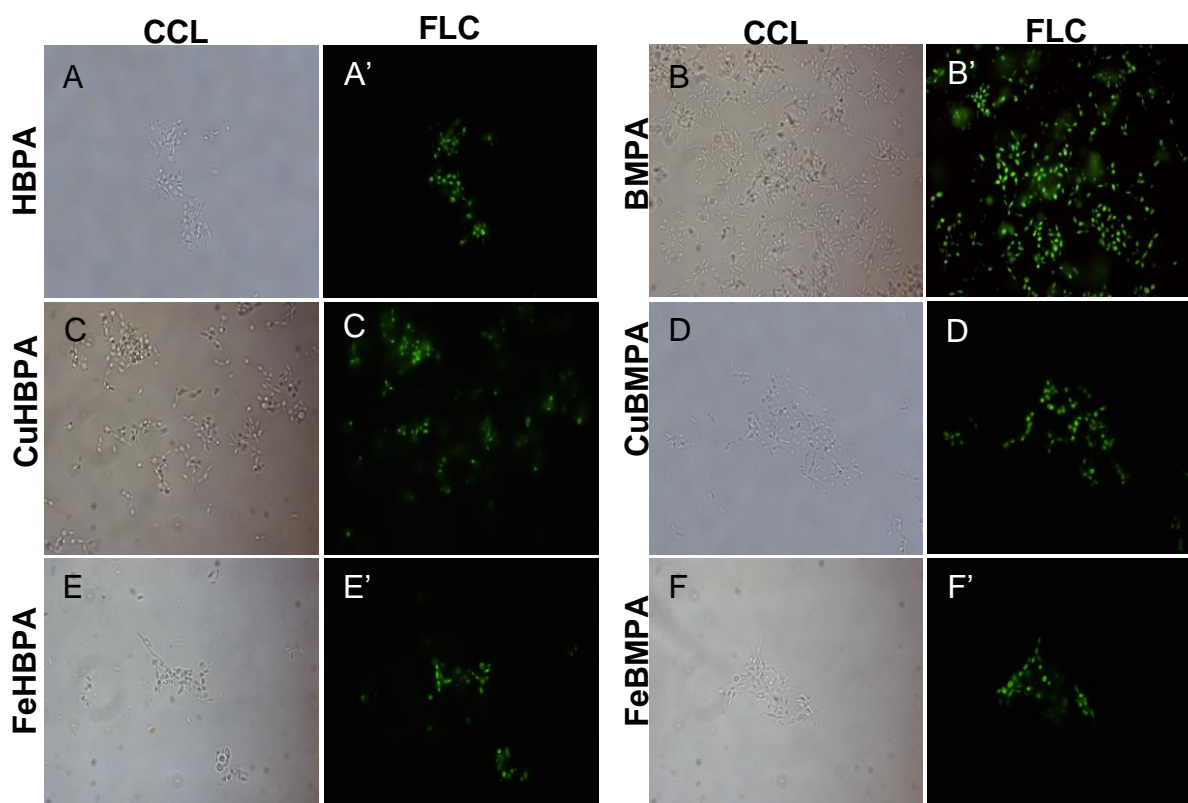


Figura 19. Microscopia óptica de campo claro e de fluorescência de células leveduriforme de *Sporothrix* spp. marcadas com Sytox Green™ após 24h de incubação com complexos de coordenação de cobre e ferro formados com os ligantes HBPA e BMPA. (A, B, C, D, E e F) Células tratadas com complexos de coordenação visualizadas por campo claro. (A', B', C', D', E' e F') Células tratadas com complexos de coordenação visualizadas por fluorescência. (Todas as células foram visualizadas com um aumento de 630X. (CCL: Campo claro; FLC: Fluorescência).

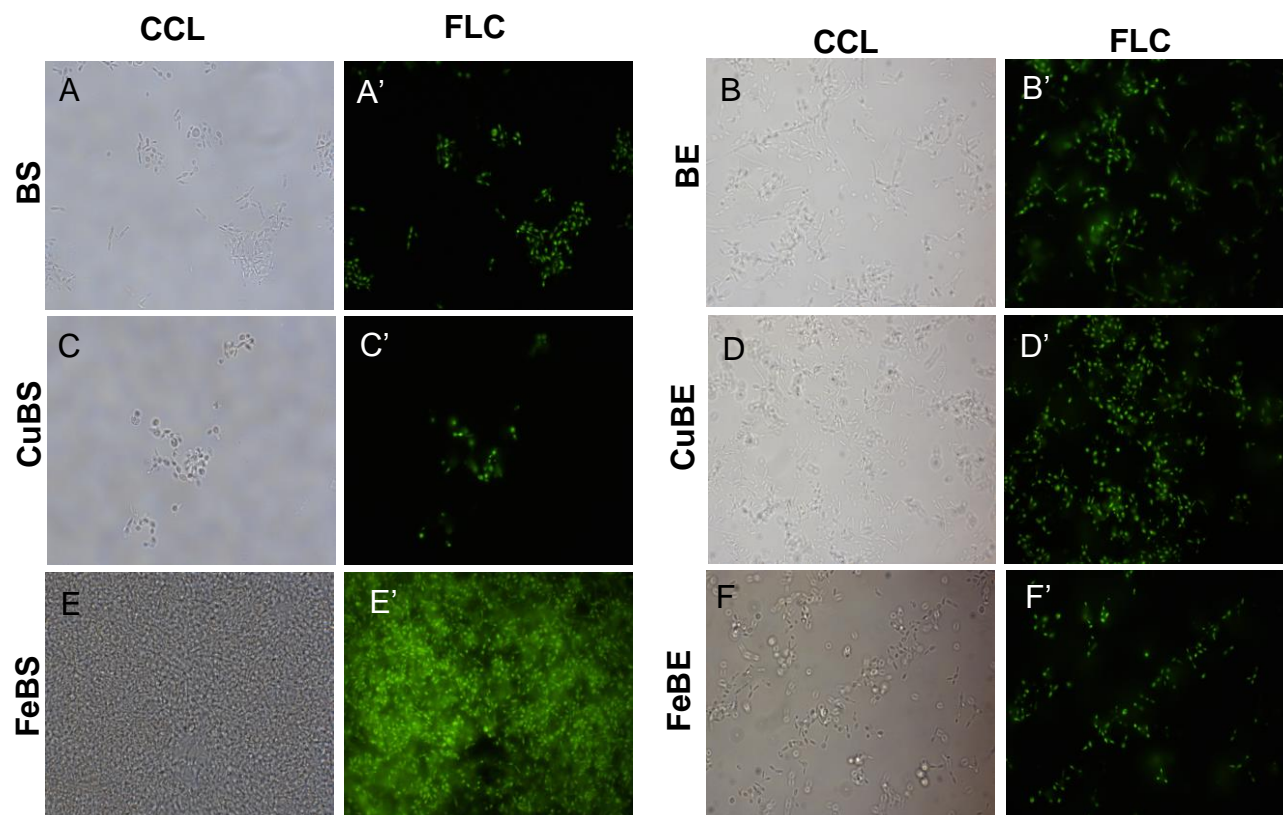


Figura 20. Microscopia óptica de campo claro e de fluorescência de células leveduriforme de *Sporothrix* spp. marcadas com Sytox Green<sup>TM</sup> após 24h de incubação com complexos de coordenação de cobre e ferro formados com os ligantes BS e BE. (A, B, C, D, E e F) Células tratadas com complexos de coordenação visualizadas por campo claro. (A', B', C', D', E' e F') Células tratadas com complexos de coordenação visualizadas por fluorescência. (Todas as células foram visualizadas com um aumento de 630X. (CCL: Campo claro; FLC: Fluorescência).

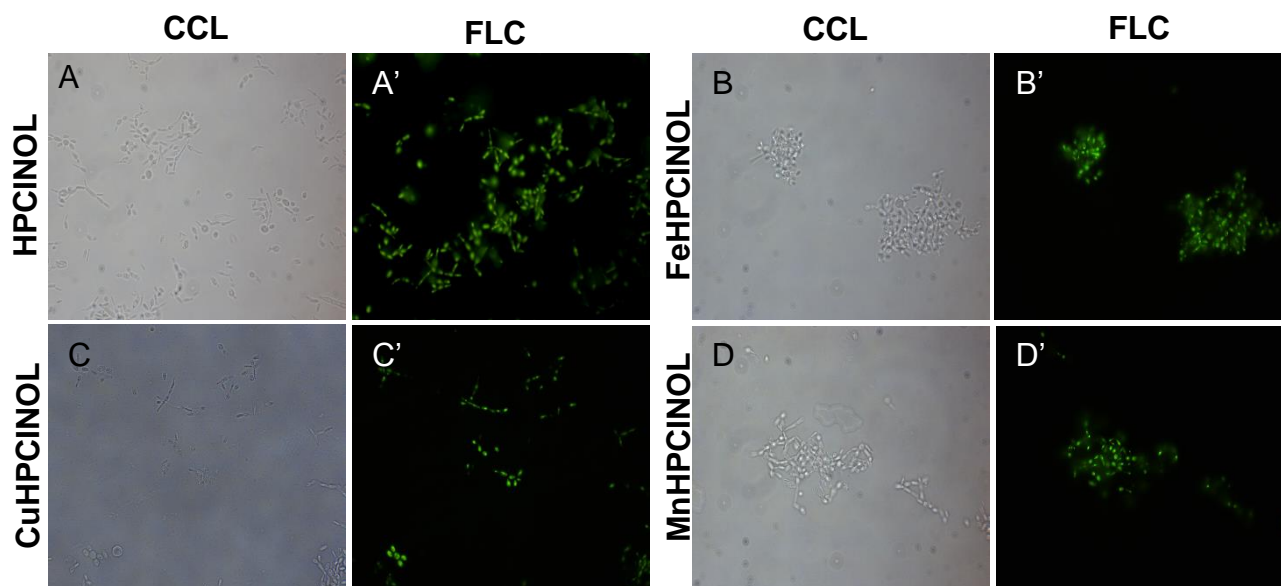


Figura 21. Microscopia óptica de campo claro e de fluorescência de células leveduriformes de *Sporothrix* spp. marcadas com Sytox Green™ após 24h de incubação com complexos de coordenação de cobre, ferro e manganês formados com o ligante HPCINOL. (A, B, C e D) Células tratadas com complexos de coordenação visualizadas por campo claro. (A', B', C' e D') Células tratadas com complexos de coordenação visualizadas por fluorescência. (Todas as células foram visualizadas com um aumento de 630X. (CCL: Campo claro; FLC: Fluorescência).

Conforme pode ser observado na figura 22, as células leveduriformes de *Sporothrix* previamente tratadas com o extrato etanólico de *Capsicum annum L.* (Figura 22 A) e análogos sintéticos da capsaicina (SA1, SA2 e SA3) apresentaram seu material genético marcado pelo corante Sytox Green (Figuras B, C e D), assim como demonstrado pelas substâncias padrão capsaicina e diidrocapsaicina (Sigma Aldrich, USA) utilizadas como controles positivos, sugerindo que estes compostos foram capazes de causar mudanças na permeabilidade das membranas das leveduras e permitiram a penetração do corante quando comparadas ao controle negativo (Figura 18 A) que não apresentou marcação pelo corante.



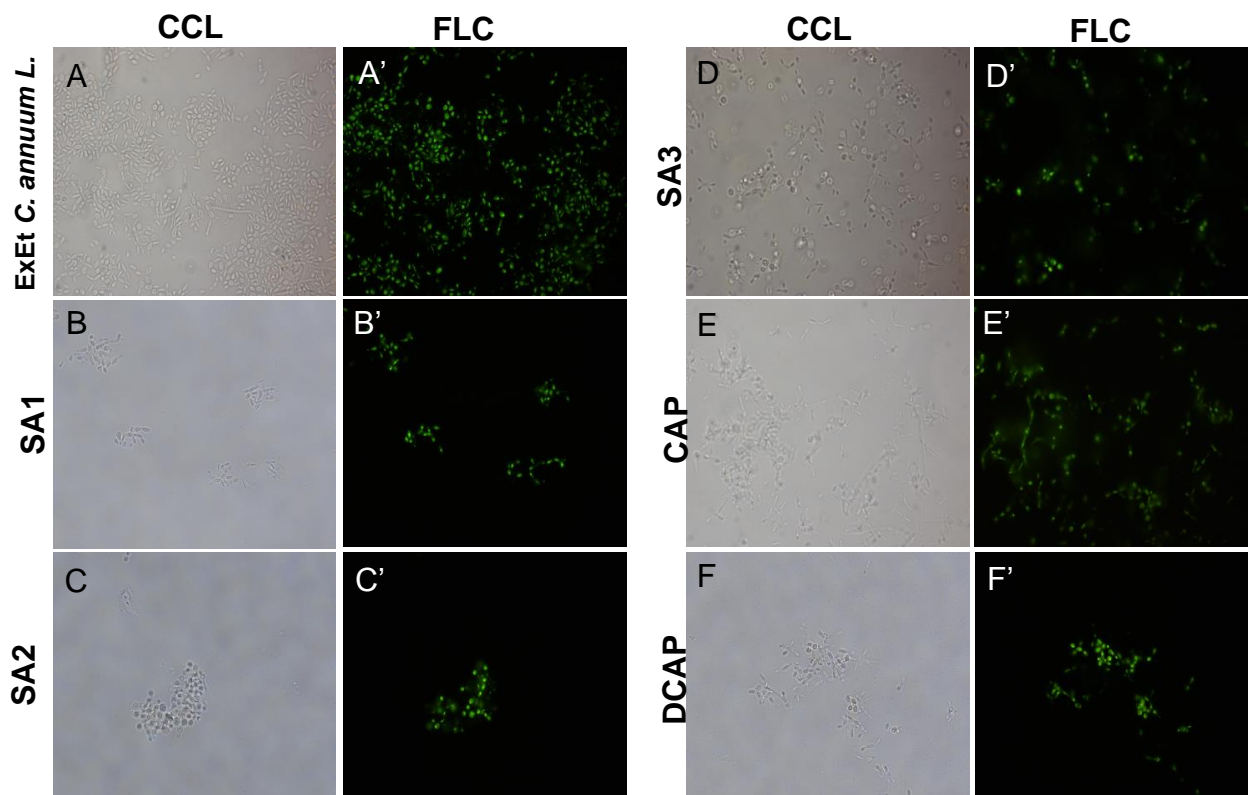


Figura 22. Microscopia óptica de campo claro e de fluorescência de células leveduriforme de *Sporothrix* spp. marcadas com Sytox Green™ após 24h de incubação com extrato etanólico de *C. annuum* L. e análogos sintéticos da capsaicina e diidrocapsaicina. (A, B, C, D, E e F) Células tratadas visualizadas por campo claro. (A', B', C', D', E' e F') Células tratadas visualizadas por fluorescência. (Todas as células foram visualizadas com um aumento de 630X. (CCL: Campo claro; FLC: Fluorescência; ExEt: extrato etanólico; SA1; SA2; SA3; CAP: Capsaicina; DCAP: Diidrocapsaicina).

### 6.3. Efeitos dos compostos sobre a ultraestrutura de *Sporothrix* spp.

#### 6.3.1. Microscopia Eletrônica de Varredura

##### 6.3.1.1. Controles negativo e positivos

Por microscopia eletrônica de varredura foi verificado que as leveduras não tratadas do isolado LSASs01 de *Sporothrix* spp. apresentaram células com

morfologia elíptica e com múltiplos brotamentos (Figura 23 A). Leveduras isoladas também foram observadas com formas mais arredondadas, mas geralmente estas correspondem às células filhas originadas do brotamento (Figura 23 B). Também foi observado em maior aumento que as leveduras isoladas apresentavam uma camada superficial de aspecto “enrugado”, que possivelmente corresponde à camada microfibrilar (Figura 23 B).

Após o tratamento com o antifúngico itraconazol (Figura 23 C) e terbinafina (Figura 23 D) foi observado que as leveduras apresentaram vários brotamentos simples e presença de células com formato de pseudo-hifas. Após o tratamento com anfotericina B foi observado a presença de células ovaladas, alongadas e outras com formato de pseudo-hifas. Além disso, pode ser observado a presença de material se desprendendo das células que provavelmente correspondem à camada de microfibrilas (Figura 23 E).

#### **6.3.1.2 Sais de Heteropoliácidos de Prata**

Como pode ser observado na figura 24, algumas alterações foram observadas nas leveduras tratadas durante 48h com os sais de HPA de prata. Em células tratadas com  $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$  foi observado poucos brotamentos simples e várias leveduras isoladas e com formatos diferenciados (Figura 24 A). Leveduras tratadas com o sal de HPA  $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$  mostram-se maiores e com brotamento simples sem alterações drásticas (figuras 24 B). Leveduras tratadas com os sais contendo silício apresentaram um aspecto mais “inchado” quando comparadas com as leveduras que receberam tratamento com os sais contendo fósforo e ao controle (figuras 24 C e D). Porém, pôde ser observado uma sobreposição da camada da parede celular com superfície enrugada, sendo que nas leveduras tratadas com  $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$  houve um destacamento desta camada (figura 24 D).



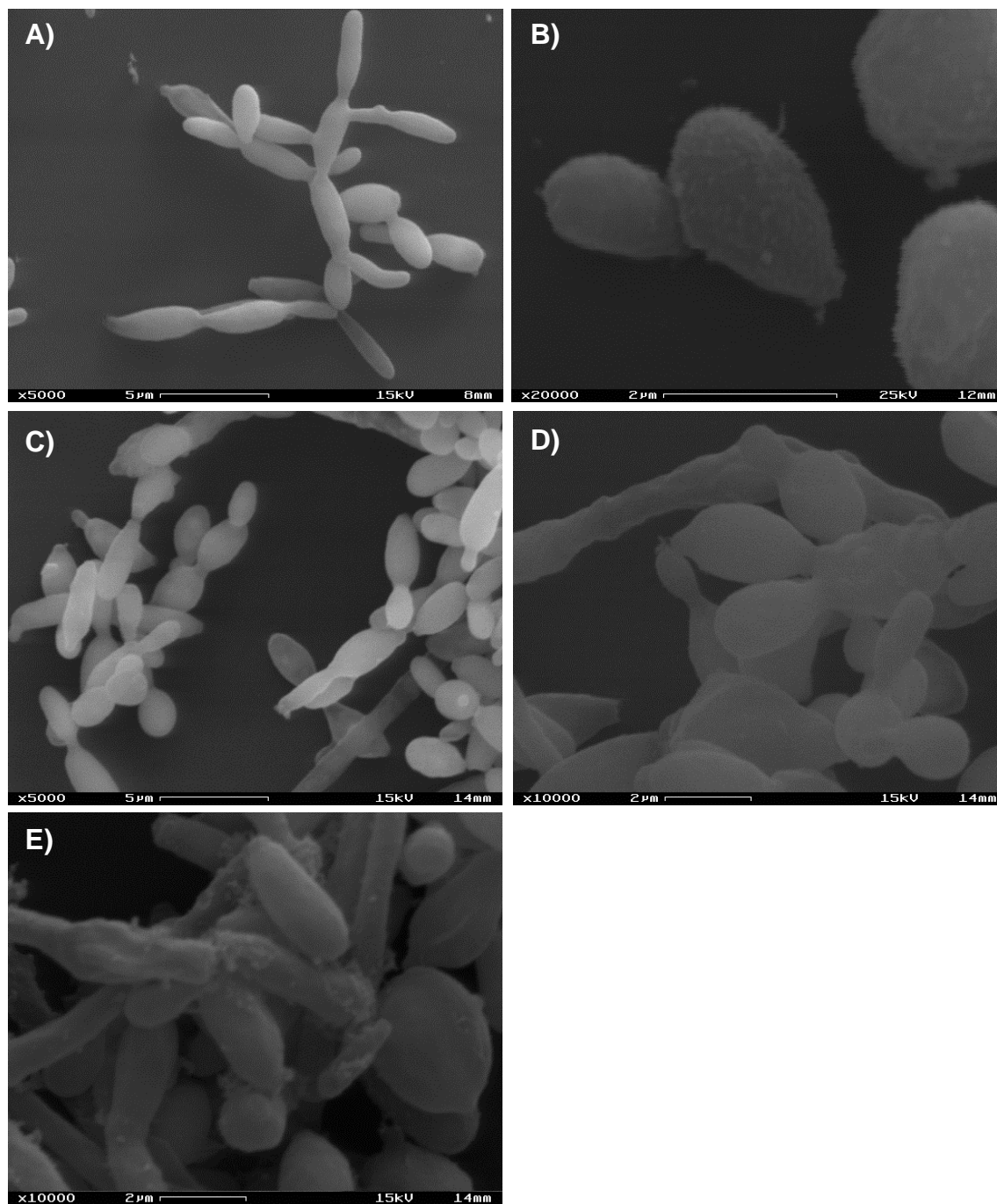


Figura 23. MEV da forma leveduriforme do isolado de *Sporothrix LSASs01* sem tratamento mostrando leveduras mais alongadas e em brotamento (A) e leveduras isoladas demonstrando a camada de microfibrilas (B). Leveduras tratadas com ICZ demonstraram bastante brotamentos (C); leveduras tratadas com TBF apresentaram brotamento e com morfologia semelhante a pseudo-hifas (D); leveduras tratadas com anfotericina B mostraram células com formas ovaladas, alongadas e semelhante a pseudo-hifas e indícios de descolamento da camada microfibrilar (E).

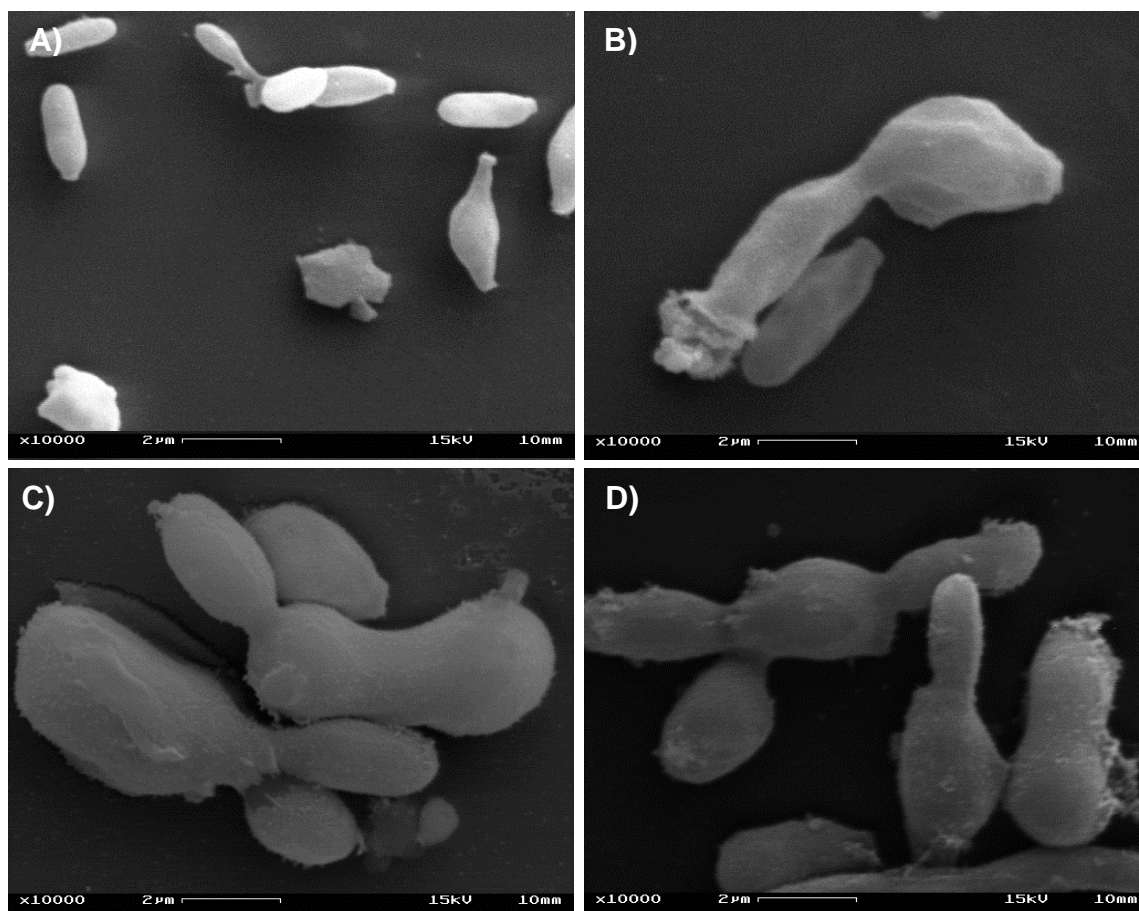


Figura 24. MEV da forma leveduriforme do isolado de *Sporothrix* LSASs01 após tratamento com  $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$  (A);  $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$ ; (B);  $\text{g}_4[\text{SiW}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]$  (C);  $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$  (D).

### 6.3.1.3 Complexos de Coordenação

Células leveduriformes tratadas com os complexos de coordenação também demonstraram inúmeras alterações em sua estrutura. A análise por MEV das células tratadas com o ligante BMPA mostrou leveduras arredondadas e com brotamentos curtos e aspecto enrugado (Figura 25 A). As células tratadas com o complexo com cobre ( $\text{CuBMPA}$ ) apresentaram-se alongadas com aspecto de pseudo-hifas (Figura 25 B), enquanto que no tratamento com complexo com ferro ( $\text{FeBMPA}$ ) foi observado

leveduras mais ovaladas e isoladas e contendo uma camada superficial (Figura 25 C). Leveduras tratadas com o ligante HBPA apresentaram morfologia normal com poucos brotamentos (Figura 25 D). As leveduras tratadas com o complexo CuHBPA apresentaram-se isoladas e algumas com morfologia bastante danificadas (Figura 25 E), enquanto que as células tratadas com o complexo FeHBPA apresentaram-se isoladas e a presença de pseudo-hifas (Figura 25 F).

Células observadas por MEV revelaram que o tratamento com o ligante BS e com o complexo CuBS provocaram mudanças na morfologia em algumas leveduras tornando-as “amassadas” e com formato de pseudo-hifa (Figuras 26 A e B), enquanto as leveduras tratadas com o complexo FeBS mostraram-se mais alongadas, com brotamentos e presença de algumas células isoladas (Figura 26 C).

Quanto as leveduras após o tratamento com o ligante BE, foi observado por MEV a presença de células isoladas e com brotamento (Figura 26 D), enquanto que células tratadas com o complexo CuBE apresentaram-se isoladas com formato mais arredondado e com marcas de brotamento (Figura 26 E). Após o tratamento com FeBE, foi observado leveduras mais alongadas e com brotamento e algumas células mais prejudicadas (Figura 26 F).

Análise por MEV das leveduras tratadas com o ligante HPCINOL revelou que as mesmas apresentaram-se mais alongadas com formato de pseudo-hifas (Figura 27 A). Leveduras tratadas com o CuHPCINOL apresentaram brotamentos e pseudo-hifas (Figura 27 B), enquanto que as tratadas com FeHPCINOL apresentaram formas mais arredondadas com marcas de brotamento e presença de hifas sem conídios (Figura 27 C). Leveduras tratadas com o complexo MnHPCINOL apresentaram-se mais isoladas e com algumas células mais prejudicadas (Figura 27 D).

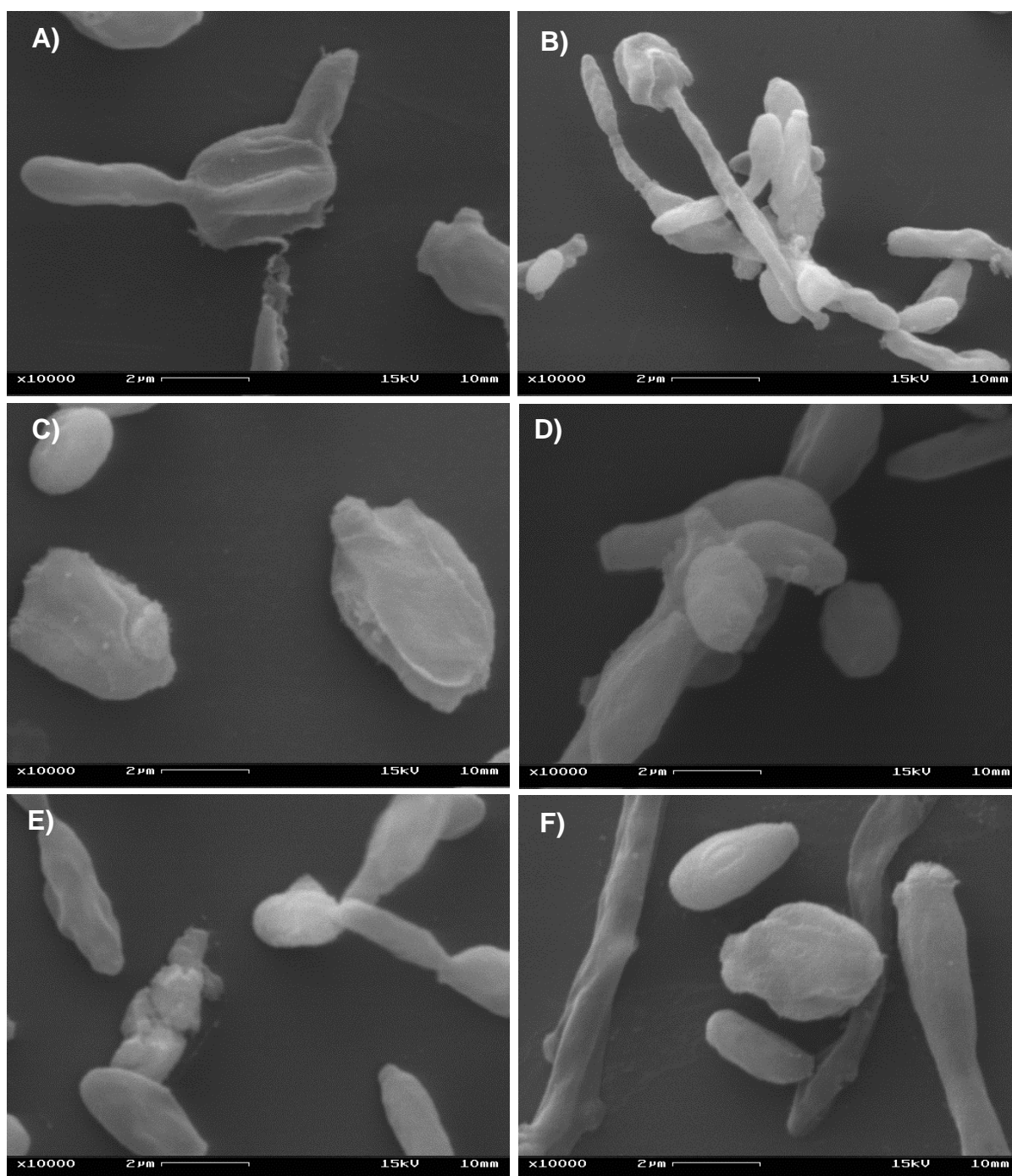


Figura 25. MEV de leveduras de *Sporothrix* spp LSASs01 tratadas com o ligante BMPA (A); tratadas com o complexo CuBMPA (B); tratadas com o complexo FeBMPA (C); tratadas com o ligante HBPA (D); tratadas com o complexo CuHBPA (E); tratadas com o complexo FeHBPA (F).

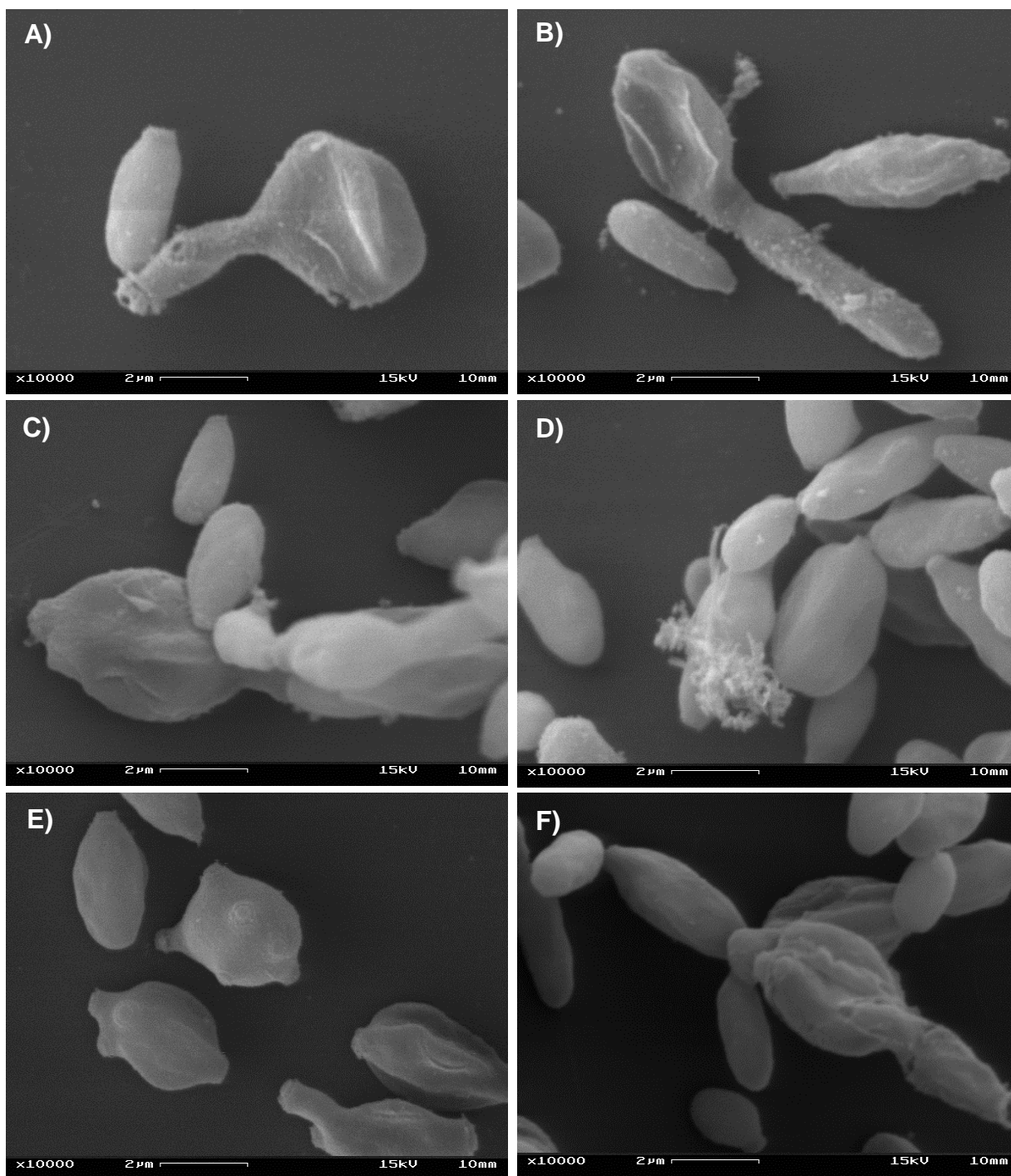


Figura 26. MEV de leveduras de *Sporothrix* spp LSASs01 tratadas com o ligante BS (A); tratadas com o complexo CuBS (B); tratadas com o complexo FeBS (C); tratadas com o ligante BE (D); tratadas com o complexo CuBE (E); tratadas com o complexo FeBE (F).

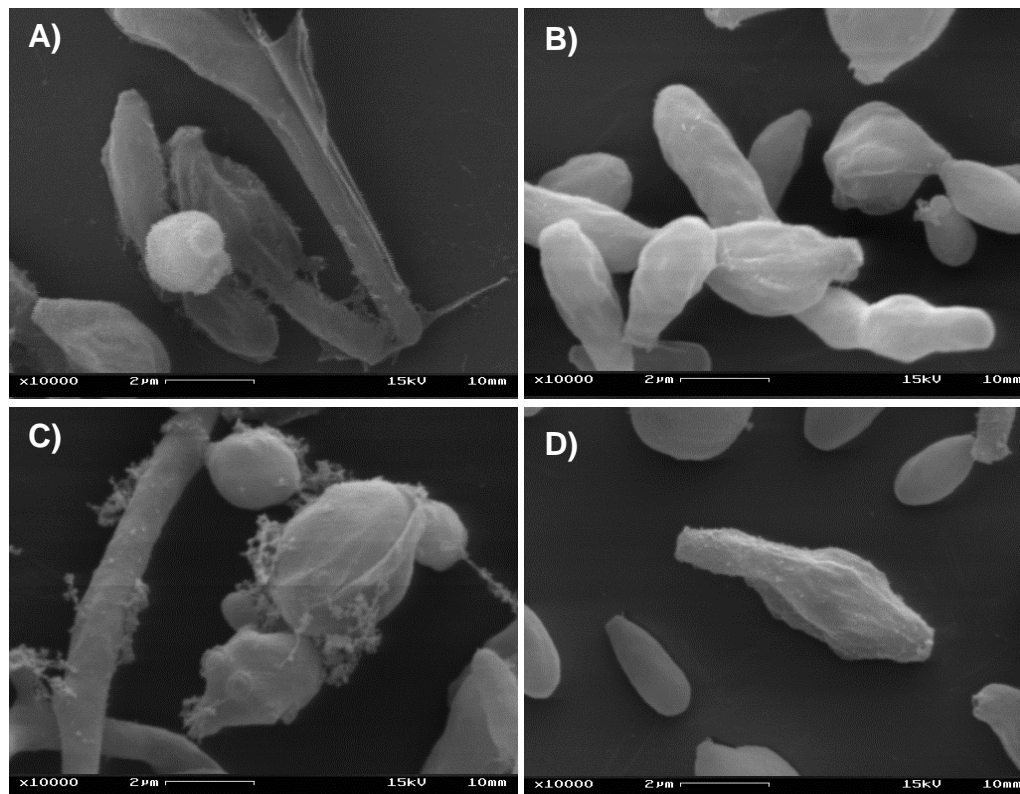


Figura 27. MEV de leveduras de *Sporothrix* spp LSASs01 tratadas com o ligante HPCINOL (A); tratadas com o complexo CuHPCINOL (B); tratadas com o complexo FeHPCINOL (C); tratadas com o complexo MnHPCINOL (D).

#### 6.3.1.4. Extrato etanólico de *C. annuum* L. e análogos sintéticos capsaicinoide

As micrografias realizadas por MEV de leveduras tratadas com o extrato etanólico de *C. annuum* L. revelaram a presença de células isoladas e em brotamento (Figura 28 A). Após o tratamento com o análogo SA1 foi observado a presença de hifas e pseudo-hifas e algumas células em brotamento (Figura 28 B), enquanto que na presença do análogo SA2, as leveduras apresentaram-se isoladas e na forma de pseudo-hifas (Figura 28 C). Na presença do análogo SA3 foi observado leveduras isoladas e com formas retraídas (Figura 28 D). Em leveduras tratadas com a capsaicina e diidrocapsaicina padrão (controles positivos) observamos células isoladas e na foma de pseudo-hifas (Figuras 28 E e F).



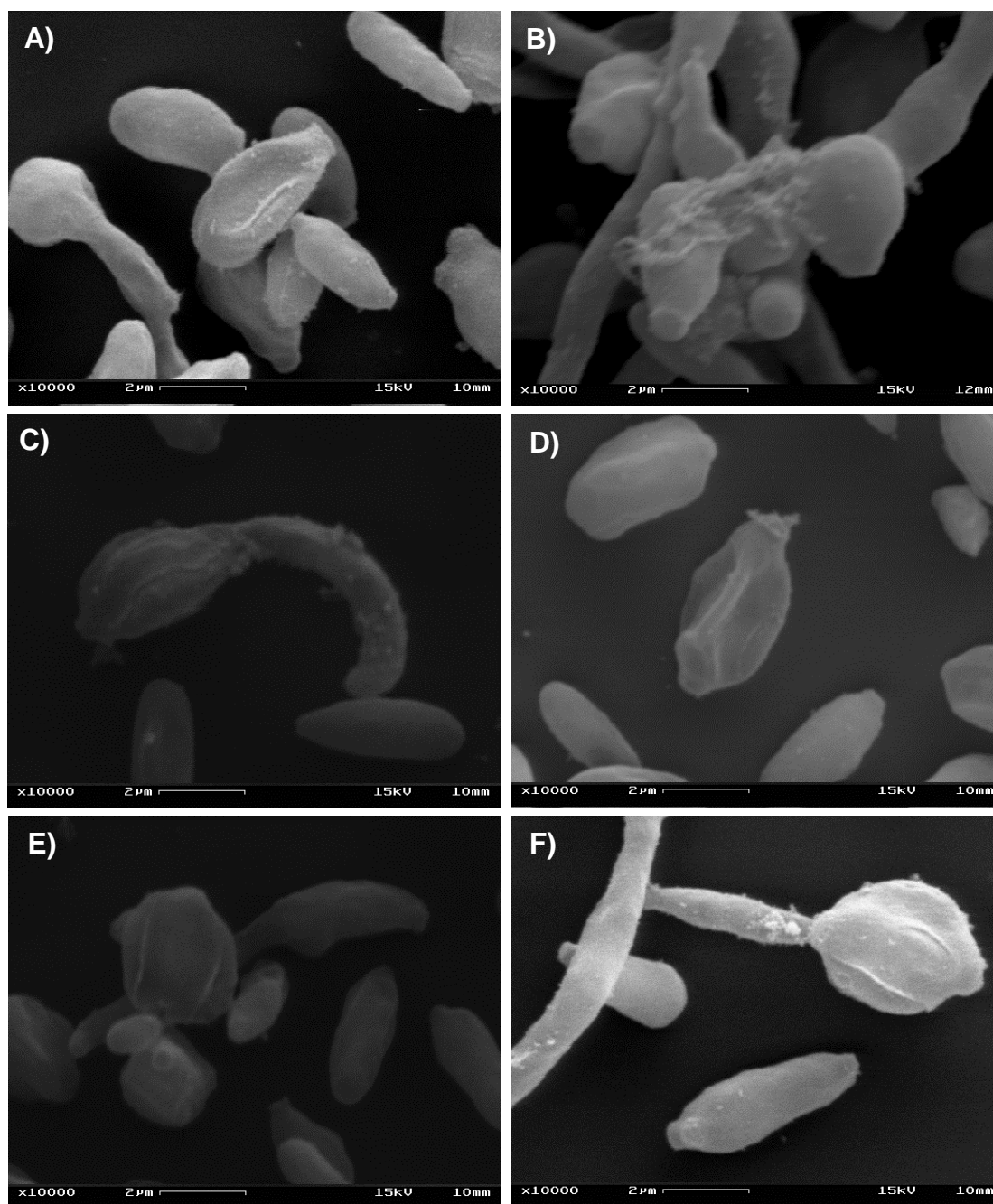


Figura 28. MEV de leveduras de *Sporothrix* spp LSASs01 tratadas com o extrato etanólico de *Capsicum annuum* L (A); leveduras tratadas com o análogo sintético SA-01 (B); leveduras tratadas com o análogo sintético SA-02 (C); leveduras tratadas com o análogo sintético SA-03 (D); leveduras tratadas com o padrão Capsaicina (Sigma Aldrich, USA) (E) e leveduras tratadas com o padrão dihidrocapsaicina (Sigma Aldrich, USA) (F).

### 6.3.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão

A ultraestrutura do fungo *Sporothrix* spp. (LSASs01) cultivado em meio BHI com e sem L-DOPA foi avaliada após os tratamentos por 48h com o extrato etanólico de *C. annuum* L., derivados sintéticos da capsaicina e com os sais de heteropoliácidos de prata e complexos de coordenação com cobre e ferro.

#### 6.3.2.1. Controles negativo e positivos

A análise por MET mostrou que as leveduras não tratadas cultivadas em caldo BHI apresentaram tamanho e forma regulares, eletrondensidade citoplasmática normal, núcleo, muitas mitocôndrias, vacúolos, parede celular homogênea bem delimitada e em íntimo contato com a membrana celular, além de uma camada de material microfibrilar eletrondenso dispostos radialmente e aderido à parede compondo o complexo da parede celular do fungo *Sporothrix*, enquanto que leveduras não tratadas cultivadas na presença de L-DOPA apresentaram uma parede celular mais espessa e quantidade de microfibrilas reduzida, mas com a presença de grânulos eletrondensos do pigmento melanina dispostos na superfície da parede celular, citoplasma mais eletrondenso com presença de vacúolo eletrondenso (Figura 29 A e E).

Após o tratamento com itraconazol as leveduras cultivadas em caldo BHI apresentaram camada microfibrilar menos densa, parede celular bastante espessa, ondulações e retração do citoplasma onde a membrana plasmática se descola da parede celular (seta branca) e presença de corpos lipídicos e pequenas vesículas em contato com a membrana (Figura 29 B), enquanto que leveduras cultivadas em BHI + L-DOPA apresentaram parede celular elétron-lucente com pequenos grânulos eletrodensos em toda sua extensão, ondulações da membrana, citoplasma eletrodenso, mas com a presença de um grande vacúolo elétron-lucente ocupando metade da célula contendo vacúolos eletrodensos e elétron-lucentes. Ainda foi

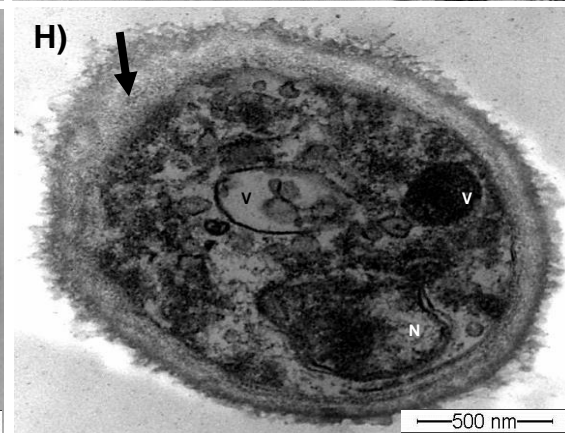
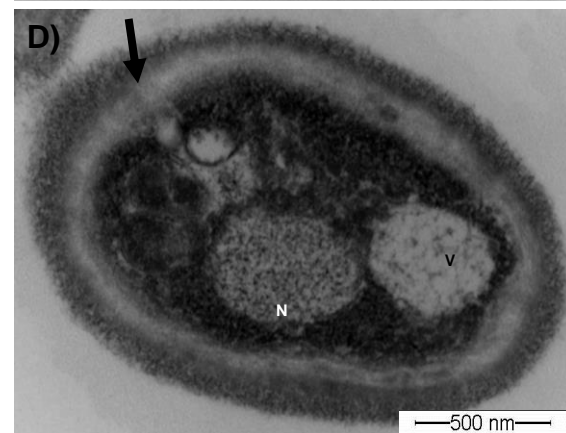
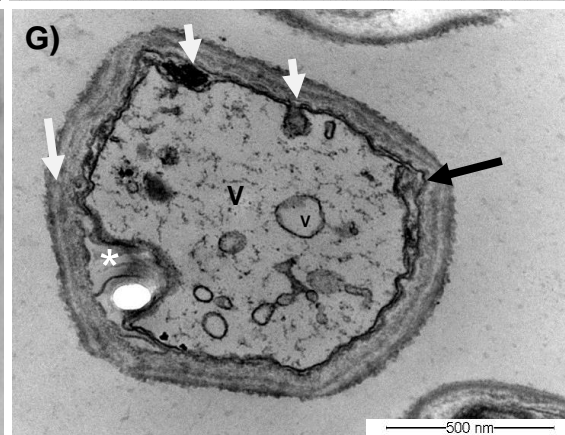
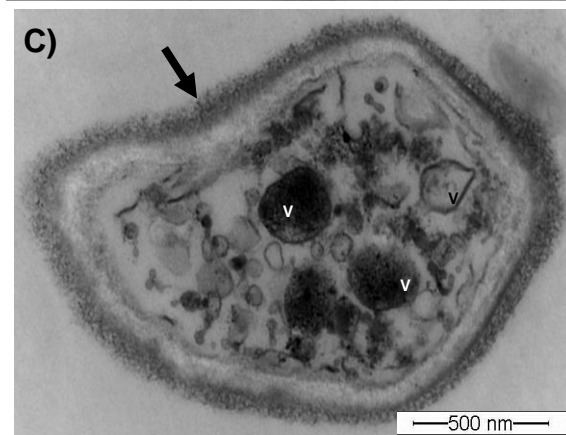
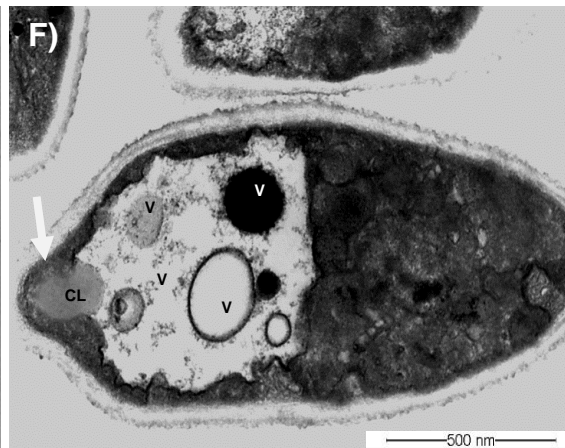
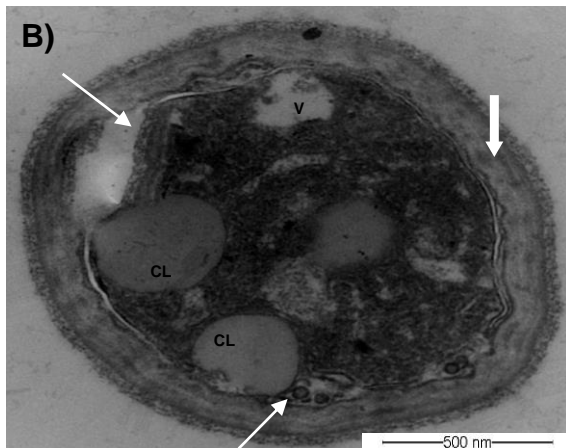
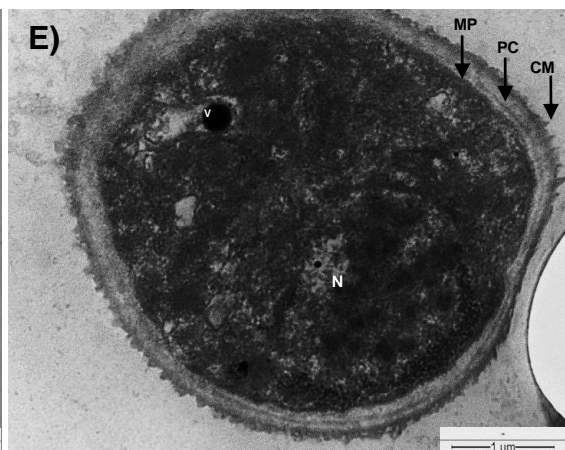
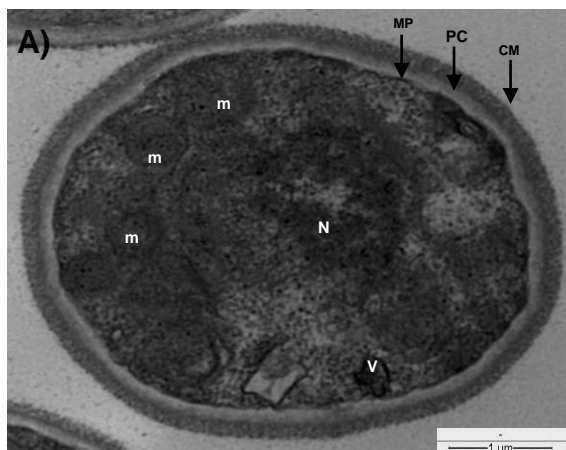


possível observar a presença de uma vesícula situada entre a membrana e a parede indicando transporte através da barreira fúngica (Figura 29 F).

No tratamento com terbinafina, as leveduras cultivadas em caldo BHI apresentaram densa camada fibrilar, parede celular e citoplasma elétron-lucente, esvaziamento do conteúdo citoplasmático, sendo possível visualizar apenas vacúolos eletodensos e várias vesículas (Figura 29 C), enquanto que leveduras cultivadas em caldo BHI + L-DOPA apresentaram camada de microfibrilas rarefeita, presença de grânulos eletrodensos junto às microfibrilas, parede celular espessa constituída por várias camadas contendo grânulos eletrodensos, ondulações na membrana, total esvaziamento citoplasmático devido a formação de um grande vacúolo que tomou toda a extensão do citoplasma que se confunde com os limites da membrana (Figura 29 C e G).

## Cultivo em caldo BHI

## Cultivo em caldo BHI + L-DOPA



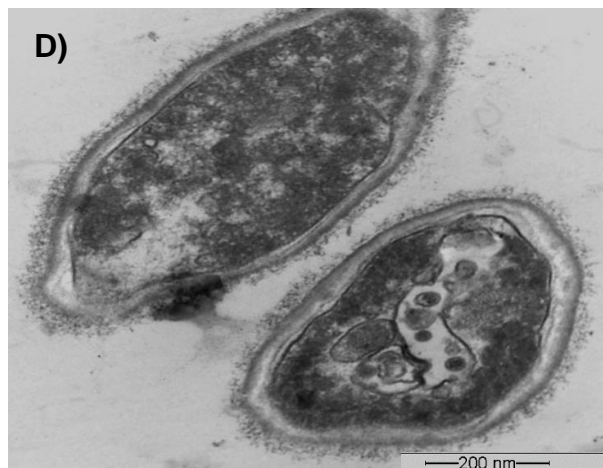
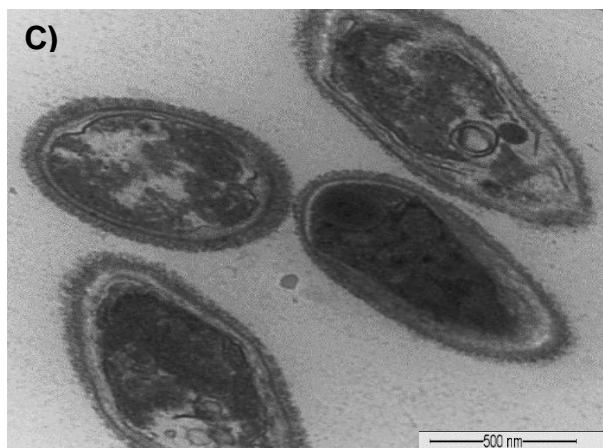
### 6.3.2.2 Sais de Heteropoliácidos de Prata

Em leveduras crescidas somente em meio BHI foi observado por MET que o sal de HPA fosfomolibdato de prata ( $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$ ) causou descolamento da membrana, desorganização citoplasmática, além da presença de corpos lipídicos e uma redução da camada de microfibrilas em algumas células (Figura 30 A), enquanto que em células melanizadas observou-se um espessamento da parede celular com camada microfibrilar reduzida, formação de um grande vacúolo contendo inúmeras vesículas e formação de um espaço entre o vacúolo e a membrana bastante eletrondenso (Figura 30 E). Já as leveduras cultivadas em BHI e tratadas com o fosfotungstato de prata ( $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$ ) apresentaram perda de eletrodensidade, depleção citoplasmática, formação de um grande vacúolo contendo inúmeras vesículas e vacúolo eletrodenso, além de um aumento da camada microfibrilar (Figura 30 B), enquanto que algumas células crescidas na presença de L-DOPA apresentaram parede celular constituída de uma dupla camada sendo que a camada mais externa não se estendeu por toda a célula, formação de um grande vacúolo, vesículas localizadas no espaço periplasmático (Figura 30 F).

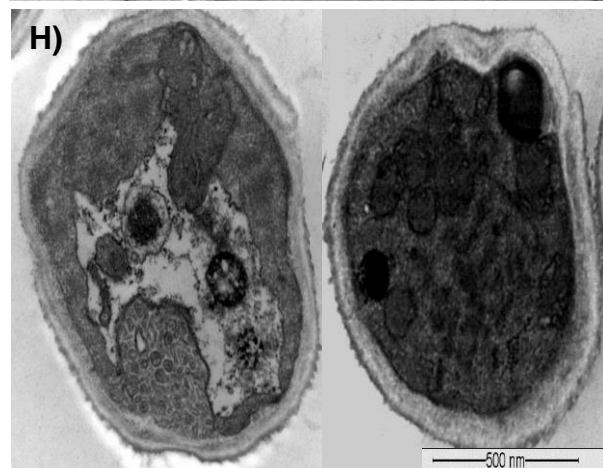
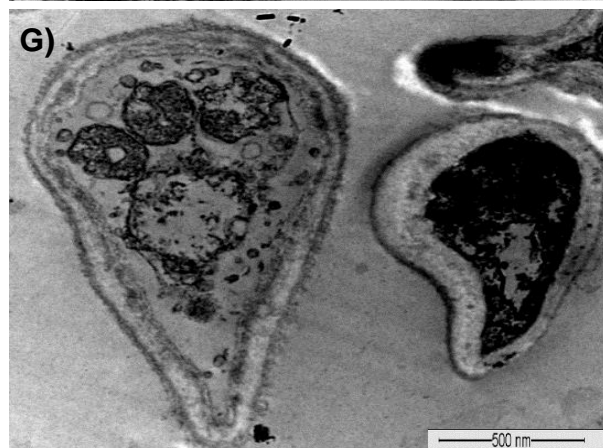
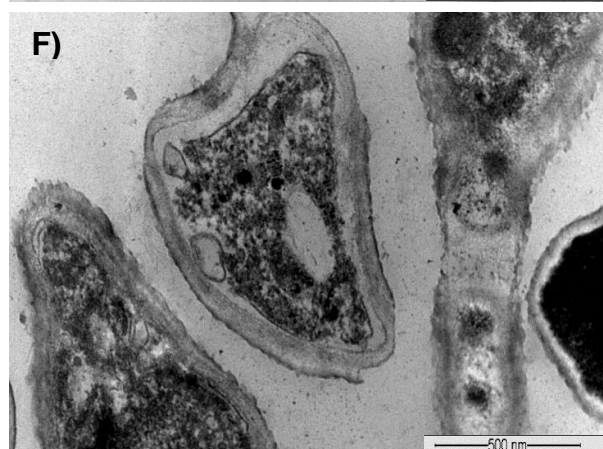
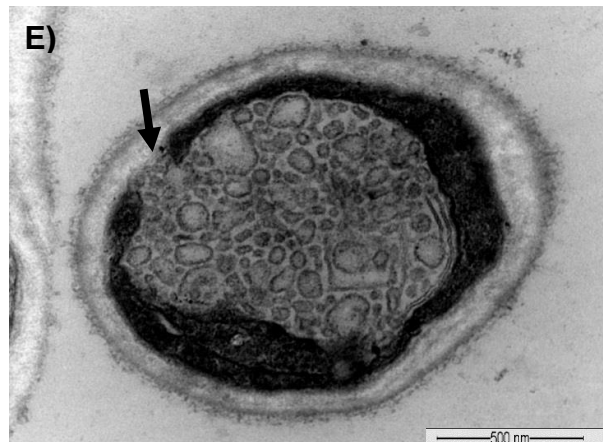
O tratamento com o sal de HPA silicotungstato de prata  $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]$  provocou o descolamento e ondulações na membrana, presença de estruturas membranosas em células crescidas somente em BHI (Figura 30 C), enquanto que leveduras cultivadas em meio contendo L-DOPA apresentaram aumento da espessura da parede celular, ausência de microfibrilas em algumas células, presença de grandes vacúolos com conteúdo eletrondenso e pequenas vesículas (Figura 30 G). Finalmente, o sal de HPA  $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$  causou espessamento em certas regiões da parede celular, vacúolos contendo estruturas membranosas, região elétron-lucente, formação de um grande vacúolo com várias vesículas e redução da camada microfibrilar em leveduras cultivadas em BHI (Figura 30 D), enquanto que na presença de L-DOPA foi observado parede celular em dupla camada, invaginações da membrana contendo várias vesículas, vacúolos elétron-lucentes no citoplasma contendo vacúolos de conteúdo eletrodenso e presença de vacúolos eletrodensos em contato com a parede celular (Figura 30 H) .



Cultivo em caldo BHI



Cultivo em caldo BHI + L-DOPA



### 6.3.2.3 Complexos de Coordenação

Por MET, foi observado que o tratamento com o ligante BMPA em células cultivadas em caldo BHI causou ondulações na membrana e parede celular, região nuclear elétron-lucente com condensação da cromatina e aumento da camada de microfibrilas (Figura 31 A), enquanto que leveduras cultivadas na presença de L-DOPA apresentaram espessamento da parede celular, presença de vacúolos opacos, descolamento da membrana, redução do conteúdo citoplasmático e do material microfibrilar (Figura 31 D).

Após o tratamento com o complexo CuBMPA, as leveduras cultivadas em caldo BHI também apresentaram ondulações na membrana, região nuclear com cromatina condensada e poros na membrana nuclear, parede celular elétron-lucente e presença de vários vacúolos com conteúdo eletrodense (Figura 31 B), enquanto que células cultivadas na presença de L-DOPA demonstraram perda da camada microfibrilar, dupla camada de parede, regiões elétron-lucentes no citoplasma e vacúolo elétron-lucente contendo vesículas eletrodensas (Figura 31 E).

O tratamento de leveduras cultivadas em caldo BHI com o mesmo ligante complexado ao metal ferro (FeBMPA) provocou perda da camada microfibrilar e de eletrodensidade da parede celular, presença de vacúolos opacos e de conteúdo eletrodense e presença de grânulos eletrodensos na face interna da membrana indicando a possível presença do pigmento melanina (Figura 31 C), enquanto que leveduras cultivadas na presença de L-DOPA apresentaram perda da camada microfibrilar, dupla camada de parede celular e presença de um grande vacúolo elétron-lucente contendo vacúolo eletrodense (Figura 31 F).



Por MET, foi observado que o tratamento de leveduras cultivadas em caldo BHI com o ligante HBPA promoveu o descolamento e a ondulação da membrana plasmática que, conseqüentemente, levou à formação de um espaço entre a membrana e a parede (periplasma), acúmulo de material eletrondenso na face interna da membrana plasmática e nuclear, vacúolo eletrondenso, regiões intramembranas ocupando grande parte do citoplasma e perda da camada microfibrilar em algumas células (Figura 32 A), enquanto que leveduras cultivadas em meio contendo L-DOPA apresentaram espessamento da parede celular, redução da camada microfibrilar, ondulações na membrana, citoplasma e vacúolos elétrondentes e acúmulo de material eletrondenso na face interna da membrana (Figura 32 D).

Leveduras cultivadas em BHI após tratamento com o complexo CuHBPA mostraram a presença de vacúolos contendo pequenos grânulos eletrondensos (Figura 32 B), enquanto que leveduras cultivadas na presença de L-DOPA apresentaram parede com dupla camada, redução de microfibrilas, desorganização citoplasmática e presença de vacúolos opacos contendo material eletrondenso (Figura 32 E). O tratamento de leveduras cultivadas em caldo BHI com o complexo FeHBPA mostrou a presença de aglomerados eletrondensos distribuídos por toda face interna da membrana sugerindo deposição de pigmento pelas vesículas em direção a parede celular, porém apresentaram parede celular e microfibrilas normais (Figura 32 C), enquanto que leveduras cultivadas na presença de L-DOPA apresentaram parede celular mais espessa e material microfibrilar reduzido e presença de grânulos eletrondensos na região central do citoplasma (Figura 32 F).



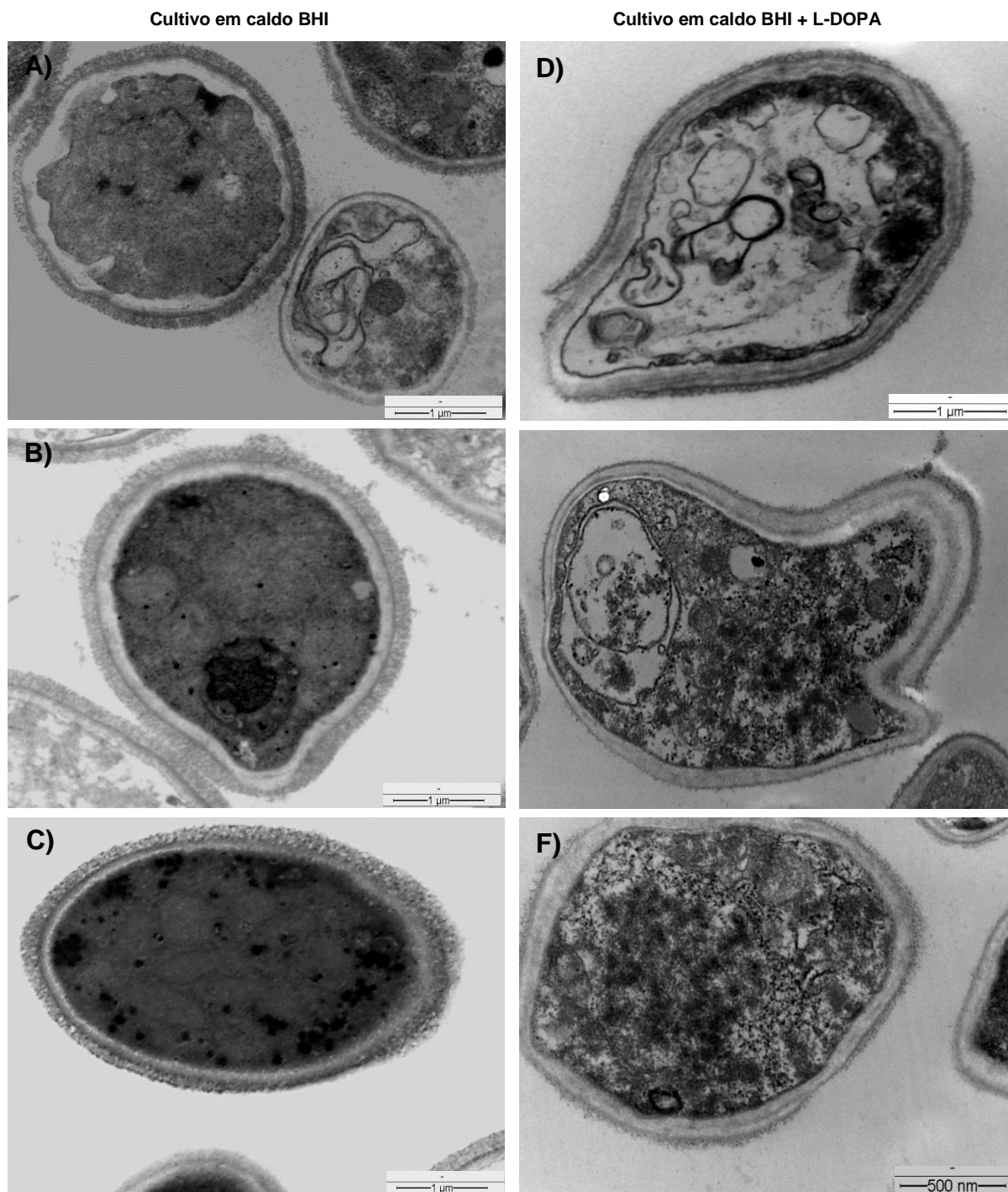


Figura 32. Microscopia eletrônica de transmissão da cepa LSASs01 de *Sporothrix* cultivada em meio BHI (A, B, C) e em BHI + L-DOPA (D, E e F). Em (A e D) células tratadas com o ligante HBPA, (B e E) tratadas com complexo CuHBPA, (C e F) tratadas com o complexo FeHBPA. Leveduras tratadas com estes compostos apresentaram perda da camada de microfibrilas, vacúolos eletrodensos, esvaziamento citoplasmático, acúmulo de grânulos eletrodensos e espessamento ou duplicidade da parede celular.



Análises por MET revelaram que o tratamento de células leveduriformes cultivadas em meio BHI com o ligante BS provocou ondulações na membrana, citoplasma elétron-lucente e presença de vacúolos eletrondensos (Figura 33 A), enquanto que em leveduras cultivadas em meio contendo L-DOPA, o ligante provocou a perda do material microfibrilar, presença de um grande corpo lipídico e de inúmeros grânulos eletrondensos nas extremidades da célula (Figura 33 D).

O tratamento de leveduras cultivadas em caldo BHI com o complexo CuBS mostrou presença de vacúolo elétron-lucente, presença de mitocôndrias com aumento de tamanho e invaginações na membrana (Figura 33 B), enquanto que células cultivadas na presença de L-DOPA apresentaram redução da camada microfibrilar, parede celular e região do citoplasma elétron-lucentes e vacúolos opacos e eletrondensos (Figura 33 E).

Com o complexo FeBS, as leveduras cultivadas em BHI também apresentaram espessamento da parede celular, ondulações na membrana, desorganização citoplasmática e presença de um grande vacúolo elétron-lucente e de pequenas vesículas com conteúdo eletrondenso na região periplasmática (Figura 33 C), enquanto que em leveduras cultivadas em BHI + L-DOPA, o complexo FeBS induziu a um maior espessamento da parede celular e ao total esvaziamento citoplasmático. Pode também ser observado o acúmulo de grânulos eletrondensos na face externa da parede celular e na região periplasmática (Figura 33 F).

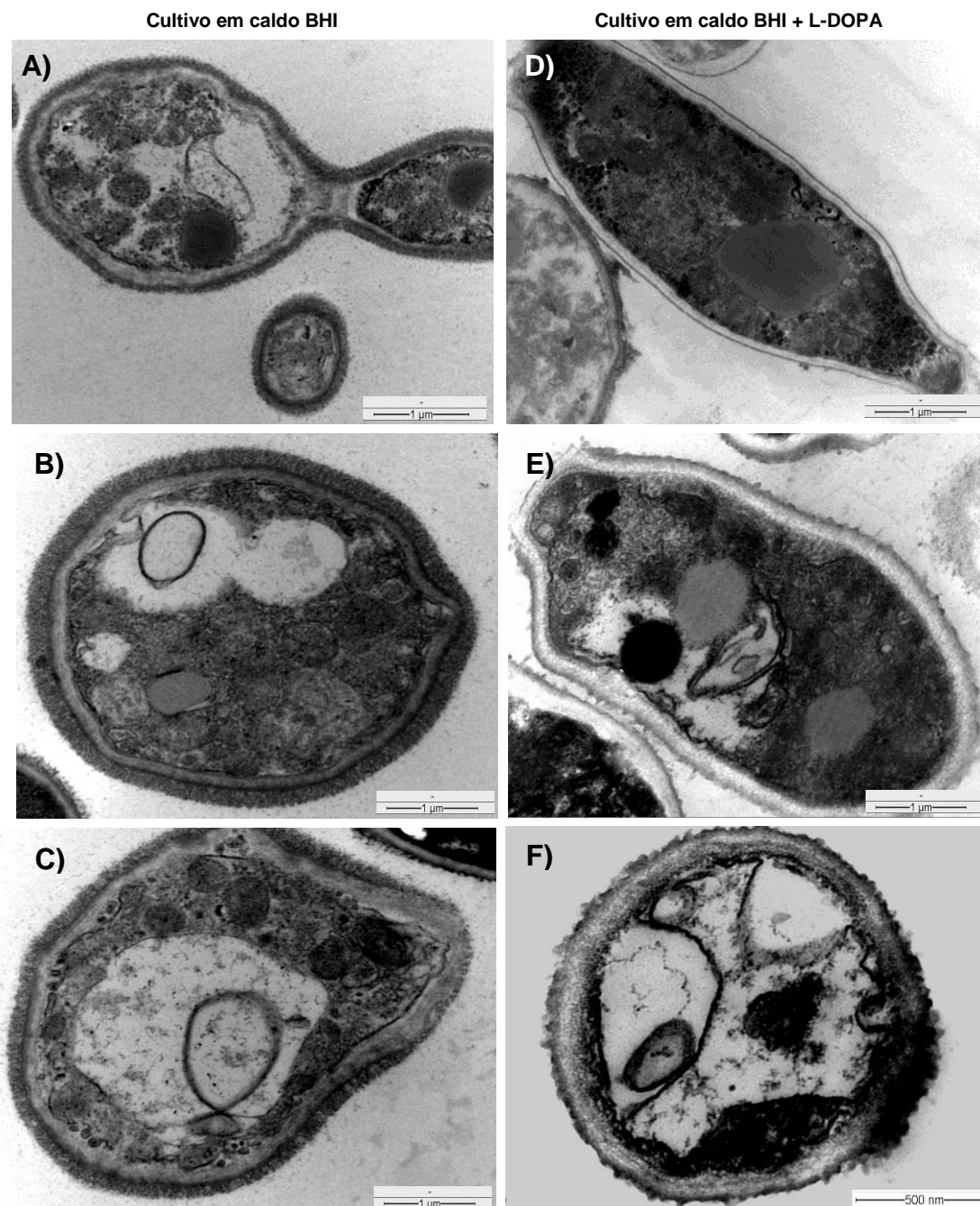


Figura 33. Microscopia eletrônica de transmissão da cepa LSASs01 de *Sporothrix* cultivada em meio BHI (A, B, C) e em BHI + L-DOPA (D, E e F). Em (A e D) células tratadas com o ligante BS, (B e E) tratadas com complexo CuBS, (C e F) tratadas com o complexo FeBS. Leveduras tratadas com estes compostos apresentaram perda da camada de microfibrilas, vacúolos eletrodensos, esvaziamento citoplasmático, acúmulo de grânulos eletrodensos e espessamento da parede celular.

Em relação ao tratamento das leveduras com o ligante BE foi observado por MET que estas células quando cultivadas em BHI apresentaram um esvaziamento citoplasmático, o que levou a formação de regiões elétron-lucentes e ondulações na membrana com a formação de pequenos vacúolos (Figura 34 A), enquanto que em células cultivadas na presença de L-DOPA, o ligante BE induziu ao aumento da densidade da camada microfibrilar, à perda de eletrondensidade da parede celular, mitocôndrias com tamanho aumentado e à deposição de grânulos eletrondensos na face interna da parede celular e pelo citoplasma (Figura 34 D). Os mesmos efeitos foram possíveis observar nas leveduras tratadas com o complexo com cobre (CuBE), em que aglomerados eletrondensos aparecem sendo claramente depositados na membrana celular indicando uma possível distribuição de pigmento melanina em células cultivadas na presença ou ausência de L-DOPA (Figura 34 B e E).

Células cultivadas em BHI demonstraram após o tratamento com FeBE a presença de um grande vacúolo central e várias vesículas contendo grânulos eletrondensos e densa camada microfibrilar (Figura 34 C), enquanto que leveduras cultivadas na presença de L-DOPA apresentaram camada microfibrilar, parede e membrana celular normais, acúmulo de material eletrondenso em algumas regiões do citoplasma em contato com a membrana, vesícula com conteúdo intramembranoso (Figura 34 F).

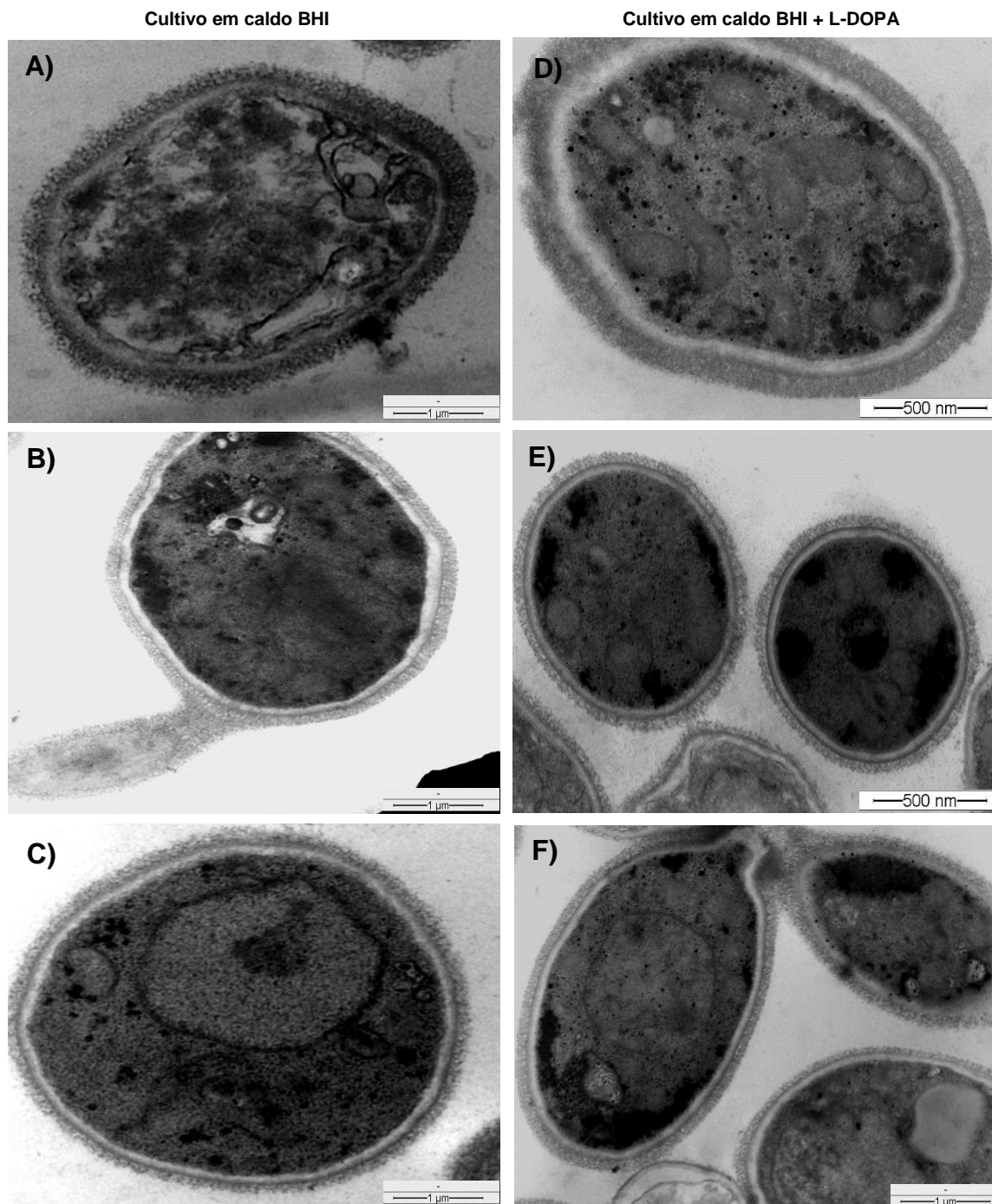
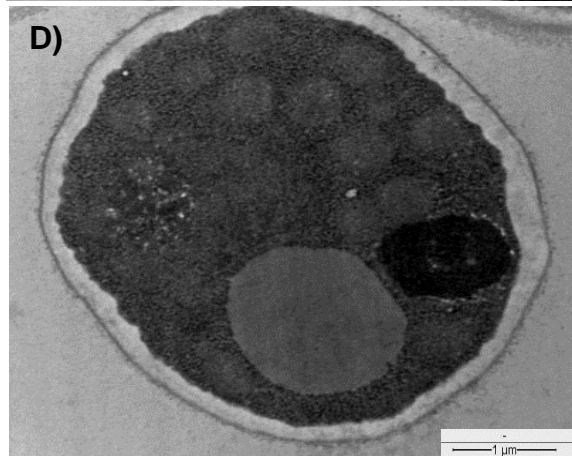
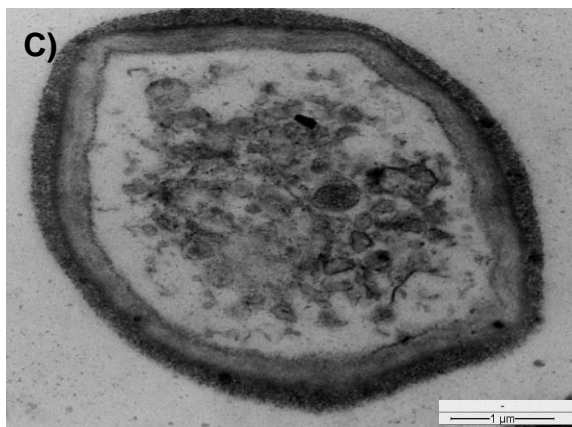
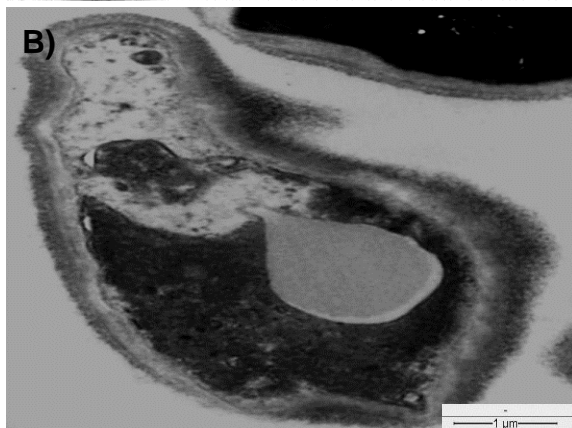
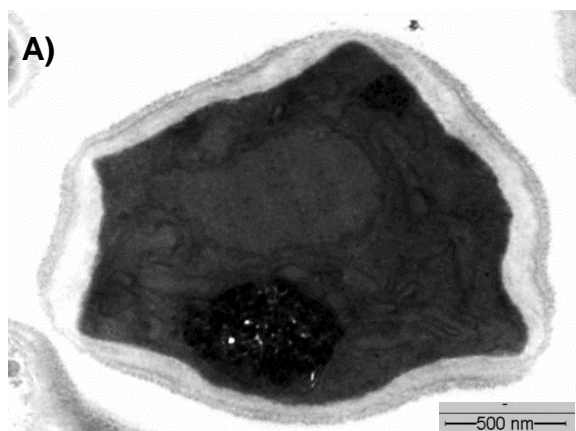


Figura 34. Microscopia eletrônica de transmissão da cepa LSASs01 de *Sporothrix* cultivada em meio BHI (A, B, C) e em BHI + L-DOPA (D, E e F). Em (A e D) células tratadas com o ligante BE, (B e E) tratadas com complexo CuBE, (C e F) tratadas com o complexo FeBE. Leveduras tratadas com estes compostos apresentaram desorganização citoplasmática e acúmulo de grânulos eletrodensos no citoplasma e na face interna da parede celular.

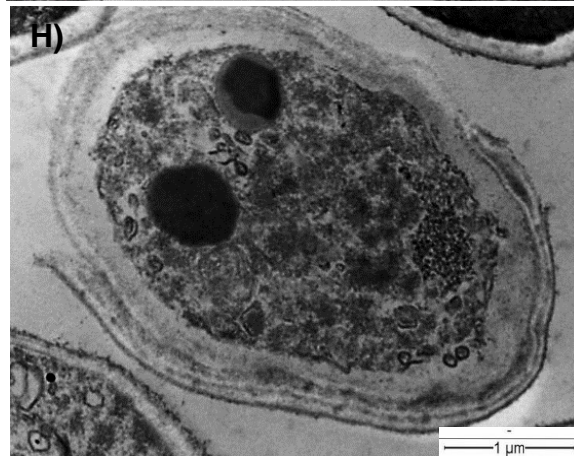
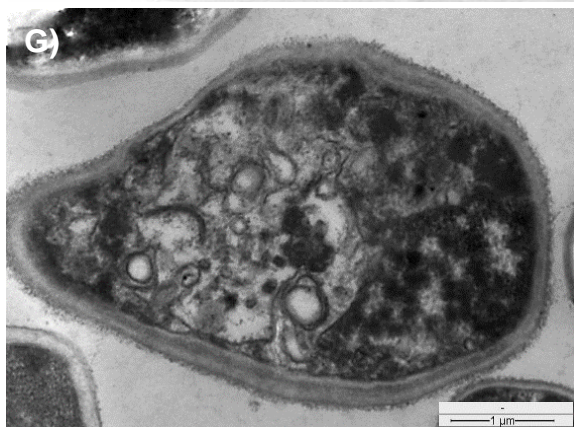
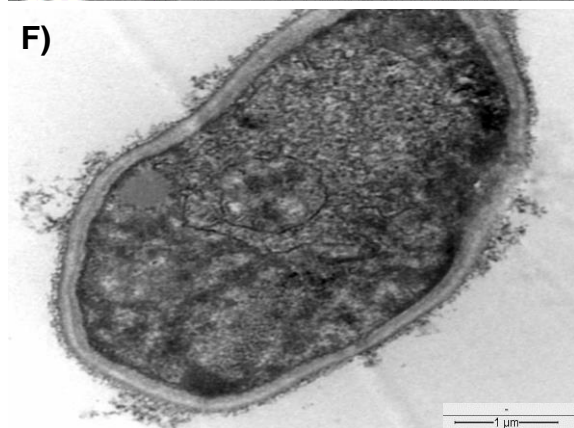
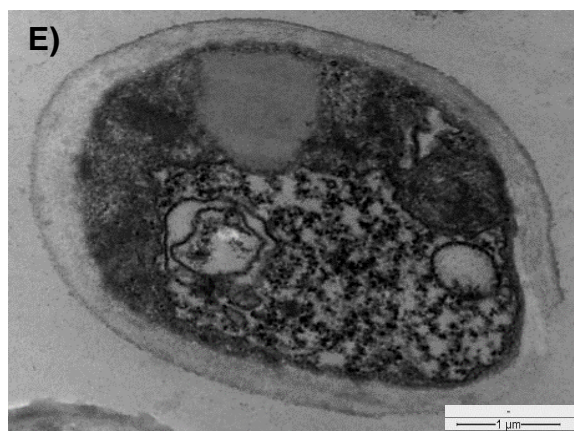
Quanto ao ligante HPCINOL e seus complexos metálicos, foi observado por MET que as leveduras cultivadas em BHI apresentaram formatos irregulares, redução do material microfibrilar, espessamento e perda de eletrondensidade da parede celular, presença de um grande corpo lipídico na região central da célula e cromatina condensada (Figura 35 A), enquanto que em células cultivadas em meio contendo L-DOPA, também foi observado o espessamento da parede devido à formação da segunda camada, perda do material microfibrilar, presença de vacúolo opaco indicando reserva lipídica, presença de um grande vacúolo contendo grânulos eletrondensos e vesículas com conteúdo membranares (Figura 35 E). O complexo CuHPCINOL provocou espessamento da parede celular, redução do material fibrilar, depleção de uma área citoplasmática e a formação de um grande vacúolo opaco que se invaginou na área elétron-densa em leveduras cultivadas em BHI (Figura 35 B), enquanto que em células cultivadas na presença de L-DOPA, o CuHPCINOL induziu a uma redução do material microfibrilar e um espessamento da parede celular (Figura 35 F). Nas leveduras cultivadas em BHI e tratadas com FeHPCINOL foi observado um espessamento da parede celular e uma densa camada microfibrilar, mas com descolamento e ondulações em certas regiões da membrana, esvaziamento citoplasmático levando à perda de eletrondensidade e presença de várias vesículas contendo grânulos eletrondensos (Figura 35 C), enquanto que o tratamento de leveduras cultivadas em L-DOPA provocou a redução da camada microfibrilar, desorganização citoplasmática e acúmulo de grânulos eletrodensos no citoplasma (Figura 35 G). Após tratamento com o complexo com manganês (MnHPCINOL), leveduras cultivadas em caldo BHI apresentaram perda do material fibrilar e de eletrodensidade da parede celular, presença de várias mitocôndrias de tamanho aumentado, corpo lipídico, vacúolo eletrondenso e cromatina condensada (Figura 35 D), enquanto que em células cultivadas em meio BHI contendo L-DOPA foi observado um espessamento bastante significativo da parede celular dando impressão de tripla camada em determinada região da célula. Além disso, também foi observado uma depleção citoplasmática e presença de vacúolos eletrondensos e inúmeras vesículas com conteúdo eletrondenso (Figura 35 H).



Cultivo em caldo BHI



Cultivo em caldo BHI + L-DOPA



#### 6.3.2.4. Extrato etanólico de *Capsicum annuum* L. e análogos sintéticos capsaicinoides

Por microscopia eletrônica de transmissão, leveduras cultivadas em BHI e tratadas com extrato etanólico de *C. annuum* L. apresentaram depleção do conteúdo citoplasmático que levou à perda de eletrodensidade, à perda da camada de microfibrilas da parede celular e ondulações na membrana plasmática (Figura 36 A), enquanto que leveduras cultivadas na presença de L-DOPA foi observado um espessamento da parede celular contendo uma fina camada de microfibrilas e grânulos eletrodensos, total depleção do citoplasma devido à formação de vacúolos contendo vesículas elétron-densas e um vacúolo opaco (Figura 36 G).

O tratamento das leveduras cultivadas em BHI com o análogo da capsaicina SA1 levou à perda de eletrondensidade citoplasmática devido à depleção do conteúdo celular, ondulações na membrana e presença de vacúolos opacos (Figura 36 B), enquanto que em células cultivadas em BHI + L-DOPA o análogo SA1 levou a uma significativa redução das microfibrilas, formação de um grande vacúolo elétron-lucente contendo vesículas eletrodensas (Figura 36 H).

Nas leveduras tratadas com o análogo da capsaicina SA2 foi observado o espessamento da parede celular, presença de vesículas elétron-densas em regiões da membrana e regiões elétron-lucentes no citoplasma (Figura 36 B), enquanto que na presença de L-DOPA, SA2 provocou alterações no formato das células, espessamento da parede celular e depleção total do conteúdo citoplasmático (Figura 36 I).

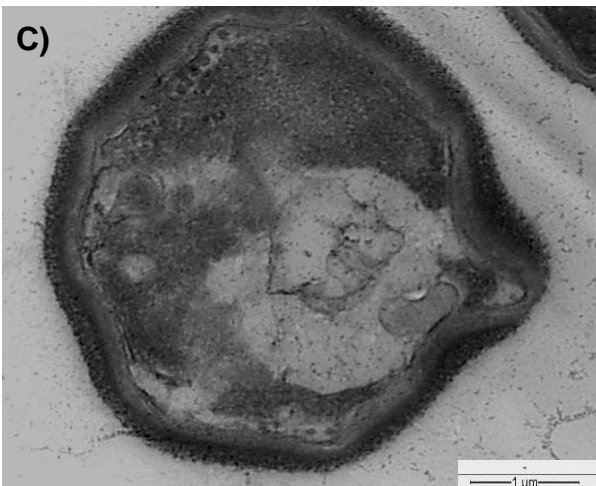
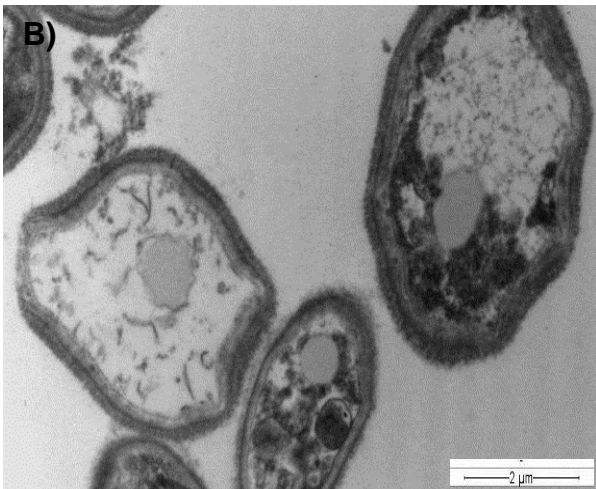
Após o tratamento com o análogo da capsaicina SA3, algumas leveduras apresentaram perda da camada de microfibrilas, presença de vacúolos eletrondensos e elétron-lucentes e descolamento da membrana (Figura 36 D), enquanto que em células cultivadas na presença de L-DOPA este análogo provocou a perda da camada de microfibrilas, o espessamento da parede celular, a depleção

do conteúdo citoplasmático e a presença de vacúolos elétron-lucentes contendo vesículas e vacúolos eletrondensos (Figura 36 J).

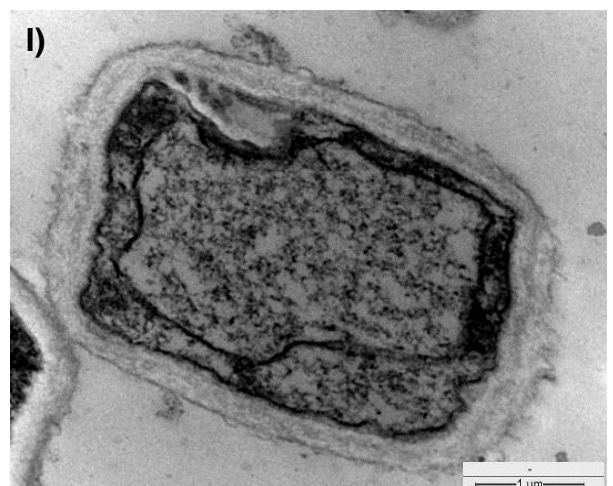
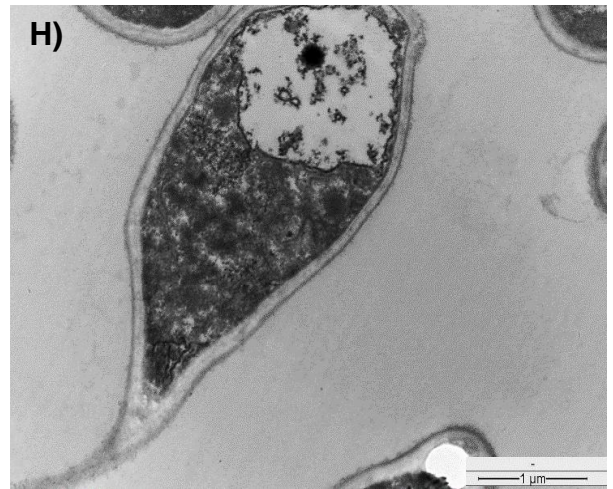
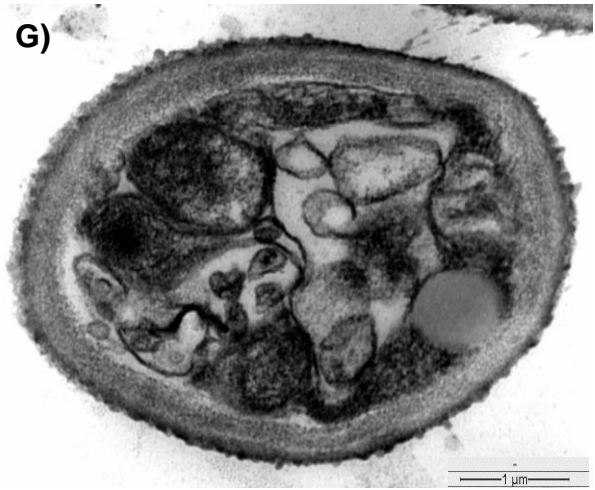
Em relação às substâncias padrão (capsaicina e diidrocapsaicina), foi observado que células leveduriformes cultivadas em BHI tratadas com a capsaicina apresentaram várias mitocôndrias elétron-densas de tamanho aumentado e um grande vacúolo elétron-lucente com conteúdo membranar (Figura 36 E), enquanto que leveduras cultivadas em L-DOPA apresentaram redução do material microfibrilar, espessamento da parede e presença de vacúolos opacos e eletrondensos (Figura 36 K). Já a substância padrão diidrocapsaicina provocou pronunciadas ondulações na membrana e na parede da célula e presença de vacúolos elétron-lucentes (Figura 36 F), enquanto que na presença de L-DOPA, a diidrocapsaicina provocou a redução da camada microfibrilar, a desorganização do citoplasma e ao acúmulo de material eletrondenso na face terminal da célula (Figura 36 L).



Cultivo em caldo BHI



Cultivo em caldo BHI + L-DOPA



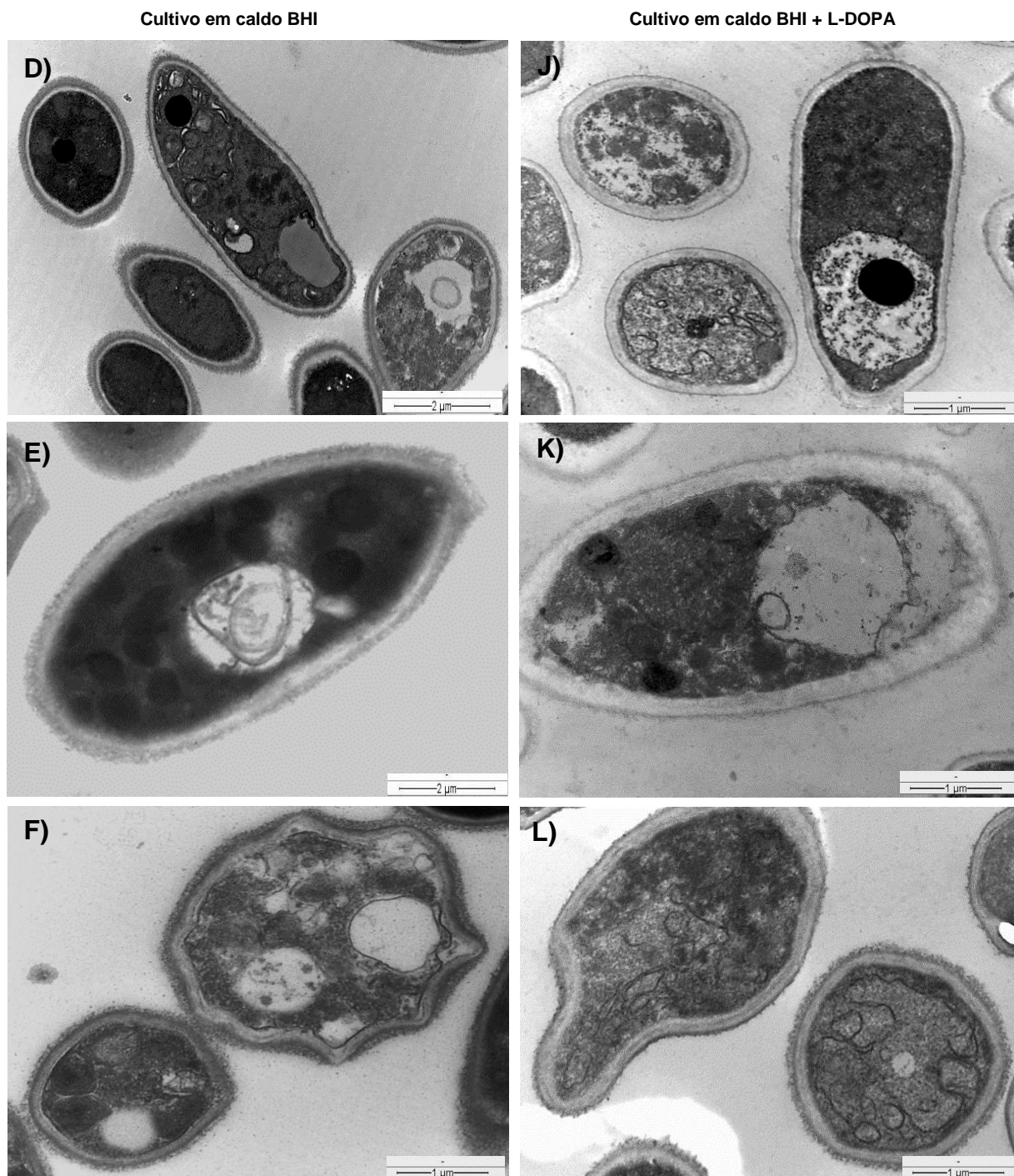


Figura 36. Microscopia eletrônica de transmissão da cepa LSASs01 de *Sporothrix* cultivada em meio BHI (A, B, C, D, E e F) e em BHI + L-DOPA (G, H, I, J, K e L). Em (A e G) células tratadas com o extrato etanólico de *C. annuum* L., (B e H) tratadas com análogo SA1, (C e I) tratadas com o análogo SA2, (D e J) tratadas com o análogo SA3; (E e K) controle positivo tratadas com a capsaicina padrão; e (F e L) controle positivo tratadas com diidrocapsaicina padrão. Leveduras tratadas com estes compostos apresentaram perda da camada de microfibrilas, vacúolos eletrodensos, esvaziamento citoplasmático, acúmulo de grânulos eletrodensos e espessamento da parede celular.



<b>Ag<sub>3</sub>[PW<sub>12</sub>O<sub>40</sub>]</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Ag<sub>4</sub>[SiW<sub>10</sub>V<sub>2</sub>O<sub>40</sub>]</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Ag<sub>4</sub>[SiW<sub>12</sub>O<sub>40</sub>]</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>BMPA</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>CuBMPA</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>FeBMPA</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>HBPA</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>CuHBPA</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>FeHBPA</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>BS</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>CuBS</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>FeBS</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>BE</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>CuBE</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>FeBE</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>HPCINOL</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
<b>CuHPCINOL</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>FeHPCINOL</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>ExEt C. annuum</b>	+	+	+	+	+	NC	+	+	+	+	+	+
<b>SA1</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>SA2</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>SA3</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>CAP</b>	+	+	NC	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>DCAP</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Legenda: (+): positivo para atividade urease; (-) negativo para atividade urease; (NC): Não cresceu no meio Christensen urease após tratamento.



### 6.4.2. Melanização

Todas as cepas de *Sporothrix* (n=12) utilizadas neste trabalho foram capazes de produzir pigmento melanina quando cultivadas em Ágar Batata dextrose (BDA) em diferentes tempos ou grau (Figura 37), com exceção da cepa ATCC 32285 que melaniza apenas quando na presença do substrato diidroxifenilalanina (L-DOPA).

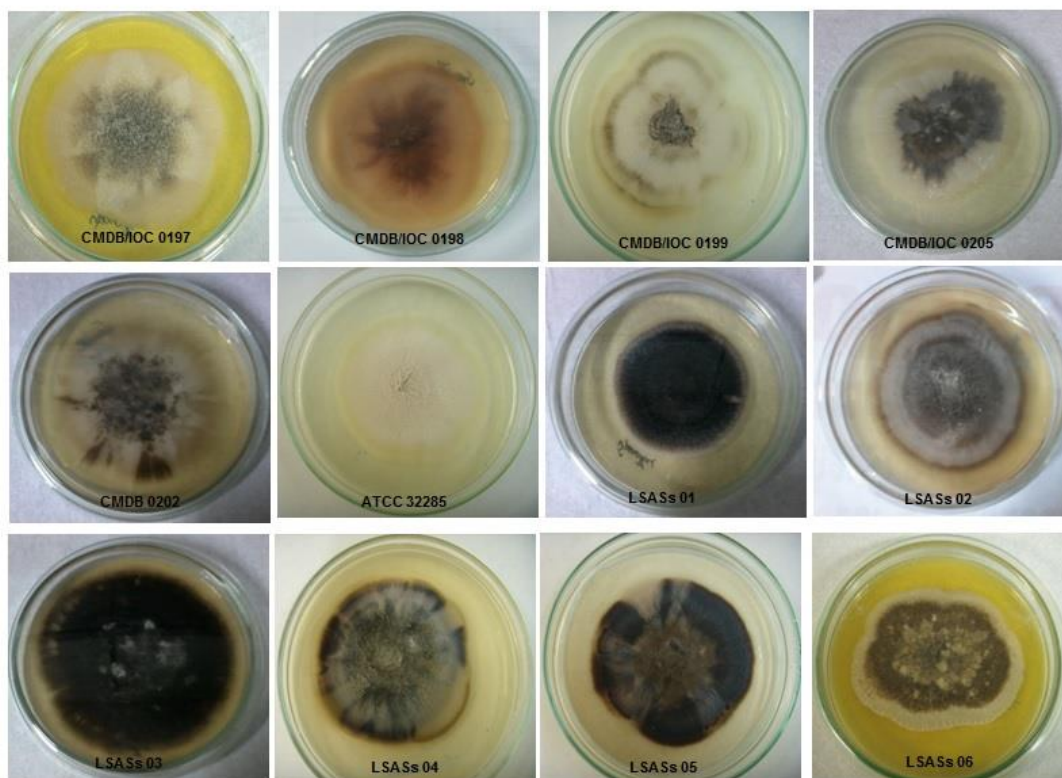


Figura 37. Padrão de melanização das colônias de diferentes linhagens de *Sporothrix* spp. após 30 dias de crescimento em placas com Ágar Batata Dextrose suplementado com cloranfenicol (50mg/mL) and cicloexamida (400mg/mL) a 28°C.

Para descobrir se o composto natural e sintéticos interferem no processo de melanização pelas vias diidroxinaftaleno (melanina DHN) e diidroxifenilalanina (melanina DOPA), as cepas de *Sporothrix* tratadas com os compostos durante 48h

foram, respectivamente, semeadas em placas contendo Ágar BDA na ausência e na presença do indutor de melanização (L-DOPA) e observadas após 15 a 30 dias de incubação a 28°C.

Neste experimento foi observado que leveduras da cepa ATCC 32285 não tratadas não produziram melanina em Ágar BDA, mas melanizaram quando semeadas em Ágar BDA+L-DOPA, demonstrando que esta cepa não sintetizou pigmento constitutivamente pela via diidroxinaftaleno (DHN), mas sintetizou melanina com a adição do precursor pela via diidroxifenilalanina (DOPA). Como era esperado, as leveduras desta cepa não produziram pigmento após tratamento com todos os compostos testados quando semeadas em Ágar BDA, exceto após o tratamento com CuBMPA, análogo sintético capsaicinoide SA2 e diidrocapsaicina, onde foram observadas uma discreta pigmentação. Entretanto, na presença de L-DOPA as leveduras melanizaram após tratamento com todos os compostos, mas com menos intensidade após tratamento com o derivado capsaicinoide SA3, capsaicina e com os antifúngicos comerciais itraconazol, anfotericina B e terbinafina, indicando que estes últimos interferiram brandamente na via sintética da melanina tipo DOPA (Figura 38).

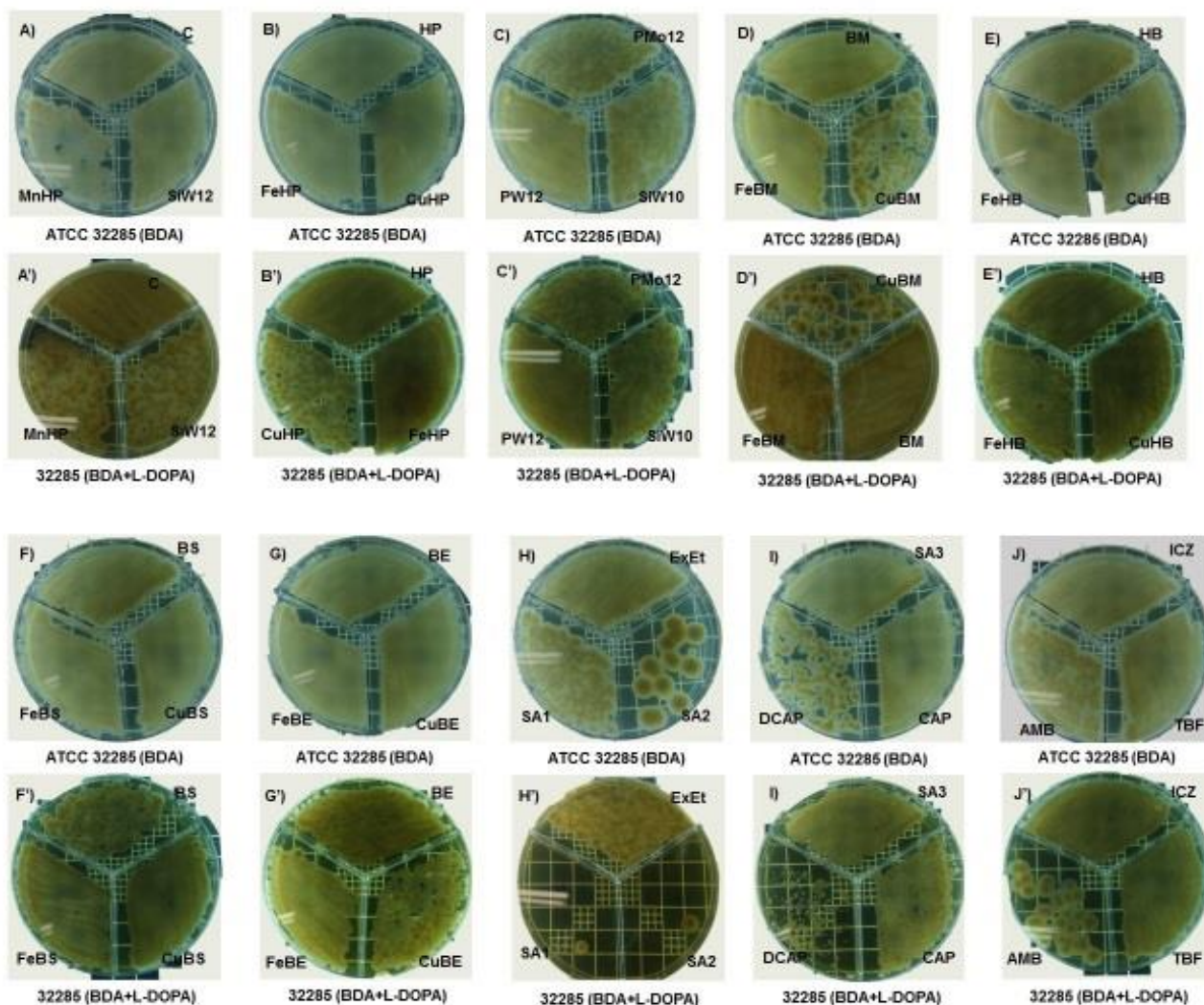


Figura 38. Diferenças no grau de melanização da cepa ATCC 32285 do fungo *Sporothrix* após tratamento com diferentes compostos na ausência e presença do indutor de melanização L-DOPA.

Com a cepa CMDB/IOC 01990699, foi observado que leveduras não tratadas produziram pouco pigmento em Ágar BDA, mas a pigmentação se intensificou quando as leveduras foram semeadas em BDA+L-DOPA. Não houve produção do pigmento mesmo na presença de L-DOPA após tratamento das leveduras com os ligantes HPCINOL, HBPA, BS e BE e com os complexos de coordenação CuHPCINOL, CuBMPA, CuHBPA, CuBS, FeBS, CuBE e FeBE indicando que estes compostos interferiram tanto na via DHN quanto na via DOPA para a produção de ambos os tipos de melanina, enquanto que após o tratamento com os complexos

FeHPCINOL, MnHPCINOL e FeBMPA foi observado uma discreta pigmentação das leveduras quando foram semeadas em Ágar BDA suplementado com L-DOPA, demonstrando que estes três compostos influenciaram na via de síntese da melanina DHN, mas não na síntese da melanina DOPA (Figura 39). Também foi observado que leveduras após tratamento com o antifúngico itraconazol e complexos BMPA e FeHBPA não cresceram em ambos os meios de cultura, indicando uma ação fungicida dos mesmos sobre a cepa CMDDB/IOC 01990699, enquanto que os demais foram fungistáticos e por esse motivo não influenciaram na transição de levedura para micélio.

Com a cepa CMDDB/IOC 02050799 foi observado que a levedura não tratada produziu melanina em Ágar BDA e BDA+L-DOPA, sendo que neste último a pigmentação foi mais intensa. Não houve síntese do pigmento após o tratamento das leveduras com extrato etanólico de *C. annuum* L., capsaicina, diidrocapsaicina, derivado sintético capsaicinoide SA2, com os sais de HPA  $Ag_3[PMo_{12}O_{40}]$ ,  $Ag_3[PW_{12}O_{40}]$ ,  $Ag_4[SiW_{10}V_2O_{40}]$ ,  $Ag_4[SiW_{12}O_{40}]$ , complexos de coordenação CuHPCINOL, FeHPCINOL, BMPA, CuBMPA, FeBMPA, BS, CuBS e FeBS e o antifúngico terbinafina quando semeadas tanto na ausência quanto na presença de L-DOPA, indicando que estes compostos interferiram em ambas as vias de síntese da melanina DHN e DOPA (Figura 40). No entanto, após tratamento com os antifúngicos itraconazol e anfotericina B, com o ligante o HPCINOL e complexo MnHPCINOL foi possível observar que estes tratamentos não impediram o fungo de sintetizar melanina na presença de L-DOPA, indicando que a maquinaria bioquímica para esta via de síntese não foi afetada por estes compostos (Figura 40). Também foi observado que leveduras após tratamento com os derivados sintéticos capsaicinoídeos SA1 e SA3 não cresceram em ambos os meios de cultura, indicando uma ação fungicida dos mesmos sobre a cepa CMDDB/IOC 02050799, enquanto que os demais foram fungistáticos e por esse motivo não influenciaram na transição de levedura para micélio (Figura 40).



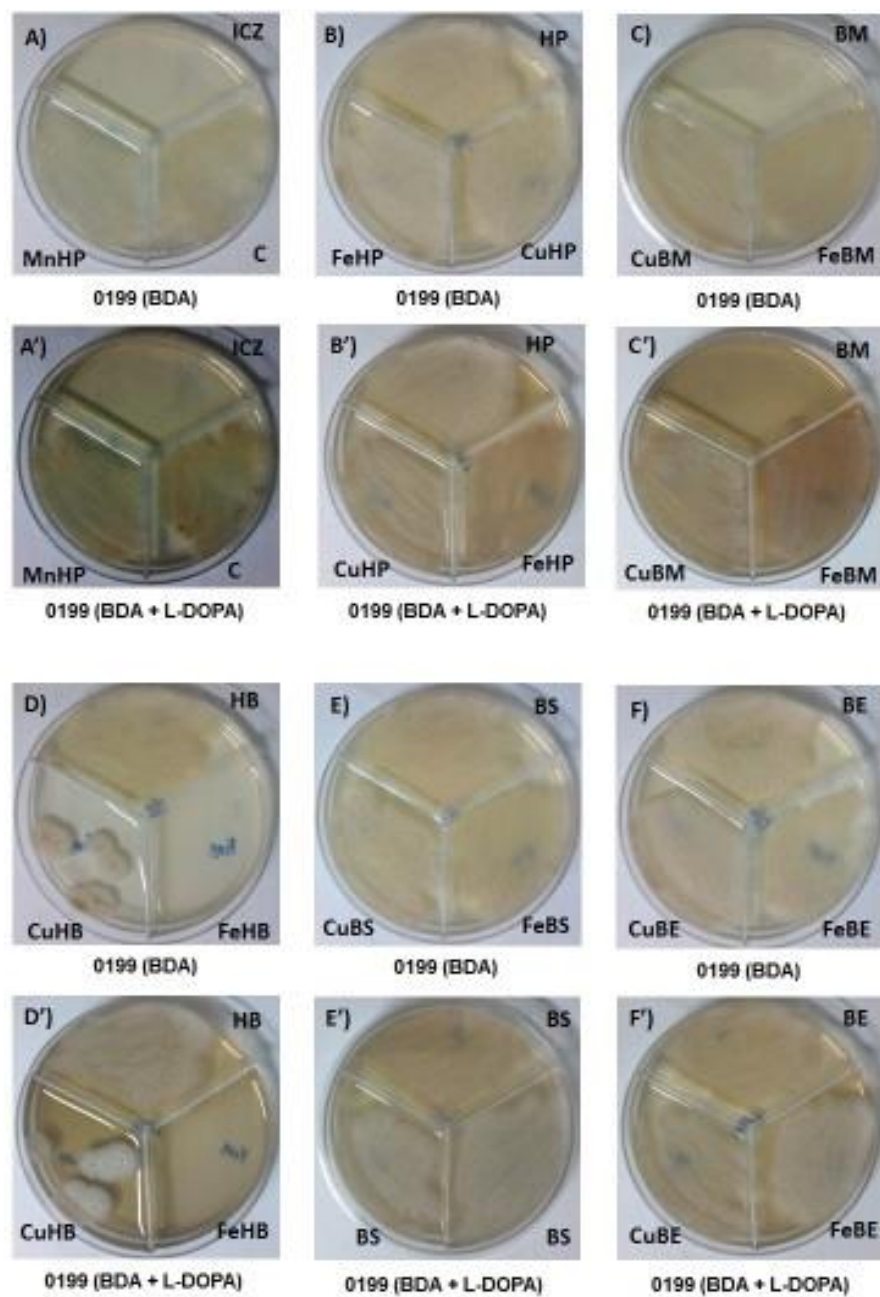


Figura 39. Diferenças no grau de melanização da cepa CMDB/IOC 01990699 do fungo *Sporothrix* após tratamento com diferentes compostos na ausência e presença do indutor de melanização L-DOPA.

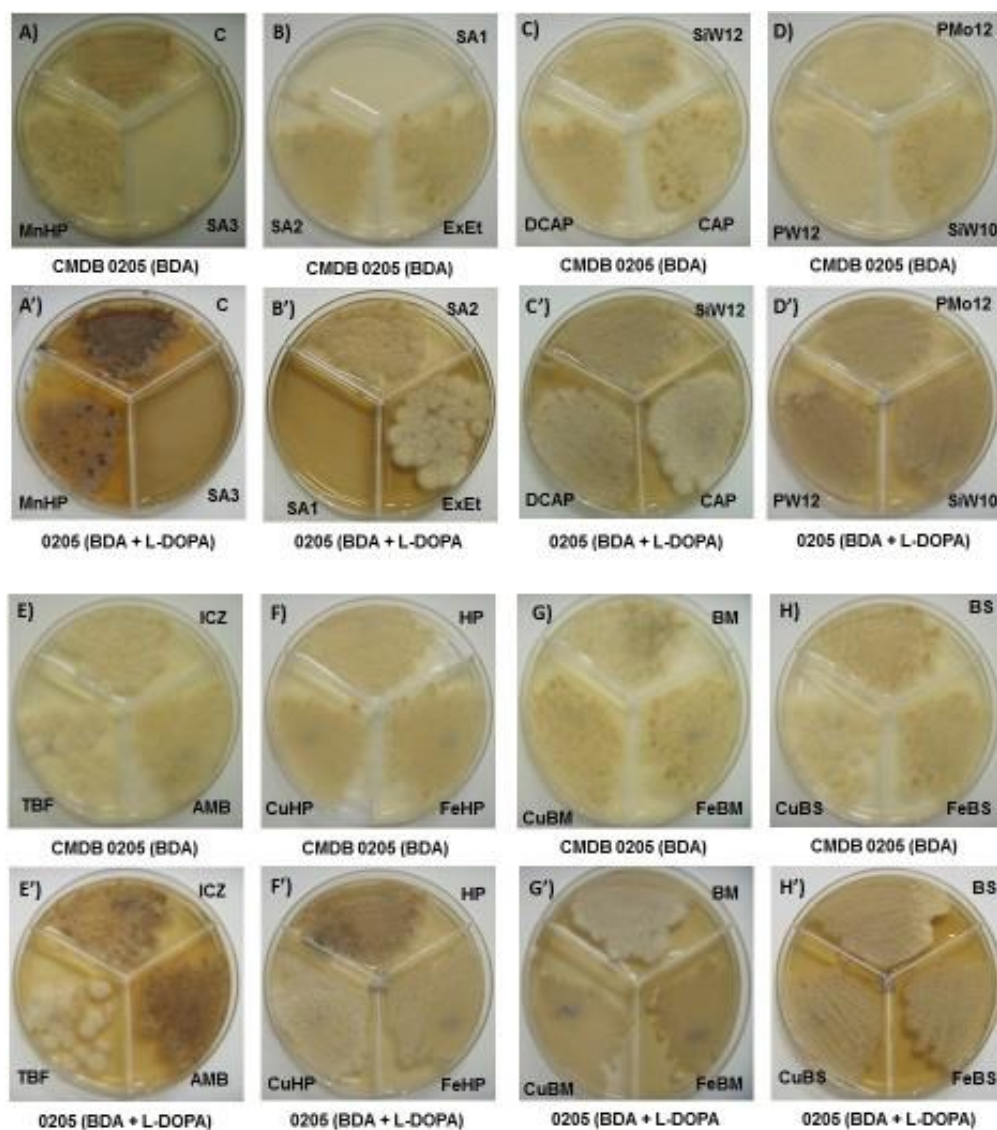


Figura 40. Diferenças no grau de melanização da cepa CMDB/IOC 02050799 do fungo *Sporothrix* após tratamento com diferentes compostos na ausência e na presença de L-DOPA após tratamento com diferentes compostos.

Outro resultado semelhante foi observado com a cepa clínica LSASs 02, onde foi observado que a levedura não tratada produziu melanina quando semeada em Ágar BDA suplementado ou não com L-DOPA. Esta cepa não produziu pigmento após tratamento com o ligante HPCINOL e com os complexos FeBS e CuBE mesmo na presença de L-DOPA, mostrando que estes compostos atuaram sobre ambas as

vias de biossíntese de melanina (DHN e DOPA) inibindo nesta cepa fúngica. Enquanto que na presença do substrato L-DOPA, os tratamentos com BS, CuBS, BE, FeBE, CuHPCINOL e FeHPCINOI não impediram a melanização, mostrando que estes compostos não interferiram na via de síntese da melanina tipo DOPA (Figura 41).

Diferenças também foram observadas com a cepa clínica LSASs 04, onde os tratamentos com CuBM, HB, CUHB, FeHB, CuBS, FeBS, FeBE e HP impediram a cepa de produzir melanina mesmo na presença do substrato L-DOPA indicando que estes compostos foram capazes de interferir nas vias biossintéticas da melanina DHN e DOPA. Enquanto que o tratamento com FeBM, BS, BEE, CuBE e FeHP não foram capazes de interferir no processo de pigmentação na presença do substrato, demonstrando que suas atividades sobre esta cepa fúngica não interferiram em nível molecular impedindo que a melanina tipo DOPA fosse sintetizada (Figura 42).

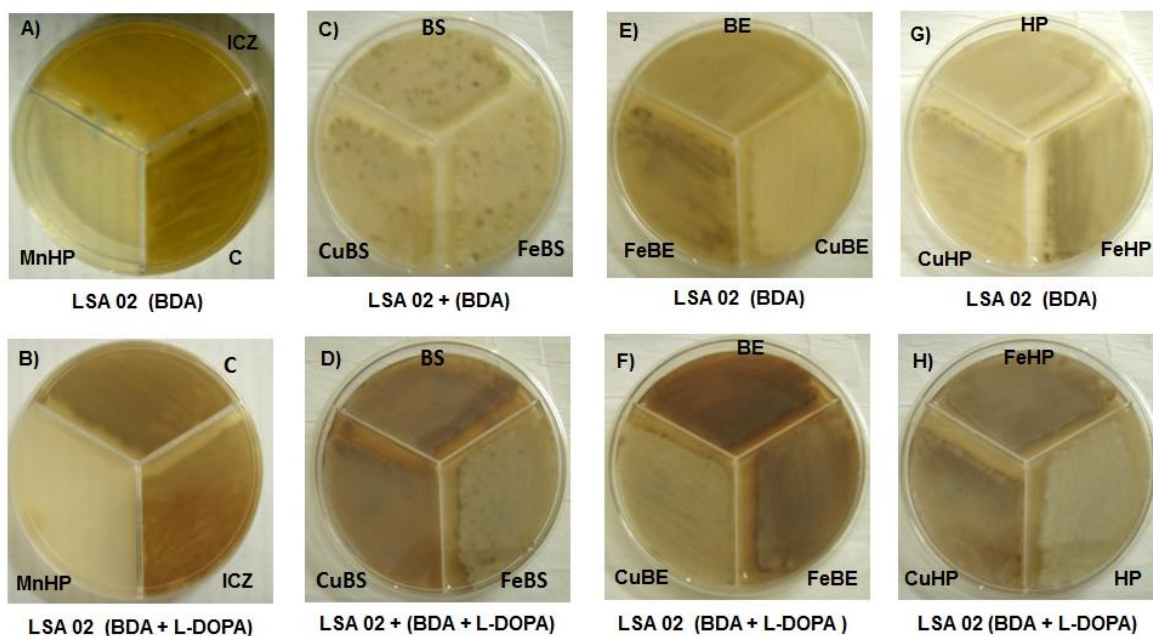


Figura 41. Diferenças no grau de melanização da cepa clínica LSASs02 do fungo *Sporothrix* em Ágar BDA adicionado de L-DOPA após tratamento com compostos.

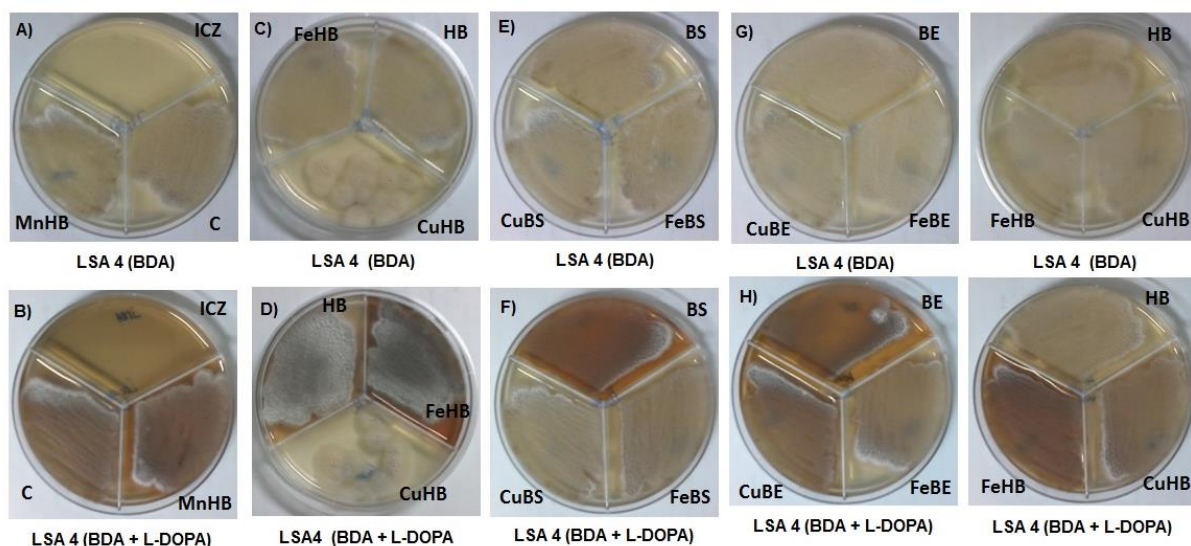


Figura 42. Diferenças no grau de melanização da cepa clínica LSASs04 do fungo *Sporothrix* em Ágar BDA adicionado de L-DOPA após tratamento com compostos.

#### 6.4.2.1 Análise das melaninas por microscopia óptica

Partículas de pigmentos melanoides das culturas de células leveduriformes de *Sporothrix* (LSASs01) incubadas na presença dos compostos natural e sintéticos (HPAs e complexos de coordenação), do indutor (L-DOPA) e inibidor (triciclazol) para a produção do pigmento foram obtidas após tratamento com agentes desnaturantes e ácido quente e observadas por microscopia óptica. A partir do cultivo da forma leveduriforme somente em meio mínimo durante 21 dias a 37°C foi possível realizar o isolamento de partículas escuras (Figura 43 A). Com a adição do substrato L-DOPA no meio de cultura foi possível isolar uma quantidade muito maior de partículas pigmentadas (Figura 43 B), enquanto que com a adição do triciclazol ao meio de cultura houve uma redução da quantidade de partículas produzidas pelo fungo sendo que as partículas apresentaram menor tamanho e estrutura amorfa (Figura 43 C). Quando L-DOPA e triciclazol foram adicionados na mesma cultura foi observado que



o inibidor para síntese do pigmento reduziu, mas não impediu a total pigmentação (Figura 43 D).

A adição dos sais de HPA de prata  $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$ ,  $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]$  e  $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$  inibiu satisfatoriamente a produção do pigmento, sendo os sais de silício mais ativos em relação ao sal de fósforo avaliado, enquanto que o fosfomolibdato ( $\text{Ag}_4[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$ ) não impediu a pigmentação. Nestes tratamentos as partículas apresentaram formato amorfo (Figura 44).

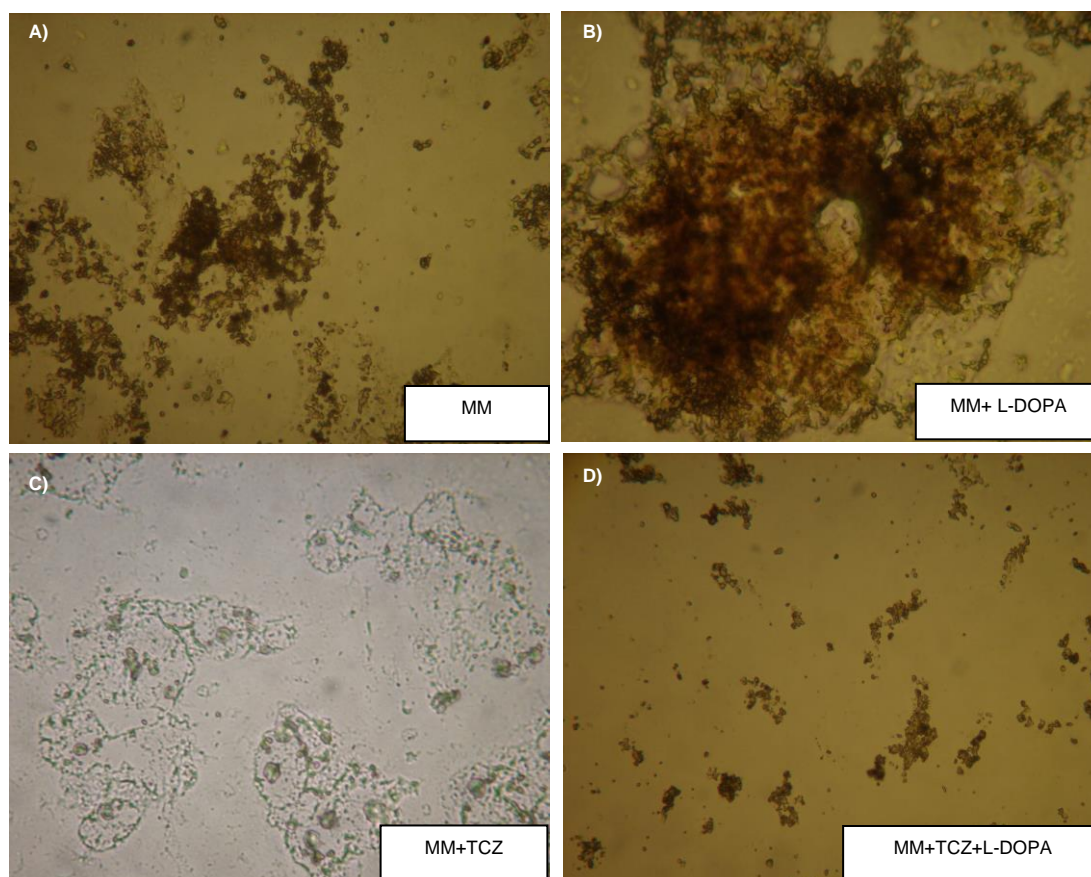


Figura 43. Partículas de melanina da forma leveduriforme de *Sporothrix* spp LSASs01 cultivadas em Meio mínimo (A); Meio Mínimo + 1 mM L-DOPA (B); Meio Mínimo + 8,0 mg/L TCZL (C); Meio Mínimo + 1 mM L-DOPA + 8,0 mg/L TCZL (D). (TCZL: Triciclazol). Aumento 400X.

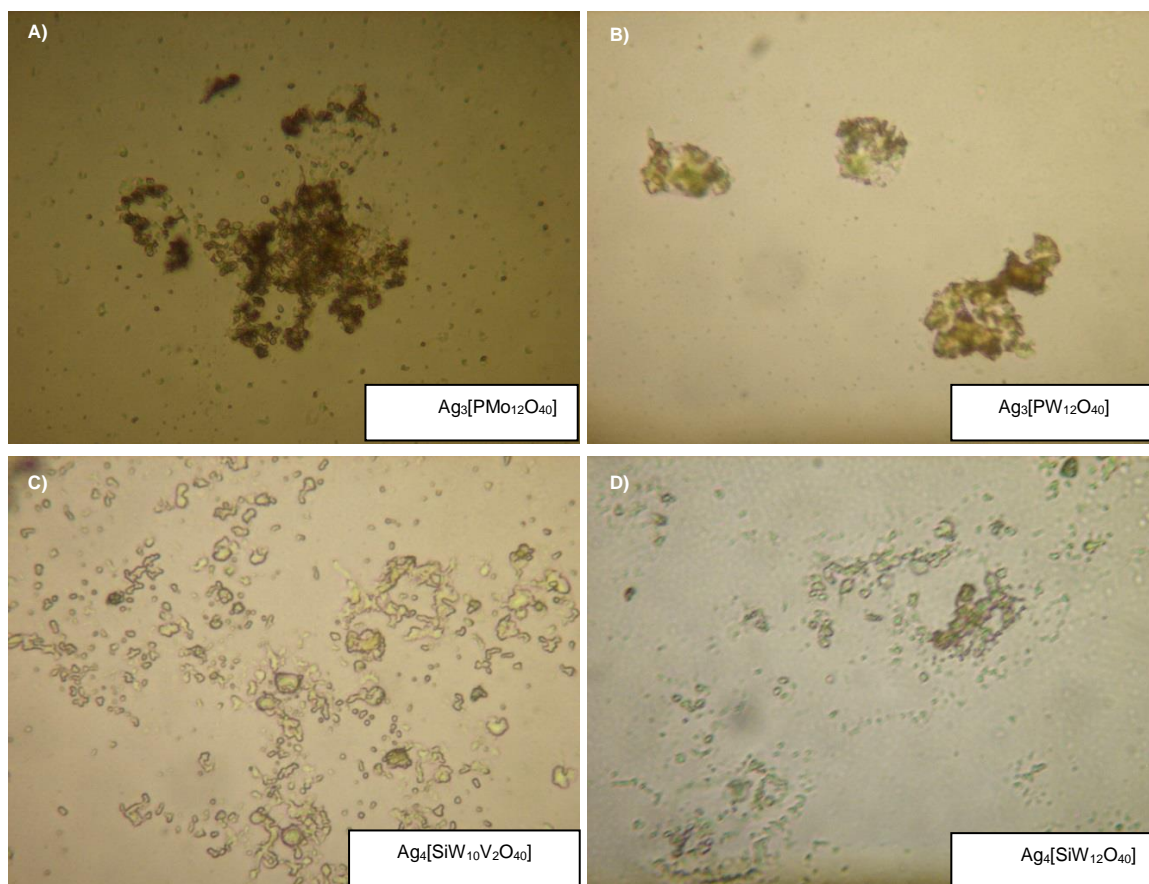


Figura 44. Partículas de melanina da forma leveduriforme de *Sporothrix* spp LSASs01 cultivadas em MM +  $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$  (A); MM +  $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$  (B); MM +  $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]$  (C); MM +  $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$  (D). (MM: Meio Mínimo). Aumento 400X.

Em relação aos complexos de coordenação, foi observado que a adição do ligante BMPA e seus complexos com cobre e ferro (CuBMPA e FeBMPA) também inibiram a produção de pigmento em meio mínimo pelo fungo, sendo observadas apenas debris no tratamento com o ligante BMPA e partículas amorfas nos tratamentos com os complexos CuBMPA e FeBMPA (Figuras 45 A-C). O ligante HBPA e seus complexos com cobre e ferro (CuHBPA e FeHBPA) reduziram, mas não inibiram a síntese do pigmento, sendo observadas partículas de coloração menos intensa na presença quando comparado ao controle não tratado (Figura 45 E).

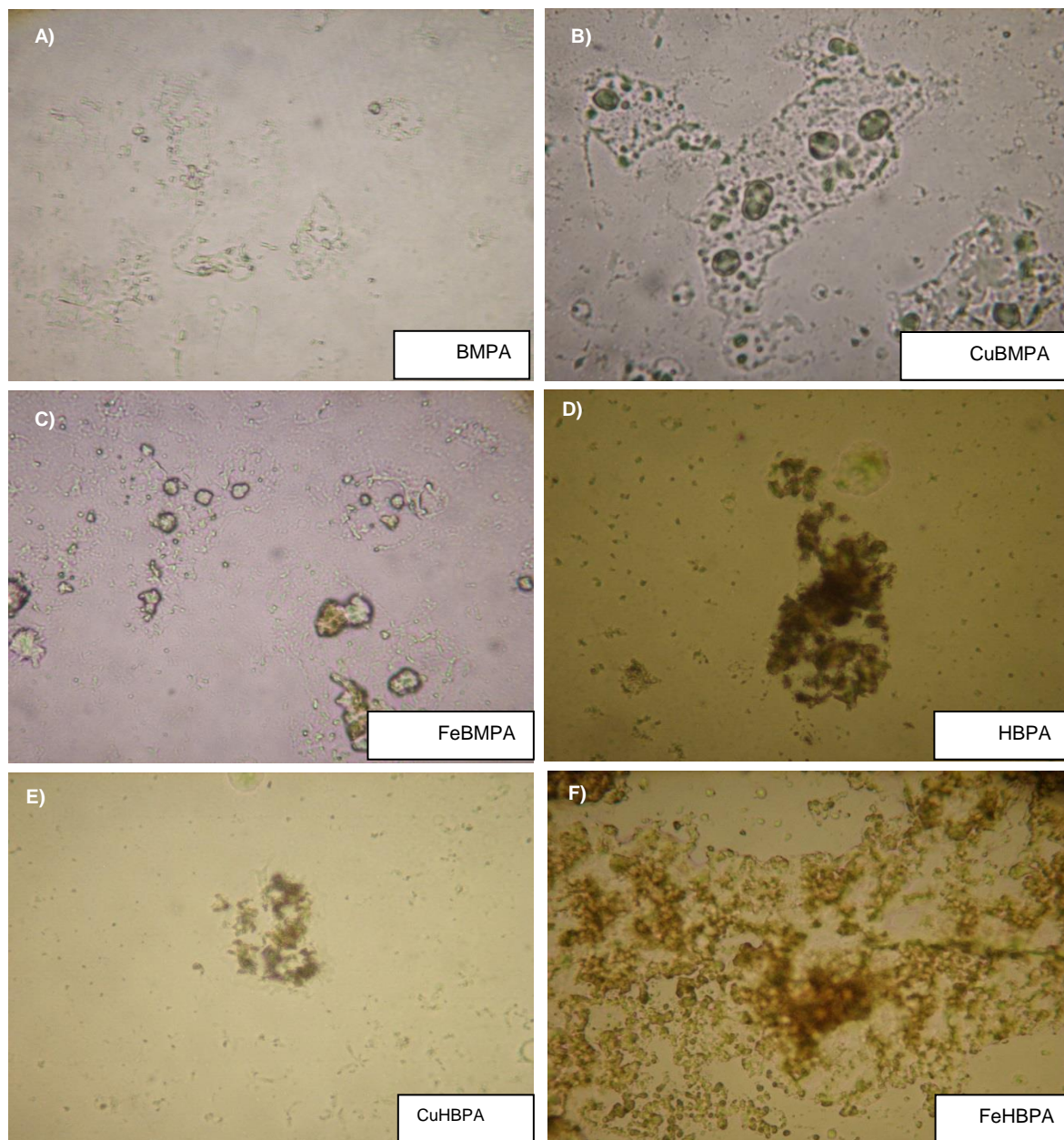


Figura 45. Partículas de melanina da forma leveduriforme de *Sporothrix* spp LSASs01 cultivadas em MM + BMPA (A); MM + CuBMPA (B); MM + FeBMPA (C); MM + HBPA (D); MM + CuHBPA (E); MM + FeHBPA (F). Aumento 400X.

O ligante BS e seus complexos com cobre e ferro (CuBS e FeBS) e os complexos CuBE e FeBE reduziram, mas não inibiram a produção do pigmento em meio mínimo



pelo fungo (Figura 46 A-C, E, F). Em contrapartida, na presença do ligante BE no meio de cultivo, a produção do pigmento foi satisfatoriamente inibida (Figura 46 D).

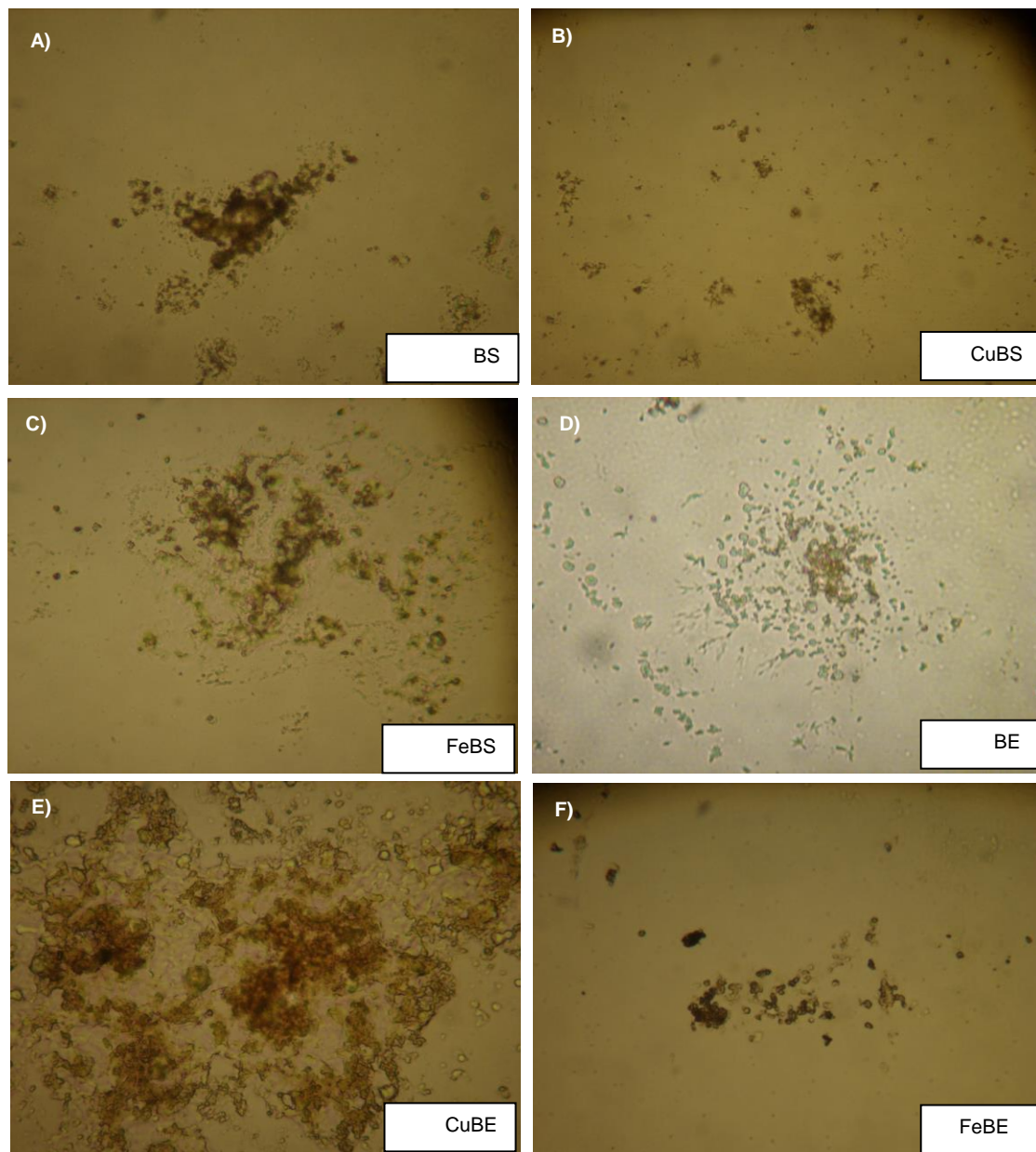


Figura 46. Partículas de melanina da forma leveduriforme de *Sporothrix* spp LSASs01 cultivadas em MM + BS (A); MM + CuBS (B); MM + FeBS (C); MM + BE (D); MM + CuBE (E); MM + FeBE (F). (MM: Meio Mínimo). Aumento 400X.



Em relação ao ligante HPCINOL e seus complexos de coordenação com cobre, ferro e manganês foi observado que a adição dos complexos FeHPCINOL e MnHPCINOL (Figura 47 C e D) ao meio mínimo inibiu satisfatoriamente a produção de pigmento pelo fungo quando comparado com a adição apenas do ligante ou do seu complexo com cobre (CuHPCINOL) (Figura 47 A e B).

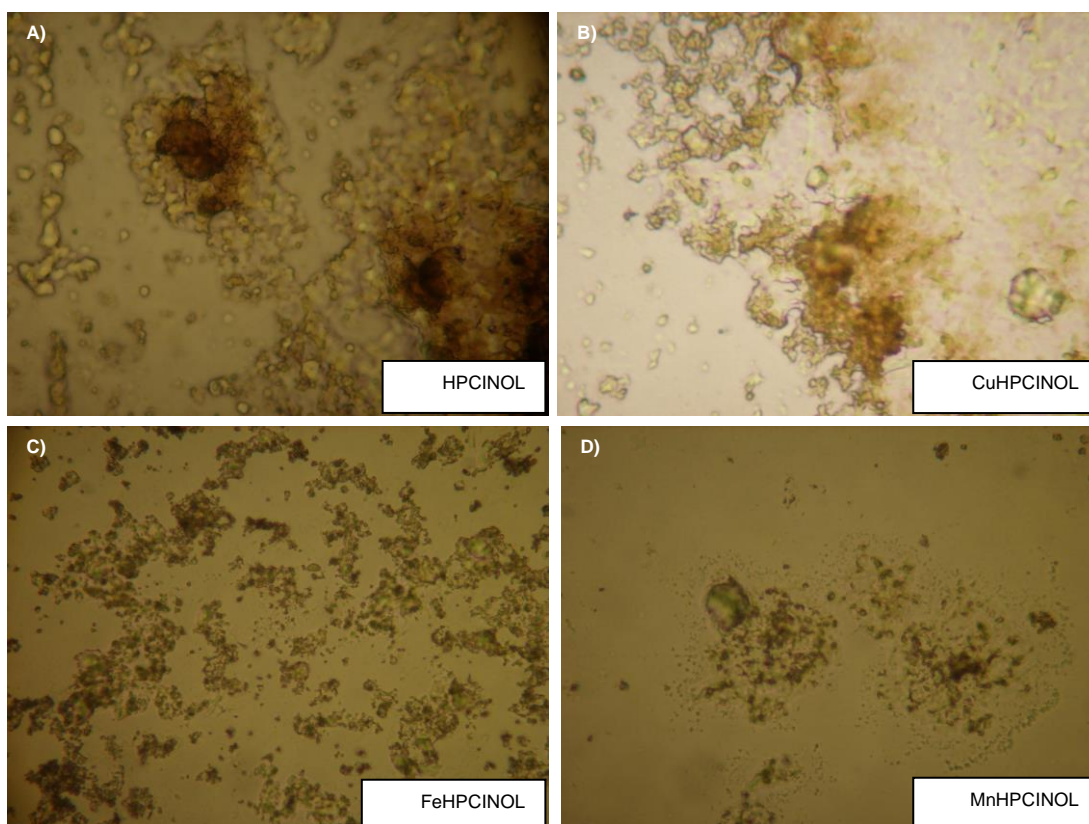


Figura 47. Partículas de melanina da forma leveduriforme de *Sporothrix* spp LSASs01 cultivadas em MM + HPCINOL (A); MM + CuHPCINOL (B); MM + FeHPCINOL (C); MM + MnHPCINOL (D). (MM: Meio Mínimo). Aumento 400X.

Quanto ao extrato etanólico de *C. annuum* L. e análogos capsaicinoides, foi verificado que quando o extrato etanólico, análogo sintético SA1 e o padrão diidroxicapasaicina foram individualmente adicionados ao meio mínimo inibiram satisfatoriamente a produção de pigmento pelo fungo (Figura 48 A, B e F), enquanto

que os análogos SA2 e SA3 e a capsaicina padrão reduziram, mas não inibiram a síntese do pigmento (Figura 48 C, D e E).

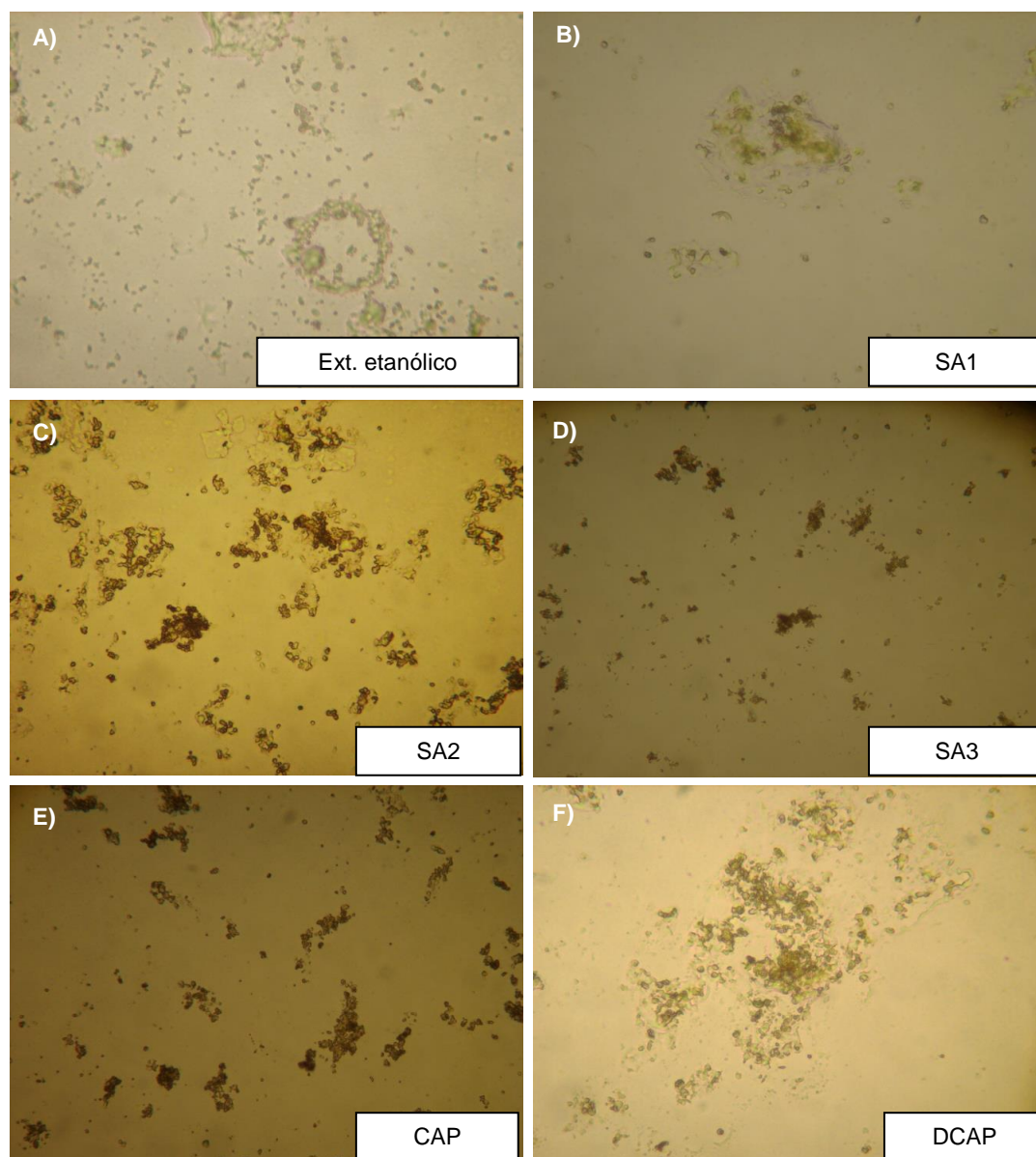


Figura 48. Partículas de melanina da forma leveduriforme de *Sporothrix* spp LSASs01 cultivadas em MM + Extrato etanólico de *C. annuum* L. (A); MM + SA1 (B); MM + SA2 (C); MM + SA3 (D); MM + CAP (E); MM + DCAP (F). (MM: Meio Mínimo; ExEt: Extrato Etanólico; CAP: Capsaicina; DCAP: Diidrocapsaicina). Aumento 400X.

#### 6.4.2.2 Análise por Infravermelho

Para verificar se as partículas de pigmento produzidas pelo fungo após o tratamento com os compostos possuíam alguma semelhança com as partículas isoladas do fungo cultivado na presença de diidroxil-L-fenilalanina (L-DOPA), as amostras foram comparadas por Infravermelho.

A molécula de L-DOPA apresenta grupos funcionais característicos das funções fenol, ácido carboxílico e amina primária (Figura 49 A). Através da análise do seu espectro no infravermelho, as principais bandas de absorção observadas foram condizentes com sua estrutura, demonstrando uma banda larga intensa como duplete em  $3400\text{cm}^{-1}$  e  $3219\text{cm}^{-1}$ . Esta banda possivelmente resultou de uma mistura dos sinais de estiramento característicos de hidroxila de fenol ( $\nu\text{O-H}$ ) com o sinal de hidroxila de ácidos carboxílicos ( $\nu\text{O-H}$ ) e ainda com o sinal característico do estiramento da ligação N-H de aminas primárias, e por isso, o duplete (Figura 49 A). Verificou-se também em  $1722\text{cm}^{-1}$  uma banda intensa característica do estiramento da carbonila ( $\nu\text{C=O}$ ) associada à hidroxila caracterizando a função ácido carboxílico. Na região  $1288\text{cm}^{-1}$  encontra-se uma banda média característica da presença da ligação C-O associada aos grupos fenólicos. Ainda foi observada uma banda de fraca intensidade, em  $1114\text{cm}^{-1}$  característica da ligação C-N de amina. Por fim, ficou destacado uma banda de baixa intensidade em  $796\text{cm}^{-1}$  que é atribuída à ligação C-H do anel aromático (Figura 49 B).

Na molécula de L-DOPA analisada foi observada a presença de um anel aromático. As ligações C=C de aromáticos produzem, na maioria dos casos, de dois a quatro sinais de intensidade média na região de  $1600$  a  $1450\text{cm}^{-1}$ . No espectro obtido, observou-se apenas uma banda intensa em  $1626\text{cm}^{-1}$  que pode estar relacionada ao anel aromático, já que não apareceram sinais na faixa característica deste grupo funcional. O grupamento amina da molécula é representado tanto pelo duplete de  $\nu_{\text{N-H}}$  citado anteriormente, quanto pela banda em  $1114\text{cm}^{-1}$  característica da ligação C-N de aminas. A banda característica de alcanos ( $\delta_{\text{sim}}\text{CH}_3$ ) foi observada na região de  $1392\text{cm}^{-1}$  com média intensidade.

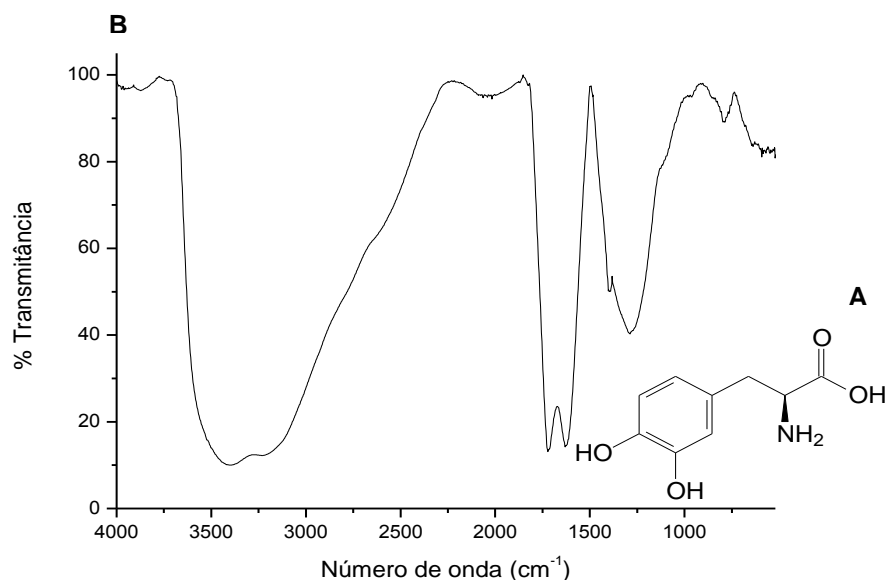


Figura 49. Estrutura molecular da 3,4-Diidroxi-L-fenilalanina (L-DOPA - Sigma Aldrich, EUA) (A) e seu perfil no espectro do Infravermelho mostrando os grupamentos majoritários e de menor intensidade presentes em sua molécula (B).

Comparando o resultado obtido da análise de infravermelho da melanina DOPA com os espectros obtidos das partículas isoladas das células leveduriformes de *Sporothrix* não tratadas e tratadas com os compostos natural e sintéticos, foi observado que as bandas características dos grupamentos funcionais que representaram a melanina DOPA (Sigma Aldrich, EUA) também foram observadas nos espectros das amostras experimentais, indicando que os pigmentos isolados das leveduras de *Sporothrix* apresentaram os mesmos grupamentos químicos em suas moléculas, porém em intensidades diferentes. Mas além destas bandas, outras foram observadas, tais como: duas bandas fortes em  $2926\text{ cm}^{-1}$  e  $2852\text{ cm}^{-1}$  relativas ao estiramento de aromáticos ( $\nu_{\text{C}_{\text{sp}^2}\text{-H}}$ ) e alcanos ( $\nu_{\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}}$ ), respectivamente. Outra banda forte em  $1545\text{ cm}^{-1}$  característica de anéis aromáticos ( $\text{C}=\text{C}$ ) e duas bandas de média intensidade nas regiões  $1465\text{ cm}^{-1}$  e  $1165\text{ cm}^{-1}$  também atribuídas à presença de anéis aromáticos ( $\text{C}=\text{C}$ ) (Figuras 50 – 58).

Na Tabela 11 estão dispostos os valores correspondentes às principais frequências das bandas observadas no espectro de infravermelho da melanina

DOPA e dos pigmentos isolados da cepa clínica LSASs01 do fungo *Sporothrix* tratado e não tratado.

Tabela 11. Frequências observadas no espectro de infravermelho da melanina sintética padrão e dos pigmentos isolados do fungo *Sporothrix* com suas respectivas atribuições.

Nº de onda (cm <sup>-1</sup> )	Atribuições	Pigmentos isolados do fungo após tratamento								
		P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
Melanina DOPA	(v)									
3400	v OH	3446	3383	3381	3352	3358	3263	3385	3263	3392
3219	v CH <sub>Aromático</sub>		3005	3215			3009			
	v C <sub>sp2</sub> -H	2924	2924	2924	2924	2924		2924	2926	2926
	v C <sub>sp3</sub> -H	2852	2852	2852	2852	2852	2852	2854	2856	2856
1722	v C=O	1745	1745	1743	1737	1739	1743	1739	1726	1707
1626	v C=C <sub>arom</sub>	1629	1626	1620	1624	1626	1626	1626	1655	1629
	v C=C <sub>arom</sub>	1535	1545							
	v C=C <sub>arom</sub>	1465		1462	1465	1465	1465	1462		1460
1392	δ <sub>sim</sub> CH <sub>3</sub>	1377	1379		1377	1371	1369		1384	1375
1288	v C-O	1242	1244	1259	1244	1244	1244		1251	1280
	v C-N	1165	1165	1172	1168		1157	1170	1155	1174
1114	v C-N	1114	1116	1118	1114	1112	1111	1120	1111	
	v C-O					1045	1043			
796	δC-H <sub>benzeno</sub>	721	723	723	719	717	717	717	759	705

(P1): pigmento isolado da levedura não tratada cultivada na presença de L-DOPA; (P2): pigmento isolado da levedura tratada com HBPA; (P3): pigmento isolado da levedura tratada como ligante BS; (P4): pigmento isolado da levedura tratada com CuBE; (P5): pigmento isolado da levedura tratada com HPCINOL; (P6): pigmento isolado da levedura tratada com Ag<sub>3</sub>[PMo12O<sub>40</sub>]; (P7): pigmento isolado da levedura tratada com o análogo da capsaicina SA2; (P8): pigmento isolado da levedura tratada com o análogo sintético da capsaicina SA3; (P9): pigmento isolado da levedura tratada com diidrocapsaicina.

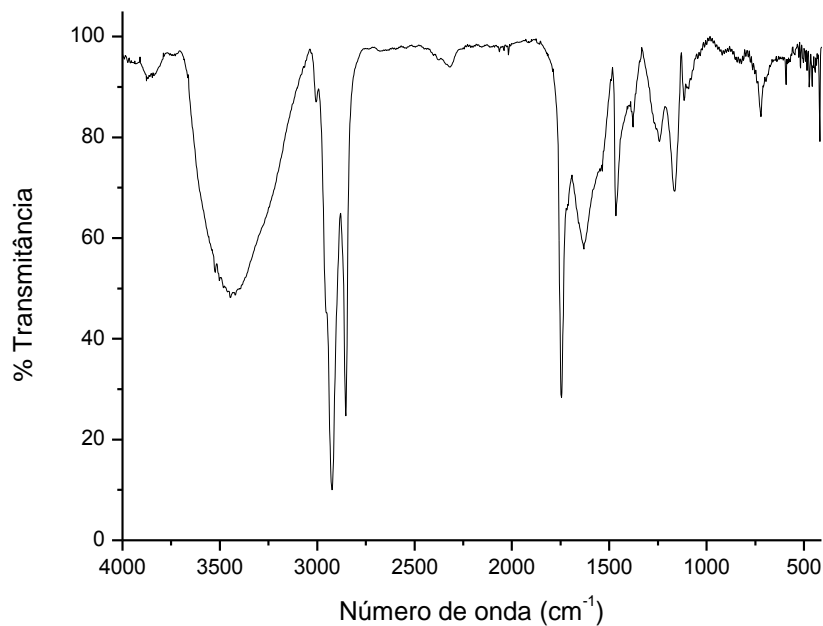


Figura 50. Perfil do espectro no infravermelho das partículas de melanina coletadas após tratamento enzimático, desnaturante e ácido quente a partir do fungo *Sporothrix* LSASs01 não tratado cultivado na presença de L-DOPA.

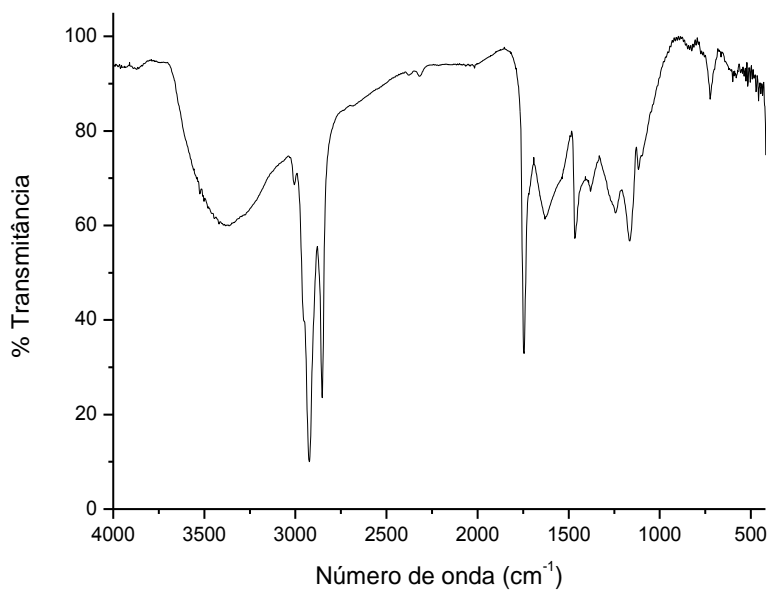


Figura 51. Perfil do espectro no Infravermelho do pigmento isolado do fungo após tratamento com o ligante HBPA.

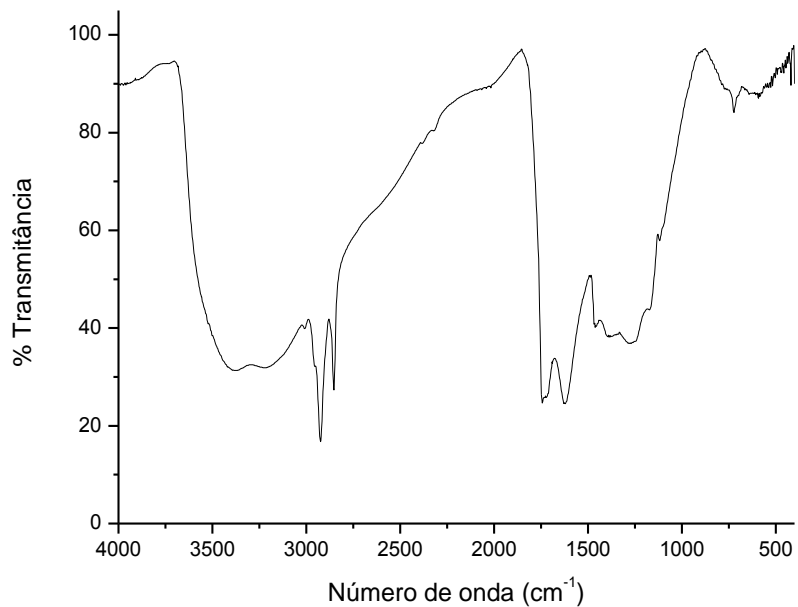


Figura 52. Perfil do espectro no Infravermelho do pigmento isolado do fungo após tratamento com o ligante BS.

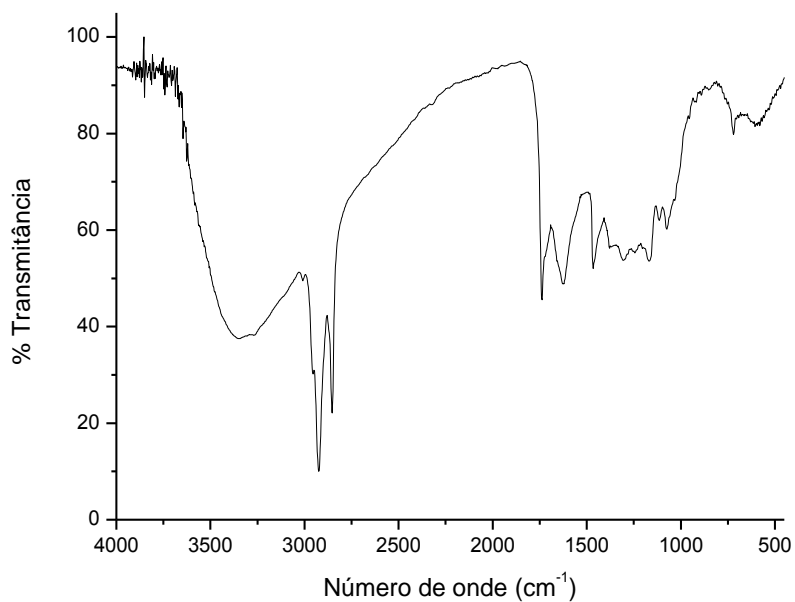


Figura 53. Perfil do espectro no Infravermelho do pigmento isolado do fungo após tratamento com o complexo de coordenação CuBE.

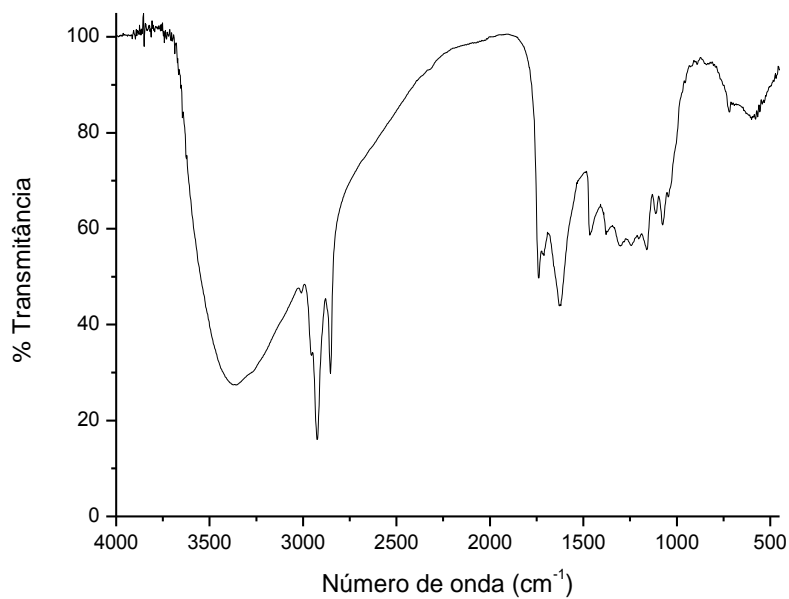


Figura 54. Perfil do espectro no Infravermelho do pigmento isolado do fungo após tratamento com o ligante HPCINOL.

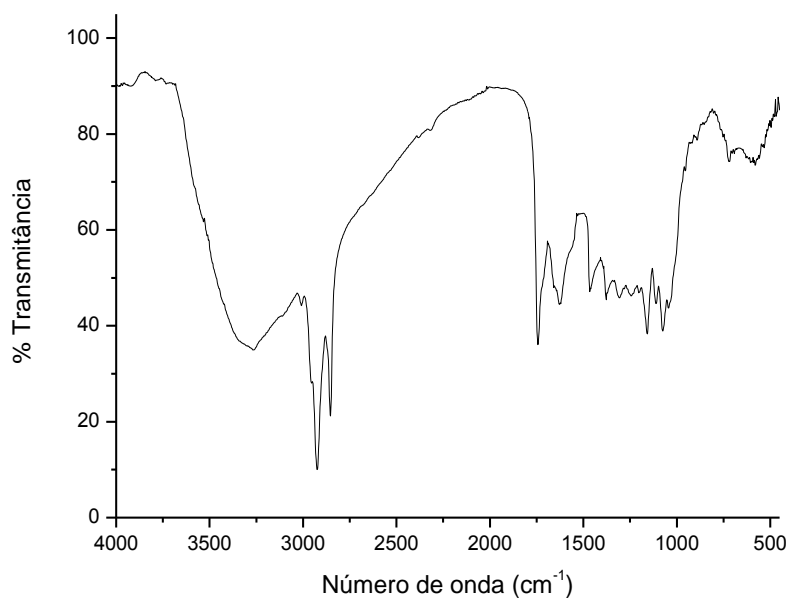


Figura 55. Perfil do espectro no Infravermelho do pigmento isolado do fungo após tratamento com o sal fosfomolibdato de prata  $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$ .



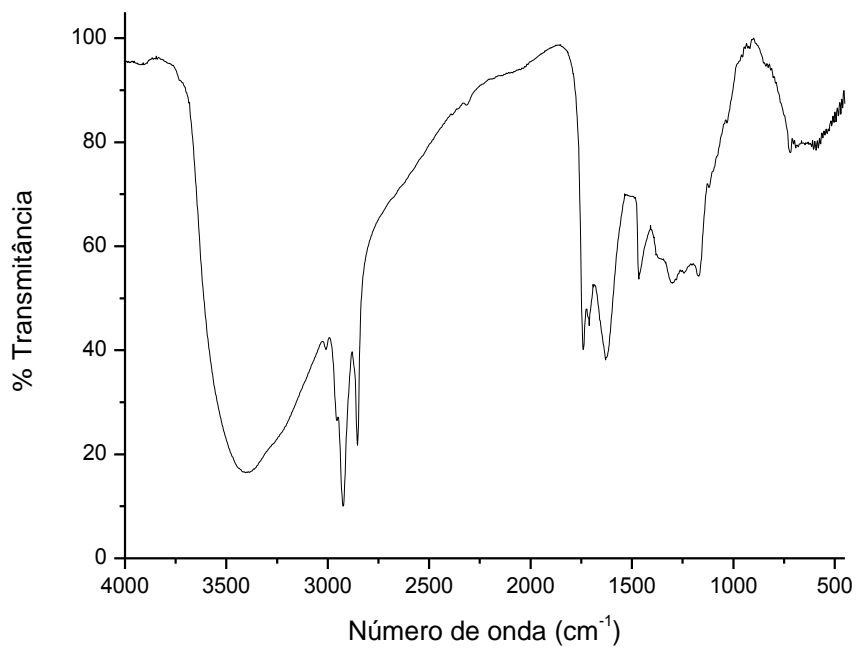


Figura 56. Perfil do espectro no Infravermelho do pigmento isolado do fungo após tratamento com o análogo sintético da capsaicina SA2.

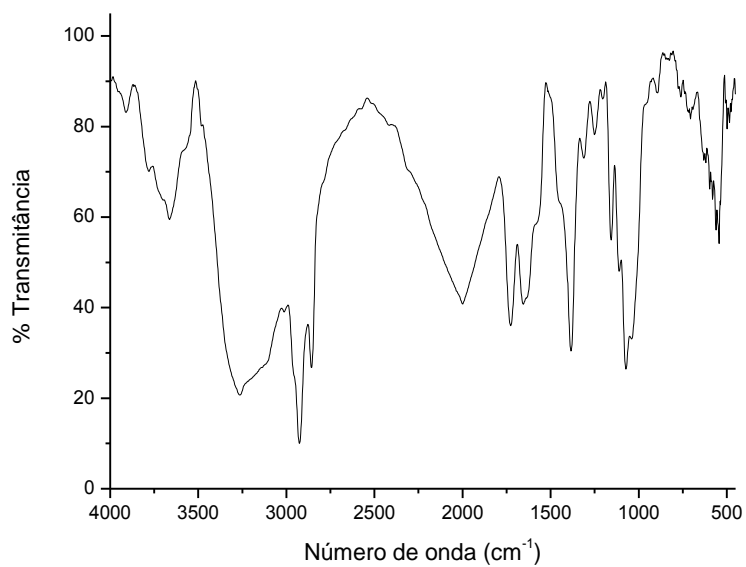


Figura 57. Perfil do espectro no Infravermelho do pigmento isolado do fungo após tratamento com o análogo sintético da capsaicina SA3.

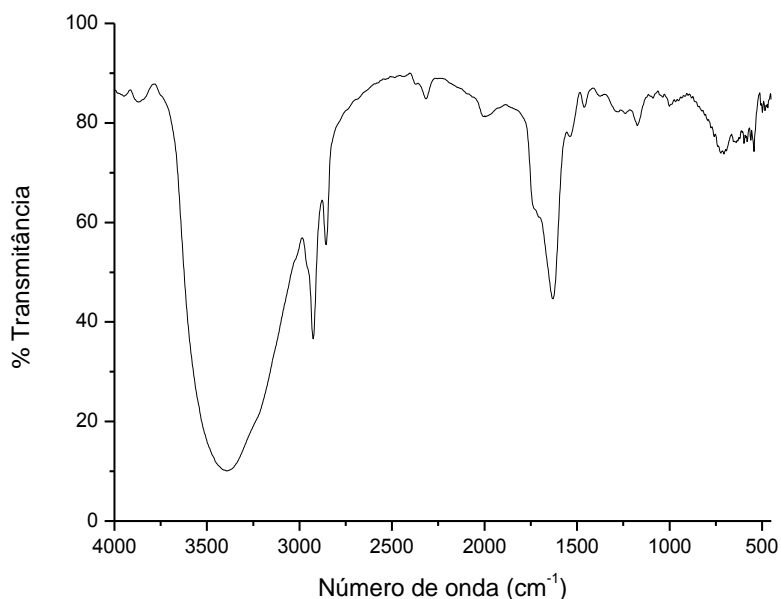


Figura 58. Perfil do espectro no Infravermelho do pigmento isolado do fungo após tratamento com o padrão Diidrocapsaicina.

### **6.5. Avaliação do efeito citotóxico do extrato etanólico de *C. annuum* L., dos análogos sintéticos capsaicinoides, dos heteropoliácidos e dos complexos de coordenação**

O experimento para avaliação do efeito citotóxico dos compostos foi realizado através do microensaio colorimétrico utilizando MTT [brometo 3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium] sobre cultura de células VERO. Foi possível observar que o itraconazol apresentou menor toxicidade quando comparado com os demais antifúngicos avaliados, apresentando uma taxa de viabilidade de 51% quando se utilizou na menor concentração (12,5  $\mu\text{M}/\text{mL}$ ). A terbinafina e anfotericina B não apresentaram diferença significativa para as três concentrações testadas, reduzindo em aproximadamente 60% a viabilidade das células VERO (Gráfico 1).

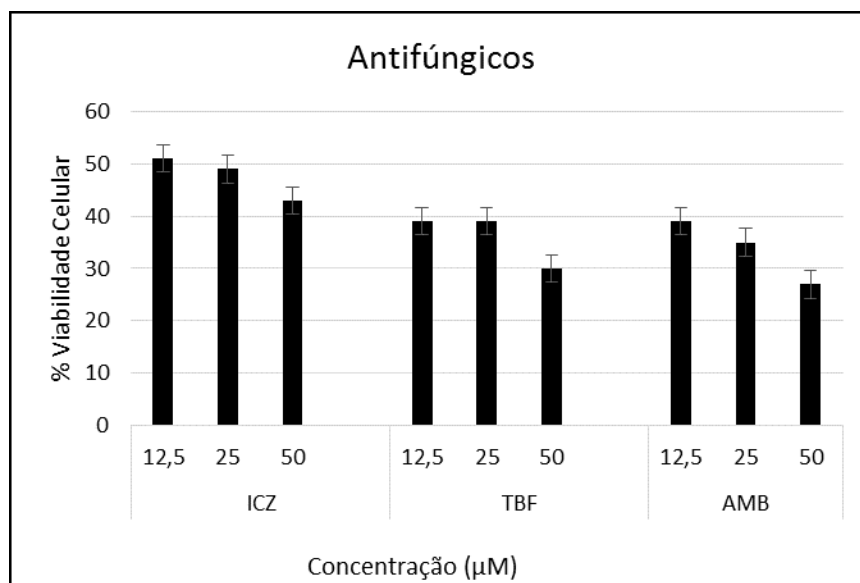


Gráfico 1. Avaliação do efeito citotóxico dos antifúngicos itraconazol, terbinafina e anfotericina B frente às células VERO após 48 horas de incubação através do microensaio colorimétrico utilizando MTT. Como controle negativo (C-) foi utilizada cultura sem tratamento com os compostos. ICZ: Itraconazol; TBF: Terbinafina; AMB: Anfotericina B. Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si, segundo o Teste Tukey ( $P < 0,05$ ).

Os dados obtidos para os sais de HPAs de prata estão apresentados no gráfico 2. Foi possível observar que os sais de HPA  $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$ ,  $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$  e  $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$  reduziram a viabilidade das células VERO em 44%, 49% e 56%, respectivamente, na menor concentração testada (12,5 µg/mL/mL). Enquanto que ( $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]$ ) apresentou 25% de citotoxicidade na maior concentração testada (50 µg/mL), sendo portanto, menos tóxico para esta linhagem celular do que os demais sais de HPAs de prata avaliados.

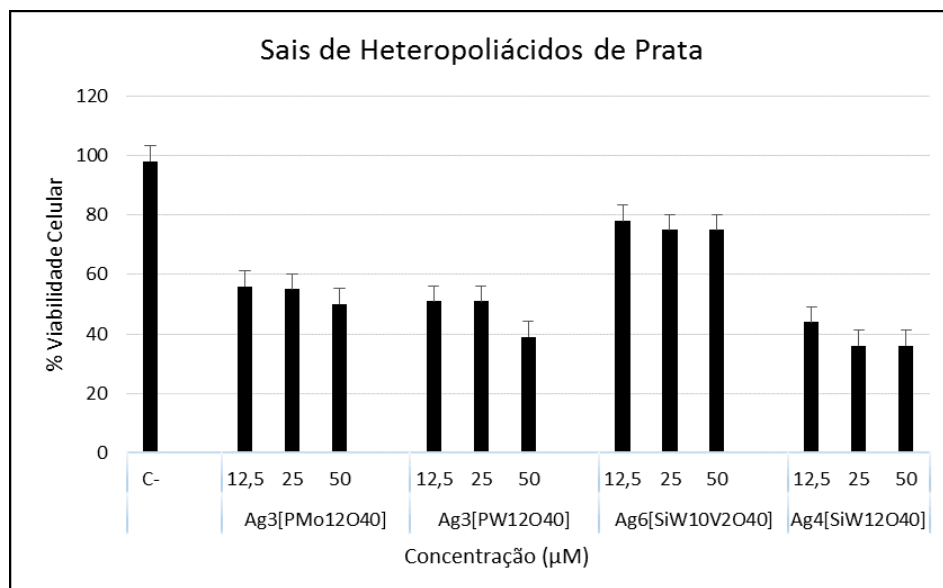


Gráfico 2. Avaliação do efeito citotóxico dos sais de HPAs de prata frente às células VERO após 48 horas de incubação através do microensaio colorimétrico utilizando MTT. Como controle negativo (C-) foi utilizado cultura sem tratamento com os compostos. Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si, segundo o Teste Tukey ( $P < 0,05$ ).

Em relação aos complexos de coordenação formados com o ligante BMPA, foi observado que as células VERO foram mais sensíveis ao complexo CuBMPA, onde se observa uma taxa de viabilidade celular de apenas 12% para a menor concentração testada ( $\mu\text{M}/\text{mL}$ ). Enquanto que frente ao tratamento com a molécula ligante (BMPA) e com complexo FeBMPA, as células VERO foram mais resistentes, exibindo uma taxa de viabilidade celular de 60% e 69%, respectivamente, na mesma concentração ( $12,5 \mu\text{M}$ ) (Gráfico 3).

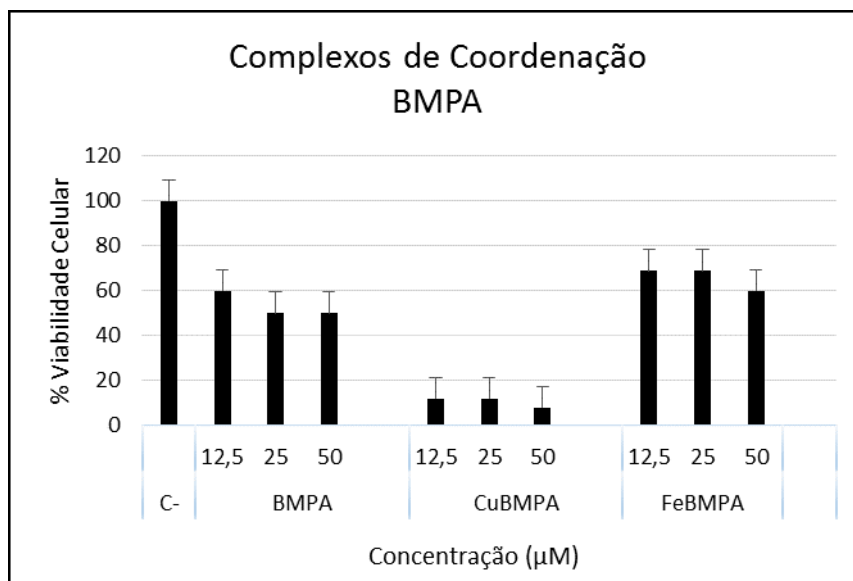


Gráfico 3. Avaliação do efeito citotóxico dos complexos de coordenação: ligante BMPA e complexos CuBMPA e FeBMPA frente às células VERO após 48 horas de incubação através do microensaio colorimétrico utilizando MTT. Como controle negativo (C-) foi utilizada cultura sem tratamento com os compostos. Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si, segundo o Teste Tukey ( $P < 0,05$ ).

As células VERO apresentaram mais de 40% de viabilidade quando tratadas com o ligante HBPA na concentração de 12,5 µM/mL, mas a sua complexação com cobre (CuHBPA) reduziu a viabilidade celular em 90% na mesma concentração. No entanto, o complexo com ferro (FeHBPA) apresentou uma taxa de viabilidade de 68%, sendo portanto, menos tóxico do que a molécula ligante e do que o complexo com cobre (Gráfico 4).

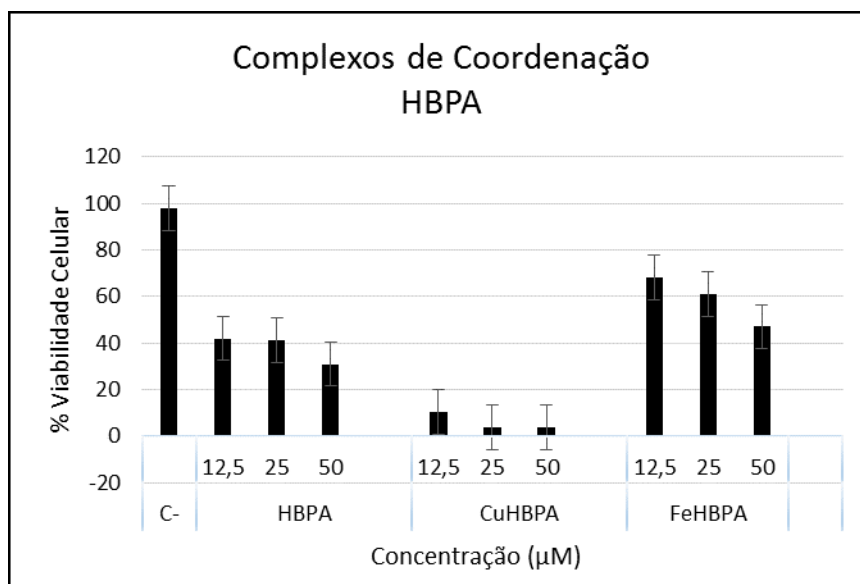


Gráfico 4. Avaliação do efeito citotóxico dos complexos de coordenação: ligante HBPA e complexos CuHBPA e FeHBPA frente às células VERO após 48 horas de incubação através do microensaio colorimétrico utilizando MTT. Como controle negativo (C-) foi utilizada cultura sem tratamento com os compostos. Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si, segundo o Teste Tukey ( $P < 0,05$ ).

Os resultados do ensaio de citotoxicidade obtidos através do tratamento com o ligante BS e seus complexos com cobre e ferro também mostraram que o complexo com cobre (CuBS) apresentou maior efeito citotóxico sobre a viabilidade das células VERO do que o complexo com ferro. Foi observado que o ligante BS apresentou baixa citotoxicidade em relação aos seus complexos, reduzindo a viabilidade celular em apenas 14% na menor concentração testada (12,5 µM). Já os complexos com cobre (CuBS) e ferro (FeBS) exibiram taxas de citotoxicidade de 85% e 21%, respectivamente.

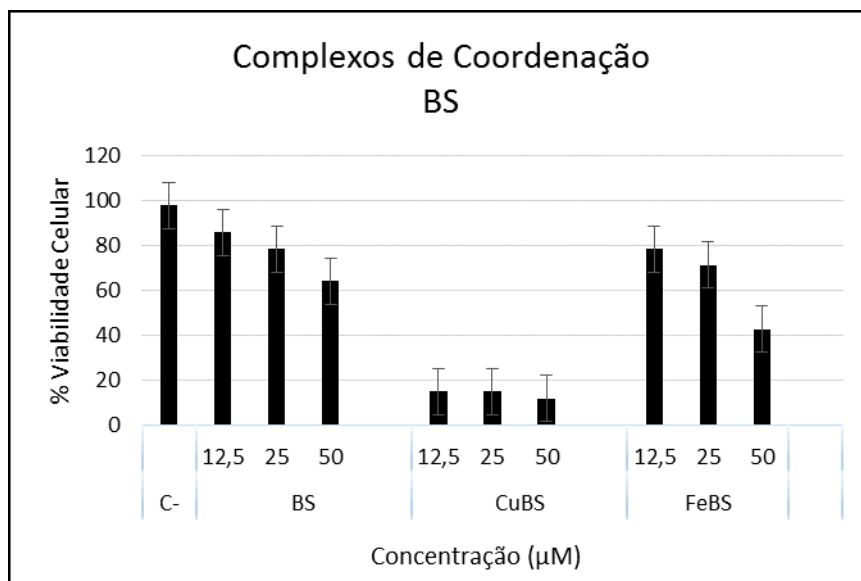


Gráfico 5. Efeito citotóxico dos complexos de coordenação: ligante BS e complexos CuBSA e FeBS frente às células VERO após 48 horas de incubação através do microensaio colorimétrico utilizando MTT. Como controle negativo (C-) foi utilizado cultura sem tratamento com os compostos. Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si, segundo o Teste Tukey ( $P < 0,05$ ).

Os resultados do ensaio de citotoxicidade obtidos através do tratamento com o ligante BE e seu complexo CuBE demonstraram que estes compostos reduziram a viabilidade das células VERO em 60% na menor concentração testada. Para este grupo, o complexo com ferro também foi menos tóxico do que o complexo com cobre, exibindo uma taxa de viabilidade celular de 48% para a concentração de 12 μM/mL (Gráfico 6).

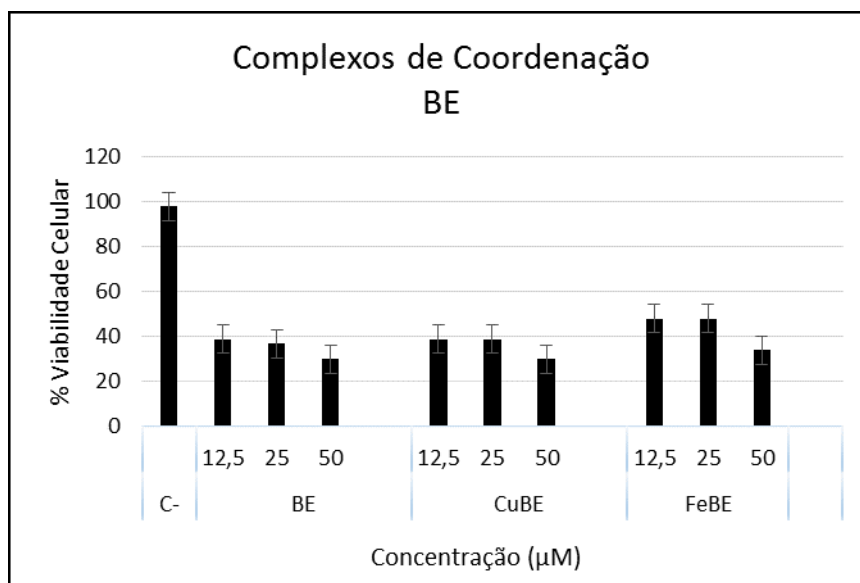


Gráfico 6. Efeito citotóxico dos complexos de coordenação: ligante BE e complexos CuBE e FeBE frente às células VERO após 48 horas de incubação através do microensaio colorimétrico utilizando MTT. Como controle negativo (C-) foi utilizada cultura sem tratamento com os compostos. Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si, segundo o Teste Tukey ( $P < 0,05$ ).

No gráfico 7 estão apresentados os resultados obtidos dos experimentos de viabilidade com o ligante HPCINOL e seus complexos com cobre, ferro e manganês. Foi observado que a molécula ligante apresentou uma taxa de viabilidade de 69% na menor concentração testada, enquanto que os complexos foram mais tóxicos para a linhagem VERO apresentando 38%, 52% e 45% de viabilidade, para os complexos CuHPCINOL, FeHPCINOL e MnHPCINOL, respectivamente, mostrando que a complexação com o cobre novamente aumentou a citotoxicidade do composto, quando comparado com o ligante e os metais manganês e ferro ( $\text{Cu} > \text{Mn} > \text{Fe}$ ).



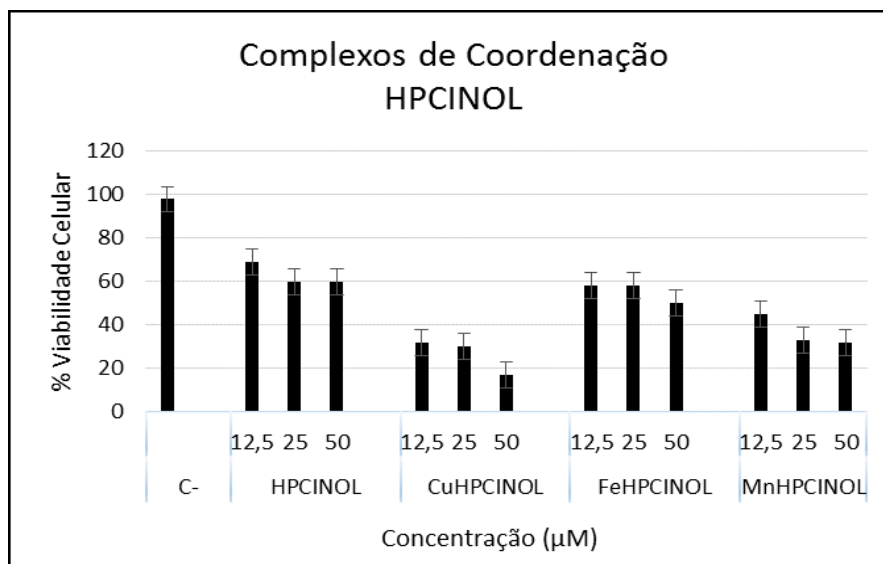


Gráfico 7. Efeito citotóxico dos complexos de coordenação: ligante HPCINOL e complexos CuHPCINOL e FeHPCINOL frente às células VERO após 48 horas de incubação através do microensaio colorimétrico utilizando MTT. Como controle negativo (C-) foi utilizado cultura sem tratamento com os compostos. Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si, segundo o Teste Tukey ( $P < 0,05$ ).

Os resultados obtidos para o extrato etanólico de *C. anuumm L.* demonstraram que este extrato apresentou toxicidade dose-dependente e foi menos tóxico do que os derivados sintéticos capsaicinoides, apresentando uma taxa de viabilidade celular de 63% para a menor concentração testada (12,5 µM/mL). Os tratamentos das células com os análogos sintéticos da capsaicina demonstraram que o SA1 foi mais tóxico que o SA2 e SA3 apresentando taxa de viabilidade celular de 14%, 45% e 43%, respectivamente, na concentração de 12,5 µM/mL. As células tratadas com a capsaicina padrão utilizada como controle apresentaram viabilidade de 49%, sendo superior aos análogos sintéticos, enquanto que a diidrocapsaicina apresentou uma taxa de viabilidade de 34% na menor concentração (Gráfico 8).

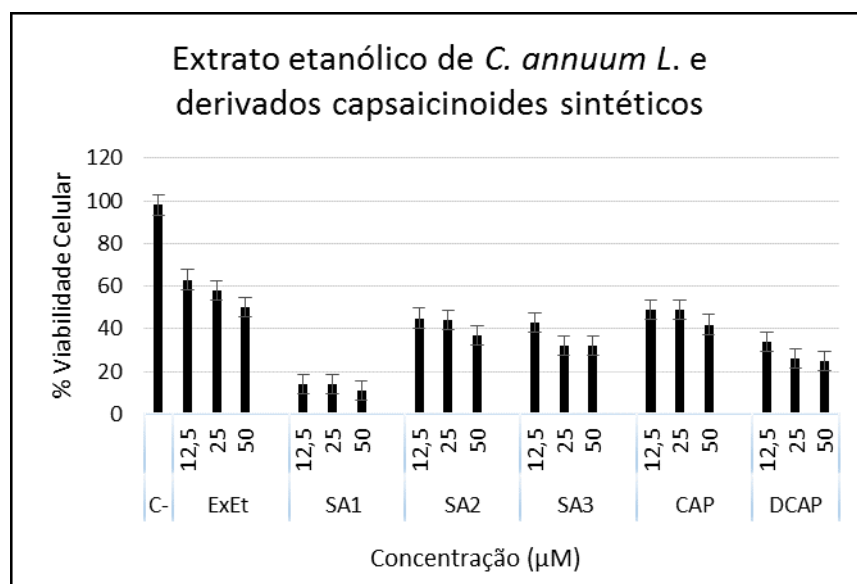


Gráfico 8. Efeito citotóxico do extrato etanólico de *C. annuum* L., derivados capsaicinoides através do microensaio colorimétrico utilizando MTT. Como controle negativo (C-) foi utilizado cultura sem tratamento com os compostos. Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si, segundo o Teste Tukey ( $P < 0,05$ ).

## 6.6. Ensaio utilizando nematoide de vida livre

### 6.6.1 Ensaio de toxicidade dos compostos sobre o nematoide de vida livre *P. redivivus*

Na tabela 12 estão representados os valores das médias de sobrevivência e mortalidade dos nematoides incubados na concentração de 512 µg/mL. Os sais de heteropoliácidos de prata, complexos de coordenação, extrato etanólico de *C. annuum* L. e análogos sintéticos da capsaicina utilizados neste trabalho não apresentaram toxicidade para o nematoide *P. redivivus* no intervalo de 10 dias a

28°C, com exceção para o complexo CuHBPA e antifúngicos terbinafina e anfotericina B que reduziram a média de sobrevivência dos nematoides para 70%, 90% e 40%, respectivamente. Também foi observado que na presença de alguns tratamentos houve multiplicação dos vermes, indicando que concentrações de 512 µg/mL destes compostos não interferem na produção de progênes viáveis, exceto na presença do ligante HPCINOL e seus complexos CuHPCINOL, FeHPCINOL e MnHPCINOL onde foram observados apenas os nematoides iniciais.

Embora tenha sido observado que o número de nematoides iniciais (n=10) não tenha sido reduzido durante os dez dias de tratamento, na presença do análogo sintético da capsaicina SA1, Ag<sub>3</sub>[PMo<sub>12</sub>O<sub>40</sub>], Ag<sub>3</sub>[PW<sub>12</sub>O<sub>40</sub>], BMPA, CuBPA, CuHBPA, FeBPA, BS, CuBE, CuHPCINOL e itraconazol houve redução da sobrevivência dos nematoides jovens, demonstrando que nesta concentração os compostos apresentaram toxicidade de 6,25%, 7,14%, 8,3%, 12%, 33%, 10%, 7%, 5%, 11,1%, 30% e 28%, respectivamente, para os nematoides deste estágio de vida.

Tabela 12. Citotoxicidade do extrato etanólico de *C. annuum* L., análogos sintéticos da capsaicina, sais de HPA de prata e complexos de coordenação.

<i>Extrato/Compostos sintéticos</i>	<i>Média de sobrevivência (%)</i>	<i>Média de mortalidade (%)</i>
<i>Controle</i>	100	0
<i>Ext Et. C. annuum</i>	100	0
<i>SA1</i>	100	6,25
<i>SA2</i>	100	0
<i>SA3</i>	100	16
<i>CAP</i>	100	0
<i>DCAP</i>	100	0
<i>Ag<sub>3</sub>[PMO<sub>12</sub>O<sub>40</sub>]</i>	100	7,14
<i>Ag<sub>3</sub>[PW<sub>12</sub>O<sub>40</sub>]</i>	100	8,3
<i>Ag<sub>6</sub>[SiW<sub>10</sub>V<sub>2</sub>O<sub>40</sub>]</i>	100	0
<i>Ag<sub>4</sub>[SiW<sub>12</sub>O<sub>40</sub>]</i>	100	5
<i>BMPA</i>	100	12
<i>CuBMPA</i>	100	33
<i>FeBMPA</i>	100	0
<i>HBPA</i>	100	0
<i>CuHBPA</i>	70	10
<i>FeHBPA</i>	100	7
<i>BS</i>	100	5
<i>CuBS</i>	100	0
<i>FeBS</i>	100	0
<i>BE</i>	100	0
<i>CuBE</i>	100	11,1

<i>FeBE</i>	100	0
<i>HPCINOL</i>	100	0
<i>CuHPCINOL</i>	100	30
<i>FeHPCINOL</i>	100	0
<i>MnHPCINOL</i>	100	0
<i>Itraconazol</i>	100	28,6
<i>Terbinafina</i>	90	12,5
<i>Anfotericina B</i>	40	60

\*A porcentagem das médias de sobrevivência e mortalidade representam a média de três experimentos independentes.

### 6.6.2. Sobrevivência e morte de *P. redivivus* após infecção pelo fungo *Sporothrix*

Para determinar se o fungo *Sporothrix* poderia servir como fonte de alimento para *Panagrellus* ou ser patogênico para este nematoide, placas com leveduras em crescimento confluyente (CMDB/IOC 0199 e LSASs01) e uma suspensão de inóculo das mesmas cepas na forma leveduriforme foram incubadas com os nematoides a 25°C e 37°C no período entre 24h e 120h. Foi observado que a cepa LSASs01 e CMDB/IOC 01990599 não possuem habilidade em reduzir o tempo de vida de *P. redivivus* à temperatura ambiente (25-28°C) tanto em Ágar quanto em meio líquido (Gráfico10). No entanto, quando o nematoide foi exposto às mesmas cepas fúngicas a 37°C foi observado que os vermes começaram a morrer a partir de 48h de exposição em meio de cultura líquido e a partir de 72h em Ágar quando comparados aos nematoides do grupo controle não-infectados (Gráfico 9). Vermes mortos foram identificados quando não apresentavam tônus muscular ou quando não respondiam ao estímulo com alça de platina (Figura 59).

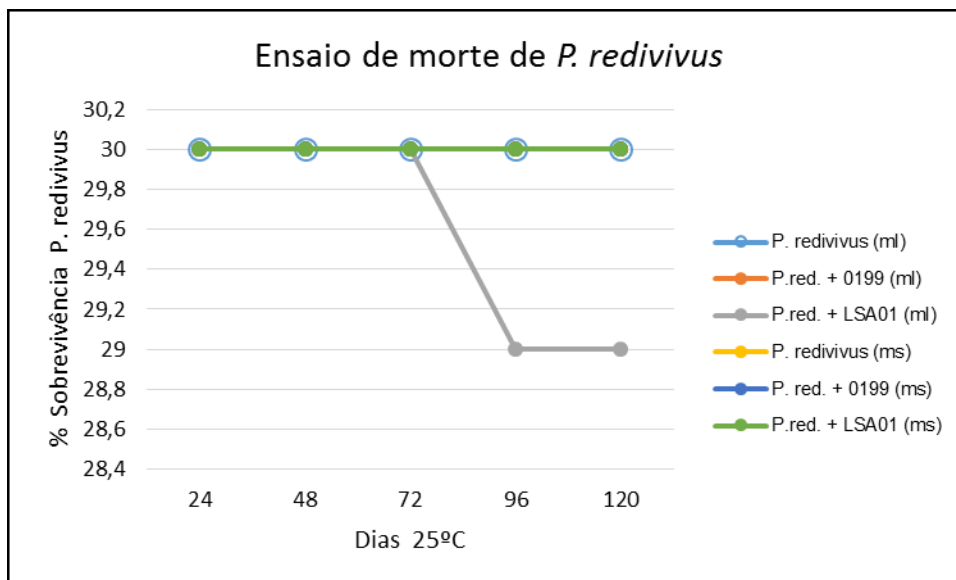


Gráfico 9. Tempo de morte do nematoide *P. redivivus* após a exposição às cepas CMDB/IOC 0199 e clínica LSASs01 de *Sporothrix spp.* a 25°C em meio de cultura sólido (Ágar BHI) e meio de cultura líquido (caldo BHI). (ml: meio de cultura líquido; ms: meio de cultura sólido). Os valores correspondem às médias de três experimentos independentes.

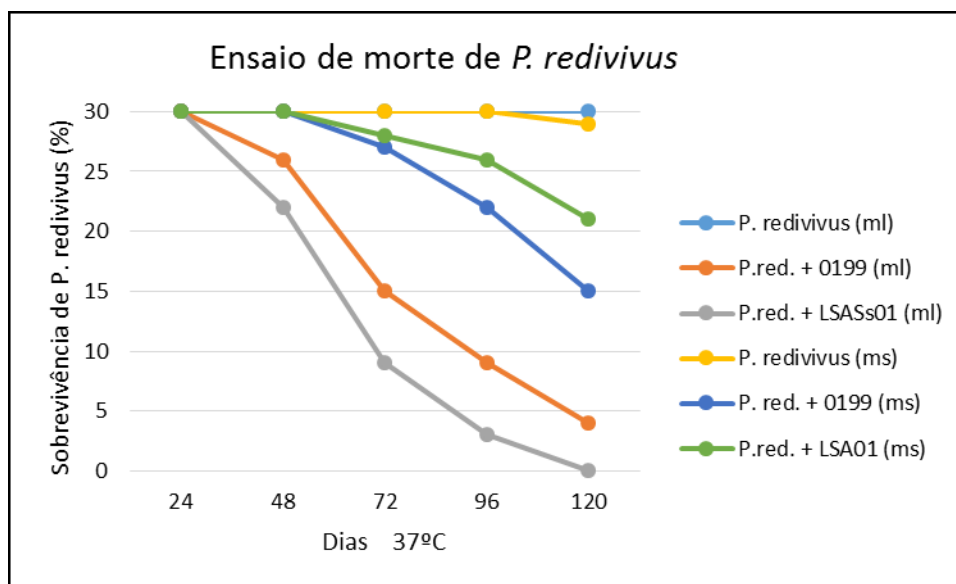


Gráfico 10. Tempo de morte do nematoide *P. redivivus* após a exposição às cepas CMDB/IOC 0199 e clínica LSASs01 de *Sporothrix spp.* a 37°C em meio de cultura sólido (Ágar BHI) e meio de cultura líquido (caldo BHI). (ml: meio de cultura líquido; ms: meio de cultura sólido). Os valores correspondem às médias de três experimentos independentes.

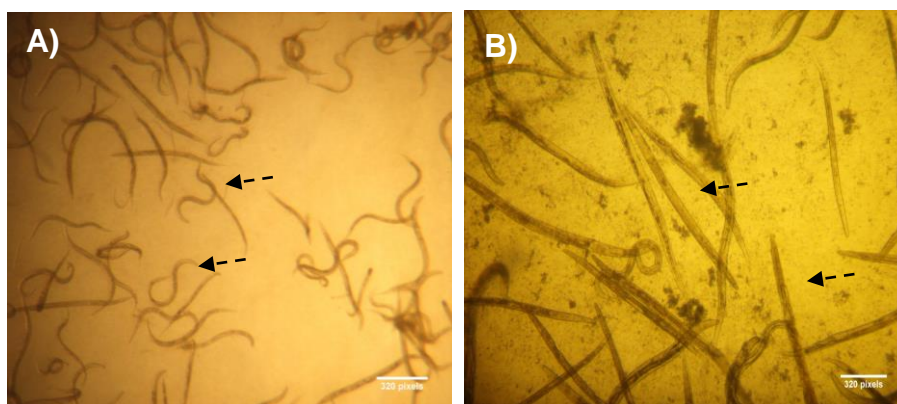


Figura 59. Aparência de *P. redivivus* em caldo BHI a 37°C. Micrografia de *P. redivivus* vivo na ausência de patógenos (A) e infectado com *Sporothrix* (B). Os vermes foram examinados em um estereomicroscópio (Nikon). As setas negras demonstram a conformação dos vermes em formado de “S” indicando que os mesmos estão vivos (A), enquanto que nematoides eretos correspondem aos vermes mortos (B).

Para melhor observar a interação entre os dois microrganismos, os vermes infectados durante 48h com *Sporothrix* na forma leveduriforme em meio de cultura líquido foram preparados para microscopia eletrônica de varredura e transmissão. Por microscopia eletrônica de varredura foi possível observar que os vermes não infectados apresentaram morfologia normal com curvatura do corpo (Figura 60 A) e integridade da cutícula quando observado em maior aumento (Figura 60 A'). Enquanto em vermes infectados com *Sporothrix* LSA01 durante 48h foi possível observar colônias fúngicas aderidas à cutícula (Figura 60 B e C), sendo que em algumas regiões do corpo do verme, a cutícula apresentava-se bastante degradada (Figuras 60 B').

Observações realizadas por MET demonstraram o acúmulo de leveduras intactas na porção anterior da cavidade bucal do nematoide *P. redivivus*. Foi possível observar tanto por microscopia óptica quanto por MET, que o fungo foi capaz de invadir o tecido do nematoide, não sendo observados, portanto, na luz intestinal como ocorre no modelo *C. elegans* quando infectado com outros patógenos (Figura 61).

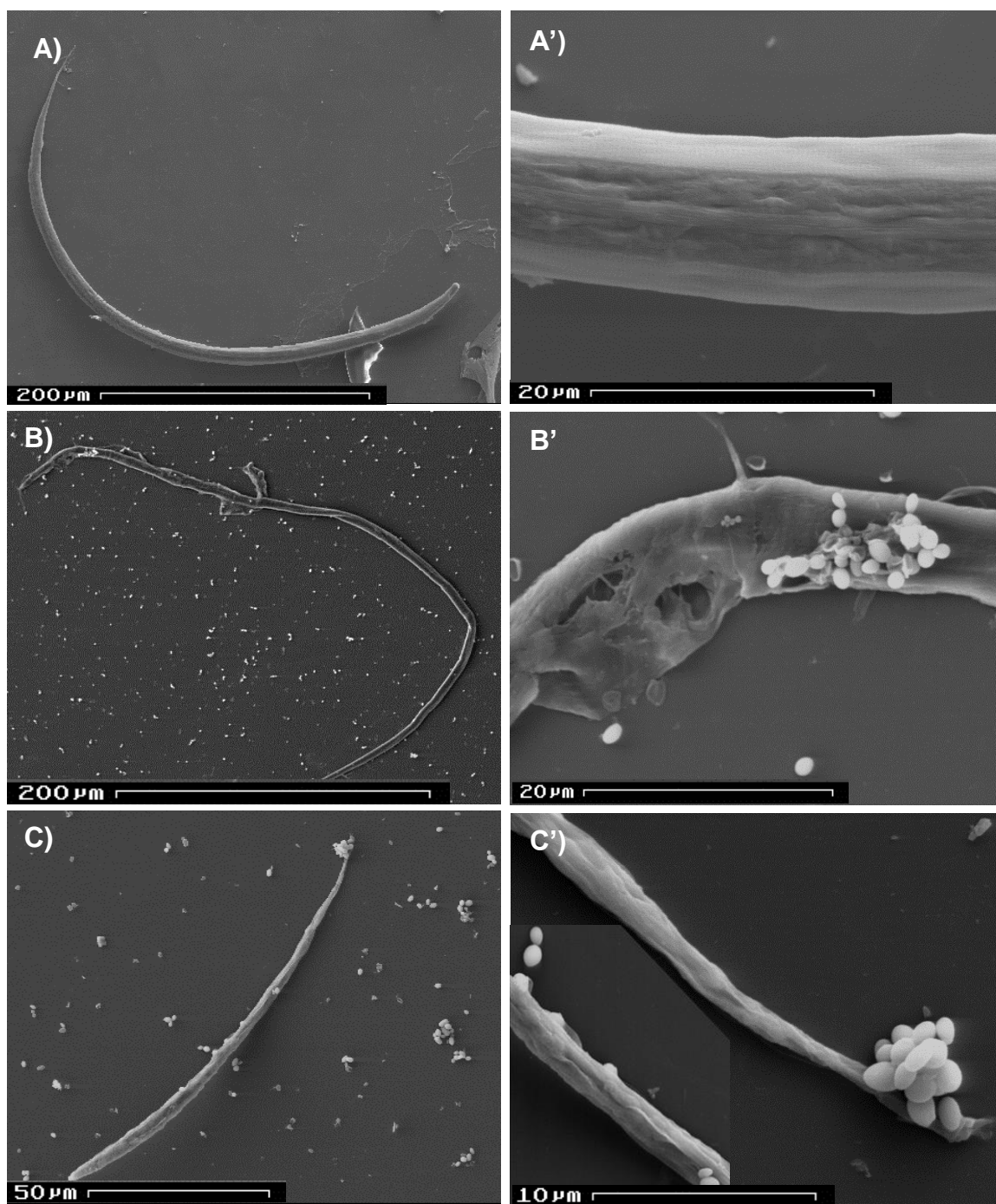


Figura 60. MEV de *P. redivivus*. (A e A') *P. redivivus* controle não infectado; (B e C) *P. redivivus* infectado com a forma leveduriforme de *Sporothrix* spp.LSAss01.



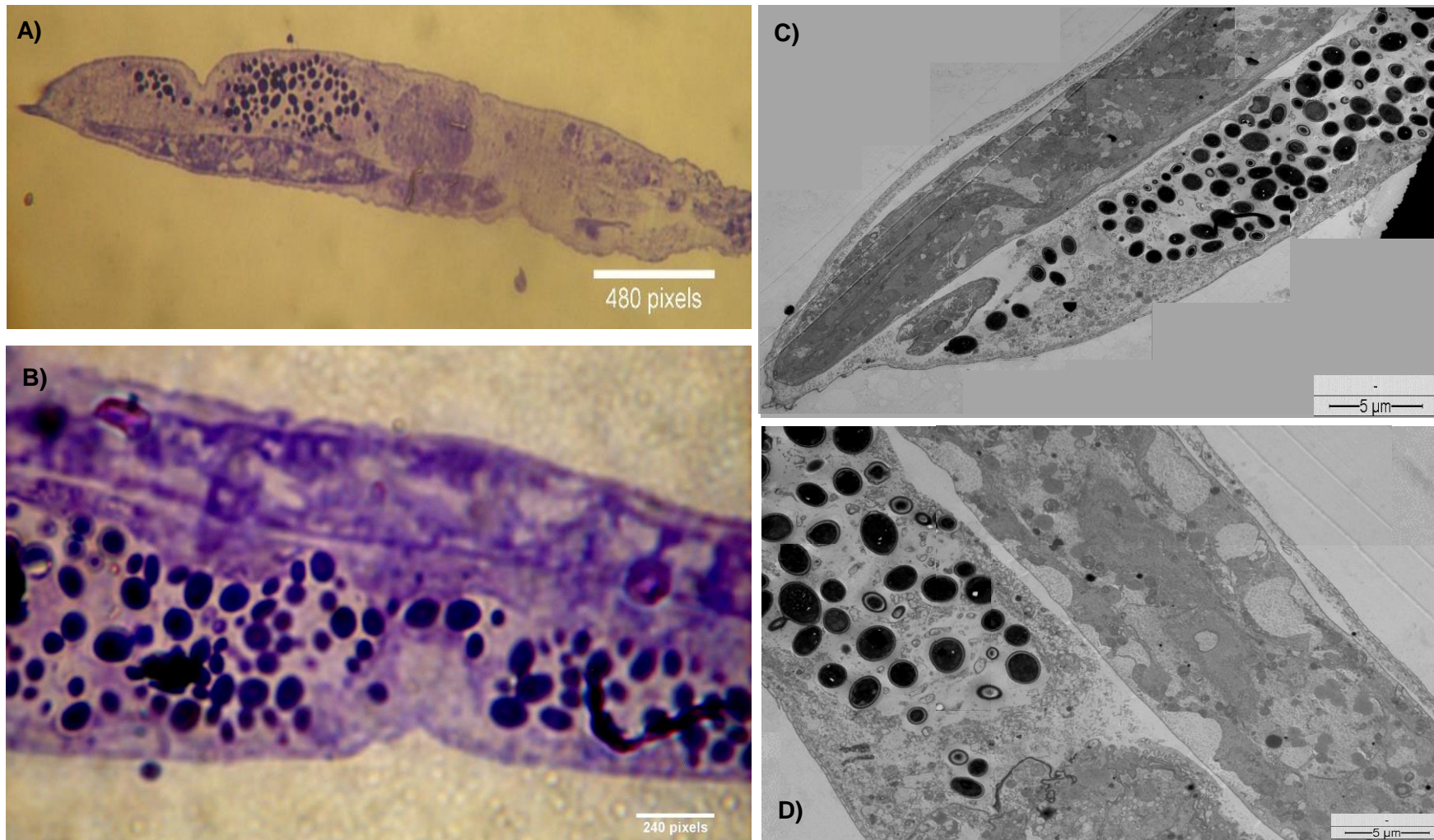


Figura 61. Microscopia óptica e eletrônica de transmissão de *P. redivivus*. Seção longitudinal de *P. redivivus* infectado com *Sporothrix* spp. LSASs01 a 37°C demonstrando leveduras intactas alojadas no tecido muscular do nematoide. (A e B) Microscopia óptica; (C e D) Microscopia eletrônica de transmissão.

Nematoides no estágio adulto infectados com a forma leveduriforme da cepa LSASs01 durante 48h a 37°C foram expostos a três diferentes concentrações dos compostos durante 5 dias a 37°C. Foi observado que a porcentagem de sobrevivência dos nematoides na presença dos compostos  $Ag_3[PMo_{12}O_{40}]$ ,  $Ag_3[PW_{12}O_{40}]$ ,  $Ag_4[SiW_{12}O_{40}]$ , BMPA, CuBMPA, FeHBPA, CuBS, CuBE, MnHPCINOL e itraconazol foi mais significativa do que em relação aos demais compostos (Gráficos 11 e 12).

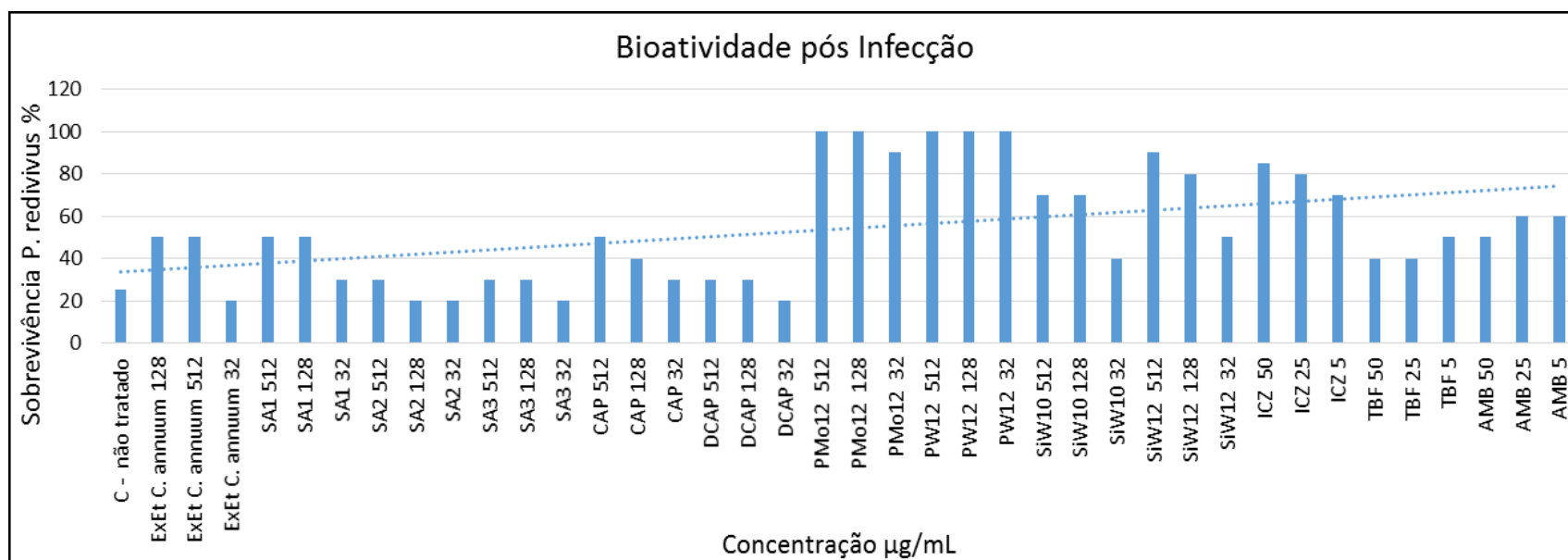


Gráfico 11. Sobrevivência dos vermes infectados com *Sporothrix* spp. quando na presença dos sais de HPAs de prata, extrato etanólico de *C. annuum* L. e análogos sintéticos da capsaicina (32, 128 e 512 µg/mL).

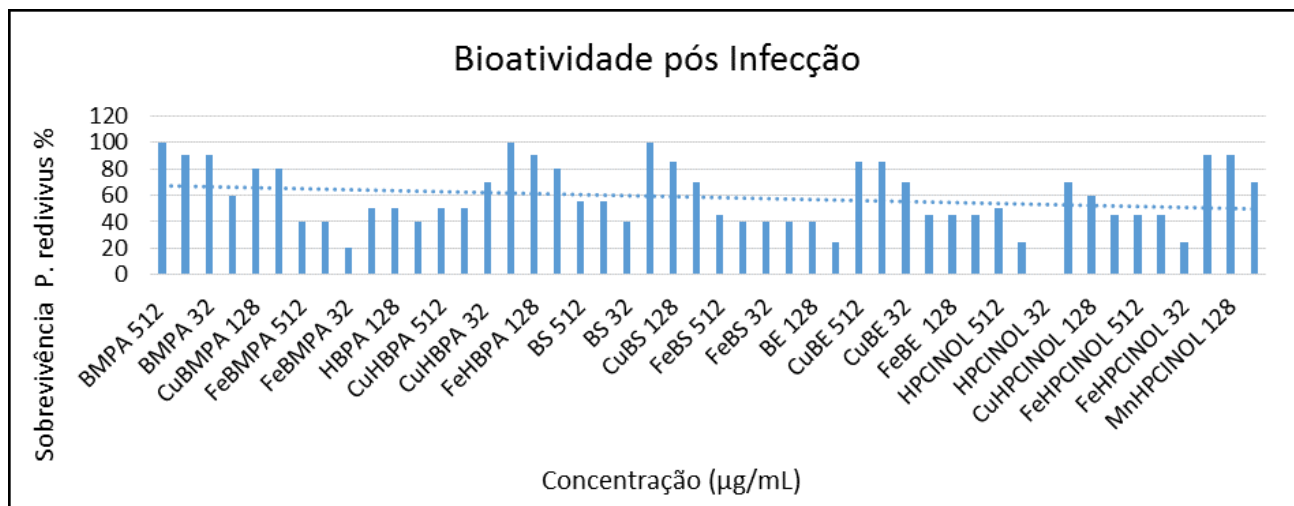


Gráfico 12. Sobrevivência dos vermes infectados com *Sporothrix* spp. quando na presença dos compostos de coordenação de cobre e ferro (32, 128 e 512 µg/mL).

## 7. Discussão

A esporotricose é uma doença infecciosa causada pela inoculação traumática de fungos do complexo *Sporothrix* na pele do hospedeiro (Kwon-Chung & Bennet, 1992; Barros et al., 2011). No Brasil, a região sudeste é a mais afetada, onde a doença assumiu proporções epidêmicas envolvendo gatos e humanos (Barros et al., 2010).

O itraconazol é o fármaco de primeira escolha para o tratamento das manifestações cutâneas, porque normalmente a doença não acomete outros órgãos além da pele, da mucosa e do subcutâneo em indivíduos imunocompetentes, porém a doença se manifesta de forma mais grave em indivíduos imunocomprometidos com necessidade de internações e, neste caso, o uso de fármacos mais tóxicos como a anfotericina B e/ou por tempo prolongado torna-se necessário. De acordo com Barros et al. (2010) e Freitas et al. (2014), a maioria dos acometidos além de terem pouca ou nenhuma instrução a respeito desta micose, não possuem condições de realizar o próprio tratamento e de seus animais de companhia, e com isso acabam

abandonando esses animais em outros locais e, conseqüentemente, propagam a doença no ambiente.

Nos gatos, a esporotricose costuma ser mais severa porque é comum o acometimento sistêmico, levando a formas graves e de difícil tratamento. Para os animais, o itraconazol e o iodeto de potássio são os fármacos mais utilizados para o tratamento, sendo que o uso deste último em felinos pode provocar a morte por toxicidade e, portanto, o itraconazol seria o fármaco de escolha também para esta espécie. Logo, fica clara a necessidade de novas alternativas quimioterápicas para o tratamento desta micose.

De acordo com Chen et al. (2010), as propriedades ideais de um agente antifúngico incluem a facilidade de produção, a potente atividade, o perfil de segurança e o baixo custo. Neste contexto, as fontes naturais e vias sintéticas de fácil reprodução e com bons rendimentos tornam-se imprescindíveis na eleição de uma substância para terapia de doenças. *Capsicum annuum* L. é uma planta de pequeno porte e de fácil cultivo, conhecidas como pimentas. Moléculas com estruturas análogas a capsaicina foram sintetizadas (Gonçalves, 2009) e essa prática aumenta a possibilidade de se obter compostos com atividade superior ou melhorada de substâncias isoladas de plantas.

Na síntese de produtos com propriedades farmacêuticas, o uso de metais tem despertado um interesse cada vez maior como potenciais substâncias para intervenção terapêutica de diversas doenças e a atividade de compostos contendo prata está entre as mais disponíveis no mercado, haja vista que compostos contendo este metal, tais como heteropoliácidos e nanopartículas de prata, possuem comprovada atividade biológica contra bactérias resistentes a antibióticos (Inoue et al., 2006) e fungos do gênero *Candida* (Kim et al., 2009), respectivamente. Outros compostos metálicos analisados neste trabalho foram os complexos de coordenação. Estes compostos já foram avaliados frente a células leucêmicas (Dash et al., 2013), contra a bactéria *S. aureus* resistentes à metilicina (MRSA) (Beeton et al., 2014) e produtoras de toxinas (Fernandes et al., 2010) e frente a alguns fungos filamentosos (Sumrra et al., 2014), mas nenhum destes compostos teve sua atividade biológica avaliada contra fungos do gênero *Sporothrix*.

Como controle positivo para os testes de susceptibilidade foram utilizadas três classes de antifúngicos comerciais: o derivado azólico (itraconazol), a alilamina (terbinafina) e o poliênico (anfotericina B). Mesmo não existindo um ponto de corte que estabeleça quais os valores que determinam a sensibilidade ou resistência do fungo *S. schenckii* frente à terbinafina, estudos consideram que valores de CIM entre 0,1 e 0,4 µg/mL estão associados à sensibilidade do agente infeccioso frente ao fármaco (Meinerz et al., 2007b). Neste trabalho foi observado que a terbinafina foi mais ativa do que o itraconazol e a anfotericina B contra 100% (n=12) das cepas fúngicas com média geométrica de 0,41 µg/mL e 0,32 µg/mL para as formas leveduriforme e filamentosa, respectivamente. Gutierrez-Galhardo et al. (2009) também demonstraram médias geométricas dos valores da CIM menores para terbinafina do que para o itraconazol e anfotericina B, sendo a forma filamentosa mais sensível do que a leveduriforme, assim como ocorreu no presente trabalho. Silveira et al. (2009) e Marimon et al. (2008) demonstraram somente para a fase filamentosa de *S. schenckii* médias geométricas da CIM menores também para a terbinafina do que para o itraconazol e anfotericina B. Outros autores observaram resultados semelhantes, obtendo uma CIM menor ou igual a 0,4 µg/mL para os antifúngicos utilizados para o tratamento da esporotricose (Hull & Vismer, 1992; Hay, 1999; Perez, 1999; Rex et al., 2001; Kohler et al., 2004; Kohler et al., 2006).

Tal como para a terbinafina, também não há padronização para os valores da CIM para o itraconazol que identifique a resistência ou sensibilidade dos isolados de *S. schenckii*. De acordo com McGinnis et al. (2001) e Rex et al. (2001), a susceptibilidade de *Sporothrix* frente ao itraconazol se traduz em uma CIM  $\leq 1$  µg/mL, semelhante ao ponto de corte recomendado pelo CLSI para os testes de susceptibilidade com leveduras do gênero *Candida*. Considerando esse valor de CIM, neste estudo foi observado a resistência de 100% dos isolados padrão (n=6) e clínicos (n=6), com médias geométricas de 4,76 µg/mL e 2,27 µg/mL para as formas leveduriformes e filamentosa, respectivamente. Embora o itraconazol seja a droga de eleição para o tratamento da esporotricose e vários estudos confirmem sua boa atividade *in vitro* frente a *S. schenckii* com CIM  $\leq 4$  µg/mL (Kohler et al., 2007; Alvarado-Ramírez & Torres-Rodríguez, 2007; Marimon et al., 2008; Alves et al.,

2010; Meinerz et al., 2010; Stopiglia et al., 2012; Stopiglia et al., 2013), outros trabalhos demonstraram que algumas cepas apresentaram resistência ao itraconazol *in vitro*, resultando em CIMs superiores a 4 µg/mL (Trilles et al., 2005; Marimon et al., 2008; Gutierrez-Galhardo et al., 2009; Stopiglia et al., 2013; Rodrigues et al., 2014). Considerando que as cepas de *Sporothrix* spp. na forma filamentosa utilizadas neste trabalho apresentaram média geométrica de 2,27 µg/mL *in vitro*, pode-se assumir que o fungo nesta forma foi sensível ao itraconazol.

De acordo com a padronização dos testes de sensibilidade para leveduras frente a *C. albicans* pelo CLSI, isolados com CIM  $\geq 1$  µg/mL para anfotericina B são considerados resistentes. No presente trabalho foi observado que 50% (6/12) (3 padrão e 3 clínicas) e 33% (4/12) (2 padrão e 2 clínicas) das cepas de *Sporothrix* na forma leveduriforme e filamentosa, respectivamente, foram resistentes para anfotericina B apresentando médias geométricas de 1,66 µg/mL e 0,86 µg/mL. Rodrigues et al. (2014) demonstraram resistência de cepas para anfotericina B com valores da CIM  $>16$  µg/mL, enquanto que Stopiglia et al. (2012; 2013) e Marimon et al. (2008) demonstraram valores de CIM superior a 8 µg/mL para este poliênico contra algumas cepas do complexo *Sporothrix*.

Neste trabalho foram encontradas duas cepas padrão e três cepas clínicas apresentando multirresistência para itraconazol e anfotericina B (tabela 2), que são os fármacos de escolha para o tratamento da esporotricose. A evolução de resistência deste fungo patogênico compromete a eficácia do número limitado de drogas antifúngicas disponíveis. O itraconazol é uma substância fungistática e de acordo com Anderson et al. (2005), patógenos sensíveis aos fármacos podem desenvolver resistência quando sofrem pressão seletiva devido à exposição contínua aos fármacos de ação fungistática e, conseqüentemente, geram casos refratários da infecção. Os mecanismos responsáveis pela resistência aos fármacos entre as espécies de *Sporothrix* ainda são desconhecidos. Porém, já foi documentado que o aumento do uso prolongado de triazóis em infecções causadas por alguns fungos como *C. neoformans* (Sionov et al., 2010), *C. albicans* (Harrison et al., 2014; Selmecki et al., 2006) e *Aspergillus fumigatus* (Snelders et al., 2008) tem gerado cepas triazóis-multi-resistentes (MTR - multiple-triazole-resistance) demonstrando

que a resistência aos azóis pode ocorrer através da regulação positiva de genes transportadores de múltiplas drogas, que leva a um aumento do efluxo dos azóis e, portanto, reduz o seu acúmulo intracelular (Schubert et al., 2011; Morschhäuser, 2010); alterações genéticas da enzima alvo que afetam a afinidade enzimática (Favre et al., 1999), e por meio da alteração da síntese de esteróis que constituem a membrana (Willger et al., 2008).

Devido às suas características intrínsecas, os HPAs do tipo Keggin têm sido extensivamente usados como catalizadores heterogêneos de reações na química fina e sustentável e na medicina (Heravi and Sadjad, 2009; Sathicq et al., 2008). Na medicina, a atividade biológica de diferentes POMs foi primeiramente notada na França em 1975 quando foi demonstrada sua atividade antiviral (Yamase, 2005). A partir dos anos 80, foi observado que polioxotungstatos com estrutura de Keggin aumentaram sinergisticamente o efeito de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos frente às bactérias *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) (Yamase et al., 1996; Fukuda et al., 1997). Além disso, tem sido demonstrado a utilização de íons e sais de prata como agentes antimicrobianos (Silver, 2003; Kim et al., 2007; 2008). Neste trabalho foi avaliado a atividade antifúngica de quatro sais de HPA de prata do tipo Keggin incluindo um polioxomolibdato ( $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$ ) e três polioxotungstatos ( $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$ ,  $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$  and  $\text{Ag}_6[\text{SiW}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]$ ) sobre as formas filamentosa e leveduriforme de *Sporothrix* spp. Os dados mostraram que os sais de HPA de prata contendo fósforo como heteroátomo e metal de transição molibdênio ( $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$ ) ou tungstênio ( $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$ ) apresentaram CIM com médias geométricas de 10,1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e 15,1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para a forma leveduriforme e de 40,3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e 13,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para a forma filamentosa de crescimento, respectivamente. No ensaio da CIM, embora, esses valores sejam maiores do que os apresentados pelos agentes antifúngicos tradicionais (Tabelas 2 e 4), quando os valores da CIM foram convertidos de  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para  $\text{nmol}/\text{mL}$ , o itraconazol foi inferior contra nove cepas quando comparado aos quatro sais de HPAs testados; os valores da CIM da AMB também quando foram convertidos tornaram-se inferiores contra quatro cepas clínicas quando comparados a três sais de HPA; e ainda os valores da CIM da TBF quando convertidos foram

inferiores contra uma cepa quando comparada a um sal de HPA demonstrando que os sais de prata possuem atividade biológica em concentrações na ordem de  $10^{-9}$  molar (Apêndice 1). Observações similares em bactérias mostraram que o valor da CIM dos polioxotungstatos e molibdatos quando convertido de  $\mu\text{g/mL}$  para  $\text{nmol/mL}$  foi comparável ou superior ao antifúngico metronidazol (Inoue et al., 2005). Além disso, no presente trabalho o polioxomolibdato apresentou atividade superior aos polioxotungstatos contra *Sporothrix*, com valores de CIM entre 3,7 - 7,4  $\text{nmol/mL}$  e 2,5 - 38,2  $\text{nmol/mL}$ , respectivamente. Por outro lado, Inoue et al., (2005) demonstraram que polioxotungstatos tipo Keggin e não estruturais exibiram atividade antibacteriana superior ao polioxomolibdatos, com valores de CIM abaixo de 5,4 - 88,9  $\text{nmol/mL}$  e acima de 140  $\text{nmol/mL}$ , respectivamente, contra a *Helicobacter pylori*, demonstrando que os valores de CIM obtidos neste trabalho contra *Sporothrix* foram mais baixos.

Em 2007, Kim et al., observaram uma diferença significativa para a CIM de nanopartículas de prata entre três microrganismos. Foi observado uma CIM  $>6,6$  nM para leveduras isoladas de infecções de mastite bovina,  $>3,3$  nM para *E. coli* (ATCC 43886) e  $>33$  nM para *S. aureus* (ATCC 19636). Em 2009, Kim et al., determinaram a CIM de nanopartículas de prata frente a *C. albicans* e não-*albicans* achando valores entre 1 - 25  $\mu\text{g/mL}$ . O exato mecanismo de ação da prata sobre os microrganismos ainda não está bem-elucidado, mas foi sugerido que em *C. albicans* as nanopartículas de prata atuam sobre a permeabilidade de membrana, formando poros e dissipando o seu potencial elétrico (Kim et al., 2009). Em células bacterianas os três mecanismos de ação mais comuns da prata são: i) absorção da prata livre seguido pela interrupção da produção de ATP e replicação do DNA; ii) produção de espécies reativas de oxigênio; iii) ação direta sobre a membrana (Marambio-Jones & Hoek, 2010; Klasen, 2000).

Estudos utilizando extratos brutos das pimentas do gênero *Capsicum*, bem como seus derivados capsaicinoides demonstram que estes apresentam atividades analgésicas, antioxidantes, antitumorais e antimicrobianas (Aggarwal et al., 2008; Peralva dos Santos et al., 2012; Zhuang et al., 2013). Neste trabalho o efeito inibitório do extrato etanólico de *C. annuum* L e análogos sintéticos da capsaicina



foram avaliados frente a três cepas do fungo *Sporothrix* spp. (ATCC32285, CMDB/IOC 01991599 e cepa clínica LSASs01). Os resultados mostraram que o extrato bruto etanólico apresentou valores de CIM variando entre 0,5 – 2,0 µg/mL e 2 - >4 µg/mL para as formas leveduriforme e filamentosa de crescimento, respectivamente. No trabalho de Bokaeian et al., (2014) foi demonstrado que o extrato de *C. annuum* L. reduziu a formação de biofilme produzido por *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* na concentração de 10mg/mL. O extrato bruto de *C. annuum* em acetato de etila inibiu o crescimento da bactéria *Streptococcus mutans* na concentração de 2,5 µg/mL (Peralva dos Santos et al., 2012). Entre os três derivados capsaicinoides sintéticos estudados, o SA1 (N-(4-hidroxifeniletil-decamida) e SA3 (N-(4-hidroxi-3-metoxibenzil)decamida) foram mais ativos frente à cepa clínica de *Sporothrix* spp. LSASs01 na forma leveduriforme, com valores de CIM entre 0,5 – 2,0 µg/mL, enquanto que SA2 (E-N-(4-hidroxi-3-metoxibenzil)-3,7-dimetilocta-2,6-dienamida) foi menos ativo para as duas formas de crescimento, apresentando CIM >4 µg/mL para as três cepas. Comparando os valores da CIM destes mesmos capsaicinoides sintéticos obtidos para *Sporothrix* spp. com os valores encontrados por Peralva dos Santos et al. (2012) contra *S. mutans*, foi observado que a atividade anti-*Sporothrix* spp. dos análogos SA1 e SA3 foi superior à antibacteriana, enquanto que o análogo SA2 apresentou atividade inferior a encontrada contra *S. mutans*. Em 2000, Dorantes et al. observaram que o crescimento das bactérias *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus cereus* e *Staphylococcus* também foram inibidos por extratos brutos de três variedades de pimentas (chilli, morrón e serrano) utilizando o método de difusão em Ágar (Dorantes et al. 2000), mas a capsaicina e diidrocapsaicina isoladas do extrato bruto da variedade serrano não foram ativas contra as mesmas bactérias pelo mesmo método. No presente trabalho foi observado que a capsaicina e diidrocapsaicina padrão (Sigma Aldrich, EUA) apresentaram o mesmo efeito (0,5 - 2,0 µg/mL) que o extrato bruto etanólico frente às duas cepas padrão na forma leveduriforme, enquanto que para a cepa clínica LSASs01 a CIM foi >4 µg/mL para as duas formas de crescimento.

Muitos extratos de plantas podem afetar a morfologia e ultraestrutura de leveduras. Foi demonstrado que taninos presentes no extrato de *Stryphnodendron adstringens* (“barbatimão”) inibiram a formação do tubo geminativo, aumentaram o número de brotamentos e alteraram a ultraestrutura da parede celular de *C. albicans* (Ishida et al., 2006). Sobre *C. neoformans*, outro fungo patogênico, os autores observaram que os taninos alteraram o crescimento, o tamanho da cápsula, reduziram o processo de melanização, além de várias alterações ultraestruturais como rompimento da parede celular, extração do citoplasma e vacuolização (Ishida et al., 2009). Neste trabalho, tanto o extrato bruto quanto os derivados capsaicinoides provocaram alterações na permeabilidade e na ultraestrutura da membrana das leveduras de *Sporothrix* spp. após incubação de 48h na concentração de 1,0 µg/mL (Figura 35), indicando o potencial do extrato de *C. annuum* L. e de seus derivados sintéticos sobre este fungo patogênico.

Dentre os complexos de coordenação avaliados neste trabalho foi observado que o ligante BMPA foi mais ativo frente às cepas de *Sporothrix* spp. testadas do que os ligantes HBPA, BS, BE e HPCINOL, apresentando uma média geométrica para a CIM de 5,04 µg/mL e 7,56 µg/mL para as formas leveduriforme e filamentosa, enquanto que os demais apresentaram médias geométricas de 67,8 µg/mL, 168,9 µg/mL, 76,1 µg/mL e 194 µg/mL, respectivamente. Além disso, o ligante BMPA também foi mais ativo sozinho do que quando coordenado aos metais cobre e ferro. Contrariamente, a atividade dos demais ligantes foi potencializada com a coordenação dos metais cobre e ferro. Fernandes et al. (2010) mostraram que o ligante  $H_2BPCINOL$  (N-(2-hidroxibenzil)-N-(2-piridilmetil)[(3-cloro)(2-hidroxi)]propilamina) testado apresentou atividade inferior quando comparado com sua atividade após sua coordenação aos metais cobalto e zinco contra as cepas de *S. aureus* ATCC25923, RN6390B, LSA88, Wood46 and COL. Estes complexos apresentaram valores de CIM entre 250 e 272 µM, respectivamente, ou seja, maiores do que os valores encontrados neste trabalho frente a *Sporothrix*. Quanto à atividade dos complexos metálicos, foi observado que a coordenação de cada ligante com o cobre foi mais efetiva do que os complexos formados com ferro para as duas formas

de crescimento. Entre os complexos com cobre, os mais ativos foram CuBMPA (MG=16 µg/mL) e CuHBPA (MG=17,9 µg/mL).

Ao converter todos os valores das concentrações inibitórias mínimas encontradas para estes compostos de µg/mL para nanomol/mL, foi observado que estes valores se tornaram menores aos valores encontrados para os antifúngicos comerciais frente à maioria das cepas de *Sporothrix* testadas (Apêndices B-F). O mesmo foi observado para os sais de HPA de prata analisados neste trabalho. A vantagem de utilizar a unidade de concentração em nanomol/mL frente a micrograma/mL é a padronização do número de moléculas das substâncias utilizadas nos testes. Dessa forma, os valores das CIMs dos compostos podem ser fielmente comparados quanto a suas atividades antimicrobianas em termos de concentração.

Para tentar elucidar os possíveis efeitos destes compostos sobre a célula fúngica, observações morfológicas foram realizadas por meio de microscopia óptica e microscopia eletrônica de transmissão e varredura. Foi observado por microscopia óptica de campo claro e fluorescência que o marcador vital, Sytox Green™, se ligou ao material genético das leveduras de *Sporothrix* spp. quando tratadas com todos os compostos propostos neste trabalho, indicando que estes foram capazes de danificar a estrutura das membranas do fungo. Este marcador orgânico penetra somente em células com membrana comprometida e interage com os ácidos nucleicos e emite fluorescência quando excitado com um comprimento de onda de 520nm. Os resultados utilizando SYTOX Green™ sugerem que a permeação da membrana seja um dos modos de ação dos compostos testados sobre as células leveduriformes de *Sporothrix* spp. Este efeito de permeabilidade de membranas foi primeiramente utilizado para descobrir mecanismos de ação de peptídeos antimicrobianos de plantas. Threvisen et al. (1996 e 1999) demonstraram que estes peptídeos foram capazes de causar alterações no potencial de membranas da levedura *S. cerevisiae*. Em 2013, Taveira et al. observaram que as frações peptídicas 1 e 3 de tioninas isoladas do fruto de *Capsicum annuum* foram capazes de induzir mudanças na integridade da membrana de *S. cerevisiae*, *C. albicans* e *C. tropicalis*.

Com relação à ultraestrutura das leveduras de *Sporothrix* spp. foi possível observar, de uma forma geral, por microscopia eletrônica de transmissão diferenças entre as células cultivadas na ausência e na presença de L-DOPA. Células não tratadas apresentaram parede celular compactas em justaposição com a membrana plasmática e presença de uma densa camada de microfibrilas dispostas radialmente. Enquanto que leveduras cultivadas na presença de L-DOPA apresentaram uma camada microfibrilar menos densa e presença de grânulos eletrodensos entremeados às microfibrilas. Em leveduras que receberam tratamento com os diferentes compostos a 37°C, durante 48 horas, foram observadas algumas alterações como: (i) redução ou total depleção da camada de microfibrilas; (ii) espessamento de toda extensão da parede celular; (iii) duplo envoltório da parede celular; (iv) descolamento e ondulações da membrana plasmática; (v) formação de grandes vacúolos; (vi) perda de eletrondensidade citoplasmática; (vii) esvaziamento do conteúdo citoplasmático.

Lane et al. (1969) mostraram por MET que *S. schenckii* cultivados em caldo TSB exibiram duas camadas concêntricas da parede celular, sendo que a mais superficial não se estendia por toda a célula. No presente trabalho, esta estrutura não foi observada nas leveduras controle sem tratamento, porém foi observada em leveduras cultivadas em caldo BHI contendo L-DOPA após tratamento com terbinafina,  $Ag_3[PW_{12}O_{40}]$ ,  $Ag_4[SiW_{12}O_{40}]$ , CuBMPA, FeBMPA, HBPA, CuHBPA, FeHBPA, HPCINOL e MnHPCINOL a 37°C, durante 48h. Este duplo envoltório também foi observado de forma bastante discreta por microscopia eletrônica de varredura após tratamento com  $Ag_3[PW_{12}O_{40}]$ ,  $Ag_4[SiW_{10}V_2O_{40}]$ , BMPA, CuBMPA, FeBMPA, FeHBPA, CuBS, FeBS, FeBE, HPCINOL, FeHPCINOL MnHPCINOL, análogo da capsaicina SA2, capsaicina e diidrocapsaicina. A parede celular tem um importante papel na manutenção da integridade celular. É ela que determina a forma celular, promove proteção mecânica e suporta a pressão osmótica interna. Além disso, desempenha um importante papel no transporte de moléculas para fora e dentro da célula, além de representar a primeira barreira ao acesso de substâncias tóxicas e tal fato pode refletir diferenças na permeabilidade de substâncias e interferir na composição iônica intracelular (Gadd, 1993). A presença de um duplo envoltório

de parede celular em algumas leveduras tratadas pode ser indício de que a célula está regenerando sua primeira barreira de proteção externa após o tratamento. No entanto, também foi verificado que após os tratamentos com o itraconazol, terbinafina, anfotericina B, Ag<sub>3</sub>[PW<sub>12</sub>O<sub>40</sub>], FeBS, HPCINOL, extrato etanólico de *C. annuum* L., análogo sintético da capsaicina SA2 e capsaicina padrão, essa estrutura apresentava espessamento anormal e disforme compreendendo toda extensão da parede celular. Em *C. albicans*, a montagem e a desmontagem da parede celular são reguladas pelas enzimas  $\beta$ -1,3-glucano-sintase e pela  $\beta$ -1,3-glucanase capazes de remodelar a parede celular propiciando seu dinamismo ao longo do ciclo celular (Osumi, 1997). Essas enzimas são capazes de sintetizar e degradar o maior componente da parede celular de *Schizosacharomyces pombe*, o  $\beta$ -1,3-glucano. Osumi et al., (1998) demonstraram que leveduras com mutação no gene *cps8* apresentam morfologia aberrante, com células ramificadas, problemas na divisão celular, espessamento de parede e alterações no posicionamento e espessamento do septo. Logo, o espessamento irregular da parede celular de *Sporothrix* spp. após alguns tratamentos sugere que estes compostos podem ter influenciado de alguma forma na expressão de genes responsáveis pela deposição dos constituintes de sua parede celular.

Macroscopicamente, a melanina só é visível na fase filamentosa de *S. schenckii*, no entanto, também foi demonstrado que este fungo produz o pigmento *in vitro* e durante a infecção (Morris-Jones et al, 2000). Estudos ultraestruturais mostraram que o acúmulo de grânulos de melanina ocorre na parede dos conídios de *S. schenckii* (Romero-Martinez, 2000) e em leveduras estes grânulos foram visualizados ao longo de toda a extensão da parede celular (Morris-Jones et al., 2003; Teixeira et al., 2010). Outros fungos dimórficos, como *Fonsecae pedrosoi*, a melanina se encontra parcialmente depositada na parede celular e em sua maioria este pigmento se encontra encapsulado em organelas citoplásmicas, semelhante aos melanossomas de mamíferos (Alviano et al., 1991; Franzen et al., 2008). Nos fungos este pigmento atua como uma barreira de proteção contra luz UV, ataque lítico, estresses ambientais e papel estrutural na parede celular (Butler et al., 2005). Neste trabalho, foi observado que a expressão deste pigmento possivelmente foi

influenciada por alguns tratamentos. Foi observado por MET que leveduras tratadas a 37°C, durante 48h, com FeBMPA, CuHBPA, FeHBPA, CuBE e FeBE em caldo BHI apresentaram grânulos eletrondensos aglomerados no citoplasma próximos à membrana celular. Enquanto que leveduras cultivadas em caldo BHI suplementado com 1mM de L-DOPA apresentaram grânulos eletrondensos entremeados na camada fibrilar, dispersos no citoplasma ou aglomerados próximos à membrana e no interior de vesículas no citosol de leveduras controle e da maioria das leveduras tratadas. *S. schenckii* e muitos ascomicetos sintetizam melanina constitutivamente pela via poliketídica utilizando o precursor acetil-coenzima A ou malonil-CoA para formar a melanina-DHN (Langfelder et al., 2003; Teixeira et al., 2010), mas também foi provado que este fungo possui maquinaria bioquímica para metabolizar substratos exógenos como a L-DOPA para sintetizar o pigmento (eumelanina), sugerindo a presença das enzimas lacases ou tirosinases em seu citoplasma (Almeida-Paes et al., 2009; Teixeira et al., 2010), assim como ocorre com outros ascomicetos como *Paracoccidioides brasiliensis* (Gómez et al., 2001; Urán et al., 2011) e *Histoplasma capsulatum* (Nosanchuck et al., 2002), o que também diferencia os ascomicetos do basidiomiceto *Cryptococcus neoformans*, que necessita de compostos fenólicos exógenos para sintetizar o pigmento (Nosanchuck & Casadevall, 2003). No caso dos ascomicetos, a metabolização da L-DOPA aumentou a melanização fúngica assim como ocorreu com *Sporothrix* spp. neste trabalho, onde foram observados grânulos de melanina tanto na parte interna (citoplasma) quanto externa (camada microfibrilar) das leveduras, na forma de grânulos eletrondensos acumulados no citoplasma em leveduras tratadas com os complexos coordenados com os metais ferro e cobre (FeBMPA, FeHBPA, FeBE, CuHBPA e CuBE).

Os íons metálicos são elementos essenciais para manter o funcionamento celular e têm grande participação em inúmeros processos metabólicos como no metabolismo do DNA, na regulação da síntese proteica e no processamento pós-transcricional da maioria das proteínas (Nelson, 1999). Dessa maneira, a célula, em geral, criou mecanismos homeostáticos para garantir as concentrações necessárias dos metais, principalmente de cobre, ferro e zinco, para a sobrevivência celular (Rutherford et al., 2004).

De acordo com McGraw (2003), os metais também podem induzir um aumento na produção de melanina através do estímulo da produção de produtos intermediários de sua via de síntese ou do aumento da atividade de enzimas chave como as tirosinases e as lacases, as quais atuam na sua biossíntese. *S. schenckii* não necessita da adição de L-DOPA para sintetizar melanina (Eisenman & Casadevall, 2012). Sabe-se que os compostos de coordenação são positivamente carregados (Fernandes et al., 2010) e que a melanina fúngica é negativamente carregada (Nosanchuck e Casadevall, 2006). Neste sentido, os resultados dos tratamentos com compostos de coordenação na presença ou não de L-DOPA observados neste trabalho, também podem indicar uma reação de atração de cargas entre a melanina e os metais presentes nestes compostos, tais como Fe e Cu, que porventura podem se dissociar e liberar os sítios de ligação para a melanina, uma vez que aglomerações de grânulos eletrondensos na face interna da membrana das células foram características. Este fenômeno pode alterar de alguma forma o metabolismo e o desempenho do fungo nestas condições experimentais. Em *C. neoformans*, pequenas concentrações de ferro e cobre no meio de crescimento podem influenciar na expressão de genes regulados por TUP1 tanto para a produção de cápsula, quanto para a manutenção da homeostase cobre/ferro, onde o cobre é utilizado como cofator pelas enzimas superóxido-dismutase Cu/Zn e laccase, uma enzima chave para a produção de melanina (Lee et al., 2009; Cox et al., 2003; Salas et al., 1996). Nos fungos *Cladosporium resinae* (Gadd & Rome, 1988) e *Aureobasidium pullulans* (Gadd & Griffiths, 1980), a presença de cobre no meio de cultura intensificou a produção do pigmento. A ausência ou presença em menor quantidade de melanina na parede celular deste fungo pode torná-lo mais susceptível às espécies reativas de oxigênio e à fagocitose por macrófagos (Romero-Martinez et al., 2000; Morris-Jones et al., 2003). Além disso, as vias de síntese de esteróis, fosfolipídios, ácidos graxos e melanina podem estar relacionadas e um composto ao interferir em determinada etapa de uma delas, pode acabar comprometendo outras vias secundariamente, principalmente quando se trata da melanina do tipo DHN, onde são utilizados os precursores acetil-coenzima A (CoA) ou malonil-CoA que são comuns para diferentes vias metabólicas (Shea & Del Poeta,

2006). Estudos utilizando ressonância do spin eletrônico demonstraram que o mecanismo de interação dos íons metálicos com a melanina ocorre através da ligação destes íons com o centro radical da o-semiquinona existente nos polímeros de melanina formando complexos quelantes (Felix et al., 1978).

No presente trabalho também foi observado que após determinados tratamentos, algumas cepas de *Sporothrix* spp. não sintetizaram o pigmento após 15 dias de incubação à temperatura ambiente quando semeadas em Ágar batata dextrose mesmo na presença do precursor L-DOPA (Figuras 37-41). Desta forma, estes dados indicam que estes compostos foram capazes de interferir tanto na via de síntese da melanina DHN produzida constitutivamente sem necessidade de substratos exógenos, quanto na via de síntese da melanina do tipo DOPA (eumelanina), indicando que os compostos também impediram a atividade das enzimas lacases e tirosinases responsáveis pela sua síntese. Logo, os compostos metálicos e extrato de *Capsicum* parecem exibir efeito compatível aos observados pela ação dos inibidores da síntese de ambos os tipos de melanina: o triciclazol (DHN) e o glifosato (DOPA). Passados os 15 dias de incubação algumas dessas cepas melanizaram no meio de cultura, e dessa forma, a interferência do tratamento no retardamento da melanização do fungo caracterizaria o potencial desses compostos no tratamento da doença.

Para confirmar a interferência dos compostos sobre a melanização de *Sporothrix*, leveduras da cepa clínica LSASs01 após incubação em meio mínimo contendo ou não o substrato L-DOPA e o inibidor triciclazol foram submetidas ao tratamento enzimático e com ácido quente para extração e posterior análise do pigmento. Observações por microscopia óptica mostraram que sais de HPA  $Ag_4[SiW_{10}V_2O_{40}]$ ,  $Ag_4[SiW_{12}O_{40}]$ , os ligantes e os complexos BMPA, BE, CuBMPA, FeBMPA, o extrato etanólico de *C. annuum* L., o análogo sintético da capsaicina SA1 e a diidrocapaicina exibiram efeito semelhante ao triciclazol, sendo observadas escassas partículas sem forma e sem coloração ou com significativa redução da pigmentação (Figuras 42-47). O mesmo padrão de estruturas foi observado por Almeida-Paes et al. (2009) utilizando *S. schenckii* e *Sporothrix brasiliensis* (Almeida-Paes et al., 2011). Entretanto, alguns compostos não inibiram a síntese do pigmento.



A análise, por infravermelho, dessas partículas escuras teve por objetivo identificar os grupos funcionais presentes nas partículas isoladas do fungo tratado e compará-los com o espectro da molécula precursora L-DOPA. As características mais importantes observadas nos espectros foram as bandas fortes na região de  $3400\text{ cm}^{-1}$  referentes aos grupos hidroxila (-OH) e amina (-NH); região próxima a  $2940\text{ cm}^{-1}$  onde foram observadas vibrações dos grupamentos C-H de compostos alifáticos; e na faixa entre 1650-1600 onde estão os grupamentos C=O de amida e C=C de compostos aromáticos. Essas análises dos espectros no infravermelho sugerem que estas melaninas extraídas de leveduras tratadas, podem ser do tipo DHN ou do tipo DOPA, uma vez que a análise de infravermelho mostrou absorções nas mesmas regiões da melanina DOPA e outras bandas em diferentes regiões. No entanto, essa diferença pode estar relacionada ao fato de que a L-DOPA foi utilizada como substrato e por isso novos grupos funcionais foram gerados. Mesmo caracterizando os grupos funcionais presentes nas partículas de melaninas fúngicas, ainda não se definiu uma estrutura química exata para estes pigmentos, e esse fato se deve à dificuldade de extração e purificação devido às suas características intrínsecas como alto peso molecular, insolubilidade em solventes orgânicos e aquosos (Henson et al., 1999). Mas, diversos métodos têm sido utilizados a fim de aperfeiçoar a caracterização das melaninas, como as análises de infravermelho, a ressonância magnética nuclear, a espectrometria de ressonância paramagnética eletrônica e a difração de Raios-X (Cunha et al., 2010; Bridelli e Crippa, 2010; Chatterjee et al., 2012). Recentemente, Casadevall et al. (2012) analisaram, através da técnica de difração de Raios-X, as melaninas extraídas de quatro fungos: *Aspergillus niger*, *Wangiella dermatitides*, *Coprinus comatus* e *Cryptococcus neoformans*. Eles observaram uma diferença nas distâncias de empilhamento de planos dos pigmentos extraídos destes microrganismos, relatando que é concebível que as melaninas do reino Fungi compartilhem uma estrutura organizacional similar, porém os pigmentos de cada espécie podem diferir em detalhes na distância do plano de empilhamento, como um resultado de diferenças na composição de seus componentes.

O teste de metabolização do MTT avalia a viabilidade celular pela presença de mitocôndrias viáveis, que por sua vez, são capazes de reduzir o sal tetrazólico, um

metabólito solúvel inicialmente de coloração amarela, em cristais de coloração púrpura. Após a solubilização destes cristais, quanto mais forte for a coloração, maior o número de mitocôndrias viáveis, e portanto maior o número de células vivas (Morgan, 1997). Através dos ensaios de citotoxicidade em culturas de células VERO, foi possível demonstrar que os antifúngicos terbinafina e anfotericina B foram mais tóxicos que o itraconazol (Gráfico 1). Em relação aos sais de HPAs de prata, o  $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]$  foi o menos tóxico entre os quatro sais testados. Ao contrário do que ocorreu no presente trabalho, em 2005, Yamase et al. mostraram que HPAs do tipo Keggin contendo vanádio em sua estrutura apresentaram toxicidade nas concentrações entre 41,9 – 47,4  $\mu\text{M}$ , enquanto que polioxotungstos com estrutura de Keggin não foram tóxicos frente às células VERO, HEP-2 e MT-4. Quanto aos complexos de coordenação foi observado que a maioria dos complexos contendo cobre foram mais tóxicos que os complexos de ferro ou do que o ligante sozinho. Esse resultado vai de encontro com os resultados de inibição onde os complexos de cobre foram mais ativos do que os complexos de ferro contra as leveduras de *Sporothrix* spp. O ensaio da metabolização do MTT utilizando o extrato de *C. annuum* L. e seus análogos da capsaicina revelou que o extrato etanólico foi menos tóxico para as células VERO do que os análogos sintéticos, com exceção do análogo SA1.

O uso do nematoide *C. elegans* já está bem-definido como um modelo pertinente e prático para o estudo de interações patógeno-hospedeiro, virulência fúngica e bacteriana, das vias da resposta imune inata (Gravato-Nobre & Hodgkine, 2005) e para seleção de novos compostos com atividades antimicrobianas (Moy et al., 2006; Zhou et al., 2011). As vantagens do modelo invertebrado de infecção em relação ao modelo mamífero estão relacionadas ao curto tempo experimental, poucas despesas para sua manutenção e sua homologia genética com mamíferos (Kurz & Ewbank, 2000). No entanto, uma limitação importante do seu uso como um modelo para patógenos de humanos é a sua incapacidade de sobreviver a 37°C. Portanto, patógenos que necessitam de estímulos da temperatura para regulação de genes de virulência, podem não expressá-los quando testados em *C. elegans* (Konkel & Tilly, 2000). Em 2005, Laws et al., utilizaram *P. redivivus* como modelo de

infecção justificando que esse nematoide oferecia a vantagem sobre o modelo *C. elegans* pelo fato de sobreviver a 37°C. Os autores deste trabalho demonstraram que a linhagem 13010 da bactéria *Burkholderia multivorans* provocou a morte de *P. redivivus* a 37°C, mas não a 25°C e o mecanismo pelo qual a bactéria acelerou a morte de *P. redivivus* pode estar relacionado ao aumento da produção de moléculas associadas com a virulência estimuladas pela temperatura mais elevada, já que não houve nenhuma invasão dos tecidos do hospedeiro. O mesmo efeito ocorreu quando *P. redivivus* foi infectado com *Sporothrix* no presente trabalho. Foi observado que os nematoides infectados começaram a morrer a partir de 48 h a 37°C, enquanto que a 25°C os vermes infectados permaneceram vivos por mais de 10 dias, demonstrando que a temperatura influencia na patogenicidade do fungo e/ou na susceptibilidade do nematoide.

Os nematoides são protegidos externamente com uma cutícula extremamente resistente e impermeável, que proporciona uma excelente barreira contra ataques externos. No presente trabalho, foi observado por MEV a presença de leveduras de *Sporothrix* aderidas à cutícula da região terminal do intestino e da região mediana do corpo de *P. redivivus*, sendo que nesta última foi observado que a cutícula estava degradada (Figura 59 C). Alguns fungos especializados são capazes de se aderir à cutícula e de suas hifas perfurarem a cutícula e proliferarem dentro do nematoide, tal como ocorreu com a interação entre o fungo *Drechmeria coniospora* (Jansson, 1994) e a bactéria *Pasteuria penetrans* com o *C. elegans* (Hodgkin & Partridge, 2008). Além disso, por MET foi possível observar a presença de leveduras intactas localizadas no tecido muscular de *P. redivivus*, próximo à cavidade bucal do nematoide, não sendo observados, portanto, leveduras na luz intestinal (Figura 60), tal como observado com o nematoide *C. elegans* quando foi infectado com outros fungos como *C. albicans* e *C. neoformans*, indicando que *Sporothrix* spp. provocou a morte do nematoide por um mecanismo diferente daquele proposto por Laws et al. (2005). Quase todos os agentes patogênicos intestinais testados em *C. elegans* permanecem no meio extracelular, exceto as salmonelas e o microsporidium, que foram mostrados estabelecer infecção intracelular nas células intestinais. Algumas bactérias e fungos patogênicos podem se aderir à cutícula e infectar a epiderme de

*C. elegans*. Por exemplo, *Mycobacterium nematophilum* se aderem na região anal do nematoide e provocam um inchaço na região posterior do intestino, enquanto que *Leucobacter chromiireducens* causa uma infecção letal no útero. Outros fungos como *Drechmeria coniospora* e espécies de *Haptocillium* produzem esporos que se aderem e perfuram a cutícula do verme e se proliferam primeiro na epiderme e depois pelo organismo (Sodehall, 2010).

Diversos trabalhos já demonstraram a utilidade de *C. elegans* como modelo de infecção para diferentes patógenos de animais e humanos. Além disso, este modelo invertebrado também tem sido explorado como uma ferramenta para a triagem de compostos sintéticos e naturais bioativos (Zhang & Hou, 2013). Neste trabalho, foi observado que *P. redivivus* também pode oferecer informações *in vivo* sobre a patogênese de *Sporothrix*, visto que o fungo foi observado aderido à cutícula e infectando o tecido do nematoide quando incubados a 37°C durante 48h. Além disso, alguns compostos aumentaram o tempo de sobrevivência dos vermes infectados e se mostraram praticamente atóxicos quando comparados com o percentual de citotoxicidade que os mesmos apresentaram sobre as células VERO.

Os dados apresentados demonstraram o grande potencial dos sais de HPAs de prata, complexos de coordenação e extrato de *C. annuum* L. e análogos sintéticos da capsaicina sobre o crescimento, a morfologia e o processo de melanização de *Sporothrix* spp. Porém, estas descobertas necessitam de aprofundamento por meio de estudos moleculares para identificação dos mecanismos de ação pelo qual inibem o crescimento e um dos seus principais fatores de patogenicidade, a melanina. Além disso, o potencial antifúngico dos produtos naturais e sintéticos testados sobre diferentes cepas de *Sporothrix* spp. pode significar um avanço no tratamento da esporotricose.

## 8. Conclusões

Em virtude dos resultados apresentados neste trabalho conclui-se que:

- Entre os antifúngicos comerciais, a terbinafina foi o que apresentou melhor atividade *in vitro* frente às fases leveduriforme e filamentosa de crescimento;
- Todos os isolados (n=12) foram resistentes ao itraconazol e 50% apresentaram resistência para a anfotericina B, que são as drogas de eleição para o tratamento da esporotricose;
- Os sais de HPAs de prata apresentaram valores de CIM menores que o itraconazol quando seus valores da CIM foram comparados em nanomolar;
- As cepas de *Sporothrix* apresentaram diferentes perfis de susceptibilidade frente aos compostos de coordenação, sendo os complexos de cobre mais ativos que os de ferro;
- O extrato etanólico de *C. annuum L.* e os análogos sintéticos da capsaicina mostraram possuir ótima atividade antifúngica sobre as cepas de *Sporothrix* testadas;
- Análises por microscopia óptica de fluorescência demonstraram que todos os compostos que apresentaram atividade sobre *Sporothrix* foram capazes de permear a membrana plasmática, permitindo que o corante vital SYTOX® Green penetrasse na célula;
- Os principais efeitos observados por microscopia eletrônica de transmissão foram as alterações na espessura da parede celular, perda da integridade da membrana plasmática e vacuolização;
- De acordo com a cepa, alguns compostos foram capazes de inibir a síntese da melanina do tipo DHN e tipo DOPA;
- Foi observado que a forma leveduriforme de *Sporothrix* provoca a morte do nematoide *P. redivivus* a partir de 48h a 37°C, mas não à temperatura ambiente;

- Por microscopia eletrônica (MEV e MET) foi observado que leveduras de *Sporothrix* podem se aderir à cutícula do nematoide e ainda infectar o tecido de *P. redivivus*;
- Os compostos BMPA, CuBMPA, FeHBPA, CuBS, CuBE, MnHPCINOL e itraconazol prolongaram a sobrevivência dos vermes infectados quando comparado com o controle sem tratamento;
- A molécula ligante (BMPA) embora seja mais simples e de menor custo de síntese, comparado aos complexos com metais, foi a que apresentou maior atividade sobre o fungo nas suas duas formas de crescimento, com efeito fungicida sobre determinadas cepas. Além disso, quando esta molécula foi complexada aos metais cobre e ferro, houve redução de sua atividade sobre o fungo.

## 9. Perspectivas Futuras

Como perspectivas futuras desse trabalho podemos citar:

- 1) Análises dos principais efeitos dos compostos sobre a expressão de genes vinculados à virulência de *Sporothrix*;
- 2) Avaliar a ação dos compostos no combate à esporotricose em modelo murino de infecção.
- 3) Avaliar a produção de lanosterol pelas leveduras na presença dos tratamentos;
- 4) Avaliar a composição química do extrato etanólico por HPLC;
- 5) Realizar estudos de outros análogos sintéticos da capsaicina.

## 10. Referências Bibliográficas

Aballay & Ausubel F. (2002) *Caenorhabditis elegans* as a host for the study of host-pathogen interactions. *Cur Opin in Microbiol*, 5:97-101.

Aggarwal, B.B., Kunnumakkara, A.B., Harikumar, K.B., Tharakan, S., Sung, B., Anand P. (2008) Potential of spice-derived phytochemicals for cancer prevention. *Planta Med*, 74: 1560-1569.

Almeida-Paes, R., Pimenta, M. P., Pizzini, C.V., Monteiro, P.C.F., Peralta, J.M., Nosanchuk, J.D., Zancopé-Oliveira, R.M. (2007) Use of mycelial-phase *Sporothrix schenckii* exoantigens in an enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of sporotrichosis by antibody detection. *Clin And Vaccin Immunol*, 244-249.

Almeida-Paes, R., Frases, S., Monteiro, P.C.F., Gutierrez-Galhardo, M.C., Nosanchuk, J.D. (2009) Growth conditions influence melanization of Brazilian clinical *Sporothrix schenckii* isolates. *Microb and Infect*, 11: 554- 562.

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.

Alvarado-Ramirez, E., Torres-Rodriguez, J.M. (2007) *In vitro* susceptibility of *Sporothrix schenckii* to six antifungal agents determined using three different methods. *Antimicrob Agents Chemoth*, 51: 2420-2423.

Alvarez-Parrilla, E., La Rosa, A. D., Amarowicz, R., & Shahidi, F. (2011). Antioxidant activity of fresh and processed Jalapenõ and serrano peppers. *J Agric Food Chem*, 59, 163–173.

Alves, S.H., Boettcher, C.S., de Oliveira, D.C., Tronco-Alves, G.R., Sgaria, M.A., Thadeu, P., Oliveira, L.T., Santurio, J.M. (2010) *Sporothrix schenckii* associated with

armadillo hunting in Southern Brazil: epidemiological and antifungal susceptibility profiles. *Rev Soc Bras Med Trop*, 43(5): 523-525.

Alviano, C.S., Farbiarz, S.R., De Souza, W., Angluster, J., Travassos, L.R. (1991) Characterization of *Fonsecaea pedrosoi* melanin. *J Gen Microbiol*, 137: 837-844.

Alviano, D.S., Franzen, A.J., Travassos, L.R., Holandino, C., Rozental, S., Ejzemberg, R., Alviano, C.S., Rodrigues, M.L. (2004) Melanin from *Fonsecaea pedrosoi* induces production of human antifungal antibodies and enhances the antimicrobial efficacy of phagocytes. *Infect Immun*, 72: 229-237.

Anderson, J.B. (2005) Evolution of antifungal-drug resistance: mechanisms and pathogen fitness. *Nat Rev Microbiol*, 3: 547-556.

Antunes, T. A., Nobre, M. O., Faria, R. O., Meinerz, A. R. M., Martins, A. A., Cleff, M. B.; Fernandes, C. G.; Meireles, M. C. A. (2009) Esporotricose cutânea experimental: Avaliação *in vivo* do itraconazol e terbinafina; Experimental cutaneous sporotrichosis: *in vivo* evaluation of itraconazole and terbinafine. *Rev Soc Bras Med Trop*, 42(6): 706-710.

Appenzeller, S., Amaral, T.N., Amstalden, E.M.I., Bertolo, M.B., Neto, J.F.M., Samara, A.M., Fernandes, S. R. (2006) *Sporothrix schenckii* infection presented as monoarthritis: report of two cases and review of the literature. *Clin Rheumatol*, 25(6): 926-928.

Araújo, J.V., Motta, M.A., Campos, A.K. (2004) Controle biológico de helmintos parasitos de animais por fungos nematófagos. *Rev Bras Parasitol Vet*, 13(1): 165-170.



Arrillaga-Moncrieff, I., Capilla, J., Mayayo, E., Marimon, R., Marine, M., Gene, J., Cano, J., Guarro, J. (2011) Different virulence levels of the species of *Sporothrix* in a murine model. *Clin Microbiol Infect*, 15: 651-655.

Ávila-Antunes, T., Nobre, M.O., Faria, R.O., Meinerz, A.R.M., Martins, A.A., Cleff, M.B., Fernandes, C.G., Meireles, M.C.A. (2009) Esporotricose cutânea experimental: Avaliação *in vivo* do itraconazol e terbinafina. *Ver Bras Med Trop*, 42(6): 706-710.

Ávila-Pires, F.D.A. Dinâmica dos reservatórios extra-humanos das doenças infecciosas e parasitárias. in: Coura, J.R (Org.) Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

Aza-González, C., Núñez-Palenius, H.G., Ochoa-Alejo, N. (2011) Molecular biology of capsaicinoid biosynthesis in chili pepper (*Capsicum* spp.). *Plant Cell Rep*, 30(5): 695-706.

Bae, H., Jayaprakasha, G.K., Jifon, J., Patil, B.S. (2012) Variation of antioxidant activity and the levels of bioactive compounds in lipophilic and hydrophilic extracts from hot pepper (*Capsicum* spp.) cultivars. *Food Chemistry*, 134: 1912-1918.

Barbosa, M.S., Bao, S.N., Andreotti, P.F., de Faria, F.P., Felipe, M.S., dos Santos Feitosa, L., Mendes-Giannini, M.J., Soares, C.M. (2006) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a cell surface protein involved in fungal adhesion to extracellular matrix proteins and interaction with cells. *Infect Immun*, 74(1): 382-389.

Beeton, M.L., Aldrich-Wright, J.R., Bolhuis, A. (2014) The antimicrobial and antibiofilm activities of copper (II) complexes. *J Inorg Biochem*, 140: 167-172.

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: 41-47.

Barros, M. B. L., Schubach, A. O., Schubach, T. M. P., Schubach, B., Wanke, Lambert-Passos, D.S.R. (2008) An epidemic of sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: epidemiological aspects of a series of cases. *Epidemiol Infect*, 136: 1192-1196.

Barros, M.B.L., Almeida-Paes, R., Schubach, A.O. (2011) *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. *Clin Microbiol Rev*, 24: 633-654.

Bennardi, D.O., Romanelli, G.P., Sathicq, A.G., Autinoa, J.C., Baronettic, G.T., Thomasd, H.J. (2011) Wells–Dawson heteropolyacid as reusable catalyst for sustainable synthesis of flavones. *Appl Catal*, 404: 68-73.

Bernardes-Engemann, A.R., Lopes-Bezerra, L.M., de Macedo, P.M., Orofino-Costa, R. (2014) Esporotricose em crianças e adolescentes atendidos no HUPE-UERJ entre 1997 e 2010: estudo clinicoepidemiológico. *Rev HUPE, RJ*, 13(Supl. 1): 50-54.

Betancourt, S., Torres-Bauza, L.J., Rodriguez-Del, Valle, N. (1985) Molecular and cellular events during the yeast to mycelium transition in *Sporothrix schenckii*. *Sabouraudia*, 23: 207-218.

Bezerra, D.P., Pessoa, C., Moraes, M.O., Alencar, N.M., Mesquita, R.O., Lima, M.W., Alves, A.P., Pessoa, O.D., Chaves, J.H., Silveira, E.R., Costa-lotufo, L.V. (2008) In vivo growth inhibition of sarcoma 180 by piperlongumine, alkaloid amide from the *Piper* Species. *J App Toxicol*, 28: 599-609.

Bhavsar, A., Brown, E.D. (2006) The worm turns for antimicrobial discovery. *Nature Biotechnol*, 24(9): 1098-1100.

Bocca, A.L., Brito, P.P.M.S., Figueiredo, F., Tosta, C.E. (2006) Inhibition of nitric oxide production by macrophages in chromoblastomycosis: a role for *Fonsecaea pedrosoi* melanin. *Mycopathol*, 161: 195-203.

Bogaerts, A., Beets, I., Schoofs, E., Verleyen, P. (2010) Antimicrobial peptides in *Caenorhabditis elegans*. *ISJ 7*: 45-52.

Bonifaz, A., Vazquez-Gonzalez, D. (2010) Sporotrichosis: na update. *G. Ital. Dermatol Venereol*, 145: 659-673.

Bokaeian, M., Saeidi, S., Bazi, S. Mehdi, G.4. (2014) The Effects of *Capsicum annum L.* extract on the Control of single and ual Biofilms of common pathogenic strains acusing urinary tract infection. *J Res Med Sci*, 16(10): 65-68.

Borrego, J.A.B., Mayorga, J., Tarango-Martínez, V.M. (2009) Esporotricosis linfangítica bilateral y simultânea. *Rev Iberoam Micol*, 26(4): 247-249.

Bradford, M.M. (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem*, 72: 248-254.

Brandelli, A., Bizani, D., Martinelli, M., Stefani, V., Gerbase, A.E. (2004). Antimicrobial activity of 1,4-naphthoquinones by metal complexation. *Braz J Pharm Scienc*, 40(2): 247-253.

Breger, J., Fuchs, B.B., Aperis, G., Moy, T.I., Ausubel, F.M., Mylonakis, E. (2007) Antifungal chemical compounds identified using a *C. elegans* athogenicity assay. *Plos Pathog*, 3(2): 168-178.

Brenner, S. (1974) The genetic of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 77: 95-104.

Bridelli, M.G., Crippa, P.R. (2010) Infrared and water sorption studies of the hydration structure and mechanism in natural and synthetic melanin. *J Phys Chem*, 114: 9381-9390.

Brogden, K. (2005) Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol*, 3: 238-250.

Brown, T.L., Lemay, J.H.E., Burten, B.E. Química, a ciência central. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 9ª ed, p. 109, 2005.

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

Butler, M.J., Day, A.W. (1998) Fungal melanins: a review. *Can J Microbiol*, 44: 1115-1136.

Bulet, P., Stöcklin, R., Menin, L. (2004) Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol Rev*, 198: 169-184.

Carlos, I.Z., Sassa, 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.

Carvalho, S. I. C., Bianchetti, L. B., Ribeiro, C. S. C., Lopes, C. A. (2004) Pimentas do gênero *Capsicum* no Brasil, *Embrapa Hortaliças: Brasília*.

Carvalho, H.H., Wiest, J. M., Cruz, F. T. (2010) Atividade antibacteriana *in vitro* de pimenta e pimentões (*Capsicum sp.*) sobre quatro bactérias toxinfecivas alimentares. *Rev Bras Plant Medicin*, 12: 8-12.

Casadevall, A. (2006) Cards virulence and the global virulome for humans. *Microbes*, 1: 359-364.

Casadevall, A., Nakouzi, A., Crippa, P.R., Eisner, M. (2012) Fungal melanins differ in planar stacking distances. *Plos one*, 7: 1-6.

Catalán, M., Montejo, J. C. (2006) Antifúngicos sistémicos. *Rev Iberoam Micol*, 23: 39-49.

Chatterjee, S., Prados-Rosales, R., Frases, S., Casadevall, A., Stark, R.E. (2012) Using solid-state NMR to monitor the molecular consequences of *Cryptococcus neoformans* melanization with different catecholamine precursors. *Biochem*, 51: 6080-6088.

Chen, B.L., Hall, D.H., Chklovskii, D.B. (2006) Wiring optimization can relate neuronal structure and function. *Proc Natl Acad Sci.*, 103: 4723-4728.

Chen, S.C.A., Biswas, C., Bartley, R., Widmer, F., Pantarat, N., Obando, D., Djordjevic, J.T., Ellis, D.H., Jolliffe, K.A., Sorrell, T.C. (2010) *In Vitro* antifungal activities of bis(alkylpyridinium)alkane compounds against pathogenic yeasts and mold. *Antimicrob Agents Chemoth*, 3233-3240.

Chopra, I., Hawkey, P.M., Hinton, M. (1991) Tetracyclines, molecular and clinical aspects. *J Antimicrob Chemoth*, 29: 245-257.

Cohen, S.M. (2007) New approaches for medicinal applications of bioinorganic chemistry. *Cur Opin Chem Biol*, 11(2): 115–120.

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

Cordeiro, F.N., Bruno, C.B., Ribeiro de Paula, C.D., Motta, J.O.C. (2011) Familial occurrence of zoonotic sporotrichosis. *An Bras Dermatol*, 86(4Supl1): S121-124.

Coskun, B., Saral, Y., Akpolat, N., Ataseven, A., Cicek, D. (2004) Sporotrichosis successfully treated with terbinafine and potassium iodide: Case report and review of the literature. *Mycopathol*, 158: 53-56.

Costa, E.O., Diniz, L.S.M., Arruda, C., Dagli, M.L.Z. (1994) Epidemiological study of sporotrichosis and histoplasmosis in captive Latin American wild mammals, São Paulo, Brazil. *Mycopathol*, 125: 19-22.

Costa-Lotufo, L.V., Silveira, E.R., Barros, M.C., Lima, M.A., Moraes, M.E., Moraes, M.O., Pessoa, C. (2004) Antiproliferative effects of albietane diterpenes from *Aegiphila ihotzkyana*. *Plant Med*, 70: 180-182.

Cox, G.M., Mukherjee, J., Cole, G.T., Casadevall, A., Perfect, J.R. (2000) Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis. *Infect Immun*, 443-448.

Cox, G.M., Harrison, T.S., McDade, H.C., Taborda, C.P., Heinrich, G., Casadevall, A., Perfect, J.R. (2003) Superoxide dismutase influences the virulence of *Cryptococcus neoformans* by affecting growth within macrophages. *Infect Immun*, 71: 173-180.

Crothers, S.L., White, S.D., Ihrke, O.J., Affolter, V.K. (2009) Sporotrichosis: a retrospective evaluation of 23 cases seen in northern California (1987–2007). *Vet Dermatol*, 20: 249-259.

Cruz, LCH. (2013) Complexo *Sporothrix schenckii*. Revisão de parte da literatura e considerações sobre o diagnóstico e a epidemiologia. *Vet Zootec*, 20: 8-28.

Curticăpean, M., Toma, F., Sopterean, A.M. (2007) Detection of the sensitivity of some bacteria and fungi to the action of sodium phosphotungstate beta- $\text{Na}_6[\text{P}_2\text{W}_{18}\text{O}_{62}]\cdot 18\text{H}_2\text{O}$ . *Bacteriol Virusol Parazitol Epidemiol*; 52(3-4): 139-147.

Dash, S.K., Chattopadhyay, S., Ghosh, T., Tripathy, S., Das, D., Roy, S. (2013) Antileukemic efficacy of monomeric manganese-based metal complex on KG-1A and K562 cell lines. *Oncology*, 1-10.

de Meyer, E.M., de Beer, Z.W., Summerbell, R.C., Moharram, A.M., de Hoog, G.S., Vismer, H.F., Wingfield, M.J. (2008) Taxonomy and phylogeny of new wood- and soil-inhabiting *Sporothrix* species in the *Ophiostoma Stenoceras-Sporothrix schenckii* complex. *Mycol*, 100: 647-661.

de Souza Barros, M., Ferrari, H.J., Rezende, R.S., Faria, J.L.M. (2012) Esporotricose felina: primeiro relato de caso em Uberaba – Minas Gerais. *Vet Not*, 18(2): 110-120.

Ewbank, J.J., Zugasti, O. (2011) *C. elegans*: model host and tool for antimicrobial drug discovery. *Dis Models Mech*, 4: 300-304.

Favre, B., Didmon, M., Ryder, N.S. (1999) Multiple amino acid substitutions in lanosterol 14- $\alpha$ -demethylase contribute to azole resistance in *Candida albicans*. *Microbiology*, 145: 2715-2725.

Fernandes, K.S.S., Coelho, A.L.J., Lopes-Bezerra, L.M., Fidalgo, C.B. (2000) Virulence of *Sporothrix schenckii* conidia and yeast cells, and their susceptibility to nitric oxide. *Immunol*, 101: 563-569.

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

Fernandes, C.H., Horn Jr. A., Vieira-da-Motta, V., de Assis, V.M., Rocha, M.R., Mathias, L.S., Bull, E.S., Bortoluzzi, A.J., Guimarães, E.V., Almeida, J.C.A., Russell, D.H. (2010) Synthesis, characterization and antibacterial activity of Fe<sup>III</sup>, Co<sup>II</sup>, Cu<sup>II</sup> and Zn<sup>II</sup> complexes probed by transmission electron Microscopy. *J Inorg Biochem*, 104: 1214–1223.

Fernandes, C., Horn Jr, A., Vieira-da-Motta, O., Kanashiro, M.M., Rocha, M.R., Moreira, R.O., Morcelli, S.R., Lopes, B.S., Mathias, L.S., Borges, S.V., Borges, L.J.H., Freitas, W.R., Visentin, L.C., Almeida, J.C.A., Schenk, G. (2014) Synthesis, characterization, antibacterial and antitumoral activities of mononuclear zinc complexes containing tridentate amine based ligands with N<sub>3</sub> or N<sub>2</sub>O donor groups. *Inorg Chim Acta*, 416: 35-48.

Figueiredo, C.C., Lima, O.C., 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 Path*, 36: 177-188.

Figueiredo, C.C., Deccache, P.M., Lopes-Bezerra, L.M., Morandi, V. (2007) TGF- $\beta$  induces transendothelial migration of the pathogenic fungus *Sporothrix schenckii* by a paracellular route involving extracellular matrix proteins. *Microbiol*, 153: 2910-2921.

Franzen, A.J., Cunha, M.M.L., Miranda, K., Hentschel, J., Plattner, H., da Silva, M.B., Salgado, C.G., de Souza, W., Rozental, S. (2008) Ultrastructural characterization of melanosomes of the human pathogenic fungus *Fonsecaea pedrosoi*. *J Struct Biol*, 162: 75-84.

Freitas, D.F.S., Hoagand, B.S., Francesconi do Valle, A.C., Fraga, B.B., Barros, M.B., Schubach, A.O., Almeida-Paes, R., Cuzzi, T., Rosalino, C.M.V., Zancopé-Oliveira,



R.M., Gutierrez-Galhardo, M.C. (2012) Sporotrichosis in HIV-infected patients: report of 21 cases of endemic sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Med Mycol*, 50: 170-178.

Freitas, D.F.S., Francesconi do Valle, A.C., Tavares da Silva, M.B., Campos, D.P., Lyra, M.R., Souza, R.V., Veloso, V.G., Zancopé-Oliveira, R.M., Bastos, F.I., Gutierrez-Galhardo, M.C. (2014) Infection in HIV-Infected Patients in Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*, 8: 1-8.

Galhardo, M.C., Oliveira, R.M.Z., Valle, A.C.F. (2008) Molecular epidemiology and antifungal susceptibility patterns of *Sporothrix schenckii* isolates from a cat-transmitted epidemic of sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Med Mycol*, 46: 141-151.

Galhardo, M.C., Silva, M.T., Lima, M.A., Nunes, E.P., Schettini, L. E., de Freitas, R.F., de Almeida Paes, R., Neves, E.S., do Vale, A.C. (2010). *Sporothrix schenckii* meningitis in AIDS during immune reconstitution syndrome. *J Neurol Neurosur Ps*, 81: 696-699.

Garrison, R.G., Boyd, K.S., Mariat, F. (1975) Ultrastructural studies of the mycelium-to yeast transformation of *Sporothrix schenckii*. *J Bacteriol*, 124: 959-968.

Ghosh, A., Maity, P.K., Hemashettar, B.M., Sharma, V.K., Charkrabarti, A. (2002) Physiological characters of *Sporothrix schenckii* isolates. *Mycoses*, 45: 449-454.

Gomez, B.L., Nosanchuk, J.D., Diez, S., Youngchim, S., Aisen, P., Cano, L.E., Restrepo, A., Casadevall, A., Hamilton, A.J. (2001). Detection of melanin-like pigments in the dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* *in vitro* and during infection. *Infect Immun*, 69: 5760–5767.

Gómez, B.L., Nosanchuk, J.D. (2003) Melanin and fungi, *Curr Opin Infect Dis*, 16: 91-96.

Gonçalves, P. S. (2009) Síntese de análogos de capsaicina e nova síntese da diidrocapsaicina como potenciais substâncias antibacterianas. Tese de Mestrado em Ciências Naturais - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ.

Gossani, C.M.D. (2012) Atividade de heteropoliácidos sobre fungos e bactérias de importância veterinária. Trabalho de conclusão de curso de Graduação em Ciências Biológicas - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ.

Gremião, I.D.F., Schubach, T.M.P., Pereira, S.A., Rodrigues, A.M., Honsea, C.O., Barros, M.B.L. (2011) Treatment of refractory feline sporotrichosis with a combination of intralesional amphotericin B and oral itraconazole. *Aust Vet J*, 89(9): 347-351.

Gremião, I.D.F., Schubach, T.M.P., Pereira, A.S., Rodrigues, A.M., Chaves, A.R., Barros, M.B.L. (2009) Intralesional amphotericin B in a cat with refractory localised sporotrichosis. *J Feline Med Surg*, 11: 720-723.

Guterres, K.A., de Matos, C.B., Osório, L.G., Schuch, I.D., Cleff, M.B. (2014) The Use of (1–3)  $\beta$ -glucan along with itraconazole against canine refractory sporotrichosis. *Mycopathologia*, 177: 217-221.

Gutierrez-Galhardo, M.C., do Valle, A.C.F., Fraga, B.L.B., Schubach, A.O., Hoagland, B.R.S., Moteiro, P.C.F., de Lima Barros, M.B. (2008) Disseminated sporotrichosis as a manifestation of immune reconstitution inflammatory syndrome. *Mycoses*, 53: 78-80.

Gutierrez-Galhardo, M.C., Zancopé-Oliveira, R.M., Monzón, A., Tudela-Rodriguez, J.L., Cuenca-Estrella, M. (2009) Antifungal susceptibilidade profile *in vitro* of

*Sporothrix schenckii* in two growth phases and by two methods: microdilution and E-test. *Mycoses*, 53: 227-231.

Gutierrez-Galhardo, M.C., doValle, A.C., Fraga, B.L., Schubach, A.O., Hoagland, B.R., Monteiro, P.C. (2010) Disseminated sporotrichosis as a manifestation of immune reconstitution inflammatory syndrome. *Mycoses*, 53:78-80.

Harrison, B.D., Hashemi, J., Bibi, M., Pulver, R., Bavli, D., Nahmias, Y., Wellington, M., Sapiro, G., Berman, J. (2014) A tetraploid intermediate precedes aneuploid formation in yeasts exposed to fluconazole. *PLoS Biol*, 12(3): 1-18.

Hay, R.J. (1999) Therapeutic potential of terbinafine in subcutaneous and systemic mycoses. *Brit J Dermatol*, 141: 36-40.

Henson, J.M., Butler, M.J., Day, A.W. (1999) The dark side of the mycelium: melanins of phytopathogenic fungi. *Annu Rev Phytopathol*, 37: 447-471.

Hekton, L., Perkins, C.F. (1900) Refractory subcutaneous abscess caused by *Sporothrix schenckii*: a new pathogenic fungus. *J Exp Med*, 5: 77-91.

Hull, P.R., Vismer, H.R. (1992) Treatment of cutaneous sporotrichosis with terbinafine. *Brit J Dermatol*, 126: 51-55.

Inoue, M., Suzuki, T., Fujita, Y., Oda, M., Matsumoto, N., Yamase, T. (2006) Enhancement of antibacterial activity of  $\beta$ -lactam antibiotics by [P<sub>2</sub>W<sub>18</sub>O<sub>62</sub>]6-, [SiMo<sub>12</sub>O<sub>40</sub>]4- and [PTi<sub>2</sub>W<sub>10</sub>O<sub>40</sub>]7- against methicillin-resistant and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Inorg Biochem*, 100: 1225-1233.

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

Jang, J.J., Kim, S.H., Yun, T.K. (1989) Inhibitory effect of capsaicin on mouse lung tumor development. *In Vivo*, 3: 49-53.

Jansson, H.B. (1994) Adhesion of conidia of *Drechmeria coniospora* to *Caenorhabditis elegans* wild type and mutants. *J Nematol*, 26(4):430-435.

Jung, M.Y., Kang, H.J., Moon, A. (2001) Capsaicin-induced apoptosis in SK-Hep-1 hepatocarcinoma cells involves Bcl-2 downregulation and caspase-3 activation. *Cancer Lett*, 165: 139–145.

Kan, V. L., and J. E. Bennett. (1988) Efficacies of four antifungal agents in experimental murine sporotrichosis. *Antimicrob Agents Chemother*, 32: 1619-1623.

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

Keleher, C.A., Redd, M.J., Schultz, J., Carison, M., Johnson, A.D. (1992) Ssn6-Tup1 is a general repressor of transcription in yeast. *Cell*, 68: 709-719.

Kohler, L.M., Monteiro, P.C.F., Hahn, R.C., Handam, JS. (2004) *In vitro* susceptibilities of isolates of *Sporothrix schenckii* to itraconazole and terbinafine. *J Clin Microbiol*, 42: 4319-4320.

Kohler, L.M., Soares, B.M., Santos, D.A., Barros, M.E.S., Hamdam, J.S. (2006) *In vitro* susceptibility of isolates of *Sporothrix schenckii* to amphotericin B, itraconazole, and terbinafine: comparison of yeast and mycelial forms. *Can J Microbiol*, 52: 1-5.

Kohler, L.M., Hamdam, S., Ferrari, T.C. (2007) Successful treatment of a disseminated *Sporothrix schenckii* infection and *in vitro* analysis for antifungal susceptibility testing. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 58: 117-120.

Kim, J.D., Kim, J.M., Pyo, J.O., Kim, S.Y., Kim, B.S., Yu, R. (1997) Capsaicin can alter the expression of tumor forming-related genes which might be followed by induction of apoptosis of a Korean stomach cancer cell line, SNU-1. *Cancer Lett*, 120: 235-241.

Kim, J.S., Kuk, E., Yu, K.N., Yu, K.N., Kim, J.H., Park, S.J., Lee, H.J., Kim, S.H., Park, Y.K., Park, Y.H., Hwang, C.Y., Kim, Y.K., Lee, Y.S., Jeong, D.H., Cho, M.H. (2007) Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomed: Nanotechnol Biol Med*, 3: 95-101.

Kim, Keuk-Jun, Woo, S.S., Seok-Ki, M., Jong-Soo, C., Jong, G.K., Dong, G.L. (2008) Antifungal effect of silver nanoparticles on dermatophytes. *J Microbiol Biotechnol*, 18(8): 1482-1484.

Kim, J.K., Sung, W.S., Suh, B.K., Moon, S.K., Choi, J.S., Kim, J.G., Lee, D.G. (2009) Antifungal activity and mode of action of silver nano-particles on *Candida albicans*. *Biometals*, 22: 235-242.

Kirienko, N.V., Kirienko, D.R., Larkins-Ford, J., Wählby, C., Ruvkun, G., Ausubel, F.M. (2013) *Pseudomonas aeruginosa* disrupts *Caenorhabditis elegans* iron homeostasis, causing a hypoxic response and death. *Cell Host Microbes*, 13(4): 406-416.

Klasen, H.J. (2000) Historical review of the use of silver in the treatment of burns. I. Early uses. *Burns* 26: 117-130.

Klass, M.R. (1977) Aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*: major biological and environmental factors influencing lifespan. *Mech Ageing Dev*, 6: 413-429.

Kong, X., Xiao, T., LIN, J., Wang, Y., Chen, H. (2006) Relationships among genotypes, virulence and clinical forms of *Sporothrix schenckii* infection. *Clin Microbiol Infec*, 12: 1077-1081.

Konkel, M.E., Tilly, K. (2000) Temperature-regulated expression of bacterial virulence genes. *Microbes Infect*, 2: 157-166.

Kurz, C.L., Ewbank, J.J. (2000) *Caenorhabditis elegans* for the study of host-pathogen interactions. *Trends Microbiol*, 8: 142-144.

Kwon-Chung, K, Bennet, J. Sporotrichosis. In: Medical Mycology, Philadelphia: Lea &Febiger, p. 707-729, 1992.

Lacaz, C.S., Porto, E., Martins, J.E.C., Heins-Vaccari, E.M., Melo, N.T. Esporotricose. In: Tratado de Micologia Médica, Ed: Savier, São Paulo, 9ª ed., p. 479-497, 2002.

Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.

Lane, J.W., Garrison, R.G., Field, M.F. (1969) Ultrastructural studies on the yeast like and mycelial phases of *Sporotrichum schenckii*. *J Bacteriol*, 1010-1019.

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

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

Laws, T.R., Smith, S.A., Smith, M.P., Harding, S.V., Atkins, T.P., Titball, R.W. (2005) The nematode *Panagrellus redivivus* is susceptible to killing by human pathogens at 37°C. *FEMS Microbiol Lett*, 250: 77-83.

Lee, H., Chang, Y.C., Varma, A., Kwon-Chung (2009) Regulatory diversity of *TUP1* in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell*, 8(12): 1901-1908.

Lima Barros, O.C., Figueiredo, B., de Oliveira Previato, J.O., Mendonça-Previato, I., Morandi, L., Lopes-Bezerra L.M. (2001) Involvement of fungal cell wall components in adhesion of *Sporothrix schenckii* to human fibronectin. *Infect Immun*, 69: 6874-6880.

Lima Barros, M.B., de Oliveira Schubach, A., Galhardo, M.C., Schubach, T.M., dos Reis, R.S., Conceição, M.J., do Valle, A.C. (2003) Sporotrichosis with widespread cutaneous lesions: report of 24 cases related to transmission by domestic cats in Rio de Janeiro, Brazil. *Int J Dermatol*, 42(9): 677-681.

Lopes, J.O., Alves, S.H., Mari, C.R., Brum, L.M., Westphalen, J.B., Altermann, M.J., Prates, F.B. (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) *An Acad Bras Ciênc*, 78(2): 293-308.

López-Romero, E., Reyes-Montes, M., Pérez-Torres, A., Ruiz-Baca, E., Villagómez-Castro, J.C., Mora-Montes, H.M., Flores-Carreón, A., Toriello, C. (2011) *Sporothrix schenckii* complex and sporotrichosis, an emerging health problem. *Future Microbiol*, 6(1): 85-102.

Lupi, O., Tying, S.K., McGuinnis, M.R. (2005) Tropical dermatology: fungal tropical diseases. *J Am Acad Dermatol*, 53(6): 931-951.

Maadani, A., Fox, K.A., Mylonakis, E., Garsin, D.A. (2007) *Enterococcus faecalis* mutations affecting virulence in the *Caenorhabditis elegans* model host. *Infect Immun*, 2634-2637.

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

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. *Acta Scient Vet*, 35(1): 105-108.

Madrid, I.M., Xavier, M.O., Mattei, A.S., Fernandes, C.G., Guim, T.N., Santin, R., Schuch, L.F.D., Nobre, M.O., Meireles, M.C.A. (2010) Role of melanin in the pathogenesis of cutaneous sporotrichosis. *Microbes Infect*, 12: 162-165.

Madrid, I.M., Mattei, A.S., Fernandes, C.G., Nobre, M.O., Meireles, M.C.A. (2012) Epidemiological Findings and Laboratory Evaluation of Sporotrichosis: A Description of 103 Cases in Cats and Dogs in Southern Brazil. *Mycopathologia*, 173: 265-273.

Mahajan-Miklos, S., Tan, M.W., Rahme, L.G., Ausubel, F.M. (1999) Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using a *Pseudomonas aeruginosa*-*Caenorhabditis elegans* pathogenesis model. *Cell*, 96: 47-56.

Marambio-Jones, C., Hoek, E.M.V. (2010) A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. *J Nanopart Res*, 12: 1531–1551.

Mares, D., Romagnoli, C., Andreotti, E., Manfrini, M., Vicentin, C.B. (2004) Synthesis and antifungal action of new tricyclazole analogues. *J Agric Food Chem*, 52: 2003-2009.

Marimon, R., Gené, J., Cano, J., Trilles, L., Dos Santos Lazéra, M., Guarro, J. (2006) Molecular phylogeny of *Sporothrix schenckii*. *J Clin Microbiol*, 44(9): 3251-3256.



Marimon, R., Cano, J., Gené, J., Sutton, D.A., Kawasaki, M., Guarro, J. (2007) *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest. *J Clin Microbiol*, 45(10): 3198-206.

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*, 35(4): 327-330.

McGinnis, M.R., Norgoff N., Li R.K., Pasarell L., Warnock, D.W. (2001) *Sporothrix schenckii* sensitivity to voriconazole, itraconazole and amphotericin B. *Med Mycol*, 39: 369-371.

Meinerz, A. R. M., Cleff, M.B., Nascente, P.S., Nobre, M.O., Schubach, L.F.D., Antunes, T.A., Xavier, M.O., Meireles, M.C.A., Mello, J.R.B. (2007a) Efeitos de doses elevadas da terbinafina e itraconazol em ratos Wistar. *Rev Bras Ciênc Farmac*, 43(1):105-109.

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

Meinerz, A.R.M., Antunes, T.A., Silva, F.V., Xavier, M.O., Cleff, M.B., Meireles, M.C.A. (2008) Esporotricose experimental sistêmica em ratos Wistar: avaliação hematológica e perfil hepático. *Arq Bras Med Vet Zootec*, 60(4): 1026-1028.

Meinerz, A.R.M., Cleff, M.B., Nascente, P.S., Osório, L.G., Lund, R.G., Meireles, M.C.A., Braga Mello, J.R. (2010) Avaliação dos métodos de etest e microdiluição em caldo para o estudo da suscetibilidade do *sporothrix schenckii* com o itraconazol. *Ci Anim Bras*, 11(2): 344-348.

Mendoza, M., Diaz, A.M., Hung, M.B., Zambrano, E.A., Diaz, E., De Albornoz, M.C. (2002) Production of culture filtrates of *Sporothrix schenckii* in diverse culture media. *Med Mycol*, 40: 447-454.

Mendonza, M., Alvarado, P., Torrez, E.D., Lucena, L., Albornoz, M.C. (2005) Comportamiento fisiológico y de sensibilidad *in vitro* de aislamientos de *Sporothrix schenckii* mantenidos 18 años por dos métodos de preservación. *Rev Iberoam Micol*, 22: 151-156.

Mori, A., Lehmann, S., O'Kelly, J., Kumagai, T., Desmond, J.C., Pervan, M., McBride, W.H., Kizaki, M., Koeffler, P. (2006) Capsaicin, a component of red peppers, inhibits the growth of androgen-independent, p53 mutant prostate cancer cells. *Cancer Res*, 66: 3222-3229.

Morris-Jones, R. (2002) Sporotrichosis. *Clin Dermatol*, 27: 427-431.

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): 4026-4033.

Morschhäuser, J. (2010) Regulation of multidrug resistance in pathogenic fungi. *Fungal Genet Biol*, 47: 94-106.

Moy, T.I., Ball, A.R., Anklesaria, Z., Casadei, G., Lewis, K., Ausubel, F.M. (2006) Identification of novel antimicrobials using a live-animal infection model. *PNAS*, 103(27): 10414-10419.

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

Mylonakis, E., Ausubel, F.M., Perfect, J.R., Heitman, J. (2002) Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Cryptococcus neoformans* as a model of yeast pathogenesis. *Pnas*, 99(24): 15675-15680.

Mylonakis, E., Casadevall, A., Ausubel, F.M. (2007) Exploiting amoeboid and non-vertebrate animal model systems to study the virulence of human pathogenic fungi. *Plos Pathogen*, 3(7): 859-865.

NCCLS (2002) Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, approved standard M27-A2, vol. 22, nº 15, 2<sup>nd</sup>, CLSI Document. Clinical and Laboratory Standards Institute, Villanova, PA, 2002.

NCCLS (2008) Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi, approved standard M38-A, vol. 22, nº 16. CLSI Document. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2002.

Newman, D.J., Cragg, G.M. (2007) Natural products as source of new drugs over the last 25 years. *J Nat Product*, 70: 461-477.

Nobre, M.O., Meireles, M.C., Caetano, D.T., Faé, F., Cordero, M., Meireles, R.M., Appelt, C., Ferreira, L. (2002a) Esporotricose zoonótica na região Sul do Rio Grande do Sul (Brasil) e revisão da literatura brasileira. *Rev Bras Cienc Vet*, 9: 36-41.

Nobre, M.O., Nascente, P.S., Meireles, M.C., Ferreira, L. (2002b) Drogas Antifúngicas para Pequenos e Grandes Animais. *Cien Rur*, 32(1): 175-184.

Nobre, M.O., Antunes, T.A., Meireles, M.C.A., Ferreira L. (2004) Production and evaluation of albino mutants of *Sporothrix schenckii*. *Act Scient Vet*, 32(2): 119-123.

Nosanchuk, J.D., Gomez, B.L., Youngchim, S. (2002) *Histoplasma capsulatum* synthesizes melanin-like pigments in vitro and during mammalian infection. *Infect Immun*, 70: 5124-5131.

Nosanchuk, J.D., Casadevall, A., (2003) The contribution of melanin to microbial pathogenesis. *Cell Microbiol*, 5: 203-223.

Nosanchuk, J.D., van Duin, D., Mandal, P., Aisen, P., Legendre, A.M., Casadevall, A., (2004) *Blastomyces dermatitidis* produces melanin *in vitro* and during infection. *FEMS Microbiol*, 239: 187-193.

Nosanchuk, J.D., Casadevall, A. (2006) Impact of melanin on microbial virulence and clinical resistance to antimicrobial compounds. *Antimicrob Agents Chemother*, 50: 519-528.

Nunes, C. F., Escosteguy, C. C. (2005) Esporotricose humana associada à transmissão por gato doméstico. Relato de caso e revisão de literatura. *Rev Ed Cont Clin Vet Peq Anim*, 54: 66-68.

Odds, F.C., Brown, A.J.P., Gow, N.A.R. (2003) Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol*, 11: 272-279.

Ojima, I. (2008) Modern Natural products chemistry and drug discovery. *J Med Chem*, 51(9): 2587-2588.

Oliveira, M.M.E., Almeida-Paes, R., Muniz, M.M., Gutierrez-Galhardo, M.C., Zancopé-Oliveira, R.M. (2011) Phenotypic and molecular identification of *Sporothrix* isolates from an endemic area of sporotrichosis in Brazil. *Mycopathol*, 172: 257-267.

Osumi, M. (1997) The ultrastructure of yeast: cell wall structure and formation. *Micron*, 29(2/3): 207-233.

Osumi, M., Sato, M., Ishijima, A.S., (1998) Dynamics of cell wall formation in fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *Fungal Gen Biol*, 24(1-2): 178-206.

Pandey, U.B., Nichols, C.D. (2011) Human Disease Models in *Drosophila melanogaster* and the Role of the Fly in Therapeutic Drug Discovery. *Pharmacol Rev*, 63(2): 411-436.

Pang, K.R., Wu, J.J., Huang, D.B., Tying, S.K. (2004) Subcutaneous fungal infections. *Dermatology Ther*, 17(6): 523-531.

Paraud, C., Cabaret, J., Pors, I., Chartier, C. (2005) Impact of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* on *Muellerius capillaries* in goat faeces. *Vet Parasitol*, 131: 71-78.

Park, K.K., Surh, Y.J. (1997) Effects of capsaicin on chemically induced two-stage mouse skin carcinogenesis. *Cancer Lett*, 114: 183-194.

Peralva dos Santos, M.M. (2010) Atividade Antimicrobiana *in vitro* de extratos vegetais das espécies *Mangifera indica*, *Eugenia jambolana*, *Schinus terebinthifolius*, *Capsicum annum*, e de análogos sintéticos da capsaicina frente aos microrganismos da cavidade oral. Tese de Doutorado em Produção Vegetal - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes-RJ.

Pereira, S.A., Passos, S.R.L., Silva, J.N., Gremião, I. D. F., Figueiredo, F. B., Teixeira, J. L., Monteiro, P. C. F., Schubach, T. M. P. (2010) Therapeutic response to azolic antifungal agents for treating feline sporotrichosis. *Vet Rec*, 66: 290-294.

Perez, A. (1999) Terbinafine: broad new spectrum of indications in several subcutaneous, systemic, and parasitic diseases. *Mycoses*, 42: 111-114.

Peruka, I., Materska, M. (2001) Phenylalanine ammonialyase and antioxidant activities of lipophilic fraction of fresh pepper fruits *Capsicum annuum L.* *Innov Food Sci Emerg Tech*, 2(2): 189-192.

Pihet, M., Vandeputte, P., Tronchin, G., Renier, G., Saulnier, P., Georgeault, S., Mallet, R., Chabasse, D., Symoens, F., Bouchara, J.P. (2009) Melanin is an essential component for the integrity of the cell wall of *Aspergillus fumigatus* conidia. *BMC microbial*, 9:177.

Pinto, C.M.F., Puiatti, M., Caliman, F.R.B., Moreira, G.R., Mattos, R.N. (2006) Clima, época de semeadura, produção de mudas, plantio e espaçamento na cultura da pimenta. *Informe Agropec*, 27: 40-49.

Prasad, B.C.N., Kumar, V., Gururaj, H.B., Parimalan, R., Giridhar, P., Ravishanka, G.A. (2006) Characterization of capsaicin synthase and identification of its gene (*csy1*) for pungency factor capsaicin in pepper (*Capsicum* sp.). *PNA*s 103(36): 13315-13320.

Price, M.F., Wilkinson, I.D., Gentry, L.O. (1982) Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia*, 20: 7-14.

Pukkila-Worley, R., Peleg, A.Y., Tampakakis, E., Mylonakis, E. (2009) *Candida albicans* hyphal formation and virulence assessed using a *Caenorhabditis elegans* infection model. *Eukaryotic Cell*, 1750-1758.

Qiao, S., Li, W., Tsubouchi, R., Haneda, M., Murakami, K., Yoshino, M. (2005) Involvement of peroxynitrite in capsaicin-induced apoptosis of C6 glioma cells. *Neurosci Res*; 51: 175–183.

Rahme, L.G., Stevens, E.J., Wolfort, S.F., Shao, J., Tompkins, R.G., Ausubel, F.M. (1995) Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science*, 268: 1899-1902.

Ramos-e-Silva, M., Vasconcelos, C., Carneiro, S., Cestari, T. (2007) Sporotrichosis. *Clin Dermatol*, 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.

Reiischneider, F.J.B. (2000) *Capsicum* Pimentas e pimentões no Brasil. Brasília, DF: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia/ Embrapa Hortaliças. 2000.113p.

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.

Rex, J.H., Pfaler, M.A., Walsh, T.J., Chaturvedi, V., Espinel-Ingroff, A. (2001) Antifungal Susceptibility testing: practical aspects and current challenges. *Clin Microbiol Rev*, 14: 643-658.

Rezende, A.H., Peluziio, M.C.V., Sabarense, C.M. (2008) Animal experimentation: ethics and the Brazilian legislation. *Rev Nutr Campinas*, 21(2): 237-242.

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

Ricci, M., Fifi, A.P., Ragni, A., Schlechtriem, C., Focken, U. (2003) Development of a low-cost technology form mass production of the free-living nematode *Panagrellus*

*redivivus* as an alternative live food for first feeding fish larvae. *Appl Microbiol Biothechnol*, 60: 556-559.

Rocha, D.P., Pinto, G.F., Ruggiero, R., Oliveira, C.A., Guerra, W., Fontes, A.P.S., Pereira-Maia, E., Marzano, I.M.M. (2011) Coordenação de metais a antibióticos como uma estratégia de combate à resistência bacteriana. *Quim Nova*, 34(1): 111-118.

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

Rodrigues, A.M., de Hoog, S., Pires, D.C., Brihante, R.S.N., Sidrim, J.J.C., Gadelha, M.F., Colombo, A.L., Camargo, Z.P. (2014) Genetic diversity and antifungal susceptibility profiles in causative agents of sporotrichosis. *BMC Infect Dis*, 14: 1-9.

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

Rosas, A.L., Nosanchuk, J.D., Gomez, B.L., Edens, W.A., Henson, J.M., Casadevall, A. (2000). Isolation and serological analyses of fungal melanins. *J Immunol Methods*, 244: 69-80.

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): 451-459.

Russell, W.M.S., Burch, K.L. (1992) The principles of humane experimental technique. UFAW, London: UFAW; 1992.



Salas, S.D., Bennet, J.E., Kwon-Chung, K.J., Perfect, J.R., Williamson, P.R. (1996) Effect of the laccase gene *CNLAC1*, on virulence of *Cryptococcus neoformans*. *J Exp Med*, 184: 377-386.

Salazar-Olivo, L. A., Silva-Ortega, C. O. (2004) Efectos farmacológicos de capsaicina, el principio pungente del chile. *Biologia Scripta*, 1(1): 7-14.

Sanchez, A.M., Sanchez, M.G., Malagarie-Cazenave, S., Olea, N., Diaz-Laviada, I. (2006) Induction of apoptosis in prostate tumor PC-3 cells and inhibition of xenograft prostate tumor growth by the vanilloid capsaicin. *Apoptosis*, 11: 89-99.

Santos, I.B., Schubach, T.M.P., Leme, L.R.P., Okamoto, T., Figueiredo, F.B., Pereira, S.A., Quintella, L.P., Madeira, M.F., Coelho, F., Reis, R.S., Schubach, A.O. (2006) Sporotrichosis – The main differential diagnosis with tegumentary leishmaniosis in dogs from Rio de Janeiro, Brazil. *Vet Parasitol*, 143: 1-6.

Ségalat, L. (2007) Invertebrat Animal Models of Diseases as screening tools in drug discovery. *Acs Chemical Biol*, 2(4): 231-235.

Selmecki, A., Forche, A., Berman, J. (2006) Aneuploidy and isochromosome formation in drug-resistant *Candida albicans*. *Science*, 313: 367-370.

Sengupta, P., Samuel, A.D.T. (2009) *Caenorhabditis elegans*: a model system for systems neuroscience. *Curr Opin Neurobiol*, 19: 1-7.

Schechtman, R.C. (2010). Sporotrichosis: Part,I. *Skinmed*, 8: 275-280.

Schubach, T., Valle, A., Gutierrez-Galhardo, M., Monteiro, P., Reis, R., Zancopé-Oliveira, R., Marzochi, K., Schubach, A. (2001). Isolation of *Sporothrix 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., Wanke, B. (2004b) Utilidade do coágulo sanguíneo para o isolamento de *Sporothrix schenckii* de gatos naturalmente infectados. *Braz J Vet Res Anim Sci* 41(6): 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 Mycology*, 44: 87-92.

Schubach, A.O., Barros, M.B.L., Wanke, B. (2008) Epidemic sporotrichosis. *Curr Opin Infect Dis*, 21: 129-133.

Schubert, S., Barker, K.S., Znaidi, S., Schneider, S., Dierolf, F., Dunkel, N., Aid, M., Boucher, G., Rogers, P.D., Raymond, M., Morschhäuser, J. (2011) Regulation of efflux pump expression and drug resistance by the transcription factors Mrr1, Upc2, and Cap1 in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother*, 55: 2212-2223.

Sifri, C.D., Begun, J., Ausubel, F.M. (2005) The worm has turned – microbial virulence modeled in *Caenorhabditis elegans*. *Trends in Microbiol*, 13(3): 119-127.

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 Infect*, 8: 197-205.

Silva, M.J.R. *Malassezia pachydermatis*: suscetibilidade a compostos alternativos naturais e sintéticos. (2012) 81p. Dissertação de Mestrado em Ciência Animal - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes-RJ.

Silva, H., Barra, C.V., Rocha, F.V., Frézard, F., Lopes, M.T.P., Fontes, A.P.S. (2010) Novel Platinum(II) complexes of long chain aliphatic diamine ligands with oxalate as the leaving group. Comparative cytotoxic activity relative to chloride precursors. *J Bras Chem Soc*, 21(10): 1961-1967.

Silva, M.B.T., Costa, M.M.M., Torres, C.C.S., Galhardo, M.C.G., Valle, A.C.F., Magalhães, M.A.F. M., Sabroza, P.C., Oliveira, R.M. (2012) Esporotricose urbana: epidemia negligenciada no Rio de Janeiro, Brasil. Urban sporotrichosis: a neglected epidemic in Rio de Janeiro, Brazil. *Cad Saúde Pública, Rio de Janeiro*, 28(10): 1867-1880.

Silva, E.A., Bernardi, F., Schoendorf, L.M.P., Mendes, M.C.N., Garcia, N.O., Paranhos, N.T., Montenegro, H., Dias, M.A.G. (2013) Esporotricose: surto epidêmico com acometimento humano e felino na Zona Leste de São Paulo, Brasil. *Act Sci Vet*, In press.

Silveira, C.P., Torres-Rodriguez, J., Alvarado-Ramirez, E., Murciano-Gonzalo, F., Dolande, M., Panizo, M., Reviakina, V. (2009) MICs and minimum fungicidal concentrations of amphotericin B, itraconazole, posaconazole and terbinafine in *Sprothrix schenckii*. *J Med Microbiol*, 58: 1607-1610.

Scott, D.W., Bentinck-Smith, J., Haggert, G.F. (1973) Sporotrichosis in three dogs. *Cornell Vet*, 64: 416-426.

Sionov, E., Lee, H., Chang, Y.C., Kwon-Chung, K.J. (2010) *Cryptococcus neoformans* overcomes stress of azole drugs by formation of disomy in specific multiple chromosomes. *PLoS Pathog*, 6(4): 1-13.

Sitaram, N., Nagaraj, R. (1999) Interaction of antimicrobial peptides with biological and model membranes: structural and charge requirements for activity. *Biophys Acta*, 1462: 29-54.

Souza, P.T., Rossi, A.V. (2014) Determinação espectrofotométrica indireta de capsaicinoides em pimentas *Capsicum* a partir da reação com o complexo de co(ii) com 4-(2-piridilazo) resorcinol. *Quim Nova*, 37(4): 631-637.

Snelders, E., van der Lee, H.A., Kuijpers, J., Rijs, A.J., Varga, J., Samson, R.A., Mellado, E., Donders, A.R., Melchers, W.J., Verweij, P.E. (2008) Emergence of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* and spread of a single resistance mechanism. *PLoS Med*, 5(11): 1629-1637.

Sodehall, K. (2010) Invertebrate immunity.II. Series: Advances in experimental medicine and biology; v 708, 0065-2598. Acessado em 25 de setembro de 2014: <http://books.google.com.br/books?id=m3rl40Qg2kkC&printsec=frontcover&hl=pt-BR#v=onepage&q&f=false>.

Souza, L.S., 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.

Stopiglia, C.D.O., Heidrich, D., Vieira, F.J., Marchese, D.P., Sorrentino, J.M., Scroferneker. (2012). Comparison between two culture media for *in vitro* evaluation of antifungal susceptibility of the *Sporothrix schenckii* complex. *An Bras Dermatol*, 87: 561-565.

Stopiglia, C.D.O., Magagnin, C.M., Castrillón, M.R., Mendes, S.D.C., Heidrich, D., Valente, P., Scroferneker, M.L. (2013) Antifungal susceptibilities and identification of species of the *Sporothrix schenckii* complex isolated in Brazil. *Med Mycol*, 3; Early Online: 1-9.

Styer, K., Hopkins, G.W., Bartra, S.S., Plano, G.V., Frothingham, R., Aballay, A. (2005) *Yersinia pestis* kills *Caenorhabditis elegans* by a biofilm-independent process that involves novel virulence factors. *Eur Mol Biol Organ*, 6(10): 992-997.

Sumrra, S. H., Ibrahim, M., Ambreen, S., Imran, M., Danish, M., Rehmani, F. S. (2014) Synthesis, spectral characterization, and biological evaluation of transition metal complexes of bidentate N, O donor schiff bases. *Bioinorg Chem Appl*, 24: 1-10.

Tanaka, T., Kohno, H., Sakata, K. (2002) Modifying effects of dietary capsaicin and rotenone on 4-nitroquinoline 1-oxide-induced rat tongue carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 23: 1361-1367.

Tavares da Silva, M B. Distribuição sócio-espacial da esporotricose humana de pacientes atendidos no Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas no período de 1997 a 2007, residentes no Estado do Rio de Janeiro”. (2010) Dissertação de Mestrado em Ciências em Saúde Pública - Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ.

Therissen, K., Terras, F.R.G., Broekaert, W.F. (1999) Permeabilization of fungal membranes by plant defensins inhibits fungal growth. *App Environ Microbiol*, 62: 5451-5458.

Torres da Silva, D., Pereira, S. A., Gremião, I.D.F., Chaves, A.R., Holanda, M.C., Silva, J.N., Schubach, T.M.P. (2008) Feline conjunctival sporotrichosis. *Acta Sci Vet*, 36(2): 181-184.

Trilles, S.L., Fernandez-Torres, B., Lazera, M.S., Wanke, B., Schubach, A.O., Almeida-Paes, R., Inza, I., Guarro, J. (2005) *In vitro* antifungal susceptibilities of *Sporothrix schenckii* in two growth phases. *Antimicrob Agent Chem*, 9: 3952-3954.

Van Diun, D., Casadevall, A., Nosanchuk, J.D. (2002) Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* reduces their susceptibilities to amphotericin B and caspofungin. *Antimicrob Agent Chem*, 46: 3004-3007.

Vesaluoma, M., Müller, L., Gallar, J., Lambiase, A., Moilanen, J., Hack, T., Belmonte, C., Tervo, T. (2000) Effects of oleoresin *Capsicum* pepper spray on human corneal morphology and sensitivity. *Invest Ophthalmol Visual Sci*, 41: 2138-2147.

Viegas Jr, C., da Silva Bolzani, V., Barreiro, E.J. (2006) Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Quim Nova*, 29(2): 326-337.

Vodovar, N., Acosta, C., Lemaitre, B., Boccard, F. (2004) *Drosophila*: a polyvalent model to decipher host-pathogen interactions. *Trends Microbiol*, 12: 235-242.

Wang, Y., Aise, P., Casadevall, A. (1995) *Cryptococcus neoformans* melanin and virulence: mechanisms of action. *Infect Immun*, 63(8): 3131-3136.

Wanke, B., Trilles, I.E., Lazera, M.S. (2005) Classificação e características gerais dos fungos patogênicos para o homem. In: Coura, J.R. (Org.). *Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias*, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.p.1137-1142.

Welsh, R.D. (2003) Sporotrichosis. *J Am Vet Med Assoc*, 223: 1123-1126.

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

Wink, M. Special Nitrogen Metabolism. In: Dey, Harborne J.B.. (Org.) Plant biochemistry. San Diego: Academic Press, 1997. cap. 12, p. 438-486.

Willger, S.D., Puttikamonkul, S., Kim, K.H., Burritt, J.B., Grahl, N., Metzler, L.J., Barbuch, R., Bard, M., Lawrence, C.B., Cramer, R.A. Jr. (2008) A sterol-regulatory element binding protein is required for cell polarity, hypoxia adaptation, azole drug resistance, and virulence in *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Pathog*, 4(11): 1-18.

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

Xue, S-L., Li, L. (2009) Oral potassium iodide for the treatment of sporotrichosis. *Mycopathol*, 167: 355-356.

Yap, F.B.B. (2011) Disseminated cutaneous sporotrichosis in an immunocompetent individual. *Int J Infect Dis*, 15: 727-729.

Yoshitani, S.I., Tanaka, T., Kohno, H., Takashima, S. (2001) Chemoprevention of azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis by dietary capsaicin and rotenone. *Int J Oncol*, 19: 929- 939.

Yunes, R. A., Cechinel Filho, V. (2001) Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna; Yunes, R. A.; Calixto, J. B., eds.; 1a ed.; Ed. Argos: Chapecó, 2001, cap. 1; Yunes, R. A.; Pedrosa, R. C.; Cechinel Filho, V.; *Quim. Nova*, 24, 147.

Zairi, A., Tangy, F., Saadi, S., Hani, K. (2008) *In vitro* activity of dermasepin S4 derivates against genital infections pathogens. *Regul Toxicol Pharmacol*, 50: 353-358.

Zancopé-Oliveira, R.M., Almeida-Paes, R., Oliveira, M.M.E., Freitas, D.F.S., Gutierrez-Galhardo, M.C. (2011) New diagnostic applications in sporotrichosis. *Skin*

Biopsy – Perspectives, Dr. Uday Khopkar (Ed.) ISBN:978-953-307-290-6, In Tech, p. 53-72.

Zewdie, Y., Bosland, P. W. (2001) Capsaicinoides profiles are not good chemotaxonomic indicatives for *Capsicum* species. *Biochem Syst Ecol*, 29: 161.

Zhang J, Nagasaki M, Tanaka Y, Morikawa S. (2003a) Capsaicin inhibits growth of adult T-cell leukemia cells. *Leuk Res*, 27: 275–283.

Zhang, C.X., Lippard, S.J. (2003b) New metal complexes as potential therapeutics. *Curr Opin Chem Biol*, 7(4): 481-489.

Zhang, R., Hou, A. (2013) Host-Microbe Interactions in *Caenorhabditis elegans*. *ISRN Microbiology*, 2-8.

Zhong, J., Frases, S., Wang, H., Casadevall, A., Stark, R.E. (2008) Following fungal melanin biosynthesis with solid-state NMR: Biopolymers molecular structures and possible connections to cell-wall polysaccharides. *Biochem*, 47: 4701–4710.

Zhou, Y-Meng., Shao, L., Li, Ji-an., Han, Li-Zhong, Cai, Wai-jiao., Zhu, Chu-bao., Chen, Dai-jie. (2011) An efficient and novel screening model for assessing the bioactivity of extracts against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* using *Caenorhabditis elegans*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 75(9): 1746-1751.

Zhuang, Y., Chen, L., Sun, L., Cao, J. (2012) Bioactive characteristics and antioxidant activities of nine peppers. *J Funct Foods*, 331-338.



## 11. APÊNDICE A

Comparação entre os valores da CIM dos sais de heteropoliácidos de prata e dos antifúngicos em nanomolar/mL. Áreas hachuradas em azul correspondem a comparação entre os sais de HPAs e o itraconazol. Áreas hachuradas em rosa correspondem a comparação entre os sais de HPAs e a terbinafina. Áreas hachuradas em laranja correspondem a comparação entre os sais de HPAs e a anfotericina B.

		Cepas de <i>Sporothrix</i>											
Compostos		0197	0198	0199	0205	0202	32285	LSA01	LSA02	LSA03	LSA04	LSA05	LSA06
<b>Polyoxotungstates</b>													
Ag <sub>3</sub> [PW <sub>12</sub> O <sub>40</sub> ]	[µg/mL]	8	8	8	32	32	16	32	32	32	16	8	4
	[nmol/mL]	2,5	2,5	2,5	9,9	9,9	4,9	9,9	9,9	9,9	4,9	2,5	1,2
Ag <sub>5</sub> [SiW <sub>10</sub> V <sub>2</sub> O <sub>40</sub> ]	[µg/mL]	8	16	16	32	16	32	64	128	64	128	64	64
	[nmol/mL]	2,4	4,8	4,8	9,6	4,8	9,6	19,1	38,2	19,1	38,2	19,1	19,1
Ag <sub>4</sub> [SiW <sub>12</sub> O <sub>40</sub> ]	[µg/mL]	16	16	32	16	16	16	16	16	16	16	8	16
	[nmol/mL]	4,8	4,8	9,6	4,8	4,8	4,8	4,8	4,8	4,8	4,8	2,4	4,8
<b>Polyoxomolybdate</b>													
Ag <sub>3</sub> [PMo <sub>12</sub> O <sub>40</sub> ]	[µg/mL]	16	8	8	16	16	16	16	16	8	16	4	4
	[nmol/mL]	7,4	3,7	3,7	7,4	7,4	7,4	7,4	7,4	3,7	7,4	1,9	1,9
<b>Antifúngicos</b>													
ICZ	[µg/mL]	1	1	16	32	16	4	16	4	4	2	4	2
	[nmol/mL]	1,4	1,4	22,6	45,3	22,6	5,7	22,6	5,7	5,7	2,8	5,7	2,8
TBF	[µg/mL]	0,125	0,5	0,5	2	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,25	1	0,25
	[nmol/mL]	0,381	1,5	1,5	6	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	0,762	3,04	0,762
AMB	[µg/mL]	0,125	2	1	4	4	1	8	8	4	0,25	0,125	0,25
	[nmol/mL]	0,135	2,16	1,1	4,3	4,3	1,1	8,6	8,6	4,3	0,27	0,135	0,27

## 12. APÊNDICE B

Comparação entre os valores da CIM dos complexos de coordenação (BMPA, CuBMPA, FeBMPA) e dos antifúngicos em nanomolar/ mL. Áreas hachuradas em laranja correspondem a comparação entre os complexos e a anfotericina B.

		Cepas de <i>Sporothrix</i>											
		0197	0198	0199	0205	0202	32285	LSA01	LSA02	LSA03	LSA04	LSA05	LSA06
<i>Complexos</i>													
BMPA	[µg/mL]	2	2	2	2	2	1	16	16	8	16	16	16
	[nmol/mL]	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,005	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08
CuBMPA	[µg/mL]	2	2	2	32	32	16	32	32	32	64	32	32
	[nmol/mL]	0,005	0,005	0,005	0,087	0,087	0,044	0,087	0,087	0,087	0,174	0,087	0,087
FeBMPA	[µg/mL]	16	16	32	16	16	16	128	128	64	128	64	128
	[nmol/mL]	0,044	0,044	0,088	0,044	0,044	0,044	0,354	0,354	0,177	0,354	0,177	0,354
<i>Antifúngicos</i>													
ICZ	[µg/mL]	1	1	16	32	16	4	16	4	4	2	4	2
	[nmol/mL]	1,4	1,4	22,6	45,3	22,6	5,7	22,6	5,7	5,7	2,8	5,7	2,8
TBF	[µg/mL]	0,125	0,5	0,5	2	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,25	1	0,25
	[nmol/mL]	0,381	1,5	1,5	6	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	0,762	3,04	0,762
AMB	[µg/mL]	0,125	2	1	4	4	1	8	8	4	0,25	0,125	0,25
	[nmol/mL]	0,135	2,16	1,1	4,3	4,3	1,1	8,6	8,6	4,3	0,27	0,135	0,27

### 13. APÊNDICE C

Comparação entre os valores da CIM dos complexos de coordenação (HBPA, CuHBPA, FeHBPA) e dos antifúngicos em nanomolar/ mL. Áreas hachuradas em laranja correspondem a comparação entre os complexos e a anfotericina B.

		Cepas de <i>Sporothrix</i>											
Compostos		0197	0198	0199	0205	0202	32285	LSA01	LSA02	LSA03	LSA04	LSA05	LSA06
<i>Complexos</i>													
HBPA	[ $\mu\text{g/mL}$ ]	64	32	32	32	32	32	256	128	64	128	128	128
	[nmol/mL]	0,298	0,149	0,149	0,149	0,149	0,149	1,195	0,597	0,298	0,597	0,597	0,597
CuHBPA	[ $\mu\text{g/mL}$ ]	8	8	4	16	32	8	32	32	32	32	32	32
	[nmol/mL]	0,022	0,022	0,0109	0,044	0,087	0,022	0,087	0,087	0,087	0,087	0,087	0,087
FeHBPA	[ $\mu\text{g/mL}$ ]	8	16	8	16	32	16	128	64	64	128	64	64
	[nmol/mL]	0,011	0,022	0,011	0,022	0,044	0,022	0,179	0,089	0,089	0,179	0,089	0,089
<i>Antifúngicos</i>													
ICZ	[ $\mu\text{g/mL}$ ]	1	1	16	32	16	4	16	4	4	2	4	2
	[nmol/mL]	1,4	1,4	22,6	45,3	22,6	5,7	22,6	5,7	5,7	2,8	5,7	2,8
TBF	[ $\mu\text{g/mL}$ ]	0,125	0,5	0,5	2	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,25	1	0,25
	[nmol/mL]	0,381	1,5	1,5	6	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	0,762	3,04	0,762
AMB	[ $\mu\text{g/mL}$ ]	0,125	2	1	4	4	1	8	8	4	0,25	0,125	0,25
	[nmol/mL]	0,135	2,16	1,1	4,3	4,3	1,1	8,6	8,6	4,3	0,27	0,135	0,27

## 14. APÊNDICE D

Comparação entre os valores da CIM dos complexos de coordenação (BS, CuBS, FeBS) e dos antifúngicos em nanomolar/ mL. Áreas hachuradas em cinza correspondem a comparação entre os complexos e a terbinafina. Áreas hachuradas em laranja correspondem a comparação entre os complexos e a anfotericina B.

		Cepas de <i>Sporothrix</i>											
Compostos		0197	0198	0199	0205	0202	32285	LSA01	LSA02	LSA03	LSA04	LSA05	LSA06
<i>Complexos</i>													
BS	[µg/mL]	128	128	28	256	>512	>512	256	128	128	256	128	256
	[nmol/mL]	0,842	0,842	0,842	1,684	>3,368	>3,368	1,684	0,842	0,842	1,684	0,842	1,684
CuBS	[µg/mL]	32	16	16	16	4	4	64	64	64	64	64	64
	[nmol/mL]	0,097	0,048	0,048	0,048	0,012	0,012	0,195	0,195	0,195	0,195	0,195	0,195
FeBS	[µg/mL]	16	32	16	32	16	16	64	64	64	64	64	64
	[nmol/mL]	0,048	0,096	0,048	0,096	0,048	0,048	0,194	0,194	0,194	0,194	0,194	0,194
<i>Antifúngicos</i>													
ICZ	[µg/mL]	1	1	16	32	16	4	16	4	4	2	4	2
	[nmol/mL]	1,4	1,4	22,6	45,3	22,6	5,7	22,6	5,7	5,7	2,8	5,7	2,8
TBF	[µg/mL]	0,125	0,5	0,5	2	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,25	1	0,25
	[nmol/mL]	0,381	1,5	1,5	6	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	0,762	3,04	0,762
AMB	[µg/mL]	0,125	2	1	4	4	1	8	8	4	0,25	0,125	0,25
	[nmol/mL]	0,135	2,16	1,1	4,3	4,3	1,1	8,6	8,6	4,3	0,27	0,135	0,27

## 15. APÊNDICE E

Comparação entre os valores da CIM dos complexos de coordenação (BE, CuBE, FeBE) e dos antifúngicos em nanomolar/ mL. Áreas hachuradas em cinza correspondem a comparação entre os complexos e a terbinafina. Áreas hachuradas em laranja correspondem a comparação entre os complexos e a anfotericina B.

		Cepas de <i>Sporothrix</i>											
Compostos		0197	0198	0199	0205	0202	32285	LSA01	LSA02	LSA03	LSA04	LSA05	LSA06
<i>Complexos</i>													
	[µg/mL]	16	64	64	64	32	32	128	128	64	256	128	256
BE	[nmol/mL]	0,096	0,385	0,385	0,385	0,192	0,192	0,771	0,771	0,385	1,542	0,771	1,542
	[µg/mL]	8	16	8	32	16	16	64	64	32	32	32	32
CuBE	[nmol/mL]	0,025	0,05	0,025	0,101	0,05	0,05	0,202	0,404	0,101	0,101	0,101	0,101
	[µg/mL]	32	32	32	64	32	32	64	64	64	128	64	64
FeBE	[nmol/mL]	0,092	0,092	0,092	0,185	0,092	0,092	0,185	0,185	0,185	0,371	0,185	0,185
<i>Antifúngicos</i>													
	[µg/mL]	1	1	16	32	16	4	16	4	4	2	4	2
ICZ	[nmol/mL]	1,4	1,4	22,6	45,3	22,6	5,7	22,6	5,7	5,7	2,8	5,7	2,8
	[µg/mL]	0,125	0,5	0,5	2	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,25	1	0,25
TBF	[nmol/mL]	0,381	1,5	1,5	6	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	0,762	3,04	0,762
	[µg/mL]	0,125	2	1	4	4	1	8	8	4	0,25	0,125	0,25
AMB	[nmol/mL]	0,135	2,16	1,1	4,3	4,3	1,1	8,6	8,6	4,3	0,27	0,135	0,27

## 16. APÊNDICE F

Comparação entre os valores da CIM dos complexos de coordenação (HPCINOL, CuHPCINOL, FeHPCINOL, MnHPCINOL) e dos antifúngicos em nanomolar/ mL. Áreas hachuradas em cinza correspondem a comparação entre os complexos e a terbinafina. Áreas hachuradas em laranja correspondem a comparação entre os complexos e a anfotericina B.

		Cepas de <i>Sporothrix</i>											
Compostos		0197	0198	0199	0205	0202	32285	LSA01	LSA02	LSA03	LSA04	LSA05	LSA06
<i>Complexos</i>													
HPCINOL	[µg/mL]	256	128	128	256	256	64	256	256	>512	256	256	>512
	[nmol/mL]	0,834	0,417	0,417	0,834	0,834	0,208	0,834	0,834	>1,668	0,834	0,834	>1,668
CuHPCINOL	[µg/mL]	64	64	16	64	64	32	128	64	32	64	64	128
	[nmol/mL]	0,144	0,144	0,036	0,144	0,144	0,072	0,288	0,144	0,072	0,144	0,144	0,288
FeHPCINOL	[µg/mL]	128	64	32	64	128	64	64	64	256	64	128	128
	[nmol/mL]	0,258	0,129	0,064	0,129	0,258	0,129	0,129	0,129	0,516	0,129	0,258	0,258
MnHPCINOL	[µg/mL]	256	64	16	64	64	64	32	128	256	16	128	32
	[nmol/mL]	0,613	0,153	0,038	0,153	0,153	0,153	0,077	0,306	0,613	0,038	0,306	0,077
<i>Antifúngicos</i>													
ICZ	[µg/mL]	1	1	16	32	16	4	16	4	4	2	4	2
	[nmol/mL]	1,4	1,4	22,6	45,3	22,6	5,7	22,6	5,7	5,7	2,8	5,7	2,8
TBF	[µg/mL]	0,125	0,5	0,5	2	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,25	1	0,25
	[nmol/mL]	0,381	1,5	1,5	6	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	0,762	3,04	0,762
AMB	[µg/mL]	0,125	2	1	4	4	1	8	8	4	0,25	0,125	0,25
	[nmol/mL]	0,135	2,16	1,1	4,3	4,3	1,1	8,6	8,6	4,3	0,27	0,135	0,27

