



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CAMPUS ARAPIRACA
UNIDADE EDUCACIONAL VIÇOSA
MEDICINA VETERINÁRIA

CLAUDIJANE DE CARVALHO MATOS

**AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DO FUNGO *SPOROTHRIX SCHENCKII* AOS
ANTIFÚNGICOS CONVENCIONAIS E EXTRATOS VEGETAIS PELA TÉCNICA DE
DIFUSÃO DE DISCO.**

Viçosa

2018

CLAUDIJANE DE CARVALHO MATOS

**AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DO FUNGO *SPOROTHRIX SCHENCKII* AOS
ANTIFÚNGICOS CONVENCIONAIS E EXTRATOS VEGETAIS PELA TÉCNICA DE
DIFUSÃO DE DISCO.**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Programa de Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para a obtenção do grau acadêmico em Medicina Veterinária.

Orientador(a): Prof. Dra. Karla Patrícia Chaves da Silva

Viçosa

2018

Folha de Aprovação

CLAUDIJANE DE CARVALHO MATOS

AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DO FUNGO *SPOROTHRIX SCHENCKII* AOS ANTIFÚNGICOS CONVENCIONAIS E EXTRATOS VEGETAIS PELA TÉCNICA DE DIFUSÃO DE DISCO.

Trabalho de conclusão de curso submetido ao corpo docente do Programa de graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 10 de dezembro de 2018.



Professora Doutora Karla Patrícia Chaves da Silva
(Orientadora)

Banca Examinadora:



Médica Veterinária Mestre Luedja Carla Vidal Monteiro Gomes



Químico Mestre Alex Alves Dantas

AGRADECIMENTOS

À razão ímpar de minha vida, amor por excelência, melhor amigo, protetor inigualável. Pai, Filho, Espírito Santo, toda minha gratidão, pois sem o Seu amor e misericórdia eu nada seria.

À Rainha do céu e da terra, Nossa Senhora. Seu colo e olhar de amor me fizeram forte nos momentos de maior tribulação. Obrigada por me fazer sua filha, e por ser tão doce mãe, ó formosa Imaculada.

Aos meus pais Claudio e Jane. Obrigada por sempre lutarem por mim e permitirem que eu pudesse perseguir os meus sonhos. Vocês são minha maior inspiração! Obrigada pela dedicação, por cada telefonema, por vibrarem e chorarem comigo. Essa conquista é nossa! Amor maior que Deus me confiou.

Aos meus irmãos João Paulo, Victor, Claudiane, Viviane e Alexandra. Obrigada por serem os braços que me sustentaram tantas vezes. Saibam que eu tenho muito orgulho de quem vocês se tornaram, e hoje tento seguir seus passos. Obrigada por cada conselho, cada acolhimento, por tantas histórias juntos, por me ensinarem com suas vidas a ser uma pessoa melhor. Em meio a nossa distancia física nosso amor só cresce, e que assim sempre seja. Amo vocês até o fim!

Ao Ícaro, menino que trouxe alegria, força e me fez redescobrir tantos sentimentos bons dentro de mim. Você foi um lindo instrumento de Deus em minha vida, e meu descanso, cantinho de paz em meio de tanta correria. Sem o seu sorriso a me dizer que eu era forte e conseguiria essa luta teria sido bem mais pesada. Obrigada por ser você, obrigada por estar em minha vida.

Aos meus queridos mestres do curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Alagoas. Vocês são o ouro dessa instituição. Para sempre me orgulharei de ter sido aluna de tão excelentíssimos e nobres professores, que além de projetarem seu grande amor pela veterinária durante cada conteúdo passado, nos ensinaram valores pessoais, e nos presentearam com suas sinceras amizades. Palavras de gratidão não bastam ao que vocês representam e merecem. Muito obrigada!

Aos meus colegas de turma e laboratório. Por muitos dias vocês foram minha família, lutaram ao meu lado, e me impulsionaram a dar o melhor de mim. Obrigada pela amizade, confiança, e exemplos que me deram de determinação e foco. Essa caminhada se tornou mais leve tendo pessoas como vocês ao meu lado.

Ao Grupo de Oração Universitário (GOU). Obrigada por exalarem o perfume de Deus no meio acadêmico, onde tantos precisam, onde eu precisei e em vocês pude encontra-lo. Cada reunião foi extremamente importante para mim, vocês foram não só parte da minha conquista profissional, como também parte da minha conversão. Obrigada pelo "SIM" de vocês.

Aos meus filhos felinos, Pimentinha e Pequi, por serem fonte de renovação diária de amor aos animais. Obrigada por me fazerem enxergar os meus futuros pacientes com mais humanidade, e por toda a companhia e amor que me deram gratuitamente nesses anos. Eu amo vocês para sempre!

RESUMO

A esporotricose é uma micose do subcutâneo causada pelo fungo do complexo *Sporothrix schenckii*, que acomete seres humanos e vários animais, principalmente os gatos. Seu tratamento é longo, e muitas vezes leva a não resolução da enfermidade devido a resistência dos fungos aos antifúngicos convencionalmente utilizados na rotina da clínica médica, necessitando de exames que comprovem a susceptibilidade a esses agentes, ou novas alternativas terapêuticas. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo analisar a susceptibilidade do complexo *Sporothrix schenckii* a antifúngicos convencionais e fitoterápicos pelo método de difusão de disco. Os *S. schenckii* foram cedidos pelo Laboratório de Bacteriologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco e submetidos a antifungigrama com uma adaptação da técnica descrita por Kirby-Bauer, utilizando com antifúngicos: Itraconazol, Fluconazol e o Iodeto de Potássio, bem como os extratos vegetais das plantas: *Tabebuia róseo-alba*, *Xylopi laevigata*, *Varronia multispicata* (Cham.), *Xylopi frutescens*, *Byrsonima crista* A. Juss, *Diospyros gaultheriifolia* Mart. ex Miq, *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy, *Aureliana fasciculata* Sendtn, *Senna phlebadenia* H. S. Irwin & Barneby, *Tournefortia bicolor*, *Cocoloba parimensis* Benth, e *Morinda citrifolia*. Foram feitas duas leituras dos halos de inibição, após 48 e 72 horas de incubação na estufa a 37°C. Tendo como resultados a sensibilidade dos fungos ao Itraconazol e fluconazol e ao extrato de *Morinda citrifolia* (Noni), e a resistência aos demais extratos e ao Iodeto de potássio. Também foi possível verificar que o melhor tempo para a análise do tamanho e forma dos halos se dá as 48 horas, e que o meio Ágar *Sabouraud* se mostrou eficiente para o método de difusão de disco para *Sporothrix schenckii*. Com isso, obteve-se como conclusão que O método modificado da técnica de Difusão de Disco para a avaliação de susceptibilidade do complexo *Sporothrix schenckii* demonstrou facilidade em sua aplicação e ótimos resultados, porém se faz necessário estudos que comprovem o nível de eficácia frente ao método já padronizado. Dentre os extratos de plantas regionais, os isolados de *S. schenckii* foram sensíveis a *Morinda citrifolia* (Noni), obtendo padrão de ação semelhante aos antifúngicos convencionais, sendo uma alternativa promissora para o tratamento da micose. Dentre os fármacos, o Itraconazol demonstrou resultados superiores ao Fluconazol, reafirmando ser o fármaco de eleição para essa infecção fúngica.

Palavras-chave: Esporotricose. Antifungigrama. Fitoterapia.

ABSTRACT

Sporotrichosis is a mycosis of the subcutaneous caused by the fungus of the *Sporothrix schenckii* complex, which affects humans and various animals, especially cats. Its treatment is long, and often leads to non-resolution of the disease due to resistance of the fungi to the antifungal agents conventionally used in the routine of the medical clinic, requiring tests that prove the susceptibility to these agents, or new therapeutic alternatives. In this context, the present work aimed to analyze the susceptibility of the *Sporothrix schenckii* complex to conventional antifungals and phytotherapies by the disc diffusion method. The *S. schenckii* were assigned by the Laboratory of Bacteriology of the Federal Rural University of Pernambuco and submitted to antifungigrama with an adaptation of the technique described by Kirby-Bauer, using Itraconazole, Fluconazole and Potassium Iodide with antifungals, as well as plant extracts from plants: *Tabebuia rosewood-alba*, *Xylopia laevigata*, *Varronia multispicata* (Cham.), *Xylopia frutescens*, *Byrsonima crispera* A. Juss, *Diospyros gaultheriifolia* Mart. ex Miq, *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy, *Aureliana fasciculata* Sendtn, *Senna phlebadenia* H. S. Irwin & Barneby, *Tournefortia bicolor*, *Cocoloba parimensis* Benth, and *Morinda citrifolia*. Two readings of the inhibition halos were made after 48 and 72 hours incubation in the oven at 37 ° C. The results showed the sensitivity of fungi to Itraconazole and fluconazole and *Morinda citrifolia* extract (Noni), and the resistance to other extracts and to potassium iodide. It was also possible to verify that the best time for the analysis of the size and shape of the halos is 48 hours, and that the *Sabouraud* agar medium was efficient for the disc diffusion method for *Sporothrix schenckii*. It was concluded that the modified method of the Disk Diffusion technique for the evaluation of the susceptibility of the *Sporothrix schenckii* complex demonstrated ease of application and excellent results, but it is necessary to study the effectiveness of the method already standardized. Among the regional plant extracts, *S. schenckii* isolates were sensitive to *Morinda citrifolia* (Noni), obtaining a pattern of action similar to conventional antifungals, being a promising alternative for the treatment of mycosis. Among the drugs, Itraconazole demonstrated superior results to Fluconazole, reaffirming that it is the drug of choice for this fungal infection.

Key Word: Sporotrichosis. Antifungigram. Phytotherapy

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição mundial dos casos de esporotricose	06
Figura 2 - Macroscopia do <i>S. schenckii</i> cultivados em Ágar <i>Sabouraud</i> após 7 dias na estufa	13
Figura 3 - Microscopia do <i>S. schenckii</i>	13
Figura 4 - Placa para antifungigrama. Meio semeado e com discos de difusão colocados	14
Figura 5 - Antifungigrama após 72 horas em estufa	14
Figura 6 - <i>S. schenckii</i> após 48 horas na estufa a 37°C	15
Figura 7 - <i>S. schenckii</i> após 72 horas na estufa a 37°C	15

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores em milímetros dos halos de inibição contra *S. schenckii*, respectivamente em 48 horas e 72 horas em estufa
16

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DD	Difusão de Disco em Ágar
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
INI	Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas
OMS	Organização Mundial da Saúde
mm	Milímetro
UFAL	Universidade Federal de Alagoas
µL	Microlitro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	01
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	03
2.1 Domésticos.....	04
2.2 Esporotricose.....	05
2.2.1 Epidemiologia.....	06
2.2.2 Agente Etiológico.....	08
2.2.3 Diagnóstico.....	09
2.2.4 Tratamento.....	09
2.3 Fitoterapia.....	10
2.4 Testes de susceptibilidade para o <i>S. schenckii</i>	11
3. MATERIAL MÉTODOS.....	13
4. RESULTADOS DISCUSSÃO.....	15
5. CONCLUSÃO.....	18
REFERÊNCIAS.....	19

1 INTRODUÇÃO

O Brasil detém a quarta maior população de animais do mundo, onde fica em segundo lugar em número de animais de companhia (ABINPET, 2018). Dentre esses, os gatos estão ganhando espaço nos lares brasileiros, estreitando também os laços afetivos com seus proprietários. Por serem animais de vida mais independente, adaptaram-se bem ao novo ritmo das pessoas que possuem espaços cada vez menores.

Por meio desse estreito convívio, juntamente com o não conhecimento e conscientização sobre medidas de prevenção e posse responsável, doenças zoonóticas como a esporotricose têm aumentado sua incidência no território brasileiro. O felino doméstico, graças a seus hábitos e exposição a nichos ambientais, como solos contaminados que contenham o agente da esporotricose, tornou-se a espécie com maior importância epidemiológica para a história dessa infecção fúngica. (BRUM *et al.*, 2007; NUNES, 2008; SCHUBACH *et al.*, 2015).

A esporotricose é uma micose do subcutâneo zoonótica, cosmopolita, que tem como agente etiológico o fungo saprófita do complexo *Sporothrix schenckii*. Esse agente é encontrado com maior frequência em áreas tropicais e temperadas, cujo plantas e vegetais em decomposição no solo são seu habitat natural. A doença é encontrada em diversas espécies, sendo mais relatada em gatos, os quais são considerados seu maior disseminador (RODRIGUES *et al.*, 2014).

Como tratamento, o itraconazol tornou-se o fármaco de escolha em humanos e tem se demonstrado muito eficaz em gatos (BARROS *et al.*, 2010). Outros agentes também são utilizados, são eles: fluconazol, terbinafina, anfotericina B e Iodeto de Potássio (LLORET *et al.*, 2013). Como o uso contínuo desses

fármacos, que varia entre 3 a 12 meses, apresenta certa toxicidade aos pacientes, se faz necessário a procura por novos métodos que possam combater tais infecções fúngicas. Esse fato também é reafirmado por haver uma preocupação em relação a crescente resistência a antifúngicos convencionais relatadas nas últimas décadas (ABAD et. al, 2007).

Para a avaliação da sensibilidade do complexo *S. schenckii* frente aos antifúngicos, existe apenas um método protocolado a partir da norma M38- A2 da Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), o qual possui certa complexidade em sua execução e maquinários específicos, restringindo sua aplicabilidade a laboratórios de maior porte.

Esse teste tem não só aplicabilidade em estudos microbiológicos, como também apresenta uma importante correlação entre os seus resultados e os desfechos clínicos esperados com a terapia indicada. Já que parte dos pequenos laboratórios não conseguem realizar essa metodologia, muitos clínicos veterinários ficam restringidos a prescrever um tratamento que é longo, de alto custo, com vários efeitos colaterais, sem ter ao menos uma segurança da sensibilidade do agente frente ao fármaco instituído.

Como proposta alternativa de tratamento, encontram-se os medicamentos fitoterápicos. Estes são considerados a forma mais antiga empregada para o tratamento de enfermidades correspondendo a uma alternativa barata, eficiente e amplamente difundida para a obtenção de novos fármacos. É uma prática reconhecida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) desde 1978, mas já era utilizada pela humanidade para a prevenção e cura de doenças antes mesmo da civilização humana (CUNHA et al., 2010; RODRIGUES; AMARAL, 2012; ARAUJO, 2013).

Nesse contexto, esse estudo teve como objetivo principal analisar a susceptibilidade do complexo *Sporothrix schenckii* a antifúngicos convencionais e fitoterápicos pelo método de difusão de disco. Tendo como objetivos específicos padronizar método de difusão de disco como alternativa para antifungigrama do complexo *Sporothrix schenckii*; identificar resistência ao Itraconazol, Fluconazol e Iodeto de Potássio; e avaliar ação antifúngica de extratos vegetais da região da zona da mata alagoana que possam vir a servir como alternativa para o tratamento da esporotricose.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Felino doméstico

A espécie *Felis catus* (gato doméstico) surgiu no oriente médio a partir de várias espécies de gatos selvagens. Os primeiros relatos de gatos domesticados datam de 9.500 anos atrás, onde felinos já eram sepultados junto aos seus proprietários. Atualmente com cerca de 600 milhões de animais espalhados e domesticados por todos os continentes, o gato é considerado o animal de estimação mais popular do mundo (DRISCOLL et al., 2009).

A proximidade com humanos, bem como sua popularidade se deu pela fácil adaptação a ambientes fechados, maior independência emocional e cotidiana quando comparados a outras espécies como os caninos. Na Europa e EUA o número de gatos domésticos superou o de cães já em 2012. No Brasil existem mais de 22 milhões de gatos, sendo um dos poucos países que ainda não superam o número de cães nos domicílios. Todo esse convívio resulta em mudanças positivas na vida dos humanos como o aumento da autoestima, diminuição do estresse, proporciona estímulos cognitivos, controle da depressão e mais benefícios físicos como o controle da pressão arterial. (ABINPET, 2013; FEDIAF, 2018; PFI, 2018).

Porém, essa estreita convivência também pode trazer desagrvos à saúde humana, voltando-se principalmente para as zoonoses. Dentre elas, destaca-se a esporotricose, doença que tem crescente número de casos no Brasil (BARROS et al. 2010). Os felinos desempenham um importante papel para a disseminação dessa doença, pois além de apresentarem uma intensa infecção, podem transmitir o agente através de mordidas ou arranhaduras, inoculando o fungo no subcutâneo do tecido de humanos e de outras espécies (SCHUBACH et al., 2015).

Outro fator decisivo para a relação dos felinos com a esporotricose está em seus hábitos de arranhar árvores, enterrar suas fezes, lambe seus corpos e brigas territoriais com outros felinos, onde os animais são expostos ao agente que está presente no ambiente, seja no solo ou unhas de animais infectados, contaminando-se e facilitando a transmissão interespecífica (MADRID, 2012; SCHUBACH et al., 2015).

2. 2 Esporotricose

A esporotricose é uma zoonose, caracterizada como uma micose subcutânea de curso subagudo ou crônico, causada pelo complexo *Sporothrix schenckii*, (RODRIGUES et al., 2014). Ocorre com maior prevalência em certos profissionais, caracterizando-se como uma doença ocupacional de jardineiros, agricultores, mineiros, caçadores, médicos veterinários e pescadores. Sua principal forma de contágio se dá pela lesão traumática através da inoculação do fungo presente em material vegetal ou orgânico de solo contaminado, solução de continuidade cutânea pré-existente, pela mordedura ou arranhadura de animais acometidos, e mais raramente pela inalação de esporos (LACAZ et al., 2002; LACERDA FILHO et al., 1999; SCHUBACH et al., 2015).

Além do ser humano, a esporotricose é uma doença que atinge várias espécies. Há relatos em primatas, cães, gatos, bovinos, equídeos, suínos, aves, caprinos, golfinhos, tatus e alguns artrópodes como abelhas, formigas e pulgas (LARSSON, 2011). Dentre todas as espécies, o gato é a de maior importância epidemiológica e que possui a maior prevalência dentre os casos dessa infecção. Esses animais detêm hábitos de arranhadura em troncos, enterrar dejetos e brigas territoriais que facilitam o contágio e a disseminação do fungo, abrigando-os nos espaços subungueais de suas unhas, podendo também carregá-los na cavidade oral e em lesões ricas de leveduriforme (BARR & BOWMAN, 2006).

Essa infecção apresenta lesões as quais se assemelham com outras afecções granulomatosas e neoplasias cutâneas. São áreas não pruriginosas, indolores, que ocorrem na maioria das vezes na região cefálica, membros e cauda. Lesões de brigas, abscessos, criptococose podem usualmente ser confundidas, porém com a evolução do caso as lesões passam a ser necróticas, erosivas, com ulcerações e crostas. Com isso, o diagnóstico definitivo deve ocorrer por meio de

exames complementares, descartando as possibilidades diferenciais (LAPPIN, 1993; SCHUBACH et al., 2003; GADEA & CUENCA-ESTRELLA, 2004 apud MEINERZ, 2007).

2.2.1 Epidemiologia

A esporotricose tem uma distribuição cosmopolita sendo mais encontrado em regiões de clima tropical e temperado (BRUM et al., 2007). É uma doença rara na Europa, porém é considerada a micose subcutânea mais comum em humanos na



América Latina (GREENE, 2012). Segundo Zhang e colaboradores (2015) China, África do Sul e Brasil apresentam o maior número de casos registrados seja em humanos ou animais, sendo apontados como as regiões de maior endemia. A Figura 1 elucida a distribuição e carga relativa da esporotricose em todo o mundo.

Epidemias com altos números de casos e atingindo extensas áreas são raras, porém nas últimas duas décadas houve ocorrência de diversos surtos, principalmente devido a mudanças de sua epidemiologia, distribuição mais ampla do agente e sua evolução taxonômica. Nesses casos geralmente o ambiente possui uma fonte de infecção em comum (BUSTAMANTE & CAMPOS, 2004; BARROS et al. 2010).

Fonte: CHAKRABATI et al., 2015.

O primeiro caso humano foi relatado por Benjamin Schenck. Ocorreu em 1898, nos Estados Unidos (EUA), no qual o fungo foi classificado no gênero *Sporotrichum* após seu isolamento a partir de uma lesão linfangítica no membro

superior direito do paciente (SCHENCK, 1898). Lutz e Splendore, em 1907, descreveram o primeiro caso de esporotricose do Brasil. Tal relato ocorreu no estado de São Paulo onde a infecção se deu em um homem e em ratos.

Na década de 40 ocorreu, na África, o maior surto já registrado desta infecção. Onde reportaram mais de 3.000 casos de esporotricose em apenas dois anos, acometendo trabalhadores de uma mina de ouro (HELM & BERMAN, 1947). Nos últimos anos, a Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) relatou 3.244 casos no Brasil em felinos domésticos e aproximadamente 2.200 casos em humanos diagnosticados entre os anos de 1998 e 2009. Portanto, o Brasil passou a deter a maior epidemia, tanto em animais quanto em humanos, já descrita no mundo (CHAKRABATI et al., 2015). Essa epidemia se dá principalmente pela transmissão zoonótica, a qual é observada principalmente na Região do Rio de Janeiro (BARROS et al. 2010), porém essa infecção fúngica já foi relatado em vários estados brasileiros, destacando-se também por seu número de casos, nos estados do São Paulo (MONTENEGRO et al., 2014) e Pernambuco (SES-PE, 2017).

A esporotricose não é uma doença de notificação obrigatória na maioria dos países. Com isso, os dados conhecidos são oriundos de artigos científicos publicados, tendo sua verdadeira prevalência desconhecida (CHAKRABATI et al. 2015). Porém, com o status hiperendêmico atribuído a situação da esporotricose no Rio de Janeiro, a doença se tornou de notificação obrigatória no estado desde julho de 2013, por meio da resolução SES nº 674 de 12 de junho de 2013, e pela portaria GM/MS nº 1.271 de 6 de junho de 2014, no artigo 2º, parágrafo IV, para a notificação dos animais acometidos. Desde então mais de 4.000 casos em humanos e 4.000 casos em felinos foram diagnosticados somente no Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI) (GREMIÃO et al., 2015).

Essa endemia, que é causada principalmente pelo *Sporothrix brasiliensis*, resulta de uma alta susceptibilidade do gato e seus comportamentos, juntamente com a alta virulência do agente e sua recente ingressão na população dos felinos urbanos da região, mostrando a importância da interação patógeno-hospedeiro-ambiente para a disseminação da infecção fúngica (MONTENEGRO et al., 2014).

2.2.2 Agente Etiológico

A esporotricose é uma infecção fúngica causada pelos fungos do complexo *Sporothrix schenckii*, terminologia essa recentemente empregada. Somente em 2013, RODRIGUES e colaboradores mostraram, a partir de ensaios filogenéticos, que o *S. schenckii* constitui pelo menos seis distintas espécies, as quais ocorrem em diferentes regiões globais. São elas: *S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. albicans*, *S. mexicana*, e *S. luriei*, além do *S. schenckii* sensu stricto. Essas são pertencentes ao reino Fungi, filo Ascomycota, classe Pyrenomycetes, ordem Ophiostomatales, família Ophiostomataceae e gênero *Sporothrix*.

Dentre os casos que ocorrem no Brasil, RODRIGUES e colaboradores (2013) afirmaram que em 96,9% das amostras das infecções de gatos prevalecia o *S. brasiliensis*. Outras novas cinco espécies foram descritas, porém não apresentaram patogenicidade sendo classificadas como ambientais, são elas: *S. stylites*, *S. humicola*, *S. lignivora*, *S. brunneoviolacea* e *S. dimorphospora*. (MEYER, et al., 2008; MADRID et al., 2010a).

Trata-se de fungos termodimórficos, apresentando forma filamentosa quando submetidos a temperatura de 25° C, seja *in vitro* ou no meio ambiente, e adquirindo a forma leveduriforme, seja *in vitro* ou em parasitismo, na temperatura de 37°C. Dentre essas, a leveduriforme é descrita com maior virulência que a forma micelial. O mesmo também é classificado como saprófito pois tem como habitat natural o solo com vegetação em decomposição, podendo ser encontrado em ambientes úmidos e quentes como cascas de árvores, vegetais, solo e materiais em decomposição (RODRIGUES *et al.*, 2013; SCHUBACH et al., 2015).

Esses fungos geralmente são isolados em meio de cultura Ágar *Sabouraud*, adicionados ou não de antibióticos, antifúngicos e nutrientes; bem como em ágar batata e ágar infusão cérebro-coração. As amostras devem ser incubadas de 25 a 37°C, por até três semanas, sendo perceptível o crescimento da forma filamentosa em 5 a 7 dias (LACAZ et al., 2002). Geralmente macroscopicamente não há diferença entre as espécies, as quais se apresentam com textura que varia de lisa a enrugada, membranosa ou aveludada; coloração branca ou amarelada, ganhando um tom mais escuro com o passar do tempo devido a produção melanina (BARROS et al., 2011). Quando ocorre a conversão a 37°C passando a leveduriforme, as colônias apresentam consistência cremosa, coloração esbranquiçada a castanha, textura lisa e úmida (MARIMON et al., 2007).

Na microscopia é observada hifas hialinas, septadas e finas, ligadas a conídios soltos e de forma oval. A depender da espécie, os conídios têm sua forma e tamanho variados (MARIMON et al., 2007). Já na forma de levedura sua micromorfologia é apresentada a partir de várias formas como estruturas ovais, redonda ou em formas de naveta, e tamanhos variados (BARROS et al., 2011).

2.2.3 Diagnóstico

O diagnóstico presuntivo da esporotricose pode se dar por meio da observação das lesões associadas as características epidemiológicas da região. Todavia, se faz indispensável o uso de exames complementares que deem a confirmação da suspeita. O exame mais comumente realizado em felinos ainda é a citologia das lesões cutâneas, nela, é possível observar a forma leveduriforme compatível com o complexo *Sporothrix*, porém, facilmente pode ser confundido com outros patógenos levando a falsos positivos. Já a cultura micológica consegue informar um resultado mais fidedigno, sendo o exame padrão de referência para o estabelecimento do diagnóstico definitivo (LACERDA FILHO et al., 1999; SILVA et al., 2018).

De acordo com Silva e colaboradores (2018), métodos alternativos podem ser utilizados quando não há possibilidade do requerimento de uma cultura. O seu estudo aponta que os exames imunohistoquímico, histopatológico e citopatológico, quando realizados em conjunto, apresentam alta sensibilidade e boa performance para um diagnóstico seguro em todas as espécies.

2.2.4 Tratamento

Os tratamentos podem variar de acordo com a espécie acometida. Para os felinos as principais drogas utilizadas são: os azólicos (Itraconazol), os triazólicos (posaconazol e fluconazol), os iodetos de sódio e potássio, a terbinafina e a anfotericina B, com tempos de tratamento que podem variar de no mínimo três meses até doze meses, a depender do aparecimento dos efeitos colaterais e cicatrização das feridas (PEREIRA et al., 2009; MADRID et al., 2010). Deve-se levar em consideração que mesmo após a resolução das lesões o tratamento deve

perpetuar por mais 4 semanas, sendo acompanhado de exames que garantam a estabilidade do paciente (LARSSON, 2011).

Para o estabelecimento da escolha do fármaco mais adequado variáveis como a condição clínica do paciente, efeitos adversos, interações medicamentosas e custo do medicamento devem ser levadas em consideração, buscando aumentar a qualidade de vida do paciente e diminuir a evasão do tratamento pelos tutores (CORDEIRO et al., 2011).

Para autores como Mahajan (2014), Bonifaz e colaboradores (2015), a escolha também pode ser baseada pela forma clínica manifestada pela doença. A escolha padrão para a forma cutânea é a terbinafina, a qual possui propriedades fungistática, fungicida e antimicótica. O iodeto de potássio é utilizado principalmente para o combate da forma linfocutânea das infecções pelo complexo *Sporothrix schenckii*, já em casos sistêmicos a recomendação é pela utilização da anfotericina. Nos demais acometimentos itraconazol, fluconazol e cetoconazol são utilizados com sucesso.

Porém, com o uso indiscriminado de drogas que combatem infecções, incluindo os antifúngicos, possibilitou a resistência do *S. Schenkii* aos antimicrobianos usuais de forma isolada (ROCHA, 2014; GOMPertz, et al., 2016; SHAHRAM, et al., 2016). Com isso, tratamentos associados ou alternativos são propostos com a intenção de reduzir o uso desses agentes. Entre essas alternativas encontra-se a crioterapia, a termoterapia e fitoterapia, os quais estão sendo amplamente estudados e empregados como auxiliares, na tentativa de acelerarem o tratamento (BONIFAZ et al., 2015; LIMA et al., 2017).

A termoterapia utiliza-se de raios infravermelhos para inviabilizar o crescimento de fungos não termotolerantes, podendo aquecer os tecidos a temperaturas de até 43°C (SCHUBACH et al., 2015). Seu uso é válido não somente para uma associação com outros métodos de tratamento, mas também como uso exclusivo, assim como atestado por Honse et al. (2010) que obteve a cura em um felino com duas aplicações diárias por sete semanas, somente com o uso de termoterapia.

Autores como Pereira et al. (2013), Souza et al. (2016) e Secchin et al. (2017) relataram casos de esporotricose felina e humana que tiveram ótimos resultados tendo como a criocirurgia um tratamento adjuvante ao convencional,

indicando principalmente em casos nos quais o tratamento antifúngico supera os seis meses e sem resolução aparente.

2.3 Fitoterapia

O uso de plantas para fins medicinais é uma prática já realizada, de acordo com estudos arqueológicos, desde os anos 3.000 A.C., onde ervas compiladas eram designadas para determinados fins terapêuticos. Ao longo da história, as plantas medicinais foram responsáveis pela maior contribuição em descobertas de novos medicamentos (REZENDE, 2002; BRASIL, 2012).

No Brasil a fitoterapia apresenta também uma parte cultural expressiva, bem como parte do cuidado básico com a saúde da população brasileira, não somente pela ação terapêutica como também pela viabilidade econômica (NASCIMENTO JUNIOR et al., 2016). De acordo com Dutra et al. (2016), como detentor da maior biodiversidade do mundo, o Brasil ainda precisa explorar mais suas plantas medicinais, necessitando de ações que estimulem tais estudos.

Uma das propriedades já comprovadas de certas plantas medicinais é a ação antimicrobiana e capacidade de potencializar a atividade antibiótica, a qual possui um mecanismo de combate ao agente diferente dos medicamentos usuais, fazendo desses extratos uma considerável alternativa para patógenos resistentes às drogas (GIBBONS, 2003; TINTINO et al., 2013).

Essa resistência também vem acompanhada com um crescente número de infecções fúngicas registradas nos últimos anos. Tendo em vista que os antifúngicos convencionais possuem efeitos colaterais, problemas de toxicidade e alto custo, há uma crescente demanda para o desenvolvimento de novos fármacos, que atuem de forma direta ou adjuvante, sejam menos tóxicos e mais seletivos. Logo, os fitoterápicos dispõem de possibilidades ilimitadas para a essa demanda (ABAD et al., 2007).

Nesse contexto, plantas da medicina tradicional vem sendo estudadas em busca de ações antimicrobianas frente a tais infecções fúngicas. Extratos como o do óleo essencial do orégano (*Origanum vulgare*), já demonstraram em estudos sua boa ação *in vitro* frente a espécie do complexo *S. schenckii* (WALLER et al. 2016), bem como o extrato aquoso de chá verde (*Camelia sinensis*), e o própolis marrom brasileiro (*Apis mellífera*) que também demonstraram resultados promissores frente a

espécie *Sporothrix brasiliensis* (WALLER et al., 2015; WALLER et al., 2017). Tais estudos estimulam e comprovam a importância sobre a descoberta das propriedades medicinais das plantas vastamente encontradas nos biomas brasileiros.

2.4 Testes de susceptibilidade para o *S. schenckii*

O Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) é um órgão internacional que nas últimas duas décadas vem estabelecendo métodos padronizados e aprovados consensualmente e mundialmente para testes de sensibilidade a antimicrobianos.

Para o complexo *Sporothrix schenckii* o protocolo padrão foi proposto pela CLSI na norma M38-A2, a qual baseia-se no método de microdiluição em caldo que abrange fungos filamentosos (CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2008). Porém, esse teste exige uma maior capacitação por parte do pesquisador, sendo uma técnica complexa, a qual não é aplicável para laboratórios menores.

Com isso, outras provas surgiram no mercado, entre elas está o E-test, que se baseia na difusão em gradiente de concentração dos antifúngicos em ágar por meio de uma fita de papel que é colocada na superfície do meio. Mas apresenta elevado custo não se enquadrando a uma realidade para rotina laboratorial (MEINERZ, 2010; CUENCA-ESTRELLA, 2011).

Considerado um dos métodos mais usuais, confiáveis e com alta facilidade de implementação, o método de difusão de disco em ágar (DD) baseia-se na medição de um halo de inibição formado a partir da ausência de crescimento bacteriano em uma cultura a partir de um disco impregnado com substâncias antimicrobianas, demonstrando se há sensibilidade ao agente (PINTO et al., 2003). O teste já foi utilizado por autores como Prakash et al. (2015), Gandhi et al. (2015) e Manika et al. (2016) para testar fitoterápicos anti-*Sporothrix schenckii*, obtendo resultados confiáveis.

É importante ressaltar que há uma metodologia aplicada a DD para leveduras pela norma M44-A (CLSSI, 2004) considerado padrão e referência, mas que se restringe apenas ao gênero *Cândida* spp., não sendo aplicável para fungos filamentosos ou dimórficos como o *S. schenckii*, salientando assim a importância de

mais pesquisas que possam contribuir para a padronização e disseminação do método.

3. MATERIAL E MÉTODOS

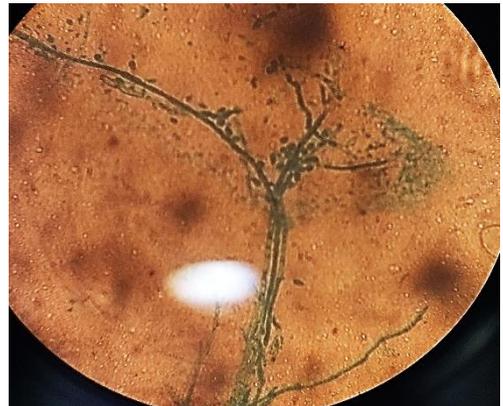
Foram utilizados três isolados clínicos do complexo *Sporothrix schenckii* cedidos pelo Laboratório de Bacterioses dos Animais Domésticos da Universidade Federal Rural de Pernambuco, que para caráter de denominação foram chamadas genericamente de Ssc4, Ssc 5 e Ssc 6.

No Laboratório de Doenças Infecciosas da Universidade Federal de Alagoas, para conservação e manutenção dos microrganismos, as culturas fúngicas foram replicadas em placas Petri contendo meio de cultura Ágar *Sabouraud*, e incubadas em estufa a $28^{\circ} \text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 7 a 10 dias. Após esse período as colônias do complexo *S. schenckii* já apresentavam suas características macroscópicas de coloração esbranquiçada, membranosa e enrugada, como observado na figura 2. Também foi possível observar em microscopia os conídios e conidióforos, estruturas de reprodução (Figura 3).

Figura 2 – Macroscopia do *S. schenckii* cultivados em Ágar *Sabouraud* após 7 dias na estufa.

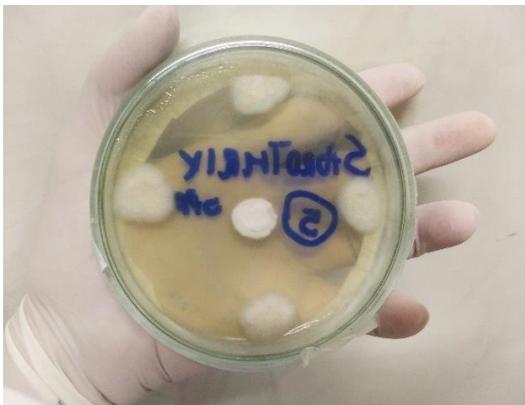
Figura 3 – Microscopia do *S. schenckii*

Os fungos foram submetidos a teste de sensibilidade *in vitro* a o qual foi realizado baseando-se na técnica de difusão em disco descrita por Kirby-Bauer para antibiograma, conforme CLSI (2005), sendo necessário a adaptação do meio de cultura, temperatura, e tempo de incubação. Foram utilizados os antifúngicos Flucanazol, Itraconazol e Iodeto de Potássio.



Fonte: Arquivo pessoal.

Para a pesquisa com fitoterápicos foram utilizados 12 extratos de plantas da zona da mata alagoana, são elas: *Tabebuia róseo-alba* (Ipê-branco), *Xylopi laevigata* (Meiú), *Varronia multispicata* (Chá de Caboclo), *Xylopi frutescens* (Embira Vermelha), *Byrsonima crisper* A. Juss (Murici-da-mata), *Diospyros gaultheriifolia* Mart. ex Miq.(Grão-de-macaco), *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy (Pau de Lacre), *Aureliana fasciculata* Sendtn (Courana), *Senna phlebadenia* H. S. Irwin & Barneby



(São João), *Tournefortia bicolor* (Erva-de-lagarto), *Cocoloba parimensis* Benth (Cocoloba), e *Morinda citrifolia* (Noni). Tais extratos foram cedidos pelo Laboratório Didático de Química da UFAL, sendo produzidos a partir da técnica de extração utilizando solventes como o etanol.

Prosseguindo a técnica de antifungigrama adaptada, para a preparação do inóculo, os fungos foram transferidos com auxílio de uma alça de platina para um tubo contendo 4 – 5 ml de caldo nutritivo duas vezes mais concentrado que o recomendado pelo fabricante, sendo posteriormente colocados em estufa a 37°C por 48 horas.

Posteriormente, com auxílio de um vortex o meio era agitado, ajustando a turbidez da suspensão do inóculo. A inoculação era feita em meio Ágar *Sabouraud* através do uso de um swab estéril que foi mergulhado na suspensão, esfregando em toda a superfície a fim de assegurar ampla distribuição do inóculo.

Os discos confeccionados a partir de papel filtro foram colocados na superfície da placa semeada (Figura 4). Por meio de um pipetador automático, cada disco era impregnado com 10µl de um extrato ou antifúngico determinado. Em seguida, as placas foram colocadas na estufa a 37°C, sendo analisadas a cada 24 horas, sendo a leitura final realizada em 72 horas, analisando a formação e diâmetro dos halos de inibição do crescimento fúngico (Figura 5).

Figura 4 – Placa para antifungigrama. Meio semeado e com discos de difusão colocados.

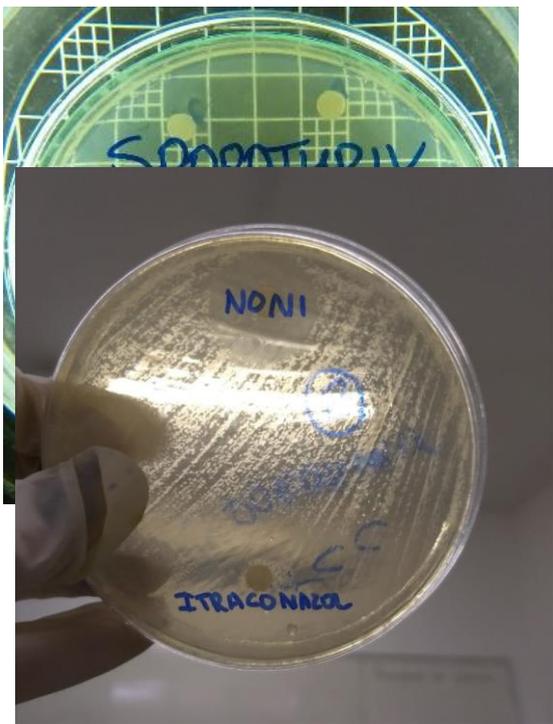
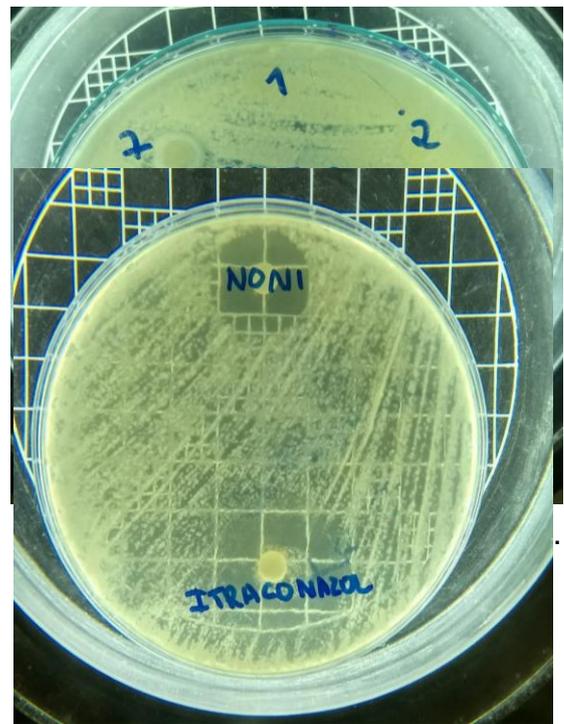


Figura 5 – Antifungigrama após 72 horas em estufa.



4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Por se tratar de uma metodologia modificada dos testes de susceptibilidade propostos para o complexo *S. schenckii*, foi preciso modificar o tempo de incubação necessário para a o crescimento em caldo nutritivo e análise do halo de inibição. Nesse estudo foi possível observar considerável crescimento do microrganismo,

Figura 6 - *S. schenckii* após 48 horas na estufa a 37°C.

Figura 7 – *S. schenckii* após 72 horas na estufa a 37° C.

Fonte: Arquivo pessoal.

aumentando consideravelmente a turbidez do caldo nutritivo após os 2 dias. Quanto a formação de halos, a melhor leitura ocorreu as 48 horas, onde já havia crescimento considerável da cultura. Nesse período os halos atingiram sua maior formação e dimensão. Na medição as 72 horas, já havia uma diminuição dos diâmetros obtendo um resultado inferior quando comparado com a leitura anterior. Nas figuras 6 e 7 pode-se ver uma comparação entre a mesma cultura com 48 horas e com 72 horas de incubação.

Também foi possível observar uma boa eficiência do meio de cultura empregado nesse estudo. O uso do *Ágar Sabouraud* se mostrou um meio adequado para a realização do antifungigrama pra essa metodologia. Meio esse também utilizado por Manika et al. (2016) e Ghandi et al. (2015), onde em seus estudos conseguiram produzir resultados também em 48 horas com o meio *Ágar sabouraud*, diferindo apenas com a temperatura de incubação, sendo 28° C e temperatura ambiente respectivamente. Nesse contexto, deve ser levado em consideração a afirmação feita por Magdali et al. (2000) sobre o dimorfismo do *S. schenckii*, o qual quando submetido a 28°C apresenta-se em sua forma filamentosa, já nesta pesquisa o antifungigrama foi desenvolvido a temperatura de 37°C com o fungo na forma leveduriforme, a qual tem maior virulência e é a forma infectante no processo de doença no animal e ser humano.

Ainda sobre o diâmetro dos halos, a tabela 1 demonstra as avaliações feitas em 48 e 72 horas. Utilizando-se do mesmo critério que Manika et al. (2016) descreveu em seu estudo, onde definiu que zonas de inibição acima de 10 mm são consideráveis de alta atividade antifúngica, 4-10mm atividade moderada, e < 4mm pouca ou nenhuma atividade, percebe-se uma alta atividade do extrato de *Morinda citrifolia* frente aos três cultivos clínicos desse estudo.

A *Morinda citrifolia*, popularmente conhecida como “noni”, já é utilizada tradicionalmente por possuir ação antifúngica, anti-inflamatória, entre outras. Estudos como os realizados por Goun et al. (2003) e Mompilé et al. (2014), confirmam o resultado desse estudo demonstrando a ação antimicrobiana do noni, sendo apontado como responsáveis por essa atividade os metabólitos secundários quinonas, coumarinas e flavonoides produzidos por esse vegetal.

Tabela 1 – Valores em milímetros dos halos de inibição contra *S. schenckii*,

respectivamente em 48 horas e 72 horas em estufa.

	<i>S. schenckii</i> 4		<i>S. schenckii</i> 5		<i>S. schenckii</i> 6	
	48 horas	72 horas	48 horas	72 horas	48 horas	72 horas
<i>Morinda citrifolia</i>	22	20	26	25	22	22
Itraconazol	24	24	28	25	21	21
Fluconazol	22	22	21	19	25	24
Iodeto de potássio	R	R	R	R	R	R

R - Resistente

Nos três cultivos de *S. schenckii* não foi observado nenhuma atividade de susceptibilidade, não havendo formação de halos de inibição aos extratos de *Tabebuia róseo-alba*, *Xylopia laevigata*, *Varronia multispicata* (Cham.), *Xylopia frutescens*, *Byrsonima crisper* A. Juss, *Diospyros gaultheriifolia* Mart. ex Miq, *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy, *Aureliana fasciculata* Sendtn, *Senna phlebadenia* H. S. Irwin & Barneby, *Tournefortia bicolor* e *Cocoloba parimensis* Benth. Esse resultado não exclui a possibilidade da ação antimicrobiana de tais extratos, mas sim instiga ao estudo de novas possibilidades terapêuticas dos mesmos.

Quanto aos antifúngicos convencionais, contrário de alguns estudos feitos onde houve alta resistência do *S. schenckii*, principalmente ao Itraconazol (MEINERZ et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2011; BORBA-SANTOS et al., 2015), nesse estudo houve alta sensibilidade dos isolados frente a este fármaco e ao Fluconazol, pertencentes ao mesmo grupo de derivados azólicos. Considerando que dentre as espécies do complexo *Sporothrix schenckii* o agente de maior incidência no território brasileiro é o *S. brasiliensis* (OLIVEIRA et al., 2011; RODRIGUES et al., 2013), estudos como o de Rodrigues et al. (2014) demonstram uma maior susceptibilidade desse agente ao Itraconazol quando comparados com as outras espécies do complexo, amparando assim o fato de não ser observado resistência nesse estudo.

O Iodeto de Potássio não resultou em formação de halos em nenhum dos três cultivos. Porém de acordo com Torres-Mendoza et al. (1997) esse fármaco pode ou não levar dano celular da levedura *in vitro* por meio da conversão de iodeto de

potássio para iodo, sendo ainda desconhecido por quais vias isso aconteceria. A grande ação do iodeto de potássio, na verdade, se dá através da modulação da resposta imune e inflamatória, não podendo assim ser negada sua eficácia através de testes de susceptibilidade com resultados negativos.

4. CONCLUSÃO

O método modificado da técnica de Difusão de Disco para a avaliação de susceptibilidade do complexo *Sporothrix schenckii* demonstrou facilidade em sua aplicação e ótimos resultados, porém se faz necessário estudos que comprovem o nível de eficácia frente ao método já padronizado. Dentre os extratos de plantas regionais, os isolados de *S. schenckii* foram sensíveis a *Morinda citrifolia* (Noni), obtendo padrão de ação semelhante aos antifúngicos convencionais, sendo uma alternativa promissora para o tratamento da micose. Dentre os fármacos, o Itraconazol demonstrou resultados superiores ao Fluconazol, reafirmando ser o fármaco de eleição para essa infecção fúngica.

REFERÊNCIAS

ABAD, M. J.; ANSUATEGUI, M.; BERMEJO, P. Active antifungal substances from natural source. **Archive for Organic Chemistry**, v. 2007, n. 7, p. 116-145, 2007.

ABINPET - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA ANIMAIS DE ESTIMAÇÃO. O Setor e seus números. Disponível em: <http://abinpet.org.br/faq/> Acesso em: 03 de dezembro de 2018.

ARAUJO, S. G. de. **Perspectivas de Desafios para o Desenvolvimento de Fitoterápicos com Plantas Medicinais da Mata Atlântica para Uso Veterinário**. [Especialização]. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2013.

BARR, S. C.; BOWMAN, D. D. **The 5-minute veterinary consult clinical companion: canine and feline infectious diseases and parasitology**. Ames: Blackwell Publishing, p. 628, 2006.

BARROS, M. B.; ALMEIDA, P. R.; SCHUBACH, A. O. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 4, p. 633-654, 2011.

BARROS, M. B.; SCHUBACH, T. P.; COLL, J. O.; GREMIAO, I. D.; WANKE, B.; SCHUBACH, A. Sporotrichosis: development and challenges of an epidemic. **Revista Panamericxana de Salud Publica**, v. 27, n. 6, p. 455-460, 2010.

BONIFAZ, A.; ROJAS-PADILLA. R.; TIRADO-SÁNCHEZ, A.; PONCE, R. M. Sporotrichosis. The state of the art. In RAZZAGHI-ABYANEH, M.; SHAMS-GHAHFAROKHI, M.; RAI, M. **Medical mycology**: current trends and future prospects. New York: CRC Press - Taylor & Francis Group, p. 430, 2015

BORBA-SANTOS, L. P.; RODRIGUES, A. M.; GAGINI, T. B.; FERNANDES, G. F.; CASTRO, R.; CAMARGO, Z. P. Susceptibility of *Sporothrix brasiliensis* isolates to amphotecicin B, azoles, and terbinafine. **Medical Micology**, v. 52, n. 2, p. 178- 188, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção á Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na atenção básica**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder executivo, Brasília, DF, 2012.

BRUM, L. C. *et al.* Principais dermatoses zoonoticas de caes e gatos. **Clínica Veterinária**, São Paulo, n. 69, p. 29-46, 2007.

BUSTAMANTE, B.; CAMPOS, P. E. Sporotrichosis: a forgotten disease in the drug rsearch. **Expert review of anti-infective therapry**, v. 2, p. 85-94, 2004.

CHAKRABARTI, A.; BONIFAZ, A.; GUTIERREZ-GALHARDO, M.C.; MOCHIZUKI, T.; LI, S. Global epidemiology of sporotrichosis. **Medical Mycology**, v. 53, p. 3–14, 2015.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous**

Fungi; Approved Standard. CLSI document M38-A2 [ISBN 1-56238-668-9]. CLSI, Pennsylvania, USA. 2008.

CORDEIRO, F. N.; PAULA, C.D.R.; BRUNO, C.B.; MOTTA, J.O.C. Orientação familiar de esporotricose zoonótica. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v.86, n.4, p.121-124, 2011.

CUENCA-ESTRELLA, M.; BASSETTI, M.; LASS-FLÖRL, C.; RÁCIL, Z.; RICHARDSON, M.; ROGERS, T. R. Detection and investigation of invasive mould disease. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 1, p.15-24, 2011.

CUNHA, D. F.; FILHO, J. A. C. L.; SAMPAIO, M. O.; AMARAL, C. R. A.; MELO, T. M. V.; MESQUITA, E. P.; SILVA, J. G.; RAMOS, I. A. S.; SOUSA, W. M. A.; COELHO, M. C. O. C. Oficina de Fitoterapia – Manipulação de Plantas Mediciniais. **X Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão** – UFRPE, Recife, 2010.

DRISCOLL, C. A.; CLUTTON-BROCK, J.; KITCHENER, C.; O'BRIEN, S. J. A longa e Incompleta Domesticação do Gato. **Scientific American Brasil**. Disponível em: <https://www2.uol.com.br/sciam/reportagens/a_longa_e_incompleta_domesticacao_do_gato.html>. Acesso em: 23 de novembro de 2018.

DUTRA, R. C.; CAMPOS, M. M.; SANTOS, A. R.S.; CALIXTO, J. B. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug Discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, vol. 112, pag. 4 – 29, 2016.

FEDIAF - THE EUROPEAN PET FOOD INDUSTRY. European Statistics. Disponível em: <http://www.fediaf.org/who-we-are/european-statistics.html> Acesso em: 03 de dezembro de 2018.

GADEA, I.; CUENCA-ESTRELLA, M. Recomendaciones para el diagnostico micológico y studios de sensibilidade a los antifúngicos. **Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clinical**, v. 22, p. 32-39, 2004.

GANDHI, P. P.; VENKATALAKSHMI, P.; BRINDHA, P. Efficacy of *Terminalia catappa* L. wood and bark against some fungal species. **International Journal of current Microbiology and Applied Sciences**, v. 4, n. 9, p. 74-80, 2015.

GIBBONS, S. An overview of plant extracts as potential therapeutics. **Expert Opinion Therapeutic Patents**, v.13, p.489-497, 2003.

GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 4. ed. Saint Louis: Elsevier, 2012, p.1376.

GREMIÃO, I.D.F.; MENEZES, R. C.; SCHUBACH, T. M.; FIGUEIREDO, A. B.; CAVALCANTI, M. C.; PEREIRA, S. A. Feline sporotrichosis: epidemiological and clinical aspects. **Medical Mycology**. v. 53: p. 15-21, 2015.

GOMPERTZ, O. F.; RODRIGUES, A. M.; FERNANDES, G. F.; BENTUBO, H. D. L.; CAMARGO, Z. P.; PETRI, V. Atypical Clinical presentation of Sporotrichosis caused by *Sporothrix globosa* resistant to itraconazole. **The American Journal of Tropical Medicine na Hygiene**, v. 94, n.6, p. 1218 – 1222, 2016.

GOUN, E.; CUNNINGHAM, G.; CHU, D.; NGUYEN, C.; MILES, D. Antibacterial and antifungal activity of Indonesian ethnomedical plants. **Fitoterapia**, v. 74, n. 6, p. 592-596, 2003.

HELM, M.; BERMAN, C. The clinical, therapeutic and epidemiological features of sporotrichosis infection of the mines. In: **Proceedings of the Transvaal Mine Medical Officers' Association Symposium on Sporotrichosis Infection on Mines of the Witwatersrand (Johannesburg)**. Johannesburg, South Africa: The Transvaal Chamber of Mines, 1947.

HONSE, C. O.; RODRIGUES, A. M.; GREMIAO, I. D.; PEREIRA, S. A.; SCHUBACH, T. M. Use of local hyperthermia to treat sporotrichosis in a cat. **Veterinary Record**, v. 166, n. 7, p. 208- 209, 2010.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N. T.

Tratado de Micologia Médica Lacaz. 9. ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 1104p.

LACERDA FILHO, A. M.; BANDEIRA, V.; SIDRIM, J. J. C. Micoses subcutâneas. In: Sidrim, J. J. C.; Moreira, J. L. B. **Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. Cap. 13, p. 132-151.

LAPPIN, M. R. Feline Zoonotic diseases. **The Veterinary Clinics of North American**, v. 23, p. 57-78, 1993.

LRSSON, C. E. Esporotricose. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 48, n. 3, p. 250-259, 2011.

LIMA, Rebeca Mól. **Óleos essenciais como alternativa inovadora para o tratamento da esporotricose.** Tese (mestrado). Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2017.

LLORET, A.; HARTMANN, K.; PENNISI, M. G.; FERRER, L.; ADDIE, D.; BELÁK, S.; BOUCRAUT-BARALON, C.; EGBERINK, H.; FRYMUS, T.; GRUFFYDD-JONES, T.; HOSIE, M. J.; LUTZ, H.; MARSILIO, F.; MÖSTL, K.; RADFORD, A. D.; THIRY, E.; TRUYEN, U.; HORZINEK, M. C. Sporotrichosis in Cats: ABCD guidelines on prevention and management. **Journal fo Feline Medicine and Surgery**, v. 15, n. 7, p. 619-623, 2013.

LUTZ, A. & SPLENDORE, A. Sobre uma micose observada em homens e ratos. **Revista Médica de São Paulo.** v. 21, p. 433-450, 1907.

MADRID, H.; GENÉ, J.; CANO, J.; SILVEIRA, C.; GUARRO, J. *Sporothrix brunneoviolacea* and *Sporothrix dimorphospora*, two new members of the *Ophiostoma stenoceras-Sporothrix schenckii* complex. **Mycologia.** V. 102, n. 5, p. 1193-1203, 2010a.

MADRID, I. M.; MATTEI, A. S.; FERNANDES, C. G.; NOBRE, M. O.; MEIRELES, M. C. A. Epidemiological findings and laboratory evaluation of Sporotrichosis: a description of 103 cases in cats and dogs in southern Brazil. **Mycopathologia**, v. 173, p. 265-273, 2012.

MADRID, I.M.; MATTEI, A.S.; MARTINS, A.F.; NOBRE, M.O.; MEIRELES M.C.A. Feline sporotrichosis in the Southern Region of Rio Grande do Sul, Brazil: clinical, zoonotic and therapeutic aspects. **Zoonoses and Public Health**, v.57, n.2, p.151-154, 2010.

MAGALDI, S.; Hartung, C.; Mata, S.; Verde, G.; & Pérez, C. Susceptibilidad de *Sporothrix schenckii* in vitro en fase filamentosa y de levadura. **Boletín de la Sociedad Venezolana de Microbiología**, v. 20, n. 2, p. 113-116, 2000.

MAHAJAN, V. K. Sporotrichosis: an overview and therapeutic options. **Dermatology Research and Practice**, v. 2014, p. 01-13, 2014.

MANIKA, N.; CHANOTIYA, C. S.; DAROKAR, M.; SINGH, S.; BAGCHI, G. D. Compositional Characters and Antimicrobial Potential of *Artemisia stricta* Edgew. f. *stricta* Pamp. Essential Oil. **Records of Natural Products**, v. 10, p. 40-46, 2016.

MARIMON, R.; CANO, J.; GENÉ, J.; SUTTON, D.A.; KAWASAKI, M.; GUARRO, J. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 45: p. 3198-3206, 2007.

MEINERZ, A. R. M.; CLEFF, M. B.; NASCENTE, P. S.; OSÓRIO, L. G.; LUND, R. G.; MEIRELES, M. C. A.; MELLO, J. R. B. Avaliação dos métodos de Etest e microdiluição em caldo para estudo da susceptibilidade do *Sporothrix schenckii* com o Itraconazol. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, pag. 344-348, 2010.

MEINERZ, A. R. M.; NASCENTE, P. S.; SCHUCH, L. F.; CLEFF, M. B.; SANTIN, R.; BRUM, C. S. Susceptibilidade *invitro* de isolados de *Sporothrix schenckii* frente a terbinafina e Itraconazol. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, p. 60-62, 2007.

MEYER, E.M.; BEER, Z.W.; SUMMERBELL, R.C.; MOHARRAM, A.M.; HOOG, G.S.; VISMER, H.F.; WINGFIELD, M.J. Taxonomy and phylogeny of new wood- and soil-

inhabiting species in the *Ophiostoma stenoceras* - *Sporothrix schenckii* complex. **Mycologia**, v. 100, p.647–661, 2008.

MOMPIÉ, A. C.; SANCHEZ, Y. M. P.; CUNHANUNE, C. L. C.; LORENTE, C. P.; AGUILA, F.C. Evaluación de la atividade antimicrobiana de extractos de hojas y semillas de *Morinda citrifolia* L. (noni). **Revista Cubana de Plantas Medicinai**s, V. 19, n.1, pag.374-382, 2014.

MONTENEGRO, H.; RODRIGUES, A. M.; DIAS, M. A. G.; SILVA, E. A.; BERNARDI, F.; CAMARGO, Z. P. Feline sporotrichosis due to *Sporothrix brasiliensis*: an emerging animal infection in São Paulo, Brazil. **BMC Veterinary Research**, v.10, p. 269, 2014.

NASCIMENTO JÚNIOR, B.J.; TÍNEL, L.O.; SILVA, E.S.; RODRIGUES, L. A.; FREITAS, T. O. N.; NUNES, X. P.; AMORIM, E. L. C. Avaliação do conhecimento e percepção dos profissionais da estratégia de saúde da família sobre o uso de plantas medicinais e fitoterapia em Petrolina-PE, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v.18, n.1, p.57-66, 2016.

NCCLS - Clinical Laboratory Standards Institute **Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts**; Proposed Guideline - M. 44, 2004.

NUNES, J. O. R. **Caracterização da população de cães e gatos e avaliação do nível de conhecimento dos moradores sobre zoonoses e posse responsável dos animais de estimação no bairro Centro do Município de Jaboticabal/SP**. Monografia (Trabalho de Graduação em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.

OLIVEIRA, D. C.; LOPES, P. G. M.; SPADER, T. B.; MAHL, C. D.; TRONCO-ALVES, G. R.; LARA, V. M.; SANTURIO, J. M.; ALVES, S. H. Antifungal Susceptibilities of *Sporothrix albicans*, *S. Brasiliensis*, and *S. luriei* of *S. schenckii* complex Identified in Brazil. **Journal Clinico of Microbiology**, p. 3034-3049, 2011.

PEREIRA, A. V.; DAIHA, M. C.; PEREIRA, S. A.; et al. Cryosurgery in a cat with localized sporotrichosis refractory to oral itraconazole. In: INTERNATIONAL MEETING ON *Sporothrix* AND SPOROTRICHOSIS, 2013, Rio de Janeiro. **ANAIS**, Rio de Janeiro: UERJ, p. 80, 2013.

PEREIRA, S. A. **Esporotricose felina: estudo terapêutico no Rio de Janeiro** [Doutorado]. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz; 2009.

PFI - PET FOOD INSTITUTE. Explore the Huma-animal Bond. Disponível em: <https://www.petfoodinstitute.org/a-pets-life/the-human-animal-bond/explore-the-human-animal-bond/> Acesso em: 03 de dezembro de 2018.

PRAKASH, R.; AGAWAL, S.; SRIVASTAVA, A.; NIGAM, V. Analysis of essential Oil of turmeric Rhizome and its activity against *Sporothrix schenckii* fungus. **Oriental Journal of Chemistry**, v. 31, n. 4, p. 2213-2214, 2015.

PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; OHARA, M.T. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. 2. ed. São Paulo: Atheneu Editora, p. 325, 2003.

REZENDE, H.A.; COCCO, M. I. M. A utilização de fitoterapia no cotidiano de uma população rural. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, vol. 36, n. 3, pag. 282-288, 2002.

Rocha, R. F. D. B. **Tratamento da esporotricose felina refratária com a associação de iodeto de potássio e itraconazol oral**. [Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas. Rio de Janeiro, 2014.

RODRIGUES, A. G.; AMARAL, A. C. F.; Aspectos sobre o desenvolvimento da fitoterapia. **Cadernos de Atenção Básica: Práticas Integrativas e Completares – Plantas Medicinais e Fitoterapia na Atenção Básica**. Ministério da Saúde, Brasília, n. 31, p. 13-16, 2012.

RODRIGUES, A. M.; HOOQ, G. S.; CAMARGO, Z.P. Genotyping species of the *Sporothrix schenckii* complex by PCR-RFLP of calmodulin. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 78, n. 4, p.383-387, 2014.

RODRIGUES, A. M.; TEIXEIRA, M. M.; HOOG, G. S.; SCHUBACH, T. M. P.; PEREIRA, S. A.; FERNANDES, G. F. Phylogenetic Analysis Reveals a High Prevalence of *Sporothrix brasiliensis* in Feline Sporotrichosis Outbreaks. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 6, p. 2281, 2013.

SCHENCK, B.R. On Refractory subcutaneous abscesses caused by a fungus possibly related to the sporotricha. **Bulletin of the Johns Hopkins Hospital**. v. 240, p. 286-90, 1898.

SECCHIN, P.; SEABRA, G. R. P.; ISHIDA, C. E.; AZULAY, D. R.; FERNANDES, N. C. Criocirurgia como tratamento adjuvante na esporotricose: relato de três casos. **Surgical And Cosmetic Dermatology**, v. 9, n. 3, p. 254-258, 2017.

SES - SECRETARIA ESTADUAL DE SAÚDE SES Lança Informativo sobre Esporotricose. Disponível em: <<http://portal.saude.pe.gov.br/noticias/secretaria-executiva-de-vigilancia-em-saude/ses-lanca-informativo-sobre-esporotricose>> Acesso em: 20 de setembro de 2018.

SHAHRAM, Mahmoudi; FARIDEH, Zaini; PARIVASH, Kordbacheh; MAHIN, Safara. High Resistance of *Sporothrix schenckii* complex to three azolic antifungal drugs. **Congress on quality improvement in clinical laboratories**, v. 14, 2016.

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

SCHUBACH, T. M.; SCHUBACH, A. D.E. O.; CUZZI-MAYA, T.; OKAMOTO, T.; REIS, R. S.; MONTEIRO, P. C.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; WANKE, B. Pathology of sporotrichosis in 10 cats in Rio de Janeiro. **Veterinary Record**, v. 152, n. 6, p. 172-175, 2003.

SILVA, J.N.; Miranda, L.H. M.; Menezes, R. C.; GREMIÃO, I. D. F.; OLIVEIRA, R. V. C.; VIEIRA, S. M. M.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.; FERREIRO, L.; PEREIRA, S. A. Comparison of the sensitivity of three methods for the early diagnosis of Sporothichosis in cats. **Journal of Comparative Pathology**, v.160, p. 72-78, 2018.

SOUZA, C. P.; LUCAS, R.; RAMADINHA, R. H. R.; PIRES, T. B. C. P. Cryosurgery in association with itraconazole for the treatment of feline sporotrichosis. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 18, n. 2, p. 137–143, 2016.

TINTINO, S. R.; GUEDES, G. M. M.; CUNHA, F. A. B.; SANTOS, K. K. A.; MATIAS, E. F. F.; MORAIS-BRAGA, M. F. B., ANDRADE, J. C.; SOUZA, E. S.; FREITAS, M. A.; ALENCAR, L. B. B.; COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M. In vitro evaluation of antimicrobial activity and modulating the ethanol and hexane extracts of *Costus arabicus* bulb. **Bioscience Journal**, v. 29, n. 3, pag. 732-738, 2013.

TORRES-MENDOZA BM, VAZQUEZ-VALLS E, GONZALEZ-MENDOZA A. Effect of potassium iodide on the immune response in the sporotrichosis. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 14, n. 3, p. 98-100, 1997.

WALLER, S. B.; MADRID, I. M.; CLEFF, M. B.; et al. Effects of essential oils of *Rosmarinus officinalis* Linn. and *Origanum vulgare* Linn. from different origins on *Sporothrix brasiliensis* and *Sporothrix schenckii* complex. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 68, n. 4, p. 991-999, 2016.

WALLER, S. B.; MADRID, I. M.; SERRA, E. F.; et al. *In vitro* susceptibility of the *Sporothrix brasiliensis* to aqueous extracts of the green tea (*Camelia sinensis* L. Kuntze). **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 9, n. 4, p. 342-347, 2015.

WALLER, S. B.; PETER, C. M.; HOFFMANN, J. F.; et al. Chemical and cytotoxic analyses of brown Brazilian propolis (*Apis mellifera*) and its *in vitro* activity against itraconazole-resistant *Sporothrix brasiliensis*. **Microbial Pathogenesis**, v. 105, p. 117-121, 2017.

ZHANG, Y.; HAGEN, F; STIELOW, B.; RODRIGUES, A. M.; SAMERPITAK, K.; ZHOU, X.; FENG, P.; YANG, L.; CHEN, M.; DENG, S.; LI, S.; LIAO, W.; LI, R.; LI, F.;

MEIS, J. F.; GUARRO, J.; TEIXEIRA, M.; AL-ZAHRANI, H. S.; CAMARGO, Z. P.; ZHANG, L.; HOOG, G. S. Phylogeography and evolutionary patterns in *Sporothrix* spanning more than 14.000 human and animal case reports. **Persoonia**. p. 1-20, 2015.