

**Melaleuca alternifolia** Cheel (Myrtaceae), **Citrus limon** (L.) Burm.f. (Rutaceae), **Caryocar brasiliense** Cambess (Caryocaraceae), **Pelargonium graveolens** L'Hér (Geraniaceae) e extrato de Própolis como inibidores *in vitro* de **Sporothrix schenckii****Melaleuca alternifolia** Cheel (Myrtaceae), **Citrus limon** (L.) Burm.f. (Rutaceae), **Caryocar brasiliense** Cambess (Caryocaraceae), **Pelargonium graveolens** L'Hér (Geraniaceae) and Propolis extract as *in vitro* **Sporothrix schenckii** inhibitors

Sabrina Rosa Magalhães Garcia<sup>1b</sup>, Esther Izaias Ribeiro<sup>1b</sup>, Leticia Tavares Ferreira Rocha<sup>1b</sup>, Swiany Silveira Lima<sup>1b</sup>, Fernanda Prieto Bruckner<sup>1b</sup>, Marisa Cristina da Fonseca Casteluber<sup>1b\*</sup>

**RESUMO**

A esporotricose, uma micose subcutânea causada por fungos do gênero *Sporothrix*, tem o itraconazol como terapia de primeira escolha. Relatos de resistência têm sido observados tanto ao itraconazol quanto à anfotericina B, culminando em falhas nos tratamentos e surgimento de casos clínicos com infecções pulmonar ou sistêmica. O objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* o efeito dos óleos essenciais (OEs) de *Melaleuca alternifolia* Cheel (Myrtaceae), *Citrus limon* (L.) Burm.f. (Rutaceae), *Caryocar brasiliense* Cambess (Caryocaraceae), *Pelargonium graveolens* L'Hér (Geraniaceae) e extrato de própolis isolado ou em associação, na inibição do crescimento de *S. schenckii*. Os métodos utilizados foram Kirb-Bauer, difusão de disco em ágar, Concentração Inibitória Mínima e Concentração Fungicida Mínima. Os óleos essenciais e o extrato de própolis inibiram o crescimento fúngico, superando os efeitos do itraconazol. Este foi capaz de inibir o crescimento de *S. schenckii* até a diluição de 4mg.mL<sup>-1</sup> (diluição 10<sup>-3</sup>). Os OEs de melaleuca, gerânio, limão, todos na concentração de 10mg.mL<sup>-1</sup> e extrato de própolis na concentração de 20mg.mL<sup>-1</sup>, foram capazes de inibir, respectivamente, o desenvolvimento desse fungo em concentrações inferiores a 0,325mg.mL<sup>-1</sup> (diluição 10<sup>-6</sup>), a 0,15625mg.mL<sup>-1</sup> (diluição 10<sup>-7</sup>), a 0,325mg.mL<sup>-1</sup> (diluição 10<sup>-4</sup>) e a 0,625mg.mL<sup>-1</sup> (diluição 10<sup>-6</sup>). Os óleos essenciais de gerânio e melaleuca apresentaram os melhores efeitos inibitórios e potencial fungicida contra *S. schenckii*. Os resultados obtidos neste estudo sugerem que futuros testes *in vivo* sejam feitos para avaliar a eficácia desses fitoterápicos como tratamento alternativo contra a esporotricose.

**Palavras-chave:** Esporotricose. Fitoterapia. Óleo essencial.

**ABSTRACT**

Sporotrichosis, a mycosis caused by fungus of the genus *Sporothrix*, has the itraconazole therapy of first choice. Resistance reports have been observed to both Itraconazol and amphotericin B, culminating in treatment failures and clinical cases like pulmonary or systemic infections. The aim of this study was to evaluate *in vitro* the effect of essential oils from *Melaleuca alternifolia* Cheel (Myrtaceae), *Citrus limon* (L.) Burm.f. (Rutaceae), *Caryocar brasiliense* Cambess (Caryocaraceae), *Pelargonium graveolens* L'Hér (Geraniaceae) and pure propolis extract or associated in inhibiting of *S. schenckii* growth. The methods used were Kirb-Bauer, disk diffusion on agar, Minimum Inhibitory Concentration and Minimum Fungicide Concentration. The essential oils and the propolis extract were effective in inhibiting fungal growth, overcoming the effects of itraconazole. Itraconazole was able to inhibit the growth of *S. schenckii* up to a dilution of 4mg.mL<sup>-1</sup> (10<sup>-3</sup> dilution). The essential oils of melaleuca, geranium, lemon, all at a concentration of 10mg.mL<sup>-1</sup> and propolis extract at a concentration of 20mg.mL<sup>-1</sup>, were able to inhibit, respectively, the development of this fungus at concentrations lower than 0.325mg.mL<sup>-1</sup> (10<sup>-6</sup> dilution), 0.15625mg.mL<sup>-1</sup> (10<sup>-7</sup> dilution), 0.325mg.mL<sup>-1</sup> (10<sup>-4</sup> dilution) and 0.625mg.mL<sup>-1</sup> (10<sup>-6</sup> dilution). Geranium and melaleuca essential oils showed the best inhibition and fungicidal potential against *S. schenckii*. These results suggest the importance of *in vivo* tests to evaluate the use of these herbal medicines as an alternative treatment against sporotrichosis.

**Keywords:** Essential oils. Phytotherapy. Sporotrichosis.



## INTRODUÇÃO

A esporotricose é uma micose subcutânea causada por fungos do gênero *Sporothrix* que acomete animais e humanos, sendo o gato doméstico importante fonte de infecção para o homem. Nos felinos, os sintomas mais comuns são lesões de pele na região cefálica, membros e extremidades da cauda. Em humanos, a infecção de pele é frequente, porém pode evoluir e acometer diversos tecidos e órgãos internos em indivíduos imunocomprometidos ou com doenças crônicas pré-existentes (Gondim & Leite, 2020). A contaminação por fungos ocorre pela inoculação de *Sporothrix* sp. na derme, principalmente por meio de arranhões, de lesões por farpas de madeira e por espinhos de plantas. Também pode ser transmitida por mordida ou arranhão de animais infectados e até mesmo em casos mais raros (Lima, 2017).

Os fungos do gênero *Sporothrix* são ascomicetos, saprófitos, termotolerantes e dimórficos, crescendo como levedura a 37 °C e como micélio em temperatura ambiente em 25 °C. Suas principais espécies são *S. schenckii*, *S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. mexicana*, *S. albicans*, *S. luriei*, as quais podem ser encontradas na vida saprófita em vegetais, no solo, na água contaminada e parasitando animais (Lima, 2017).

A disseminação da doença é mundial, ocorrendo principalmente em regiões tropicais e subtropicais, como o Brasil, em que a incidência de esporotricose contraída pelo contato com gatos infectados está aumentando. Em estudo com 161 cepas de *Sporothrix* sp., provenientes de amostras clínicas e ambientais de diversas regiões do Brasil, comprovou-se que as espécies *S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. mexicana* e *S. schenckii* apresentavam maior distribuição geográfica no país (Macedo-Sales et al., 2019).

Itraconazol, terfinafina, iodeto de potássio e anfotericina B são medicamentos para tratamento da esporotricose (Kauffman, Bustamante, Chapman & Pappas, 2007), mas o itraconazol é o medicamento de primeira escolha prescrito. Estudos têm relatado, entretanto, a existência de isolados resistentes a esse medicamento, o que tem levado a falhas terapêuticas e à disseminação de micoses, além de longa duração do tratamento, alto custo e toxicidade (Queiroz-Fernandes & Magalhães, 2020). Esses relatos refletem a necessidade de métodos alternativos no tratamento da esporotricose, sendo as plantas medicinais uma possibilidade, uma vez que possuem alta diversidade de compostos químicos e potencial antimicrobiano (Lima, 2017).

Os medicamentos fitoterápicos são preparados a partir de partes de plantas e apresentam grande eficácia no tratamento ou na prevenção de diversas doenças em todo o mundo, podendo ser utilizados na forma de ceras, extratos e óleos essenciais (OEs) (Cardoso et al., 2013). O uso de OEs foi adotado desde o início da vida primitiva e seu uso tem crescido entre a população atual. Estudos relatam que os

OEs possuem extensa atividade séptica e medicamentosa, sendo amplamente utilizados no tratamento e prevenção de doenças (Bakkali, Averbeck, Averbeck & Idaomar, 2008). Isso se deve aos OEs serem compostos naturais, líquidos, complexos, bioativos, voláteis e de cor e odor característicos, formados por metabólitos secundários de plantas aromáticas (Almeida, Almeida & Gherardi, 2020).

No presente estudo, foram escolhidos quatro OEs que apresentavam dados relevantes como antimicrobianos na literatura, sendo os OEs de *Melaleuca alternifolia* Cheel (Myrtaceae), *Citrus limon* (L.) Burm.f. (Rutaceae), *Caryocar brasiliense* Cambess (Caryocaraceae), *Pelargonium graveolens* L'Hér (Geraniaceae) e, além desses OEs, o extrato de própolis.

*M. alternifolia* pertence à família Myrtaceae, comumente conhecida como “árvore do chá” ou melaleuca, possui grande importância medicinal devido à presença em sua composição de compostos ativos que atuam com ação bactericida, antifúngica e virucida (Sampaio, 2022). Pode ser aplicada sobre cortes na pele, feridas, arranhões, infecções fúngicas e bacterianas da pele, além de atuar como agente cicatrizante e obter ação antisséptica e expectorante, o que tem destacado essa planta nos estudos de fitoterapia em todo o mundo (Silva, 2019).

Uma planta muito comum no Brasil que tem demonstrado potencial como antimicrobiano é o *Caryocar brasiliense* Cambess (Caryocaraceae), conhecido como pequi, uma das árvores brasileiras com maior grau de aproveitamento e é amplamente utilizada na medicina tradicional (Nascimento, 2018). Compostos fenólicos, bloqueadores de radicais livres, foram encontrados na folha do pequi e por isso têm sido utilizados como antioxidante (Denger et al., 2020), além de apresentar potencial antifúngico e moluscicidas (Passos et al., 2002). Esse achado pode sugerir a eficácia do óleo de pequi contra fungos de *Sporothrix* sp.

Outro extrato muito utilizado pela população brasileira contra infecções virais é a Própolis, que, além de atuar como hormônio vegetal no desenvolvimento das plantas, protege-a contra ataques de fungos e de bactérias. Devido à sua ação antimicrobiana, tem sido amplamente utilizada em estudos que indicam sua eficácia contra patógenos humanos e animais (Barbosa, Zuffi, Maruxo & Jorge, 2009). Muitas pessoas, tanto na medicina tradicional quanta na popular, tomavam extrato de própolis todos os dias para evitar infecções e para reduzir os sintomas da gripe (Ozarowski & Karpinski, 2023).

Além disso, o gênero *Citrus* possui diversas espécies, dentre elas a *C. limon* (L.) Burm.f (Rutaceae), popularmente conhecida como limão. O OE de *C. limon* possui atividade anticancerígena e antimicrobiana, em virtude de seus compostos fenólicos e antioxidantes já descritos (Everton et al., 2018). Em muitos países, o limão é popularmente utilizado pela sua eficácia no tratamento

de infecções, febres, acidez no estômago e por apresentar propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias, antiparasitárias e antissépticas. O OE do limão cítrico é composto principalmente por limoneno e citral, que possuem atividade antimicrobiana comprovada em estudos sobre as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (Santos, Carvalho, Barros & Guimarães, 2011).

Outro óleo comum utilizado pela população é o *Pelargonium graveolens* L'Hér (Geraniaceae), conhecido como gerânio, possui propriedades antioxidantes, antibacterianas, antifúngicas e acaricidas. Seus efeitos terapêuticos são atribuídos aos terpenoides e aos flavonoides em sua composição (Lima, 2022). Esse óleo está sendo utilizado na aromaterapia contra infecções de gripe e tem sido sugerido por empresas produtoras de óleos essenciais para uso durante o período da menopausa para reduzir os sintomas de déficit indesejável de estrogênio (Cheverria, Cheverria, Barreto, Echeverría & Mendoza, 2021).

Mediante ao apresentado, o presente trabalho verificou a sensibilidade ou a resistência de *S. schenckii* ao crescimento quando utilizados óleos essenciais e extrato de própolis como inibidores naturais.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Cultivo do microrganismo

O microrganismo utilizado neste estudo foi o *Sporothrix schenckii*, que faz parte da coleção de microrganismos utilizada no Laboratório de Microbiologia Aplicada (LAMAP) da Universidade do Estado de Minas Gerais (UEMG). Um caso de lesão felina foi isolado e identificado na cidade de Ibirité – MG, feito sua identificação seguindo o “Manual de Detecção e Identificação de Fungos de Importância Médica” da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), de 2004.

Esse processo foi feito com tecido subcutâneo coletado após antisepsia e colocado em recipiente estéril e lacrado, conforme orientação para pesquisa do agente, em quantidade suficiente (> 2mL ou 0,5cm<sup>3</sup> ou duas vezes). A cultura foi utilizada para cultivo em Ágar Sabouraud Dextrose de acordo com as recomendações do fabricante para observação de finas hifas hialinas, septadas com esporos em arranjos como uma flor estufa de crescimento. Foi possível a visualização após 10 dias de cultivo a 30 °C em estufa.

A placa também foi cultivada a 25 °C, o que após 24 horas permitiu a preparação de lâminas para observação de pequenas leveduras em KOH 20% e, por coloração de Gram, para visualização de leveduras do tipo charuto características de *Sporothrix schenckii*. A análise genômica por PCR foi realizada por um laboratório veterinário quando a amostra foi coletada ainda na clínica, confirmando que se tratava de *S. schenckii*.

## Óleos essenciais

Os OEs de melaleuca, gerânio e limão foram obtidos comercialmente da Laszlo® na concentração de 10mg.mL<sup>-1</sup>. O extrato de própolis foi obtido comercialmente da Santa Bárbara® na concentração de 20mg.mL<sup>-1</sup> e o óleo vegetal de Pequi foi obtido da Mundo dos Óleos® na concentração de 10mg.mL<sup>-1</sup>.

### Teste Kirb-Bauer

Para os testes de Kirb-Bauer, 10µL de *S. schenckii* (1x10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup>) foram inoculados por teste em triplicata utilizando placas de Petri contendo Ágar Mueller-Hinton (MHA) preparadas de acordo com as recomendações do fabricante. O inóculo foi espalhado em uma placa com o cabo de Drigalsky.

Já para a confecção dos discos em laboratório, utilizou-se o papel filtro cortado em círculos por um furador de papel com 0,4mm de diâmetro. No interior da capela de fluxo laminar, os discos foram embebidos com 10µL dos extratos: M – OE de melaleuca (10mg.mL<sup>-1</sup>), L - OE de limão (10mg.mL<sup>-1</sup>), G - OE de gerânio (10mg.mL<sup>-1</sup>), Pr - extrato de própolis (20mg.mL<sup>-1</sup>), Pe - óleo de pequi (10mg.mL<sup>-1</sup>), I - itraconazol (16mg.mL<sup>-1</sup>) foi utilizado como controle positivo, S1 – volumes iguais de cada óleo foram misturados em frasco estéril e S2 – volumes iguais de cada óleo mais itraconazol foram misturados em frasco estéril.

A fim de verificar se o óleo de pequi poderia inibir o efeito de outros óleos em conjunto com o itraconazol, outro tratamento foi denominado S3. Este continha volumes iguais de cada óleo essencial e itraconazol, exceto óleo de pequi. Os discos foram distribuídos na placa contendo o inóculo fúngico e incubados a 37 °C por 48 horas. A zona de inibição foi medida com auxílio de um paquímetro para posterior análise estatística.

### Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Este teste foi baseado no método de microdiluição em microplacas de 96 poços, sugerido pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2018). Em seguida, foram distribuídos 100µL de RPMI em poços de uma placa de microtitulação e 100µL de cada produto fitoterápico foram adicionados no primeiro poço de sua respectiva coluna. Após homogeneização, foram transferidos 100µL para o segundo poço e assim sucessivamente.

O preparo do inóculo consistiu em ressuspender das colônias desenvolvidas em ágar Muller-Hinton, uma suspensão microbiana (*S. schenckii*) em soro fisiológico, com turbidez equivalente ao tubo 0,5 da Escala Mac Farland (1x10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup> ou 80% de transmitância a 530nm). Essa suspensão foi diluída 1:100 com RPMI, obtendo-se como inóculo 1x10<sup>6</sup> UFC mL<sup>-1</sup> em cada poço já contendo os óleos essenciais. As microplacas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Todos os testes foram realizados em triplicata.

## Concentração Mínima de Fungicida (MFC)

Este ensaio permitiu determinar a menor concentração de extratos capazes de eliminar *S. schenckii*, demonstrando efeito fungicida contra o microrganismo. Realizou-se este ensaio em triplicado. Dos poços que não obtiveram crescimento fúngico visível nos testes de CIM, uma suspensão de 10µL foi cultivada em placa com meio YPD pela metodologia de Santurio et al. (2007).

## Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas pelo programa GraphPad Prism 7.0 da One-Way Anova, por meio do teste de Tukey, para obter comparações sobre o potencial inibitório dos extratos estudados.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Ensaio de atividade antifúngica

Os dados obtidos após o teste de difusão em ágar mostraram que todos os extratos estudados, exceto o óleo de pequi, apresentaram atividade antifúngica *in vitro* contra *S. schenckii*. Os resultados obtidos pelo teste de Kirb Bauer podem ser observados na Tabela 1 e na Figura 1. Na Tabela 1, a média da zona de inibição foi expressa em milímetros (mm) e a Figura 1 contém as análises estatísticas do valor de crescimento do *S. schenckii* de acordo com zona de inibição *in vitro*.

**Tabela 1**

Diâmetro médio da zona de inibição do crescimento de *S. schenckii* *in vitro* de acordo com os testes estudados em comparação com o itraconazol, droga de escolha clínica.

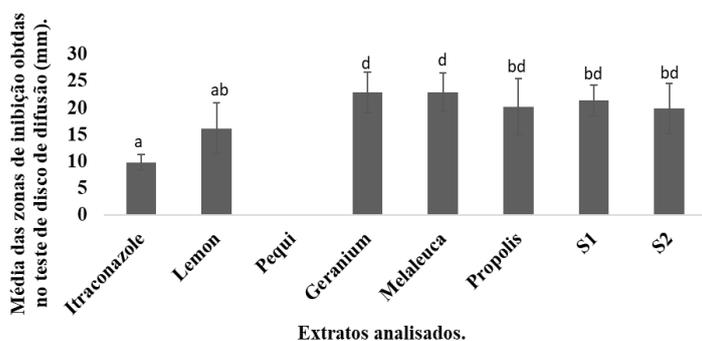
	Limoneno	Pequi	Gerânio	Melaleuca	Própolis	S1	S2	Itraconazol
Média.	16,00	00,00	23,00	23,00	20,00	21,00	20,00	00,90
Desvio Padrão.	04,68	00,00	03,73	03,55	05,25	02,83	04,70	01,56

Fonte: Os autores.

Nota. O valor é expresso em milímetros.

**Figura 1**

Comparação da média do valor de inibição do crescimento *in vitro* de *S. schenckii* expresso em milímetros.



Fonte: Os autores.

Nota. As médias foram comparadas por meio de ANOVA, seguido do teste de Tukey, com nível de significância de 5%. As barras de erro indicam o desvio padrão, enquanto as letras nas barras indicam equivalência estatística entre os grupos. Letras diferentes apresentam diferenças estatisticamente significativas pelo teste de Turkey ( $p < 0,05$ ).

Os OEs de gerânio, melaleuca, limão e extrato de própolis foram capazes de inibir o crescimento de *S. schenckii* em todos os testes de inibição de disco. O OE de gerânio (23mm), melaleuca (23mm) e extrato de própolis (20mm) apresentaram a maior média de zona de inibição do teste de inibição entre os fitoterápicos testados comparados *in vitro* ao Itraconazol, que, apesar de ser o antifúngico de escolha para o tratamento de esporotricose, obtiveram em média teste de inibição de zona de 9mm.

Santos e Casteluber (2020) também demonstraram *in vitro* o efeito do itraconazol contra *S. schenckii* com teste de zona de inibição de apenas 10mm, como o encontrado neste estudo. Os dados mostraram que os OEs de gerânio e melaleuca foram mais eficazes contra *S. schenckii*, enquanto os OEs de limão não apresentaram desempenho significativamente superior quando comparados ao Itraconazol. Além disso, não houve diferença estatisticamente significativa entre os halos obtidos em S1 (todos os fitoterápicos sem Itraconazol) e em S2 (todos os fitoterápicos com adição de Itraconazol), permitindo inferir que os fitoterápicos testados não apresentam efeito antagonico quando adicionados ao Itraconazol.

Esses resultados de inibição *in vitro* permitem inferir que, com exceção do pequi, que não demonstrou efeito de inibição em nenhum dos testes, os fitoterápicos estudados auxiliam positivamente no tratamento da esporotricose, dada à atividade antifúngica observada. Isto é de grande importância principalmente tendo em vista a resistência fúngica que as espécies do complexo *Sporothrix* têm demonstrado (Pimentel, Santos & Cabral, 2017).

Além disso, estudos indicam que altas doses e tratamentos longos com Itraconazol em felinos podem gerar efeitos tóxicos para os fetos e causar diminuição do apetite, perda de peso, vômitos e diarreia, somados a problemas hepáticos. Em humanos também são descritos problemas hepáticos devido ao seu uso prolongado (Meinerz et al., 2007; Pimentel et al., 2017).

Considerando que óleos e extratos essenciais são utilizados em baixas concentrações, as chances de aparecimento de efeitos colaterais são reduzidas (Santos & Casteluber, 2020), porém tais efeitos citotóxicos ainda precisam ser confirmados por testes *in vivo*. Embora os testes de citotoxicidade dos OEs isolados ou associados ainda não tenham sido realizados *in vivo*, Fogaça de Andrade, Batista, Lasakosvitsch, Souza Antunes e Oliveira (2018) realizaram a citotoxicidade do OE de *M. alternifolia* Chell (Myrtaceae) a partir do método de incorporação do corante azul de tripano e redução de TM em fibroblastos L-929, assim, observaram baixo nível de citotoxicidade do óleo, uma vez que, após os testes, não houve redução significativa das células L-929.

Peter et al. (2019) também descreveram a atividade antifúngica de três extratos de própolis brasileira: abelha marrom, verde e jataí (*Tetragonisca angustula*)

contra *Sporothrix brasiliensis* e a toxicidade celular foi avaliada em células MDBK (Madin-Darby Bovine Kidney), por observação microscópica e quantificada pelo Ensaio MTT. Os resultados mostraram que não foram observadas toxicidade celular nas concentrações de 0,097 a 0,39 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Além disso, os estudiosos enfatizam a importância de mais pesquisas sobre a citotoxicidade de medicamentos fitoterápicos, pois podem apresentar soluções promissoras para o controle de microrganismos resistentes a medicamentos. O óleo de pequi não apresentou efeito inibidor para esse fungo quando comparado aos demais tratamentos, de acordo com a Figura 1.

Os resultados obtidos são promissores, inclusive para o limão, que foi considerado estatisticamente equivalente ao Itraconazol. A identificação de fitoterápicos capazes de inibir o crescimento de forma semelhante ao observado para o itraconazol é de grande importância, uma vez que não foi descrita na literatura sobre resistência induzida pelo uso de fitoterápicos, além da resistência fúngica ao Itraconazol, que tem sido cada vez mais destacada na literatura para *S. schenckii* (Meinerz, 2007; Queiroz-Fernandes & Magalhães, 2020).

Segundo Felipe et al. (2018), o uso do OE de melaleuca é uma alternativa para o tratamento de infecção por fungos do gênero *Candida* que apresentam alto índice de resistência a antifúngicos, principalmente por causa do terpinen-4-ol, que está associado à hidrofobicidade em que os terpenos interagem com os lipídios da membrana celular do patógeno, alterando a permeabilidade da membrana. Esses autores sugerem que o uso de OE em conjunto com a terapia antifúngica convencional pode ser uma estratégia muito promissora para superar a resistência microbiana, demonstrando que a fitoterapia é eficaz em espécies de fungos além de *S. schenckii*.

Chagas (2019) demonstrou *in vivo* a atividade antifúngica do fitoterápico *C. limon* (L.) Burm.f. (Rutaceae) juntamente com *Mentha piperita* e *Pimpinella anisum* no tratamento contra candidíase oral, por meio da criação de um enxaguatório bucal contendo a associação de extratos. O enxaguante foi testado durante 15 dias em voluntários selecionados com quadro ativo de candidíase oral e os resultados foram acompanhados nos 7.<sup>o</sup> e 15.<sup>o</sup> dias de tratamento, mensurando a evolução das lesões e realizando registros fotográficos. Foi possível verificar diminuição das lesões brancas e do tom avermelhado das lesões, comprovando a atividade antifúngica dos extratos utilizados.

Estudos de Pereira et al. (2021) também analisaram a eficiência antifúngica dos extratos brutos de pequi e do extrato de própolis contra a levedura *C. albicans*. Tanto o extrato de pequi quanto o extrato de própolis apresentaram efeito antimicrobiano sobre leveduras, com teste médio de zona de inibição de 18mm e 26mm, respectivamente, enquanto no presente estudo os halos médios foram de 0mm e 20mm, respectivamente. Esses dados amostrados

por eles para o efeito do extrato de pequi confrontam o presente trabalho, uma vez que o óleo de pequi não foi capaz de inibir o desenvolvimento *in vitro* de *S. schenckii* em nenhum dos testes e pode sugerir que o extrato contém compostos bioativos mais interessantes quando o objetivo é observar o efeito antifúngico desse efeito fitoterápico.

Essa afirmação também se baseia na observação dos estudos de Martins et al. (2020), que verificaram *in vivo* a eficácia de uma pomada à base de extrato da folha de pequi na cicatrização de feridas cutâneas causadas experimentalmente em coelhos. O grupo controle foi tratado com a pomada apenas como veículo à base de glicerina.

As análises macroscópicas das feridas foram realizadas nos 7.<sup>o</sup> e 14.<sup>o</sup> dias após o procedimento cirúrgico e foram observadas menor frequência de hiperemia nos coelhos tratados com pomada à base de folha de pequi. Constatou-se, porém, nenhuma redução significativa da área quando comparada às feridas tratadas com pomada à base de glicerina. Esta observação sugere que a presença do composto oleaginoso pode ter interferido nos resultados observados, como foi visto no presente estudo quando foi verificado que o óleo de pequi não conseguiu inibir o crescimento de *S. schenckii*.

Vale ressaltar a importância de novos estudos em torno das características dos extratos de pequi, buscando avaliar com maior precisão sua atividade antimicrobiana contra fungos como *S. schenckii*, e identificar a natureza química dos compostos antimicrobianos, que podem estar presentes em diferentes frações da planta.

Estudos de Ferrão et al. (2020) analisaram a atividade antifúngica *in vitro* do OE de *P. graveolens* contra *Candida* spp., utilizando o método de microdiluição em caldo. O OE de gerânio apresentou forte atividade antifúngica para dez espécies isoladas estudadas, indicando resultados promissores corroborando o presente estudo em que o OE de gerânio se mostrou eficaz na inibição do crescimento de *S. schenckii*, também na concentração inibitória mínima conforme mostrado na Tabela 2.

### Resultados de concentração inibitória mínima

O itraconazol foi capaz de inibir o crescimento de *S. schenckii* até diluição de 4mg.mL<sup>-1</sup> (diluição 10<sup>-3</sup>). Os OEs de melaleuca, gerânio, limão – todos na concentração de 10mg.mL<sup>-1</sup> e extrato de própolis na concentração de 20mg.mL<sup>-1</sup> – foram capazes de inibir respectivamente o desenvolvimento desse fungo em concentrações inferiores a 0,325mg.mL<sup>-1</sup> (diluição 10<sup>-6</sup>), a 0,15625mg.mL<sup>-1</sup> (diluição 10<sup>-7</sup>), a 0,325mg.mL<sup>-1</sup> (diluição 10<sup>-4</sup>) e a 0,625mg.mL<sup>-1</sup> (diluição 10<sup>-6</sup>), conforme Tabela 2. Os dados indicam que os óleos essenciais e o extrato de própolis, mesmo diluídos, ainda apresentam efeito inibidor satisfatório *in vitro* contra *S. schenckii* e em diluições menores quando comparados ao Itraconazol.

**Tabela 2**

Concentração Inibitória Mínima (CIM) observada em tratamentos com medicamentos extratos e Itraconazol.

	Itraconazol	Melaleuca	Gerânio	Lemoneno	Própolis	Pequi	S1	S2	S3
10 <sup>-1</sup>	-	-	-	-	-	+	-	-	-
10 <sup>-2</sup>	-	-	-	-	-	+	-	-	-
10 <sup>-3</sup>	-	-	-	-	-	+	-	-	-
10 <sup>-4</sup>	+	-	-	-	-	+	-	-	-
10 <sup>-5</sup>	+	-	-	+	-	+	-	-	-
10 <sup>-6</sup>	+	-	-	+	-	+	+	+	-
10 <sup>-7</sup>	+	+	-	+	+	+	+	+	-
10 <sup>-8</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	-
10 <sup>-9</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	-

Fonte: Os autores.

Nota. (-) Concentração em que não houve crescimento de *S. schenckii*; (+) concentração em que houve crescimento de *S. schenckii*; S1- volumes iguais de cada óleo foram misturados em frasco estéril; S2 – volumes iguais de cada óleo e de itraconazol foram misturados em frasco estéril; S3- volumes iguais de cada óleo e de itraconazol foram misturados em frasco estéril sem óleo de pequi.

Meinerz et al. (2007) estudou a atividade *in vitro* da terbinafina e do itraconazol por meio da técnica de microdiluição em caldo (NCCLSM27-A2) contra 12 isolados clínicos de *S. schenckii*, seis casos de esporotricose felina, cinco de esporotricose humana e um de micose canina da Instituto Oswaldo Cruz (IOC). A CIM para terbinafina variou de 0,055µg.mL<sup>-1</sup> a 0,109µg.mL<sup>-1</sup>; para itraconazol, de 0,219µg.mL<sup>-1</sup> a 1,75µg.mL<sup>-1</sup>; já para ambos os fármacos, as CIMs entre os isolados do CIO foram de 0,875µg.mL<sup>-1</sup>. Foi observada resistência ao itraconazol no isolado canino e nos demais isolados de esporotricose felina.

No presente estudo, o Itraconazol apresentou CIM entre 16mg.mL<sup>-1</sup> e 4mg.mL<sup>-1</sup>, demonstrando maior potencial de resistência em comparação à pesquisa anterior, enfatizando a importância de tratamentos alternativos contra a esporotricose.

Junio et al. (2016) comprovaram em seus estudos o efeito inibitório do óleo de melaleuca no crescimento de cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de animais com mastite. Inibições de microrganismos foram observadas principalmente quando utilizados na concentração de 1,5% (v/v), nesta concentração, todos os isolados de *S. aureus* testados tiveram seu crescimento inibido.

Em outro estudo, Cox et al. (2000) reafirmaram a atividade antimicrobiana de amplo espectro da melaleuca contra *S. aureus* e comprovaram ação eficaz contra o crescimento de *Escherichia coli* e de *C. albicans*, dados que corroboram o presente estudo, dado o grande potencial antimicrobiano do OE de melaleuca, com nível de inibição de até 0,325mg.mL<sup>-1</sup> contra *S. schenckii*.

O estudo de Gucwa, Milewski, Dymerski e Szwed (2018) investigou a atividade antifúngica do óleo essencial de gerânio e outros medicamentos fitoterápicos contra isolados de *C. albicans* e de *C. glabrata* isolada. Nos testes de CIM, a fitoterapia inibiu o crescimento de todas as cepas testadas, até a concentração de 1,25%.

Além de apresentar efeito fungicida contra os isolados, os dados desta pesquisa apresentam que o OE de gerânio obteve ação fungicida e fungistática contra *S. schenckii*, consoante ao apresentado na Tabela 3. Há, entretanto, poucos estudos sobre a atividade antifúngica do OE de gerânio. Não foram encontrados dados sobre a ação do óleo essencial de gerânio ou do extrato vegetal contra *S. schenckii*, sendo este trabalho pioneiro no assunto.

Os óleos essenciais de gerânio e limão foram capazes de bloquear os receptores ACE2 e TMPRSS2, com os quais a proteína Spike do SARS-CoV-2 interage para invasão celular, assim, apontado por Kumar et al. (2020). No presente estudo, o OE de limão foi eficaz em inibir o crescimento de *S. schenckii*, mesmo na diluição 10<sup>-4</sup> (0,325mg.mL<sup>-1</sup>), apresentando dados satisfatórios quanto ao potencial de inibição desse microrganismo, conforme mostra a Tabela 2.

Nos estudos de Menezes (2020), foi verificada a atividade antifúngica dos óleos essenciais produzidos a partir dos frutos verdes e maduros da espécie *Citrus limon*. Os dados por ele obtidos mostraram atividade antifúngica de 1,08 a 88,17% contra *Sclerotinia sclerotiorum*; de 96,18% e 6,51 a 93,51% contra *Colletotrichum acutatum*, de 71,94 a 100%, e 25,18 a 90,03% contra *Aspergillus flavus*, respectivamente, para frutos verdes e maduros de *C. limon*. Apresentando, assim, resultados importantes da atividade antifúngica de outras espécies do gênero *Citrus*.

A partir da análise dos dados obtidos pelo teste de MIC com todos os óleos atuando em conjunto, nota-se que, mesmo com bom grau de inibição, com diluição até 10<sup>-5</sup>, conforme Tabela 2, os OEs de gerânio, melaleuca e própolis realizaram melhor quando testados isoladamente, apresentando grau de inibição nas diluições 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-6</sup> e 10<sup>-6</sup>, respectivamente. Como o óleo de pequi não foi capaz de inibir o fungo *in vitro*, ele pode ter agido de forma antagonista, impedindo a ação de compostos químicos presentes nos óleos essenciais e no extrato de própolis.

Isso foi sugerido anteriormente no trabalho de Martins et al. (2020), em que, ao testar o efeito da pomada em comparação à loção, ambas elaboradas com extrato de folha de pequi, foi demonstrado que a pomada não teve efeito na inibição do crescimento do fungo, agindo apenas na hiperemia local, enquanto a loção foi eficiente, corroborando a afirmação. Enfatiza-se a importância de mais estudos sobre os efeitos citotóxicos moleculares dos óleos essenciais, para combinar os melhores fitoterápicos contra *S. schenckii*.

Para verificar se o óleo de pequi poderia ter interferido na ação antimicrobiana dos extratos, também foi verificado o efeito de todos os óleos adicionados (sendo misturados adicionando o mesmo volume de cada um deles em um mesmo frasco), o que foi chamado de teste S3 (observado na Tabela 2). A partir deste resultado, é possível inferir que a atividade antifúngica dos óleos de gerânio e de melaleuca (inibição até diluição 10<sup>-7</sup> e 10<sup>-6</sup>

respectivamente) foi prejudicada ao combiná-los aos demais óleos, sendo possível observar possível efeito antagônico quando misturando todos os extratos testados.

A partir da análise do teste de CIM com todos os óleos e o Itraconazol atuando em conjunto, infere-se que o Itraconazol não exerce antagonismo ou sinergismo com os óleos essenciais e o extrato estudados, mantendo o mesmo nível de inibição em ambos os casos ( $10^{-5}$ ), conforme mostrado na Tabela 2. Mesmo padrão de grau de inibição é novamente observado quando comparado ao desempenho apenas dos óleos essenciais. Esse dado é importante porque pode indicar que os óleos e os extratos não interferem no mecanismo de ação do medicamento indicado na clínica médica e permite sugerir que os óleos essenciais e o extrato de própolis podem ser utilizados em terapia conjunta ao Itraconazol para o tratamento da esporotricose.

A atividade antifúngica da mistura de todos os óleos sem óleo de pequi foi testada no MIC (dados disponíveis na Tabela 2) para verificar se o fitoterápico agiu de forma antagônica quando adicionado aos demais extratos, prejudicando a expressão da atividade antifúngica.

A partir da análise dos dados do teste MIC da sinergia de gerânio, melaleuca, OEs de limão e própolis, infere-se que o óleo de pequi atuou com efeito antagônico aos fitoterápicos testados, visto que o nível de inibição aumentou da diluição  $10^{-5}$  para a diluição  $10^{-9}$ , confirmando a hipótese colocada a partir dos resultados do teste MIC da mistura de todos os óleos. Esse comportamento é consistente com os resultados do teste de difusão em ágar e da CIM de seus indivíduos, não apresentando ação contra *S. schenckii*.

**Tabela 3**

Concentração Mínima de Fungicida (MFC) de cada fitoterápico e Itraconazol contra *S. Schenckii*.

	Itraconazol	Limoneno	Pequi	Gerânio	Melaleuca	Própolis	S1	S2	S3
$10^{-1}$	-	+	+	-	-	+	+	+	+
$10^{-2}$	+	+	+	+	+	+	+	+	+
$10^{-3}$	+	+	+	+	+	+	+	+	+
$10^{-4}$	+	+	+	+	+	+	+	+	+
$10^{-5}$	+	+	+	+	+	+	+	+	+
$10^{-6}$	+	+	+	+	+	+	+	+	+
$10^{-7}$	+	+	+	+	+	+	+	+	+
$10^{-8}$	+	+	+	+	+	+	+	+	+
$10^{-9}$	+	+	+	+	+	+	+	+	+
$10^{-10}$	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Fonte: Os autores.

Nota. (-) Concentração em que não houve crescimento de *S. schenckii*; (+) concentração em que houve crescimento de *S. schenckii*; S1- volumes iguais de cada óleo foram misturados em frasco estéril; S2 - volumes iguais de cada óleo e itraconazol foram misturados em frasco estéril; S3 - volumes iguais de cada óleo e itraconazol foram misturados em frasco estéril sem óleo de pequi.

Apesar da descrição de seu efeito como antifúngico e antibacteriano na literatura, como no estudo de Pereira et al. (2021), que verificaram a ação antifúngica do extrato

produzido a partir das folhas do pequi contra a levedura *C. albicans in vitro*, o óleo de pequi não foi capaz de inibir o crescimento de *S. schenckii* e esse achado confronta o uso do óleo de pequi como antifúngico e comprova a afirmação de que o extrato da oleaginosa pode não conter todos os compostos necessários para inibir o desenvolvimento de *S. schenckii* ou de outros fungos como *C. albicans*, observado por Martins et al. (2020), que, ao testar a pomada contra *C. albicans*, não constataram efeito inibidor.

Ainda são poucos os estudos que verificam a atividade antifúngica contra *S. schenckii*, os dados encontrados revelam o potencial do uso de óleos essenciais e de extrato de própolis para conter a esporotricose, uma vez que muitos estudos têm sido feitos avaliando fitoterápicos contra outras espécies fúngicas.

### Ensaio de concentração mínima de fungicida

Nos dados obtidos por meio dos testes de Concentração Mínima Fungicida (CFM) dos fitoterápicos testados observados na Tabela 3, foi possível observar o comportamento fungicida dos OEs de gerânio e de melaleuca, bem como do antifúngico Itraconazol na diluição  $10^{-1}$ . O OE de limão e o extrato de própolis apresentaram comportamento fungistático frente ao *S. schenckii*. Enquanto o Itraconazol apresentou efeito fungicida na concentração de  $16\text{mg.mL}^{-1}$ , os OEs de gerânio e de melaleuca apresentaram efeito fungicida na concentração de  $10\text{mg.mL}^{-1}$ .

Os achados deste estudo sugerem que os OEs de gerânio e de melaleuca podem ser considerados como uma alternativa de tratamento contra a esporotricose, isoladamente ou adicionados ao antifúngico de escolha clínica para potencializar a capacidade de inibição do fungo. Esses óleos podem ser uma alternativa futura para o tratamento da esporotricose causada por *S. schenckii* resistente ao itraconazol e permitir a cura da doença em gatos e em humanos afetados.

### CONCLUSÃO

Os OEs de gerânio, de melaleuca, de limão e o extrato de própolis apresentaram efeitos inibitórios sobre o crescimento *in vitro* de *S. schenckii*, enquanto o óleo de pequi não demonstrou tal efeito. Este estudo destaca a atividade antifúngica dos OEs de melaleuca e de gerânio por apresentarem os melhores níveis de inibição contra *S. schenckii in vitro*, além de efeitos fungicidas como o demonstrado pelo Itraconazol, faz-se necessário mais estudos para sugerir tratamento alternativo isolado ou associado ao Itraconazol. Neste contexto, sugere-se a realização de testes *in vivo* para demonstrar a possibilidade de efeitos citotóxicos da utilização dos óleos essenciais estudados.

### AGRADECIMENTOS

À Universidade do Estado de Minas Gerais

(UEMG) e ao Programa Institucional de Apoio à Pesquisa da Universidade do Estado de Minas Gerais (PAPq), pelo apoio financeiro essencial para a realização desta pesquisa. Ao Laboratório de Microbiologia Aplicada (LAMAP) e à Universidade do Estado de Minas Gerais (UEMG), pelo espaço para realização dos experimentos da pesquisa.

## CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram a ausência de conflito de interesse.

## FONTES DE FINANCIAMENTO

Este estudo foi financiado pelo Programa Institucional de Apoio à pesquisa da Universidade do Estado de Minas Gerais (PAPq) e pelo Programa de Bolsas de Produtividade em Pesquisa (PQ/UEMG).

## REFERÊNCIAS

- Almeida, J. C., Almeida, P. P., & Gherardi, S. R. M. (2020). Potencial antimicrobiano de óleos essenciais: uma revisão de literatura de 2005 a 2018. *Revista Eletrônica Nutritime*, 17(1), pp. 8623-8633. Recuperado de <https://www.nutritime.com.br/wp-content/uploads/2020/01/Artigo-506.pdf>
- Andrade, C. S. F., Batista, N. F., Lasakosvitsch, P. R., Antunes, V. M. S., & Oliveira, C. R. (2018). Efeitos da citotoxicidade do *tea tree oil* e sua ação antimicrobiana em bactéria *Propionibacterium acnes*. *Brazilian Journal of Natural Sciences*, 1(3), p. 13. doi: 10.31415/bjns.v1i3.37
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils: a review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), pp. 446-475. doi: 10.1016/j.fct.2007.09.106
- Barbosa, M. H., Zuffi, F. B., Maruxo, H. B., & Jorge, L. L. R. (2009). Ação terapêutica da própolis em lesões cutâneas. *Acta Paulista de Enfermagem*, 22(3), pp. 318-322. doi: 10.1590/S0103-21002009000300013
- Cardoso, C. M. Z., Silva, C. P., Yamagami, K., Lopes, R. P., Santos, F., Bonassi, I., ... Inowe, C. (2009). Elaboração de uma cartilha direcionada aos profissionais da Área da Saúde, Contendo Informações sobre Interações Medicamentosas envolvendo Fitoterápicos e Alopáticos. *Revista Fitos*, 4(1), pp. 56-69. Recuperado de <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/19166>
- Chagas, C. F. (2019). *Uso de um enxaguatório bucal com extratos fitoterápicos de Mentha piperita, Pimpinella anisum e Citrus limon, no tratamento de candidíase oral: uma avaliação in vivo* [Monografia do Curso de Farmácia, Universidade de Santa Cruz do Sul]. UNISC. <http://hdl.handle.net/11624/2650>
- Cheverria, V., Cheverria, F., Barreto, G. E., Echeverría, J., & Mendoza, C. (2021). Estrogenic plants: to prevent neurodegeneration and memory loss and other symptoms in women after menopause. *Frontiers in Pharmacology*, 12, pp. 1-25. doi: 10.3389/fphar.2021.644103
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2018). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. *CLSI Approved Standard M100-S15*. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne. Recuperado de [https://clsi.org/media/2042/catalog2018\\_web-unlinked.pdf](https://clsi.org/media/2042/catalog2018_web-unlinked.pdf)
- Cox, S. D., Mann, C. M., Markham, J. L., Bell, H. C., Gustafson, J. E., Warmington, J. R., & Wyllie, S. G. (2000). The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology*, 88(1), pp. 170-175. doi: 10.1046/j.1365-2672.2000.00943.x
- Denger, A. P. F. L., Kawano, L. O., Paula, R. A. O., Santos, L. B., Rodrigues, M. R., Paula, F. B. O., & Duarte, S. M. S. (2020). Determinação da atividade antioxidante e de fenóis totais do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). *Research, Society and Development*, 9(11), pp. 2-22. doi: 10.33448/rsd-v9i11.9781
- Everton, G. O., Silva, M. G. S., Teles, A. M., & Mouchrek, A. N. (2018). Atividade antioxidante e antimicrobiana das folhas e frutos de *Citrus limon* (L.) Burn (limão siciliano). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 23(4), pp.1-17. Recuperado de: <https://revplantasmedicinales.sld.cu/index.php/pla/article/view/756>
- Felipe, L. O., Silva, W. F. Jr., Araújo, K. C., & Fabrino, D. L. (2018) Lactoferrin, chitosan and *Melaleuca alternifolia*: a natural products that show promise in candidiasis treatment. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49(2), pp 212-219. doi: 10.1016/j.bjm.2017.05.008
- Ferrão, S. K., Butzge, J., Mezzomo, L., Cali, L. N., Apel, M., Mezzari, A., & Limberger, R. P. (2020). Atividade antifúngica de óleos essenciais frente a *Candida* spp. *Brazilian Journal of Health Review*, 3(1), pp. 100-113. doi: 10.34119/bjhrv3n1-007
- Gondim, A. L., & Leite, A. K. A. (2020). Aspectos gerais da esporotricose em pequenos animais e sua importância como zoonose. *Revista Brasileira de Educação e Saúde*, 10(2), pp. 37-44. doi: 10.18378/rebes.v10i2.7571
- Gucwa, K., Milewski, S., Dymerski, T., & Szveda, P. (2018). Investigation of the antifungal activity and mode of action of *Thymus vulgaris*, *Citrus limonum*, *Pelargonium graveolens*, *Cinnamomum cassia*, *Ocimum basilicum*, and *Eugenia caryophyllus* essential oils. *Molecules*, 23(5), pp. 2-18. doi: 10.3390/molecules23051116
- Junio, C. S., Cunha, A. F., Nunes, M. F., Cardoso, V. A. F. X., Alves, R. G., & Fontes, T. O. M. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas frente à *Staphylococcus aureus* isolados de bovinos com mastite. In Anais do SIMPAC, v. 8, n. 1, 2016. Recuperado de <https://revista.univicoso.com.br/index.php/RevistaSimpac/article/view/628>

## CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

*Conceitualização*: M. C. F. C. *Curadoria de dados*: S. R. M. G., M. C. F. C. *Análise de dados*: S. R. M. G., E. I. R., M. C. F. C., F. P. B. *Recebimento de financiamento*: M. C. F. C., S. R. M. G. *Pesquisa*: S. R. M. G., E. I. R., L. T. F. R.. *Metodologia*: M. C. F. C., F. P. B. *Administração do projeto*: M. C. F. C. *Disponibilização de ferramentas*: M. C. F. C., S. S. L. *Desenvolvimento, implementação e teste de software*: M. C. F. C., F. P. B. *Supervisão*: M. C. F. C. *Validação de dados e de experimentos*: S. R. M. G., E. I. R., M. C. F. C. *Design da apresentação de dados*: M. C. F. C., F. P. B., S. S. L. *Redação do rascunho inicial*: M. C. F. C., S. R. M. G., E. I. R. *Revisão e edição da escrita*: M. C. F. C., F. P. B., S. S. L.

- Kauffman, C. A., Bustamante, B., Chapman, S. W., & Pappas, P. G. (2007). Clinical practice guidelines for the management of sporotrichosis: 2007 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, 45(10), pp. 1255-1265. doi: 10.1086/522765
- Kumar, K. J. S., Vani, M. G., Wang, C. S., Chen, C. C., Chen, Y. C., Lu, L. P., ... Wang, S. Y. (2020). Geranium and lemon essential oils and their active compounds downregulate angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2), a SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain, in epithelial cells. *Plants*, 9(6), pp. 2-12. doi: 10.3390/plants9060770
- Lima, P. M. N. (2022). *Efeitos sinérgicos antimicrobianos da combinação dos óleos essenciais de gerânio e lemongrass sobre Streptococcus mutans, Staphylococcus aureus e Candida spp.* [Dissertação do Programa de Saúde Bucal, Universidade Estadual Paulista]. UNESP. <http://hdl.handle.net/11449/217586>
- Lima, R. M. (2017). *Óleos essenciais como alternativa inovadora para o tratamento da esporotricose* [Dissertação do Programa de Pós-Graduação em Saúde, Universidade Federal de Juiz de Fora]. UFJF. <https://repositorio.ufjf.br/jsui/handle/ufjf/4065>
- Macêdo-Sales, P. A. S., Souto, S. L. R. S., Destefani, C. A., Lucena, R. P., Rocha, E. M. S., & Baptista, A. R. S. (2018). Diagnóstico laboratorial da esporotricose felina em amostras coletadas no estado do Rio de Janeiro, Brasil: limitações da citopatologia por *imprint*. *Revista Pan-Americana de Saúde*, 9(2), pp. 13-19. doi: 10.5123/S2176-62232018000200002
- Martins, D. L., Oliveira, J. E., Ferreira, T. M. S., Lopes, G. S., Treichel, T. L. E., & Prado, T. D. (2020). Avaliação macroscópica da cicatrização de lesões experimentalmente provocadas na pele de coelhos e tratadas com pomada à base da folha do pequizeiro (*Caryocar brasiliense*). *Brazilian Journal of Development*, 6(12), pp. 101926-101936. doi: 10.34117/bjdv6n12-621
- Meinerz, A. R. M., Nascente, P. S., Schuch, L. F. D., Cleff, M. B., Santin, R., Brum, C. S., ... Mello, J. R. B. (2007). Suscetibilidade *in vitro* de isolados de *Sporothrix schenckii* frente à terbinafina e itraconazol. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 40(1), pp. 60-62. doi: 10.1590/S0037-86822007000100012
- Menezes, A. C. P., Filho (2020). Avaliação química e atividades antifúngica e antioxidante dos óleos essenciais dos frutos verdes e maduros de *Citrus limonia* Osbeck (limão-china). *Global Science and Technology*, 13(3), pp. 1-11. Recuperado de <https://rv.ifgoiano.edu.br/periodicos/index.php/gst/article/view/1228>
- Ozarowski, M., & Karpinski, T. M. (2023). The effects of propolis on viral respiratory diseases. (2023). *Molecules*, 28(1), pp. 2-14. doi: 10.3390/molecules28010359
- Passos, X. S., Santos, S. C., Ferri, P. H., Fernandes, O. F. L., Paula, T. F., Garcia, A. C. F., & Silva, M. R. R. (2002). Atividade antifúngica de *Caryocar brasiliensis* (Caryocaraceae) sobre *Cryptococcus neoformans*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 35(6), pp. 623-627. doi: 10.1590/S0037-86822002000600013
- Pereira, L. V. A. C., Silva, L. C., Sá, M. C., Moreira, M. C., Nascimento, G. L. M. S., Andrade, T. C., ... Silva, F. L. (2021). Análise *in vitro* da atividade antifúngica de extratos vegetais frente a leveduras pertencentes à espécie *Candida albicans*. *Research, Society and Development*, 10(10), pp. 1-8. doi: 10.33448/rsd-v10i10.19075
- Peter, C. M., Waller, S. B., Picoli, T., Osório, L. G., Zani, J. L., Meireles, M. C. A., ... Fischer, G. (2019). Análises químicas e citotóxicas de três variedades de própolis brasileiras (própolis verde, própolis jataí e própolis marrom) e sua atividade *in vitro* anti-*Sporothrix brasiliensis*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 71(3), pp. 819-827. doi: 10.1590/1678-4162-9918
- Pimentel, S. P., Santos, M. H., Cabral, L. A. R., & Costa, P. P. C. (2017). Complicações do uso do Itraconazol–Revisão. (2017). *Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública*, 4(2), pp. 191-193. doi: 10.4025/revcivet.v4i2.36583
- Queiroz-Fernandes, G., & Magalhães, J. C. S. (2021). Perfil de resistência de agentes de micoses oportunistas no Brasil. *InterAmerican Journal of Medicine and Health*, 4, pp. 1-9. doi: 10.31005/iajmh.v4i.149
- Sampaio, L. T. R. (2022). *Potencial antimicrobiano e antiaderente do óleo essencial de Melaleuca alternifolia contra cepa de Staphylococcus saprophyticus* [Monografia do Curso de Bacharelado em Odontologia, Universidade Federal de Pernambuco]. UFPE. <http://dspace.sti.ufcg.edu.br:8080/jsui/handle/riufcg/23861>
- Santos, J. C., Carvalho, C. D. Filho, Barros, T. F., & Guimarães, A. G. (2011). Atividade antimicrobiana *in vitro* dos óleos essenciais de orégano, alho, cravo e limão sobre bactérias patogênicas isoladas de vôngole. *Semina Ciências Agrárias*, 32(4), pp. 1557-1564. doi: 10.5433/1679-0359.2011v32n4p1557
- Santos, J. R. E., & Casteluber, M. C. F. (2020). *Citrus limon*, *Melaleuca alternifolia* e *Psidium guajava* como inibidores naturais de *Sporothrix schenckii*. *Uningá Review*, 35, pp. 1-19. doi: 10.46311/2178-2571.35.eRUR3520
- Santurio, J. M., Santurio, D. F., Pozzatti, P., Moraes, C., Franchin, P. R., & Alves, S. H. (2007). Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de Salmonella entérica de origem avícola. *Ciência Rural*, 37(3), pp. 803-808. doi: 10.1590/S0103-84782007000300031