

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS AGROPECUÁRIAS
LABORATÓRIO DE SANIDADE ANIMAL

MARIA LUIZA SANTOS MARTINS

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE EXTRATOS VEGETAIS DE
Capsicum annuum L., *Clitoria fairchildiana* R. Howard e *Phaseolus vulgaris* L.
SOBRE OS FUNGOS PATOGÊNICOS *Malassezia pachydermatis* E *Sporothrix* spp.

CAMPOS DOS GOYTACAZES
JUNHO/2023

MARIA LUIZA SANTOS MARTINS

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE EXTRATOS VEGETAIS DE
Capsicum annum L., *Clitoria fairchildiana* R. Howard e *Phaseolus vulgaris* L. SOBRE
OS FUNGOS PATOGÊNICOS *Malassezia pachydermatis* E *Sporothrix* spp.

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal na Área de Concentração em Sanidade Animal.

ORIENTADOR: Prof Dr. Olney Vieira da Motta

CAMPOS DOS GOYTACAZES

JUNHO/2023

MARIA LUIZA SANTOS MARTINS

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE EXTRATOS VEGETAIS DE *Capsicum annum* L., *Clitoria fairchildiana* R. Howard e *Phaseolus vulgaris* L. SOBRE OS FUNGOS PATOGÊNICOS *Malassezia pachydermatis* E *Sporothrix* spp.

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal na Área de Concentração em Sanidade Animal.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Solange Silva Samarão (Doutora, Biociências e Biotecnologia) -
LSA/CCTA/UENF

Prof. Gabriel Bonan Taveira (Doutor, Biociências e Biotecnologia) -
LFBM/CBB/UENF

Prof^a Andrea Regina de Souza Baptista (Doutora, Genética) - UNESP

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

Ao meu esposo e melhor amigo
Daniel, e a nossa filha, Maria
Alice, luz de nossas vidas.

Agradecimentos

Agradeço a Deus pela minha vida e pela saúde para seguir.

Ao meu orientador, Prof. Olney Vieira da Motta, por todo incentivo, zelo, compreensão, orientação e por não ter desistido de mim.

À Prof^a Solange Silva Samarão, por todos os ensinamentos, pela paciência, pela preocupação e pelo auxílio em várias etapas deste trabalho.

À amiga Nina Quintanilha Costa, parceira de pesquisa, obrigada por nunca ter soltado a minha mão. Sua energia e generosidade são inspiradoras.

À doutoranda Milena Bellei Cherene (LFBM), obrigada pela disponibilidade, por toda calma e gentileza em todos os momentos em que precisei da sua ajuda.

A Maria de Lourdes Amaral Barnardino, técnica de nível superior, por todo apoio, muito além da parte técnica, por me ajudar nos experimentos e a superar os desafios, assim como por dividir suas experiências acadêmicas e de vida.

À técnica de nível superior Gina Nunes Teixeira, pela paciência, pela ajuda e por tantas trocas enriquecedoras.

Aos senhores Eli e Sueli, pelo apoio na limpeza e na esterilização dos materiais.

A Nayara Sampaio, por todo apoio nesse trajeto e por ser sempre muito solícita.

Ao Ramon de Moraes, pela disponibilidade e pela ajuda com as análises estatísticas.

À minha família e aos meus amigos, pelo amor, pela compreensão, pelo apoio e pela presença nos melhores e piores momentos. Em especial, ao meu irmão Manoel Luiz, à minha cunhada Amanda, aos amigos Marina, Luize, Rodrigo, e à minha amada afilhada Yasmin, que, mesmo com pouca idade, foi uma grande incentivadora nas horas devidas.

À minha mãe Maristela, por sempre acreditar na minha capacidade, por toda preocupação, torcida, amor e por me acolher nos momentos mais desafiadores e estressantes. Mas principalmente por ser essa vovó excepcional e por ajudar a cuidar de Maria Alice na minha ausência.

À minha sogra Regina, por toda dedicação, apoio e disponibilidade em ajudar nos cuidados diários com Maria Alice para que eu pudesse me dedicar a este trabalho.

Ao meu esposo e melhor amigo Daniel, obrigada pelo companheirismo, não só no período da realização deste estudo, como em todos os anos em que estamos juntos. Agradeço por todo cuidado, pelos puxões de orelha e por ser meu porto seguro.

À minha filha Maria Alice, que, mesmo tão novinha, pareceu entender meus momentos de ausência. Obrigada pela sua doçura, pureza e alegria de viver, que são combustíveis e me dão coragem para seguir em frente.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro que tornou possível a realização deste trabalho.

RESUMO

A ocorrência de infecções fúngicas em humanos e em animais tem se tornado mais frequente. Dentre os agentes infecciosos, destacam-se a levedura *Malassezia pachydermatis* e os fungos termodimórficos do Complexo *Sporothrix schenckii*. O primeiro é um microrganismo comensal da pele de cães e gatos, tornando-se patogênico a partir de desequilíbrios no microclima desse órgão, causando, então, dermatite e otite. O segundo, um fungo saprófita, de distribuição mundial, causador da esporotricose – micose subcutânea de caráter subagudo ou crônico, que pode acometer diversas espécies animais, inclusive humanos, e que é classificada como uma zoonose emergente e epidêmica em várias regiões do mundo. Com a pressão do uso de drogas antifúngicas para tratamento dessas micoses, surgiram inúmeros casos de cepas resistentes aos medicamentos de eleição para o tratamento. Dessa forma, este trabalho avaliou a atividade inibitória *in vitro* de extratos ricos em peptídeos de folha de *Clitoria fairchildiana*, folha de *Phaseolus vulgaris*, bem como folha e fruto de *Capsicum annuum* frente a cepas clínicas de *Malassezia pachydermatis* e a uma cepa clínica e outra padrão de *Sporothrix schenckii* na forma de levedura, previamente cultivadas em ágar Sabouraud, acrescidos de cloranfenicol [50mg/ml] e cicloheximida [400mg/ml] a 37°C por 4-6 dias. A atividade inibitória desses extratos foi avaliada em ensaios de microdiluição e de diluição em caldo, seguidos de análise de viabilidade celular, formação de melanina e ensaio de permeabilidade de membrana com o corante vital Sytox Green™. O perfil de sensibilidade das cepas de *M. pachydermatis* foi determinado pelo ensaio de antifungigrama, pela técnica de disco difusão. Uma cepa de *M. pachydermatis* apresentou sensibilidade intermediária a miconazol e cetoconazol. Os extratos de *C. fairchildiana* e do fruto de *C. annuum* apresentaram melhores resultados de inibição. Houve atraso no processo de melanização da colônia tratada com fruto de *C. annuum*. O extrato de *C. fairchildiana* foi capaz de causar danos nas membranas celulares das cepas testadas. A partir dessas descobertas, concluiu-se que mais estudos são necessários, visando a alternativas no tratamento de infecções fúngicas humanas e animais por esses patógenos.

Palavras-chave: Micoses, tratamento, peptídeos antimicrobianos, produtos naturais.

ABSTRACT

The occurrence of fungal infections in humans and animals has become more frequent. Among the infectious agents, the yeast *Malassezia pachydermatis* and the thermotolerant fungi of the *Sporothrix schenckii* Complex stand out. The first is a commensal microorganism of the skin of dogs and cats, becoming pathogenic from imbalances in the microclimate of that organ causing dermatitis and otitis. The second, a saprophytic fungus, of worldwide distribution, which causes sporotrichosis, subcutaneous or organic subcutaneous mycosis in animals that can affect several species, including humans. It is seen as an emerging and epidemic zoonosis in various regions of the world. With the pressure of using antifungal drugs to treat these mycoses, numerous cases of strains resistant to the drugs chosen for treatment. Thus, this work evaluated the in vitro inhibitory activity of extracts rich in peptides from the leaf of *Clitoria fairchildiana*, leaf of *Phaseolus vulgaris* and leaf and fruit of *Capsicum annum*, against clinical strains of *Malassezia pachydermatis* and a clinical strain and another pattern of *Sporothrix schenckii* in yeast form, previously cultivated in Sabouraud agar with the addition of chloramphenicol [50mg/ml] and cycloheximide [400mg/ml] at 37°C for 4-6 days. Their inhibitory activity was evaluated in microdilution and broth dilution assays followed by prediction analysis, cellular melanin formation and membrane permeability assay with the vital dye Sytox Green™. The sensitivity profile of the *M. pachydermatis* strains was determined by the antifungigram assay, using the disk diffusion technique. One strain of *M. pachydermatis* showed mutual susceptibility to miconazole and ketoconazole. *C. fairchildiana* and *C. annum* fruit extracts showed better restriction results. There was a delay in the melanization process of the colony treated with *C. annum* fruit. The *C. fairchildiana* extract was capable of causing damage to the cell membranes of the tested strains. From these findings, it is concluded that further studies are needed to provide alternatives in the treatment of human and animal fungal infections by these pathogens.

Keywords: Mycoses, treatment, antimicrobial peptides, natural products.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Colônia de <i>M. pachydermatis</i>	20
Figura 2: Microscopia de exame direto, feito com fita de dobra labial de um cão apresentando dermatite por <i>M. pachydermatis</i> . Observam-se células ovóides e cilíndricas curtas, entre restos celulares. Coloração Giemsa modificada, aumento 50x.....	20
Figura 3: Otite ceruminosa em cão, causada por <i>M. pachydermatis</i>	22
Figura 4: Lesões inflamatórias hiperpigmentadas em um cão com dermatite por <i>Malassezia pachydermatis</i> , secundária a uma infestação de ácaros <i>Demodex spp</i>	22
Figura 5: Citologia por <i>imprint</i> de úlcera de pele felino, mostrando várias estruturas semelhantes a leveduras de <i>S. schenckii</i> em forma de charuto, ovais ou redondas, em meio extracelular e dentro de macrófagos. Corado com panótico, 100x.....	26
Figura 6: Morfologia macroscópica de uma colônia pigmentada e escura de <i>Sporothrix brasiliensis</i> devido à produção de melanina. Cultura em ágar Sabouraud Dextrose...	27
Figura 7: Esporotricose felina. (a) Lesões crostosas e ulcerativas em face, (b) múltiplas lesões ulcerativas em membro torácico (Lloret et al., 2013), (c) lesão ulcerada e exsudativa localizada em região nasal, (d) lesões nodulares causando deformação de face.....	29
Figura 8: Diferentes apresentações clínicas de esporotricose em humanos. (a) esporotricose linfocutânea, (b) esporotricose cutânea fixa.....	30
Figura 9: Pimentas do gênero <i>Capsicum annum</i> . (a) Pimenta-doce 2006), (b) Pimenta jalapeño.....	37
Figura 10: (a) “Sombreiro” ou <i>C. fairchildiana</i> , apresenta médio ou grande porte e copa frondosa, (b) flores violáceas em ráceros pêndulos.....	38
Figura 11: <i>Phaseolus vulgaris</i> , feijão carioca.....	39

Figura 12: Desenho esquemático da distribuição dos componentes do ensaio na microplaca de 96 poços.....	46
Figura 13: Viabilidade celular da cepa MP1 de <i>M. pachydermatis</i> , tratadas com terbinafina e extrato de <i>P. vulgaris</i> . O controle positivo representa 100% da viabilidade celular (leveduras não tratadas).....	66
Figura 14: Viabilidade celular da cepa MP5 de <i>M. pachydermatis</i> após tratamento com extrato de frutos de <i>C. annuum</i> . O controle positivo representa 100% da viabilidade celular, e o controle negativo, ausência de células.....	66
Figura 15: Crescimento de colônias de S1 após 5 dias de incubação em estufa a 25°C.....	69
Figura 16: Crescimento de colônias de S1 após 12 dias de incubação em estufa a 25°C.....	70
Figura 17: Crescimento de colônias de S1 após 19 dias de incubação em estufa a 25°C.....	70
Figura 18: Crescimento de colônias de S2 após 4 dias de incubação em estufa a 25°C.....	72
Figura 19: Crescimento de colônias de S2 após 11 dias de incubação em estufa a 25°C.....	73
Figura 20: Crescimento de colônias de S2 após 17 dias de incubação em estufa a 25°C.....	74
Figura 21: Células de <i>M. pachydermatis</i> (cepa MP1) incubadas com a sonda Sytox Green™, após terem crescido na ausência (controle) e na presença de extrato de <i>C. fairchildiana</i> [400µg/ml] e de Terbinafina [2µg/ml]. Barras = 10µm.....	76
Figura 22: Células de <i>M. pachydermatis</i> (cepa MP2) incubadas com a sonda Sytox Green™, após terem crescido na ausência (controle) e na presença de extrato de <i>C. fairchildiana</i> [400µg/ml] e de Terbinafina [2µg/ml]. Barras = 10µm.....	77

Figura 23: Células de *S. schenckii* ATCC 32285 (cepa S1) incubadas com a sonda Sytox Green™, após terem crescido na ausência (controle) e na presença de extrato de *C. fairchildiana* [800µg/ml]. Barras = 10µm.....78

Figura 24: Células de *S. brasiliensis* (cepa S2) incubadas com a sonda Sytox Green™, após terem crescido na ausência (controle) e na presença de extrato de *C. fairchildiana* [800µg/ml]. Barras = 10µm.....78

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1: Ação do extrato de *C. fairchildiana* em diferentes concentrações sobre MP1. Médias com letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).....51
- Gráfico 2: Ação do extrato de *P. vulgaris* em diferentes concentrações sobre MP1. Diferença das médias não significativa (ns).....52
- Gráfico 3: Ação do extrato de folha de *C. annuum* em diferentes concentrações sobre MP1. Médias com letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).....52
- Gráfico 4: Ação do extrato de frutos maduros de *C. annuum* em diferentes concentrações sobre MP1. Diferença das médias não significativa (ns).....53
- Gráfico 5: Ação de Terbinafina em diferentes concentrações sobre MP1. Médias com letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).....53
- Gráfico 6: Ação de Anfotericina B em diferentes concentrações sobre MP1. Médias com letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).....54
- Gráfico 7: Ação do extrato de *C. fairchildiana* em diferentes concentrações sobre MP2. Médias com letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).....55
- Gráfico 8: Ação do extrato de *P. vulgaris* em diferentes concentrações sobre MP2. Médias com letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).....55
- Gráfico 9: Ação do extrato de folha de *C. annuum* em diferentes concentrações sobre MP2. Médias com letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).....56
- Gráfico 10: Ação do extrato de fruto de *C. annuum* em diferentes concentrações sobre MP2. Médias com letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).....56

Gráfico 11: Ação de Terbinafina em diferentes concentrações sobre MP2. Médias com letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).....	57
Gráfico 12: Ação de Anfotericina B em diferentes concentrações sobre MP2. Médias com letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).....	57
Gráfico 13: Ação do extrato de <i>C. fairchildiana</i> em diferentes concentrações sobre MP3. Médias com letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).....	58
Gráfico 14: Ação do extrato de <i>P. vulgaris</i> em diferentes concentrações sobre MP3. Médias com letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).....	59
Gráfico 15: Ação do extrato de folha de <i>C. annuum</i> em diferentes concentrações sobre MP3. Diferença das médias não significativa (ns).....	59
Gráfico 16: Ação do extrato de fruto de <i>C. annuum</i> em diferentes concentrações sobre MP3. Médias com letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).....	60
Gráfico 17: Ação do extrato de <i>C. fairchildiana</i> em diferentes concentrações sobre MP4. Médias com letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).....	60
Gráfico 18: Ação do extrato de <i>P. vulgaris</i> em diferentes concentrações sobre MP4. Médias com letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).....	61
Gráfico 19: Ação do extrato de folha de <i>C. annuum</i> em diferentes concentrações sobre MP4. Médias com letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).....	61

Gráfico 20: Ação do extrato de fruto de <i>C. annuum</i> em diferentes concentrações sobre MP4. Médias com letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).....	62
Gráfico 21: Ação do extrato de <i>C. fairchildiana</i> em diferentes concentrações sobre MP5. Diferença das médias não significativa (ns).....	63
Gráfico 22: Ação do extrato de <i>P. vulgaris</i> em diferentes concentrações sobre MP5. Médias com letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).....	63
Gráfico 23: Ação do extrato de folha de <i>C. annuum</i> em diferentes concentrações sobre MP5. Médias com letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).....	64
Gráfico 24: Ação do extrato de frutos maduros de <i>C. annuum</i> em diferentes concentrações sobre MP5. Médias com letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).....	64
Gráfico 25: Curvas de crescimento de <i>S. chenckii</i> (cepa ATCC 32285) na presença de extratos vegetais (<i>C. fairchildiana</i> , <i>P. vulgaris</i> , folha e fruto de <i>C. annuum</i> - [800µg/ml]) e antifúngicos comerciais (Terbinafina- [1µg/ml] e Anfotericina B [2µg/ml]), cultivados em meio RPMI-1640. O valor de cada ponto corresponde à média entre as triplicatas.....	67
Gráfico 26: Curvas de crescimento de <i>S. brasiliensis</i> na presença de extratos vegetais (<i>C. fairchildiana</i> , <i>P. vulgaris</i> , folha e fruto de <i>C. annuum</i> - [800µg/ml]) e antifúngicos comerciais (Terbinafina- [1µg/ml] e Anfotericina B [2µg/ml]), cultivados em meio RPMI-1640. O valor de cada ponto corresponde à média entre as triplicatas.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Antifúngicos comerciais e suas informações. Fonte: CECON, 2008. 44

Tabela 2: Médias das medidas dos halos (mm) das cinco cepas de *M. pachydermatis* frente aos antifúngicos comerciais AB; ICZ; FLU; EC; MCZ NY e KET. Sendo (S) sensível e (I) intermediário. Os experimentos foram realizados em triplicata. 50

Tabela 3: Médias das Unidades Formadoras de Colônia (UFC) e porcentagens, das cinco cepas de *M. pachydermatis* frente a extratos vegetais e antifúngicos comerciais. O controle representa 100% da viabilidade celular. Na cor vermelha, casos em que houve redução da viabilidade celular em comparação ao controle. Os experimentos foram realizados em triplicata. 65

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1. <i>Malassezia pachydermatis</i>	19
2.1.1 Filogenia e características microbiológicas	19
2.1.2 Ecologia	21
2.1.3 Patogenia e sinais clínicos	21
2.1.4 Diagnóstico	22
2.1.5 Tratamento	23
2.1.6 Resistência antifúngica	24
2.2. Complexo <i>Sporothrix schenckii</i>	24
2.2.1 Filogenia e características gerais	24
2.2.2 Características microbiológicas e fatores de virulência	25
2.2.3 Epidemiologia	27
2.2.4 Transmissão e manifestações clínicas	28
2.2.5 Diagnóstico de esporotricose	30
2.2.6 Tratamento	33
2.2.7 <i>S. schenckii</i> resistente a antifúngicos	35
2.3. Peptídeos antimicrobianos	35
2.4. Plantas de interesse microbiológico	37
2.4.1 Gênero <i>Capsicum</i>	37
2.4.2 <i>Clitoria fairchildiana</i> R. Howard	38
2.4.3 <i>Phaseolus vulgaris</i> L.	39
3. JUSTIFICATIVA	40
4. OBJETIVOS	41
4.1. Objetivos gerais	41

4.2. Objetivos específicos	41
5. MATERIAL E MÉTODOS	42
5.1. Microrganismos utilizados	42
5.2. Extratos de plantas	43
5.3. Antifungigrama de <i>M. pachydermatis</i> utilizando antifúngicos convencionais.	44
5.4. Ensaio de inibição de crescimento de <i>M. pachydermatis</i> por extratos vegetais pelo método de microdiluição	45
5.5. Análise da viabilidade celular de <i>M. pachydermatis</i>	47
5.6. Ensaio de inibição do crescimento de <i>S. schenckii</i> e <i>S. brasiliensis</i> por extratos vegetais em meio líquido	47
5.7. Avaliação do crescimento de <i>S. schenckii</i> e <i>S. brasiliensis</i> em meio de cultura sólido e formação de melanina.....	48
5.8. Ensaio de permeabilização da membrana plasmática	48
6. RESULTADOS.....	50
6.1. Antifungigrama de <i>M. pachydermatis</i> utilizando antifúngicos convencionais.	50
6.2. Ensaio de inibição de crescimento de <i>M. pachydermatis</i> por extratos vegetais pelo método de microdiluição	50
6.3. Análise de viabilidade celular de <i>M. pachydermatis</i>	64
6.4. Ensaio de inibição do crescimento de <i>S. schenckii</i> (ATCC 32285) e <i>S. brasiliensis</i> por extratos vegetais em meio líquido	67
6.5. Avaliação do crescimento de <i>S. schenckii</i> e <i>S. brasiliensis</i> em meio de cultura sólido e formação de melanina.....	68
6.6. Ensaio de permeabilização da membrana plasmática	75
7. DISCUSSÃO	79
8. CONCLUSÃO	82
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83

1. INTRODUÇÃO

Um dos principais motivos de procura à assistência veterinária é a ocorrência de micoses cutâneas nos animais de estimação (CRUZ *et al.*, 2020). Segundo estudo retrospectivo realizado por Galiza e colaboradores (2014), *Malassezia pachydermatis* e *S. schenckii* estão entre os agentes etiológicos fúngicos de maior casuística diagnosticados pelo Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria- RS entre 1990 e 2012. Com o passar do tempo e devido ao número crescente de casos de infecções fúngicas, diversos fatores relacionados a elas passaram a ser observados, como a resposta imune dos hospedeiros e a necessidade de escolhas terapêuticas apropriadas a partir da identificação desses agentes.

M. pachydermatis é uma levedura comensal na pele e na orelha externa de cães e gatos. Principalmente em cães, desequilíbrios do microclima da pele, por vezes relacionados a outras doenças, podem levar a proliferação exacerbada do microrganismo, causando otite e dermatite (GUILLOT e BOND, 2020). O *M. pachydermatis* foi descrito como o fungo isolado com maior frequência em animais de estimação que apresentavam lesões de pele (DWORECKA-KASZAK *et al.*, 2020).

Também de grande importância, os fungos do Complexo *Sporothrix schenckii* são termodimórficos, saprófitas e, em geral, a partir da sua inoculação traumática, causam a micose subcutânea de caráter subagudo ou crônico, conhecida como esporotricose. Cosmopolita, de distribuição mundial e considerada endêmica em diversas regiões do mundo, a esporotricose pode afetar diversas espécies de animais, inclusive humanos. Nas últimas décadas, passou a ser classificada como uma micose emergente e hiperendêmica no estado do Rio de Janeiro, onde os felinos domésticos foram apontados como pontos-chave da transmissão e fonte de infecção para outros animais e seres humanos. A transmissão geralmente ocorre pela implantação traumática de leveduras a partir de arranhões, mordeduras ou contato com exsudato, rico em leveduras, de lesões desses animais, conferindo a eles esse papel de destaque na epidemiologia dessa zoonose (GREMIÃO *et al.*, 2017).

A esporotricose produz lesões nodulares, ulcerativas e crostosas. Nos felinos, pode ocorrer na forma cutânea, linfocutânea ou disseminada, e as lesões iniciais são principalmente descritas em região de face e/ou membros (LLORET *et al.*, 2013). Em humanos, as formas clínicas podem ser a cutânea fixa, extracutânea, linfocutânea ou disseminada (LOPES-BEZERRA *et al.*, 2006). Casos de manifestação disseminada e

grave estão comumente relacionados a indivíduos imunocomprometidos (OROFINO-COSTA *et al.*, 2017), podendo levar ao óbito (MONTE ALVES *et al.*, 2020).

Essas micoses habitualmente necessitam de tratamentos prolongados com drogas antifúngicas, sendo os efeitos adversos e as falhas terapêuticas causadas pela diminuição da susceptibilidade dos agentes etiológicos aos medicamentos, um tópico importante e desafiador para os clínicos veterinários (PEREIRA *et al.*, 2009). Além disso, o manejo com os animais doentes é uma questão complexa para muitos tutores. O risco de contaminação, bem como as dificuldades em administrar as medicações corretamente ou manter os gatos em isolamento são motivos frequentes de interrupção do tratamento desses animais (SCHUBACH *et al.*, 2004).

A partir desses desafios, torna-se cada vez maior o interesse pelas propriedades de plantas medicinais com foco na avaliação e na padronização de testes *in vitro* com seus compostos ativos (JAMSHIDI-KIA *et al.*, 2018). Nesse sentido, os peptídeos antimicrobianos de plantas surgem como alternativa promissora aos antifúngicos convencionais, por apresentarem ampla atividade inibitória no desenvolvimento de microrganismos como fungos, bactérias, protozoários, entre outros (MOOKHERJEE *et al.*, 2020; CHERENE *et al.*, 2023).

Na busca por novas substâncias e devido à importância adquirida pelas infecções fúngicas na medicina veterinária e humana, os estudos que envolvem a descoberta de novos agentes antifúngicos, o reposicionamento de fármacos e a descoberta de novos alvos estão em foco. Com isso, este trabalho objetiva avaliar a atividade antifúngica de extratos ricos em peptídeos das plantas *Capsicum annum*, *Clitoria fairchildiana* e *Phaseolus vulgaris* frente aos fungos patogênicos *Malassezia pachydermatis* e *Sporothrix* spp.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Malassezia pachydermatis*

Malassezia pachydermatis é um agente fúngico de grande importância clínica na medicina humana e veterinária (GUILLOT e BOND, 1999), sendo uma levedura lipofílica que habita normalmente a pele de diversas espécies de animais, podendo causar patologias como otites externas e dermatites, principalmente em cães e gatos (GUILLOT e BOND, 2020). Tal agente foi identificado como patógeno causador de surto de infecção hospitalar em unidade de terapia intensiva neonatal (ILAHÍ *et al.*, 2017) e descrito como comensal também na pele de tutores de cães, podendo estes servirem como carreadores da levedura (MORRIS *et al.*, 2005).

2.1.1 Filogenia e características microbiológicas

Pertencentes ao filo dos basidiomicetos, espécies do gênero *Malassezia* tiveram seu genoma sequenciado a partir do ano de 2007. Por muitos anos entendeu-se que a *M. pachydermatis* era apenas lipofílica, mas não dependente de lipídios, devido a sua capacidade de crescer no ágar Sabouraud dextrose (GUILLOT e BOND, 1999). O sequenciamento do genoma, porém, e o estudo de famílias específicas de genes, tornou possível identificar peculiaridades desses tipos de leveduras, como a baixa capacidade de degradação de carboidratos pela restrição do gene glicosil, o qual codifica a enzima hidrolase, além da inexistência de um gene que sintetiza ácidos graxos, o que o torna dependente de lipídeos. Ao mesmo tempo, identificou-se um aumento de enzimas capazes de captar e hidrolisar esses componentes da pele e das mucosas dos animais que estão habitando (CABAÑES, 2019; WU *et al.*, 2015). Ainda, foram detectados genes com função desconhecida, que podem ter sido assimilados por transferência horizontal de genes (WU *et al.*, 2015). A capacidade dessa levedura de crescer em ágar Sabouraud dextrose é explicada por dispor de frações lipídicas da peptona, um constituinte desse meio de cultura (PUIG *et al.*, 2017).

M. pachydermatis apresenta colônias de coloração creme a amarelo, lisas ou levemente enrugadas, foscas ou brilhantes (Figura 1). Em geral, as leveduras caracterizam-se pelo formato ovóide, mas também podem ser elípticas ou cilíndricas – forma de pegada de sapato – (GUILLOT e BOND, 2020), medindo aproximadamente

2 μ m x 5 μ m (MCVEY *et al.*, 2016), com possibilidade de variações de 1,5-3,5 μ m x 6,0-8,0 μ m (Figura 2) (GUILLOT e BOND, 2020).

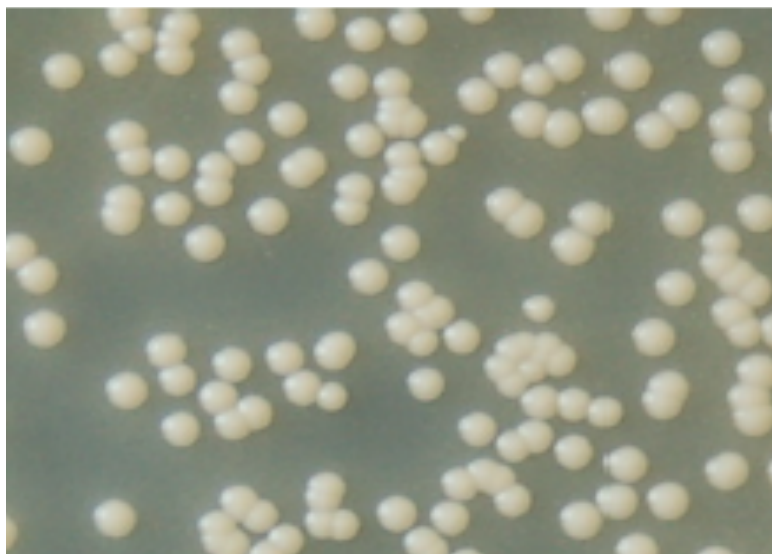


Figura 1: Colônia de *M. pachydermatis*. Fonte: Cabañes, 2019

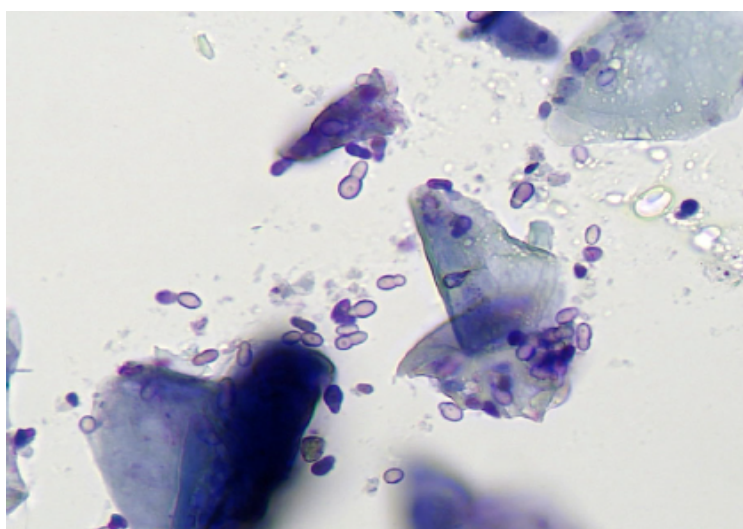


Figura 2: Microscopia de exame direto feito com fita de dobra labial de um cão apresentando dermatite por *M. pachydermatis*. Observam-se células ovóides e cilíndricas curtas, entre restos celulares. Coloração Giemsa modificada, aumento 50x. Fonte: Bond *et al.*, 2020

Sua reprodução ocorre por brotamento de um único polo (desenvolvimento monopolar blástico) e em uma base ampla. *M. pachydermatis* não é capaz de formar filamentos (GUILLOT e BOND, 1999; MCVEY *et al.*, 2016), entretanto algumas outras espécies do gênero *Malassezia*, se em condições de cultura muito específicas ou em lesões cutâneas, podem formar (SAADATZADEH *et al.*, 2001). Sua parede celular é

constituída por glicoproteínas (75-80%), lipídios (15-20%) e quitina (1-2%) (MCVEY et al, 2016), apresenta espessura de aproximadamente 0,12µm em sua camada mais interna, uma estrutura serrilhada forma invaginações na membrana plasmática (DAVID et al, 2007).

2.1.2 Ecologia

É extensamente documentada a presença de *M. pachydermatis* em cães e gatos saudáveis ou que apresentam dermatites ou otites, embora nos felinos domésticos outras espécies de *Malassezia* sejam encontradas com mais frequência. (CAFARCHIA et al., 2005; GUILLOT e BOND, 2020). Como essas leveduras são comensais, compõem uma reserva de patógenos em potencial, localizada nas mucosas e no extrato córneo, e, quando há algum desequilíbrio entre virulência e imunidade do hospedeiro, elas são capazes de causar as dermatites e otites (BOND et al., 2020), sendo, então, comumente associadas a quadros de imunossupressão ou alterações predisponentes (MCVEY et al, 2016). De todo modo, a presença do fungo no extrato córneo deixa o hospedeiro exposto a diversos componentes químicos, alergênicos e imunogênicos, como enzimas e metabólitos. As interações com outros microrganismos comensais também pode influenciar na virulência, especialmente bactérias do gênero *Staphylococcus* spp., as quais acabam exacerbando os sinais clínicos e, nesses casos, torna-se necessária uma avaliação de terapia antimicrobiana concomitante (BOND et al., 2020).

2.1.3 Patogenia e sinais clínicos

Frequentemente, em cães e gatos, a dermatite por *Malassezia* ocorre ao mesmo tempo que outras doenças as quais acabam alterando a função imune da pele ou o seu microclima (BOND et al., 2020). Principalmente em cães, as endocrinopatias, os defeitos de cornificação e as alterações de hipersensibilidade (dermatite atópica) são importantes fatores que também devem ser diagnosticados e tratados (BOND et al., 1996).

Identificam-se como sinais clínicos comuns da dermatite por *Malassezia* pele eritematosa com presença de prurido, hiperpigmentação, liqueinificação, odor fétido,

excesso de gordura e otite. Na otite, em geral, a secreção não é purulenta, e sim ceruminosa (GUILLOT e BOND, 2020), como se observa nas Figuras 3 e 4 a seguir:



Figura 3: Otite ceruminosa em cão, causada por *M. pachydermatis*. Fonte: Peano et al., 2020



Figura 4: Lesões inflamatórias hiperpigmentadas em um cão com dermatite por *Malassezia pachydermatis*, secundária a uma infestação de ácaros *Demodex* sp. Fonte: Peano et al., 2020

2.1.4 Diagnóstico

O principal método diagnóstico da Malasseziose é o exame direto. Em animais saudáveis, a quantidade de leveduras tanto na pele quanto no conduto auditivo externo é baixa para ser detectada no exame direto, assim, quando há o aumento e a detecção, é compreensível que a levedura possa estar associada à desordem otológica ou

dermatológica. Salvo em cães que apresentam distúrbio de hipersensibilidade, situação em que é possível encontrar as leveduras em todo o corpo do animal.

Para os casos de otite externa, o material é facilmente colhido com auxílio de swabs, e, em seguida, é feito o “rolamento” em uma lâmina de vidro, seco no ar e corado com Giemsa (MCVEY *et al.*, 2016). Para outras áreas do corpo, pode ser utilizada a técnica da fita adesiva, que consiste em aplicar com firmeza um pequeno fragmento da fita na área lesionada escolhida e remover com gentileza. A técnica deve ser repetida por três vezes no mesmo local. A amostra, então, é corada também com Giemsa, seca e colocada numa lâmina de vidro (MAYNARD *et al.*, 2011). Ao microscópio, as lâminas são avaliadas, e leveduras com característica morfológica de “pegada” são evidenciadas.

Técnicas moleculares, como o PCR (reação em cadeia de polimerase), capaz de amplificar o DNA, também podem ser utilizadas, no entanto não fazem parte da rotina diagnóstica veterinária (MCVEY *et al.*, 2016).

2.1.5 Tratamento

O tratamento é frequentemente realizado a partir de medicamentos antifúngicos derivados de compostos azólicos, tópicos e sistêmicos. Contudo, o tratamento da doença de base e de infecções secundárias causadas por agentes bacterianos constitui-se como essencial (MCVEY *et al.*, 2016). As leveduras do gênero *Malassezia* spp., inclusive a *M. pachydermatis*, mostram-se susceptíveis à maioria dos compostos azólicos usados, como o itraconazol, miconazol e cetoconazol, sendo variável a eficácia do fluconazol (BRILHANTE *et al.*, 2018; CAFARCHIA *et al.*, 2012). Entretanto, já foram relatados casos de falha no tratamento contra dermatites e otites causadas por *M. pachydermatis*, associadas a aumento de tolerância *in vitro* dessas cepas aos componentes azólicos (ANGILERI *et al.*, 2019; KANO *et al.*, 2019), sendo a exposição por longos períodos a esses antifúngicos um fator importante na seleção da resistência. Foi sugerido, ainda, que um mesmo animal pode ser colonizado por cepas de *M. pachydermatis* com distintos perfis de susceptibilidade aos antifúngicos (ANGILERE *et al.*, 2019). A partir de estudos genômicos, a diminuição da susceptibilidade aos antifúngicos azólicos foi relacionada a qualquer mutação do gene ERG11, (KANO *et al.*, 2019) ou à quadruplicação dele (KIM *et al.*, 2018). Esse gene é

responsável pela codificação da molécula alvo para os antifúngicos azólicos, a lanosterol 14-alfa-desmetilase (KANO *et al.*, 2019).

2.1.6 Resistência antifúngica

Vários achados apontam para a capacidade de *M. pachydermatis* desenvolver resistência, incluindo falha no tratamento, redução de atividade antifúngica observada em cepas isoladas de animais intensamente expostos a drogas antifúngicas e *in vitro* e a descrição de mecanismos de resistência fúngica (PEANO *et al.*, 2020).

Além do mais, Concová e colaboradores (2022) relatam que a levedura possui a capacidade de produção de biofilme e apontam como tendo relevante associação na diminuição da susceptibilidade aos antifúngicos. Os estudiosos observaram que as células livres foram mais susceptíveis aos antifúngicos utilizados do que as células aderidas e o biofilme maduro.

É necessária bastante prudência na utilização dos antifúngicos disponíveis para que possam continuar sendo utilizados com eficácia (GUILLOT e BOND, 2020).

O aparecimento de cepas de menor susceptibilidade aos azóis tem aumentado o interesse em agentes antifúngicos alternativos, como óleos essenciais, que são misturas heterogêneas e muito concentradas de óleos aromáticos, extraídos de plantas por hidrodifusão, pressão ou destilação a vapor (BISMARCK *et al.*, 2019; MANION e WIDDER, 2017).

2.2. Complexo *Sporothrix schenckii*

2.2.1 Filogenia e características gerais

Sporothrix schenckii faz parte do Reino Fungi, eucarionte, heterotrófico, sem mobilidade própria, sua parede celular é rígida e contém quitina. Ele é integrante da Divisão Ascomycota, Classe Pyrenomycetes, Ordem Ophiostomatales e Família Ophiostomataceae (GUARRO *et al.*, 1999). É um fungo termodimórfico, saprófita, cosmopolita, amplamente distribuído em todo o mundo, em particular nas regiões tropicais e subtropicais, causador da micose zoonótica, conhecida como esporotricose (BARROS *et al.*, 2011). A esporotricose é uma micose subcutânea de caráter

subagudo ou crônico que pode acometer inúmeras espécies de mamíferos, incluindo os humanos (ANTUNES *et al.*, 2009).

A espécie *S. schenckii* foi conhecida como única causadora da esporotricose durante muito tempo, entretanto novas classificações filogenéticas mostram, até então, que existem seis espécies distintas de relevância epidemiológica e clínica que formam o Complexo *Sporothrix schenckii*, sendo elas o *S. schenckii strictu sensu*, *S. albicans* (*S. pallida*), *S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. luriei* e *S. mexicana* (CHAKRABARTI *et al.*, 2015; de BEER *et al.*, 2016; MARIMON *et al.*, 2008; OROFINO-COSTA *et al.*, 2017).

Apesar de relatadas no mundo inteiro, a ocorrência e a distribuição geográfica das espécies causadoras da esporotricose são distintas (CHAKRABARTI *et al.*, 2015). No Brasil, *S. brasiliensis* tem mostrado maior prevalência, além de ser a espécie mais virulenta do Complexo em razão de sua habilidade de invadir tecidos e levar o hospedeiro à morte (OROFINO-COSTA *et al.*, 2017; ROGRIGUES *et al.*, 2013; RODRIGUES *et al.*, 2014).

2.2.2 Características microbiológicas e fatores de virulência

O dimorfismo térmico é um notável ajuste morfológico quando se trata da capacidade de infectar os mamíferos. Os fungos dimórficos apresentam-se na forma micelial ou filamentosa, na natureza ou *in vitro* a 25°C, e como leveduras, forma infectante quando em contato com a temperatura do mamífero hospedeiro de 35-37°C ou *in vitro* (RODRIGUES *et al.*, 2016). Na sua forma micelial, apresenta-se como hifas finas e septadas, medindo de 2µm a 3µm, com conídios ovais ou em formato de lágrima, podendo estar isolados ou reunidos nas extremidades dos conidióforos e ao longo das hifas (MCVEY *et al.*, 2016). Macroscopicamente são colônias enrugadas a lisas, cremosas, inicialmente esbranquiçadas, tornando-se marrons ou pretas com o passar dos dias (BARROS *et al.*, 2011). Já na forma de levedura (Figura 5), o patógeno se revela como células alongadas com brotamentos, lembrando o formato de um “charuto”, contudo também podem ser mais arredondadas, medindo até 10µm (MCVEY *et al.*, 2016). Na observação macroscópica, apresenta textura lisa e coloração creme (BARROS *et al.*, 2011)

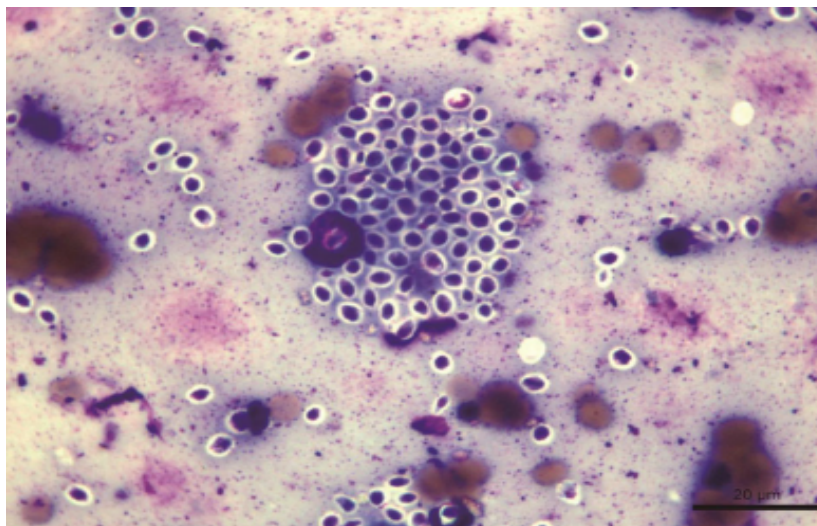


Figura 5: Citologia por imprint de úlcera de pele felino, mostrando várias estruturas semelhantes a leveduras de *S. schenckii* em forma de charuto, ovais ou redondas, em meio extracelular e dentro de macrófagos. Corado com panótico, 100x. Fonte: Silva et al., 2015

S. schenckii apresenta, em sua parede celular, componentes que podem colaborar para a sua virulência. Um deles, também considerado fator de grande importância, é a capacidade de produzir melanina. Três diferentes tipos de melaninas já foram relatados, são eles: DHN-melanina, a eumelanina e a piomelanina. A DHN-melanina é o principal pigmento produzido, pois esse processo se dá a partir do acetil-coA, proveniente da glicólise. Em contrapartida, a eumelanina e a piomelanina somente são produzidas se a L-DOPA e a L-tirosina, respectivamente, estiverem disponíveis durante o crescimento do fungo (ALMEIDA-PAES *et al.*, 2009; ALMEIDA-PAES *et al.*, 2015). A produção desses tipos de melanina é considerada um fator de resistência dos fungos patogênicos contra antifúngicos, como anfotericina B, itraconazol e terbinafina, além de induzirem a fuga deles frente às defesas dos hospedeiros (ALMEIDA-PAES *et al.*, 2015; OROFINO-COSTA *et al.*, 2017). Uma colônia produtora de melanina está evidenciada na Figura 6. Outros possíveis fatores de virulência são adesinas, proteinases, peróxido de ergosterol e enzimas (BARROS *et al.*, 2011).



Figura 6: Morfologia macroscópica de uma colônia pigmentada e escura de *Sporothrix brasiliensis* devido à produção de melanina. Cultura em ágar Sabouraud Dextrose. Fonte: Arquivo pessoal.

2.2.3 Epidemiologia

Amplamente distribuída pelo mundo, a esporotricose apresenta maior ocorrência em regiões tropicais e subtropicais, sendo considerada uma doença endêmica em várias partes da China, Japão, África do Sul, Índia e América Latina (BARROS *et al.*, 2011). Ao longo das décadas, surtos de dimensões variadas foram relatados, sendo, em sua maioria, relacionados a atividades profissionais ou ocupacionais ligadas à jardinagem, ao trabalho florestal ou ainda à manipulação de madeira contaminada (CHACKRABARTI *et al.*, 2015). Entretanto, a partir de 1997, o Brasil passou a relatar inúmeros casos de esporotricose relacionada à transmissão por arranhadura ou mordedura felinas. O Rio de Janeiro desde então é classificado como área hiperendêmica dessa zoonose (GREMIÃO *et al.*, 2017).

Entre os anos de 2017 e 2018, foi realizado um estudo por De Almeida e colaboradores (2019), com parceria da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) e da Faculdade de Medicina de Campos (FMC) pelo período de um ano, em Campos dos Goytacazes-RJ. Nele, foram avaliadas 22 amostras oriundas de pacientes humanos que apresentavam lesões suspeitas e que foram encaminhados ao dermatologista. Em sua maioria, os indivíduos eram tutores de animais previamente atendidos no Hospital Veterinário da UENF, que apresentavam lesões de difícil cicatrização e compatíveis com esporotricose. Após análise de

citologia, cultura micológica e demonstração do dimorfismo térmico do *Sporothrix* spp., todos os 22 indivíduos, sendo 14 mulheres e 8 homens com idades variando de 2 a 78 anos, foram diagnosticados como positivos para esporotricose. As lesões eram localizadas principalmente em membros superiores e nas mãos, e a maioria dos indivíduos teve contato com animais de estimação doentes. Sendo assim, a frequência de diagnósticos da doença passa a ser preocupação das autoridades de saúde pública.

Segundo a Nota Técnica 60/2023-CGZV/DEDT/SVSA/MS (0033634745), a esporotricose não é uma doença de notificação compulsória em todo o Brasil, entretanto o Ministério da Saúde orienta que os casos suspeitos e confirmados sejam notificados e investigados para correto delineamento das ações. O Ministério orienta, ainda, sobre manejo dos animais doentes, medidas de prevenção e controle e medidas direcionadas aos profissionais de saúde e à população geral.

2.2.4 Transmissão e manifestações clínicas

A infecção por esporotricose em si se dá pela implantação traumática do *Sporothrix* spp. na derme, ou ainda por via inalatória. Em geral, no Brasil, a transmissão para humanos ocorre de duas maneiras diferentes: uma quando existe diretamente o contato com plantas, solo ou matéria orgânica contaminada com o fungo; a outra, na qual os gatos atuam fortemente, é forma zoonótica de transmissão e ocorre através de arranhaduras, mordeduras ou exsudato de lesões. A transmissão horizontal, ou seja, entre os gatos, também ocorre amplamente e é um agravante quanto à necessidade de estipular táticas para o controle da epidemia. Dessa forma, tornam-se necessárias várias estratégias, como o tratamento de gatos infectados, a castração de animais errantes, a adoção de políticas de conscientização das comunidades quanto às responsabilidades da posse de animais, assim como a divulgação de informações quanto à transmissão da esporotricose (OROFINO-COSTA *et al.*, 2017).

Nos felinos, seguida da inoculação do agente etiológico, a infecção pode ficar localizada ou se propagar pelos vasos linfáticos próximos, causando linfangite e linfadenite, levando ao surgimento de lesões nodulares, ulcerativas e crostosas, principalmente em região de face e membros. Casos disseminados são mais raros, mas podem ocorrer em animais imunocomprometidos e afetam especialmente

pulmões e fígado. Ainda nos felinos, classifica-se clinicamente a esporotricose como forma cutânea, linfocutânea ou disseminada. Sinais clínicos sistêmicos inespecíficos podem ocorrer, como prostração, anorexia e febre. Espirros são comuns quando há acometimento de mucosa nasal (LLORET *et al.*, 2013), além de serem sinal precoce da doença e de demonstrarem maior chance de diagnóstico positivo quando concomitantes a lesões suspeitas (MACÊDO-SALES *et al.*, 2018). A autoinoculação nessa espécie pode acarretar a disseminação da doença, tendo em vista que o ato de se coçar ou lambe pode carrear e introduzir o agente etiológico em unhas e cavidade oral (SCHUBACH *et al.*, 2001).

As lesões exsudativas dos gatos podem ser particularmente contagiosas pela grande quantidade de microrganismos presentes nas secreções. Além disso, o fungo pode ser encontrado tanto nas unhas de gatos infectados como sadios, sendo esses últimos portadores (MCVEY *et al.*, 2016). Contudo, estudo realizado por Macêdo-Sales e colaboradores (2018) não encontrou leveduras nas unhas de 175 felinos saudáveis que viviam em áreas endêmicas do Rio de Janeiro, mesmo que a maior parte dos animais tenha tido contato anterior com plantas e solo. Desses animais, apenas um gato que convivia e compartilhava fômites com outros já diagnosticados, apresentava o fungo na cavidade oral. Casos de esporotricose felina estão exemplificados na Figura 7.



Figura 7: Esporotricose felina. (a) Lesões crostosas e ulcerativas em face, (b) múltiplas lesões ulcerativas em membro torácico (Lloret *et al.*, 2013), (c) lesão ulcerada e exsudativa localizada em região nasal, (d) lesões nodulares causando deformação de face (Gremião *et al.* 2015)

Em humanos e cães a forma disseminada é tida incomum, ficando as lesões restritas ao tecido subcutâneo e à pele e usualmente sendo classificadas clinicamente como formas cutânea e extracutânea (SCHUBACH *et al.*, 2015). No entanto, com o surgimento de manifestações clínicas variadas e incomuns em humanos, como infecção sistêmica pulmonar primária devido à inalação de propágulos de *Sporothrix* (OROFINO-COSTA *et al.*, 2013), passou-se a classificar as formas clínicas da esporotricose como cutânea fixa, extracutânea, linfocutânea e disseminada (LOPES-BEZERRA *et al.*, 2006). As formas linfocutânea e cutânea fixa estão exemplificadas na Figura 8. Orofino-Costa e colaboradores (2017) ainda propõem uma atualização na classificação, baseada no local das lesões.



Figura 8: Diferentes apresentações clínicas de esporotricose em humanos. (a) esporotricose linfocutânea, (b) esporotricose cutânea fixa. Fonte: Chakrabarti *et al.*, 2015

A forma disseminada e de maior gravidade em humanos está intimamente ligada a situações de imunocomprometimento, como indivíduos soropositivos para HIV, podendo ocorrer lesões ósseas, em mucosas e ainda no baço e nos pulmões, com a possibilidade de progredir para sepse e óbito (FREITAS *et al.*, 2012; OROFINO-COSTA *et al.*, 2013).

2.2.5 Diagnóstico de esporotricose

O diagnóstico da micose é realizado a partir de histórico, anamnese, exame físico, além de exames laboratoriais, como citopatologia, histopatologia e especialmente cultura micológica. Outros métodos como reação em cadeia de polimerase (PCR), testes intradérmicos e provas sorológicas também podem ser

utilizados, apesar de serem menos comuns e, em geral, utilizados em pesquisas (LARSSON, 2011).

A citologia, ou exame direto, consiste na obtenção de esfregaços em lâminas de vidro do material das feridas ulceradas, exsudato ou ainda aspiração de nódulos por agulha fina, que, em seguida, são secos no ar e corados com coloração de Gram ou Panótico rápido (PEREIRA *et al.*, 2011; TRABULSI e ALTERTHUM, 2015). A lâmina segue para análise em microscopia óptica para que, com objetiva de 100x, seja possível observar as leveduras. Especialmente nos felinos, o exsudato das lesões na análise microscópica habitualmente demonstra numerosas formas arredondadas ou ovais semelhantes a “charutos”, podendo estar ou não no interior de neutrófilos e macrófagos. O exame citopatológico se mostra simples de ser realizado, de baixo custo e com resultados rápidos (SILVA *et al.*, 2015). Apesar disso, humanos e outras espécies animais não apresentam o número de leveduras abundantes nas lesões, sendo necessários outros métodos (LACAZ *et al.*, 2002).

Atualmente, o padrão ouro para diagnóstico do agente etiológico da esporotricose é a cultura micológica (TRABULSI e ALTERTHUM, 2015; OROFINO-COSTA *et al.*, 2017). O material biológico para cultura pode ser coletado diretamente de lesões ulceradas, pus, ou ainda sangue, escarro, líquido sinovial e líquido cefalorraquidiano (KAUFFMAN *et al.*, 2007). A técnica é realizada em duas temperaturas diferentes para que o dimorfismo térmico do agente seja evidenciado (CRUZ, 2013). Inicialmente, para o isolamento da forma filamentosa a 25°C, a amostra é inoculada em ágar Sabourad dextrose acrescido de cloranfenicol e cicloheximida para inibição de crescimento bacteriano indesejado. Num período de 4 a 6 dias, a colônia é enrugada, esbranquiçada, podendo escurecer com o passar do tempo e adquirir coloração negra. Na microscopia óptica, são evidenciadas hifas hialinas septadas, medindo de 1 a 2µm de diâmetro, e conidióforos com conídios elípticos, que formam estrutura que remete a “buquê de flores” (LARSSON, 2011; OROFINO-COSTA *et al.*, 2017; TRABULSI e ALTERTHUM, 2015). Na segunda etapa, o material pode ser cultivado no ágar YPD ou BHI (infusão cérebro coração) a 37°C. As colônias têm consistência cremosa, superfície lisa e esbranquiçada, escurecendo a partir do centro. As células podem ser ovoides, globosas e alongadas, de tamanho variado entre 2,5-5µm por 3,5-6,5µm e com forma característica semelhante a “charuto”. Algumas colônias, dependendo da cepa e da espécie, podem ser escuras desde o início do crescimento, sendo a pigmentação escura ligada à produção de melanina,

importante fator de virulência de espécies do complexo *Sporothrix schenckii* (OROFINO-COSTA *et al.*, 2017).

A conversão da fase filamentosa para fase de levedura é fundamental para diferenciar fungos do complexo *Sporothrix schenckii* de outros fungos saprófitas (TRABULSI e ALTERTHUM, 2015).

O exame histopatológico pode ser utilizado em lesões nodulares íntegras, sendo coletado a partir de biópsia e submetido à coloração pela hematoxilina-eosina ou pelo ácido Periódico de Schiff (PAS), procedimento no qual são observadas células fúngicas leveduriformes ovaladas, arredondadas dentro de macrófagos ou livres. O padrão histológico revela inflamação piogranulomatosa difusa, acometendo derme e tecido subcutâneo (CROTHERS *et al.*, 2009). Contudo, a sensibilidade da histopatologia para detecção do agente fúngico é baixa, por apresentar escassez desses agentes nas lesões, com exceção da espécie felina (OROFINO-COSTA *et al.*, 2017).

O método de ensaio imunoenzimático (ELISA) detecta anticorpos da parede celular do *Sporothrix* spp. no soro de indivíduos infectados. Nos felinos, esse método apresenta alta especificidade e sensibilidade de diagnóstico (FERNANDES *et al.*, 2010) e auxilia principalmente na detecção de formas atípicas da doença, além de ser útil na triagem, no acompanhamento e na percepção da evolução de pacientes em tratamento, contribuindo especialmente para a monitorização da resposta terapêutica (OROFINO-COSTA *et al.*, 2017). Baptista e colaboradores (2020) apresentam resultados favoráveis quanto à utilização do anticorpo anti-SsCBF (*Sporothrix schenckii* ConA Binding Fraction) pelo método ELISA, tanto no diagnóstico de esporotricose em gatos, como também no acompanhamento do tratamento, dado que foi possível apontar uma boa relação entre a titulação de anticorpos anti-SsCBF e os resultados clínicos observados aos tratamentos escolhidos. Durante o estudo, não foi possível constatar uma medida para a cura clínica. Segundo Fernandes e colaboradores (2010), essa técnica é rápida, barata e de fácil realização, contudo ainda não foi estabelecida sua aplicação na rotina.

Para identificação molecular, a reação em cadeia de polimerase (PCR) amplifica regiões específicas e identificam genes codificadores de proteínas como a calmodulina (CAL), podendo definir a espécie patogênica a partir de amostras clínicas e de cultura. É um método com alta especificidade e sensibilidade, além de ser

descomplicado e de apresentar um alto rendimento, é a única forma de diferenciar as espécies (RODRIGUES *et al.*, 2015).

2.2.6 Tratamento

Alguns fatores importantes determinam a escolha do tratamento da esporotricose, como a espécie do agente etiológico, as condições gerais de saúde e o sistema imunológico do paciente, além da forma clínica da doença.

No Brasil, atualmente, existe um número bastante limitado de antifúngicos disponíveis e eficazes no tratamento dessa doença, são eles: itraconazol, iodeto de potássio, terbinafina e anfotericina B, sendo os três primeiros administrados por via oral, e o último, por via endovenosa (OROFINO-COSTA *et al.*, 2017).

O itraconazol é um derivado azólico e atua inibindo a síntese de ergosterol, lipídio essencial constituinte da membrana (SONG *et al.*, 2010). Tem sido a droga de escolha tanto na medicina humana, quanto na medicina veterinária, em função de sua eficácia somada à segurança e à facilidade de administração (KAUFFMAN *et al.*, 2007). Em humanos, o itraconazol pode ser utilizado por pacientes com bom estado geral de saúde, com lesões localizadas e em imunossuprimidos, entretanto a indicação não ocorre para a forma disseminada. A dose varia de 100-400mg/dia, em doses contínuas ou pulsadas (SONG *et al.*, 2010). Em geral, os efeitos colaterais são toleráveis, mas sua utilização deve ser feita com acompanhamento preciso, pois é hepatotóxico, teratogênico e interações medicamentosas podem ocorrer.

O iodeto de potássio (KI) não tem mecanismo de ação plenamente compreendido, ainda que a atuação sobre a resposta imune e fagocítica contra o *Sporothrix* spp. seja conhecida (XUE *et al.*, 2009). Em humanos, é indicado para indivíduos imunocompetentes com lesões localizadas e é contraindicado especialmente para pacientes gestantes, com insuficiência renal, ou ainda que apresentem disfunção de tireoide ou alergia a iodo (OROFINO-COSTA *et al.*, 2013).

A terbinafina, derivado de alilamina, também atua inibindo a síntese de ergosterol na membrana, e se apresenta como opção quando o itraconazol e o iodeto de potássio não podem ser administrados (ANTUNES *et al.*, 2009). Exibe menos interações medicamentosas e pode ser utilizada em pacientes com diversas comorbidades associadas. Dor de cabeça, náuseas e alteração do paladar são alguns efeitos colaterais comuns em humanos (KAUFFMAN *et al.*, 2007).

Nos casos graves e com risco de óbito, a anfotericina B é indicada. Age alterando a permeabilidade da membrana celular por se ligar ao ergosterol. Pode ser utilizada por mulheres grávidas com a forma grave da doença, podendo causar alterações metabólicas, mas não teratogênicas. É nefrotóxica e cardiopática (COSTA *et al.*, 2011).

Para os felinos, a medicação de escolha é o itraconazol, e a dose indicada é de 5-10mg/kg. É um medicamento hepatotóxico para essa espécie, e o tratamento requer exames laboratoriais de bioquímica hepática com frequência. A duração do tratamento vai depender da resposta do animal, e a administração deve ser mantida por um mês após a cura clínica (PEREIRA *et al.*, 2009).

O iodeto de potássio é visto como o mais indicado para tratar cães (PEREIRA *et al.*, 2009). Em felinos, costuma ser utilizado em conjunto com o itraconazol ou em outras associações em casos refratários (REIS *et al.*, 2012; SCHUBACH *et al.*, 2004). Além da possibilidade de os felinos não responderem bem ao KI, são uma espécie muito sensível a esse composto, podendo desenvolver alterações clínicas, como depressão, anorexia, vômito, diarreia, espasmos musculares, hipotermia ou hipertermia, hiperexcitabilidade, cardiopatia – sinais clínicos mais comuns do iodismo em gatos (NOBRE *et al.*, 2002).

Apesar do potencial terapêutico da terbinafina para tratar esporotricose humana, a eficácia e os efeitos colaterais não são bem estabelecidos na utilização em animais (PEREIRA *et al.*, 2009). Schubach e colaboradores (2004) relataram sucesso na utilização de terbinafina oral, 30mg a cada 24 horas, para tratamento da doença em felinos, enquanto Antunes e colaboradores (2009) não obtiveram resultados satisfatórios com o uso desse composto nas doses de 20 e 30mg/kg em ratos.

Anfotericina B pode ser alternativa em casos de felinos refratários, sendo as doses ainda variadas na literatura. Além de diversos efeitos colaterais, como disfunção renal, anemia, hepatopatia, também apresenta maior dificuldade na administração, que é endovenosa e recorrente por semanas (PEREIRA *et al.*, 2019). Gremião *et al.* (2011) propõe tratamento combinado de Anfotericina B interlesional em lesões nasais refratárias ao itraconazol, em que 84,6% dos gatos apresentaram remissão dos sinais clínicos e, destes, 72,7% alcançaram a cura clínica.

2.2.7 *S. schenckii* resistente a antifúngicos

Recentemente têm sido relatados vários casos de diminuição da susceptibilidade de cepas do Complexo *Sporothrix schenckii* aos antifúngicos comumente utilizados no tratamento da esporotricose humana e animal. Fatores como capacidade de produção de melanina, baixa diversidade genética e mutações do citocromo P450 são apontados para o desenvolvimento de mecanismos de resistência. (GOMPERTZ *et al.*, 2016).

Foram relatados em humanos casos nos quais houve falha no tratamento, com itraconazol, da esporotricose causada por *S. globosa* (GOMPERTZ *et al.*, 2016) e *S. schenckii strictu sensu* (VETTORATO *et al.*, 2017). Em ambas as situações, foi observado aumento dos valores da concentração inibitória mínima (CIM) de antifúngicos tradicionais, assim como em relatos da doença refratária em felinos, nos quais houve necessidade de administrar outros antifúngicos ao tratamento (GREMIÃO *et al.*, 2011; ROCHA *et al.*, 2018). Guterres e colaboradores (2014) observaram adicionalmente a resistência ao itraconazol em cão, em que um imunomodulador ((1-3) β -glucano) foi utilizado como adjuvante ao tratamento.

Visto isso, outras terapias e substâncias com potencial antifúngico devem ser investigadas para complementar o tratamento e, assim, auxiliar em casos refratários os medicamentos sistêmicos convencionais (GREMIÃO *et al.*, 2011).

2.3. Peptídeos antimicrobianos

Os peptídeos antimicrobianos (AMPs) são moléculas produzidas por todos os organismos multicelulares, tanto vegetais como animais. São pequenos, compostos por 12 a 50 aminoácidos, geralmente anfipáticos e possuem caráter catiônico. Apresentam resíduos de cisteína, tendendo a formar pontes dissulfeto, o que os torna estáveis e resistentes. Essas moléculas fazem parte da imunidade inata dos hospedeiros e conferem uma proteção natural contra os microrganismos patógenos do ambiente, como fungos, bactérias, leveduras, vírus, entre outros (PINHEIRO DA SILVA, 2012).

Na maior parte dos casos, são pequenas cadeias de peptídeos sintetizadas por ribossomos, que, a partir de alterações e clivagem de proteínas precursoras, dão

origem aos polipeptídeos maduros. Alguns AMPs podem ser originados de sintetizadores de peptídeos não ribossômicos (TYAGI *et al.*, 2019).

De ocorrência natural, podem atuar influenciando as respostas imunes do hospedeiro e/ou no combate direto das infecções devido a suas propriedades microbicidas (MOOKHERJEE *et al.*, 2020).

O mecanismo de ação se dá pela interação dessas moléculas com a membrana celular dos microrganismos, causando a permeabilização ou ruptura desta. Além disso, os peptídeos antimicrobianos podem ainda inibir a síntese de DNA, RNA e proteínas, interrompendo ou controlando o crescimento dos potenciais patógenos (CAMPOS *et al.*, 2018a).

As plantas sofrem constantemente situações de estresse ambiental, provenientes de fatores bióticos e abióticos que podem levar a diversas adaptações com o objetivo de manter a estabilidade do próprio organismo (KULAEVA *et al.*, 2020). A produção de peptídeos antimicrobianos mostra-se como um notável artifício de proteção e combate a ameaças, conferindo resistência direta e prolongada contra inúmeros patógenos e pragas (CAMPOS *et al.* 2018b), além da proteção contra fatores abióticos, como alterações de temperatura, de salinidade, seca e na presença de metais pesados. Assim, quando o estresse é reconhecido por receptores específicos, resulta em modificação de transcrição e síntese dos peptídeos antimicrobianos, os quais irão proteger ou remediar os danos causados nas células vegetais (KULAEVA *et al.*, 2020).

Classificados de acordo com sua estrutura e com seu mecanismo de ação, os peptídeos antimicrobianos de plantas se dividem em cinco grupos principais: defensinas, tioninas, proteínas transportadoras de lipídeos (LTPs) e ciclotídeos que apresentam estrutura circular. De forma geral, apresentam grande atividade inibitória no desenvolvimento de fungos, bactérias, vírus, protozoários, insetos, entre outros (MOOKHERJEE *et al.*, 2020; ZASLOFF, 2019).

Visto isso, o desenvolvimento de fármacos a partir de AMPs pode ser promissor, como alternativa à terapêutica convencional. Além de suas características como atividade de amplo espectro, mecanismo de ação diferenciado e capacidade de evitar os mecanismos de desenvolvimento de resistência microbiana, tais fármacos ainda demonstram como vantagens serem pouco ou nada tóxico para células animais e serem encontrados em todos os organismos multicelulares (LEI *et al.*, 2019).

2.4. Plantas de interesse microbiológico

2.4.1 Gênero *Capsicum*

Pertencentes à família *Solanaceae*, as plantas do gênero *Capsicum* são popularmente conhecidas como pimentas e pimentões. De notável relevância econômica e comercial, são habitualmente utilizadas no setor alimentício, medicinal e ornamental (MOSCONE *et al.*, 2007). Duas variações de pimentas do gênero *Capsicum* estão exemplificadas na Figura 9.



Figura 9: Pimentas do gênero *Capsicum annuum*. (a) Pimenta-doce (CARVALHO *et al.*, 2006), (b) Pimenta jalapeño (RIBEIRO *et al.*, 2008).

No Brasil, os estados de Minas Gerais, Bahia e Goiás são os principais produtores de pimentas. Três espécies do gênero *Capsicum* são bastante difundidas e contêm frutos com pungência elevada, o *C. annuum*, *C. frutescens* e o *C. chinense*. Compostos capsaicinóides são responsáveis por atribuir a pungência aos frutos e são encontrados em quantidades diferentes dependendo da variedade da pimenta (AL OTHMAN *et al.*, 2011).

A partir de suas propriedades biológicas, a pimenta é relatada como um alimento funcional, auxiliando na prevenção e tratamento de diversas doenças, como diabetes, câncer, alterações cardiovasculares, gastrointestinais, entre outras (ALVAREZ-PARRILLA *et al.*, 2011). Partindo dessas observações, o gênero *Capsicum* tem ficado em foco em pesquisas científicas, por conter peptídeos antimicrobianos com potencial de subjugar a resistência microbiana (LI *et al.*, 2012).

2.4.2 *Clitoria fairchildiana* R. Howard

O gênero *Clitoria*, da família *Fabaceae*, apresenta um porte arbóreo com tamanho variado de médio a grande, copa frondosa e flores violetas em cachos. *C. fairchildiana* é uma espécie rústica, de crescimento rápido e popularmente conhecida como “sombreiro” (COSTA *et al.*, 2014), como se observa na Figura 10. Sua ocorrência se dá principalmente em regiões tropicais. No Brasil, é bastante utilizada como ornamentação na região Sudeste (SILVA *et al.*, 1998).



Figura 10: (a) “Sombreiro” ou *C. fairchildiana*, apresenta médio ou grande porte e copa frondosa, (b) flores violáceas em ráceros pêndulos. Fonte: ÁRVORES DA UENF- <https://uenf.br/projetos/arvoresdauenf/especie-2/sombreiro-de-minas/>.

Outras espécies do gênero *Clitoria*, como a *C. macrophylla* e a *C. ternatea*, são utilizadas respectivamente na Tailândia e África com fins farmacológicos, para tratar doenças de pele, dores de garganta e infecções pulmonares (PEREIRA DA SILVA e PARENTE, 2002). Como já descrito, *C. fairchildiana* apresenta compostos flavonóides e retinóides com atividade anti-inflamatória e antinociceptiva, e não demonstra citotoxicidade para humanos (LEITE *et al.*, 2012). Em outro estudo, foi avaliada a atividade antifúngica de lectinas de *C. fairchildiana*, em que esta apresentou resultados favoráveis quanto a sua capacidade de causar a morte dos patógenos pesquisados. A partir disso, *C. fairchildiana* torna-se provável na busca por novos compostos com capacidade de atuação antifúngica (KLAFKE *et al.*, 2013).

2.4.3 *Phaseolus vulgaris* L.

P. vulgaris, popularmente conhecido como feijão carioca (Figura 11), é uma espécie de herbácea leguminosa pertencente à família Fabaceae. Relatada como uma das espécies mais cultivadas no mundo, é também a principal leguminosa utilizada na alimentação dos brasileiros, suprimindo em grande parte as necessidades diárias de proteína e micronutrientes. Além disso, o Brasil também é um dos maiores produtores mundiais desse alimento (FERREIRA *et al.*, 2002; MESQUITA *et al.*, 2007).



Figura 11: *Phaseolus vulgaris*, feijão carioca. Fonte: EMBRAPA.

Apresentam em sua constituição compostos fenólicos, os flavonoides, (AGUILERA *et al.*, 2011), que demonstram efeitos antioxidantes, como também estimula a ação do hormônio insulina, podendo auxiliar a manutenção anti-hiperglicêmica em indivíduos que possuem *Diabetes mellitus* (VENKATESWARAN e PARI, 2002). Além disso, são capazes de produzir defensinas com ação antifúngica (GAMES *et al.*, 2008).

3. JUSTIFICATIVA

As infecções fúngicas em animais de estimação são motivos comuns de procura ao auxílio médico veterinário. Somado a isso, o potencial zoonótico, endêmico e altamente virulento de algumas delas preocupa, tornando-se questão de saúde pública. Relatos crescentes de agentes micóticos resistentes aos antifúngicos convencionais justificam a necessidade de descoberta de novos compostos que possuem atividade antifúngica. Com isso, o estudo de novas moléculas com potencial farmacológico para combater as infecções causadas por *M. pachydermatis* e *Sporothrix* spp., ou para contribuir como alternativas terapêuticas mostra-se de grande interesse para os profissionais da área da saúde.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivos gerais

Pesquisar o potencial antifúngico de extratos ricos em peptídeos de folha e fruto de *C. annuum* e folha de *C. fairchildiana* e *P. vulgaris* frente à levedura *M. pachydermatis* e aos fungos *S. schenckii* ATCC 32285 e *S. brasiliensis*, como alternativa aos antifúngicos comerciais para tratamento da malasseziose e esporotricose.

4.2. Objetivos específicos

- Realizar antifungigrama de cepas de *M. pachydermatis* e definir perfil de susceptibilidade;
- Testar o efeito *in vitro* dos extratos de folha e fruto de *C. annuum*, e folha de *C. fairchildiana* e de *P. vulgaris* sobre os fungos patogênicos *M. pachydermatis*, *S. schenckii* (ATCC 32285) e *S. brasiliensis*;
- Avaliar o efeito *in vitro* da Terbinafina e da Anfotericina B sobre cepas de *M. pachydermatis*, *S. schenckii* (ATCC 32285) e *S. brasiliensis*;
- Avaliar a viabilidade celular de cepas de *M. pachydermatis* após tratamento com extratos vegetais;
- Observar a viabilidade de colônias e formação de melanina de cepas de *Sporothrix* spp. após tratamento com extratos vegetais;
- Avaliar a capacidade dos extratos vegetais de causar permeabilização de membranas celulares.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Microrganismos utilizados

Para os ensaios, foram utilizadas cinco cepas clínicas de *M. pachidermatis* (MP1, MP2, MP3, MP4 e MP5), uma cepa clínica de *S. brasiliensis* (S1) (Identificação molecular realizada pela Fiocruz-RJ) e uma cepa padrão (ATCC32285) de *S. schenckii* (S2).

As cepas clínicas foram obtidas de cães ou gatos atendidos no setor de Clínica Médica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário da UENF, ou ainda de cães ou gatos atendidos em clínicas veterinárias particulares do município de Campos dos Goytacazes-RJ. O isolamento foi realizado pelo Laboratório de Sanidade Animal CCTA/UENF. A cepa MP1 foi oriunda de um canino, fêmea, da raça American Bully, que já havia feito tratamento para otite com medicação à base do antifúngico miconazol. A cepa MP2 foi coletada de um canino, fêmea, SRD, que, segundo o tutor, nunca apresentou otite ou utilizou medicação para tal afecção. A cepa MP3, por sua vez, foi coletada de um canino, fêmea, Dálmata, que apresentava otites de repetição e já havia utilizado medicações otológicas a base de miconazol, cetoconazol, posaconazol e clotrimazol. Já as cepas MP4 e MP5 foram coletadas de caninos sem histórico clínico.

Amostras de secreção otológica foram coletadas com auxílio de swab estéril para isolamento das cepas de *M. pachidermatis*. Em seguida, o material foi inoculado em ágar Sabouraud Dextrose (KASVI) acrescido com cloranfenicol [50mg/ml] e cicloheximida [400mg/ml] e levado à estufa a 37°C durante 48 a 72 horas. Para visualização de colônias e suas características morfotintórias na microscopia óptica, as colônias foram coradas pelo método Gram (Laborclin).

A cepa de *S. schenckii*, ATCC 32285, foi gentilmente cedida pelo INCQS-Fiocruz, e a cepa clínica *S. brasiliensis* foi isolada pelo setor de micologia do LSA/CCTA/UENF, de um felino com lesões cutâneas da cidade de Macaé/RJ, e, posteriormente, identificada pelo INCQS-Fiocruz.

As cepas de *S. schenckii* e *S. brasiliensis* foram cultivadas em ágar Sabouraud dextrose a 4% (Himedia, Itália) à temperatura ambiente (25 a 30°C), por 10 dias, para o crescimento micelial do fungo. Após esse período, para se obter o dimorfismo e consequente crescimento leveduriforme das cepas, fragmentos dos respectivos

micélios foram semeados e cultivados em ágar Brain/Heart Infusion (BHA-Himedia, Itália) à temperatura de 37°C.

5.2. Extratos de plantas

Os extratos ricos em peptídeos utilizados nos ensaios microbiológicos foram gentilmente cedidos pela doutoranda Milena Bellei Cherene, responsável pelo cultivo de *P. vulgaris* L. (cv. Pérola) e de *C. annuum* L. var. *annuum* (cv. Carioquinha), bem como pela professora DSc Valdirene Moreira Gomes, ambas pertencentes ao Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos (LFBM/CBB/UENF). A extração seguiu a metodologia descrita por Cherene e colaboradores (2023).

As sementes de *P. vulgaris* L. (cv. Pérola) e de *C. annuum* L. var. *annuum* (cv. Carioquinha) foram cedidas pelo Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal (LMGV/CCTA/UENF). A semeadura foi realizada em espuma de poliestireno de 72 células com substrato comercial e mantida em câmara de crescimento na temperatura de 28°C e fotoperíodo de 12 horas. Quando as mudas chegaram a 10 centímetros de altura, foram transferidas para vasos de 5 litros e levadas à estufa. Após sessenta dias, as folhas foram cortadas e utilizadas para a produção dos extratos. Os frutos de *C. annuum* L. var. *annuum* (cv. Carioquinha) foram coletados quando apresentavam características de amadurecimento.

As folhas de *C. fairchildiana* R. Howard foram coletadas no *campus* da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF). A exsiccata do material vegetal foi depositada no Herbário Universitário sob o número de comprovante HUENF 9492.

Foram cedidos quatro extratos aquosos ricos em peptídeos, sendo eles e suas concentrações:

- Fruto de *Capsicum annuum* [4200µg/mL];
- Folha de *Capsicum annuum* [11140µg/mL];
- Folha de *Phaseolus vulgaris* [5580µg/mL];
- Folha de *Clitoria fairchildiana* [20060µg/mL].

5.3. Antifungigrama de *M. pachydermatis* utilizando antifúngicos convencionais

As cepas previamente isoladas e cultivadas foram testadas frente aos antifúngicos comerciais Anfotericina B, Itraconazol, Fluconazol, Econazol, Miconazol, Nistatina e Cetoconazol, pela técnica de disco difusão em ágar, a partir das instruções do fabricante. As informações retiradas da bula sobre os antifúngicos, como identificações, concentração, valores de referência de zona de inibição e interpretação, podem ser observados na Tabela 1, abaixo:

Antifúngicos	Símbolo	Conc./ Disco	Zona de inibição (mm)	Interpretação
Anfotericina B	AB	100mcg	>10 <10	Sensível Intermediário ou Resistente
Nistatina	NY	100 U.I.	>10 -- <10	Sensível -- Resistente
Econazol	EC	50 mcg	>20 20-10 <10	Sensível Intermediário Resistente
Miconazol	MCZ	50 mcg	>20 20-10 <10	Sensível Intermediário Resistente
Ketoconazol	KET	50 mcg	>20 20-10 <10	Sensível Intermediário Resistente
Fluconazol	FLU	25 mcg	>19 19-14 <14	Sensível Intermediário Resistente
Itraconazol	ICZ	10 mcg	≥20 19-12 ≤11	Sensível Intermediário Resistente

Tabela 1- Antifúngicos comerciais e suas informações. Fonte: CECON, 2008.

As colônias foram inoculadas em solução salina estéril (NaCl a 0,85%) e ajustadas quanto a sua concentração celular por mililitro, com auxílio da leitura no fotômetro (Densimat, bioMérieux), alcançando o valor de 0,5 na escala de McFarland, que corresponde a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Posteriormente, um swab estéril foi embebido na solução de inóculo e semeado em ágar Miller Hinton (KASVI). Após breve período de secagem, foram adicionados os discos de antifungigrama sobre a superfície do ágar. As placas foram incubadas em estufa a 37°C, por 48 horas, e, em seguida, os halos formados ao redor dos discos foram medidos com o auxílio de um paquímetro.

5.4. Ensaio de inibição de crescimento de *M. pachydermatis* por extratos vegetais pelo método de microdiluição

Para este ensaio, foram utilizados os quatro extratos de plantas ricos em peptídeos, cada um sobre as cinco cepas de *M. pachydermatis*, com a finalidade de avaliar a atividade dos peptídeos sobre o crescimento delas. Duas das cinco cepas, MP1 e MP2, ainda foram testadas frente a dois antifúngicos em sua forma líquida, a Terbinafina e Anfotericina B. Foram utilizadas microplacas de 96 poços, e todo o ensaio foi realizado em triplicata. O ensaio de inibição de crescimento seguiu a metodologia descrita por Gebara e colaboradores (2020), com algumas modificações.

Uma solução de inóculo foi preparada, adicionando as células fúngicas a uma solução salina para obtenção de densidade óptica de 0,5 na escala McFarland, aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Essa concentração celular por mililitro foi ajustada pela leitura no fotômetro (Densimat, bioMérieux). Em seguida, em um tubo estéril, contendo 10mL de caldo Sabouraud Dextrose, foi adicionado 1111 μ L da solução de inóculo anterior, resultando na solução de inóculo final que foi utilizada no ensaio.

Na microplaca de 96 poços, foi adicionado 100 μ L de caldo Sabouraud Dextrose (Acumedia) como controles negativos. Já os controles positivos foram alíquotas de 100 μ L da solução de inóculo final.

Em seguida, cada extrato foi adicionado a um poço em um volume específico, e cada poço foi preenchido com a solução de inóculo final até que o volume final da primeira fileira de poços antes da diluição fosse de 200 μ L.

- Extrato de fruto de *Capsicum annuum* [800 μ g/ml] → 38 μ L de extrato + 162 μ L de solução de inóculo final;
- Extrato de folha de *Capsicum annuum* [800 μ g/ml] → 14 μ L de extrato + 186 μ L de solução de inóculo final;
- Extrato de folha de *Phaseolus vulgaris* [800 μ g/ml] → 29 μ L de extrato + 171 μ L de solução de inóculo final;
- Extrato de folha de *Clitoria fairchildiana* [800 μ g/ml] → 8 μ L de extrato + 192 μ L de solução de inóculo final.

Ainda foram preenchidos poços com as mesmas frações de extrato descritas acima, somadas ao caldo Sabouraud Dextrose (Acumedia) até o volume final de 200 μ L. Esses poços são os controles do composto, chamados de “branco”.

Por fim, os poços de fileiras seguintes que permanecerem vazios foram preenchidos com alíquotas de 100µl de solução de inóculo final. Em seguida, realizou-se, então, a diluição até 10^{-5} , utilizando uma faixa de concentração de 800µg/ml a 50µg/ml e, no último poço, 100µl foi descartado.

Para o ensaio com as cepas MP1 e MP2, que também foram testadas frente aos antifúngicos Terbinafina e Anfotericina B, foram utilizadas duas microplacas de 96 poços, que seguiram a mesma técnica de preenchimento, sendo os volumes ajustados para a concentração desses produtos:

- Terbinafina [2µg/ml] → 4µl de extrato + 196µl de solução de inóculo final;
- Anfotericina B [2µg/ml] → 4µl de extrato + 196µl de solução de inóculo final.

Um desenho esquemático da distribuição dos componentes do ensaio na microplaca de 96 poços pode ser visto na Figura 12.

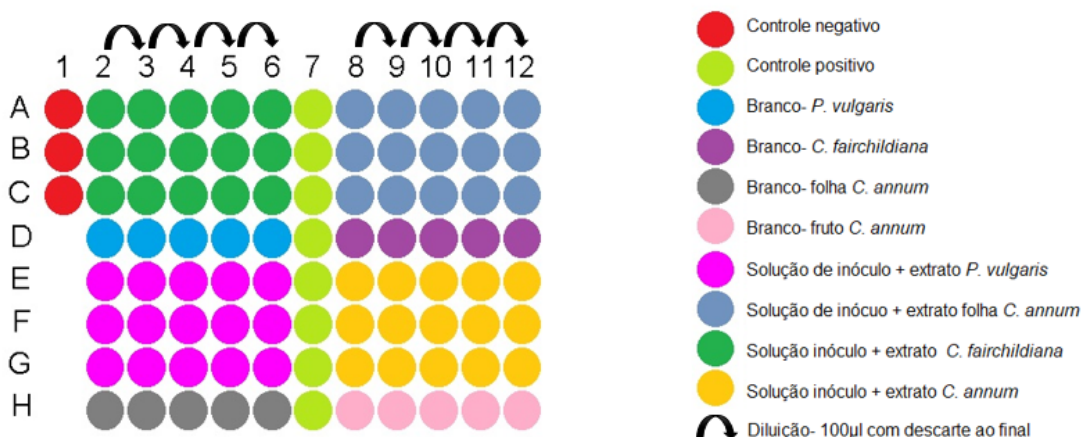


Figura 12: Desenho esquemático da distribuição dos componentes do ensaio na microplaca de 96 poços. Fonte: A autora.

A microplaca foi mantida em estufa por um período de 48 horas, e o crescimento fúngico, avaliado através da leitura a cada 24 horas pelo aparelho *Multiskan FC* (Thermo Scientific- Uniscience) num comprimento de onda de 620nm, conforme a metodologia adaptada de Broekaert *et al.* (1990).

Os dados referentes aos extratos e às concentrações de cada cepa foram analisados separadamente, utilizando o modelo fatorial duplo, submetidos à análise de variância e, quando significativo, foi realizado teste de Tukey ($p < 0,05$) em nível de

5% de significância. Os dados foram submetidos pelo programa estatístico R, utilizando o pacote “Expdes.pt”.

5.5. Análise da viabilidade celular de *M. pachydermatis*

Após os ensaios de inibição do crescimento, foi realizada a análise de viabilidade celular por diluição seriada, seguindo a metodologia de Vermelho *et al.* (2006) com algumas modificações, selecionando da microplaca um poço do controle positivo e outro poço referente a cada extrato. Os poços escolhidos foram os de menor valor de absorbância na leitura. Em tubos eppendorfs estéreis, adicionou-se 225µL de solução salina (NaCl 0,85%) e, no primeiro tubo (10^{-1}), 25µL de cada poço escolhido. Em seguida, foi realizada a diluição seriada, retirando 25µL do conteúdo do primeiro tubo eppendorf e passando para o seguinte, até alcançar a diluição de 10^{-10} . O conteúdo dos tubos, então, foi homogeneizado, e alíquotas de 25µL de cada, espalhadas em placas de Petri, contendo ágar Sabouraud Dextrose (KASVI), com auxílio de uma alça de Drigalsky. As placas foram cultivadas em estufa a 37°C por 48 horas, e, por fim, as unidades formadoras de colônia foram determinadas. Assumiu-se que o controle positivo representa 100% da viabilidade celular. A análise foi realizada em triplicata.

5.6. Ensaio de inibição do crescimento de *S. schenckii* e *S. brasiliensis* por extratos vegetais em meio líquido

Para este ensaio, foram utilizados os quatro extratos de plantas ricos em peptídeos, cedidos por colaboradores do LFBM-CBB, com a finalidade de avaliar a atividade dos peptídeos sobre o crescimento da cepa *S. schenckii* ATCC 32285 (S1) e clínica de *S. brasiliensis* (S2).

Uma solução de inóculo foi preparada adicionando a levedura crescida por 48 a 72 horas à solução salina e, então, realizada leitura pelo fotômetro (Densimat, bioMérieux) com leitura no feixe de 550nm até a densidade óptica ser ajustada a 0,5 na escala McFarland, que equivale a $1,5 \times 10^8$ UFC. Com auxílio de uma micropipeta, foi distribuído um volume de 2000µL de caldo RPMI-1640 em cubetas de vidro,

chamados de controle negativo. Já o controle positivo, foi composto de 1900µL de caldo RPMI-1640 e 100µL do inóculo. Para os tratamentos com os extratos vegetais na concentração de 800µg/mL, foi calculado o volume cada um (*P. vulgaris*- 287µL; *C. fairchildiana*- 80µL; *C. annuum* folha- 144µL; *C. annuum* fruto- 380µL), adicionado 100µL do inóculo e o restante para completar 2000µL de caldo RPMI-1640. Os antifúngicos líquidos Terbinafina e Anfotericina B também foram testados, nas concentrações de 1µg/ml e 2µg/ml respectivamente, adicionando-se então 20µL de Terbinafina e 40µL de AnfotericinaLB, separadamente, a 100µL do inóculo e mais o restante de caldo RPMI-1640 para completar 2000µL.

Foi ainda realizado o controle dos compostos, chamado de branco, adicionando os volumes dos compostos descritos acima com caldo RPMI-1640 até o volume final de 2000µL. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Após esses procedimentos, os tubos de vidro foram levados para incubação em estufa a 37°C, onde passaram por leitura de densidade óptica no tempo zero, imediatamente após o término do experimento, e a cada 24 horas, até 72 horas. Os cultivos foram, então, avaliados por fotometria, e a análise dos resultados baseou-se em curvas de crescimento (MATHIAS, L. S. *et al.* 2020; NCCLS- M27-A2, 2002).

5.7. Avaliação do crescimento de *S. schenckii* e *S. brasiliensis* em meio de cultura sólido e formação de melanina

Após 72 horas de incubação, o conteúdo de cada cubeta de vidro foi semeado em placas de Petri contendo ágar Sabouraud dextrose, com auxílio de swab estéril, para posterior observação do crescimento da colônia na sua forma filamentosa e formação do pigmento melanina (ALMEIDA-PAES, R. *et al.* 2016).

5.8. Ensaio de permeabilização da membrana plasmática

A permeabilização da membrana das leveduras *S. schenckii* (ATCC 32285), um isolado clínico de *S. brasiliensis*, e dois isolados clínicos de *M. pachydermatis*, tratados com 800µg/ml dos extratos vegetais, foi avaliada por microscopia de fluorescência pela captação do Sytox Green Nucleic Acid Stain. O ensaio foi realizado com o extrato

de *C. fairchildiana* e o antifúngico Terbinafina, que apresentaram melhores resultados de inibição. Após o ensaio de inibição do crescimento, alíquotas de 100µl de cada levedura nas diferentes condições de tratamento foram lavadas com PBS estéril, em seguida as células foram centrifugadas a 800 x g e ressuspensas em 100µl de PBS. Após a lavagem, 0,2 µM de Sytox Green foi adicionado a cada amostra e incubado por 15 min sob a proteção da luz. Após este período as células foram analisadas por DIC usando um microscópio óptico (Axioplan.A2, Zeis), equipado com um conjunto de filtro de fluorescência para detecção de fluoresceína (comprimentos de onda de excitação 450-490 nm; emissão 500 nm) (Thevissen *et al.*, 1999). Este experimento foi realizado no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos (LFBM/CBB/UENF), em colaboração com o Professor Gabriel Taveira.

6. RESULTADOS

6.1. Antifungigrama de *M. pachydermatis* utilizando antifúngicos convencionais

Após 48 horas de incubação em estufa a 37°C, os halos formados foram medidos com auxílio de um paquímetro e calculadas as médias das triplicatas. Todas as cepas se mostraram sensíveis aos antifúngicos Anfotericina B (AB), Itraconazol (ICZ), Fluconazol (FLU), Econazol (EC) e Nistatina (NY), enquanto a cepa MP1, demonstrou resistência intermediária aos antifúngicos Miconazol (MCZ) e Cetoconazol (KET), como pode ser observado na Tabela 2, abaixo:

<i>M. pachydermatis</i>	AB	ICZ	FLU	EC	MCZ	NY	KET
MP1	29,03 (S)	28,63 (S)	23,8 (S)	29,96 (S)	19,03 (I)	24,36 (S)	19,56 (I)
MP2	15,6 (S)	29,36 (S)	23,93 (S)	30,66 (S)	28,83 (S)	27,5 (S)	21,86 (S)
MP3	31,33 (S)	26,4 (S)	28,13 (S)	31,46 (S)	37,56 (S)	38,3 (S)	43,43 (S)
MP4	32,3 (S)	27,06 (S)	27,5 (S)	33,03 (S)	40,66 (S)	37,3 (S)	47,63 (S)
MP5	29,1 (S)	29,2 (S)	26 (S)	24 (S)	40,53 (S)	37,83 (S)	46,9 (S)

Tabela 2- Médias das medidas dos halos (mm) das cinco cepas de *M. pachydermatis* frente aos antifúngicos comerciais AB; ICZ; FLU; EC; MCZ NY e KET. Sendo (S) sensível e (I) intermediário. Os experimentos foram realizados em triplicata.

6.2. Ensaio de inibição de crescimento de *M. pachydermatis* por extratos vegetais pelo método de microdiluição

Na análise dos dados referentes à cepa MP1 frente ao extrato de *C. fairchildiana*, é possível observar que houve inibição significativa na concentração de 400µg/ml, quando comparada ao controle. As outras concentrações testadas não apresentaram inibição de crescimento. Os extratos oriundos de *P. vulgaris* e fruto de *C. annuum* não foram capazes de inibir o crescimento de MP1, independente da concentração utilizada. Quanto ao extrato de folha de *C. annuum*, quando utilizado nas concentrações de 50 e 200µg/ml, notou-se um aumento do crescimento da

referida cepa. As outras concentrações não inibiram o crescimento quando comparadas ao controle. Em todas as concentrações utilizadas, o antifúngico comercial terbinafina foi capaz de inibir o crescimento da levedura, sendo 0,125 µg/ml a melhor opção. Já com antifúngico Anfotericina B, apenas ocorreu inibição na concentração de 1 e 2µg/ml. Tais análises podem ser observadas nos gráficos de 1 a 6 abaixo:

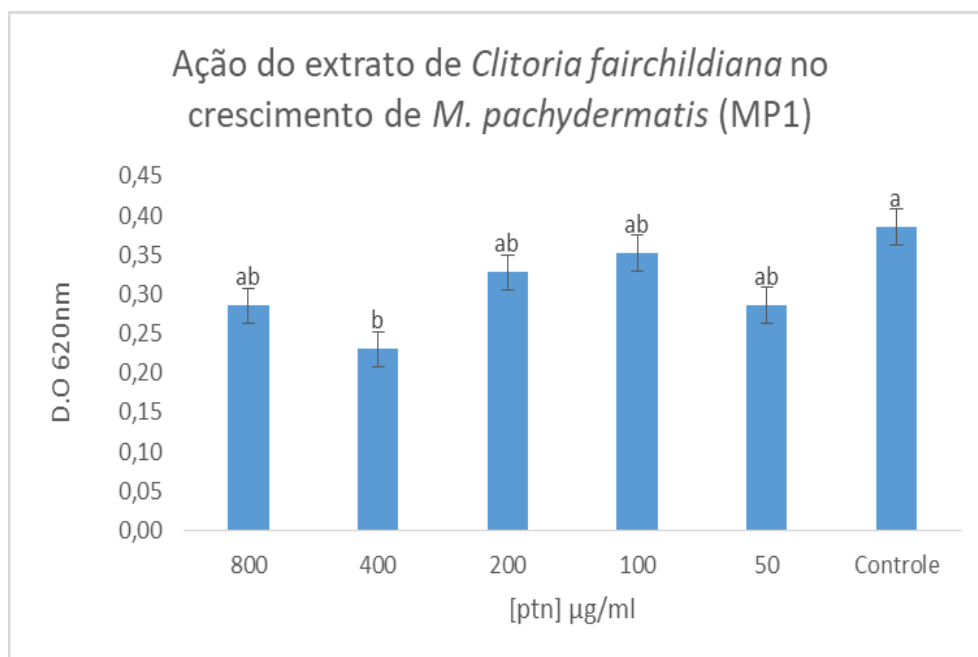


Gráfico 1: Ação do extrato de *C. fairchildiana* em diferentes concentrações sobre MP1. Médias com letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

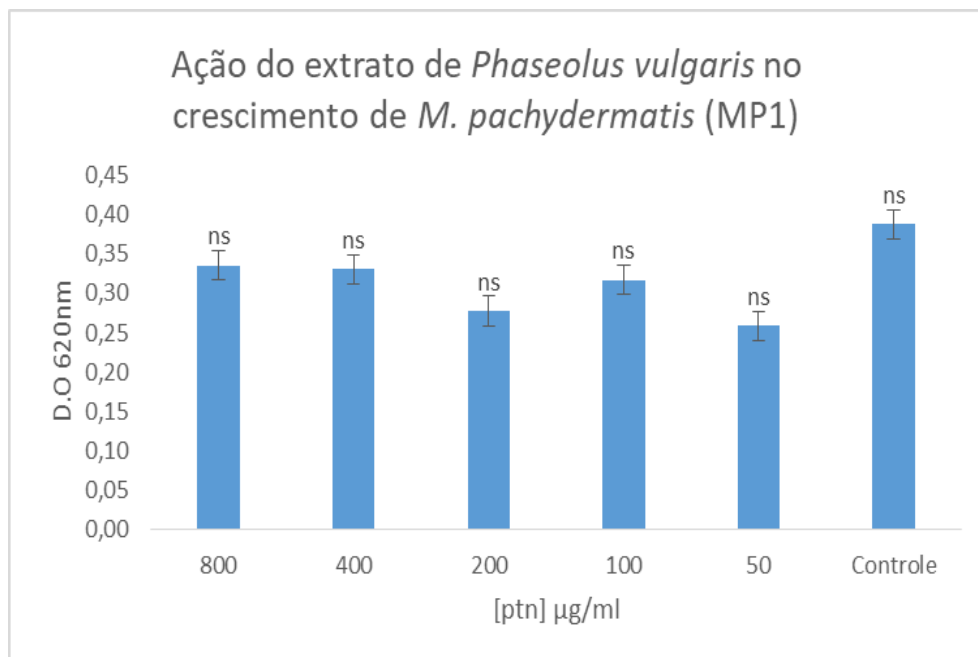


Gráfico 2: Ação do extrato de *P.vulgaris* em diferentes concentrações sobre MP1. Diferença das médias não significativa (ns).

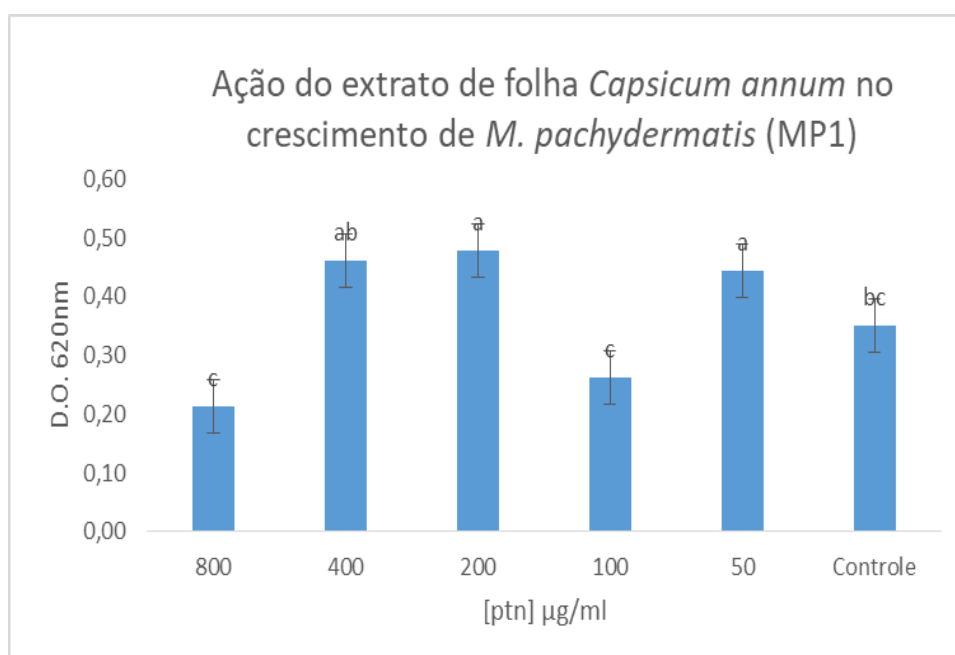


Gráfico 3: Ação do extrato de folha de *C. annum* em diferentes concentrações sobre MP1. Diferença das médias não significativa (ns).

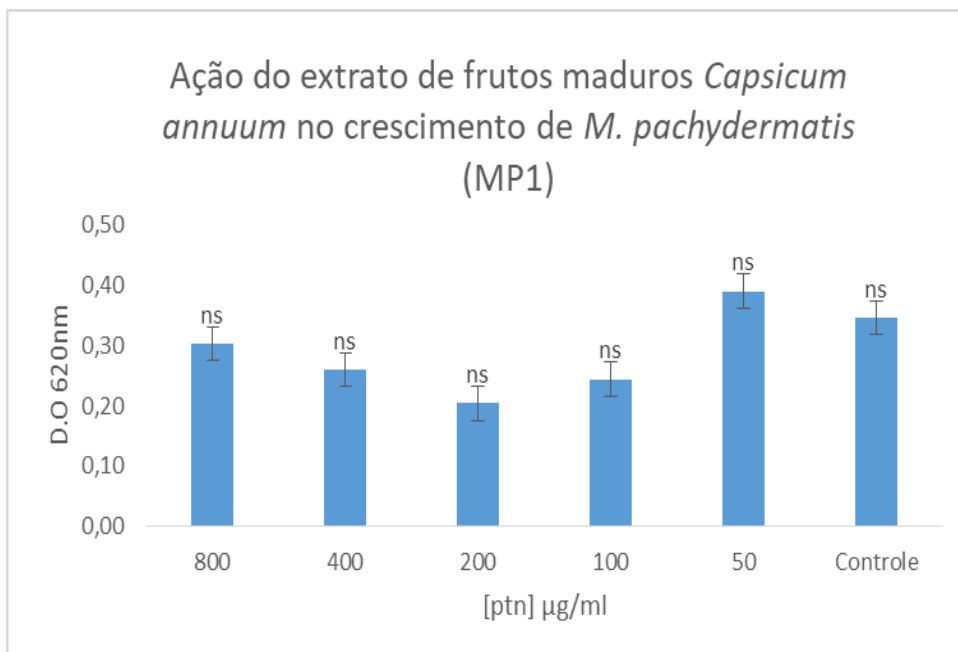


Gráfico 4: Ação do extrato de frutos maduros de *C. annuum* em diferentes concentrações sobre MP1. Diferença das médias não significativa (ns).

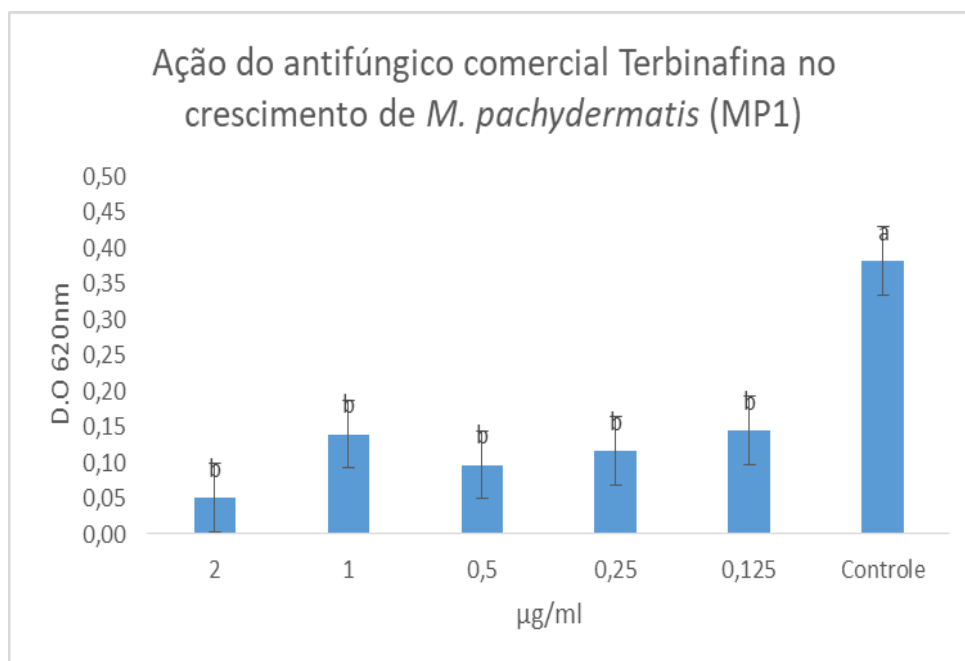


Gráfico 5: Ação de Terbinafina em diferentes concentrações sobre MP1. Médias com letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

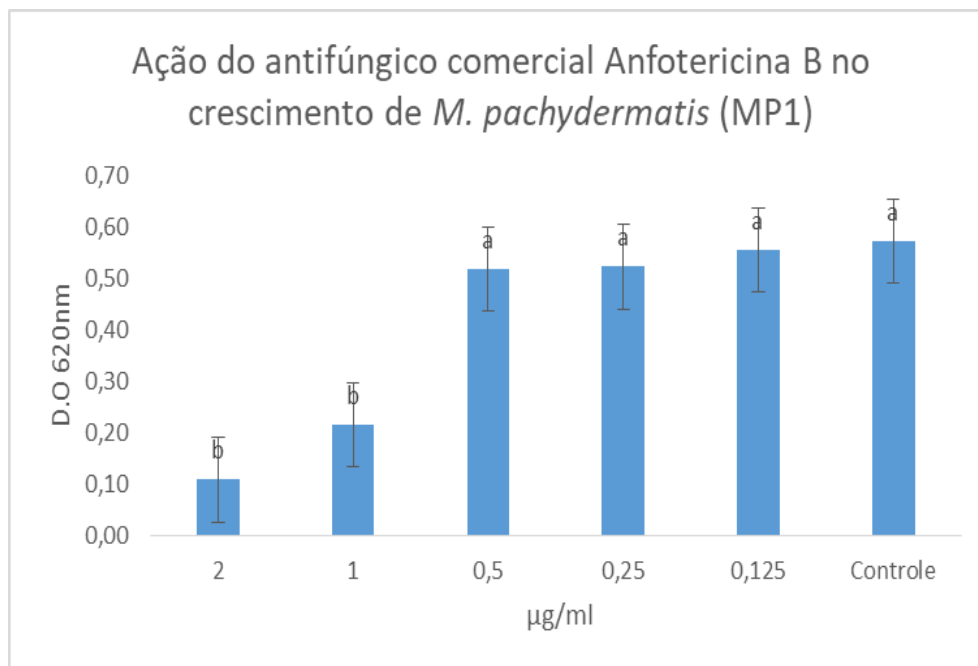


Gráfico 6: Ação de Anfotericina B em diferentes concentrações sobre MP1. Médias com letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Nos ensaios com MP2, nenhum dos extratos vegetais foi capaz de causar inibição do crescimento da levedura. Na concentração de $800 \mu\text{g/ml}$, os extratos de *C. fairchildiana* e folha de *C. annuum* estimularam o crescimento fúngico. Tendo em vista os valores das médias da leitura de absorvância foram maiores e diferentes estatisticamente que o grupo controle. O antifúngico Terbinafina foi capaz de inibir o crescimento nas concentrações $2 \mu\text{g/ml}$, $1 \mu\text{g/ml}$ e $0,5 \mu\text{g/ml}$. Já a Anfotericina B só causou inibição na maior concentração, como pode ser observado nos gráficos a seguir (Gráfico 7-12):

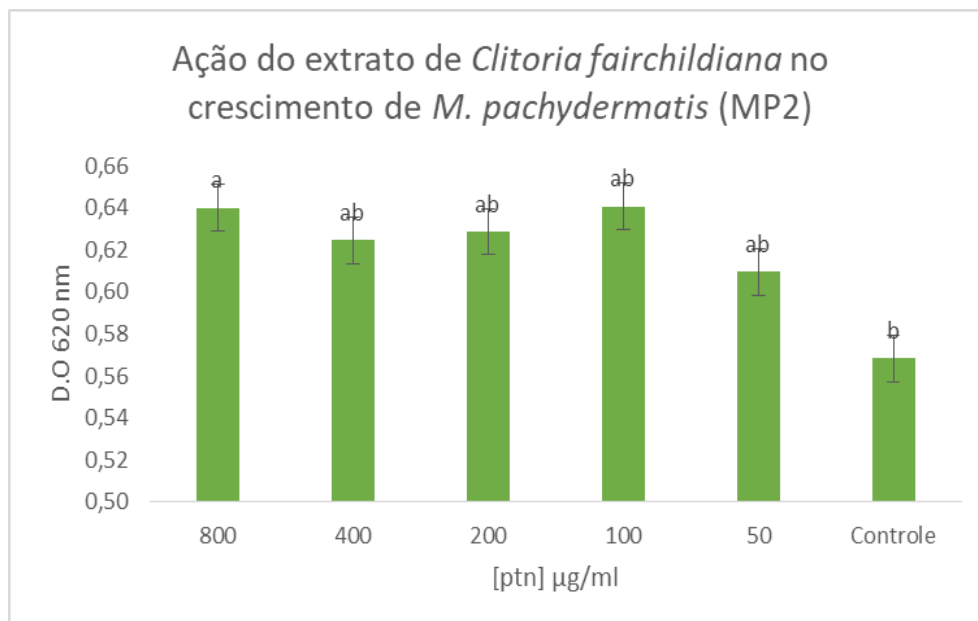


Gráfico 7: Ação do extrato de *C. fairchildiana* em diferentes concentrações sobre MP2. Médias com letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

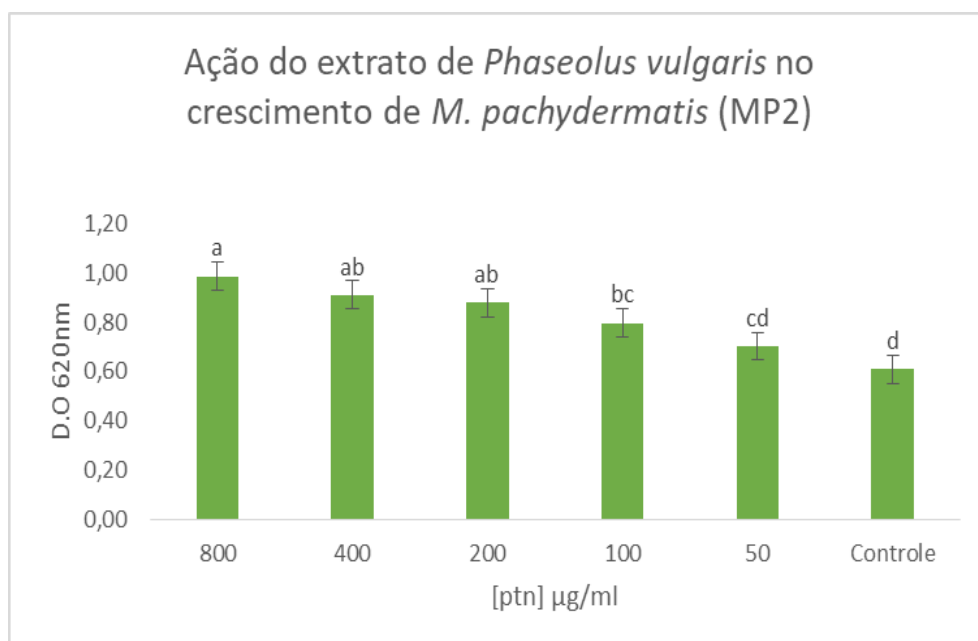


Gráfico 8: Ação do extrato de *P. vulgaris* em diferentes concentrações sobre MP2. Médias com letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

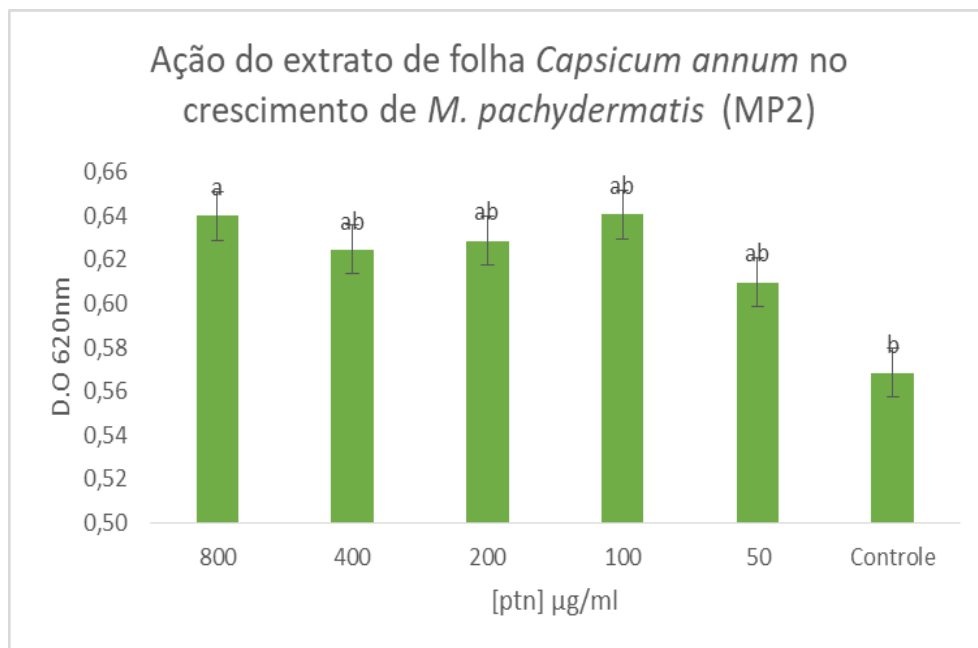


Gráfico 9: Ação do extrato de folha de *C. annuum* em diferentes concentrações sobre MP2. Médias com letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

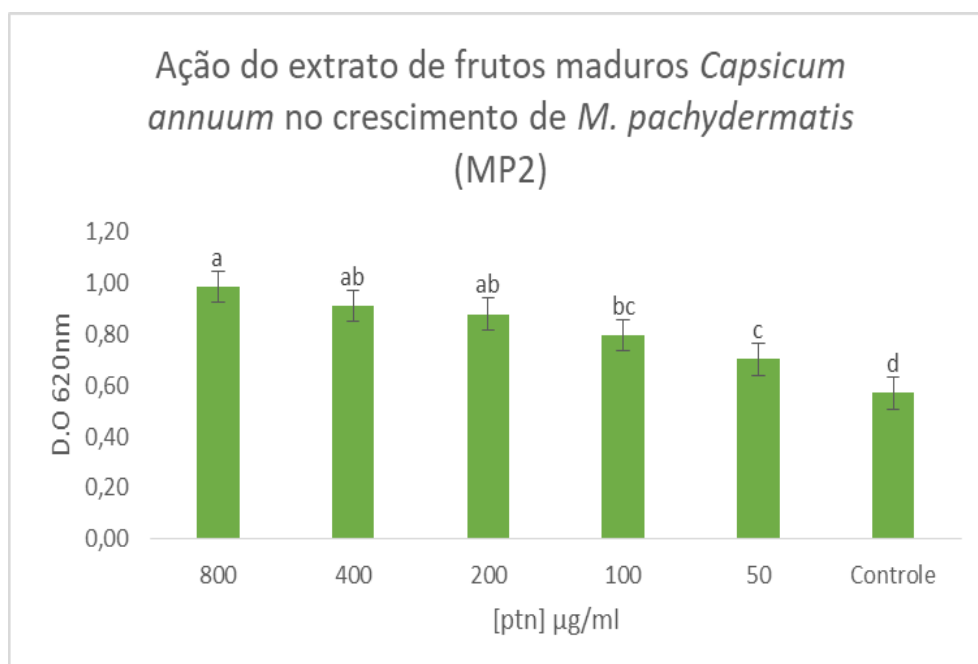


Gráfico 10: Ação do extrato de fruto de *C. annuum* em diferentes concentrações sobre MP2. Médias com letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

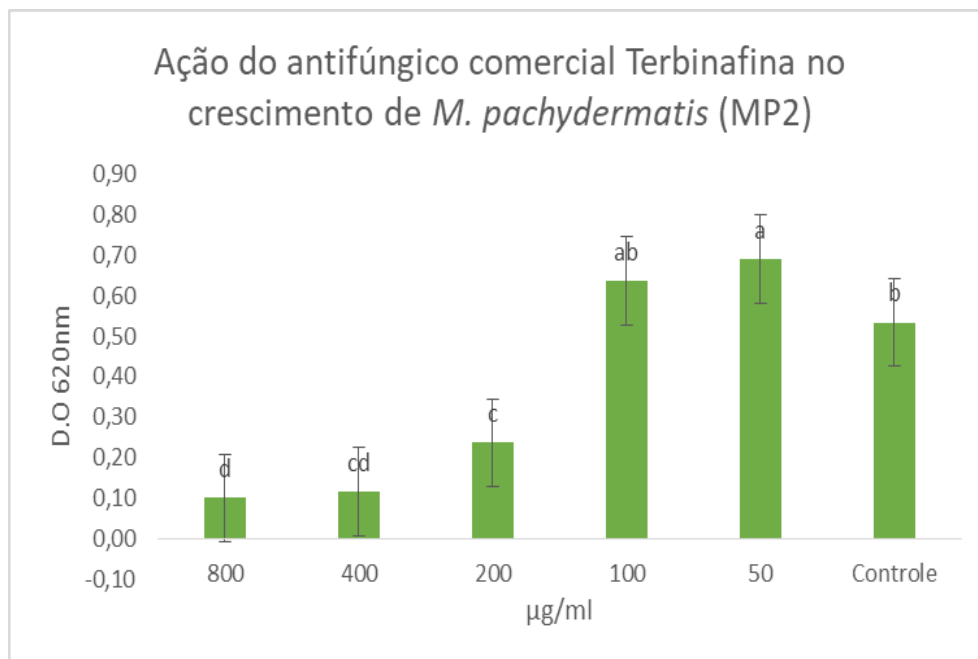


Gráfico 11: Ação de Terbinafina em diferentes concentrações sobre MP2. Médias com letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

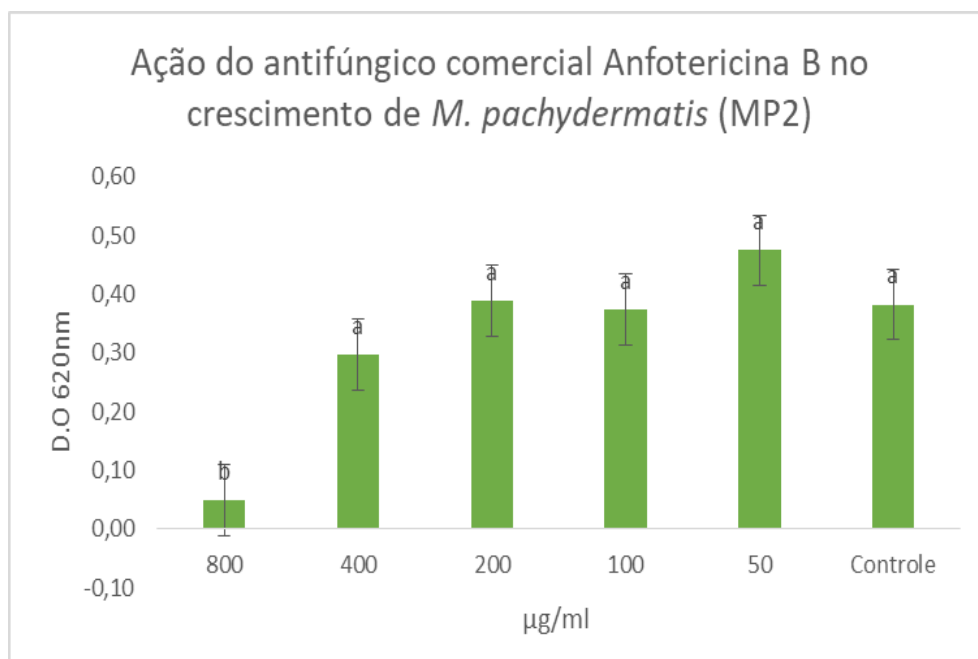


Gráfico 12: Ação de Anfotericina B em diferentes concentrações sobre MP2. Médias com letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Na verificação da ação antifúngica dos extratos vegetais sobre a cepa MP3, notou-se potencialização no crescimento da levedura pelos extratos de *C. fairchildiana* e *P. vulgaris*, em comparação ao controle. Não houve significância estatística na média das leituras de absorbância quando adicionado o extrato de folha de *C. annuum*. Já o extrato de frutos maduros de *C. annuum* foi capaz de inibir significativamente o crescimento do fungo quando utilizada a concentração de 800 µg/ml. Os dados das médias das leituras de absorbâncias podem ser observados nos gráficos de 13 a 16, a seguir:

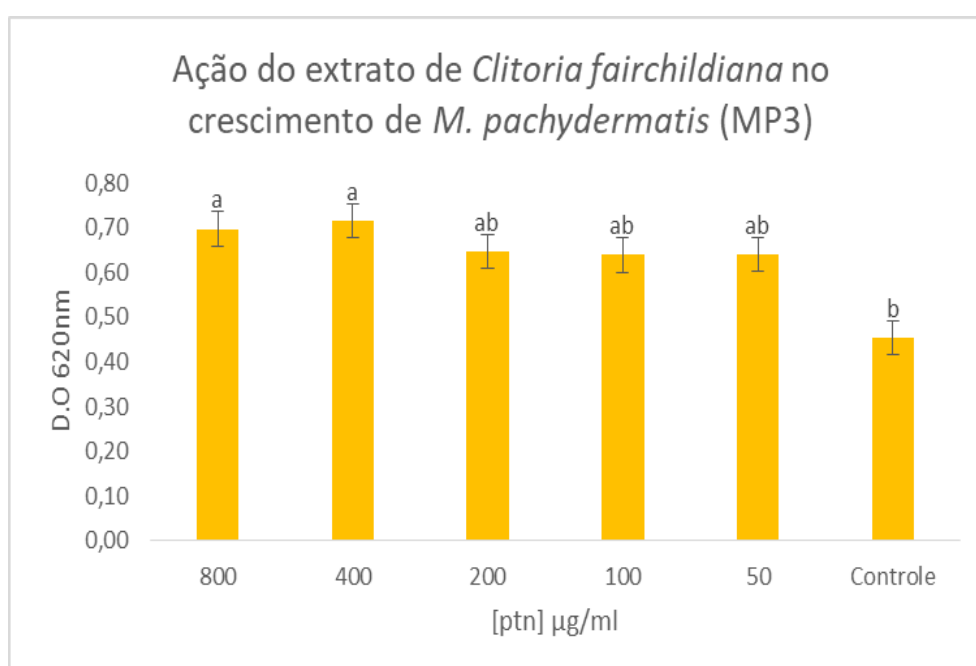


Gráfico 13: Ação do extrato de *C. fairchildiana* em diferentes concentrações sobre MP3. Médias com letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

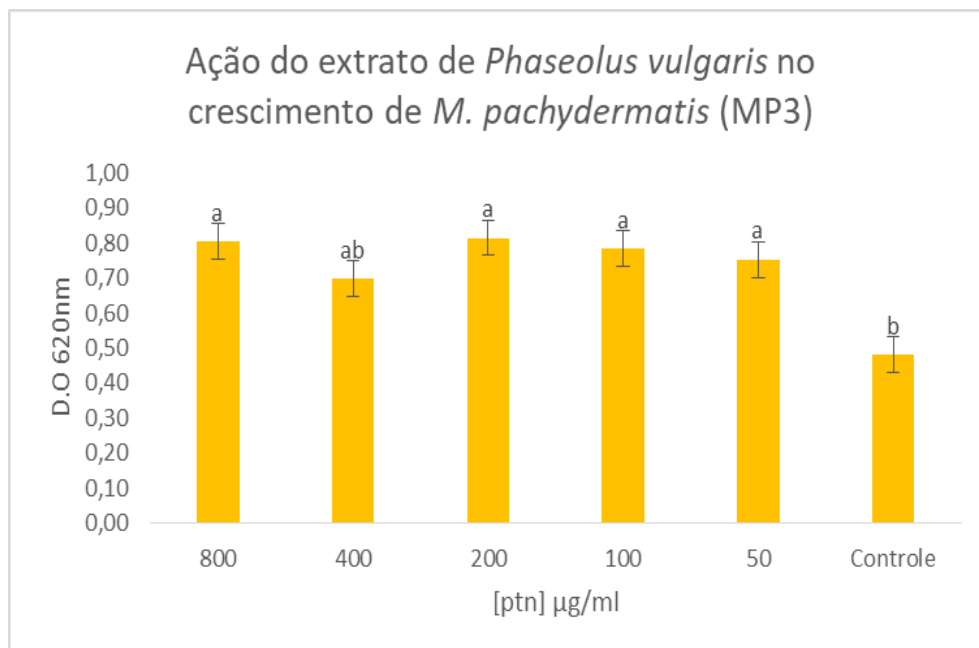


Gráfico 14: Ação do extrato de *P. vulgaris* em diferentes concentrações sobre MP3. Médias com letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

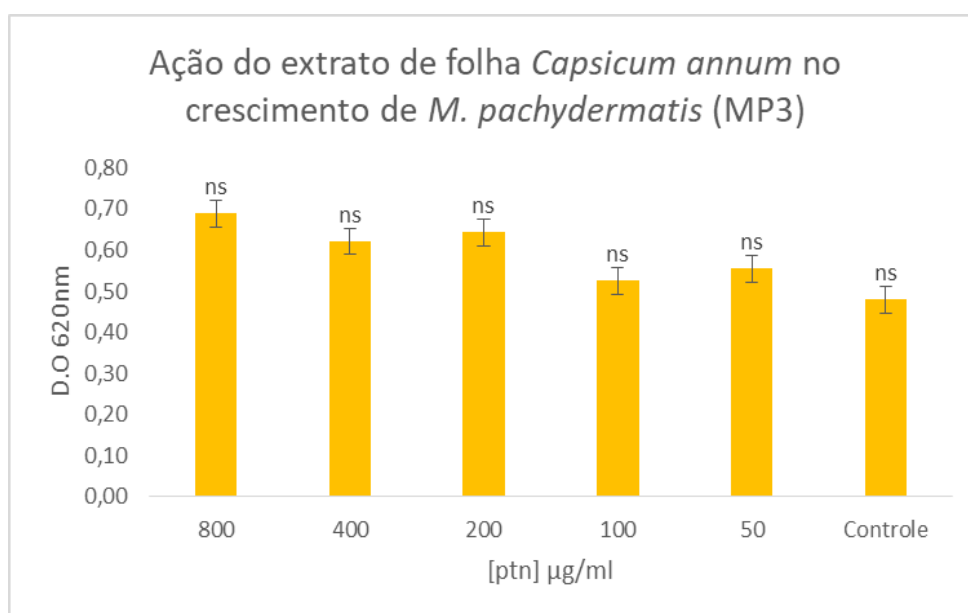


Gráfico 15: Ação do extrato de folha de *C. annuum* em diferentes concentrações sobre MP3. Diferença das médias não significativa (ns).

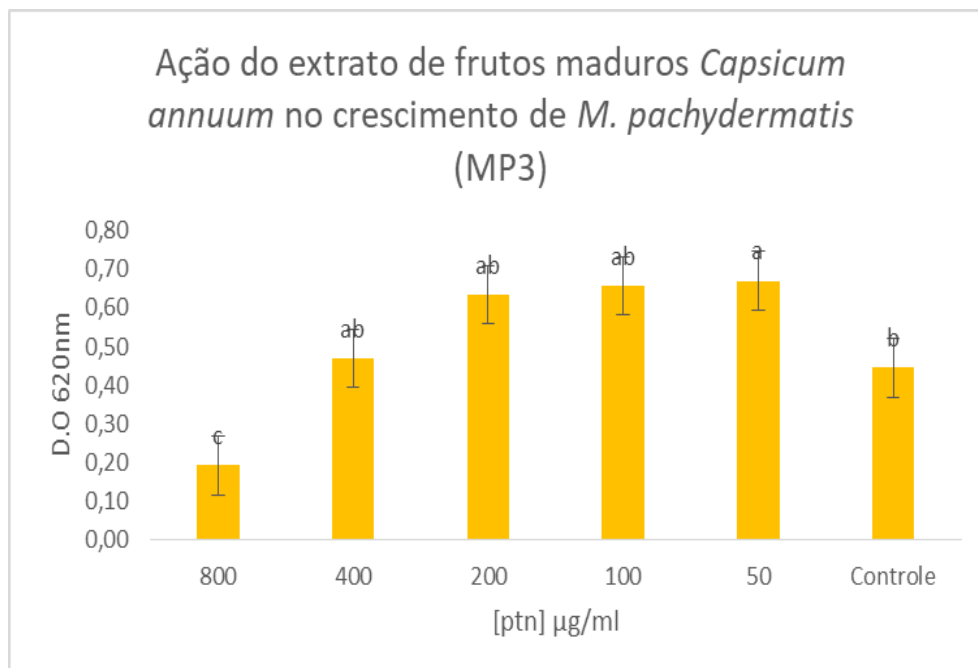


Gráfico 16: Ação do extrato de fruto de *C. annuum* em diferentes concentrações sobre MP3. Médias com letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Na análise dos dados referentes à cepa MP4, foi possível observar que os quatro extratos vegetais causaram inibição do crescimento fúngico na concentração de 400 µg/ml, pois os valores das médias de absorvância foram menores que o controle, havendo significância estatística, como mostram os gráficos 17-20 a seguir:

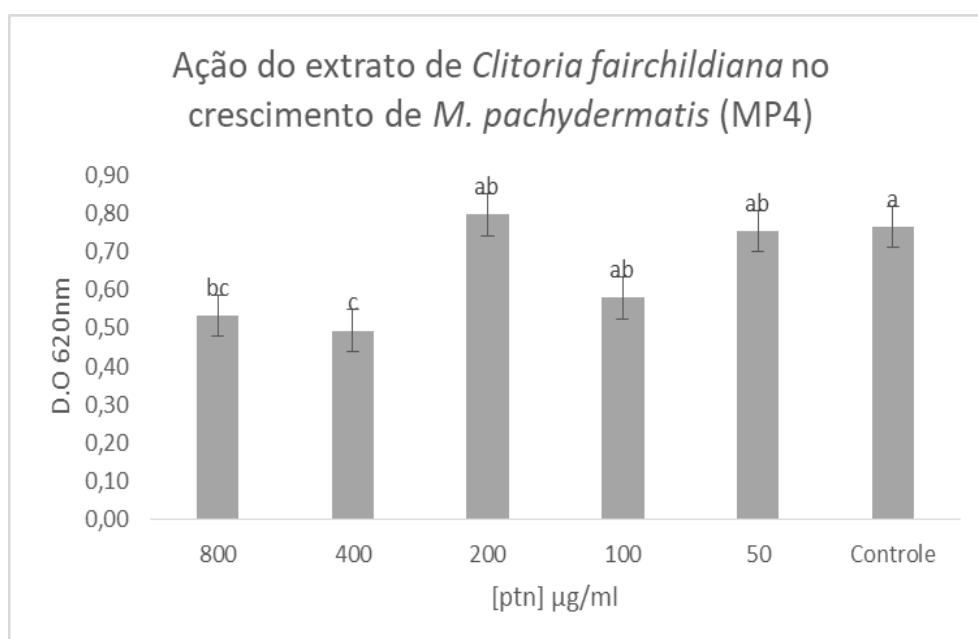


Gráfico 17: Ação do extrato de *C. fairchildiana* em diferentes concentrações sobre MP4. Médias com letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

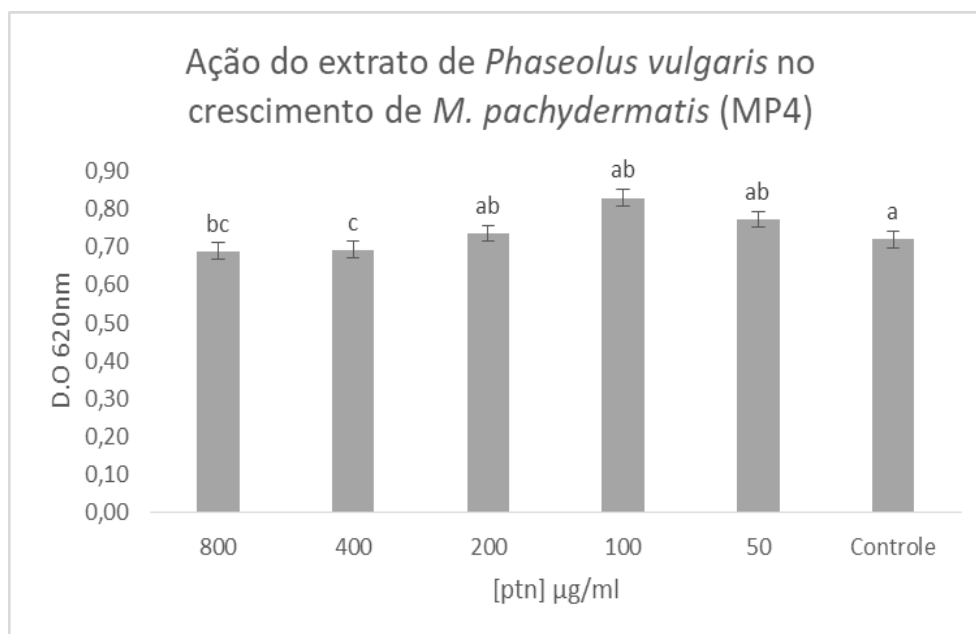


Gráfico 18: Ação do extrato de *P. vulgaris* em diferentes concentrações sobre MP4. Médias com letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

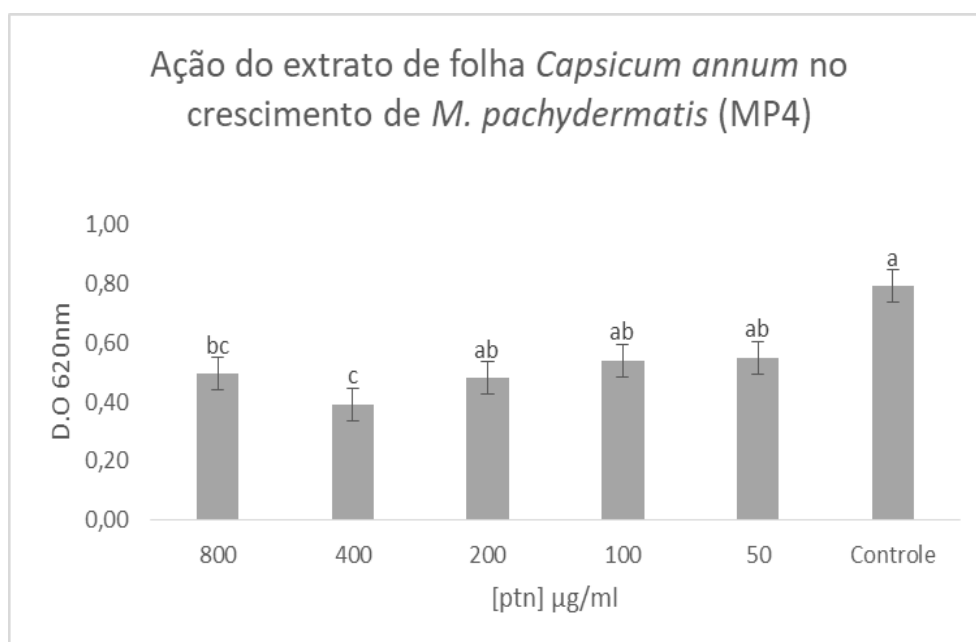


Gráfico 19: Ação do extrato de folha de *C. annum* em diferentes concentrações sobre MP4. Médias com letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

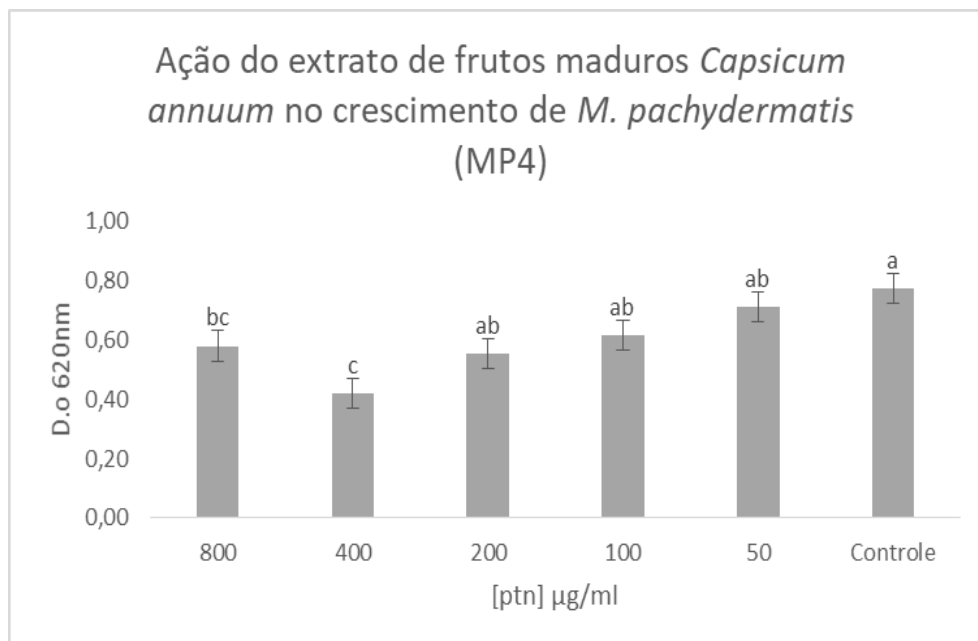


Gráfico 20: Ação do extrato de fruto de *C. annuum* em diferentes concentrações sobre MP4. Médias com letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Nos resultados dos ensaios referentes à cepa MP5, é possível notar que não houve significância estatística das médias dos valores das leituras de absorvância do extrato de *C. fairchildiana*. O extrato de *P. vulgaris* levou a uma potencialização no crescimento da levedura, em todas as concentrações utilizadas. Quanto ao extrato de folha de *C. annuum*, houve inibição frente às duas maiores concentrações (800 µg/ml e 400 µg/ml), enquanto o extrato de frutos maduros de *C. annuum* causou inibição nas concentrações de 800 µg/ml e 50 µg/ml. Os gráficos (21-24) abaixo exibem essas análises:

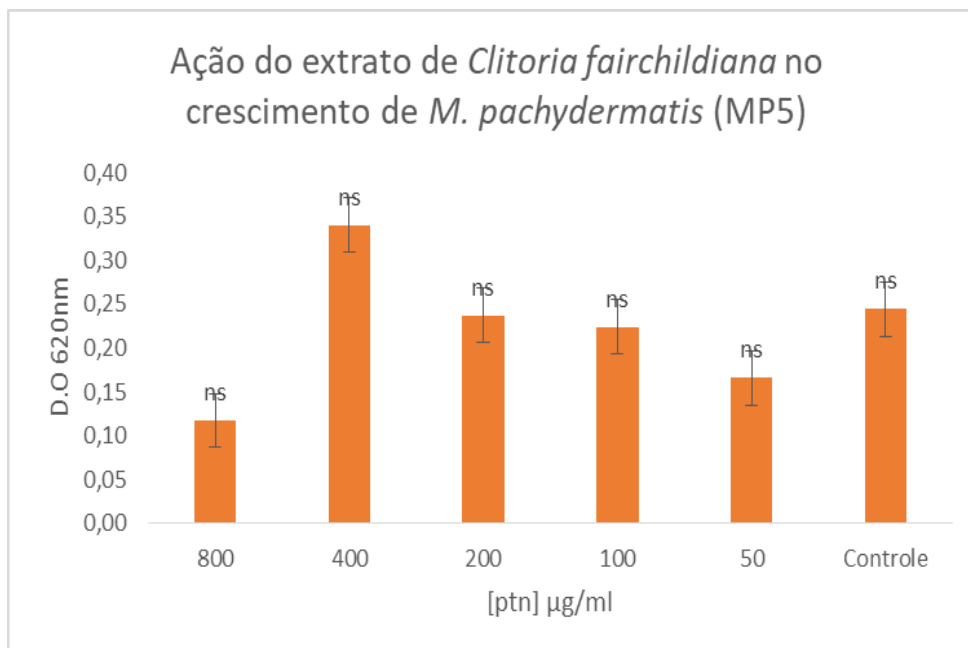


Gráfico 21: Ação do extrato de *C. fairchildiana* em diferentes concentrações sobre MP5. Diferença das médias não significativa (ns).

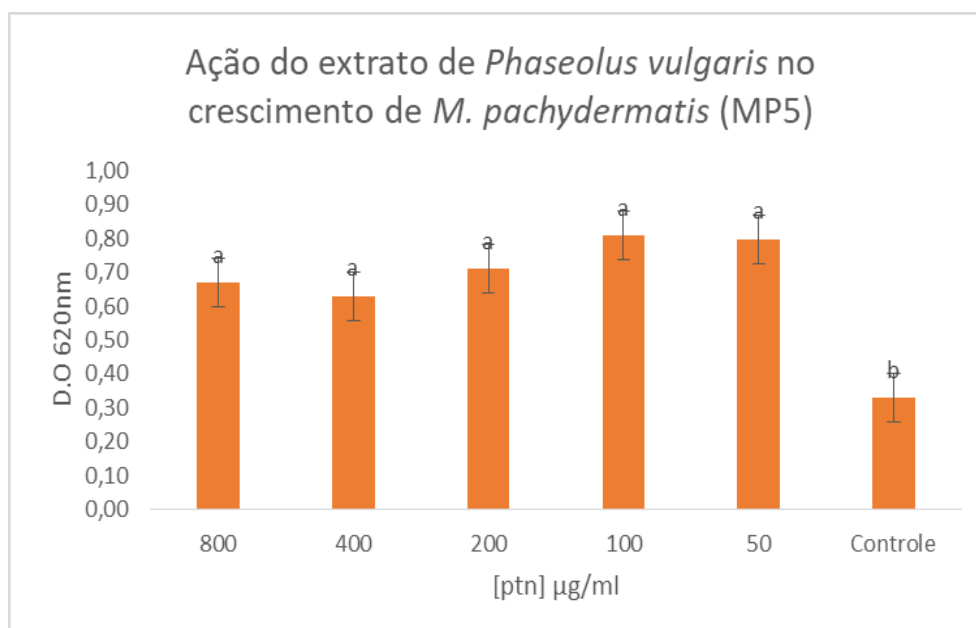


Gráfico 22: Ação do extrato de *P. vulgaris* em diferentes concentrações sobre MP5. Médias com letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

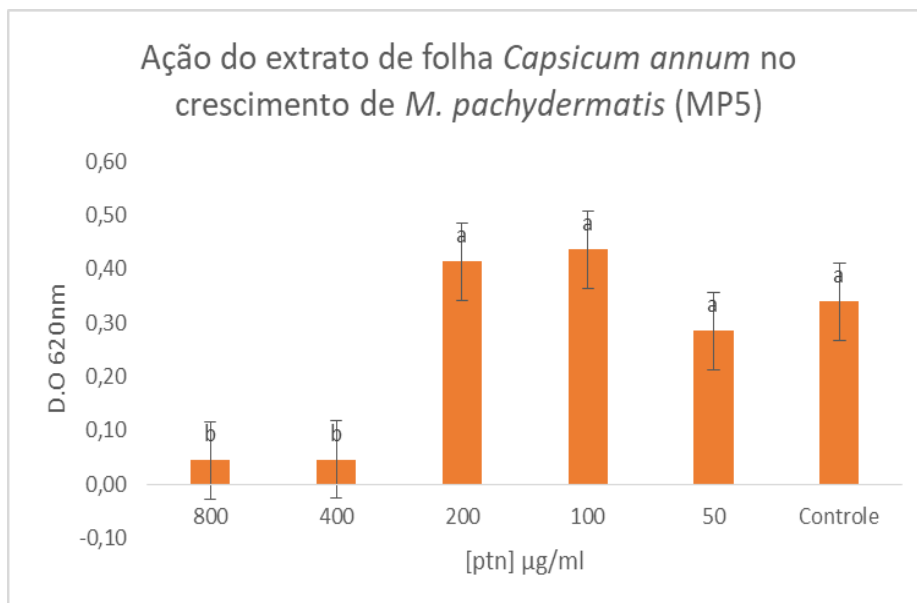


Gráfico 23: Ação do extrato de folha de *C. annum* em diferentes concentrações sobre MP5. Médias com letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

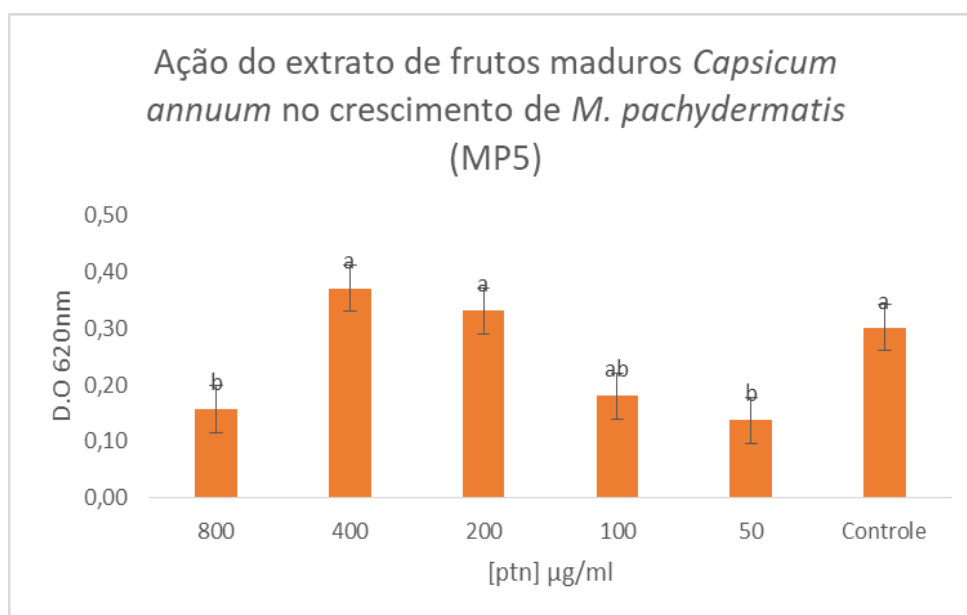


Gráfico 24: Ação do extrato de frutos maduros de *C. annum* em diferentes concentrações sobre MP5. Médias com letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

6.3. Análise de viabilidade celular de *M. pachydermatis*

Os resultados obtidos pelo ensaio de viabilidade celular das cepas MP1 a MP5 de *M. pachydermatis* apontam que o extrato de *C. fairchildiana* causou diminuição da viabilidade para 47,94% na cepa MP1 (Figura 13). Nas outras cepas testadas, o

referido extrato não apresentou capacidade de redução. Apenas na cepa MP5 não houve perda da viabilidade celular pelo extrato de *P. vulgaris*, sendo a maior delas sobre a cepa MP1, na qual houve 77,40% de perda. O extrato de folha de *C. annuum* diminuiu a viabilidade nas cepas MP3 e MP5. Já o extrato de frutos de *C. annuum* levou à perda da viabilidade para todas as cepas testadas, tendo sido em MP5 a diminuição mais importante (Figura 14), para 25,14%. Os antifúngicos comerciais Terbinafina e Anfotericina B apenas foram testados com as cepas MP1 e MP2, e ambos foram capazes de reduzir a viabilidade celular das duas cepas. Em MP1, Terbinafina reduziu o número de células viáveis para menos de 1% (Figura 13). A Tabela 3 a seguir, contém todos estes resultados.

Cepa	Microdiluição	Controle (100%)	<i>C. fairchildiana</i>	<i>P. vulgaris</i>	Folha <i>C. annuum</i>	Fruto <i>C. annuum</i>	Terbinafina	Anfotericina B
MP1	10 ⁻³	146	70 (47,94%)	33 (22,60%)	218	103 (70,55%)	1 (0,68%)	56 (38,36%)
MP2	10 ⁻³	287	324	185 (64,46%)	298	141 (49,13%)	116 (40,42%)	167 (58,19%)
MP3	10 ⁻³	237	266	230 (97,05%)	202 (85,23%)	194 (81,85%)	–	–
MP4	10 ⁻³	204	225	198 (97,06%)	263	180 (88,23%)	–	–
MP5	10 ⁻³	183	205	278	42 (22,95%)	46 (25,14%)	–	–

Tabela 3: Médias das Unidades Formadoras de Colônia (UFC) e porcentagens das cinco cepas de *M. pachydermatis* frente a extratos vegetais e antifúngicos comerciais. O controle representa 100% da viabilidade celular. Na cor vermelha, casos em que houve redução da viabilidade celular em comparação ao controle. Os experimentos foram realizados em triplicata.

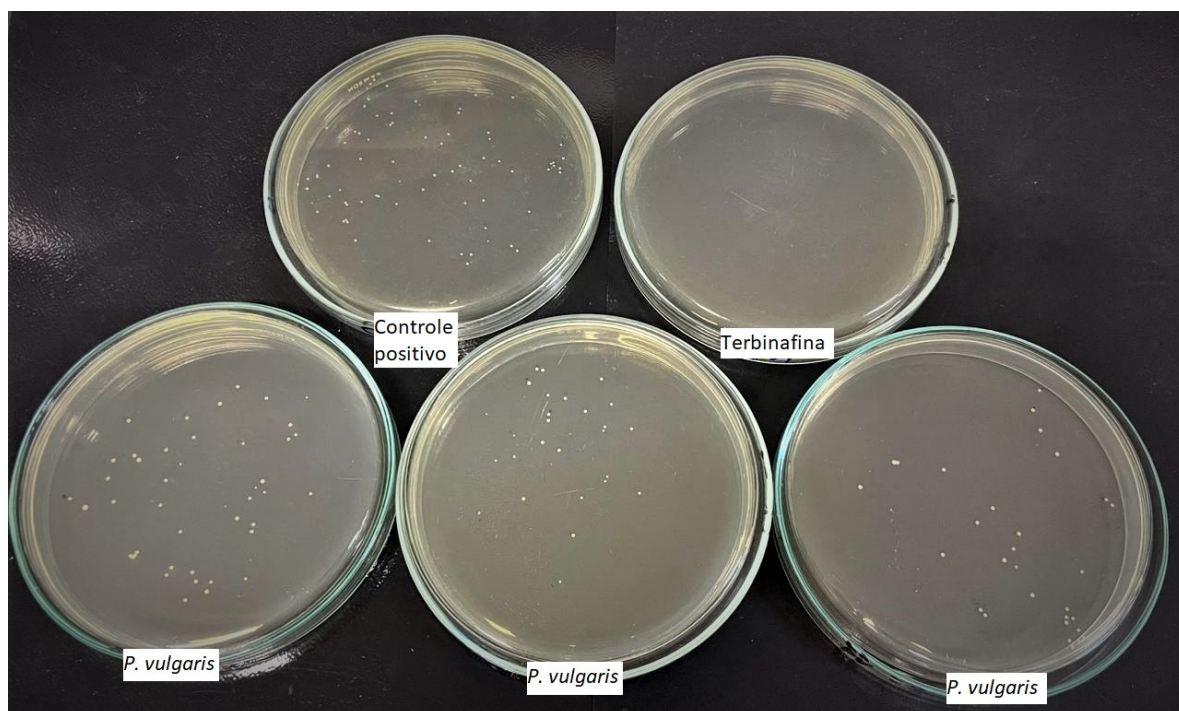


Figura 13 - Viabilidade celular da cepa MP1 de *M. pachydermatis*, tratada com terbinafina e extrato de *P. vulgaris*. O controle positivo representa 100% da viabilidade celular (leveduras não tratadas). Fonte: Arquivo pessoal.

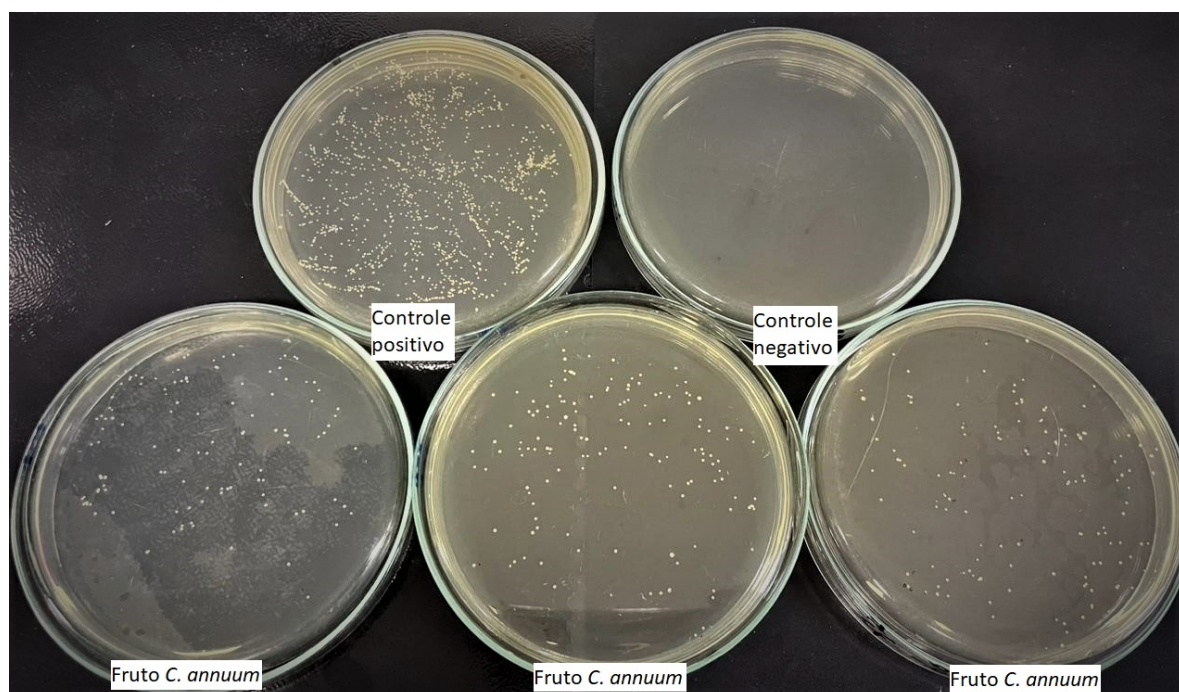


Figura 14 - Viabilidade celular da cepa MP5 de *M. pachydermatis* após tratamento com extrato de frutos de *C. annuum*. O controle positivo representa 100% da viabilidade celular, e o controle negativo, ausência de células.

6.4. Ensaio de inibição do crescimento de *S. schenckii* (ATCC 32285) e *S. brasiliensis* por extratos vegetais em meio líquido

Nos ensaios de inibição realizados, foi possível observar que tanto na cepa S1, quanto na cepa S2, o extrato de *C. fairchildiana* causou inibição quase total do crescimento da levedura, assim como o extrato de folha de *C. annuum* sobre a cepa S2. Em ambas as cepas, o extrato de *P. vulgaris* levou a uma potencialização do crescimento. Tendo em vista o último tempo analisado, o valor das médias das leituras de densidade óptica foram maiores comparando com os do controle positivo. O extrato de folha de *C. annuum* apresentou efeito inibitório nas duas cepas, mas não tão eficiente quanto o extrato de *C. fairchildiana* e fruto de *C. annuum*. Quando adicionados, os antifúngicos comerciais Terbinafina e Anfotericina B inibiram completamente o crescimento fúngico. Os dados podem ser visualizados nos gráficos 25 e 26 a seguir:

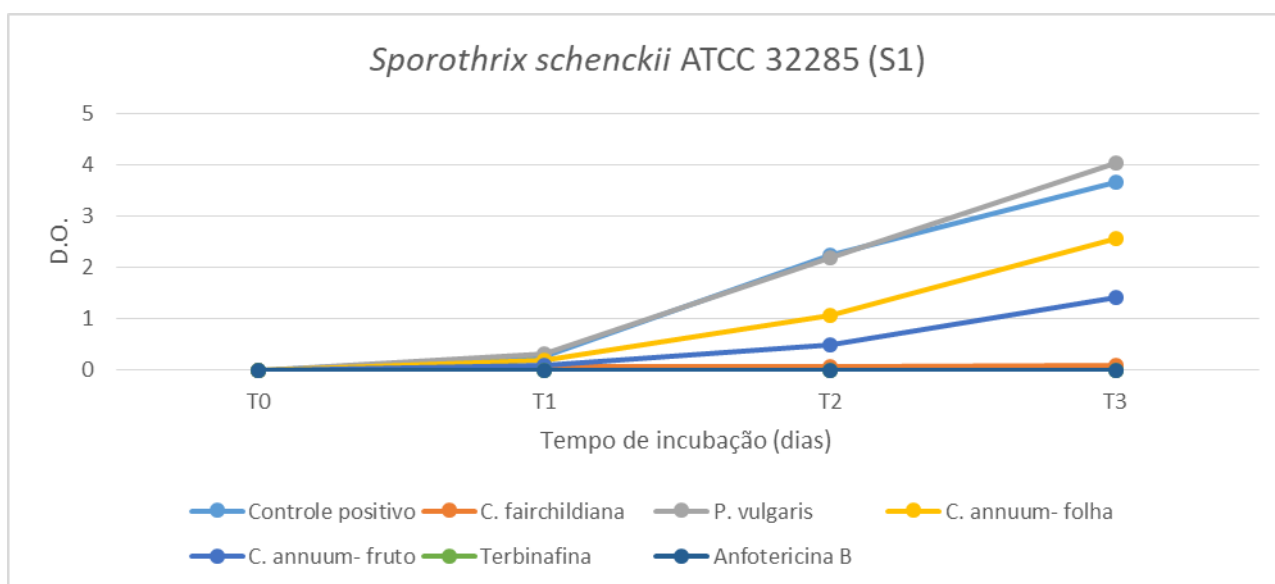


Gráfico 25: Curvas de crescimento de *S. schenckii* (cepa ATCC 32285) na presença de extratos vegetais (*C. fairchildiana*, *P. vulgaris*, folha e fruto de *C. annuum* - [800µg/ml]) e antifúngicos comerciais (Terbinafina- [1µg/ml] e Anfotericina B [2µg/ml]), cultivados em meio RPMI-1640. O valor de cada ponto corresponde à média entre as triplicatas.

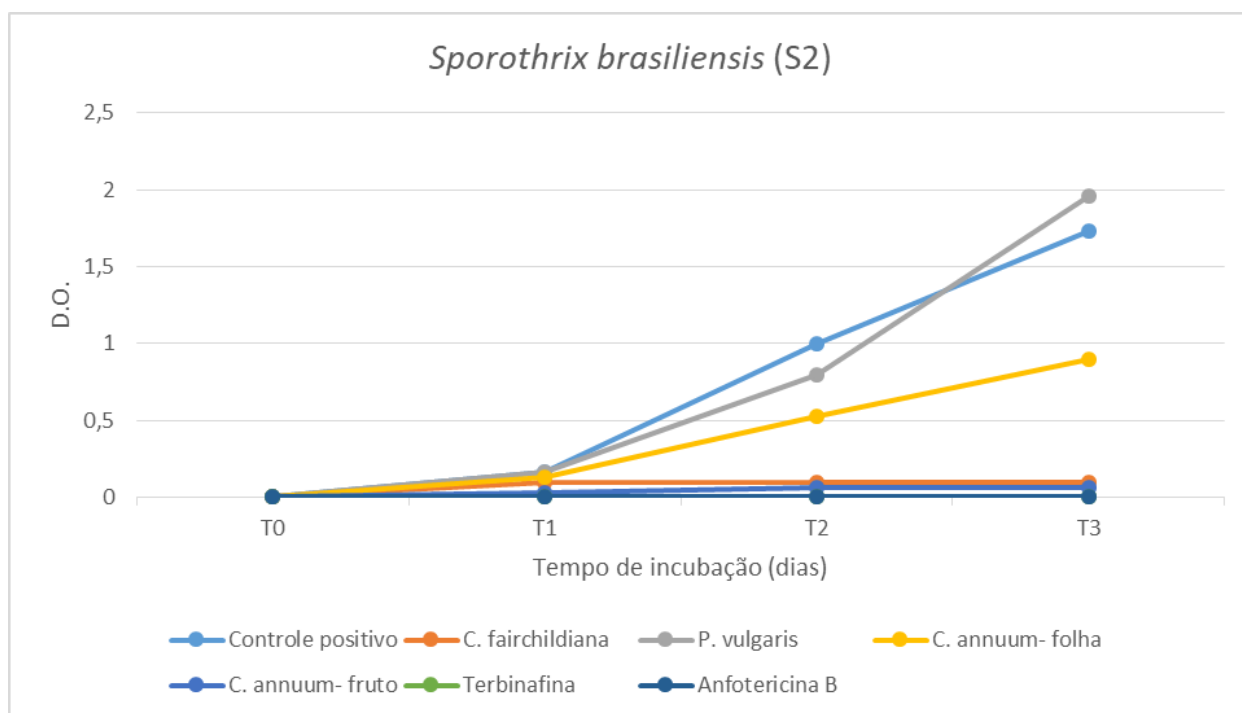


Gráfico 26: Curvas de crescimento de *S. brasiliensis* na presença de extratos vegetais (*C. fairchildiana*, *P. vulgaris*, folha e fruto de *C. annuum* - [800µg/ml]) e antifúngicos comerciais (Terbinafina- [1µg/ml] e Anfotericina B [2µg/ml]), cultivados em meio RPMI-1640. O valor de cada ponto corresponde à média entre as triplicatas.

6.5. Avaliação do crescimento de *S. schenckii* e *S. brasiliensis* em meio de cultura sólido e formação de melanina

Após terem sido semeadas em placas de Petri contendo ágar Sabouraud dextrose e levadas a estufa a 25°C, foi possível notar o início do crescimento das colônias na fase filamentosa em 48-72 horas, tanto das leveduras tratadas, quanto das não tratadas (controle positivo). No quinto dia, as principais características macroscópicas já podiam ser observadas. As placas de Petri referentes ao controle negativo permaneceram sem crescimento.

As colônias da cepa S1 eram esbranquiçadas, enrugadas e membranosas. Com o passar dos dias, elas se expandiram sem alterar suas características de pigmentação, visto que a referida cepa não produz pigmento escuro. Verificou-se que as colônias de leveduras previamente tratadas com extrato de *C. fairchildiana* tiveram seu crescimento inicial mais lento, assim como uma colônia do extrato de fruto de *C. annuum*. Já as colônias referentes ao extrato de *P. vulgaris*, após 18 dias, estavam maiores que as do controle positivo. As placas semeadas com leveduras previamente

tratadas com os antifúngicos comerciais Terbinafina e Anfotericina B permaneceram sem crescimento (figuras 15-17).

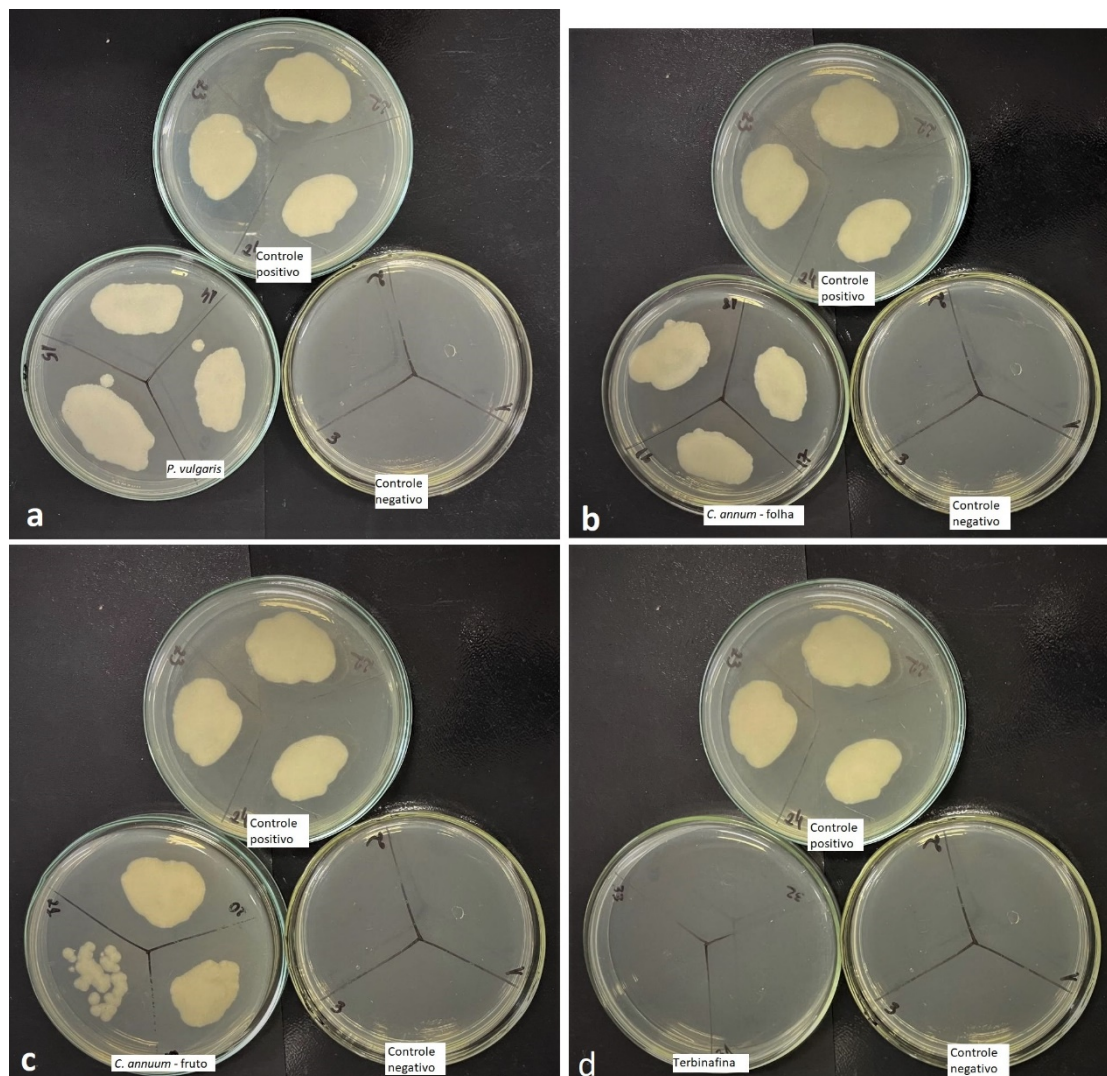


Figura 15: Crescimento de colônias de S1 após 5 dias de incubação em estufa a 25°C. Fonte: Arquivo pessoal.

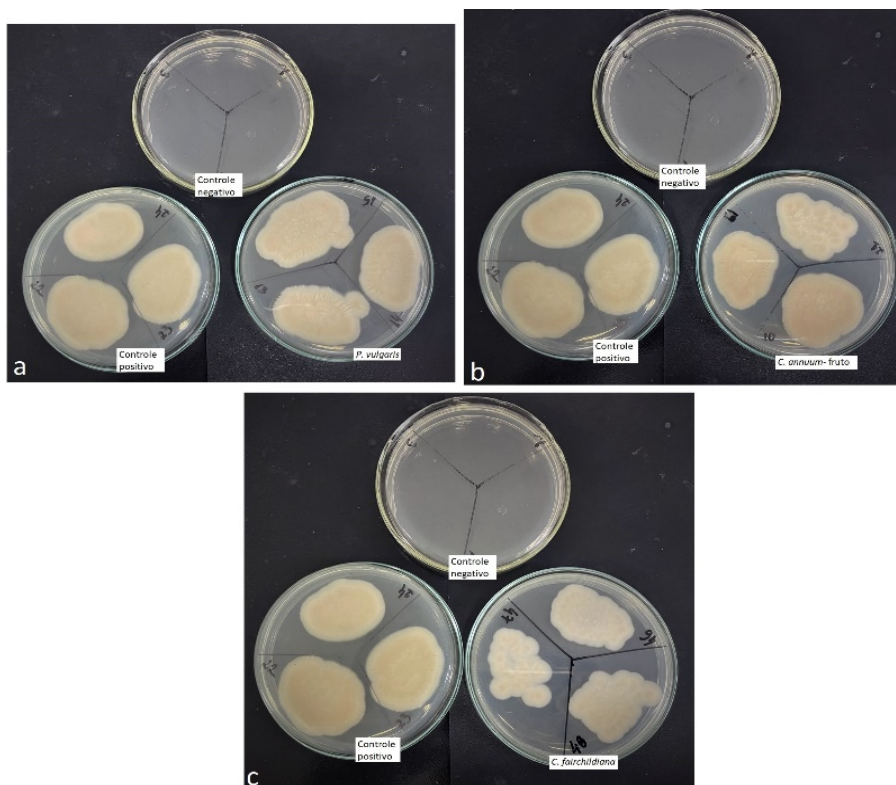


Figura 16: Crescimento de colônias de S1 após 12 dias de incubação em estufa a 25°C. Fonte: Arquivo pessoal.

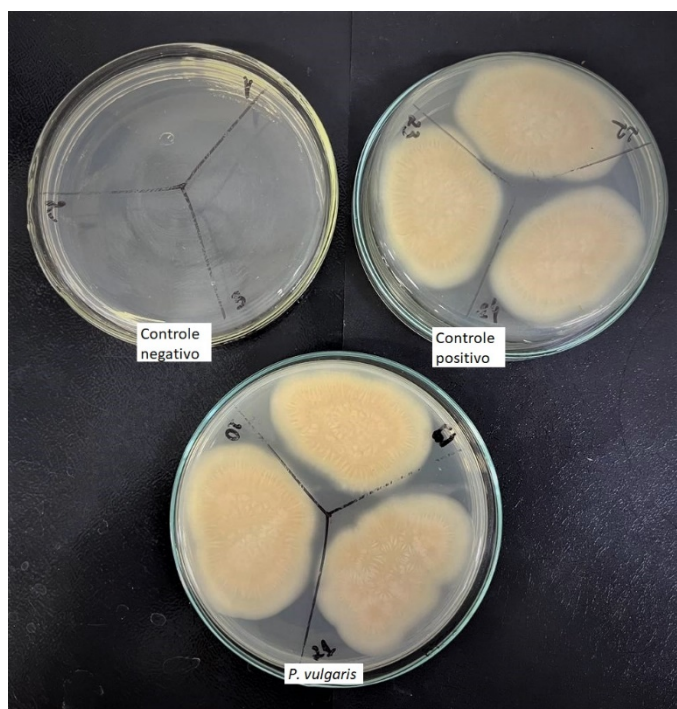


Figura 17: Crescimento de colônias de S1 após 19 dias de incubação em estufa a 25°C. Fonte: Arquivo pessoal.

No que se refere às colônias da cepa S2, inicialmente também eram esbranquiçadas, enrugadas e membranosas, entretanto, por volta do sétimo dia, começou o processo de melanização, escurecendo-as com o passar do tempo. Além disso, observou-se que nos primeiros dias as colônias anteriormente tratadas com extrato de *P. vulgaris* tiveram um crescimento mais acelerado e ficaram mais escuras quando comparadas ao controle positivo. Em contrapartida, as tratadas com extratos de folha e fruto de *C. annuum* e *C. fairchildiana* cresceram mais lentamente que as do controle. As tratadas com fruto de *C. annuum* ainda iniciaram o processo de melanização mais tardiamente. Apesar de, na leitura de densidade óptica, não ter havido crescimento de leveduras tratadas com o antifúngico Terbinafina, após serem semeadas no ágar, as colônias cresceram e, ao fim de 17 dias, estavam visualmente mais escuras do que as do controle positivo. A placa referente ao tratamento com Anfotericina B permaneceu sem crescimento (figuras 18-20). Todo o ensaio foi realizado em triplicata.

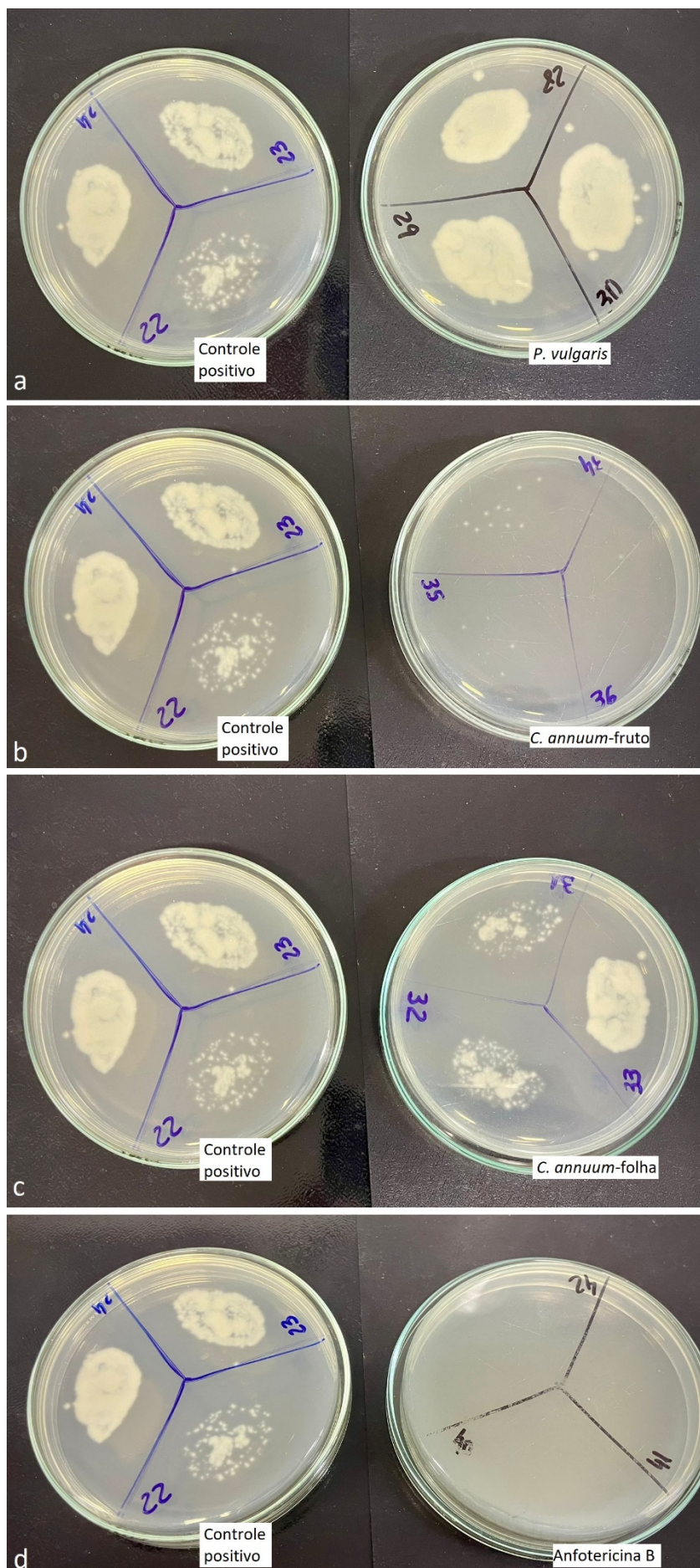


Figura 18: Crescimento de colônias de S2 após 4 dias de incubação em estufa a 25°C. Fonte: Arquivo pessoal.

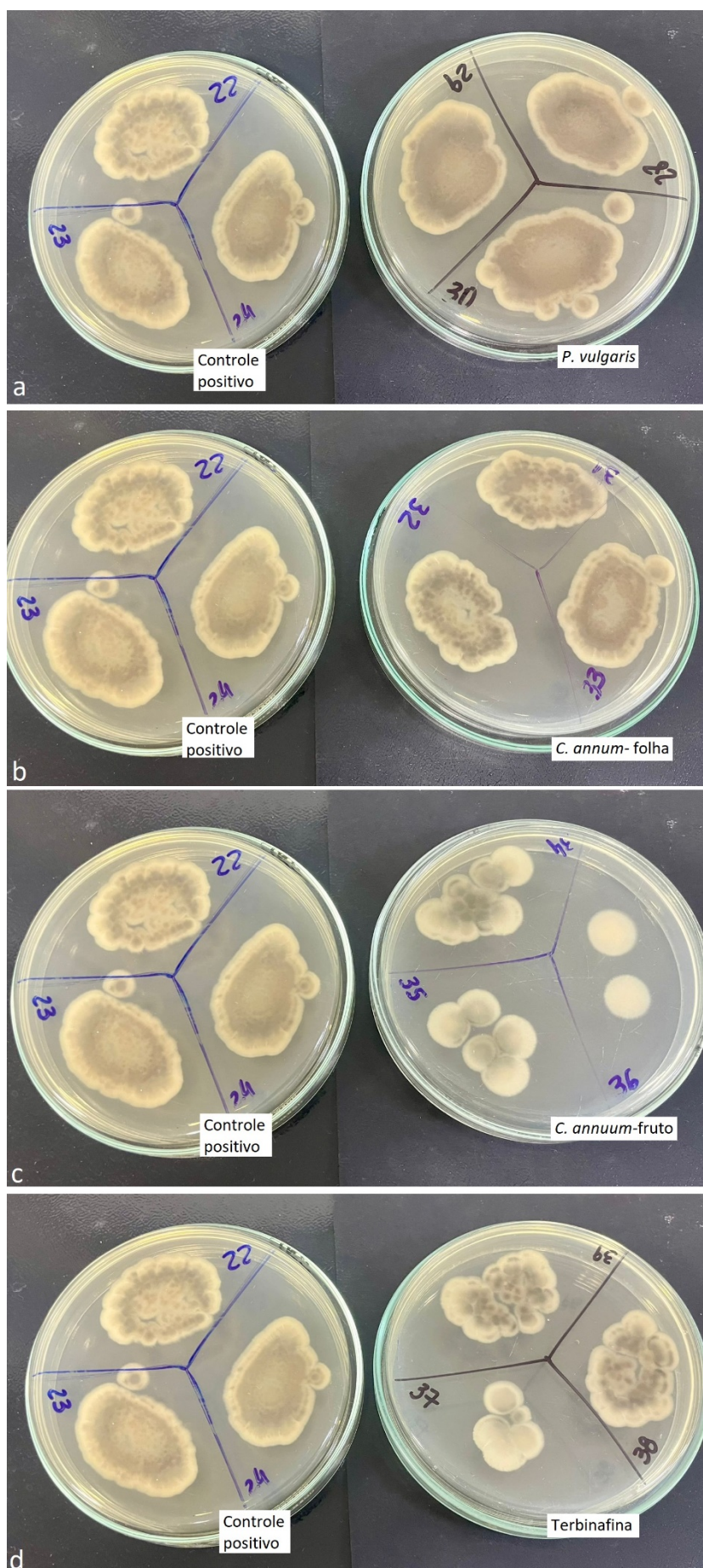


Figura 19: Crescimento de colônias de S2 após 11 dias de incubação em estufa a 25°C. Fonte: Arquivo pessoal.

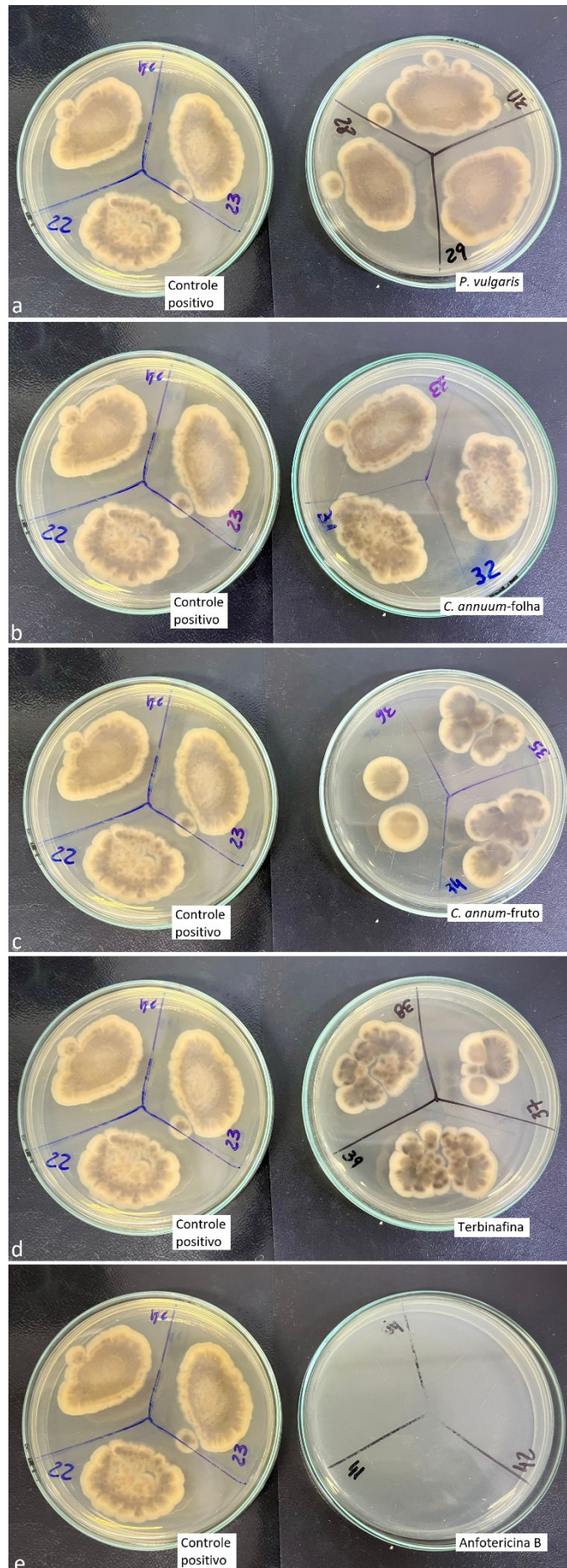


Figura 20: Crescimento de colônias de S2 após 17 dias de incubação em estufa a 25°C. Fonte: Arquivo pessoal.

6.6. Ensaio de permeabilização da membrana plasmática

A permeabilização da membrana das cepas MP1, MP2, S1 e S2 foi avaliada por microscopia de fluorescência pela captação do Sytox Green Nucleic Acid Stain. O ensaio foi realizado com o extrato de *C. fairchildiana* para as quatro cepas e com antifúngico Terbinafina para MP1 e MP2, por apresentarem melhores resultados de inibição. Foi possível observar que todas as cepas apresentaram sinal de fluorescência quando tratadas com extrato de *C. fairchildiana*, além da redução do número de células quando comparadas ao controle. Das cepas de *M. pachydermatis*, apenas MP1 apresentou sinal fluorescente após o tratamento com Terbinafina. Sugere-se, então, que o extrato rico em peptídeos de *C. fairchildiana* tenha sido capaz de comprometer estruturalmente a membrana plasmática, levando à permeabilização e entrada do corante Sytox Green™, sendo assim possível a emissão do sinal fluorescente (figuras 21-24).

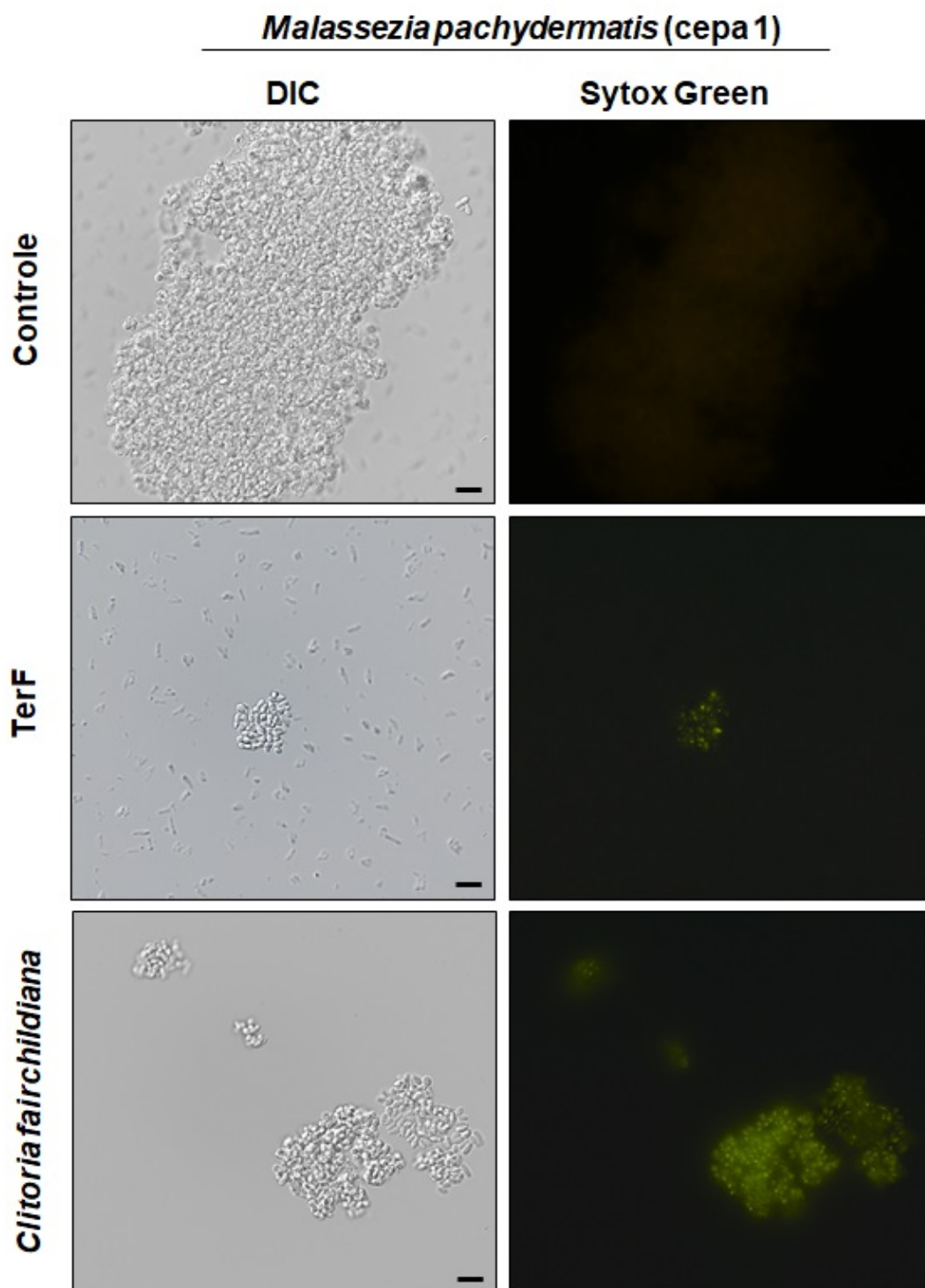


Figura 21: Células de *M. pachydermatis* (cepa MP1) incubadas com a sonda Sytox Green™, após terem crescido na ausência (controle) e na presença de extrato de *C. fairchildiana* [400µg/ml] e Terbinafina [2µg/ml]. Barras = 10µm. Fonte: Imagem cedida pelo Prof. Gabriel Taveira (LFBM).

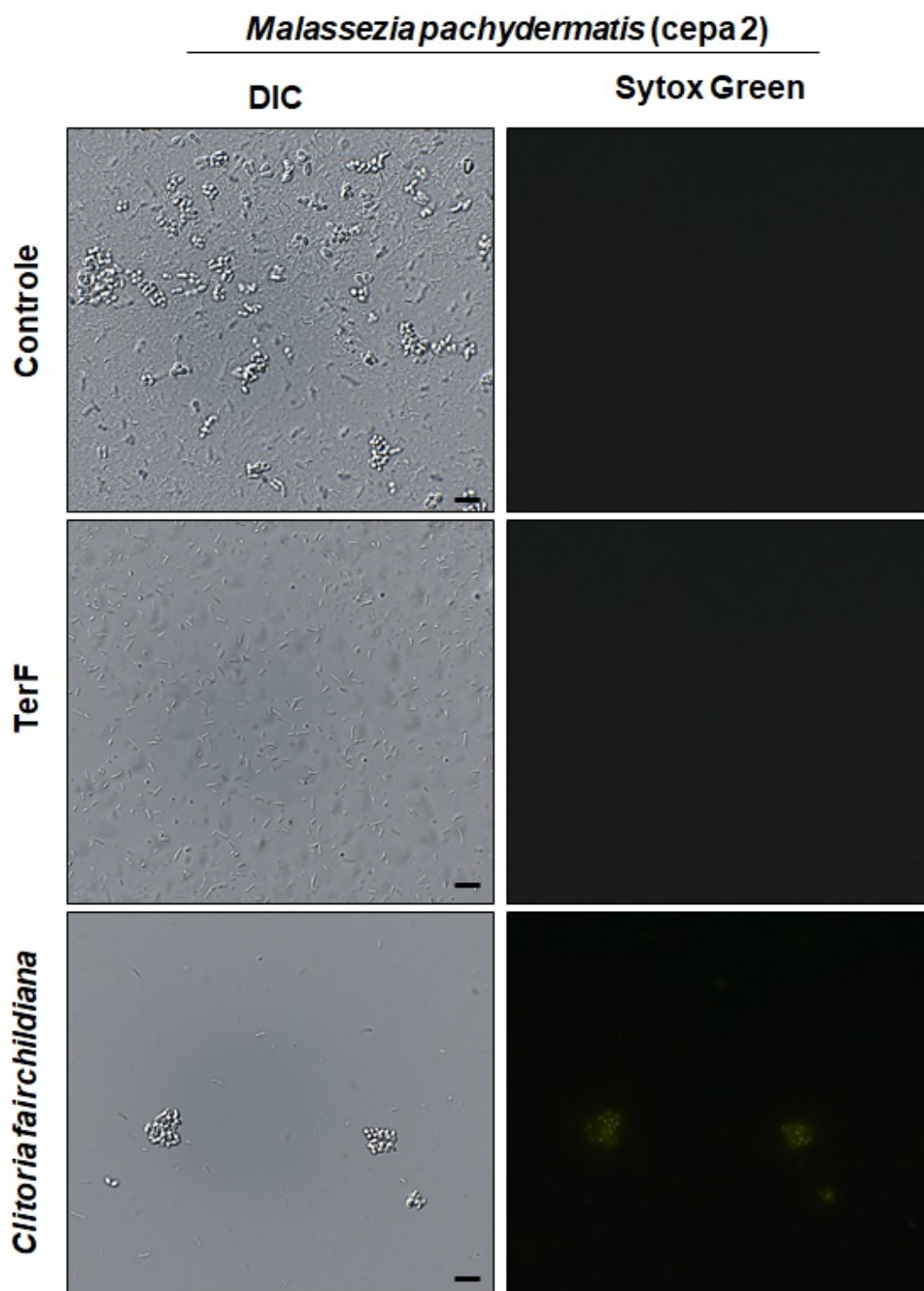


Figura 22: Células de *M. pachydermatis* (cepa MP2) incubadas com a sonda Sytox Green™, após terem crescido na ausência (controle) e na presença de extrato de *C. fairchildiana* [400µg/ml] e Terbinafina [2µg/ml]. Barras = 10µm. Fonte: Imagem cedida pelo Prof. Gabriel Taveira (LFBM).

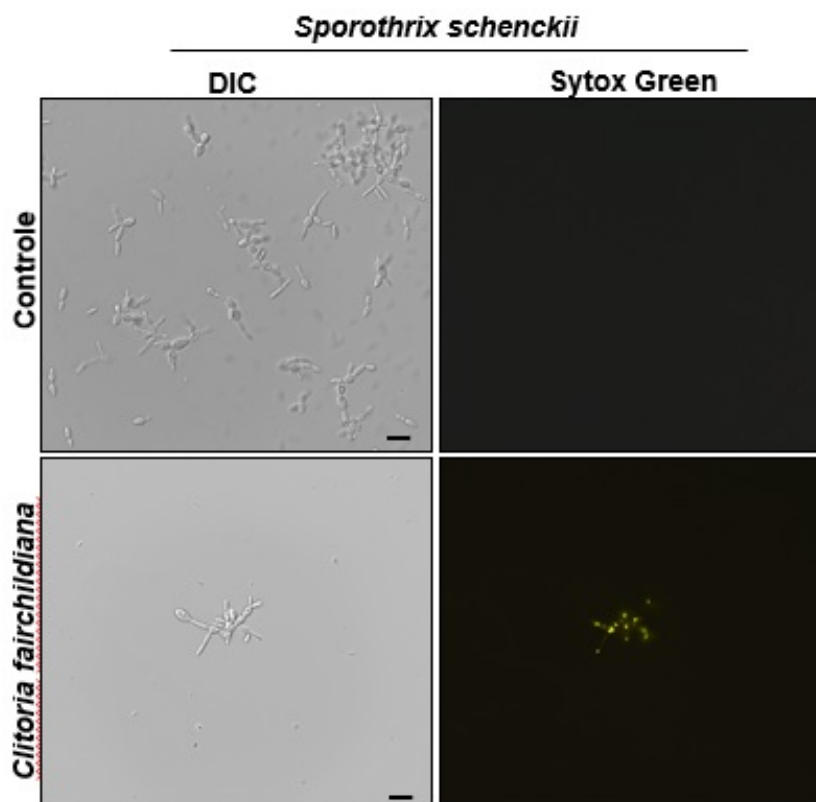


Figura 23: Células de *S. schenckii* ATCC 32285 (cepa S1) incubadas com a sonda Sytox Green™, após terem crescido na ausência (controle) e na presença de extrato de *C. fairchildiana* [800µg/ml]. Barras = 10µm. Fonte: Imagem cedida pelo Prof. Gabriel Taveira (LFBM).

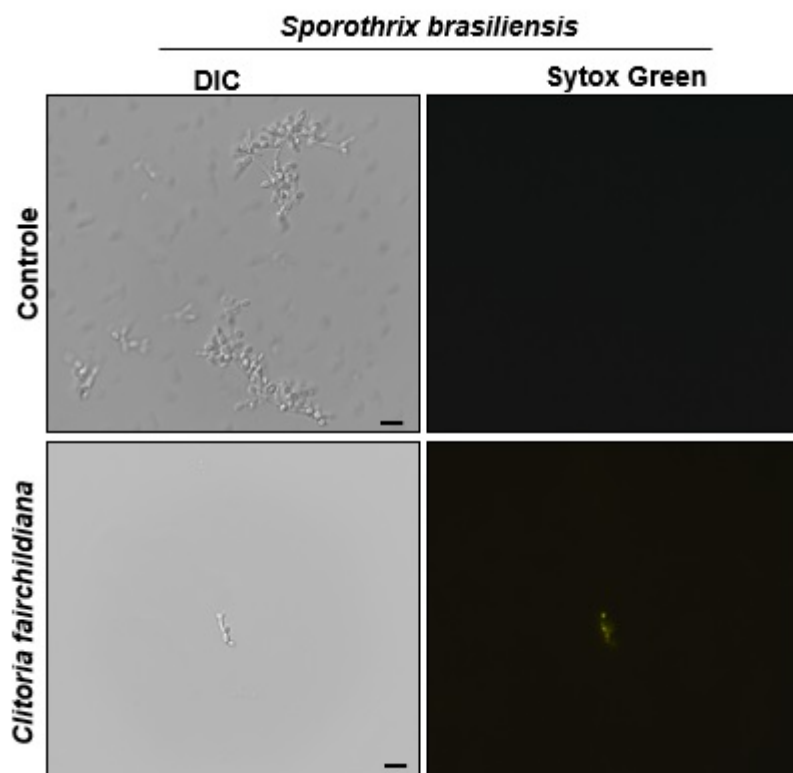


Figura 24: Células de *S. brasiliensis* (cepa S2) incubadas com a sonda Sytox Green™, após terem crescido na ausência (controle) e na presença de extrato de *C. fairchildiana* [800µg/ml]. Barras = 10µm. Fonte: Imagem cedida pelo Prof. Gabriel Taveira (LFBM).

7. DISCUSSÃO

O número de casos de infecções fúngicas que apresentam falhas terapêuticas vem crescendo nos últimos anos. As principais causas dessas ocorrências são imunodeficiência, disponibilidade reduzida dos antifúngicos, mudanças metabólicas dessas drogas, interações medicamentosas e resistência antifúngica (MANZANO-GAYOSSO, *et al.* 2008), principalmente em casos de tratamentos mais longos (BERTO, *et al.* 2018).

Na época presente, existem apenas três classes principais de antifúngicos, os triazóis, polienos (Anfotericina B) e equinocandinas, tornando significativamente limitadas as opções de tratamento em caso de resistência a qualquer uma delas. Em casos de resistência múltipla aos antifúngicos, a micose pode se tornar intratável (BEN-AMI e KONTOYIANNIS, 2021).

Segundo Chen e colaboradores (2017), em unidades de terapia intensiva de hospital em Taiwan, casos de infecções causadas por *M. pachydermatis* resistentes a fluconazol aumentaram após ser instalado protocolo profilático com essa droga para bebês de muito baixo peso. Em saúde animal, diversos achados sugerem desenvolvimento de resistência de *M. pachydermatis*, como relatos de falha de tratamento de otites e dermatites em cães, aumento da exposição dos animais a drogas antifúngicas e diminuição de resposta ao tratamento com drogas antifúngicas (PEANO, 2020).

No presente estudo, pode-se observar que a cepa MP1 apresentou sensibilidade intermediária aos antifúngicos miconazol e cetoconazol. Cafarchia e colaboradores (2012a), após avaliarem isolados de *M. pachydermatis* frente a antifúngicos da classe dos azóis, observaram maior susceptibilidade ao cetoconazol e itraconazol e menor ao fluconazol e miconazol. Em estudo realizado por Ribeiro (2013), foi notada resistência a fluconazol em uma cepa de *M. pachydermatis* e sensibilidade intermediária em outra.

Klafke e colaboradores (2012) estudaram a atividade inibitória de lectinas provenientes de *C. fairchildiana* em oito espécies de leveduras e encontraram resultados positivos em *Candida parapsilosis*. Leite (2012), por sua vez, encontrou redução significativa do crescimento da bactéria saprófita *Bacillus subtilis*, mas não nos fungos dermatófitos testados.

Neste trabalho, o extrato de *C. fairchildiana* foi capaz de inibir o crescimento de duas cepas de *M. pachydermatis* e de *S. schenckii* (ATCC 32285) e *S. brasiliensis*. Costa (2021) ainda relata efeito inibitório sobre bactérias Gram-positiva *Staphylococcus spp.* e Gram-negativa *Escherichia coli*. Outra espécie da mesma família, a *Clitoria ternatea*, já conhecida por sua atividade antimicrobiana, apresentou favorável efeito de atividade antifúngica contra *Aspergillus niger* (KAMILLA *et al.* 2009).

Quanto ao extrato de *P. vulgaris*, foi possível observar neste trabalho que em apenas uma das cepas de *M. pachydermatis* (MP4) houve efeito inibitório, enquanto em duas outras cepas da mesma levedura (MP3 e MP5) e nas cepas de *S. schenckii* e *S. brasiliensis* houve potencialização do crescimento. No trabalho de Chan e colaboradores (2012), um peptídeo extraído de *P. vulgaris* teve atividade inibitória sobre *Mycosphaerella arachidicola*, *Setosphaeria túrcica* e *Bipolaris maydis*, assim como Tofanelli (2018), que observou efeito inibitório nas leveduras de interesse médico *Candida tropicalis* e *Candida albicans*. Segundo Costa (2021), extrato de folha do referido vegetal não foi capaz de inibir significativamente o crescimento das bactérias patogênicas *S. epidermidis*, *S. pseudintermedius*, *S. aureus* e *E. coli*.

No presente estudo, os extratos provenientes de *C. annuum*, foram capazes de inibir algumas cepas de *M. pachydermatis* e as espécies de *Sporothrix*. O extrato de fruto causou perda de viabilidade celular em todas as cepas testadas e, na cepa de *S. brasiliensis*, causou retardo de alguns dias na produção de melanina. O mesmo foi constatado por Júnior e colaboradores (2017), que testaram extratos aquosos e alcoólicos de diferentes partes de 18 cultivares comerciais de pimenta (*Capsicum spp.*) e obtiveram resultado favorável contra os fitopatógenos *Colletotrichum lindemuthianum*, *Alternaria*, *Fusarium oxysporum*, *Phomopsis* e *C. gloeosporioides*. Da mesma forma, Palma (2022) avaliou cepas clínicas multirresistente de *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* frente a alguns extratos vegetais, e o de *C. annuum* L. foi o que teve o melhor desempenho. Estudo realizado por Gebara e colaboradores (2020) avaliou frações provenientes de frutos de *C. annuum* que tiveram efeito inibitório em cepas da espécie *Candida* e *Mycobacterium tuberculosis*; outras frações levaram à permeabilização de membrana de algumas leveduras. Em contraponto, Mangucci e colaboradores (2018) não encontraram atividade antimicrobiana de óleo essencial de pimenta sobre as bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*.

Neste trabalho, foram avaliados possíveis efeitos dos extratos vegetais utilizados no processo de melanização da cepa clínica de *Sporothrix brasiliensis* (S2). As colônias começaram a produção do pigmento por volta do sétimo dia de incubação, exceto uma, tratada com extrato de fruto de *C. annuum*, que apresentou crescimento mais lento no início; só após 10 dias foi possível notar seu escurecimento. Com o passar do tempo, as colônias provenientes dos tratamentos com o extrato de *P. vulgaris* e Terbinafina apresentaram uma coloração mais escura.

Diversos fungos são capazes de produzir melanina, e a presença do pigmento está relacionada à sobrevivência deles, nas mais variadas condições do ambiente e de hospedeiros, além de estar relacionada à diminuição da susceptibilidade a drogas antifúngicas (ALMEIDA-PAES, 2009). Em estudo realizado por Almeida-Paes e colaboradores (2016), observou-se que, em algumas cepas de *Sporothrix*, houve aumento da susceptibilidade à terbinafina, quando utilizados inibidores de DHN-melanina. Notou-se, ainda, que a piomelanina e a eumelanina desempenharam efeito protetor com o antifúngico utilizado.

Como alternativa aos fungicidas convencionais, Mathias e colaboradores (2020) propõem a utilização de compostos heteropoliácidos de prata contra o *S. schenckii*. No estudo, os compostos de sais de prata testados frente a diferentes cepas do fungo tiveram seu efeito inibitório avaliado, a concentração inibitória mínima determinada, além dos efeitos sinérgicos da utilização *in vitro* desses compostos utilizados concomitantemente à antifúngicos comerciais. Também foram investigadas possíveis alterações na morfologia do microrganismo. Como resultados, as substâncias testadas revelaram grau variado de inibição, de médio a bom, dependendo da cepa, efeito sinérgico com alguns antifúngicos e foram relatadas, ainda, alterações danosas à parede celular do patógeno e produção retardada e diminuída de melanina, sugerindo interferência no processo de melanização. Dessa forma, os heteropoliácidos de prata mostraram-se consistentes e promissores contra o *Sporothrix* spp.

Nos resultados obtidos a partir do ensaio de permeabilidade da membrana, pode-se destacar a capacidade do extrato de *C. fairchildiana* de causar danos à membrana celular, pois o corante Sytox Green™ só penetra em células com membranas estruturalmente comprometidas e fluoresce após se ligar a ácidos nucléicos. Thevissen e colaboradores (2014) relatam alterações de membranas tratadas com defensinas, levando à permeabilidade celular.

8. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos nos experimentos realizados e com as metodologias empregadas neste trabalho, foi possível concluir que:

- A cepa MP1 apresenta sensibilidade intermediária aos antifúngicos comerciais Miconazol e Cetoconazol;
- O extrato de *C. fairchildiana* foi capaz de inibir o crescimento das cepas MP1, MP4, S1 e S2, bem como reduziu a viabilidade celular da cepa MP1 em mais de 50%;
- O extrato de *P. vulgaris* inibiu o crescimento da cepa MP4 e potencializou o crescimento de MP3, MP5, S1 e S2, além de ter produzido colônias de *S. brasiliensis* mais escuras quando comparada às colônias controle;
- O extrato de folha de *C. annuum* inibiu o crescimento das cepas MP4, MP5 e S2.
- O extrato de frutos maduros de *C. annuum* levou à inibição das cepas MP3, MP4, MP5, além de ter causado perda da viabilidade celular em todas as cepas de *M. pachydermatis*. As cepas S1 e S2 também tiveram seu crescimento inibido pelo extrato, e uma colônia da segunda cepa começou processo de melanização mais tardiamente em comparação ao controle e aos outros tratamentos com extratos vegetais.
- Os antifúngicos Terbinafina e Anfotericina B inibiram, em algum grau, todas as cepas testadas.
- O extrato de *C. fairchildiana* foi capaz de interagir com a membrana plasmática das células de MP1, MP2, S1 e S2, levando a danos estruturais e possibilitando a entrada do corante Sytox Green™.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILERA, Y. *et al.* Bioactive phenolic compound and functional properties of dehydrated bean flours. **Food Research International**, v.44, p.774-780.

ALMEIDA-PAES, R. *et al.*, Growth conditions influence melanization of Brazilian clinical *Sporothrix schenckii* isolates. **Microbes and Infection**, v.11, p.554-562, Mar. 2009.

ALMEIDA-PAES, R. *et al.* Phenotypic characteristics associated with virulence of clinical isolates from the *Sporothrix* complex. **BioMed Research International**, v.2015, p.1-10, Jan. 2015.

ALMEIDA-PAES, R. *et al.* Melanins protect *Sporothrix brasiliensis* and *Sporothrix schenckii* from the antifungal effects of terbinafine. **PLoS ONE**, v.11, n.3, p.1-13, Mar. 2016.

AL OTHMAN, Z. A. *et al.* Determination of capsaicin and dihydrocapsaicin in *Capsicum* fruit sample using high performance liquid chromatography. **Molecules**, v.16, p.8919-8929, Oct. 2011.

ALVAREZ-PARRILLA, E. *et al.* Antioxidant activity of fresh and processed jalapeño and serrano peppers. **J. Agric. Food Chem.**, v.59, n.1, p.163-173, 2011.

ANGILERI, M. *et al.* Azole resistance of *Malassezia pachydermatis* causing treatment failure in a dog. **Medical Mycology Case Reports**, v.23, p.58-61, 2019.

ANTUNES, T. A. *et al.* Esporotricose cutânea experimental: avaliação *in vivo* do itraconazol e terbinafina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasil, v.42, n.6, p.706-710, Nov-Dez. 2009.

ÁRVORES DA UENF- Projeto árvores da Uenf. Campos dos Goytacazes, RJ, 2020. Disponível em: <https://uenf.br/projetos/arvoresdaueenf/especie-2/sombreiro-de-minas/>. Acesso em: 2 fev. 2021.

BAPTISTA, V. S. *et al.* **Promising application of the SsCBF ELISA test to monitor the therapeutic response of feline sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis* from Brazilian epidemic.** Braz. J. Microbiol. 2020.

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

BEN-AMI, R.; KONTOYIANNIS, D. P. Resistance to Antifungal Drugs. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 35, issue 2, p. 279-311, June 2021.

BERTO, C. *et al.* **Bases da resistência antifúngica: uma revisão comentada.** Revista UNINGÁ, Maringá, v. 55, n. 3, p. 52-71, jul./set. 2018.

BISMARCK, D. *et al.* Antifungal *in vitro* activity of essential oils against clinical isolates of *Malassezia pachydermatis* from canine ears: a report from a practice laboratory. **Complement Med Res**, v.27, p. 143-154, Oct. 2019.

BOND, R. *et al.* Factors associated with elevated cutaneous *Malassezia pachydermatis* populations in dogs with pruritic skin disease. **Journal of Small Animal Practice**, v.37, p.103-107, 1996.

BOND, R. *et al.* Biology, diagnosis and treatment of *Malassezia* dermatitis in dogs and cats. **Vet dermatol**, v.31, p.27-e4, 2020.

BRILHANTE, R. S. N. *et al.* *Malassezia pachydermatis* from animals: planktonic and biofilm antifungal susceptibility and its virulence arsenal. **Veterinary Microbiology**, p.1-16, May. 2018.

BROEKAERT, W. F. *et al.* **An automated quantitative assay for fungal growth inhibition**. FEMS Microbiology Letters. v. 69. P. 55-60. 1990.

CABAÑES, F. J. *Malassezia pachydermatis*: to be, or not to be lipid-dependent. **Rev Iberoam Micol**, Spain, v.37, n.1, p.3-4, Oct. 2019.

CAFARCHIA, C. *et al.* Frequency, body distribution, and population size of *Malassezia* species in healthy dogs and in dogs with localized cutaneous lesions. **J Vet Diagn Invest**, v.17, p.316-322, 2005.

CAFARCHIA, C. *et al.* *In vitro* evaluation of *Malassezia pachydermatis* susceptibility to azole compounds using E-test and CLSI microdilution methods. **Medical Mycology**, v.50, p.795-801, Mar. 2012.

CAFARCHIA, C.; FIGUEREDO, L.A.; FAVUZZI, V.; *et al.* Assessment of the antifungal susceptibility of *Malassezia pachydermatis* in various media using a CLSI protocol. **Vet Microbiol**, n.159, p.536–540, 2012 (a).

CAMPOS, M. L. *et al.* The role of antimicrobial peptides in plant immunity. **Journal of Experimental Botany**, v.69, n.21, p.4997-5011, July. 2018a.

CAMPOS, M. L. *et al.* A structural perspective of plant antimicrobial peptides. **Biochemical Journal**, v.475, p.3359-3375, Nov. 2018b.

CARVALHO, S. I. C. *et al.* **Pimentas do gênero *Capsicum* do Brasil**. 1. ed. Brasília: Embrapa hortaliças, 2006. 27p.

CHAKRABARTI, A. *et al.* Global epidemiology of sporotrichosis. **Medical Mycology**, v.53, n.1, p.3-14, 2015.

CHAN, Y. S. *et al.* **An antifungal peptide from *Phaseolus vulgaris* cv. brown kidney bean**. Acta Biochim Biophys Sin, v.44, n.4, p.307, 2012.

CHEN, I. L. *et al.* Changing of bloodstream infections in a medical center neonatal intensive care unit. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 50, n4, p. 514-520, Aug. 2017.

CHERENE, M.B. *et al.* Structural and biochemical characterization of three antimicrobial peptides from *Capsicum annum* L. var. *annuum* leaves for anti-Candida use. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2023.

CONCOVÁ, E. *et al.* *In vitro* biofilm formation by *Malassezia pachydermatis* isolates and its susceptibility to azole antifungals. *J. Fungi*. v. 8, n. 1209, p. 1-9, nov, 2022.

COSTA, L. G.; SILVA, A. G.; GOMES, D. R. Morfologia de frutos, sementes e plântulas, e anatomia das sementes de sombreiro (*Clitoria fairchildiana*). **Rev. Cienc. Agrar**, v.57, n.4, p.414-421, out/dez. 2014.

COSTA, N. Q. Avaliação da atividade antimicrobiana de peptídeos de origem vegetal em bactérias de importância para saúde pública. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2021.

COSTA, R. O. *et al.* Esporotricose na gestação: relato de cinco casos numa epidemia zoonótica no Rio de Janeiro, Brasil. **An Bras Dermatol**, v.86, n.5, p.995-998, 2011.

CROTHERS, S. L. *et al.* Sporotrichosis: a retrospective evaluation of 23 cases seen in northern California (1987-2007). **Journal compilation ESVD and ACVD**, v.20, p.249-259, Feb. 2009.

CRUZ, L. C. H. Complexo *Sporothrix schenckii*. **Veterinária e Zootecnia**, v.20, p.8-28, 2013.

CRUZ, R. O. *et al.* Casuística de micoses em pequenos animais atendidos em Hospital Veterinário Universitário do Ceará: um estudo retrospectivo. **PUBVET**, Paraná, v.14, n.7, a614, p.1-9, Jul. 2020.

DAVID, M.; GABRIEL, M.; KOPECKÁ, M. Microtubular and actin cytoskeletons and ultrastructural characteristics of the potentially pathogenic basidiomycetous yeast *Malassezia pachydermatis*. **Cell Biology International**, v.31, p.16-23, 2007.

DE BEER, Z. W. *et al.* **The divorce of *Sporothrix* and *Ophiostoma*: solution to a problematic relationship.** *Studies in Mycology*, v.83, p. 165-191, 2016.

DE ALMEIDA, A. J. *et al.* Diagnosis of human sporotrichosis in Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brazil. **J Infect Dev Ctries**, v.13, n.8, p.768-772, June. 2019.

DWORECKA-KASZAK, B.; BIEGANSKA, M. J.; DABROWSKA, I. Occurrence of various pathogenic and opportunistic fungi in skin diseases of domestic animals: a retrospective study. **BMC Veterinary Research**, Poland, v.16, n.248, July. 2020.

EMBRAPA. *Phaseolus vulgaris*, feijão carioca. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-imagens/-/midia/2181002/cultivar-de-feijao-carioca-brsmg-madreperola>. Acesso em: 2 fev. 2021.

FERNANDES, G. F. *et al.* Serodiagnosis of sporotrichosis infection in cats by enzyme-linked immunosorbent assay using a specific antigen, SsCBF, and crude exoantigens. **Veterinary Microbiology**, v.147, p.445-449, July. 2010.

FERREIRA, C. M.; DEL PELOSO, M. J.; FARIA, L. C. Feijão na economia nacional. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2002.

FREITAS, D. F. S. *et al.* Sporotrichosis in HIV-infected patients: report of 21 cases of endemic sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil. **Medical Mycology**, v.50, p.170-178, Feb. 2012.

GALIZA, G. J. N. *et al.* Ocorrência de micoses e pitiose em animais domésticos: 230 casos. **Pesq Vet Bras**, Brasil, v.34, n.3, p. 224-232, Mar. 2014.

GEBARA, R. S. *et al.* Identification and Characterization of two defensins from *Capsicum annuum* fruits that exhibit antimicrobial activity. **Probiotics & Antimicro. Prot.** v.12, p. 1253-1265, 2020. <https://doi.org/10.1007/s12602-020-09647-6>

GOMPertz, O. F. *et al.* Case Report: Atypical clinical presentation of sporotrichosis caused by *Sporothrix globosa* resistant to itraconazole. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.94, n.6, p.1218-1222, 2016.

GREMIÃO, I. D. F. *et al.* Treatment of refractory feline sporotrichosis with a combination of interlesional amphotericin B and oral itraconazole. **Australian Veterinary Journal**, v.89, n.9, p.346-351, Sep. 2011.

GREMIÃO, I. D. F. *et al.* Feline sporotrichosis: epidemiological and clinical aspects. **Medical Mycology**, v.53, n.1, p.15-21, 2015.

GREMIÃO, I. D. F. *et al.* Zoonotic epidemic of sporotrichosis: cat to human transmission. **PLoS Pathog**, v.13, n.1, Jan. 2017.

GUARRO, J.; GENE, J.; STCHIGEL A. M. Developments in fungal taxonomy. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, n.3, p.454-500, July. 1999.

GUILLOT, J.; BOND, R. *Malassezia pachydermatis*: a review. **Medical Mycology**, v.37, p. 295-306, Jan. 1999.

GUILLOT, J.; BOND, R. *Malassezia* yeasts in veterinary dermatology: an updated overview. **Front Cell Infect Microbiol**, USA, v.10, n. 79, Feb. 2020.

GUTERRES, K. A. *et al.* The use (1-3) β -glucan along with itraconazole against canine refractory sporotrichosis. **Mycopathologia**, v.177, p.217-221, Mar. 2014.

ILAH, A., *et al.* Molecular epidemiology of a *Malassezia pachydermatis* neonatal unit outbreak. **Medical Mycology**, Oxford/USA, v.00, n.00, p.1-9, Feb. 2017.

JAMSHIDI-KIA, F.; LORIGOOINI, Z.; AMINI-KHOEI, H. Medicinal plants: past history and future perspective. **J Herbmec Pharmacol.**, v.7, n.1, p. 1-7, Dec. 2018.

JÚNIOR, J. R. V. **Extratos de espécies de capsicum no controle *in vitro* de patógenos de importância agrícola.** Enciclopédia Biosfera, v.14, n.25, p.673, 2017.

KAMILLA, L. *et al.* Effects of *Clitoria ternatea* leaf extract on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger*. *Microscopy and Microanalysis*. V. 15, n.4. p. 366-372, 2009.

KANO, R. *et al.* Molecular diagnosis of feline sporotrichosis. **Veterinary Record**, v.156, p.484-485, Apr. 2005.

KANO, R. *et al.* High multi-azole-resistant *Malassezia pachydermatis* clinical isolates from canine *Malassezia* dermatitis. **Medical Mycology**, v.00, n.00, p.1-4, Mar. 2019.

KAUFFMAN, C. A. *et al.* Clinical practice guidelines for the management os sporotrichosis: 2007 update by the Infectious Diseases Society of America. **IDSA Guidelines for Management of Sporotrichosis**, v.45, p.1255-1265, Oct. 2007.

KIM, M. *et al.* Genomic tandem quadruplication is associated with ketoconazole resistance in *Malassezia pachydermatis*. **J. Microbiol. Biotechnol.**, v.28, n.11, p.1937-1945, Nov. 2018.

KLAFKE, G. B. *et al.* Assessment of plant lectin antifungal potential against yeasts of major importance in medical mycology. **Mycopathologia**, v.175, p.147-151, 2013.

KULAEVA, O. *et al.* The role of plant antimicrobial peptides (AMPs) in response to biotic and abiotic environmental factors. *Bio. Comm.* v. 65, n. 2, p. 187-199, Jan. 2020.

LACAZ, C. S. *et al.* **Tratado de Micologia Médica**, 9. ed. São Paulo: Savier, 2002. 479-497 p.

LARSSON, C. E. Esporotricose. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v.48, n.3, p.250-259, 2011.

LEI, J. *et al.* The antimicrobial peptides and their potential clinical applications. **Am J Transl Res**, v.11, n.7, p.3919-3931, July. 2019.

LEITE, J. F. M. *et al.* Antinociceptive and anti-inflammatory effects of a lectin-like substance from *Clitoria fairchildiana* R. Howard seeds. **Molecules**, v.17, p.3277-3290, Mar. 2012.

LEITE, J. F. M. **Propriedades bioativas e caracterização bioquímica de uma lectina purificada a partir de sementes de *Clitoria fairchildiana* R. A. HOWARD.** Tese de Doutorado. Universidade Federal do Ceará. 67-69p. 2012.

LI, Y. *et al.* Overview on the recente study of antimicrobial peptides: origins, functions, relative mechanisms and application. **Peptides**, v.37, p.207-215, July. 2012.

LLORET, A., *et al.* Sporotrichosis in cats ABCD guidelines on prevention and management. **JFMS Clinical Practice**, USA, v.15, n.7, p.619-623, June. 2013.

LOPES-BEZERRA, L. M.; SCHUBACH, A.; COSTA, R. O. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. **An Acad Bras Cienc**, Brasil, v.78, n.2, p.293-308, Oct. 2006.

MACÊDO-SALES, P. A., *et al.* Domestic feline contribution in the transmission of *Sporothrix* in Rio de Janeiro State Brazil: a comparison between infected and non-infected population. **BMC Vet Res** 14, 19, 2018.

MANGUCCI, C. B. *et al.* **Atividade antimicrobiana e viabilidade econômica do óleo essencial de pimentas do gênero Capsicum**. II Encontro de Desenvolvimento de Processos Agroindustriais- Uniube, 2018.

MANION, C. R.; WIDDER, R. M. Essentials of essential oils. **Am J Health-Syst Pharm**, v.74, n.9, p.153-162, May. 2017.

MANZANO-GAYOSSO, *et al.* **La resistencia a los antifúngicos: un problema emergente en México**. *Gac Méd Méx*. Vol. 144 No. 1, 2008.

MARIMON, R. *et al.* *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa* and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, n.10, p.3198-3206, Oct. 2007.

MARIMON, R. *et al.* *In vitro* antifungal susceptibilities of five species of *Sporothrix*. **Antimicrobial Agentes and Chemotherapy**, v.52, n.2, p.732-734, Feb. 2008.

MATHIAS, L. S. *et al.* Antifungal activity of silver salts of Keggin-type heteropolyacids against *Sporothrix spp.* **J. Microbiol. Biotechnol**, v.30, n.0, p.1-12, 2020.

MAYNARD, L.; RÈME, C. A.; VIAUD, S. Comparison of two shampoos for the treatment of canine *Malassezia* dermatitis: a randomised controlled trial. **Journal of Small Animal Practice**, France, v.52, p.566-572, Nov. 2011.

MCVEY, S.; KENNEDY, M.; CHENGAPPA, M. M. **Microbiologia veterinária**. Tradução José Jurandir Fagliari. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016. 476p.

MESQUITA, F. R. *et al.* Linhagens de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.): composição química e digestibilidade protéica. **Ciênc. Agrotec.**, Lavras, v.31, n.4, p.1114-1121, jul./ago. 2007.

MONTE ALVES, M. *et al.* Fatal pulmonary sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis* in Northeast Brazil. **PLoS Negl Trop Dis**. May, 2020. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008141>

MOOKHERJEE, N., *et al.* Antimicrobial host defence peptides: functions and clinical potential. **Nat Rev Drug Discov**, v.19, p. 311-332, May. 2020.

MORRIS, D. O., *et al.* *Malassezia pachydermatis* carriage in dog owners. **Emerging Infectious Diseases**, v.11, n.1, p. 83-88, June. 2005.

MOSCONE, E. A. *et al.* The evolution of chilli peppers (*Capsicum*-Solanaceae): a cytogenetic perspective. **Acta Horticulture**, v.745, p.137-169, 2007.

NCCLS. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras; Norma Aprovada—Segunda Edição. Norma M27-A2 do NCCLS (ISBN 1-56238-469-4).

NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 Estados Unidos, 2002.

NOBRE, M. O. *et al.* Drogas antifúngicas para pequenos e grandes animais. **Ciência Rural**, v.32, n.1, p.175-184, 2002.

NOTA TÉCNICA 60/2023-CGZV/DEDT/SVSA/MS (0033634745). Nota Técnica acerca de recomendações sobre a vigilância da esporotricose animal no Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde e Meio Ambiente. Brasília, Maio, 2023.

OROFINO-COSTA, R. *et al.* Pulmonary cavitation and skin lesions mimicking tuberculosis in a HIV negative patient caused by *Sporothrix brasiliensis*. **Medical Mycology**, v.2, p.65-71, Feb. 2013.

OROFINO-COSTA, R., *et al.* Sporotrichosis: na update on epidemiology, etiopathogenesis, laboratory and clinical therapeutics. **An Bras Dermatol**, Brasil, v.92, n.5, p. 606-620, July. 2017.

PALMA, A. L. R. **Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana dos extratos de *Calendula officinalis*, *Capsicum annuum* L e *Hamamelis virginiana* L. sobre cepas clínicas multirresistente de *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa***. Tese de Doutorado. Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista, 2022.

PEANO, A. *et al.* Antifungal resistance regarding *Malassezia pachydermatis*: where are we now?. **J. Fungi**, v.6, n.93, p.1-26, June, 2020.

PEREIRA DA SILVA, B.; PARENTE, J. P. Antiinflammatory activity of rotenoids from *Clitoria fairchildiana*. **Phytother. Res.**, v.16, p.87-88, 2002.

PEREIRA, S. A. *et al.* Aspectos terapêuticos da esporotricose felina. **Acta Scientiae Veterinariae**, Rio Grande do Sul, v.37, n.4, p.311-321, Mai. 2009.

PEREIRA, S. A. *et al.* Sensitivity of cytopathological examination in the diagnosis of feline sporotrichosis. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.13, p.220-223, 2011.

PINHEIRO DA SILVA, F.; MACHADO, M. C. C. Antimicrobial peptides: clinical relevance and therapeutic implications. **Peptides**, São Paulo, v.36, p.308-314, June. 2012.

PUIG, L., *et al.* Characterization of the species *Malassezia pachydermatis* and re-evaluation of its lipid dependence using a synthetic agar medium. **PLoS ONE**, v.12, n.6, p.1-12, June 2017.

REIS, E. G. *et al.* Potassium iodide capsule treatment of feline sporotrichosis. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.14, n.6, p.399-404, Mar. 2012.

RIBEIRO, C. S. C. *et al.* **Pimentas *Capsicum***. 21. ed. Brasília: Embrapa hortaliças, 2008. 200p.

RIBEIRO, F. E. F. **Estudo da atividade de *Capsicum baccatum* var. *pendulum*, *Hibiscus sabdariffa* L. e de heteropoliácidos sobre micro-organismos causadores de otite canina**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 55p., 2013.

ROCHA, R. F. D. B. *et al.* Refractory feline sporotrichosis treated with itraconazole combined with potassium iodide. **Journal of Small Animal Practice**, v.59, p.720-721, Nov. 2018.

RODRIGUES, A. M. *et al.* Phylogenetic analysis reveals a high prevalence of *Sporothrix brasiliensis* in feline sporotrichosis outbreaks. **PLoS Negl Trop Dis**, v.7, n.6, p.1-14, June. 2013.

RODRIGUES, A. M. *et al.* Emerging sporotrichosis is driven by clonal and recombinant *Sporothrix* species. **Emerging Microbes and Infections**, v.3, n.32, p.1-10, May. 2014.

RODRIGUES, A. M.; HOOG, G. S.; CAMARGO, Z. P. Molecular diagnosis of pathogenic *Sporothrix* species. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 9, n. 12, p. 1-22, Dec. 2015.

RODRIGUES, A. M.; HOOG, G. S.; CAMARGO, Z. P. *Sporothrix* species causing outbreaks in animals and humans driven by animal-animal transmission. **PLoS Pathog**, v.12, n.7, p.1-7, July. 2016.

SAADATZADEH, M. R. *et al.* Production of the mycelial phase of *Malassezia in vitro*. **Medical Mycology**, UK, v.39, p.487-493, Jan. 2001.

SCHUBACH, T.M.P. *et al.* Isolation of *Sporothrix schenckii* from the nails of domestic cats (*Felis catus*). **Medical Mycology**, v.39, p.147-149, 2001.

SCHUBACH, T. M. P. *et al.* Evaluation of an epidemic of sporotrichosis in cats: 347 cases (1998-2001). **J Am Vet Med Assoc**, v.224, n.10, p.1623-1629, May. 2004.

SCHUBACH, T. M. P.; MENEZES, R. C.; WANKE, B. Esporotricose. In: Greene, C. E. Doenças Infecciosas em cães e gatos. 4ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015. Cap. 61, p.678-684.

SILVA, B. P.; BERNARDO, R. R.; PARENTE, J. P. Rotenoids from roots of *Clitoria fairchildiana*. **Phytochemistry**, v.49, n.6, p.1787-1789, 1998.

SILVA, J. N. *et al.* Diagnostic accuracy assessment of cytopathological examination of feline sporotrichosis. **Medical Mycology**, v.00, n.00, p.1-5, June. 2015.

SMITH, D. F. Q. **Melanization of *Candida auris* is associated with alteration of extracellular pH.** *J. fungi*, v.8, p.1068, Oct. 2022.

SONG, Y. *et al.* Efficacy and safety of itraconazole pulses vs. Continuous regimen in cutaneous sporotrichosis. **JEADV**, v.2011, n.25, p.302-305, June. 2010.

THEVISSSEN, F.R.G. TERRAS, W.F. Broekaert, Permeabilization of fungal membranes by plant defensins inhibits fungal growth, **Appl. Environ. Microbiol.** 65 (1999) 5451–5458. <https://doi.org/10.1128/aem.65.12.5451-5458.1999>.

THEVISSSEN, K. *et al.* Defensins from Insects and Plants Interact with Fungal Glucosylceramides. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 6, p. 3900–3905, 2004.

TOFANELLI, E. J. Atividade antimicrobiana da defensina de semente de *Phaseolus vulgaris* (PvD₁) em combinação com fluconazol sobre as leveduras *Candida tropicalis* e *Candida albicans*. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2018.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 6. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2015. 587p.

TYAGI, C. *et al.* Accelerate molecular dynamics applied to the peptaibol folding problem. **Int. J. Mol. Sci.** v. 20. n. 4268, p. 1-19. 2019.

VENKATESWARAN, S.; PARI, L. Antioxidant effect of *Phaseolus vulgaris* in streptozotocin-induced diabetic rats. **Asia Pacific J Clin Nutr**, v.11, n.3, p.206-209, 2002.

VERMELHO, A.B. *et al.* **Práticas de Microbiologia**. 1.ed. Rio de Janeiro: Editora Guarabara Koogan. 2006. 256p.

VETTORATO, R. *et al.* Sporotrichosis by *Sporothrix schenckii sensu stricto* with itraconazole resistance and terbinafine sensitivity observed *in vitro* and *in vivo*: case report. **Medical Mycology Case Reports**, p.1-7, Oct. 2017.

WU, G., *et al.* Genus-wide comparative genomics of *Malassezia* delineates its phylogeny, physiology, and niche adaptation on human skin. **PLoS Genet**, USA, v. 11, n.11, p.1-26, Nov. 2015.

XUE, S. *et al.* Oral potassium iodide for the treatment of sporotrichosis. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v.4, n.: CD006136, 2009.

YESHAK, M. Y. *et al.* Genotoxicity and cellular uptake of cyclotides: evidence for multiple modes of action. **Mutation Research**, v.747, p.176-181, May. 2012.

ZOSLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms: my perspective. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.1117, p.3-6, Jan. 2019.