

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

RAUL ROQUE DE SOUZA DIAS

**TESTES DE SENSIBILIDADE *IN VITRO* DE *Sporothrix brasiliensis* FRENTE A  
COMPOSTOS TIAZÓIS PARA O DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS  
PARA O TRATAMENTO DA ESPOROTRICOSE FELINA**

BELO HORIZONTE

2025

RAUL ROQUE DE SOUZA DIAS

**TESTES DE SENSIBILIDADE *IN VITRO* DE *Sporothrix brasiliensis* FRENTE A  
COMPOSTOS TIAZÓIS PARA O DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS  
PARA O TRATAMENTO DA ESPOROTRICOSE FELINA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Kelly Moura Keller

Co-orientadora: Rossimiriam Pereira de Freitas

BELO HORIZONTE

2025

## FICHA CATALOGRÁFICA

D541t Dias, Raul Roque de Souza, 1997 -  
Testes de sensibilidade in vitro de *Sporothrix brasiliensis* frente a compostos Tiazóis para o desenvolvimento de novos Fármacos para o tratamento da Esporotricose Felinaprurido /Raul Roque de Souza Dias.- 2025.  
56f. il

Orientadora: Kelly Moura Keller  
Coorientadora: Rosemiriam Pereira de Freitas

Dissertação (Mestrado) apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais para obtenção do título de Mestre em Ciências Animal.

Bibliografia: 46 a 56.

1- Gatos - Teses - 2. Gatos - Doenças- Teses – 3- Zoonoses – Teses - I. Keller, Kelly Moura - II. Freitas, Rosemiriam Pereira de. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária – IV. Título.

CDD – 636.8

Bibliotecário responsável Marcio Alves dos santos CRB 3589  
Biblioteca da Escola de Veterinária, UFMG.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

**RAUL ROQUE DE SOUZA DIAS**

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós Graduação em **CIÊNCIA ANIMAL**, como requisito para obtenção do grau de **MESTRE** em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração **Medicina Veterinária Preventiva**. Defesa da dissertação intitulada: "**TESTES DE SENSIBILIDADE *IN VITRO* DE *Sporothrix brasiliensis* FRENTE A COMPOSTOS TIAZÓIS PARA O DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS PARA O TRATAMENTO DA ESPOROTRICOSE FELINA.**"

Aprovado(a) em 30 de maio de 2025, pela banca constituída pelos membros:

Dr.(a). Kelly Moura Keller - Orientador(a)  
Dr.(a). Águida Aparecida de Oliveira  
Dr.(a). Renata Barbosa de Oliveira



Documento assinado eletronicamente por **Silvana de Vasconcelos Cancado, Coordenador(a)**, em 05/08/2025, às 15:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **4432277** e o código CRC **CB4129F8**.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer de coração a toda a minha família pelo apoio e acolhimento durante toda a minha caminhada acadêmica. Um agradecimento especial aos meus pais, Alex Dias e Raquel Roque, por estarem sempre ao meu lado, me apoiando em todos os momentos, acreditando em mim e me incentivando a continuar, mesmo quando as coisas ficaram difíceis.

Sou muito grato também a toda a equipe do LAMICO, que fez parte importante da minha formação. Em especial, agradeço à professora Kelly Moura Keller pelas oportunidades que me deu, por compartilhar tantos conhecimentos, pela paciência e por sempre ter compreensão nos momentos em que eu precisei. Agradeço também em especial às minhas colegas de laboratório, Priscila e Mariana, que me ajudaram muito no dia a dia, tanto no trabalho quanto com apoio pessoal. Ter vocês por perto fez muita diferença.

Meus sinceros agradecimentos aos professores da Universidade, em especial às professoras Rossimiriam Pereira, Maria Isabel de Azevedo, Érika Alvarenga e Renata Barbosa que contribuíram com meu projeto de forma direta e fundamental.

Agradeço de verdade aos meus amigos, que estiveram por perto nos momentos em que eu precisava respirar um pouco, rir e esquecer um pouco da correria. Obrigado por me ouvirem, pelos conselhos, pelas conversas e pela amizade.

Por fim, deixo meu agradecimento à Universidade Federal de Minas Gerais, à Escola de Veterinária e a todos os funcionários que mantêm tudo funcionando. Também sou muito grato à FAPEMIG pelo apoio ao meu projeto, que foi essencial para que tudo acontecesse.

## RESUMO

A esporotricose é uma micose subcutânea de grande importância no que se refere à saúde pública, especialmente no Brasil. *Sporothrix brasiliensis* é a principal espécie associada à transmissão zoonótica da doença por felinos. O aumento da resistência das cepas fúngicas ao itraconazol, um antifúngico amplamente utilizado no tratamento desse tipo de infecção, evidencia a necessidade da busca por novos agentes terapêuticos. Neste contexto, o presente estudo avaliou a atividade *in vitro* antifúngica de seis compostos tiazólicos (RJ54, RJ56, RVJ31, RJ34, RJ38 e RJ59) frente a isolados clínicos de *Sporothrix brasiliensis*, além de investigar o efeito da associação do tiazol RJ59 com o itraconazol. Para a análise, foram utilizados dez isolados leveduriformes de *S. brasiliensis*. A atividade antifúngica foi avaliada através do método de microdiluição em caldo, de acordo com as diretrizes do protocolo do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM). As análises estatísticas foram realizadas por meio do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Conover, considerando nível de significância de  $p < 0,05$ . Os resultados demonstraram que os compostos RJ54 e RJ56 não apresentaram atividade fungistática, nem fungicida, nas concentrações testadas. Os tiazóis RVJ31 e RJ34 exibiram efeito fungistático em concentrações mais elevadas (16–32 mg/L), sendo que RJ34 também apresentou efeito fungicida a 32 mg/L. O composto RJ38 demonstrou desempenho superior, com efeito fungistático e fungicida observado a 16 mg/L. O tiazol RJ59 destacou-se por apresentar atividade fungistática e fungicida em todas as cepas na concentração de 4 mg/L. Na análise final, o desempenho do RJ59 foi estatisticamente semelhante ao do itraconazol. Além disso, a associação entre o tiazol RJ59 e o itraconazol revelou sinergismo, permitindo a obtenção de efeito fungistático e fungicida em concentrações muito reduzidas. A obtenção de atividade antifúngica com dosagens mais baixas é de grande importância clínica, pois contribui para reduzir a toxicidade, melhorar a adesão ao tratamento, diminuir os custos terapêuticos e reduzir a pressão seletiva para o surgimento de cepas resistentes. Em conjunto, os resultados obtidos indicam que o tiazol RJ59, isolado ou em combinação com o itraconazol, representa um forte candidato para o desenvolvimento de novos tratamentos antifúngicos voltados ao combate da esporotricose felina.

Palavras-Chave: Tiazóis, esporotricose felina, antifúngicos, zoonose.

## ABSTRACT

Sporotrichosis is an emerging subcutaneous mycosis of growing public health importance, especially in Brazil, where *Sporothrix brasiliensis* is the main etiological agent, associated with zoonotic transmission by felines. The increasing resistance to itraconazole, the main antifungal used for treatment, highlights the urgent need for new therapeutic options. In this context, the present study evaluated the *in vitro* antifungal activity of six thiazole compounds (RJ54, RJ56, RVJ31, RJ34, RJ38, and RJ59) against clinical isolates of *Sporothrix brasiliensis*, and also investigated the effect of combining the thiazole RJ59 with itraconazole. Ten yeast-form isolates of *S. brasiliensis* were used. Antifungal activity was assessed using the broth microdilution method according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines, to determine minimum inhibitory concentrations (MICs) and minimum fungicidal concentrations (MFCs). Statistical analyses were performed using the non-parametric Kruskal-Wallis test followed by Conover's post-hoc test, with a significance level of  $p < 0.05$ . The results showed that RJ54 and RJ56 did not display fungistatic or fungicidal activity at the tested concentrations. The thiazoles RVJ31 and RJ34 exhibited fungistatic activity at higher concentrations (16–32 mg/L), with RJ34 also demonstrating fungicidal activity at 32 mg/L. RJ38 showed improved performance, with both fungistatic and fungicidal effects observed at 16 mg/L. RJ59 stood out by exhibiting fungistatic and fungicidal activity against all isolates at a concentration of 4 mg/L. In the final analysis, RJ59 demonstrated statistically similar activity to itraconazole. Furthermore, the combination of RJ59 with itraconazole exhibited synergism, allowing antifungal activity to be achieved at markedly lower concentrations. Achieving antifungal efficacy at lower doses is of major clinical relevance, as it helps to reduce toxicity, improve treatment adherence, lower therapeutic costs, and mitigate the selective pressure for the emergence of resistant strains. Overall, the results indicate that the thiazole RJ59, either alone or in combination with itraconazole, is a promising candidate for the development of new antifungal treatments against feline sporotrichosis.

Keywords: Thiazoles, feline sporotrichosis, antifungals, zoonosis.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1 -</b>	Felino diagnosticado com esporotricose com ferida ulcerada na face. Um exemplo da forma cutânea localizada da doença.....	16
<b>Figura 2 -</b>	Felino diagnosticado com esporotricose com feridas ulceradas e sanguinolentas por toda a região da cabeça. Um exemplo da forma cutânea disseminada.....	16
<b>Figura 3 -</b>	Colônia de <i>Sporothrix brasiliensis</i> na sua forma filamentosa com o crescimento de 5 dias a 25°C em SDA.....	18
<b>Figura 4 -</b>	Colônia de <i>Sporothrix brasiliensis</i> na sua forma leveduriforme com o crescimento de 3 dias a 37°C em BHI.....	18
<b>Figura 5 -</b>	Estruturas moleculares dos tiazóis testados.....	29
<b>Figura 6 -</b>	Gráficos de frequência absoluta do efeito fungicida dos tiazóis testados.....	34
<b>Figura 7 -</b>	Gráficos de frequência absoluta do efeito fungistático dos tiazóis testados.....	35
<b>Figura 8 -</b>	Representação gráfica do efeito fungistático do tiazol RJ34 na placa de 96 poços.....	37
<b>Figura 9 -</b>	Representação gráfica do efeito fungistático do tiazol RJV31 na placa de 96 poços.....	38
<b>Figura 10 -</b>	Representação gráfica do efeito fungistático do tiazol RJ38 na placa de 96 poços.....	39
<b>Figura 11 -</b>	Representação gráfica do efeito fungistático do tiazol RJ59 na placa de 96 poços.....	40
<b>Figura 12 -</b>	Representações moleculares dos tiazóis RJ34, RJ38 e RJ59 com seus pontos de similaridades em destaque.....	42

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 -</b>	Estruturas moleculares dos tiazóis testados.....	30
<b>Tabela 2 -</b>	Comparação do efeito fungistático e fungicida de diferentes Tiazóis, Itraconazol e combinação itraconazol + RJ59.....	36

## LISTA DE SIGLAS

ATCC - *American Type Culture Collection*

BHI - *Brain Heart Infusion agar*

CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*

DMSO - *Dimethyl sulfoxide*

DNA - *Deoxyribonucleic acid*

EV - *Escola de Veterinária*

LAMICO - *Laboratório de Micologia e Micotoxinas*

LABIOMIC - *Laboratório de Biologia Molecular e Micologia*

MALDI-TOF *Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*

MIC - *minimum inhibitory concentration*

NaOH - *Sodium hydroxide*

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

pH - *Potential of Hydrogen*

RPMI - *Roswell Park Memorial Institute*

S1 – S10 – *Isolados de Sporothrix brasiliensis*

SDA - *Sabouraud Dextrose Agar*

UFC - *Unidade formadora de colônia*

UFMG - *Universidade Federal de Minas Gerais*

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	10
<b>2 OBJETIVOS</b>	14
2.1 OBJETIVO GERAL	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	15
3.1 ESPOROTRICOSE FELINA	15
3.2 TRATAMENTO DA ESPOROTRICOSE	20
3.3 TIAZOIS COMO POTENCIAIS ANTIFÚNGICOS	23
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b>	26
4.1 ISOLADOS DE <i>Sporothrix brasiliensis</i>	26
4.2. COMPOSTOS TIAZÓLICOS E ITRACONAZOL	26
4.3 PREPARAÇÃO DO MEIO RPMI 1640	26
4.4 ASSOCIAÇÃO ENTRE ITRACONAZOL E TIAZOL	27
4.4.1 Preparo das soluções dos tiazóis e itraconazol	28
4.4.2 Controle de diluição	30
4.4.3 Preparo do inóculo leveduriforme	20
4.4.4 Preparo da placa de microdiluição	31
4.4.5 Associação do composto tiazol RJ59 e itraconazol	32
4.4.6 Armazenamento das placas e leitura dos testes	33
4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	33
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	34
<b>6 CONCLUSÕES</b>	45
<b>7 REFERÊNCIAS</b>	46

## 1 INTRODUÇÃO

A esporotricose é uma doença micótica subcutânea capaz de acometer animais e humanos. É causada pela inoculação traumática de espécies patogênicas de fungos do gênero *Sporothrix*. De forma geral, seres humanos contraem a doença a partir de cepas encontradas no solo, plantas ou matéria orgânica, entretanto, no Brasil, a partir de meados dos anos 90, vários isolados de fungos do gênero *Sporothrix* foram detectados em unhas e presas de animais contaminados, e a maioria dos humanos acometidos pela esporotricose relataram terem sido arranhados ou mordidos por gatos. Dessa forma, a transmissão zoonótica se provou a mais comum em centros urbanos do país (Schubach *et al.*, 2001; Marimon *et al.*, 2006; Marimon *et al.*, 2007; Rodrigues *et al.*, 2014; Rodrigues *et al.*, 2016; Rodrigues *et al.*, 2020).

Devido à característica termodimórfica, fungos do gênero *Sporothrix* são encontrados comumente em sua forma filamentosa na vegetação, no solo e na matéria orgânica em decomposição e seu diagnóstico laboratorial é feito a 25°C em ágar Sabouraud dextrose (SDA) acrescido de cloranfenicol. Sua apresentação leveduriforme é encontrada parasitando o organismo humano e animal, seu cultivo para diagnóstico laboratorial é realizado a 37°C em ágar infusão de cérebro e coração (BHI) (Schubach *et al.*, 2004; Larsson *et al.*, 2011). Atualmente, a esporotricose é especialmente frequente na América Latina, África do Sul, Madagascar, China, Índia e Japão.

Estudos recentes apontam que essa é uma das principais micoses diagnosticadas no Brasil, sendo as regiões sul e sudeste especialmente desafiadas pela doença. É necessário destacar a transmissão zoonótica, na qual o gato é vetor responsável pela transmissão do fungo para os humanos e outros animais na maioria dos casos (Barros *et al.*, 2004; Schubach *et al.*, 2004; Rodrigues *et al.*, 2013). Estudos biomoleculares identificaram a presença de várias espécies do fungo no Brasil, entretanto a espécie apontada com tendo a maior relevância clínica devido a predominância do agente em gatos e humanos e a mais virulenta das cepas é o *S. brasiliensis*, capaz de provocar esporotricose localizada a disseminada podendo levar a morte de humanos e animais (Marimon *et al.*, 2006; Arrillaga-moncrieff *et al.*, 2009; Fernandes *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2013; Rodrigues *et al.*, 2014).

Apesar de existirem diversas espécies animais capazes de contrair a esporotricose, os gatos, são os principais envolvidos na transmissão zoonótica, pois os mesmos apresentam

comportamentos que contribuem para a captação de cepas e disseminação da doença como, hábitos de arranhar árvores, circular de forma errante ou semi domiciliada e brigar por território. Além disso, esses animais apresentam maiores cargas de células leveduriformes nas lesões (Schubach *et al.*, 2001; Barros *et al.*, 2004; De Souza *et al.*, 2006). Nos felinos, a doença pode apresentar-se de maneiras clínicas distintas, que vão desde infecções assintomáticas até a presença de lesões cutâneas únicas ou múltiplas. Além disso, podem ocorrer formas sistêmicas graves, acompanhadas de manifestações respiratórias ou envolvendo o comprometimento de outros órgãos.

Na prática clínica, múltiplas lesões cutâneas e acometimento das mucosas, especialmente do sistema respiratório são mais comumente observadas (Pereira *et al.*, 2010). O fungo pode se disseminar por meio de autoinoculação enquanto o felino se coça ou se lambe, modo pelo qual coloniza unhas e cavidade oral (Schubach *et al.*, 2001). Nos humanos, dentre as diferentes descrições encontradas na literatura, a forma linfocutânea localizada é a apresentação mais comumente observada após a introdução traumática do agente na pele. Formas graves e disseminadas são incomuns em seres humanos, ocorrendo principalmente em pessoas que possuem condições de imunossupressão, como a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), hepatite C, diabetes mellitus, além de serem também relatadas em indivíduos com histórico de abuso de álcool e pacientes submetidos a terapias imunossupressoras (Larsson, 2011; Benvegnú *et al.*, 2017). O tratamento da esporotricose em felinos representa um desafio significativo. Diversos fatores contribuem para a interrupção do tratamento ou até mesmo a opção da eutanásia pelos tutores. Esses fatores incluem a necessidade de um manejo prolongado e regular, a dificuldade dos tutores em administrar medicamentos aos gatos, a disponibilidade limitada de antifúngicos no mercado, a toxicidade dos medicamentos e seus potenciais efeitos colaterais, os custos elevados associados a certos medicamentos, o risco de membros da família contraírem a doença e a ocorrência de recidivas, que podem prejudicar a eficácia do tratamento no geral (Nobre *et al.*, 2002; Barros *et al.*, 2004; Schubach *et al.*, 2004; Gremião *et al.*, 2006; Chaves *et al.*, 2012; Pereira *et al.*, 2014).

Os fármacos mais utilizados no tratamento são o cetoconazol, itraconazol, fluconazol, os iodetos de sódio e potássio, a terbinafina e a anfotericina B. Além disso, pode-se realizar a remoção cirúrgica das lesões, a termoterapia local (Pereira *et al.*, 2009). O itraconazol tem sido amplamente utilizado como o medicamento preferencial devido aos seus melhores resultados terapêuticos e menor incidência de efeitos colaterais em comparação com outros antifúngicos.

No entanto, o tratamento requer um período prolongado e o fármaco deve ser administrado continuamente até após a completa resolução das lesões cutâneas, o que pode levar de algumas semanas a vários meses. Essa duração estendida do tratamento contribui para o alto custo envolvido na terapia da esporotricose (Welsh, 2003; Pereira *et al.*, 2011). Falhas terapêuticas relacionadas ao uso indiscriminado de itraconazol nas clínicas médicas e veterinárias foram relatadas como um dos possíveis fatores que levaram a resistência de isolados de fungos do gênero *Sporothrix* (Odds; Brown; Gow, 2003; Kohler *et al.*, 2004; Schubach *et al.*, 2004; Kohler *et al.*, 2006; Gremião *et al.*, 2009; Pereira *et al.*, 2010).

Durante muitos anos, os fungos têm sido negligenciados em termos de desenvolvimento de novos fármacos. Esse atraso pode ser atribuído ao fato de que, no passado, grande parte das infecções fúngicas era superficial e facilmente tratável, resultando em uma baixa demanda por medicamentos antifúngicos. Além disso, a natureza eucariótica das células fúngicas, que se assemelha às células humanas, representa um desafio na busca por fármacos com mecanismos de ação direcionados a alvos comuns, como ácido desoxirribonucleico (DNA), ácido ribonucleico (RNA) ou síntese de proteínas, ao contrário do que ocorre com as células procarióticas bacterianas (Sundriyal *et al.*, 2006). Em revisão relativa à resistência aos tratamentos, foi relatado que 40% dos gatos tratados não atingiram a cura. Ao analisar somente aqueles tratados com Itraconazol, foi observado a ineficácia em 50% dos casos (Xavier *et al.*, 2019).

Em vista do surgimento de cepas resistentes e dos consequentes insucessos terapêuticos, bem como da escassez de opções de fármacos disponíveis para o tratamento de infecções fúngicas, é de extrema importância deslocar esforços na busca por novos agentes antifúngicos para aprimorar o conjunto de recursos terapêuticos à disposição. Os azóis são uma categoria de compostos químicos heterocíclicos que contêm um átomo de nitrogênio e pelo menos um outro átomo não carbono como parte do seu anel molecular (Eicher *et al.*, 2003). Por outro lado, os tiazóis, ou (1,3-tiazol), têm um átomo de enxofre como o outro átomo não carbono, além do nitrogênio, sendo representados pela fórmula molecular  $C_3H_3NS$  (Lino *et al.*, 2018; Sinha *et al.*, 2018; Althagafi *et al.*, 2019; Aaghaz *et al.*, 2023). Tais conformações moleculares conferem aos tiazóis características singulares, permitindo que a substância seja usada no combate de várias afecções, agindo de forma antitumoral, antiviral, antiparasitária, antibacteriana e antifúngica, estando presente em diversos medicamentos (Lino *et al.*, 2018; Santana *et al.*, 2018; Santos *et al.*, 2018).

Dentre os diversos usos da substância, suas propriedades antifúngicas se destacam. Em sua pesquisa, Leocádio *et al.* (2023) concluíram que os derivados tiazólicos testados revelaram-se eficazes como agentes fungicidas contra o *Cryptococcus* spp. Destacando que esses compostos não apenas inibiram a produção de melanina e ergosterol pelos fungos, mas também reduziram significativamente sua quantidade. Além disso, em ensaios de transcitose, esses derivados demonstraram capacidade de impedir a passagem das leveduras através das membranas celulares estudadas. Acrescentaram também que experimentos realizados em modelos animais, os compostos apresentaram resultados promissores: a sobrevivência dos animais tratados foi prolongada, e a carga fúngica diminuiu consideravelmente. Em geral, os tiazóis são considerados promissores para o planejamento de novos agentes antifúngicos. Considerando a atividade antifúngica demonstrada por alguns tiazóis frente a fungos de importância clínica, este estudo propõe avaliar *in vitro* a sensibilidade de isolados de *Sporothrix brasiliensis* frente a uma série de compostos, com o objetivo de gerar informações relevantes para o desenvolvimento de novos fármacos eficazes no tratamento da esporotricose felina.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Testar o potencial antifúngico *in vitro* de compostos tiazóis frente a isolados de *Sporothrix brasiliensis*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a concentração inibitória mínima de compostos tiazóis, frente a isolados de *Sporothrix brasiliensis* em sua apresentação leveduriforme.
- Determinar a concentração inibitória mínima de compostos tiazóis associados ao itraconazol frente a isolados de *Sporothrix brasiliensis* em sua apresentação leveduriforme.
- Analisar a viabilidade da associação do itraconazol e do tiazol testado com o maior potencial frente a isolados de *Sporothrix brasiliensis* em sua apresentação leveduriforme.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 ESPOROTRICOSE FELINA

A esporotricose é uma doença micótica de caráter subagudo ou crônico desencadeada por fungos do gênero *Sporothrix*, representando um desafio tanto para a saúde humana quanto para a veterinária. Devido à sua característica zoonótica, possui a capacidade de se propagar entre animais e humanos, afetando uma ampla gama de mamíferos, com destaque para os felinos domésticos e humanos, tornando-se um ponto de atenção para a saúde pública (Weese; Fulford, 2011; Rodrigues *et al.*, 2015).

A esporotricose pode se manifestar de diversas formas, desde a cutânea localizada (Figura 1), na qual a infecção fica restrita a uma área específica da pele, linfocutânea, onde o fungo se dissemina pelos vasos linfáticos, formando lesões nodulares e ulceradas. Em casos mais intensos, a micose pode se disseminar para várias áreas do corpo do animal, comprometendo grande parte do tecido cutâneo, configurando a forma disseminada (Figura 2), ou ainda, comprometer estruturas internas, como ossos e articulações, na forma extracutânea. Independentemente da forma clínica, a esporotricose, na maior parte dos casos, se caracteriza pela presença de sinais clínicos marcantes, como o surgimento de nódulos, que podem evoluir para úlceras com secreção purulenta ou hemorrágica (Jones; Hunt; King, 2000).

**Figura 1** - Felino diagnosticado com esporotricose com ferida ulcerada na face. Um exemplo da forma cutânea localizada da doença.



Fonte: Arquivo pessoal.

**Figura 2** - Felino diagnosticado com esporotricose com feridas ulceradas e sanguinolentas por toda a região da cabeça. Um exemplo da forma cutânea disseminada.



Fonte: Arquivo pessoal.

A infecção por *Sporothrix* sp. tem início, na maioria dos casos, quando o fungo é inoculado através de uma lesão cutânea, alcançando camadas mais profundas do tecido e transformando-se em levedura. A partir dessa instalação, o agente pode permanecer no ponto

de entrada, originando lesões nodulares que podem evoluir para úlceras com secreção característica, ou, em casos mais incomuns, pode se disseminar para outros órgãos, como olhos, sistema respiratório e sistema nervoso central. A forma que a doença assume é influenciada pela resposta imunológica do hospedeiro, quantidade do inóculo e características da cepa. Apesar da inoculação traumática ser a forma mais comum de contágio, outras formas já foram descritas, como a inalação, aspiração ou ingestão do fungo (Brum *et al.*, 2007; Dabus *et al.*, 2008).

A esporotricose é uma infecção muito comum no Brasil (Rodrigues, 2015). Ao longo dos anos, no Brasil, a principal via de contaminação mudou da forma clássica. Registros indicam que no período entre de 1950 - 1990, houve predominância de esporotricose humana, sendo a maioria dos casos pela via clássica de transmissão, ou seja, através de feridas causadas por plantas infectadas pela forma ambiental do fungo, resultando em grande parte dos casos formas cutâneas e linfáticas enquanto as sistêmicas e disseminadas eram mais incomuns. No entanto, a partir de meados da década de 1990, começou a aumentar o número de casos de esporotricose em gatos no Rio de Janeiro, com o isolamento de *S. schenckii s.* das garras e cavidade oral de animais infectados, dessa forma, a maioria dos pacientes com esporotricose relataram ter sido mordidos ou arranhados por gatos. No Rio de Janeiro, foi registrado pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) um aumento abrupto e contínuo a partir de 1998, totalizando 4517 casos de 1991 a 2015 (Schubach *et al.*, 2001; Freitas *et al.*, 2010; Falcao *et al.*, 2019). O aumento crescente dos casos continuou a ser observado, até que em 2019 milhares de casos de esporotricose felina foram relatados no Brasil, com um destaque para as regiões sul e sudeste. No que se refere à esporotricose humana, há relatos em todas as regiões, confirmando a crescente rápida da doença se comparada com anos anteriores (Rodrigues *et al.*, 2020).

Os fungos do gênero *Sporothrix* apresentam dimorfismo térmico, modificando sua estrutura conforme a temperatura e o meio em que se desenvolvem. No ambiente, possuem afinidade por solo, plantas e matéria orgânica, onde se apresentam na forma filamentosa (Figura 3) a temperaturas próximas a 25 °C. Já em hospedeiros suscetíveis, como animais e humanos, a 37 °C, assumem a apresentação leveduriforme (Figura 4), adaptando-se às condições do organismo infectado (Larsson *et al.*, 2011).

**Figura 3** - Colônia de *Sporothrix brasiliensis* na sua forma filamentosa com o crescimento de 5 dias a 25°C em SDA.



Fonte: Arquivo pessoal.

**Figura 4** - Colônia de *Sporothrix brasiliensis* na sua apresentação leveduriforme com o crescimento de 3 dias a 37°C em BHI.



Fonte: Arquivo pessoal.

Atualmente, diversas metodologias estão disponíveis para o diagnóstico da esporotricose em felinos, sendo o isolamento e identificação de *Sporothrix* spp a partir de amostras clínicas ainda considerado o método mais confiável. O procedimento consiste no cultivo de fragmentos de tecido ou exsudato em ágar Sabouraud dextrose, podendo conter cloranfenicol, com incubação a 25 °C.

O crescimento micelial geralmente ocorre entre 5 e 15 dias. As colônias apresentam, inicialmente, aspecto claro e dimensões reduzidas, tornando-se progressivamente de coloração marrom, cinza-escuro ou quase preto ao longo de uma a duas semanas. Na análise microscópica, observa-se a presença de hifas hialinas septadas e seus conídeos organizados em estruturas que lembram um arranjo floral, similar a uma margarida.

Para confirmação do dimorfismo térmico característico do gênero, a forma filamentosa deve ser repicada em ágar BHI e incubada entre 35 e 37 °C. Após 38 a 72 horas, é possível observar a transição para a fase leveduriforme, cuja presença reforça a identificação do microrganismo. Macroscopicamente, essas colônias de levedura variam de tonalidade esbranquiçada a amarelo-acinzentada, e, ao microscópio, exibem células arredondadas ou ovais, semelhantes às visualizadas em esfregaços clínicos de gatos acometidos (Arenas *et al.*, 2018).

O exame citopatológico de esfregaços de lesões, utilizando hidróxido de potássio (KOH 10-40%) ou colorações diferenciais (GRAM, PAS e Giemsa), permite a visualização direta de estruturas leveduriformes ovais ou alongadas, com morfologia característica de "charuto". Este método é amplamente empregado como triagem inicial devido à sua elevada sensibilidade, especialmente em felinos, onde a alta carga fúngica no exsudato cutâneo facilita a detecção. Sua praticidade, rapidez e baixo custo o tornam uma ferramenta valiosa para o diagnóstico presuntivo da esporotricose (Pereira *et al.*, 2011; Arenas *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2018).

Para confirmação diagnóstica, técnicas moleculares como o sequenciamento de genes codificadores (calmodulina,  $\beta$ -tubulina e fator de alongação da tradução) e ensaios baseados em PCR destacam-se pela alta precisão na identificação das espécies de *Sporothrix* sp. A espectrometria de massas (MALDI-TOF) também tem se mostrado eficaz, oferecendo identificação rápida e específica. A sorologia, por sua vez, é útil como ferramenta de triagem em casos clinicamente ambíguos ou em espécies não felinas, além de auxiliar no monitoramento terapêutico. A histopatologia complementa a investigação, revelando padrões inflamatórios sugestivos e, eventualmente, as típicas leveduras em forma de charuto em tecidos ou exsudatos (Miranda *et al.*, 2013; Oliveira *et al.*, 2015; Rodrigues *et al.*, 2015).

### 3.2 TRATAMENTO DA ESPOROTRICOSE FELINA

O manejo terapêutico da esporotricose em gatos apresenta diversos desafios, principalmente pela sensibilidade da espécie a determinados antifúngicos, pela necessidade de tratamentos prolongados e pela alta taxa de mortalidade em animais com lesões extensas ou imunocomprometidos, muitas vezes antes mesmo de completarem o primeiro mês de tratamento. A escolha da abordagem terapêutica varia conforme a gravidade do quadro clínico, a localização e extensão das lesões, o estado imunológico do animal e a espécie de *Sporothrix* sp envolvida no processo infeccioso (Pereira *et al.*, 2010; Pereira *et al.*, 2014; Nakasu *et al.*, 2020).

Os azóis representam uma das principais classes de antifúngicos utilizados no tratamento da esporotricose. Seu mecanismo de ação envolve a inibição da enzima lanosterol 14- $\alpha$ -demetilase, essencial para a conversão do lanosterol em ergosterol, componente-chave da membrana celular fúngica. A interrupção dessa via compromete a integridade da membrana, aumentando sua permeabilidade e levando à morte celular. Dentro dos subgrupos dessa classe, o itraconazol costuma ser amplamente empregado nos protocolos terapêuticos devido ao seu perfil farmacológico favorável em casos de esporotricose (Alspaugh, 2020; Gintjee, Donnelley; Thompson, 2020).

O itraconazol é amplamente utilizado no tratamento da esporotricose felina, sendo geralmente preferido devido à sua eficácia e melhor tolerância clínica em comparação a outros antifúngicos da mesma classe. Ele é indicado em diferentes formas clínicas da doença e apresenta boa penetração tecidual, fator importante para o controle das lesões. Além disso, costuma provocar menos efeitos colaterais que o cetoconazol, como distúrbios gastrointestinais e hepáticos, embora seu uso prolongado exija acompanhamento da função hepática. A literatura recomenda que o tratamento com itraconazol seja mantido até pelo menos um mês após a completa cicatrização das lesões, o que pode representar um desafio devido ao custo e à necessidade de adesão por longos períodos. Casos mais graves, imunossuprimidos ou com envolvimento sistêmico podem ter resposta terapêutica limitada, mesmo com o uso desse antifúngico. Ainda assim, quando utilizado adequadamente, o itraconazol tem se mostrado uma opção terapêutica sólida e segura para felinos com esporotricose (Macdonald, Ewert;

Reitmeyer, 1980; Welsh, 2003; Schubach *et al.*, 2004; Pereira *et al.*, 2010; Rossi, Odaguiri; Larsson, 2013; Lloret *et al.*, 2013; Gremião *et al.*, 2014; Thomson *et al.*, 2019).

A anfotericina B, um agente poliênico, atua ligando-se ao ergosterol da membrana fúngica, aumentando sua permeabilidade e levando à morte celular. Estudos apontam sua boa atividade contra espécies de *Sporothrix* spp, inclusive em casos graves. Contudo, seu uso intravenoso em gatos é bastante limitado devido à alta frequência de efeitos adversos, como trombose venosa, nefrotoxicidade e falta de resposta clínica. Em tentativas alternativas, a administração intralesional da droga, associada ao itraconazol, demonstrou bons resultados em gatos com lesões refratárias, apesar de alguns efeitos locais como edema e abscessos estéreis. A via subcutânea, também em associação ao itraconazol, mostrou eficácia em parte dos casos, porém com registros de recidiva, ausência de resposta e efeitos adversos semelhantes. Essas vias alternativas, embora promissoras, ainda carecem de padronização e apresentam limitações práticas (Marimon *et al.*, 2007b; Silveira *et al.*, 2009; Gutierrez-galhardo *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2011; Gintjee, Donnelley; Thompson, 2020).

Uma alternativa terapêutica para a esporotricose felina são as alilaminas, sendo a terbinafina a principal representante dessa classe. Esse antifúngico age inibindo a esqualeno epoxidase, enzima essencial para a síntese do ergosterol, afetando a integridade da membrana fúngica. Estudos laboratoriais demonstraram que a terbinafina possui boa atividade contra isolados de *Sporothrix* spp, inclusive superior à de alguns azólicos, o que a torna promissora como tratamento complementar (Nusbaum *et al.*, 1983; Rodrigues, 2009; Gremião *et al.*, 2009; Gremião *et al.*, 2011; Rodrigues *et al.*, 2014a; Ishida *et al.*, 2015; Brilhante *et al.*, 2016; Córdoba *et al.*, 2018).

Entretanto, sua eficácia *in vivo* ainda é questionável. Testes com gatos mostraram baixas taxas de cura, mesmo quando usada em associação com o itraconazol. Além disso, estudos *in vitro* identificaram resistência à terbinafina em boa parte dos isolados de *S. brasiliensis*, o que pode comprometer sua efetividade clínica. Em modelo murino, a terbinafina também demonstrou baixa eficácia no controle da esporotricose cutânea. Esses resultados sugerem que, apesar de seu potencial, a terbinafina apresenta limitações importantes em termos de resposta clínica e resistência fúngica.

Por muito tempo, os fungos foram negligenciados nas pesquisas para desenvolvimento de novos medicamentos, o que acabou limitando bastante as opções de tratamento antifúngico

disponíveis hoje. Isso se deve, em parte, à antiga ideia de que infecções fúngicas eram sempre brandas e fáceis de tratar. Com o tempo, essa percepção mudou, principalmente com o aumento das infecções mais graves e da resistência aos medicamentos. O problema é que os fungos, por serem organismos eucariontes como nós, têm estruturas muito parecidas com as das células humanas. Isso dificulta a criação de medicamentos que ataquem apenas o fungo sem prejudicar o paciente. Na medicina veterinária, e especialmente no tratamento da esporotricose em gatos, isso é ainda mais desafiador. Muitos felinos não respondem bem aos tratamentos, e estudos mostram que até 40% deles não chegam à cura. Quando se trata do itraconazol, o antifúngico mais usado, esse número pode ser ainda maior. Diante disso, fica claro que precisamos urgentemente de novos antifúngicos, mais eficazes e acessíveis para o dia a dia da clínica (Sundriyal *et al.*, 2006; Xavier *et al.*, 2019).

Outro grande desafio no combate à esporotricose felina é o tempo que o tratamento leva para fazer efeito. Em muitos casos, o tratamento precisa continuar mesmo depois que as lesões já cicatrizaram e isso pode durar meses. Além do custo elevado, esse processo todo exige uma dedicação enorme por parte dos tutores, o que infelizmente nem sempre acontece. Muitas vezes, os tutores desistem no meio do caminho ou acabam administrando o medicamento de forma incorreta. Para piorar, o uso excessivo e muitas vezes inadequado de antifúngicos como o itraconazol tem contribuído para o surgimento de cepas resistentes de *Sporothrix sp.* Por isso, é essencial que o tratamento seja feito com responsabilidade, com acompanhamento adequado e protocolos bem definidos (Welsh, 2003; Schubach *et al.*, 2004; Kohler *et al.*, 2006; Gremião *et al.*, 2009; Pereira *et al.*, 2010; Pereira *et al.*, 2010; Gremião *et al.*, 2011).

Existem muitos motivos que levam ao abandono do tratamento ou mesmo à decisão pela eutanásia do animal. Um dos principais é a dificuldade que muitos tutores enfrentam para medicar gatos todos os dias por um longo período. Além disso, a variedade de antifúngicos veterinários ainda é pequena, muitos medicamentos têm efeitos colaterais importantes, e o custo, principalmente em tratamentos prolongados, pode ser alto. Também pesa o medo da transmissão da doença para humanos e a frustração de ver a doença voltando mesmo após meses de tratamento. Para completar, fatores ligados ao próprio organismo do animal também influenciam no sucesso do tratamento. A idade, por exemplo, pode impactar a resposta imune: gatos mais jovens costumam ter uma carga fúngica maior e uma resposta inflamatória mais fraca. As lesões em regiões como o nariz, onde a irrigação sanguínea é menor, também dificultam a ação dos medicamentos, tornando o tratamento ainda mais complicado. Por isso, a

região nasal é frequentemente apontada como uma das mais difíceis de tratar, e merece atenção especial desde o início (Nobre *et al.*, 2001; Gremião *et al.*, 2011; Chaves *et al.*, 2012; Reis *et al.*, 2012; Pereira *et al.*, 2014).

### 3.3 TIAZÓIS COMO POTENCIAIS ANTIFÚNGICOS

Os azóis compõem uma das mais relevantes e amplamente estudadas classes de compostos heterocíclicos utilizados na farmacologia moderna, sendo particularmente notáveis por sua aplicação no combate a infecções fúngicas. Estruturalmente, esses compostos são definidos pela presença de um anel heterocíclico que contém pelo menos um átomo de nitrogênio e outro átomo não carbônico, o que lhes confere propriedades específicas, facilitando sua interação com alvos biológicos fundamentais para a sobrevivência de microrganismos patogênicos (Eicher *et al.*, 2003). Essa conformação estrutural tem sido amplamente explorada no desenvolvimento de agentes terapêuticos com ação antifúngica, antibacteriana e antiviral, destacando-se como um alicerce para a síntese de novos fármacos.

Dentro dessa ampla família de compostos, os tiazóis, também conhecidos como 1,3-tiazóis, merecem destaque por apresentarem uma configuração química ainda mais específica, incorporando átomos de nitrogênio e enxofre ao seu anel heterocíclico. Essa composição única resulta na fórmula molecular  $C_3H_3NS$  e confere aos tiazóis uma série de propriedades químicas e farmacológicas singulares, que os diferenciam de outros compostos heterocíclicos análogos (Lino *et al.*, 2018; Althagafi *et al.*, 2019; Aaghaz *et al.*, 2023). O anel tiazólico possui alta densidade eletrônica e capacidade de formar interações específicas com enzimas e outras proteínas-alvo, o que favorece sua incorporação em estratégias terapêuticas direcionadas a diversos tipos de patógenos.

A versatilidade estrutural dos tiazóis, somada à sua estabilidade e capacidade de modificação química, tem estimulado sua aplicação em diversos campos da medicina. Atualmente, esses compostos são investigados por seu potencial em uma ampla gama de atividades biológicas, incluindo ação antitumoral, antiviral, antiparasitária, antibacteriana e, especialmente, antifúngica. Essa ampla aplicabilidade é resultado da interação eficiente dos tiazóis com biomoléculas críticas nos organismos-alvo, interferindo em processos fisiológicos essenciais e, em muitos casos, resultando na morte celular (Lino *et al.*, 2018; Santos *et al.*, 2016).

Dentre as várias atividades farmacológicas dos tiazóis, a atividade antifúngica tem chamado a atenção da comunidade científica devido ao aumento da incidência de micoses sistêmicas e à crescente resistência aos antifúngicos convencionais. Estudos recentes, como o conduzido por Leocádio *et al.* (2023), investigaram a ação de derivados tiazólicos sobre cepas de *Cryptococcus* spp., um fungo oportunista de alta relevância clínica, principalmente em pacientes imunocomprometidos. Os resultados obtidos foram animadores: os compostos testados inibiram significativamente a produção de melanina e ergosterol pelos fungos, substâncias essenciais à virulência e integridade da membrana fúngica, respectivamente, e também reduziram substancialmente a carga fúngica *in vitro*.

Além disso, os mesmos derivados tiazólicos demonstraram impedir a transcitose, mecanismo pelo qual os fungos atravessam barreiras celulares, como o endotélio da barreira hematoencefálica, o que tem implicações diretas na disseminação do patógeno no organismo do hospedeiro. Esses achados sugerem que os tiazóis podem atuar não apenas como fungistáticos ou fungicidas, mas também como inibidores da disseminação sistêmica dos fungos, o que amplia ainda mais seu potencial terapêutico. Nos ensaios realizados em modelos animais, os resultados também se mostraram promissores: os animais tratados com os compostos apresentaram sobrevida prolongada e redução significativa da carga fúngica nos órgãos avaliados, reforçando a eficácia sistêmica dessas moléculas.

Apesar dos avanços já registrados quanto à ação dos tiazóis sobre fungos como *Cryptococcus* sp, a literatura ainda carece de mais informações quanto à eficácia desses compostos frente a outros patógenos fúngicos de importância veterinária e zoonótica, como o gênero *Sporothrix*. Entre as espécies desse gênero, destaca-se a *Sporothrix brasiliensis*, principal agente etiológico da esporotricose felina no Brasil e responsável por surtos zoonóticos cada vez mais frequentes, sobretudo em áreas urbanas. A esporotricose é uma micose subcutânea de difícil controle, que pode evoluir para quadros graves, especialmente em animais imunossuprimidos ou com lesões disseminadas. O tratamento convencional é baseado, em grande parte, no uso de antifúngicos azólicos, como o itraconazol, cuja eficácia pode ser limitada em casos refratários ou prolongados.

Nesse contexto, torna-se urgente a busca por alternativas terapêuticas mais eficazes, acessíveis e com menor toxicidade. A descoberta de novos compostos com ação antifúngica, como os tiazóis, pode representar um avanço importante no enfrentamento da esporotricose, sobretudo frente ao aumento da resistência observada em algumas cepas de *S. brasiliensis* aos

antifúngicos tradicionais. Considerando os bons resultados obtidos em estudos com outros fungos patogênicos, os tiazóis despontam como candidatos promissores para testes específicos contra o gênero *Sporothrix*.

Dessa forma, o presente estudo propõe a realização de ensaios *in vitro* para avaliar a sensibilidade de isolados clínicos de *S. brasiliensis* frente a compostos tiazólicos previamente selecionados. Espera-se que, a partir dessa análise, seja possível gerar dados robustos e inéditos que possam contribuir para o entendimento do potencial antifúngico dessa classe química frente à esporotricose felina. Os resultados obtidos poderão fundamentar futuras pesquisas em modelos *in vivo*, e, eventualmente, orientar o desenvolvimento de novos fármacos específicos para o tratamento dessa micose, com melhor desempenho clínico e menor toxicidade para os animais acometidos. O avanço nesse campo pode representar uma resposta concreta às limitações enfrentadas atualmente na terapêutica da esporotricose, oferecendo esperança de tratamento mais eficaz e seguro tanto para os gatos quanto para os tutores envolvidos no manejo da doença.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 ISOLADOS DE *Sporothrix brasiliensis*

Foram utilizados dez isolados de *Sporothrix brasiliensis* caracterizados molecularmente, fornecidos pelo Laboratório de biologia molecular e micologia (LABIOMIC) da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais. Os testes foram realizados com *S. brasiliensis* na sua apresentação leveduriforme. Os isolados clínicos foram identificados como S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, S8, S9, S10.

### 4.2 COMPOSTOS TIAZÓLICOS E ITRACONAZOL

Sete compostos tiazólicos foram fornecidos pela Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais e identificados como RJ29, RVJ31, RJ54, RJ56, RJ34, RJ38 e RJ59. A representação da fórmula estrutural das substâncias está mostrada na Figura 5. O itraconazol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi utilizado como o padrão antifúngico para fins de comparação. Para a realização do controle de qualidade do itraconazol, foram utilizados isolados de *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Aspergillus flavus* ATCC 204304, sendo testadas, respectivamente, as apresentações leveduriforme e filamentosa. Tanto os tiazóis quanto o itraconazol foram mantidos em armazenamento a -20 °C até serem necessários para uso.

### 4.3 PREPARAÇÃO DO MEIO RPMI 1640

Para os ensaios de microdiluição em caldo, foi empregado o meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640, contendo L-glutamina, isento de bicarbonato de sódio e com vermelho de fenol como indicador de pH (Gibco®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). O meio foi adquirido em pó e reconstituído conforme as orientações do fabricante.

Uma formulação foi preparada a partir desse meio destinada à realização dos testes com a apresentação leveduriforme do fungo e à preparação dos tiazóis, foi composta por 10,4 g do meio RPMI 1640, dissolvidos em solução tampão MOPS (ácido 3-[N-morfolino] propanosulfônico) a 0,165 M, na proporção de 34,53 g/L (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), completando-se o volume final com água destilada até 1 litro.

A completa solubilização dos componentes foi obtida por agitação em agitador magnético (Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil). O pH da solução foi ajustado para 7,0 com hidróxido de sódio (NaOH) 1 mol/L, sendo a aferição realizada com auxílio de um pHmetro de bancada (PG 1800, Gehaka, São Paulo, SP, Brasil). Posteriormente, as soluções foram submetidas à esterilização por filtração, utilizando membranas com poros de 0,22 µm sob pressão positiva, e armazenadas a -8 °C até sua utilização nos experimentos.

#### 4.4 ASSOCIAÇÃO ENTRE ITRACONAZOL E TIAZOL

Para avaliar a sensibilidade dos fungos isolados aos compostos tiazóis, foi realizado o teste de concentração inibitória mínima utilizando o método de microdiluição em caldo. As diretrizes detalhadas nos documentos M38-A (CLSI, 2002a) e M27-A2 (CLSI, 2002b) do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) foram seguidas de forma apropriada. Algumas modificações específicas foram implementadas para que as necessidades do estudo tenham sido atendidas. Foi realizado o teste de sensibilidade de sete compostos tiazólicos, fornecidos pela Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais. Esses compostos foram preparados inicialmente como soluções estoque de 1000 mg/L, utilizando dimetilsulfóxido (DMSO) como solvente. Em seguida, foram realizadas dez diluições consecutivas utilizando o meio líquido RPMI-1640, suplementado com L- glutamina e tamponado com MOPS 0,165 M. Além disso, o meio foi enriquecido com 20% de glicose. As diluições abrangem uma ampla faixa de concentrações de teste, variando de 32 mg/L a 0,25 mg/L. Posteriormente, foram adicionadas alíquotas de 100 µL de cada diluição aos poços de uma placa de microdiluição de 96 poços. Esse método permitiu avaliar de forma precisa e padronizada a concentração inibitória mínima (CIM) de cada tiazol frente aos fungos investigados.

Para se obter o inóculo das leveduras, os isolados foram primeiramente cultivados em placas contendo ágar BHI, sendo incubados a uma temperatura de 35°C por um período que varia de 48 a 72 horas. Após o crescimento adequado, às culturas de leveduras foram coletadas individualmente usando alças estéreis e transferidas para tubos de ensaio contendo 5 mL de solução salina estéril (0,85%). As suspensões resultantes foram agitadas por 15 segundos e a densidade óptica medida a 530 nm utilizando um espectrofotômetro, ajustando a transmitância para uma faixa de 75-77%. Para preparar a concentração final adequada, a suspensão de leveduras foi então diluída duas vezes usando meio RPMI-1640 tamponado. A primeira diluição foi feita na proporção de 1:50 e a segunda diluição na proporção de 1:20, resultando em uma concentração final de  $1 \times 10^3$  a  $5 \times 10^3$  unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL).

Este protocolo garante a padronização do inóculo de leveduras para os ensaios subsequentes de sensibilidade aos compostos estudados. Em cada placa, foi testado um composto e foi feita uma duplicata, além do itraconazol, que foi usado como antifúngico de referência para comparação com os resultados obtidos dos compostos. Houve um controle de inóculo, contendo apenas o meio RPMI-1640 tamponado e o inóculo; controle de esterilidade, contendo apenas o meio RPMI-1640 tamponado; e controle de toxicidade, contendo o inóculo, o meio RPMI-1640 tamponado e o DMSO na maior concentração utilizada no teste. A concentração inicial usada para os compostos foi de 32 mg/L, sendo diluída 1:2 a cada poço subsequente. O itraconazol foi testado na concentração inicial de 16 mg/L. Em cada poço, foram adicionados 100 µL do composto e 100 µL do inóculo. Os resultados das duplicatas foram considerados concordantes quando as CIM determinadas nos diferentes experimentos não apresentaram variação de mais de duas concentrações. A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi feita por avaliação visual, observando o crescimento fúngico no fundo de cada poço da placa. Os resultados foram interpretados comparativamente com o controle do inóculo, utilizando critérios predefinidos para determinar a eficácia dos compostos testados contra os fungos estudados.

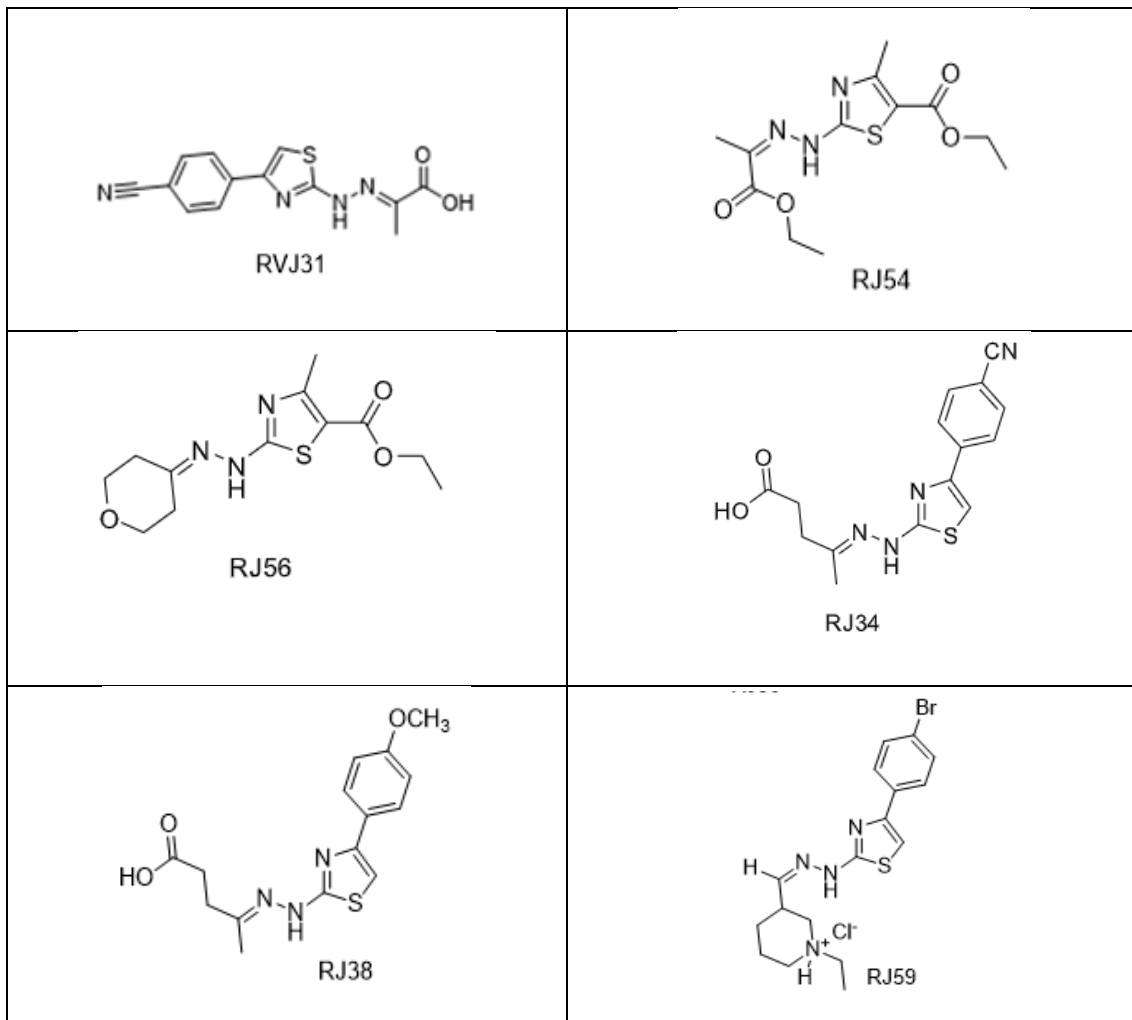
#### 4.4.1 Preparo das soluções tiazóis e do itraconazol

Foram preparadas soluções-estoque dos tiazóis e do itraconazol nas concentrações de 3200 mg/L e 1600 mg/L, respectivamente, utilizando DMSO como veículo solubilizante

(Merck, Darmstadt, HE, Alemanha). Posteriormente, essas soluções foram diluídas em meio RPMI 1640 tamponado com MOPS, de forma a alcançar o dobro das concentrações finais desejadas nos ensaios de microdiluição: 64 mg/L para os tiazóis e 32 mg/L para o itraconazol.

As diluições subsequentes foram realizadas diretamente nas placas de ensaio, por meio de diluições seriadas em razão 1:2, empregando o mesmo meio RPMI. Com esse procedimento, as concentrações finais testadas variaram entre 32 mg/L e 0,25 mg/L para os tiazóis, e entre 16 mg/L e 0,0125 mg/L para o itraconazol (Tabela 1), permitindo a avaliação da atividade antifúngica em diferentes faixas de concentração.

**Figura 5** - Estruturas moleculares dos tiazóis testados.



Fonte: Elaborado por Renata Barbosa de Oliveira..

**Tabela 1** - Concentrações dos compostos tiazóis e do itraconazol avaliadas nos estudos de microdiluição em caldo.

Poço	TIAZÓIS	ITRACONAZOL
1	32 mg/L	16 mg/L
2	16 mg/L	8 mg/L
3	8 mg/L	4 mg/L
4	4 mg/L	2 mg/L
5	2 mg/L	1 mg/L
6	1 mg/L	0,5 mg/L
7	0,5 mg/L	0,25 mg/L
8	0,25 mg/L	0,125 mg/L

Fonte: Elaborado pelo autor.

#### 4.4.2 Controle de diluição

Visando assegurar que o DMSO não exercesse efeito tóxico sobre os isolados fúngicos, a maior concentração do solvente presente nos ensaios foi previamente testada. Para isso, uma solução controle contendo apenas o DMSO diluído em meio RPMI 1640 tamponado, isenta de tiazóis ou itraconazol, foi preparada e avaliada quanto à sua influência no crescimento fúngico. Essa condição controle foi aplicada aos dez isolados testados, tanto na apresentação leveduriforme quanto filamentosa, utilizando placas de 96 poços como suporte experimental.

#### 4.4.3 Preparo do inóculo leveduriforme

O preparo do inóculo leveduriforme iniciou-se com o cultivo dos isolados fúngicos em ágar BHI (Becton Dickinson, East Rutherford, NJ, EUA), incubados por 48 a 72 horas a 37 °C em estufa com circulação de ar forçado (ACBLABOR, Americana, SP, Brasil). Após o crescimento, as colônias foram cuidadosamente coletadas com alça estéril e transferidas para tubos contendo 5 mL de solução salina estéril (NaCl 0,85%) enriquecida com 0,1% de Tween 20 (PROquimios, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). A suspensão resultante foi homogeneizada por

agitação em vórtex (Quimis, Diadema, SP, Brasil) durante 15 segundos e, posteriormente, submetida à leitura espectrofotométrica a 530 nm (Coleman, Santo André, SP, Brasil) para ajuste da densidade celular, adotando-se uma faixa de transmitância entre 75% e 77%. Em seguida, a suspensão foi diluída sequencialmente em meio RPMI 1640 tamponado, com uma primeira diluição na proporção de 1:50 e uma segunda de 1:20. Esse procedimento resultou em uma concentração celular final entre  $1 \times 10^3$  e  $5 \times 10^3$  UFC/mL, correspondente ao dobro da concentração empregada nos testes antifúngicos ( $0,5 \times 10^3$  a  $2,5 \times 10^3$  UFC/mL).

#### 4.4.4 Preparo da placa de microdiluição

Os ensaios de microdiluição em caldo foram conduzidos em placas estéreis de 96 poços, organizadas em oito linhas horizontais (A a H) e doze colunas verticais (1 a 12). Cada experimento foi realizado em duplicata. Considerando-se os sete compostos tiazólicos testados e o itraconazol, foram utilizadas ao todo 16 placas, sendo duas placas destinadas a cada tiazol.

As avaliações envolveram oito concentrações distintas de cada tiazol e do itraconazol, dispostas nas linhas horizontais, testadas contra dez isolados de *Sporothrix brasiliensis*, distribuídos nas colunas 1 a 10, com cinco isolados por placa.

Inicialmente, foram dispensados 100  $\mu$ L de meio RPMI 1640 tamponado nos poços das linhas B a H e colunas 1 a 10, utilizando uma pipeta multicanal. Nos poços da linha A (colunas 1 a 10), foram adicionados 200  $\mu$ L das soluções dos tiazóis e do itraconazol, previamente diluídas em meio RPMI para concentrações de 64 mg/L e 32 mg/L, respectivamente — o dobro da concentração máxima utilizada nos testes.

As diluições seriadas (razão 1:2) foram realizadas a partir da linha A até a linha H, transferindo-se 100  $\mu$ L de uma linha para a seguinte, com descarte do excedente ao final. Na sequência, 100  $\mu$ L do inóculo padronizado foram adicionados aos poços das colunas 1 a 10. As colunas 11 e 12 foram reservadas para os controles experimentais: a coluna 11 recebeu 100  $\mu$ L de meio RPMI tamponado e 100  $\mu$ L de inóculo (controle de crescimento), enquanto a coluna 12 recebeu 200  $\mu$ L de meio RPMI apenas (controle de esterilidade).

#### 4.4.5 Associação do composto tiazólico RJ59 e Itraconazol.

Foram realizadas diluições sucessivas de itraconazol, com concentrações variando de 1 mg/L até 0,0031 mg/L. Em paralelo, o composto tiazólico RJ59 também foi diluído progressivamente, partindo de 4 mg/L até atingir 0,0625 mg/L. Após o preparo das soluções individuais, as diluições de ambos os compostos foram combinadas em uma mesma placa, de modo que cada poço continha a associação das duas substâncias em proporções correspondentes. Dessa forma, a maior concentração testada correspondia à combinação de 4 mg/L de RJ59 com 1 mg/L de itraconazol, enquanto a menor equivalia a 0,0625 mg/L de RJ59 com 0,0031 mg/L de itraconazol.

Na sequência, foram adicionados dez inóculos distintos de *Sporothrix brasiliensis*, previamente preparados a partir de cultivos em ágar BHI a 37 °C, mantidos por um período de 5 a 7 dias, para garantir a apresentação leveduriforme do fungo. As colônias foram ressuspendidas em solução salina estéril, homogeneizadas e filtradas para eliminar agregados e fragmentos maiores. A concentração final foi ajustada por espectrofotometria para aproximadamente  $1 \times 10^6$  células/mL, seguindo os mesmos parâmetros adotados na etapa anterior.

Os controles positivos (meio com inóculo, sem antifúngico) e negativo (meio com antifúngico, sem inóculo) foram inseridos nos espaços remanescentes das placas. Todos os testes foram realizados em duplicata para garantir a confiabilidade dos resultados. Por fim, as placas foram incubadas a 37 °C por um período de 72 horas, e a leitura foi feita por inspeção visual, observando-se a presença ou ausência de crescimento fúngico em comparação com o controle positivo.

O efeito da combinação será obtido através do cálculo do FICI, usando as seguintes fórmulas (Malik *et al.*, 2011):

$$FIC_{\text{Tiazol RJ59}} = \frac{\text{CIM do Tiazol RJ59 em combinação}}{\text{CIM do Tiazol RJ59}}$$

$$FIC_{\text{Itraconazol}} = \frac{\text{CIM do Itraconazol em combinação}}{\text{CIM do Itraconazol}}$$

$$\text{FIC índice (FICI)} = FIC_{\text{Tiazol RJ59}} + FIC_{\text{Itraconazol}}$$

Interpretou-se o resultado como: efeito sinérgico quando  $FICI \leq 0,5$ ; efeito aditivo ou indiferente quando  $FICI$  for  $> 0,5$  e  $< 1$ ; e efeito antagonista quando  $FICI \geq 1$ .

#### 4.4.6 Armazenamento das placas e leitura do teste

Após a preparação dos ensaios, as placas de microdiluição foram incubadas em estufa com circulação de ar forçado (ACBLABOR, Americana, SP, Brasil) a 35 °C por 72 horas, tanto para a apresentação leveduriforme quanto filamentosa dos isolados de *Sporothrix brasiliensis*. A leitura dos resultados foi realizada por inspeção visual, observando-se o fundo dos poços para determinar a concentração inibitória mínima (CIM), definida como a menor concentração do tiazol capaz de impedir visivelmente o crescimento do fungo. Essa avaliação foi feita por comparação direta com os poços de controle contendo apenas o inóculo e o meio.

Adicionalmente, para verificar o possível efeito fungicida dos compostos, foi realizado um teste complementar. De cada poço onde se observou ausência de crescimento visível (sugestivo de inibição completa), foram transferidos 100 µL para placas de Petri contendo ágar BHI. Essas placas foram então incubadas novamente a 35 °C por mais 72 horas. Ao final desse período, realizou-se nova inspeção visual para identificar qualquer sinal de crescimento fúngico, permitindo assim distinguir entre efeito fungistático e fungicida.

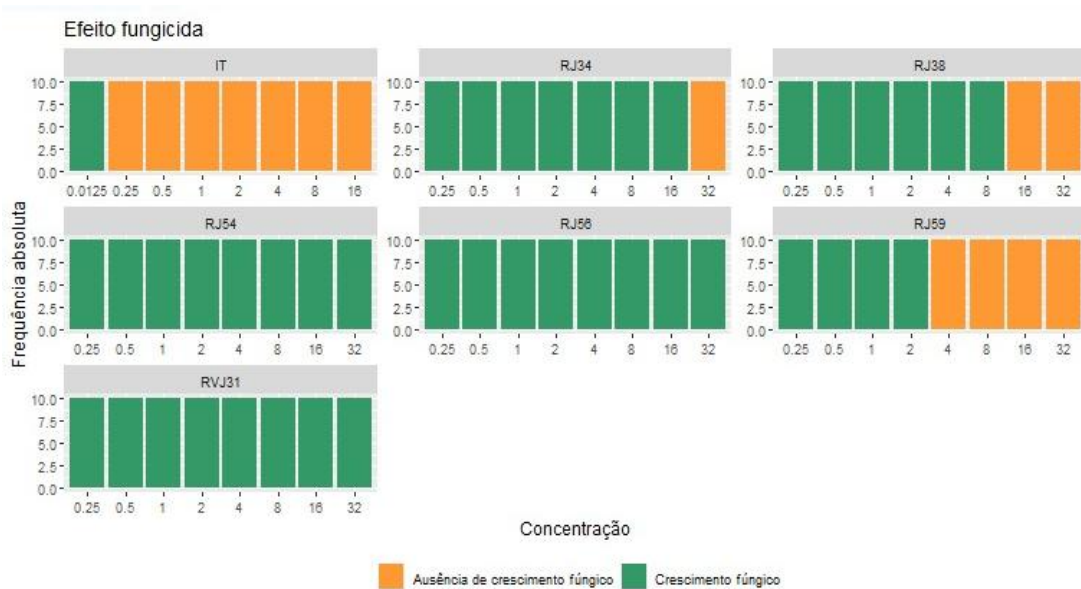
#### 4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados de concentração fungistática e fungicida mínima são dados em escala ordinal, ou seja, análises paramétricas não são recomendadas. Assim, realizou-se a análise estatística não paramétrica de Kruskal-Wallis e pós teste de Conover no software Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2015). As análises descritivas gráficas da frequência absoluta de cepas com ou sem crescimento ou com inibição do crescimento foram realizadas no software R (R Core team, 2024), utilizando o pacote estatístico Tidyverse (Wickham *et al.*, 2019).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

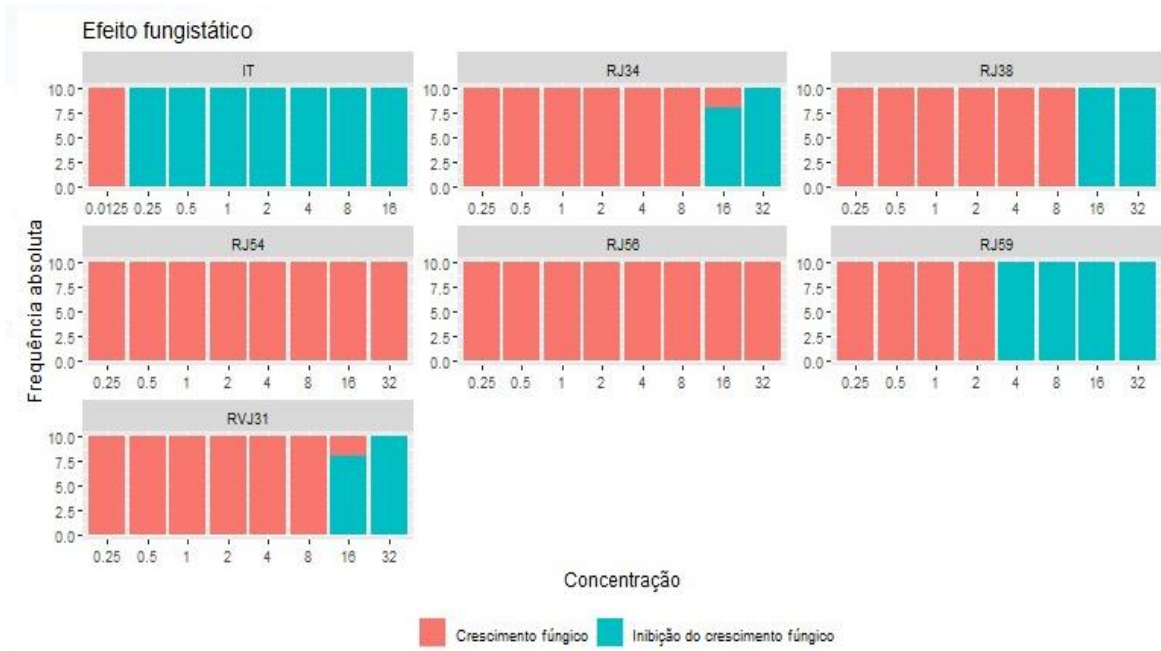
Os resultados obtidos estão representados nos gráficos de frequência absoluta referentes aos efeitos fungicidas (Figura 6) e fungistáticos observados nos testes realizados (Figura 7). Além disso, os dados estão organizados na Tabela 2, intitulada “Comparação do efeito fungistático e fungicida de diferentes tiazóis, itraconazol e da combinação itraconazol + RJ59”, permitindo uma análise comparativa entre os compostos testados. Essas representações visuais e tabulares fornecem uma visão geral do desempenho dos compostos frente ao *Sporothrix brasiliensis*, servindo como base para a discussão detalhada dos efeitos observados *in vitro*.

**Figura 6-** Gráficos de frequência absoluta do efeito fungicida dos tiazóis testados.



Fonte: Elaborado pelo autor.

**Figura 7-** Gráficos de frequência absoluta do efeito fungistático dos tiazóis testados.



Fonte: Elaborado pelo autor.

**Tabela 2** - Comparação do efeito fungistático e fungicida de diferentes Tiazóis, Itraconazol e combinação Itraconazol + RJ59.

	Antimicrobiano	Mediana da Concentração fungistática mínima (mg/L)*	Mínimo	Máximo	
Referência	Itraconazol	0,25 <sup>a</sup>	0,25	0,25	
	RJ54	>32 <sup>d</sup>	>32	>32	
	RJ56	>32 <sup>d</sup>	>32	>32	
	Tiazóis	RVJ31	16 <sup>c</sup>	16	32
		RJ34	16 <sup>c</sup>	16	32
		RJ38	16 <sup>bc</sup>	16	16
		RJ59	4 <sup>ab</sup>	4	4
Combinação	Itraconazol + RJ59	0,0625mg/L do Tiazol RJ59 + 0,031mg/L de Itraconazol <sup>a</sup>	0,0625mg/L do Tiazol RJ59 + 0,031mg/L de Itraconazol	0,0625mg/L do Tiazol RJ59 + 0,031mg/L de Itraconazol	
		Mediana da Concentração fungicida mínima (mg/L)*	Mínimo	Máximo	
Referência	Itraconazol	0,25 <sup>ab</sup>	0,25	0,25	
	RJ54	>32 <sup>d</sup>	>32	>32	
	RJ56	>32 <sup>d</sup>	>32	>32	
	Tiazóis	RVJ31	>32 <sup>d</sup>	>32	>32
		RJ34	32 <sup>cd</sup>	32	32
		RJ38	16 <sup>bc</sup>	16	16
		RJ59	4 <sup>abc</sup>	4	4
Combinação	Itraconazol + RJ59	0,0625mg/L do Tiazol RJ59 + 0,031mg/L de Itraconazol <sup>a</sup>	0,0625mg/L do Tiazol RJ59 + 0,031mg/L de Itraconazol	0,0625mg/L do Tiazol RJ59 + 0,031mg/L de Itraconazol	

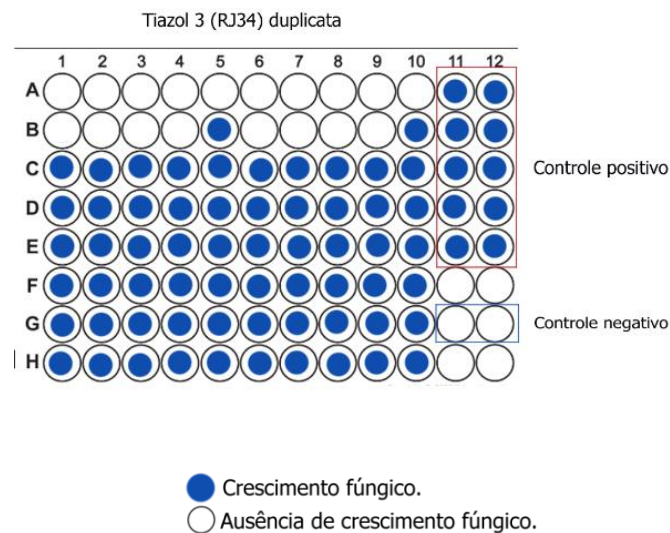
Fonte: Elaborado pelo autor.

Na presente avaliação, os compostos RJ54 e RJ56 não apresentaram efeito fungicida nem fungistático em nenhuma das concentrações testadas, indicando que, sob as condições experimentais adotadas, esses tiazóis não possuem atividade antifúngica relevante contra *Sporothrix brasiliensis*. Esses resultados sugerem que essas moléculas, em sua forma atual,

talvez não sejam candidatas promissoras para o desenvolvimento de novas terapias antifúngicas, embora ajustes estruturais possam ser considerados em investigações futuras. Essa baixa atividade foi corroborada pela análise estatística, na qual RJ54 e RJ56, que indicou um desempenho significativamente inferior em relação aos demais compostos testados tanto para o efeito fungistático quanto para o fungicida.

O composto RJ34 apresentou um perfil semelhante em relação à atividade fungistática, mas se destacou por também apresentar efeito fungicida em todas as cepas testadas, ainda que restrito à concentração de 32 mg/L (Figura 8). Estatisticamente, RJ34 mostrou uma atividade superior à de RJ54 e RJ56, porém ainda inferior a compostos como RJ38 e RJ59.

**Figura 8-** Representação gráfica do efeito fungistático do tiazol RJ34 na placa de 96 poços

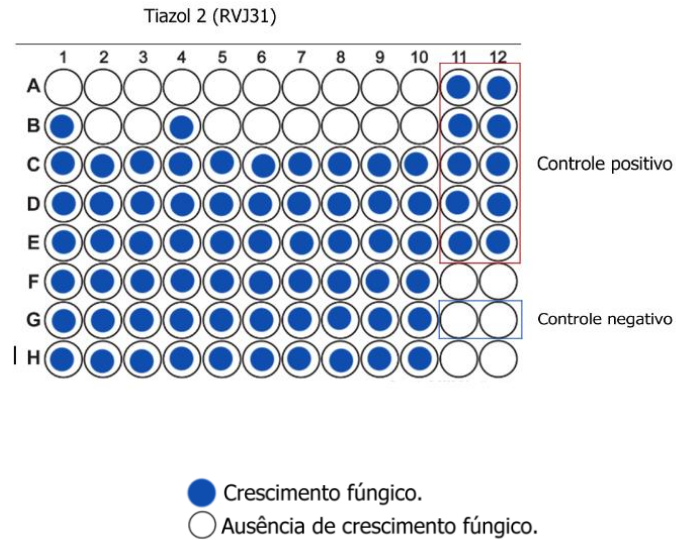


Fonte: Elaborado pelo autor.

Em contrapartida, o composto RVJ31 demonstrou efeito fungistático em todas as cepas testadas na concentração de 32 mg/L e em 80% delas na concentração de 16 mg/L, apesar de não apresentar atividade fungicida em nenhuma das faixas avaliadas (Figura 9). De acordo com a análise estatística, RVJ31 compartilhou o mesmo potencial de RJ34 no efeito fungistático, evidenciando que ambos possuem eficácia moderada e estatisticamente semelhante nesse parâmetro. Esses dados apontam que, embora necessitem de concentrações relativamente elevadas para exercer ação sobre o fungo, RVJ31 e RJ34 possuem potencial de inibição do

crescimento fúngico, o que pode ser interessante como ponto de partida para modificações químicas que aumentem sua potência.

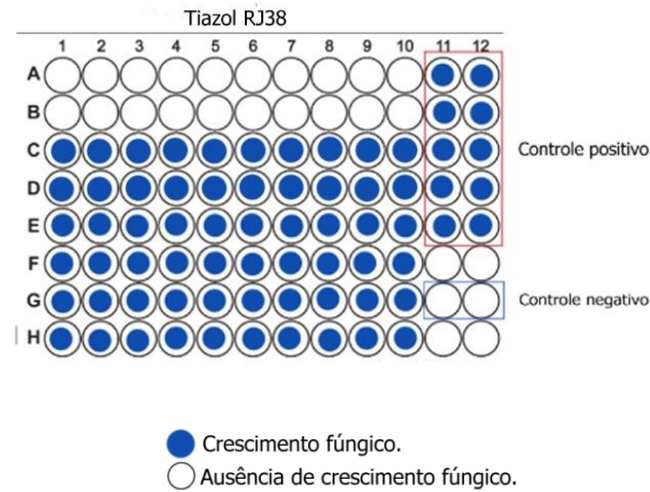
**Figura 9-** Representação gráfica do efeito fungistático do tiazol RJV31 na placa de 96 poços



Fonte: Elaborado pelo autor.

O tiazol RJ38 apresentou um desempenho superior aos compostos mencionados anteriormente, exibindo tanto atividade fungistática quanto fungicida em todas as cepas na concentração de 16 mg/L (Figura 10). Esse resultado indica uma melhora significativa no perfil de atividade, uma vez que a eficácia foi alcançada com uma dose duas vezes menor em comparação a RJ34 e RVJ31, reduzindo a quantidade de composto necessária para inibir e eliminar o patógeno. Na avaliação estatística, RJ38 foi posicionado entre os compostos com desempenho intermediário a alto, próximo ao RJ59.

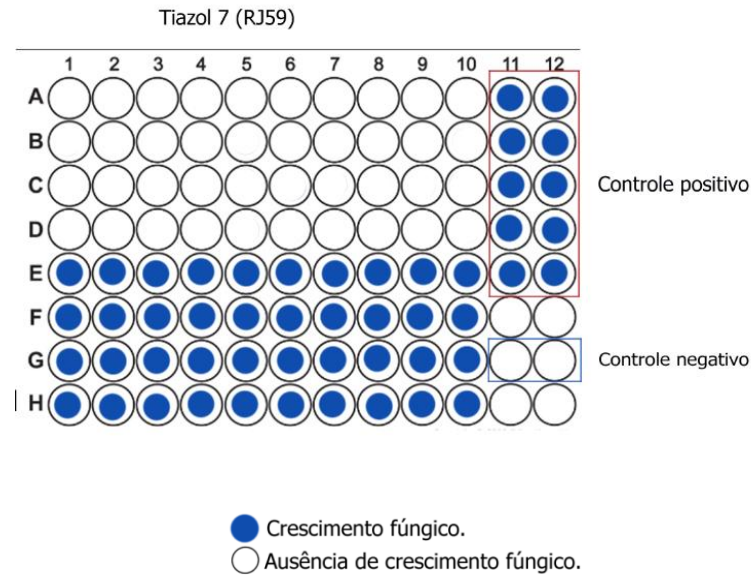
**Figura 10-** Representação gráfica do efeito fungistático do tiazol RJ38 na placa de 96 poços



Fonte: Elaborado pelo autor.

Entre todos os compostos testados, o RJ59 foi o que apresentou a melhor performance, alcançando tanto a inibição quanto a erradicação do crescimento fúngico em todas as cepas na concentração de 4 mg/L (Figura 11). A análise estatística evidenciou sua superioridade em relação à maioria dos tiazóis testados. A capacidade de exercer ação fungicida e fungistática em uma concentração consideravelmente menor indica que o RJ59 possui um potencial particularmente promissor como candidato a futuras terapias antifúngicas.

**Figura 11-** Representação do efeito fungistático do tiazol RJ59 na placa de 96 poços



Fonte: Elaborado pelo autor.

O itraconazol, utilizado como comparativo nesta análise, apresentou atividade fungistática e fungicida em todas as cepas testadas já na concentração de 0,25 mg/L. Estatisticamente, o itraconazol demonstrou ser significativamente mais eficaz que todos os compostos tiazólicos isolados. Considerando que este fármaco é amplamente empregado no tratamento da esporotricose felina e humana, sua elevada eficácia reafirma seu papel como agente de referência no manejo dessas infecções. No entanto, embora o itraconazol tenha se mostrado mais potente em relação aos tiazóis avaliados, os resultados obtidos com o novo composto RJ59 são expressivos e merecem destaque.

Este ponto se torna ainda mais relevante diante do aumento do número de casos clínicos envolvendo cepas de *Sporothrix brasiliensis* resistentes ao itraconazol, fenômeno que compromete a eficácia dos tratamentos convencionais. Além disso, é importante ressaltar que o itraconazol atua inibindo a síntese do ergosterol por meio da inibição da enzima lanosterol 14 $\alpha$ -desmetilase, enquanto os tiazóis estudados apresentam estruturas químicas distintas e, possivelmente, mecanismos de ação também diferenciados, como alteração da integridade da membrana, geração de estresse oxidativo ou bloqueio da síntese da parede celular (Sá *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2024). Essa diferença mecanística é de grande relevância no contexto clínico, uma vez que compostos que atuam em alvos celulares diferentes podem contornar os

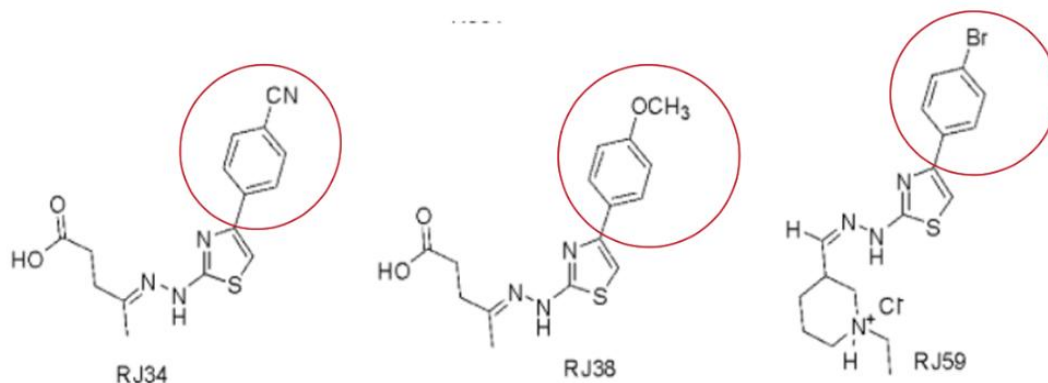
mecanismos de resistência estabelecidos para fármacos tradicionais, oferecendo novas alternativas terapêuticas em infecções refratárias.

Assim, a exploração de moléculas com novos modos de ação é fundamental não apenas para ampliar o arsenal terapêutico disponível, mas também para mitigar a pressão seletiva que favorece o surgimento de patógenos resistentes.

Diante desses achados, é imprescindível a continuidade dos estudos envolvendo esses tiazóis. Primeiramente, recomenda-se a realização de testes utilizando cepas de *S. brasiliensis* previamente caracterizadas como resistentes ao itraconazol, a fim de verificar se os compostos mantêm eficácia nesse cenário. Paralelamente, é essencial avaliar a citotoxicidade dessas moléculas em células de mamíferos, de modo a garantir que a atividade antifúngica observada não esteja associada a efeitos tóxicos relevantes para o hospedeiro. Além disso, estudos de farmacocinética e farmacodinâmica se tornam indispensáveis, abrangendo a investigação da biodisponibilidade, meia-vida, metabolismo e excreção dos compostos em modelos animais. Esses dados são fundamentais para compreender o comportamento das moléculas no organismo e para o planejamento racional de futuros ensaios clínicos. A conjugação de testes *in vitro* e *in vivo* permitirá, assim, uma avaliação mais robusta do potencial dos tiazóis como candidatos à inovação terapêutica no combate à esporotricose.

Ao analisar a estrutura dos compostos que apresentaram efeito fungicida (RJ34, RJ38 e RJ59), observa-se uma característica comum: todos possuem um anel benzênico ligado a um átomo ou grupo funcional específico, como destacado na “Figura 12”. No caso do RJ34, o anel está ligado a um grupo ciano ( $-CN$ ); no RJ38, a ligação ocorre com um grupo metoxi ( $-OCH_3$ ); e no RJ59, com um átomo de bromo ( $-Br$ ). A presença desse padrão estrutural entre os compostos ativos sugere que a associação de um anel aromático a grupos específicos pode estar relacionada à atividade antifúngica observada.

**Figura 12-** Representações gráficas moleculares dos tiazóis RJ34, RJ38 e RJ59 com seus pontos de similaridades em destaque.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Esse achado é relevante, pois abre perspectivas para a investigação de novos tiazóis com modificações estruturais semelhantes, buscando otimizar ainda mais o perfil de atividade antifúngica. A partir dessas informações, estudos futuros podem explorar sistematicamente diferentes substituintes no anel benzênico, visando identificar padrões que potencializem a eficácia e a seletividade dos compostos contra cepas de interesse clínico.

Nesse sentido, é relevante destacar estudos previamente publicados que corroboram e expandem essas observações. O estudo de Sá *et al.* (2017), desenvolvido na UFMG, avaliou compostos tiazólicos com atividade antifúngica contra o complexo *Cryptococcus neoformans*–*C. gattii*. Os autores identificaram quatro compostos com valores de MIC entre 0,25 e 2 µg/mL, com destaque para a atuação sobre o sistema antioxidante dos fungos. Foi demonstrado que esses tiazóis aumentam a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), comprometendo a sobrevivência celular. Além disso, apresentaram baixa toxicidade em células de mamíferos, o que indica potencial terapêutico.

No presente trabalho, os compostos tiazólicos foram avaliados frente a cepas de *Sporothrix brasiliensis* e também apresentaram atividade antifúngica relevante, com inibição significativa do crescimento fúngico em concentrações micromolares. Embora o mecanismo de ação não tenha sido investigado, os resultados observados estão de acordo com o que vem sendo descrito na literatura, sugerindo que essa classe química pode ter amplo espectro de ação contra fungos patogênicos. A aplicação dos tiazóis no contexto da esporotricose felina contribui para ampliar o conhecimento sobre seu uso além do complexo *Cryptococcus*.

Outros estudos recentes também trazem contribuições importantes. A tese de Leocádio (2023) investigou 30 derivados tiazólicos frente a cepas de *C. neoformans* e *C. gattii*, obtendo MICs entre 0,5 e 4 µg/mL. Os compostos RJ37 e RVJ42 foram os mais ativos e apresentaram efeito fungicida, além de reduzirem a produção de ergosterol e melanina. Foram realizados ensaios com estressores celulares, modelos de viabilidade e avaliação da toxicidade, além de testes in vivo. Os compostos reduziram a carga fúngica em pulmão e cérebro e aumentaram a sobrevivência de camundongos infectados.

Em continuidade, Leocádio *et al.* (2025) aprofundaram essas análises, especialmente no que diz respeito aos mecanismos de ação. Foram utilizados mutantes de *Cryptococcus* com deleções em genes reguladores, o que ajudou a identificar vias relacionadas à resistência aos compostos. Também foram feitos testes de combinação com antifúngicos convencionais, que indicaram que os tiazóis atuam por vias distintas. A interferência em processos como a integridade de membrana, estresse oxidativo e metabolismo de ergosterol foi reforçada.

Apesar dos avanços nos estudos com *Cryptococcus*, ainda são poucos os trabalhos que investigam o uso de tiazóis frente a espécies do gênero *Sporothrix*. Essa limitação dificulta comparações diretas com os resultados obtidos aqui. No entanto, reforça a importância de novas pesquisas voltadas a esse agente, que permanece relevante do ponto de vista clínico e veterinário.

Com relação à combinação do tiazol RJ59 e do itraconazol, pode ser observado que houve efeito fungicida e fungistático na menor concentração testada: 0,0625 mg/L do tiazol RJ59 + 0,031 mg/L de itraconazol. Dessa forma, foi verificado um efeito sinérgico entre as substâncias, evidenciado pelo valor de FICI = 0,1396, o qual é inferior a 0,5, confirmando uma interação sinérgica significativa.

$$FIC_{\text{Tiazol RJ59}} = \frac{\text{CIM do Tiazol RJ59 em combinação}}{\text{CIM do Tiazol RJ59}} = \frac{0,0625}{4} = 0,015625$$

$$FIC_{\text{Itraconazol}} = \frac{\text{CIM do Itraconazol em combinação}}{\text{CIM do Itraconazol}} = \frac{0,031}{0,25} = 0,124$$

$$FIC \text{ índice (FICI)} = FIC_{\text{Tiazol RJ59}} + FIC_{\text{Itraconazol}} = 0,015625 + 0,124 = \boxed{0,139625}$$

Vale destacar que, estatisticamente, essa combinação apresentou desempenho semelhante ao itraconazol isolado, entretanto, a obtenção de efeito fungistático e fungicida com

dosagens menores é de grande importância no desenvolvimento de novos antifúngicos por diversas razões, como reduzir o risco de efeitos colaterais ao hospedeiro, aumentando a segurança na utilização do fármaco.

Outro aspecto relevante é o impacto econômico, uma vez que compostos eficazes em baixas concentrações podem resultar em custos de produção e formulação mais baixos, o que torna o tratamento mais acessível. No contexto da esporotricose, que vem se tornando uma micose de grande impacto em saúde pública devido à emergência de cepas resistentes, o desenvolvimento de compostos ativos em baixas concentrações, representa uma estratégia fundamental não apenas para o tratamento efetivo, mas também para a contenção da evolução da resistência antifúngica no ambiente clínico e veterinário.

Apesar dos resultados promissores obtidos neste estudo, alguns pontos ainda demandam investigação para que se avance na validação pré-clínica dos compostos avaliados. Testes futuros com cepas de *Sporothrix brasiliensis* previamente caracterizadas como resistentes ao itraconazol são fundamentais para verificar a eficácia dos tiazóis em cenários de resistência antifúngica, cada vez mais frequentes na prática clínica. Também é necessário assegurar que a atividade antifúngica observada *in vitro* não esteja associada a efeitos tóxicos relevantes para o hospedeiro, o que requer estudos de citotoxicidade mais abrangentes e testes em modelos animais. Além disso, a caracterização farmacocinética dos compostos, incluindo aspectos como biodisponibilidade, meia-vida, metabolismo e excreção, constitui uma etapa essencial para o desenvolvimento racional de novas terapias. Por fim, a elucidação dos mecanismos de ação envolvidos poderá contribuir para um uso mais seguro e eficaz dessas substâncias, além de abrir possibilidades para combinações terapêuticas com antifúngicos já existentes.

## 6 CONCLUSÕES

- Os tiazóis RVJ31 e RJ34 nas concentrações de 16-32 mg/L mostraram efeitos fungistáticos em isolados de *Sporothrix brasiliensis* em sua apresentação leveduriforme.
- O tiazol RJ38 nas concentrações de 16-32 mg/L mostrou efeitos fungicidas e fungistáticos em isolados de *Sporothrix brasiliensis* em sua apresentação leveduriforme.
- O tiazol RJ59 nas concentrações de 4-32 mg/L mostrou efeitos fungicidas e fungistáticos em isolados de *Sporothrix brasiliensis* em sua apresentação leveduriforme, sendo estatisticamente semelhante ao itraconazol.
- Foi verificado um efeito sinérgico entre o itraconazol e o tiazol RJ59, sendo que a combinação entre os dois foi capaz de diminuir a concentração necessária para os efeitos fungistático e fungicida.

Os resultados obtidos neste estudo indicam que os compostos tiazólicos avaliados apresentam potencial antifúngico relevante frente a *Sporothrix brasiliensis*. Considerando o desempenho observado, esses dados servem como base para o avanço em etapas posteriores do processo de pesquisa e desenvolvimento de novos antifúngicos. Embora ainda haja pontos a serem explorados, os achados aqui apresentados contribuem para ampliar o conhecimento sobre essa classe de compostos e sugerem que sua aplicação terapêutica possa ser viável, especialmente diante da necessidade de novas alternativas no enfrentamento da esporotricose. A continuidade dos estudos poderá consolidar essas substâncias como candidatas úteis no contexto clínico, veterinário e de saúde pública.

## REFERÊNCIAS

AAGHAZ, S. *et al.* Thiazole-containing compounds as potential antimicrobial agents: Recent advances in drug design and discovery. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 247, p. 115026, 2023

ALSPAUGH, J. A. New Spins on Old Drugs: Enhancing Activity of Antifungals. **Cell Chemical Biology**, v. 27, n. 3, p. 255–256, 2020.

ALTHAGAFI, Ismail I. *et al.* New Series of Thiazole Derivatives: Synthesis, Structural Elucidation, Antimicrobial Activity, Molecular Modeling and MOE Docking. **Molecules**, v. 24, n. 9, p. 1741, 2019. DOI: 10.3390/molecules24091741

ARENAS, R.; SANCHEZ-CARDENAS, C. D.; RAMIREZ-HOBAK, L.; RUIZ ARRIAGA, L. F.; VEGA MEMIJE, M. E. Sporotrichosis: from KOH to molecular biology. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 2, p. 1-10, 2018.

ARRILLAGA-MONCRIEFF, I.; CAPILLA, J.; MAYAYO, E.; MARIMON, R.; MARINE, M.; GENÉ, J.; CANO, J.; GUARRO, J. Different virulence levels of the species of *Sporothrix* in a murine model. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, n. 7, p. 651–655, 2009.

BARROS, M. B. L.; SCHUBACH, A. O.; DO VALLE, A. C. F.; GALHARDO, M. C. G.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.; SCHUBACH, T. M. P.; REIS, R. S.; WANKE, B.; MARZOCHI, K. B. F.; CONCEIÇÃO, M. J. Cat-transmitted sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil: Description of a series of cases. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 4, p. 529-535, 2004.

BENVEGNÚ, Ana Maria *et al.* Disseminated cutaneous sporotrichosis in patient with alcoholism. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 6, p. 871–873, nov./dez. 2017. DOI: 10.1590/0037-8682-0281-2017.

BRILHANTE, R. S. N.; RODRIGUES, A. M.; SIDRIM, J. J.; ROCHA, M. F.; PEREIRA, S. A.; GREMIAO, I. D. F.; SCHUBACH, T. M. P.; DE CAMARGO, Z. P. *In vitro* susceptibility of antifungal drugs against *Sporothrix brasiliensis* recovered from cats with sporotrichosis in Brazil. **Medical Mycology**. v. 54, n. 3, p.275–279, 2016.

BRUM, P. T. *et al.* Aspectos clínicos e epidemiológicos da paracoccidiodomicose. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 33, n. 5, p. 535-542, 2007.

CHAVES, A. R.; DE CAMPOS, M. P.; BARROS, M. B. L.; DO CARMO, C. N.; GREMIÃO, I. D. F.; PEREIRA, S. A.; SCHUBACH, T. M. P. Treatment Abandonment in Feline Sporotrichosis – Study of 147 Cases. **Zoonoses and Public Health**. v. 60, n. 2, p. 149-153, 2012.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi, approved standard, M38-A2, 2nd ed. Wayne, PA: **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 2008a.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts, approved standard, M27-A3, 3rd ed. Wayne, PA: **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 2008b.

CÓRDOBA, S.; ISLA, G.; SZUSZ, W.; VIVOT, W.; HEVIA, A.; DAVEL, G.; CANTEROS, C. E. Molecular identification and susceptibility profile of *Sporothrix schenckii* sensu lato isolated in Argentina. **Mycoses**, v. 61, n. 7, p. 441–448, 2018.

DABUS, R. *et al.* Paracoccidiodomicose: revisão de aspectos clínicos, diagnósticos e terapêuticos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 3, p. 297-310, 2008.

DE SOUZA, L. L.; NASCENTE, P. S.; NOBRE, M. O.; MEINERZ, A. R. M.; MEIRELES, M. C. A. Isolation of *Sporothrix schenckii* from the nails of healthy cats. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 1, p. 372-374, 2006.

EICHER, Theophil; HAUPTMANN, Siegfried; SPEICHER, Andreas. *The Chemistry of Heterocycles: Structures, Reactions, Synthesis and Applications*. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, 2003.

FALCÃO, E. M. M. *et al.* Zoonotic sporotrichosis with greater severity in Rio de Janeiro, Brazil: 118 hospitalizations and 11 deaths in the last 2 decades in a reference institution. **Medical Mycology**, 2019.

FERNANDES, G. F.; DOS SANTOS, P. O.; RODRIGUES, A. M.; SASAKI, A. A.; BURGER, E.; DE CAMARGO, Z. P. Characterization of virulence profile, protein secretion and immunogenicity of different *Sporothrix schenckii sensu stricto* isolates compared with *S. globosa* and *S. brasiliensis* species. **Virulence**, v. 4, n. 3, p. 241–249, 2013.

FREITAS, D. F. *et al.* Zoonotic sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: a protracted epidemic yet to be curbed. **Clinical Infectious Diseases**, v. 50, n. 3, p. 453, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1086/649891>.

GINTJEE, T. J.; DONNELLEY, M. A.; THOMPSON, G. R. Aspiring Antifungals: Review of Current Antifungal Pipeline Developments. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 28, p. 1-14, 2020.

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, n. 1, p. 15–21, 2014.

GREMIÃO, I. D. F.; PEREIRA, S. A.; RODRIGUES, A. M.; FIGUEIREDO, F. B.; NASCIMENTO-JÚNIOR, A.; SANTOS, I. B.; SCHUBACH, T. M. P. Tratamento cirúrgico associado à terapia antifúngica convencional na esporotricose felina. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, n. 2, p. 221-223, 2006.

GREMIÃO, I. D. F.; SCHUBACH, T. M. P.; PEREIRA, S. A.; RODRIGUES, A. M.; CHAVES, A. R.; BARROS, M. B. L. Intralesional amphotericin B in a cat with refractory localised sporotrichosis. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 11, n. 8, p. 720-723, 2009.

GREMIÃO, I. D. F.; SCHUBACH, T. M. P.; PEREIRA, S. A.; RODRIGUES, A. M.; HONSE, C. O.; BARROS, M. B. L. Treatment of refractory feline sporotrichosis with a combination of intralesional amphotericin B and oral itraconazole. **Australian Veterinary Journal**, v. 89, n. 9, p. 346-351, 2011.

GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M.; MONZÓN, A.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L.; CUENCA-ESTRELLA, M. Antifungal susceptibility profile *in vitro* of *Sporothrix schenckii* in two growth phases and by two methods: microdilution and E-test. **Mycoses**, v. 53, n. 3, p. 227–231, 2010.

ISHIDA, K.; DE CASTRO, R. A.; BORBA DOS SANTOS, L. P.; QUINTELLA, L. P.; LOPES-BEZERRA, L. M.; ROZENTAL, S. Amphotericin B, alone or followed by itraconazole therapy, is effective in the control of experimental disseminated sporotrichosis by *Sporothrix brasiliensis*. **Medical Mycology**, v. 53, n. 1, p. 34–41, 2015.

SANTANA, T. I. *et al.* Synthesis, anticancer activity and mechanism of action of new thiazole derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 144, p. 874–886, 2018. DOI: 10.1016/j.ejmech.2017.12.040

KOHLER, L. M.; MONTEIRO, P. C.; HAHN, R. C.; HAMDAN, J. S. *In vitro* susceptibilities of isolates of *Sporothrix schenckii* to itraconazole and terbinafine. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 9, p. 4319-4320, 2004.

KOHLER, L. M.; SOARES, B. M.; SANTOS, D. A.; BARROS, M. E. S.; HAMDAN, J. S. *In vitro* susceptibility of isolates of *Sporothrix schenckii* to amphotericin

B, itraconazole, and terbinafine: comparison of yeast and mycelial forms. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 9, p. 843-847, 2006.

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

LEOCÁDIO, Victor Augusto Teixeira. *Avaliação da atividade e mecanismo de ação antifúngico de derivados tiazólicos sobre Cryptococcus spp.* 2023. 129 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Microbiologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2023.

LEOCÁDIO, Victor Augusto Teixeira *et al.* Thiazole derivatives as promising candidates for cryptococcosis therapy: broad antifungal activity, low toxicity and synergism with amphotericin B. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. l.], v. 69, n. 2, p. e01423-24, 2025. DOI: 10.1128/aac.01423-24.

LINO, Cleudiomar Inácio *et al.* Synthesis, molecular modeling studies and evaluation of antifungal activity of a novel series of thiazole derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 151, p. 248–260, 2018. DOI: 10.1016/j.ejmech.2018.03.083

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 of Feline Medicine and Surgery**, v. 15, n. 7, p. 619–623, 2013.

MACDONALD, E.; EWERT, A.; REITMEYER, J. C. Reappearance of *Sporothrix schenckii* lesions after administration of Solu-MedrolR to infected cats. **Medical Mycology**, v. 18, n. 4, p. 295–300, 1980.

MARIMON, R.; CANO, J.; GENE, 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, n. 10, p. 3198-3206, 2007a.

MARIMON, R.; GENE, J.; CANO, J.; TRILLES, L.; DOS SANTOS LAZERA, M.; GUARRO, J. Molecular Phylogeny of *Sporothrix schenckii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 9, p. 3251-3256, 2006.

MARIMON, R.; SERENA, C.; GENE, J.; CANO, J.; GUARRO, J. *In vitro* Antifungal Susceptibilities of Five Species of *Sporothrix*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 2, p. 732–734, 2007b.

MIRANDA, L. H. M.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.; QUINTELLA, L. P.; KURAIEM, B. P.; PEREIRA, S. A.; SCHUBACH, T. M. P. Feline sporotrichosis: Histopathological profile of cutaneous lesions and their correlation with clinical presentation. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 36, n. 4, p. 425–432, 2013.

NAKASU, C. C. T. *et al.* Feline sporotrichosis: Associations between clinical-epidemiological profiles and phenotypic-genotypic characteristics of the etiological agents in the Rio de Janeiro epizootic area. **Medical Mycology**, v. 58, n. 2, p. 261-267, 2020.

NOBRE, M. O.; CASTRO, A. P.; CAETANO, D.; SOUZA, L. L.; MEIRELES, M. C. A.; FERREIRO L. Recurrence of sporotrichosis in cats with zoonotic involvement. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 18, n. 1, p. 137-140, 2001.

NOBRE, M. O.; NASCENTE, P. S.; MEIRELES, M. C.; FERREIRO, L. Antifungal drugs for small and large animals. **Ciência Rural**, v. 32, n. 1, p. 175-184, 2002.

NUSBAUM, B. P.; GULBAS, N.; HORWITZ, S. N. Sporotrichosis acquired from a cat. **Journal of American Academy of Dermatology**, v. 8, n. 3; p. 386-391, 1983.

ODDS, F. C.; BROWN, A. J. P.; GOW, N. A. R. Antifungal agents: mechanisms of action. **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 6, p. 272-279, 2003.

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 the *S. schenckii* Complex Identified in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 8, p. 3047–3049, 2011.

OLIVEIRA, M. M. E.; SANTOS, C.; SAMPAIO, P.; ROMEO, O.; ALMEIDA-PAES, R.; PAIS, C.; LIMA, N.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M. Development and optimization of a new MALDI-TOF protocol for identification of the *Sporothrix* species complex. **Research in Microbiology**, v. 166, n. 2, p. 102–110, 2015.

PEREIRA, S. A.; GREMIÃO, I. D. F.; KITADA, A. A. B.; BOECHAT, J. S.; VIANA, P. G.; SHUBACH, T. M. P. The epidemiological scenario of feline sporotrichosis in Rio de Janeiro, State of Rio de Janeiro, Brazil. **Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropica**, v. 47, n. 3, p. 392-393, 2014.

PEREIRA, S. A.; MENEZES, R. C.; GREMIÃO, I. D. F.; SILVA, J. N. O.; HONSE, C.; FIGUEIREDO, F. B.; SILVA, D. T.; KITADA, A. A. B.; REIS, E. G.; SCHUBACH, T. M. P. Sensitivity of cytopathological examination in the diagnosis of feline sporotrichosis. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 13, n. 4, p. 220–223, 2011.

PEREIRA, S. A.; PASSOS, S. R. L.; SILVA, J. N.; GREMIÃO, I. D. F.; FIGUEIREDO, F. B.; TEIXEIRA, J. L.; MONTEIRO, P. C. F.; SCHUBACH, T. M. P. Response to azolic antifungal agents for treating feline sporotrichosis. **Veterinary Record**, v. 166, n. 10, p. 290-294, 2010.

PEREIRA, S. A.; SCHUBACH, T. M.; GREMIÃO, I. D.; SILVA, D. T.; FIGUEIREDO, F. B.; ASSIS, N. V.; PASSOS, S. R. L. Aspectos terapêuticos da esporotricose felina. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 37, n. 4, p. 331-341, 2009.

RODRIGUES, A. M. *Anfotericina B subcutânea associada ao itraconazol no tratamento da esporotricose em gatos domésticos*. 2009. 55 f. Dissertação (Mestrado em pesquisa clínica em doenças infecciosas) -Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2009.

RODRIGUES, A. M.; CRUZ CHOAPPA, R.; FERNANDES, G. F.; DE HOOG, G. S.; DE CAMARGO, Z. P. *Sporothrix chilensis* sp. nov. (Ascomycota: Ophiostomatales), a soil-borne agent of human sporotrichosis with mild-pathogenic potential to mammals. **Fungal Biology**, v. 120, n. 2, p. 246–264, 2016.

RODRIGUES, A. M.; DE MELO TEIXEIRA, M.; DE HOOG, G. S.; SCHUBACH, T. M.; PEREIRA, S. A.; FERNANDES, G. F.; BEZERRA, L. M. L.; FELIPE, M. S.; DE CAMARGO, Z. P. Phylogenetic analysis reveals a high prevalence of *Sporothrix brasiliensis* in feline sporotrichosis outbreaks. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 6, p. 1-14, 2013.

RODRIGUES, A. M., DE HOOG, G. S.; DE CAMARGO, Z. P. Emergence of pathogenicity in the *Sporothrix schenckii* complex. **Medical Mycology**, v. 51, n. 4, p. 405–412, 2013.

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

RODRIGUES, A. M; DE HOOG, G. S.; DE CAMARGO, Z. P. Molecular Diagnosis of Pathogenic *Sporothrix* Species. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n.12, p. 1-22, 2015.

RODRIGUES, A. M.; DE HOOG, G. S.; DE CÁSSIA PIRES, D.; BRIHANTE, R. S. N.; DA COSTA SIDRIM, J. J; GADELHA, M. F.; COLOMBO, A. L. DE CAMARGO, Z. P. Genetic diversity and antifungal susceptibility profiles in causative agents of sporotrichosis. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, n. 1, p. 1-9, 2014a.

RODRIGUES, A. M.; DE HOOG, G. S.; ZHANG, Y.; DE CAMARGO, Z. P. Emerging sporotrichosis is driven by clonal and recombinant *Sporothrix* species. **Emerging Microbes & Infections**, v. 3, n. 5, p. 1-10, 2014b.

RODRIGUES, A. M. *Emerging pathogens in the genus Sporothrix and the global evolution of pathogenicity*. São Paulo: Federal University of São Paulo, 2015

RODRIGUES, A. M.; DELLA TERRA, P. P.; GREMIÃO, I. D.; PEREIRA, S. A.; OROFINO-COSTA, R.; DE CAMARGO, Z. P. The threat of emerging and re-emerging pathogenic *Sporothrix* species. **Mycopathologia.**, v. 1, n. 1, p. 1-30, 2020.

ROSSI, C. N.; ODAGUIRI, J.; LARSSON, C. E. Retrospective Assessment of the Treatment of Sporotrichosis in Cats and Dogs Using Itraconazole. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 41, n. 1, p. 1-5, 2013.

SÁ, Nívea Pereira de *et al.* Heterocycle thiazole compounds exhibit antifungal activity through increase in the production of reactive oxygen species in the *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* species complex. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 61, n. 8, p. 10.1128/aac.02700-16, 2017.

SANTANA, T. I. *et al.* Synthesis, anticancer activity and mechanism of action of new thiazole derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 144, p. 874–886, 2018. DOI: 10.1016/j.ejmech.2017.12.040

SANTOS, A. F.; ROCHA, B. D.; BASTOS, C. V.; OLIVEIRA, C. S. F.; SOARES D. F. M.; PAIS, G. C. T.; XAULIM, G. M. D.; KELLER, K. M.; SALVATO, L. A.; LECCA, L. O.; FERREIRA, L.; SARAIVA, L. H. G.; ANDRADE M. B.; PAIVA M. T.; ALVES, M. R. S.; MORAIS, M. H. S.; AZEVEDO, M. I.; TEIXEIRA, M. K. I.; ECCO, R.; BRANDÃO S. T. Guia Prático para enfrentamento da Esporotricose Felina em Minas Gerais. **Revista V&Z Em Minas**, v. 1, n.137, p. 16-27, 2018.

SCHUBACH, T. M. P.; VALLE, A. C. F.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; MONTEIRO, P. C. F.; REIS, R. S.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M.; MARZOCHI, K. B. F.; SCHUBACH, A. Isolation of *Sporothrix schenckii* from the nails of domestic cats (*Felis catus*). **Medical Mycology**, v. 39, n.1, p. 147-149, 2001.

SCHUBACH, T. M. P.; SCHUBACH, A.; OKAMOTO, T.; BARROS, M. B. L.; FIGUEIREDO, F. B.; CUZZI, T.; FIALHO-MONTEIRO, P. C.; REIS, R. S.; PEREZ, M. A.; WANKE, B. T. Evaluation of an epidemic of sporotrichosis in cats: 347 cases (1998–2001). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 224, n. 10, p. 1623–1629, 2004.

SCHUBACH, T. M. *et al.* Isolation of *Sporothrix schenckii* from the nails of domestic cats (*Felis catus*). **Medical Mycology**, v. 39, n. 1, p. 147–149, 2001

SINHA, S.K. *et al.* Estudo sobre propriedades anti-inflamatórias de derivados tiazólicos]. **Journal of Biomolecular Structure & Dynamics**, v. 39, n. 4686–XXXX, 2018. DOI: 10.1080/07391102.2020.1779132

SILVA, J. N.; MIRANDA, L. H. M.; MENEZES, R. C.; GREMIÃO, I. D. F.; OLIVEIRA, R. V. C.; VIEIRA, S. M. M.; CONCEIÇÃO, S.; FERREIRO, L.; PEREIRA, S. A. Comparison of the Sensitivity of Three Methods for the Early Diagnosis of Sporotrichosis in Cats. **Journal of Comparative Pathology**, v. 160, n. 1, p. 72–78, 2018.

SILVEIRA, C. P.; TORRES-RODRIGUEZ, J. M.; ALVARADO-RAMIREZ, E.; MURCIANO-GONZALO, F.; DOLANDE, M.; PANIZO, M.; REVIKINA, V. MICs and minimum fungicidal concentrations of amphotericin B, itraconazole, posaconazole and terbinafine in *Sporothrix schenckii*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, n.12, p.1607–1610, 2009.

SUNDRIYAL S.; SHARMA R.K.; JAIN R. Current advances in antifungal targets and drug development. **Current Medicinal Chemistry**, v.13, n. 11, p.1321-1335, 2006.

THOMSON, J.; TROTT, D. J.; MALIK, R.; GALGUT, B.; ALLISTER, M. M.; NIMMO, J.; RENTON, D.; KIDD, Sa. E. An atypical cause of sporotrichosis in a cat. **Medical Mycology Case Reports**, v. 23, p. 72–76, 2019.

WEESE, J. S.; FULFORD, M. E. *Feline sporotrichosis: epidemiological and clinical aspects*. **Medical Mycology**, v. 53, n. 1, p. 15–21, 2015. DOI: 10.1093/mmy/myu061

WELSH, R. D. Sporotrichosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 223, n. 8, p. 1123-1126, 2003.

XAVIER, M. O. *et al. Sporothrix brasiliensis: Epidemiology, therapy, and recent developments*. **Journal of Fungi**, v. 9, n. 9, p. 921, 2023. DOI: 10.3390/jof9090921.

ZHOU, X.; RODRIGUES, A. M.; FENG, P.; HOOG, G. S. Global ITS diversity in the *Sporothrix schenckii* complex. **Fungal Diversity**, v. 1, n. 1, p. 1–13, 2013.