

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**SUSCEPTIBILIDADE DE ISOLADOS DE
Malassezia pachydermatis SENSÍVEIS E RESISTENTES
AO FLUCONAZOL FRENTE A ANTIFÚNGICOS E
ÓLEOS ESSENCIAIS.**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Francielli Pantella Kunz de Jesus

Santa Maria, RS, Brasil

2011

**SUSCEPTIBILIDADE DE ISOLADOS DE *Malassezia*
pachydermatis SENSÍVEIS E RESISTENTES AO FLUCONAZOL
FRENTE A ANTIFÚNGICOS E ÓLEOS ESSENCIAIS.**

por

Francielli Pantella Kunz de Jesus

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Área de Concentração em Farmacologia Aplicada à Produção Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Farmacologia.**

Orientador: Prof. Dr. Janio Morais Santurio

Santa Maria, RS, Brasil

2011

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**SUSCEPTIBILIDADE DE ISOLADOS DE *Malassezia*
pachydermatis SENSÍVEIS E RESISTENTES AO FLUCONAZOL
FRENTE A ANTIFÚNGICOS E ÓLEOS ESSENCIAIS.**

elaborada por
Francielli Pantella Kunz de Jesus

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Farmacologia

COMISSÃO EXAMINADORA:

Janio Morais Santurio, Dr.
(Presidente/Orientador)

Daniela Isabel Brayer Pereira, Dra.
(UFPel)

Sônia de Avila Botton, Dra
(UFSM-RS)

Santa Maria, 01 fevereiro de 2011.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais,

**Nelson Silva de Jesus e
Mariza Angélica Kunz de Jesus**

Que com todo o amor e carinho me ensinaram a cultivar valores importantes como os da dignidade, respeito, honestidade, caráter e amor. Princípios que dinheiro nenhum no mundo compra.

Ao meu esposo,

Adonir Lorensi

Por compreender a minha ausência, por ser um companheiro amável e acima de tudo amigo.

Amo vocês!

“Se um dia você tiver que escolher entre o mundo e o amor, lembre-se: se escolher o mundo ficará sem o amor, mas se você escolher o amor, com ele conquistará o mundo”

Albert Eistein

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a esta força superior chamada “Deus”, que ilumina meus passos, abrindo caminhos e fazendo com que tudo sempre dê certo em minha vida. A Nossa Senhora Medianeira de todas as graças, por permitir que eu chegasse até aqui, me proporcionando saúde e iluminando meus caminhos, muitas vezes tortuosos e estreitos, mas sempre guiado por sua força maior.

A minha família gostaria de agradecer o apoio, o amor, a amizade. Jamais esquecerei os passeios da “família buscapé na terra do cadilho”.

Aos meus pais que com suas palavras sábias e exemplos me ensinaram que quando acreditamos em nossos sonhos, nada nesta vida é impossível.

Aos meus irmãos, Tiago, Diego, Thales e Pablo por estarem sempre presentes em minha vida, vocês são muito importantes na conquista de meus ideais. As minhas “irmãzinhas emprestadas” Alessandra, Lausiani e Raquel, obrigada pela amizade e por acreditarem e torcerem sempre por mim. A minha madrinha Elaine Medianeira Feltrin (*in memoriam*), por seu exemplo de amor e dedicação aos estudos.

Ao grande amor da minha vida Adonir Lorensi, agradeço por construir ao meu lado o nosso lar, compartilhar comigo o amor aos animais, compreendendo minhas ausências, TE AMO! As minhas filhotas Lola, Lara, e Oréia por estarem sempre ao meu lado, nos dias quentes ou frios, madrugadas a fora, agradecem a amizade sincera, vocês são muito importantes em minha vida!

Aos meus avós, Cenira e Pedro (*in memoriam*) e Ethel e Clarindo, agradeço todo o apoio, amor e dedicação que me deram, saibam que jamais esquecerei minhas raízes.

Aos meus sobrinhos Lorenzo, Ricardo, Luan, Lucas, José Francisco, Lutiani, Luiza e Luma, pelo amor sincero que recebo a cada dia de vocês. Aos amigos Lizete e Silvio por estarem sempre ao meu lado apoiando-me. Aos demais familiares que sempre me incentivaram, agradeço.

Ao meu orientador, Professor Dr. Janio Morais Santurio, exemplo de pai, professor, pesquisador, a quem devo grande parte do meu aprendizado, através de suas orientações, amizade e acima de tudo por seu exemplo de dignidade, persistência e amor à profissão, não existem palavras que consigam expressar minha gratidão.

Ao Prof. Dr. Sydney Hartz Alves, meu co-orientador durante o mestrado, não tenho palavras para agradecer por sua amizade, apoio, disposição, empenho, tolerância, compreensão e auxílio, imprescindível e incondicional, na concretização deste trabalho.

As professoras Dr^{as} Valéria Carregaro, Daniela I. B. Pereira e Sônia Botton, pelo apoio, dedicação e amizade.

À Universidade Federal de Santa Maria por todos estes anos de ensino público, gratuito e de qualidade.

Ao LAPEMI por me acolher durante estes três ótimos anos e oportunizar a realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro e concessão de bolsas de estudo.

Aos amigos que fazem e fizeram parte do LAPEMI, que estiveram sempre ao meu lado: Camila Souza, Grazielli Maboni, Rubia Zancan, Andressa Curtis, Francielli Bess, Deise Santurio, Maria Isabel, Deise Mahl, Camila Mahl, Cláudia Lautert, Carla Weiblein, Luana Rossato, Débora, Isabel, Isaura, Laura, Daniele, Liandra, Fernanda, João, Patrique, Pedro, Régis, Érico, Marcelo. Obrigado a todos pelos bons momentos que desfrutamos juntos.

Enfim, obrigada a todos que de alguma forma colaboraram para o desenvolvimento da minha pesquisa e que acreditaram e torceram por minha vitória!

*“É exatamente disso que a vida é feita, de **MOMENTOS**.*

*Momentos que **TEMOS** que passar, sendo bons ou ruins, para o nosso próprio aprendizado.*

Nunca se esquecendo do mais importante: Nada nessa vida é por acaso. Absolutamente nada.

Por isso, faça sua parte, da melhor forma possível, pois “a vida nem sempre segue a nossa vontade, mas ela é perfeita naquilo que tem que ser.”

Chico Xavier

“Na nossa busca devemos superar provas, isto nos assusta, devemos transitar pela escuridão com fé, crendo que uma mão nos leva enquanto vamos tateando o caminho. De repente a luz se faz. Então reconhecemos que valeu a pena ser valentes e atravessarmos um terreno desconhecido”.

(Paulo Coelho)

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia
Universidade Federal de Santa Maria

SUSCEPTIBILIDADE DE ISOLADOS DE *Malassezia pachydermatis* SENSÍVEIS E RESISTENTES AO FLUCONAZOL FRENTE A ANTIFÚNGICOS E ÓLEOS ESSENCIAIS.

Autor: Francielli Pantella kunz de Jesus

Orientador: Janio Morais Santurio

Local e Data da Defesa: Santa Maria, 01 de fevereiro de 2011.

Malassezia pachydermatis é um fungo oportunista, associado à dermatomicoses e otopatias em animais domésticos e selvagens. O objetivo deste estudo foi comparar o perfil de susceptibilidade de isolados clínicos de *M. pachydermatis* frente antifúngicos tópicos e sistêmicos, através de duas técnicas padronizadas pelo CLSI: microdiluição em caldo (M27-A3, 2008) e disco-difusão (M44-A, 2004). Para todos os testes foi utilizada uma cepa padrão de *Candida albicans* (ATCC 28367) como controle de qualidade. Isolados de *M. pachydermatis* testados através do método de microdiluição em caldo apresentaram em ordem decrescente de susceptibilidade: anfotericina-B (100%), fluconazol (97,83%), cetoconazol (95,66%), itraconazol (93,48%), seguido de clotrimazol e miconazol (86,96%). Pelo método de disco-difusão 97,83% dos isolados foram suscetíveis a nistatina, 95,66% ao itraconazol e a anfotericina-B; 91,32% ao cetoconazol, 89,14% ao fluconazol; e 86,96% ao miconazol e clotrimazol. Através da indução de resistência *in vitro*, de 30 isolados de *M. pachydermatis*, ao fluconazol (100%) foi possível evidenciar resistência cruzada pelo método de microdiluição em caldo frente aos antifúngicos azólicos, itraconazol (93%), cetoconazol (97%) e voriconazol (100%). O estudo da atividade de óleos essenciais gerados pelo método de microdiluição em caldo, baseado nas médias geométricas das CFMs, evidenciou-se que concentrações acima de 195,42 µg/mL de óleo essencial de orégano, 332,49 µg/mL de óleo essencial de orégano mexicano e 448,8 µg/mL de óleo essencial de canela, possuem ação fungicida *in vitro* sobre *M. pachydermatis*, independente da sensibilidade ou resistência ao fluconazol. A atividade de óleos essenciais frente *M. pachydermatis* fluconazol resistente, é um achado que consolida a importância destes para estudos futuros voltados a terapêutica desta micose. Apesar dos dados de susceptibilidade apresentados pelas cepas sensíveis de *M. pachydermatis* sugerirem que o fluconazol ainda é uma droga segura para terapêutica da maioria dos casos de malasseziose superficial ou invasiva, é fundamental que estudos de vigilância epidemiológica sejam realizados continuamente para evidenciar mudanças no perfil microbiológico em função de práticas terapêuticas.

Palavras-chave: *Malassezia pachydermatis*. Susceptibilidade. Resistência. Antifúngicos. Óleos essenciais. Disco-difusão. Microdiluição em caldo.

ABSTRACT

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia
Universidade Federal de Santa Maria

SUSCEPTIBILITY OF FLUCONAZOLE SENSITIVE AND FLUCONAZOLE RESISTANT *Malassezia pachydermatis* ISOLATES AGAINST ANTIFUNGALS AND ESSENTIAL OILS

Malassezia pachydermatis is an opportunistic fungus associated to dermatomycoses and otopathies in domestic and wild animals. The aim of this study was to compare the susceptibility profile of clinical isolates of *M. pachydermatis* against topic and systemic antifungals, through two standardized CLSI techniques: broth microdilution (M27-A3, 2008) and disk diffusion (M44-A, 2004). A standard *Candida albicans* strain (ATCC 28367) was used as quality control. *M. pachydermatis* isolates assayed through the broth microdilution method showed susceptibility to anfotericina-B (100%), fluconazole (97,83%), ketoconazole (95,66%), itraconazole (93,48%), followed by clotrimazole and miconazole (86,96%). The disk diffusion method showed susceptibility of 97,83% to nystatin, 95,66% to itraconazole and to amphotericin B, 91,32% to ketoconazole, 89,14% to fluconazole and of 86,96% to miconazole and clotrimazole. Through the *in vitro* induction of resistance to fluconazole (100%), cross-resistance was observed through the broth microdilution method among the 30 *M. pachydermatis* isolates against the azoles itraconazole (93%), ketoconazole (97%) and voriconazole (100%). The study of the activities of the essential oils obtained through the broth microdilution, based on geometric means of the minimum fungicidal concentration, showed that concentrations above 195.42 µg/mL, 332.49 µg/mL and 448.8 µg/mL of oregano, Mexican oregano and cinnamon essential oils, respectively, have fungicidal action against *M. pachydermatis*, independently of the sensitivity or resistance to fluconazole. The fungicidal activity of the essential oils against fluconazole-resistant *M. pachydermatis* strains is important for further therapeutic studies of this mycosis. Despite the susceptibility observed among sensitive *M. pachydermatis* strains suggesting fluconazole as a safe drug for the treatment of most cases of superficial and invasive malasseziosis, it is essential continuous surveillance studies to detect changes in the microbiological profile due to therapeutic practices.

Key words: *Malassezia pachydermatis*. Resistance. Antifungal. Essential oils. Susceptibility, disk diffusion. Broth microdilution.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1. Distribuição das 46 amostras de *M. pachydermatis* classificadas pela origem e sinais clínicos dos cães. 38

Quadro 2. Pontos de corte indicados pelo fabricante dos discos e estabelecidos pelos protocolos M27-A3 e M44-A, para *C. albicans* adaptados para *M. pachydermatis*..... 46

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Comparação da susceptibilidade de isolados de *Malassezia pachydermatis* frente antifúngicos tópicos e sistêmicos, através das técnicas de disco-difusão e microdiluição em caldo.66

Tabela suplementar

Tabela 1. Valores de CIM50 e CIM90 para os testes de microdiluição (M27-A3) em caldo e disco-difusão (M44-A).67

CAPÍTULO 2

Table 1. The *in vitro* susceptibility to azolic antifungal agents ($\mu\text{g/mL}$) of *M. pachydermatis* isolates sensitive (FS) and resistant (FR) to fluconazole.....81

Tabelas suplementares

Tabela 1- Distribuição das 30 amostras de *M. pachydermatis* provenientes de cães, induzidas a resistência ao fluconazol, classificadas pelos MICs, sinais clínicos e produção da enzima urease.....82

Tabela 2. Valores de p e sua significâncias comparções entre os dois grupos de isolados FS e FR de *M. pachydermatis*, respectivamente sensíveis e resistentes ao fluconazol.....83

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Susceptibilidade de isolados do fungo *Malassezia pachydermatis* frente óleos essenciais de canela, orégano mexicano e orégano.....94

Tabelas suplementares

Tabela 1. Valores de CIM₅₀ e CIM₉₀ dos óleos essenciais, frente aos isolados de *M. pachydermatis* sensíveis (FS) e resistentes (FR) ao fluconazol..... 95

Tabela 2. Concentração Fungicida Mínima (CFM) da atividade de cada óleo em estudo frente a susceptibilidade do fungo *Malassezia pachydermatis* no grupo sensível ao fluconazol (FS) e no grupo resistente ao fluconazol (FR).....96

Tabela 3. Composição química dos óleos essenciais.....97

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO.....	17
2.1. Gênero <i>Malassezia</i>	17
2.2. <i>Malassezia pachydermatis</i>	19
2.2.1. Taxonomia	20
2.2.2. Morfologia e identificação.....	20
2.2.3. Epidemiologia das infecções causadas por <i>M. pachydermatis</i> no homem e animais.....	20
2.2.4. Patogenia em cães.....	21
2.2.5. Meios de cultivo	22
2.2.6. Identificação	23
2.3. Agentes antifúngicos.....	23
2.3.1. Derivados azólicos.....	24
2.3.1.1. Cetoconazol	25
2.3.1.2. Miconazol	26
2.3.1.3. Clotrimazol	26
2.3.1.4. Fluconazol	27
2.3.1.5. Itraconazol	27
2.3.1.6. Voriconazol	28
2.4. Poliênicos	29
2.4.1. Anfotericina B	30
2.4.2. Nistatina.....	30
2.5. Óleos essenciais	31
2.5.1. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais	32
2.5.1.1. <i>Origanum vulgare</i>	33
2.5.1.2. <i>Lippia graveolens</i>	33
2.5.1.3. <i>Cinnamomum zeylanicum</i>	34
2.6. Tratamento da Malasseziose	34
3. METODOLOGIA.....	36
3.1. Local do experimento	36
3.2. Isolados de <i>M. pachydermatis</i>.....	36
3.2.2. Isolados sensíveis ao fluconazol.....	36
3.2.3. Isolados resistentes ao fluconazol.....	37
3.3. Avaliação da susceptibilidade de <i>M. pachydermatis</i>	39
3.3.1. Avaliação da susceptibilidade pela técnica de microdiluição em caldo.....	39
3.3.1.1. Antifúngicos	39
3.3.1.1.1. Diluição dos antifúngicos	39
3.3.1.2. Preparação dos inóculos	40
3.3.1.3. Inoculação nas placas de microtitulação	40
3.3.1.4. Incubação.....	40
3.3.1.5. Leitura dos testes	41
3.3.2. Avaliação da susceptibilidade de <i>M. pachydermatis</i> pela técnica de Disco-difusão.....	41
3.3.2.1. Discos	41
3.3.2.2. Preparação do meio	42
3.3.2.3. Preparação do inóculo	42
3.3.2.4. Ensaios de disco-difusão	42
3.3.2.5. Leitura e interpretação dos halos de inibição.	43

3.3.2.6. Interpretação dos halos inibitórios: definição qualitativa de susceptibilidade de <i>M. pachydermatis</i> aos antifúngicos.....	44
3.4. Avaliação da atividade de óleos essenciais frente a <i>Malassezia pachydermatis</i>.....	44
3.4.1. Óleos essenciais.....	44
3.4.1.1. Origem dos óleos essenciais.....	44
3.4.1.2. Análise dos constituintes químicos dos óleos essenciais.....	45
3.4.2. Técnica utilizada.....	47
3.4.2.1. Microdiluição em caldo.....	47
3.4.2.2. Diluição dos óleos essenciais.....	47
3.4.2.3. Preparação dos inóculos.....	48
3.4.2.4. Inoculação nas placas de microtitulação.....	48
3.4.2.5. Incubação.....	49
3.4.2.6. Leitura dos testes.....	49
3.4.2.6.1. Concentração fungicida mínima (CFM).....	49
3.5. Análise estatística.....	50
CAPÍTULO 1.....	51
Resumo.....	53
Abstract.....	54
Introdução.....	55
Materiais e métodos.....	56
<i>Antifúngicos e Discos</i>	56
<i>Microdiluição em caldo</i>	56
<i>Disco-Difusão</i>	57
<i>Interpretação dos resultados</i>	57
Resultados.....	58
Discussão.....	59
Referências.....	63
CAPÍTULO 2.....	68
Abstract.....	71
Introduction.....	72
Materials and methods.....	72
<i>Fungi</i>	72
<i>In vitro Antifungal Activity</i>	73
<i>Statistical Analysis</i>	73
Results.....	74
Discussion.....	75
Conclusion.....	77
References.....	77
CAPÍTULO 3.....	84
Resumo.....	86
Abstract.....	87
Materiais e métodos.....	88
<i>Microorganismos</i>	88
<i>Óleos essenciais</i>	89
<i>Atividade antifúngica</i>	89
<i>Análise estatística</i>	90
Resultados.....	90
Discussão.....	90

Referências	92
4. DISCUSSÃO	98
5. CONCLUSÕES.....	103
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	104

1. INTRODUÇÃO

Os fungos leveduriformes do gênero *Malassezia*, anteriormente descritos como *Pityrosporum*, são organismos comensais da pele da maioria dos vertebrados (CARFACHIA *et al.*, 2005). “Dermatite por *Malassezia*” ou Malasseziose são termos utilizados para descrever doenças cutâneas associadas ao aumento deste fungo nas regiões afetadas. Este aumento em determinadas regiões anatômicas parece também influenciar a ocorrência e a extensão das lesões de pele. Várias condições, como doenças endócrinas, imunológicas ou parasitárias poderiam alterar a “função de barreira” da pele e favorecer a reprodução exacerbada destas leveduras (CHEN & HILL, 2005).

A classificação atual do gênero *Malassezia* compreende treze espécies, doze das quais são lipidiodependentes (*M. furfur*, *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. restricta*, *M. slooffiae*, *M. sympodialis*, *M. dermatis*, *M. nana*, *M. japonica*, *M. yamatoensis*, *M. equi* sp. nov. e *M. caprae* sp. nov.) e uma espécie não lipidiodependente, *M. pachydermatis* (CABAÑES *et al.*, 2007, CAFARCHIA *et al.*, 2008a).

Malassezia pachydermatis é uma levedura comum da pele de carnívoros selvagens e domésticos, sendo considerada um fungo oportunista de crescente importância em cães e humanos (NARDONI *et al.*, 2004), podendo tanto assumir o papel de um habitante normal, como de um patógeno oportunista do meato acústico externo e tegumento. Quando em infecção ativa necessita de tratamento prolongado e possui frequente recorrência. Para a malasseziose não existe um único agente ou tratamento e as preparações destinadas para esta enfermidade, usualmente, contém vários princípios ativos. Casos de insucesso terapêuticos são relatados e ocorrem principalmente quando não são realizados exames diagnósticos, sendo os animais tratados com antibacterianos inespecíficos e desprovidos de ação antifúngica. Considerando-se que o fenômeno da resistência dos antifúngicos é pouco explorado em *M. pachydermatis*, os casos de insucesso terapêutico acima referidos podem ser determinados também por este fenômeno (BOEKHOUT *et al.*, 2010).

O desenvolvimento de novos agentes antifúngicos com diferentes mecanismos de ação, bem como o possível efeito sinérgico obtido da combinação de agentes antifúngicos com drogas de outras classes farmacêuticas, tem estimulado grande interesse no estudo da susceptibilidade a terapias antifúngicas (JOHNSON *et al.*, 2004). Em função disso, testes de

suscetibilidade *in vitro*, padronizados pelos protocolos apresentados pelo CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), têm explorado as interações entre os agentes antifúngicos e compostos com ação antimicótica contra diversos fungos patogênicos.

A malasseziose embora represente importante infecção clínica de pequenos animais, determinando casos de otite externa e dermatite, no Brasil, seus dados baseiam-se principalmente, em levantamentos relacionados à frequência, aspectos clínicos ou terapêuticos. Existe uma carência de estudos nacionais que enfoquem o agente propriamente dito e seu perfil de susceptibilidade a antifúngicos e sua correlação com a clínica (BOEKHOUT *et al.*, 2010). Estes aspectos justificam a necessidade de estudos microbiológicos mais aprofundados sobre a *Malassezia* sp., que sirvam de suporte para uma melhor avaliação e conduta terapêutica, não só na clínica veterinária, como em casos que a literatura cita seu envolvimento com enfermidades em humanos. Com base nestes aspectos os objetivos deste trabalho foram:

a) Comparar a susceptibilidade de amostras previamente identificadas de *M. pachydermatis* isoladas de casos clínicos de dermatite e otite canina, através de duas técnicas padronizadas pelo CLSI, microdiluição em caldo (M27-A3) e disco difusão (M44-A), frente aos antifúngicos tópicos e sistêmicos: miconazol, cetoconazol, itraconazol, fluconazol, clotrimazol, nistatina e anfotericina-B.

b) Descrever o perfil de susceptibilidade de cepas previamente classificadas como sensíveis e resistentes ao fluconazol frente voriconazol, cetoconazol e itraconazol.

c) Verificar a susceptibilidade de isolados sensíveis e resistentes ao fluconazol frente a três óleos essenciais extraídos de condimentos orégano (*Origanum vulgare*), orégano mexicano (*Lippia graveolans*) e canela (*Cinnamomum zeylanicum*).

2. REVISÃO

2.1. Gênero *Malassezia*

A *Malassezia furfur* foi a primeira levedura do gênero a ser descrita, agrupou as antigas *Pityrosporumn ovale* e *P. orbiculare* e foi criada por Baillon em 1889, em homenagem a Malasses que havia estudado a levedura em 1874 (BAILLON, 1889).

Em animais, foi Weidman em 1925, que isolou a levedura de um rinoceronte indiano (*Rhinoceras unicornis*) com lesões de pele, sendo primeiramente denominada *Pityrosporum pachydermatis* devido as semelhanças com *Pityrosporum* humano com a característica de não apresentar lipodependência. Essa característica foi estudada por Lodder, em 1952, quando concluiu que a levedura isolada por Weidman crescia razoavelmente bem em meios de cultura sem adição de substâncias oleosas diferindo dos anteriores *P. ovale* e do *P. orbiculare*, cujo crescimento em tais condições era inexistente. *Malassezia pachydermatis* é a única espécie do gênero capaz de crescer em meio de cultivo com agar Sabouraud dextrose sem suplemento lipídico (GUILLOT & BOND, 1999).

Em 1853, Robin denominou o agente causador da pitiríase versicolor em humanos de *Microsporum furfur*, por associá-lo ao *M. audoumii* e causar lesões com características furfuráceas relacionando o com dermatófitos (SLOOF, 1971; GUILLOT *et al.*, 1995a). Porém, o primeiro relato da natureza fúngica do agente causador da pitiríase versicolor, com lesão superficial descamativa e despigmentada, foi feito por Eichstedt em 1846 quando células fúngicas foram evidenciadas a partir de escamas cutâneas de pacientes humanos. Um ano mais tarde, Sluyer (1847), descreve detalhadamente essas estruturas fúngicas que recebe a denominação descrita por Robin (GUILLOT & GUÉHO, 1995a).

Em 1955, Gustafson substituiu a nomenclatura de *Pityrosporum pachydermatis* por *P. cani*, e em 1974 foi estabelecido que todas as leveduras do gênero que crescessem sem suplementação de lipídios seriam agrupadas em um único táxon, *P. canis*, que atualmente foi substituído por *Malassezia pachydermatis* (apud GHILLOT & BOND, 1999). Sloof, em 1955, foi quem primeiro revelou a levedura em cães, isolando-a em cerca de 70% do total de amostras estudadas de casos de otite externa (SLOOF,1970). Guillot & Guého, em 1995b,

estudaram amostras de *M. pachydermatis* provenientes de cães e rinocerontes, afirmando, através de técnicas moleculares, que todas as amostras não lipodependentes conceituam-se em um único táxon, *M. pachydermatis*. Confirmou-se que esta espécie está adaptada em animais embora esta espécie possa, ocasionalmente, ser encontrada em humanos (DWORECKA & TOKA, 1999). Akerstedt & Vollset (1996) citam que a levedura tem sido associada a casos de diversas infecções em animais domésticos, silvestres e no homem.

Em 1993, a taxonomia do gênero *Malassezia* foi reconhecida por Guillot & Guého através do seqüenciamento do rRNA. Como resultado houve uma ampliação do gênero para sete espécies distintas e a inclusão dessas novas espécies foi confirmada por Guillot *et al.* (1996) e Aspiroz *et al.* (1999) através de vários critérios: diferenças morfológicas, sorotípicas, metabólicas, bioquímicas e cariotipagem.

Porém, foi um importante estudo feito por Guého *et al.* (1996), através de análise morfológica de colônias, estudos fisiológicos incluindo: temperatura de incubação, capacidade de crescimento em diversas concentrações de Tween (Polyoxyethylene sorbitan mono-palmitate), reação de catalase e hidrólise da uréia que as bases fenotípicas da identificação foram melhor propostas. Estudos ultramicroscópicos, descreveram quatro novas espécies de *Malassezia*, todas lipodependentes (*M. restricta*, *M. slooffiae*, *M. obtusa* e *M. globosa*). A partir desse estudo, novos testes para diferenciação entre *M. furfur* de *M. sympodialis* e *M. slooffiae* foram propostos (MAYSER *et al.*, 1997), onde somente a primeira espécie tem a capacidade de metabolizar o cromofor EL (óleo de rícino) e de transformar a esculina em esculetina e glicose.

Atualmente, com o crescente interesse por novas técnicas moleculares para elucidar a biologia de microorganismos, é mais fácil a comparação de genomas para sua diferenciação. As sete espécies já descritas (*M. furfur*, *M. sympodialis*, *M. slooffiae*, *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. restricta* e *M. pachydermatis*) foram confirmadas por tipagem molecular através de PFGE (*pulsed field gel electrophoresis*) e RAPD (*random amplified polymorphic DNA*) onde relataram-se a ocorrência de variações genéticas em todas as espécies (BOEKHOUT *et al.*, 1998).

Gupta *et al.* (2000), ao analisar genes por PCR-REA, também confirmou as mesmas espécies de *Malassezia*, mas ressaltou que a diferenciação, por este método, entre *M. globosa* e *M. restricta* não é muito confiável, e preconizou o estudo de outras características, como morfologia celular e prova da catalase. Outro estudo realizado por Guillot *et al.* (2000), descreveram uma técnica baseada em PCR-REA de somente uma região genômica (LSU do

rRNA) para distinguir as espécies de *Malassezia* já identificadas através de enzimas de restrição (*BanI*, *HaeII* e *MspI*) e concluíram que este método é confiável e de fácil execução. Sugita *et al.* (2001), identificaram *M. dermatis*, de pacientes humanos com dermatite atópica, por seqüenciamento de rRNA. Em seqüência, no ano de 2003, Sugita *et al.* descreveram *M. japonica* isolada de paciente com dermatite atópica e pessoas sem manifestações clínicas de malasseziose, também por seqüenciamento do rDNA.

No ano seguinte, Sugita *et al.* (2004) descreveram uma nova espécie denominada *M. yamatoensis*, a qual foi isolada de pacientes humanos com dermatite seborréica e de pessoas saudáveis, com a técnica empregada anteriormente. Em 2004, Hirai *et al.* propuseram uma outra espécie, *M. nana*, isolada de felinos e bovinos com otite externa, também identificada por seqüenciamento do rDNA. Mais recentemente, Cabañes *et al.* (2007) descreveram duas novas espécies, *M. caprae* e *M. equina*, confirmadas por seqüenciamento das regiões D1/D2 do gene 26S e ITS 5.8S do rRNA; da subunidade 1 da RNA polimerase (RPB1) e do gene “chitin synthase”, e também pelos padrões de Restriction fragment length polymorphism (RFLP).

A importância na diferenciação de espécies ou subespécies de *Malassezia* não reside apenas no fato de identificação *per se*, mas sim no fato de que possa haver diferenças na virulência e na susceptibilidade a antifúngicos (SCHIOTTFELDT *et al.*, 2002).

2.2. *Malassezia pachydermatis*

Malassezia pachydermatis é considerada um habitante normal e patógeno oportunista do meato acústico externo de cães e gatos, também podendo ser encontrada no reto, pele interdigital, tegumento cutâneo, sacos anais e vagina (BOND *et al.*, 1996). É considerada um dos mais freqüentes microorganismos associados com otite externa em cães (BAXTER, 1975; CHENGAPA, 1983; LANGONI *et al.*, 1991) e, nos últimos anos, os estudos também apontam essa levedura como causadora de dermatite canina (LARSSON *et al.*, 1988; PLANT *et al.*, 1992; NOBRE *et al.*, 1998). Assim como os ácaros de gênero *Demodex* sp. e as bactérias do gênero *Staphylococcus* sp., a levedura *M. pachydermatis* é constituinte da microbiota sapróbica cutânea de cães e gatos, embora seja um agente oportunista (NAHAS, 1997).

2.2.1. Taxonomia

Devido às características reprodutivas (assexuada), pela estrutura lamelar, pelas características genéticas, pela capacidade de hidrolisar a uréia, a espécie *Malassezia pachydermatis*, pertence ao reino *Fungi*, filo *Basidiomycota*, classe *Blastomycetes*, ordem *Cryptococcales* e família *Cryptococcaceae* ao gênero *Malassezia* (BAILLON, 1889, SCHIOTTFELDT *et al.*, 2002; ASPÍROZ *et al.*, 1999; GUILLOT & BOND, 1999).

2.2.2. Morfologia e identificação

Morfologicamente *M. pachydermatis* se apresenta como leveduras com células pequenas com parede celular espessa, com múltiplas camadas, medindo 2 a 7µm, a reprodução na pele é assexuada com produção de blastoconídeos por um processo monopolar repetitivo ou brotamento, formando uma célula globosa, ovóide ou cilíndrica quando esta se desliga da célula mãe (KEDDIE, 1996; GUILLOT *et al.*, 1995a). Hifas são raramente observadas no exame direto das lesões ou a partir dos meios de cultura. A identificação morfológica pode ser realizada através de exame direto através da observação microscópica (40 ou 100 X) do material advindo de lesões ou de culturas, corado com corantes azuis (azul de algodão, azul de metileno, etc.) (GUILLOT *et al.*, 1998).

2.2.3. Epidemiologia das infecções causadas por *M. pachydermatis* no homem e animais

Em animais a maioria dos casos de malasseziose está associada com otite externa em cães e apresenta formações excessivas de cerume e prurido, determinando eritema do meato acústico externo (HIRAI *et al.* 2004). O exsudato produzido na otite externa varia de marrom escuro a negro. Esses animais demonstram frequente prurido, entretanto a apresentação clínica não é específica e o diagnóstico deve ser baseado na identificação da levedura, pela citologia do cerume e cultura do agente (HUANG, 1994). Assim sendo, os autores

consideram que a presença de células compatíveis morfolologicamente com a *M. pachydermatis* em um exame direto não significa doença, mas a presença de numerosas células por campo é considerada patogênica (PLANT *et al.*, 1992; GRIFFIN, 1996; BOND *et al.*, 1996). Entretanto, Ribeiro et al, (1997) enfatizaram que a interpretação deste exame laboratorial deve ser prudente já que foi evidenciada a ocorrência de células de *M. pachydermatis* em número elevado tanto em animais hígidos como em animais afetados pelo agente.

As leveduras do gênero *Malassezia* em humanos estão associadas a quadros patológicos como pitiríase versicolor, dermatite seborréica e dermatite atópica, que anteriormente eram apenas associadas à espécie *M. furfur* e hoje, o surgimento das demais espécies levou a uma reavaliação no processo laboratorial (SCHIOTTFELDT *et al.* 2002). *M. pachydermatis* também tem sido referida como causadora de infecções sistêmicas no homem, particularmente em pacientes imunodeprimidos (LAROCCO *et al.*, 1988; WELBEL *et al.*, 1994). No entanto, informações sobre fungemias deste gênero são limitadas e se restringem a *M. pachydermatis* e *M. furfur*. Os relatos estão associados a surtos nosocomiais em Unidades de Tratamento Intensivo (UTI), e esporadicamente em pacientes imunocomprometidos. *M. pachydermatis* é uma levedura zoofílica associada principalmente à otite externa e dermatite seborréica em cães, é frequentemente isolada da pele de humanos e tem sido implicada em infecções hospitalares, principalmente em pacientes recebendo nutrição parenteral a base de lipídios (DANKNER *et al.*, 1987, CHRYSSANTHOU *et al.*, 2001).

Embora ainda não existam dados sistemáticos sobre fatores de risco para infecções invasivas da espécie *M. pachydermatis*, a ocorrência em pacientes imunocomprometidos, colonização saprófita do agente na pele de humanos e animais podem ser pré-requisitos fundamentais para determinar uma fungemia. Embora infecções invasivas pela espécie *M. pachydermatis* possam ocorrer esporadicamente, na última década, surtos em UTIs neonatais têm sido amplamente divulgados (BARBER *et al.*, 1993, CHRYSSANTHOU *et al.*, 2001, SHATTUCK *et al.*, 1996).

2.2.4. Patogenia em cães

Cães que apresentam doenças de pele associada a *M. pachydermatis* podem ter aumentos de até 10.000 vezes na densidade populacional da levedura nas lesões, quando

comparados com cães saudáveis, no entanto, ainda não foi estabelecido um limiar de densidade populacional necessário para a infecção. A adesão aos tecidos e produção de enzimas, tem um importante papel na colonização e infecção (BOEKHOUT *et al.*, 2010). Entre os fatores de virulência e sobrevivência utilizadas por *M. pachydermatis*, incluem-se a firme aderência dessa levedura aos queratinócitos, podendo alterar a coesão entre as células e, ainda, danificar a queratina. Em adição, a produção de enzimas que alteram a composição do manto lipídico cutâneo, promovem inflamação local seguida de ativação do complemento, desencadeando processos inflamatórios que favorecem a penetração da levedura nos tecidos (BOND & LLOYD, 1987).

2.2.5. Meios de cultivo

O isolamento de *M. pachydermatis* é realizado em meio de cultivo ágar Saboraud, acrescido de cloranfenicol e ciclohexamida incubado sob temperaturas entre 27° a 35°C; este meio permite o isolamento da maioria das espécies de fungos responsáveis por dermatopatias em carnívoros, tais como os dermatófitos e as leveduras. Na rotina laboratorial meios de cultivo suplementados com uma fonte de ácidos graxos, têm sido utilizados para cultivo de *Malassezia spp.*, tais como o ágar Dixon modificado (GUILLOT *et al.*, 1998). A vantagem da utilização deste meio de cultura tem por objetivo isolar outras espécies que requerem suplementação lipídica (BOND & ANTHONY, 1995; GUILLOT *et al.*, 1997, GUILLOT *et al.* 1998) além da *M. pachydermatis*. Após sete dias de incubação a 37°C as leveduras apresentam-se como colônias com crescimento ideal. *M. pachydermatis* é particularmente sensível ao frio e a maioria das cepas tornam-se inviáveis após três meses em temperatura 4°C (GUILLOT & BOND, 1999). *M. pachydermatis*, diferentemente das demais espécies do gênero, não utiliza lipídios como fonte de carbono e não necessita de suplementação com ácido graxo de cadeia longa, no meio de cultura para o seu desenvolvimento (GUÉHO *et al.*, 1996).

2.2.6. Identificação

A identificação de *M. pachydermatis* é realizada pela morfologia e aspectos fisiológicos, e atualmente por métodos moleculares. As colônias são opacas de coloração amarelo creme, passando a marrom alaranjada conforme o envelhecimento; a superfície é redonda ou em forma de cápsula, a medida transversal é de 1,3 μ m e a textura pode ser seca, friável, granulosa e algumas vezes gordurosa (GUILLOT *et al.*, 1996). Fisiologicamente, *M. pachydermatis* apresenta lipiofilia, mas não é lipodependente; esta é a principal característica que contribui na identificação. Além disso, observa-se reação de catalase, urease e prova de coloração por DDB (azul de diazônio B) positivas. A incorporação de Tween a 10% em ágar glicose/peptona inibe o seu crescimento. A temperatura ótima de crescimento é entre 32 e 35°C, podendo crescer também a 25°C (GUILLOT, 1995). Apesar dessas características, pode-se também identificar a espécie *M. pachydermatis* através técnicas moleculares para posterior avaliação de sua patogenicidade (GUILLOT *et al.*, 1997; AIZAWA *et al.*, 1999, 2001; CARFACHIA *et al.*, 2007).

2.3. Agentes antifúngicos

Os antifúngicos surgiram bem mais tarde que os agentes bacterianos, por serem os fungos, a exemplo do hospedeiro, seres eucariotos. Em razão dessa semelhança, entre o Reino Fungi e os seres humanos e animais e suas conseqüentes similaridades bioquímicas e fisiológicas, muitas substâncias com propriedades antifúngicas causam reações deletérias inespecíficas, podendo acarretar uma série de efeitos colaterais à terapia. Este é um dos fatores que retardaram o uso destes fármacos, bem como continuam limitando os avanços no campo da terapia antifúngica (LACAZ *et al.*, 2002; SIDRIM & ROCHA, 2004). O arsenal terapêutico antifúngico tem aumentado muito nos últimos anos, buscando atender a uma demanda crescente na micologia médica, destacando-se o tratamento tópico das dermatomicoses. A terapia antifúngica era pouco efetiva e não específica, tendo sido o iodeto de potássio o primeiro composto utilizado em 1903, e até hoje é utilizado para o tratamento da

esporotricose, tanto nos animais quanto no homem. Em 1939, surgiu a griseofulvina, só utilizada em 1958 após a comprovação de sua eficácia no tratamento da dermatofitose em animais de laboratório (NIMURA *et al.*, 2001).

Com a descoberta da anfotericina B, em 1956, houve grande avanço no tratamento, sendo o primeiro fármaco eficiente para o tratamento das micoses sistêmicas. Na mesma época foi descoberta atividade antimicótica de um derivado pirimidínico, denominado 5 - fluocitosina, que ampliou o arsenal terapêutico das micoses profundas. Porém o grande impulso nesta área foi a descoberta da propriedade antifúngica do benzimidazol, de onde surgiram os derivados imidazólicos: miconazol (1967), clotrimazol (1969), econazol(1975), isoconazol (1979), tioconazol (1984), oxiconazol (1986), entre outros. Após, novas descobertas houve a síntese dos triazólicos; representados pelo fluconazol (1990), itraconazol (1992), voriconazol (2002), ravuconazol (2004), entre outros ainda em estudo. Estes últimos deixaram de apresentar efeitos colaterais no hospedeiro além de apresentarem propriedades farmacocinéticas mais favoráveis determinando uma terapia mais segura e eficaz. Ademais, surgiram ainda na década de 90, os derivados morfolínicos, as alilamina, as equinocandinas, ampliando sobremaneira as opções terapêuticas em micoses (SIDRIM & ROCHA, 2004).

O atual arsenal de agentes antifúngicos atua em um número limitado de processos celulares. A maior parte dos antifúngicos que estão em uso clínico atua sobre a biossíntese do ergosterol, que é o principal esterol nas membranas celulares fúngicas. Ergosterol é o alvo dos poliênicos, que inclui a anfotericina B, uma droga que tem sido explorada clinicamente por mais de 50 anos. No entanto, sua utilização tem sido indicada em infecções graves devido à sua toxicidade aos pacientes, provavelmente pelos efeitos às membranas celulares contendo colesterol. Outros passos na biossíntese do ergosterol são alvos para as alilaminas, tiocarbamatos, morfolinas e azólicos (COWEN, 2008). Uma nova classe de antifúngicos que recentemente tornou-se disponível foram as equinocandinas. Elas atuam bloqueando a síntese da parede celular através da inibição da enzima β -(1,3) - d-glucano sintetase, tendo boa segurança e um amplo espectro de atividade (COWEN, 2008).

2.3.1. Derivados azólicos

Os derivados azólicos são compostos sintéticos que podem ser classificados em imidazóis ou triazóis, de acordo com o número de átomos de nitrogênio no anel azólico. Entre

os imidazóis estão cetoconazol, miconazol e clotrimazol. Como regra, miconazol e clotrimazol são usados como terapia tópica. Os derivados triazóis são representados pelo itraconazol, fluconazol e voriconazol. Os azóis são bem tolerados, têm atividade contra uma variedade de fungos patogênicos e tem sido a classe de antifúngicos mais amplamente utilizada durante décadas. Inibem a enzima lanosterol 14 α -demetilase (codificada pelo gene ERG11) e, por isso, bloqueiam a produção de ergosterol e provocam a acumulação de um esteroide intermediário tóxico (lanosterol) (COWEN, 2008). A especificidade das drogas azólicas resulta da sua maior afinidade pelas enzimas fúngicas do citocromo P450 do que pelas enzimas do citocromo P450 humano. Os imidazóis apresentam um grau de especificidade menor do que os triazólicos, o que explica sua maior incidência na interação com drogas e de efeitos adversos. A reação adversa mais comum é um pequeno distúrbio gastrointestinal. Todos os azóis podem provocar anormalidades nas enzimas hepáticas e, muito raramente, hepatite (BENNETT, 2006).

2.3.1.1. Cetoconazol

O cetoconazol foi o primeiro derivado azólico oral usado na clínica. Distingue-se dos triazóis pela sua maior capacidade em inibir as enzimas do citocromo P450 dos mamíferos, ou seja, é menos seletivo para o citocromo P450 fúngico do que os mais novos derivados azólicos. Mostra-se eficaz contra diferentes tipos de fungos, entretanto é comum a ocorrência de recidiva após tratamento aparentemente bem-sucedido. Distribui-se amplamente por todos os tecidos e líquidos teciduais, porém só atinge concentrações terapêuticas no SNC administrado em altas doses (SILVA, 2006). O principal efeito adverso é a hepatotoxicidade, que é rara, mas que pode se tornar fatal. Pode ocorrer sem qualquer evidência clínica manifesta e evoluir após a interrupção do fármaco. Outros efeitos colaterais que podem ocorrer consistem em distúrbios gastrointestinais e prurido (BENNETT, 2006). Foi registrada uma inibição da síntese de esteróides e testosterona pelo córtex supra-renal com altas doses, sendo esta última responsável pelo desenvolvimento de ginecomastia em alguns pacientes do sexo masculino. Podem ocorrer interações adversas com outros fármacos. A terfenadina, a ciclosporina e o astemizol interferem com enzimas metabolizantes, causando concentrações plasmáticas elevadas de cetoconazol ou da droga com a qual interage, ou de ambos. Os

antagonistas dos receptores H₂ e os antiácidos diminuem a absorção do cetoconazol e, por conseguinte, reduzem sua concentração plasmática (SILVA, 2006).

2.3.1.2. Miconazol

Miconazol é um dos antifúngicos mais tradicionais. Atualmente é utilizado em larga escala como antifúngico tópico ou por via oral para o tratamento das infecções fúngicas do trato gastrintestinal (BENNETT, 2006). Entretanto já foi muito utilizado por via parenteral para o tratamento de micoses sistêmicas (NEGRONI *et al.*, 1977; SUNG *et al.*, 1977; MCDOUGALL *et al.*, 1982; ROLAN *et al.*, 1983). Possui meia-vida plasmática curta e deve ser administrado a cada oito horas. Atinge concentrações terapêuticas no tecido ósseo, nas articulações e no tecido pulmonar, mas não no sistema nervoso central. É inativado no fígado. Os efeitos adversos são relativamente raros, e os mais comuns consistem em distúrbios gastrintestinais, embora se tenha relatado a ocorrência de prurido, discrasias sangüíneas e hiponatremia (SILVA, 2006).

2.3.1.3. Clotrimazol

O clotrimazol, como os demais antifúngicos imidazólicos, inibem a incorporação do acetato de ergosterol, inibindo a lanosterol desmetilase, por interferência no citocromo P-450 da levedura, trazendo como consequência alterações na fluidez e permeabilidade da membrana citoplasmática do fungo, prejudicando a captação dos nutrientes, o que se traduz por inibição do crescimento fúngico, originando alterações morfológicas que resultam em necrose celular (RICHARDSON and WARNOCK, 1993). A metabolização é principalmente por via hepática, sendo os efeitos colaterais mais comuns náuseas e vômitos quando utilizados por via sistêmica, além de eritema, ardência, descamação, edema, prurido, urticária e formação de vesículas no uso tópico (SANDE & MANDELL, 1987; ARENAS, 1993). Atualmente, o clotrimazol só é utilizado topicamente no tratamento de dermatofitose, candidose e malasseziose (SAWYER *et al.*, 1975), com absorção inferior a 0,5% após

aplicação à pele intacta; na vagina a absorção oscila entre 3 e 10%, permanecendo concentrações da droga por até três dias após a aplicação (SANDE & MANDELL, 1987). O clotrimazol a 1% está indicado para cães no tratamento de otites externas com envolvimento de *M. pachydermatis* (LOBELL *et al.*, 1995).

2.3.1.4. Fluconazol

O fluconazol é um bistriazol fluorado, sendo um dos antifúngicos mais recentes. As concentrações plasmáticas são essencialmente iguais, seja a administração feita por via oral ou intravenosa, uma vez que este fármaco é quase totalmente absorvido pelo trato gastrintestinal, diferindo neste ponto do itraconazol e cetoconazol (BENNETT, 2006). É muito hidrossolúvel e penetra no líquido facilmente. As interações medicamentosas são mais raras porque o fluconazol é, de todos os derivados azólicos, o que menos age sobre as enzimas microssomais hepáticas. Por causa desse efeito e melhor tolerância gastrintestinal, o fluconazol apresenta o maior índice terapêutico entre os derivados azólicos, permitindo posologia mais agressiva em diversas infecções fúngicas. A concentração plasmática máxima é de 4 a 8 µg/ml após doses repetidas de 100 mg. A excreção renal representa mais de 90% da eliminação, e a meia-vida de eliminação é de 25 a 30 horas. O fluconazol difunde-se rapidamente em fluidos corporais, incluindo leite materno, escarro e saliva; concentrações no LCR podem atingir 50% a 90% dos valores do plasma (BENNETT, 2006). É um agente fungistático que altera a funcionalidade da membrana plasmática fúngica pela depleção do ergosterol, seu componente de maior importância, através da inibição da enzima 14- α -lanosterol demetilase, necessária para a sua biossíntese (WU *et al.*, 2000; HAZEN *et al.*, 2000).

2.3.1.5. Itraconazol

O itraconazol é um derivado triazólico sintético, que apresenta um largo espectro de ação nas micoses superficiais (dermatofitose, candidose, malasseziose) e sistêmicas

(candidose sistêmica, aspergilose, histoplasmose, esporotricose e cromomicose). A biodisponibilidade de itraconazol é máxima quando a ingestão se faz imediatamente após uma refeição e a eliminação é bifásica, com uma meia-vida terminal em um dia. Os níveis da droga nos tecidos queratinizados, especialmente na pele, são cinco vezes superiores aos níveis plasmáticos (ARENAS, 1993; RICHARDSON and WARNOCK, 1993). O itraconazol também tem sido utilizado com sucesso em cães com rinite micótica (MUIR *et al.*, 1998; SMITH *et al.*, 1998) e, em micoses sistêmicas, como blastomicose, na dose de 5mg/kg/dia (LEGENDRE *et al.*, 1996). O uso deste medicamento em cães pode levar a erupções cutâneas (PLOTNICK *et al.*, 1997) e, em dosagens elevadas, causar anorexia e aumento da concentração plasmática das enzimas fosfatase alcalina e aminotransferase (LEGENDRE *et al.*, 1996). Jaham *et al.* (2000) indicam para micoses superficiais de cães até 5mg de itraconazol/kg/dia e 1,5-3mg/kg/dia para gatos, enquanto as micoses subcutâneas e profundas de caninos e felinos seriam tratadas com 10- 20mg/kg/dia. Itraconazol é um agente antifúngico triazólico que é usado para o tratamento de doenças causadas por vários fungos em humanos e para o tratamento da dermatofitose em gatos. As características queratinofílicas e propriedades lipofílicas desta droga possibilitam a administração intermitente durante o tratamento de infecções causadas por fungos do extrato córneo (RIGOPOULOS *et al.*, 2004). Itraconazol pode ser melhor tolerado em cães quando comparado com cetoconazol, e os efeitos colaterais (principalmente a anorexia) são incomuns em uma dose de 5 mg / kg, embora anorexia e ulceração da pele sejam mais frequentes. Vasculite foi observada em cães com blastomicose que recebeu 10 mg/ kg (GAMBICHLER *et al.*, 2005). A eficácia da administração de 5 mg / kg por via oral a cada dois dias, durante 3 semanas (terapia em pulso) foi eficaz no tratamento da dermatite causada por *Malassezia*. A terapia em pulso tem a vantagem da redução dos custos e de efeitos colaterais melhorando a complacência. Entretanto, as infecções graves podem exigir um tratamento mais prolongado ou doses mais elevadas (DRENO *et al.*, 2003).

2.3.1.6. Voriconazol

O voriconazol é um recente antifúngico triazólico com potente ação e largo espectro de atividade *in vitro*; como os demais antifúngicos azólicos, atua inibindo a enzima 14 alfa-desmetilase, dependente do citocromo P-450, essencial para a biossíntese de ergosterol. O

voriconazol é ativo *in vivo* frente a uma série de infecções fúngicas em modelos animais, incluindo infecções sistêmicas com *Aspergillus* sp, *Candida* sp, menos sensíveis a outros azólicos, e *C. neoformans* (KAPPE, 1999; MANAVATHU *et al.*, 2000). Tem demonstrado ser ativo contra uma série de leveduras patogênicas (MASSURE *et al.*, 1997). Os mesmos autores compararam o efeito do voriconazol com o do itraconazol, sendo que o primeiro foi mais ativo sobre todos os isolados com exceção do *Rhizopus* spp. e comparando com o efeito da anfotericina B, o voriconazol foi mais efetivo contra *A. fumigatus*, *A. flavus* e *P. boydii* e foi mais ativo que a flucitosina em todas as espécies testadas. Estudo de aspergilose invasiva em pacientes humanos imunocomprometidos, transplantados e em casos de falha de outros antifúngicos, demonstrou que o voriconazol foi efetivo contra o *Aspergillus* spp e bem tolerado pelos pacientes (DENNING *et al.*, 2000). Brummer *et al.* (1998) estudaram a concentração e o tempo de ação do voriconazol e fluconazol frente ao *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans in vitro*, demonstrando que 0,2 mg/L de voriconazol causa efeito similar na diminuição da viabilidade das células do microrganismo que 2,0 mg/L de fluconazol, embora o número médio de células após 72 horas foram significativamente menores para o voriconazol do que do fluconazol (ASHBEE *et al.*, 2002). Recentemente o CLSI estabeleceu provisoriamente *breakpoints* para o voriconazol, classificando os isolados com CIMs menor que 1 µg/mL como sensíveis, e CIMs maior que 4 µg/mL, como resistentes.

2.4. Poliênicos

Os antibióticos poliênicos possuem um grande anel lactônico macrocíclico e semelhante aos macrolídios antibacterianos como a eritromicina, daí serem chamados macrolídios poliênicos, sendo a estrutura ativa o anel macrolídico com suas partes rígida lipofílica e flexível hidrofílica (SANDE & MANDELL, 1987).

2.4.1. Anfotericina B

A anfotericina B é um antibiótico poliênico e sua atividade antimicótica é, principalmente, dependente de sua ligação a uma fração esterol, primariamente o ergosterol, presente na membrana de fungos, interferindo, desta forma, na permeabilidade e nas funções de transporte. Forma poros na membrana, criando com a parte central hidrofílica da molécula um canal iônico transmembrana. Uma das conseqüências disso é a perda de íons K^+ intracelulares. Contudo, os efeitos da anfotericina B sobre a permeabilidade das membranas livres de esterol indicam que mecanismos adicionais também podem estar envolvidos (BENNETT, 2006). A anfotericina B exerce uma ação seletiva, ligando-se avidamente às membranas de fungos e de alguns protozoários e com menor avidéz às células de mamíferos, não havendo nenhuma ligação às bactérias. A especificidade relativa para fungos pode ser devido a maior avidéz da droga pelo ergosterol do que pelo colesterol, o principal esterol encontrado na membrana plasmática de células animais (BENNETT, 2006).

Quando administrada por via oral é pouco absorvida, razão pela qual só é administrada por esta via para infecções fúngicas do trato gastrointestinal. Nas infecções sistêmicas é complexada com desoxicolato de sódio e administrada na forma de suspensão por injeção intravenosa lenta. Outras preparações disponíveis para infusão intravenosa incluem a anfotericina complexada com lipídeos ou encapsulada em lipossomos. Além disso, pode ser administrada topicamente (SILVA, 2006).

2.4.2. Nistatina

A nistatina, isolada *do Streptomyces noursei*, pertence ao grupo dos antibióticos poliênicos. É levemente hidrosolúvel e atua lesando a membrana citoplasmática dos fungos sensíveis e sua ação pode ser tanto fungicida como fungistática, estando indicada como terapia tópica em micoses superficiais, de pele e mucosa, principalmente na candidose, sendo extremamente tóxica para uso parenteral. Nas doses terapêuticas, por via oral, a absorção pelo trato gastrointestinal é praticamente inexistente (SANDE & MANDELL, 1987). Em pequenos animais, cães e gatos, é utilizada no tratamento de otomicose por leveduras. Atualmente uma

nova formulação da nistatina, nistatina lipossomal, está sendo utilizada, com menos efeitos tóxicos que a fórmula original, causando menos hemólise como efeito colateral. A nistatina lipossomal tem largo espectro de ação atuando contra *Pseudallescheria* sp, *Alternaria* sp, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, várias espécies de *Candida* spp., *Cladosporium*, *Cryptococcus neoformans*, *Mucor* spp., *Penicilium* spp., *Rhizopus* sp., *Rhodotorulla* sp., *Sporothrix* sp, *Trichosporon* sp, entre outros, mas não foi ativa contra algumas cepas de *Fusarium* testadas. Contra leveduras resistentes *in vitro* a outros antifúngicos como fluconazol, itraconazol e anfotericina B ela também foi efetiva (BENNETT, 2006).

2.5. Óleos essenciais

Os vegetais têm ampla habilidade em sintetizar substâncias odoríferas, das quais a maioria são terpenóides, fenóis ou seus derivados oxigenados. Geralmente estes compostos são metabólitos secundários que servem como mecanismo de defesa para a planta contra ataques por microorganismos e herbívoros, além de atraírem insetos visando à polinização. Muitos constituintes dos vegetais originam o seu aroma, e algumas ervas e condimentos, historicamente utilizados em culinária, podem também ser empregados no campo da medicina (COWAN, 1999). Os óleos essenciais têm sido usados com amplas finalidades por muitos séculos; nas últimas décadas, numerosos estudos *in vitro* e *in vivo* foram realizados avaliando suas atividades antibacterianas e antifúngicas (TAMPIERI *et al.*, 2005).

Em sua grande maioria, os óleos essenciais consistem de misturas de hidrocarbonetos (terpenos, sesquiterpenos, entre outros) e compostos oxigenados (álcoois, ésteres, éteres, aldeídos, cetonas, lactonas, fenóis, éteres fenólicos, etc.). Quimicamente, estes compostos derivam de terpenóides, originados a partir do ácido mevalônico, ou de fenilpropanóides, provindos do ácido chiquímico (SIMÕES *et al.*, 1999). Os terpenos constituem-se como os principais responsáveis químicos pela utilização das plantas odoríferas em medicina, em aplicações químico-farmacêuticas e na culinária (DORMAN & DEANS, 2000).

Atualmente, grande número de microorganismos patogênicos ao homem e animais evidencia preocupante perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos existentes, demonstrando

alarmantes percentuais de resistência, sobretudo no ambiente hospitalar. O impacto da resistência é crítico quando as opções terapêuticas restringem-se a poucas drogas ou as opções são nulas. A indústria químico-farmacêutica busca soluções inovadoras e, neste contexto, metabólitos de vegetais, tradicionalmente utilizados na alimentação humana ou na medicina popular, revestem-se de importância, cujos potenciais requerem avaliações. No Brasil, a medicina popular emprega vegetais e/ou fitofármacos no tratamento de doenças tais como esquistossomose, leishmaniose, malária e infecções bacterianas e fúngicas (ALVES *et al.*, 2001).

2.5.1. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais

Alguns extratos de plantas e seus metabólitos secundários possuem efeitos inibitórios e letais dose-dependente sobre microorganismos tais como bactérias, fungos, vírus e protozoários (SMITH-PALMER *et al.*, 1998). Diversos óleos voláteis são conhecidos por possuírem propriedades antifúngicas e, desta forma, são potencialmente aplicáveis como agentes antimicóticos. Estudando a eficácia de óleos essenciais contra diferentes fungos patogênicos, Tampieri *et al.* (2005) determinaram a atividade *in vitro* de 16 óleos essenciais e seus componentes principais frente a isolados de *Candida albicans*. Os resultados dos constituintes puros dos óleos mostraram que o beta-felandreno foi o composto mais ativo entre os hidrocarbonetos monoterpênicos cíclicos; entre os fenóis foi o carvacrol; entre os álcoois de cadeia aberta, o mais ativo foi 1-decanol e, entre os aldeídos, o de maior atividade foi o trans-cinamaldeído. Também, observaram que óleos essenciais que possuem carvacrol, composto fenólico presente nos óleos de orégano (*Origanum vulgare*), lípia (*Lippia graveolens*) e tomilho (*Thymus vulgaris*), são ativos contra *C. albicans*. CHAMI *et al.* (2004) estudaram *in vivo* a ação terapêutica do carvacrol e do eugenol no tratamento de candidíase oral causada por *C. albicans* em ratos imunodeprimidos. Nesta pesquisa, os autores comprovaram a intensa atividade antifúngica do carvacrol e eugenol.

2.5.1.1. *Origanum vulgare*

O orégano (*Origanum vulgare*) atua como tônico geral, digestivo, espasmolítico, carminativo, expectorante, anti-séptico das vias respiratórias e emenagogo; topicamente é analgésico, cicatrizante, anti-séptico e antifúngico. Seu óleo essencial é rico em carvacrol, timol e terpineol (CÁCERES, 1999). Manohar et al (2001) avaliaram a atividade antifúngica do óleo essencial de orégano, demonstrando que este óleo tem efeito fungicida contra *C. albicans* e que o mesmo inibe a formação de tubo germinativo desta levedura, estrutura que se correlaciona com a capacidade desta espécie em invadir tecidos.

2.5.1.2. *Lippia graveolens*

Popularmente denominada orégano do México, é um vegetal utilizado como condimento, mas está documentado unicamente na Farmacopéia Mexicana. Ensaio de atividade antifúngica demonstram que seus extratos diclorometânico e etanólico são ativos contra *C. albicans*, *Aspergillus flavus*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum gypseum* e *Trichophyton rubrum*, e são inativos contra *Cryptococcus neoformans* (CÁCERES, 1999). A composição e atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *L. graveolens* coletada na Guatemala foram estudados e caracterizados por seu alto conteúdo de monoterpenos (70,0 a 87,2%). Importantes diferenças entre os constituintes majoritários foram encontradas, particularmente para carvacrol (0,2 a 44,8%), timol (7,4 a 18,1%) e p-cimeno (6,8 a 21,8%). Todos os óleos demonstraram significativa atividade contra todas as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas testadas, bem como contra os fungos. Contudo, óleos com maior conteúdo de carvacrol do que de timol, demonstraram maior atividade antimicrobiana (SALGUEIRO *et al.*, 2003).

2.5.1.3. *Cinnamomum zeylanicum*

O óleo essencial de canela (*Cinnamomum zeylanicum*), bem como a canela em pó, são empregados na preparação de alguns medicamentos na área farmacêutica. Esta planta apresenta propriedades estomáquica, carminativa e emenagoga (SOUZA *et al.*, 1991). Seu óleo essencial é rico em cinamaldeído, acompanhado do ácido cinâmico, eugenol e linalol (LORENZI & MATOS, 2002). Quale *et al.* (1996) descreveram a atividade antifúngica da canela em um estudo piloto, no qual cinco pacientes com HIV e candidíase oral receberam uma preparação de canela, disponível comercialmente, durante uma semana. Após o tratamento, três dos cinco pacientes evidenciaram redução no quadro de candidíase, o que sugere novos estudos objetivados a determinar o uso da canela na candidíase orofaríngea.

2.6. Tratamento da Malasseziose

Doenças cutâneas associadas a *Malassezia* são usualmente tratadas com antifúngicos tópicos, no entanto, lesões extensas ou doenças invasivas requerem terapia antifúngica sistêmica. Estudos *in vitro* demonstraram que *Malassezia* é, normalmente, suscetível aos antifúngicos azólicos clotrimazol, miconazol, cetoconazol e itraconazol (RICHET *et al.*, 1989; CLSI, 2008). Os agentes antifúngicos mais recentemente desenvolvidos, entre eles pozakonazol e voriconazol são altamente ativos contra *Malassezia* spp. (RICHET *et al.*, 1989; EUCAST, 2008; BARBANOJ *et al.*, 2005), mas os produtos comerciais contendo estes agentes são caros e não estão ainda licenciados para uso veterinário. Os poliênicos nistatina e natamicina (pimaricina), também são ativas contra *M. pachydermatis*, mas geralmente em maiores concentrações *in vitro* quando comparados com azóis (POWELL *et al.*, 1984; RUBIN *et al.*, 2002; KOGA *et al.*, 2008). Substâncias derivadas de plantas, tal como o óleo de “tea tree” (*Melaleuca Alternifólia*) também possui estudos demonstrando propriedades anti-*Malassezia* (WESELER *et al.*, 2002). A aplicação tópica de nistatina, tiabendazol, cetoconazol, miconazol ou clotrimazol é indicado para leveduras e outros fungos superficiais (MACHADO *et al.*, 2003). Embora a monoterapia com nistatina foi relatada como eficaz os

produtos atuais disponíveis para o tratamento de cães com otite externa associada a *M. pachydermatis*, contém agentes antifúngicos combinados com um agente antibacteriano e um glicocorticóide, refletindo a etiologia multi-fatorial dos casos (BOEKHOUT *et al.*, 2010).

Apesar do uso bastante amplo da combinação de produtos comercialmente disponíveis, surpreendentemente, há poucos dados de ensaios clínicos descrevendo a sua eficácia. A resposta ao tratamento eleito pode ser complicada se não for utilizada de forma adequada e requer a identificação e se possível, a eliminação de todos os fatores envolvidos na doença. As opções tradicionalmente utilizadas para o tratamento das afecções por *Malassezia* sp. incluem alguns derivados azólicos, a clorexidina ou o sulfeto de selênio e normalmente, nos casos de otopatias por *Malassezia* o tratamento tópico é suficiente. Na maioria dos casos, ou quando a erradicação da *Malassezia* é o principal objetivo, miconazol a 1% tem demonstrado ser bastante efetivo. Portanto, a seleção de medicamentos específicos deve ter como base a identificação do agente e a resposta orgânica ao processo nosológico (BOEKHOUT *et al.*, 2010).

3. METODOLOGIA

3.1. Local do experimento

As avaliações foram desenvolvidas no Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI), Departamento de Microbiologia e Parasitologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

3.2. Isolados de *M. pachydermatis*

Neste estudo foram utilizadas neste estudo 46 amostras de *M. pachydermatis* isoladas de cães. As amostras foram identificadas molecularmente por PCR-REA de acordo com Machado *et. al.* (2010). A distribuição das amostras bem como sua origem, podem ser visualizados no Quadro 1.

3.2.2. Isolados sensíveis ao fluconazol

Foram utilizadas 20 amostras de *M. pachydermatis*, isoladas de cães, provenientes do Hospital de Clínicas Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto alegre, Rio Grande do Sul e 26 amostras provenientes da Universidade Federal do Mato Grosso, Cuiabá, Mato Grosso.

3.2.3. Isolados resistentes ao fluconazol

A partir dos 46 isolados sensíveis, selecionou-se 30 amostras de *M. pachydermatis*, que foram submetidas à resistência ao fluconazol, conforme a técnica de Fekete-Forgacs *et al.* (2000). Os testes de susceptibilidade confirmaram a resistência ao fluconazol de acordo com as normas de padronização publicadas no documento M27-A3 do CLSI (2007). Os critérios de definição de suscetibilidade ao fluconazol foram aqueles sugeridos para *C. albicans* pelo CLSI (2007): isolados sensíveis (CIM $\leq 8\mu\text{g/mL}$); isolados sensíveis-dose-dependente (CIM entre 16 e $32\mu\text{g/mL}$); isolados resistentes (CIM $\geq 64\mu\text{g/mL}$).

Amostras	Procedência	Sinais clínicos
12AM	HCV-UFRGS	DAPP
22 CM	HCV-UFRGS	Atopia
37 CM	HCV-UFRGS	Dermatite seborréica
38 AM	HCV-UFRGS	Atopia
64 AM	HCV-UFRGS	Atopia
39 CM	HCV-UFRGS	Sarna demodéica
63 CM	HCV-UFRGS	Atopia
64 AM	HCV-UFRGS	Atopia
70 AM	HCV-UFRGS	Atopia
84 CM	HCV-UFRGS	Pênfigo
86 AM	HCV-UFRGS	Sarna demodéica
91 AM	HCV-UFRGS	Atopia
95 CM	HCV-UFRGS	Atopia
97 CM	HCV-UFRGS	Atopia
98 AM	HCV-UFRGS	Atopia
99 AM	HCV-UFRGS	Sem sinais clínicos
113 CM	HCV-UFRGS	Atopia
114 AM	HCV-UFRGS	Sem sinais clínicos
115 CM	HCV-UFRGS	DAPP
175 CM	HCV-UFRGS	Sem sinais clínicos

189	UFMT-Cuiabá	Otite
243	UFMT-Cuiabá	Otite
247	UFMT-Cuiabá	Otite
414	UFMT-Cuiabá	Otite
441	UFMT-Cuiabá	Otite
470	UFMT-Cuiabá	Otite
474	UFMT-Cuiabá	Otite
476	UFMT-Cuiabá	Otite
485	UFMT-Cuiabá	Otite
494	UFMT-Cuiabá	Otite
503	UFMT-Cuiabá	Otite
528	UFMT-Cuiabá	Otite
540	UFMT-Cuiabá	Otite
541	UFMT-Cuiabá	Otite
563	UFMT-Cuiabá	Otite
570	UFMT-Cuiabá	Otite
583	UFMT-Cuiabá	Otite
589	UFMT-Cuiabá	Otite
631	UFMT-Cuiabá	Otite
637	UFMT-Cuiabá	Otite
651	UFMT-Cuiabá	Otite
654	UFMT-Cuiabá	Otite
668	UFMT-Cuiabá	Otite
671	UFMT-Cuiabá	Otite
674	UFMT-Cuiabá	Otite
681	UFMT-Cuiabá	Otite

Quadro 1. Distribuição das 46 amostras de *M. pachydermatis* classificadas pela origem e sinasi clínicos dos cães.

3.3. Avaliação da susceptibilidade de *M. pachydermatis*

3.3.1. Avaliação da susceptibilidade pela técnica de microdiluição em caldo

A avaliação da susceptibilidade de *M. pachydermatis* foi realizada pelo método de microdiluição em caldo seguindo o protocolo internacional M27 – A3, para fungos leveduriformes, determinado pelo CLSI (2007), adaptado para *M. pachydermatis*.

3.3 1.1. Antifúngicos

Os seguintes antifúngicos foram utilizados no presente estudo: Voriconazol (VRZ, Pfizer Central Research, New York, NY), itraconazol (ITZ, Janssen Beerse, Belgium), clotrimazol (CTZ, Bayer Schering Pharma, New York, USA), nitrato de miconazol (MNZ, Labware), cetoconazol (KTC, Janssen Beerse, Belgium), fluconazol (FLC, Pfizer Central Research, New York, NY), anfotericina B (AMB, Bristol Myers Squibb Pharmaceuticals Research Institute, Wallingford, CT), Nistatina (Bristol-Myers Squibb Pharmaceuticals Research Institute, Wallingford, CT.).

3.3.1.1.1. Diluição dos antifúngicos

As soluções estoque dos fármacos foram preparadas de acordo com a solubilidade: exceto fluconazol, que foi diluído em água destilada estéril, todos os demais fármacos foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO). A partir das soluções estoque dos fármacos foram realizadas diluições em série em tubos de ensaio com capacidade para 10 mL, a fim de obter as concentrações desejadas de cada fármaco. Todas estas diluições foram realizadas em caldo RPMI 1640. A concentração final nos poços variou para: voriconazol (0,125 a 64 µg/mL), itraconazol (0,125 a 64 µg/mL), clotrimazol (0,125 a 64 µg/mL), nitrato de miconazol (0,25 a

32 µg/mL), cetoconazol (0,125 a 64 µg/mL), fluconazol (0,125 a 64 µg/mL), anfotericina B (0,25 a 32 µg/mL) e Nistatina (0,25 a 32 µg/mL).

3.3.1.2. Preparação dos inóculos

A partir de cultivos puros e com 48-72h de crescimento, no meio Dixon, obtinha-se uma suspensão em solução salina acrescida de Triton, a qual era ajustada em espectrofotômetro ($\lambda = 530$ nm) com transmitância de 90%; após esta correção, a suspensão era diluída (1:50) em água destilada estéril e novamente a 1:20 em caldo RPMI 1640 (Gibco Laboratories) tamponado com MOPS (Acros) e acrescido de glicose, conforme protocolo M27-A3 (CLSI, 2008).

3.3.1.3. Inoculação nas placas de microtitulação

Os testes foram realizados em microplacas de 96 cavidades. Foram utilizadas concentrações dos fármacos em diluição decrescente. Todos os testes foram feitos em triplicata, sendo que quando os resultados não coincidiram, os mesmos foram repetidos.

Foram colocadas alíquotas de 100µl das diferentes concentrações de cada fármaco (a partir de soluções 2x concentradas) nas cavidades da microplaca; um volume igual de inóculo foi adicionado a cada cavidade, resultando em uma concentração final de $0,5 \times 10^2$ UFC/mL. Para cada isolado de *M. pachydermatis* testado foram realizados controles positivos (200µl de inóculo) e negativos (200µl de RPMI).

3.3.1.4. Incubação

As microplacas foram incubadas em estufa com temperatura controlada, a 35°C, durante 48 horas.

3.3.1.5. Leitura dos testes

Depois deste período foi realizada a leitura dos testes, determinando-se a concentração inibitória mínima (CIM) de cada fármaco, considerando a menor concentração onde não houve crescimento leveduriforme. Foram adotados dois procedimentos para leitura das CIMs:

1º) Inibição parcial (CIM_P): corresponde a menor concentração capaz de inibir 50% do crescimento fúngico, quando comparado ao controle positivo.

2º) Inibição total (CIM_T): corresponde a menor concentração capaz de inibir completamente o crescimento fúngico.

De posse das CIMs de cada fármaco frente aos isolados estudados, determinou-se ainda a CIM₅₀ e a CIM₉₀ (concentração de antifúngico capaz de inibir o crescimento de 50 e 90% dos isolados, respectivamente).

3.3.2. Avaliação da susceptibilidade de *M. pachydermatis* pela técnica de Disco-difusão

A susceptibilidade dos isolados de *M. pachydermatis* em estudo para a técnica de disco-difusão foi realizada seguindo a metodologia proposta pelo documento M44-A (2004), proposto pelo CLSI.

3.3.2.1. Discos

Os discos impregnados com antifúngicos foram adquiridos através do Centro de Controle e Produtos para diagnóstico (CECON). A concentração dos discos foi para anfotericina-B (100µg), nistatina (100 U.I.), clotrimazol (50 µg), miconazol (50 µg), cetoconazol (50 µg), fluconazol (50 µg) e itraconazol (10 µg).

3.3.2.2. Preparação do meio

O meio utilizado no teste de disco-difusão foi o Agar Muller Hinton (MH) (Difco), sendo re-hidratado em água destilada esterilizada, na concentração de 38g/L, suplementado com 2% de glicose e 0,5µg/mL de azul de metileno, a seguir o meio era esterelizado em autoclave. Para realização do ensaio, alíquotas de 30 mL do meio foram distribuídas em placas de Petri (90mm), de modo a obter-se volume suficiente para 4mm de espessura.

3.3.2.3. Preparação do inóculo

Todos os isolados a serem testados tiveram um cultivo recente realizado em ágar Dixon, por técnica de esgotamento, sendo incubado em estufa a 35°C, por 24h. No dia do ensaio, o inóculo foi preparado selecionando-se cinco colônias distintas, de aproximadamente 1mm de diâmetro, que foram suspensas em 4mL de solução salina estéril (8,5 g/L NaCl; 0,085% salina) acrescida de 0,05% de Tween , em tubos de hemólise esterilizados. A suspensão da levedura foi agitada em vórtex, por 15 segundos, sendo sua turbidez ajustada na escala 0,5 de McFarland, correspondente a 90% de Transmitância a 530 nm, em espectrofotômetro. Ao final deste procedimento, obteve-se uma suspensão de leveduras com inóculo apresentando concentração variando entre $1-5 \times 10^6$ células/mL.

3.3.2.4. Ensaio de disco-difusão

Amostras de cada inóculo previamente preparados no dia do ensaio foram homogeneamente distribuídas sobre a superfície do meio MHA, com o auxílio de swab de algodão, semeando-se a levedura em três direções diferentes. As placas semeadas ficaram em descanso por cerca de 5-10 minutos, permitindo completa absorção do inóculo pela superfície do meio.

Posteriormente, os discos contendo os antifúngicos foram distribuídos de forma equidistante na superfície do meio de cultivo, utilizando-se pinça esterilizada. Para evitar prejuízos na interpretação das zonas de inibição de crescimento gerados pelos discos, os mesmos foram distribuídos na superfície do meio MHA, observando-se uma distância de 30 a 40mm entre eles e de 30mm entre cada disco e a borda da placa de Petri, não ultrapassando mais de três discos por placa. Cada disco foi pressionado, suavemente, sobre a superfície do ágar com a ponta da pinça esterilizada.

É importante ressaltar que os discos não foram movidos após a sua colocação, evitando assim prejuízos na leitura dos testes. As placas foram invertidas e incubadas por 48h a 35°C, em estufa microbiológica. Os isolados com crescimento insuficiente após 48h de incubação, permaneceram na estufa até 72h de incubação.

Foi incluída no ensaio uma cepa-controle de *Candida albicans* (ATCC - 28367). Para controle de qualidade dos testes foram utilizados os valores de inibição sugeridos pelo CLSI M44-A, para esta cepa, a saber: diâmetros de 28-30mm para fluconazol. Para os demais antifúngicos foi utilizado a variação dos diâmetros propostos pelo fabricante (CECON-Centro de Controle e Produtos para Diagnóstico).

3.3.2.5. Leitura e interpretação dos halos de inibição.

Para a realização da leitura dos halos de inibição, foram realizadas leituras após 24, 48 e 72h de incubação, para isolados de *M. pachydermatis* e 24-48h após incubação, para a cepa controle de *Candida albicans* (ATCC - 28367). A leitura dos halos foi realizada através da medida dos diâmetros dos halos de inibição gerados pelo teste de disco-difusão. Estes diâmetros foram medidos no limite do ponto de transição onde há decréscimo abrupto do padrão de crescimento dos isolados semeados no meio MHA. Posteriormente, os resultados qualitativos foram disponibilizados, sendo armazenados para análise dos dados obtidos.

3.3.2.6. Interpretação dos halos inibitórios: definição qualitativa de susceptibilidade de *M. pachydermatis* aos antifúngicos.

Consideraram-se para a análise qualitativa de susceptibilidade de *M. pachydermatis* aos antifúngicos, as dimensões dos diâmetros dos halos inibitórios gerados por cada uma das drogas. Utilizou-se como parâmetros os halos inibitórios gerados nos diferentes ensaios, os valores sugeridos pelo CLSI no documento M44-A (2004) para fluconazol, para os demais antifúngicos testados foi utilizado os dados sugeridos pelo fabricante (CECON, Centro de diagnóstico e Controle de produtos diagnósticos), *breakpoints*, apresentados no Quadro 2.

3.4. Avaliação da atividade de óleos essenciais frente a *Malassezia pachydermatis*

3.4.1. Óleos essenciais

No presente estudo, avaliou-se a atividade antifúngica de óleos essenciais obtidos dos seguintes condimentos: canela (*Cinnamomum zeylanicum* Breyn), orégano (*Origanum vulgare* L.) e orégano mexicano (*Lippia graveolens* HBK).

3.4.1.1. Origem dos óleos essenciais

O óleo essencial de orégano foi adquirido comercialmente da empresa Essential 7 (Roswell, NM, EUA). O óleo de orégano mexicano foi adquirido da empresa Agroindustrial Don Pablo (Chihuahua, Chih., México), e o de canela, da empresa Fuchs Gewurze do Brasil LTDA (Itupeva, SP, Brasil).

3.4.1.2. Análise dos constituintes químicos dos óleos essenciais

As análises qualitativa e semi-quantitativas dos principais constituintes químicos dos óleos essenciais foram realizadas através de duas técnicas: cromatografia gasosa (CG), de onde se obteve os índices de retenção (Índices de Kovats) dos compostos, e cromatografia gasosa acoplada em espectrômetro de massas (CG-EM), a qual forneceu os espectros de massas da maioria dos constituintes dos óleos essenciais. Os compostos presentes em concentração inferior a 0,5% não foram considerados para fins de identificação.

O índice de retenção (IR), que relaciona o tempo de retenção dos compostos ao tempo de retenção de uma série de hidrocarbonetos homólogos, permite uma boa comparação com os valores encontrados na literatura. Para obtenção do IR, foi empregada uma mistura de padrões de alcanos C8-C16, a qual foi injetada sob as mesmas condições de análises cromatográficas.

Para o cálculo do IR, utilizou-se a seguinte equação:

$$IR = 100 \left\{ \frac{t'R(A) - t'R(N)}{t'R(N+n) - t'R(N)} + N \right\}$$

Onde: IR é o índice de retenção; t'R (A) é o tempo de retenção do composto desconhecido; t'R (N) e t'R (N+n) são os tempos de retenção dos hidrocarbonetos de números de átomos de carbono (N) e (N+n) que são respectivamente, menor e maior do que o tempo de retenção da amostra; e N é o número de carbonos do hidrocarboneto de tempo de retenção inferior ao do composto a ser identificado.

A técnica de CG foi efetuada em Cromatógrafo Gasoso Varian CP-3800 equipado com detector de ionização de chama (FID), injetor tipo splitless e coluna capilar de sílica fundida SE-54 de 25m de comprimento x 0,25mm de diâmetro interno; a temperatura do injetor utilizada foi de 220°C, enquanto a aplicada ao detector foi de 250°C; o gás de arraste foi o Hidrogênio (H₂), 7,0 psi; e a rampa de temperatura iniciou em 50°C, atingindo a temperatura final de 250°C numa velocidade de 4°C/min. A técnica de cromatografia gasosa, para obtenção do IR das principais substâncias presentes nos óleos, foi realizado em colaboração com o Professor Doutor Ademir F. Morel do Departamento de Química desta universidade. Os espectros de massas dos compostos presentes nos óleos essenciais foram obtidos através de um Cromatógrafo Gasoso modelo Hewlett-Packard (HP) 6890 Series Plus+, equipado com

injetor automático split-splitless modelo HP 6890 Series GCAutoSampler Controller e detector seletivo de massas modelo HP 5973 MSD.

Antifúngicos	Símbolo	Concentração Disco	Zona de inibição	CIM µg/mL	I
Anfotericina B	AB	100µg	> 10 ≤ 10	< 1 ≥ 1	S S-DD/R
Nistatina	NY	100 U.I.	> 10 -- ≤ 10	-- -- --	S -- R
Clotrimazol	CTR	50 µg	> 20 20 – 10 < 10	< 1,56 1,56 - 6,4 > 6,4	S S-DD R
Miconazol	MCZ	50 µg	> 20 20 - 10 < 10	< 1,56 1,56 - 6,4 > 6,4	S S-DD R
Cetoconazol	KET	50 µg	> 20 20 - 10 < 10	< 1,56 1,56 - 6,4 > 6,4	S S-DD R
Fluconazol¹	FLU	25 µg	> 19 18 - 15 ≤ 14	≤ 8 16 - 32 ≥ 64	S S-DD R
Itraconazol¹	ICZ	10 µg	≥ 20 19 – 12 ≤ 11	≤ 0,125 0,25 – 0,5 ≥ 1	S S-DD R

Quadro 1. Pontos de corte indicados pelo fabricante dos discos e estabelecidos pelos protocolos M27-A3 e M44-A, para *C. albicans* adaptados para *M. pachydermatis*.

¹ Pontos de corte estabelecidos pelo protocolo M27-A3 e M44-A; S-DD, Sensibilidade Dose Dependente; S – Sensível; R – Resistente. S – sensível; S-DD, sensibilidade dose dependente; R– resistente; I- interpretação.

Foi utilizada coluna de sílica fundida HP 5 MS (30m de comprimento, 0,32mm de diâmetro interno e espessura do filme de 0,25µm) com 5% de fenil e 95% de metilsiloxano. O gás de arraste usado foi o Hélio (He) com 99,999% de pureza. O fluxo do gás He foi constante e de 2mL/min. A temperatura do injetor foi de 250°C. A temperatura inicial de programação do forno foi de 60°C por 1 min, Os parâmetros do espectrômetro de massas foram os seguintes: linha de transferência a 290°C, a energia de ionização por impacto de elétrons foi de 70 eV; a temperatura da fonte foi de 230°C, a temperatura do quadrupolo MS foi de 150°C, a voltagem do EM foi mantida 400V acima do autotune e/ou Quiktune. A técnica de CG-EM foi efetuada no Núcleo de após aquecendo 12°C/min até atingir 280°C, permanecendo nesta temperatura. A amostra (1µL) foi injetada no modo split, com razão 20/1. Análises e Pesquisas Orgânicas (NAPO) da Universidade Federal de Santa Maria. Os espectros de massas e os IRs obtidos foram comparados aos descritos na literatura (ADAMS, 2001).

3.4.2. Técnica utilizada

Empregou-se a microdiluição em caldo, de acordo com o documento M27-A3 (CLSI, 2008).

3.4.2.1. Microdiluição em caldo

A metodologia foi adaptada substituindo-se os antifúngicos, descritos no documento M27-A3, pelos óleos essenciais. Os testes foram realizados em triplicata em dias diferentes, utilizando placas de microtitulação com 96 poços.

3.4.2.2. Diluição dos óleos essenciais

Inicialmente, os óleos essenciais foram solubilizados em metanol originando uma solução estoque na concentração de 640 mg/mL. A partir desta, realizou-se uma diluição

1:100 em RPMI 1640, a fim de se eliminar qualquer possibilidade de interferência do metanol na atividade antifúngica. Desta forma, a maior concentração obtida de óleo essencial foi de 6,4 mg/mL, realizando-se, a partir desta, diluições seriadas a 1:2 também no meio RPMI 1640, obtendo-se as seguintes concentrações: 3,2 mg/mL, 1,6 mg/mL, 0,8 mg/mL, 0,4 mg/mL, 0,2 mg/mL, 0,1 mg/mL. Alíquotas de 100 µL das sete concentrações diferentes de cada óleo essencial foram dispensadas, seqüencialmente, nas placas de microtitulação, sendo que as concentrações finais de cada óleo essencial testado, após a adição do inóculo, foram: 3200 µg/mL, 1600 µg/mL, 800 µg/mL, 400 µg/mL, 200 µg/mL, 100µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL, 12,25 µg/mL e 6, 125 µg/mL.

3.4.2.3. Preparação dos inóculos

Realizou-se o cultivo das amostras de *M. pachydermatis* a serem testadas em ágar Dixon a fim de assegurar sua pureza e viabilidade. Os cultivos foram incubados a 35°C durante 24/48 horas antes da realização dos ensaios. Após esse período, uma suspensão inicial dos microorganismos foi obtida em água estéril ajustando-se a turvação em espectrofotômetro a 90% de transmitância ($\lambda = 530\text{nm}$). Esta turvação é equivalente ao tubo n° 0,5 da escala MacFarland, correspondendo a $1 \times 10^6 - 5 \times 10^6$ UFC/mL. As suspensões de trabalho (final) foram obtidas através de diluição a 1:50, em água estéril, da suspensão inicial, seguida por outra a 1:20 no caldo RPMI 1640. Após tais diluições, o inóculo passou a conter aproximadamente $1,0 \times 10^3$ a $5,0 \times 10^3$ UFC/mL. A concentração final do inóculo foi de $0,5 \times 10^3 - 2,5 \times 10^3$ UFC/mL, visto que, quando colocado na placa de microtitulação, o volume de caldo RPMI 1640 contendo o óleo essencial em estudo, provocou uma diluição 1:2.

3.4.2.4. Inoculação nas placas de microtitulação

Alíquotas de 100 µL do inóculo final foram adicionadas a cada poço das placas de microtitulação contendo 100 µL das sete diferentes concentrações dos óleos essenciais diluídos em RPMI 1640, obtendo-se assim a concentração final desejada de óleo essencial e

de inóculo. Cada série de testes incluiu um controle de crescimento positivo do inóculo no meio RPMI 1640, sem agente antifúngico, para avaliar a viabilidade dos organismos testados; também se fez uso de controle negativo, que além de indicar a presença de contaminação no meio de cultura utilizado, auxilia no controle da turbidez para a leitura das CIMs.

3.4.2.5. Incubação

As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35°C durante 48 horas.

3.4.2.6. Leitura dos testes

Após o período de incubação, os controles de crescimento foram observados e, a seguir, registrou-se a CIM (concentração inibitória mínima) que corresponde a menor concentração de óleo essencial capaz de inibir o crescimento fúngico.

Foram adotados dois procedimentos para leitura das CIMs:

1º) Inibição parcial (CIM_P): corresponde a menor concentração capaz de inibir 50% do crescimento fúngico, quando comparado ao controle positivo.

2º) Inibição total (CIM_T): corresponde a menor concentração capaz de inibir completamente o crescimento fúngico.

3.4.2.6.1. Concentração fungicida mínima (CFM)

Alíquotas de 20 µL dos poços onde não foi evidenciado crescimento fúngico foram repicadas em placas de Petri contendo ágar Sabouraud dextrose, sendo estas incubadas a 35°C durante 48h.

A menor concentração de óleo essencial cujo subcultivo não gerou crescimento no meio de cultura foi considerada como CFM.

3.5. Análise estatística

O teste “U” de Mann Whitney (SIEGEL, 1981) foi empregado para comparar duas amostras independentes, visando observar se os diferentes grupos em estudo apresentavam perfis de suscetibilidade semelhantes ou não, frente a determinado antifúngico e aos óleos essenciais. Este é um teste não-paramétrico, o qual foi escolhido porque os dados obtidos no presente estudo não satisfizeram as exigências de normalidade do teste “t” de Student. Quando o valor encontrado foi $p \geq 0,05$, a diferença é não significativa, ou seja, não houve diferença estatística entre os grupos analisados. Se o valor foi de $p < 0,01$, verifica-se então diferença significativa referente a 1%. Quando o valor foi de $p < 0,05$, houve diferença significativa a 5%. O nível mínimo de significância indica a probabilidade de erro que se arrisca quando se rejeita H_0 , ou seja, quando se diz que há diferença entre as duas médias.

CAPÍTULO 1

Avaliação do perfil de susceptibilidade de *Malassezia pachydermatis* a antifúngicos através da microdiluição em caldo e disco difusão.

CAPÍTULO 1

**Evaluation of the susceptibility profile of *Malassezia pachydermatis* against antifungals
by the broth microdilution and disk diffusion methods**

Artigo a ser submetido na revista American Journal of Veterinary research

Avaliação do perfil de susceptibilidade de *Malassezia pachydermatis* a antifúngicos através da microdiluição em caldo e disco difusão.

Resumo

Objetivo: O objetivo deste estudo foi comparar as técnicas de microdiluição em caldo e disco difusão para teste susceptibilidade de *M. pachydermatis* frente antifúngicos tópicos e sistêmicos.

Materiais e métodos: Foram utilizadas 46 amostras de *M. pachydermatis* isoladas de animais, com lesões de pele e otite externa. Os ensaios de disco difusão e microdiluição em caldo foram realizados de acordo com os protocolos M27-A3 (CLSI, 2008) e M44-A (CLSI, 2004).

Resultados: Os isolados testados através de microdiluição em caldo apresentaram susceptibilidade: anfotericina-B (100%), fluconazol (97,835%), cetoconazol (95,66%), itraconazol (93,48%) e ao miconazol e clotrimazol (86,96%). Pelo método de disco-difusão 97,83% dos isolados foram sensíveis a nistatina, 95,66% a anfotericina B e itraconazol, 91,32% ao cetoconazol, 89,14% ao fluconazol seguido de 86,96% sensíveis ao clotrimazol e miconazol. A concordância entre as duas técnicas foi maior para clotrimazol, miconazol e itraconazol (97,82%) seguido de anfotericina B, cetoconazol (95,65%) e fluconazol (91,31%).

Conclusão: A comparação entre as técnicas de microdiluição em caldo e disco-difusão para testes com *M. pachydermatis* evidenciou que os percentuais de concordância dependem do antifúngico e que os melhores percentuais de concordância foram observados com clotrimazol, itraconazol e miconazol.

Evaluation of the susceptibility profile of *Malassezia pachydermatis* against antifungals by the broth microdilution and disk diffusion methods

Abstract

Introduction: The aim of this study was to compare the susceptibility of *Malassezia pachydermatis* against topic and systemic antifungals by the broth microdilution and disk diffusion methods.

Materials and methods: 46 isolates of *M. pachydermatis*, obtained from animals with skin lesions and external otitis. Broth dilution and disk diffusion methods were performed according to CLSI protocols M27-A3 (2008) and M44-A (2004), respectively.

Results: The isolates assayed by the broth microdilution method showed susceptibility to: amphotericin B (100%), fluconazole (97.84%), ketoconazole (95.66%), itraconazole (93.48%) and to miconazole and clotrimazole (86.96%). The disk diffusion method showed susceptibility of 97.83% to nystatin, 95.66% to amphotericin B and itraconazole, 91.32% to cetoconazole, 89.14% to fluconazole and of 86.96% to clotrimazole and miconazole. The results of both techniques were alike to clotrimazole, miconazole and itraconazole (97.82%), followed by amphotericin B, ketoconazole (95.65%) and fluconazole (91.31%).

Conclusion: The comparison between the methods of broth microdilution and disk diffusion highlighted that the agreement percentages depend upon the antifungal tested and that the best percentages in this study were observed with clotrimazole, itraconazole and miconazole.

Introdução

Nos últimos anos, o arsenal antifúngico tem aumentado para atender a crescente demanda da terapêutica das doenças fúngicas incluindo-se o tratamento tópico das dermatomicoses¹. Se por um lado, temos hoje um maior número de opções de agentes antifúngicos, por outro, há crescente preocupação com o aumento da resistência aos mesmos. Diante deste fato, aumentou o interesse da comunidade científica no aperfeiçoamento de testes de susceptibilidade para auxiliar na escolha mais adequada na terapêutica antifúngica². O Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), padronizou protocolos de avaliação da susceptibilidade para fungos leveduriformes, entre elas o documento M27-A3 (2008)³ para testes de microdiluição em caldo e o M44-A (2004)⁴ para testes de difusão em ágar.

Os casos de insucesso terapêutico na malasseziose podem ser devidos ao diagnóstico inadequado, ou tratamentos a base de associações contendo antibacterianos e antifúngicos. Por outro lado na avaliação dos fatores responsáveis pelo insucesso terapêutico deve-se considerar a resistência clínica como também investigar a possibilidade de resistência aos antimicóticos. Os estudos de susceptibilidade de *M. pachydermatis* aos antifúngicos têm sido pouco explorados, sobretudo no âmbito da medicina veterinária^{5,6}. A diferenciação entre estes tipos de resistência é um tema complexo, o que aumenta a importância de estudos para reconhecer o perfil de sensibilidade de isolados clínicos frente aos agentes antifúngicos. Com a disponibilidade de novos antifúngicos e estratégias terapêuticas, a precoce detecção de resistência será mandatória no momento de eleger a terapêutica⁷.

Estes aspectos justificam a necessidade de estudos microbiológicos mais profundos sobre *M. pachydermatis*, que sirvam de suporte para a melhor avaliação e conduta terapêutica. Neste contexto este trabalho buscou avaliar a atividade de antifúngicos tópicos e sistêmicos,

frente a *M. pachydermatis* isoladas de animais, através das técnicas de disco difusão e microdiluição em caldo.

Materiais e métodos

Isolados e identificação

Foram utilizadas 46 amostras de *M. pachydermatis* isoladas de lesões de animais com otite externa e/ou dermatopatias, atendidos no setor de dermatologia do Hospital de Clínicas Veterinárias (HCV), da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. Foi utilizado um isolado de *C. albicans* ATCC 28367, como garantia do controle de qualidade.

Antifúngicos e Discos

Os antifúngicos foram previamente diluídos em concentração estoque, sendo o cetoconazol (16.0 µg/mL - 0.007µg/mL) (Bayer), itraconazol (16.0 µg/mL - 0.007µg/mL) (Janssen), clotrimazol (64.0 µg/mL - 0.125µg/mL) (Bayer), miconazol (64.0 µg/mL - 0.125µg/mL), nistatina (64.0 µg/mL - 0.125µg/mL) e anfotericina-B (16.0 µg/mL - 0.007µg/mL) (Bristol-Myers, CT) diluídos em DMSO (Merck) e o fluconazol (64.0 µg/mL - 0.125µg/mL) (Pfizer) diluídos em água. Os discos continham cetoconazol (50 µg), itraconazol (10 µg), clotrimazol (50 µg), miconazole (50 µg), nistatina (100 U.I.) e anfotericina-B (100 µg) e fluconazol (25 µg). Foram adquiridos diretamente com o distribuidor (CECON- Centro de Controle e Produtos para Diagnóstico, São Paulo, Brasil), mantidos a -20°C até o uso.

Microdiluição em caldo

A metodologia utilizada foi baseado no protocolo M27-A3 onde o inóculo partiu de uma suspensão do microorganismo em solução salina (0,85%) acrescida de Triton X100 (0,05%), cuja turvação era ajustada em espectrofotômetro ($\lambda=530\text{nm}$), equivalente a $1-5 \times 10^6$ UFC/mL. A seguir o inóculo era diluído a 1:50 em água destilada estéril e a 1:20 em caldo RPMI 1640 glicosado e tamponado. Placas de microtitulação contendo 100 μL de diferentes concentrações de antifúngicos diluídos em RPMI 1640 eram inoculadas com 100 μL do inóculo padronizado. As placas eram incubadas a 35°C/48h. As CIMs eram determinadas de acordo com o protocolo M27-A3 (CLSI, 2008). Os testes eram realizados em duplicata e repetidos uma segunda vez na ausência de resultados concordantes.

Disco-Difusão

Os inóculos foram preparados, através da suspensão inicial dos microorganismos em solução salina (0.085%) acrescida de triton X 100 (0.05%), e ajustados de acordo com o protocolo M44-A⁴. O inóculo foi homogeneamente distribuído com *swab* de algodão sobre a superfície do meio agar Muller Hinton (MH) (Difco), suplementado com 2% de glicose e 0,05 $\mu\text{g/mL}$ de azul de metileno. Posteriormente, os discos, foram distribuídos de forma equidistante na superfície do meio. As placas foram incubadas por 48 h / 35°C. A determinação da susceptibilidade foi realizada pela leitura da medida do diâmetro (mm) dos halos de inibição.

Interpretação dos resultados

A interpretação dos resultados foi definida através dos pontos de corte estabelecidos para *C. albicans* nos protocolos M27-A3 e M44-A, para a interpretação dos resultados gerados pelo método de disco-difusão para antifúngicos poliênicos e azólicos, com exceção do fluconazol (M44-A, 2004) e para a microdiluição em caldo com poliênicos, foram

considerados os pontos de corte sugeridos pelo fabricante dos discos (CECON, Brasil). A comparação entre as técnicas foi realizada comparando-se as interpretações (Susceptível, intermediário e /ou resistente) para os referentes métodos: disco-difusão e Microdiluição em caldo, e o grau de concordância entre as duas diferentes técnicas (Tabela 1.).

Resultados

Com base na técnica de microdiluição em caldo as CIMs variaram entre 0.01 e 4 $\mu\text{g/mL}$, com médias geométricas variando entre 0.017 a 0.431 $\mu\text{g/mL}$. As CIM₅₀ obtidas foram: nistatina (0.03 $\mu\text{g/mL}$), anfotericina B (0.25 $\mu\text{g/mL}$), clotrimazol (0.01 $\mu\text{g/mL}$), miconazol (1 $\mu\text{g/mL}$), cetoconazol (0.01 $\mu\text{g/mL}$), fluconazol (0.01 $\mu\text{g/mL}$) e itraconazol (0.01 $\mu\text{g/mL}$). As CIM₉₀ foram de: itraconazol (0.25 $\mu\text{g/mL}$), anfotericina B e cetoconazol (0.5 $\mu\text{g/mL}$), nistatina e miconazol (1 $\mu\text{g/mL}$) e para fluconazol e clotrimazol (2 $\mu\text{g/mL}$).

Os resultados gerados pela técnica de disco-difusão apresentaram pequenas variações nas médias geométricas dos halos de inibição. Para antifúngicos azólicos a média geométrica dos diâmetros foi de 24,371 mm e para os poliênicos 14,319 mm. Os halos inibitórios para 90% dos isolados foram: nistatina (15 mm), anfotericina B (21 mm), clotrimazol, cetoconazol e itraconazol (30 mm), miconazol (25 mm) e fluconazol (40 mm). Foi detectada a resistência clínica de um isolado, por ambos os métodos utilizados, de *M. pachydermatis* de otite canina, aos antifúngicos azólicos fluconazol (8 $\mu\text{g/mL}$; 9 mm), clotrimazol (16 $\mu\text{g/mL}$; 9 mm), miconazol (8 $\mu\text{g/mL}$; 8 mm) e itraconazol (1 $\mu\text{g/mL}$; 10 mm)., nas técnicas de microdiluição em caldo e disco-difusão. A concordância entre o método de disco-difusão e microdiluição em caldo, demonstrou uma boa correlação entre ambas, para diferentes antifúngicos testados (Tabela 1).

Discussão

Os testes de susceptibilidade *in vitro* aos antifúngicos são ferramentas que buscam reconhecer antecipadamente qual a provável resposta do microorganismo a um regime terapêutico padrão; para tanto utiliza concentrações correspondentes àquelas obtidas na corrente sanguínea resultando de uma dose média. Os testes de susceptibilidade *in vitro* permitem reconhecer espécies ou cepas primariamente resistentes, bem como a resistência secundária que pode emergir durante a antifungioterapia⁹.

Para *M. pachydermatis* não há técnicas de susceptibilidade padronizadas, todavia, a necessidade de reconhecer variações de susceptibilidade nesta espécie é clinicamente relevante¹⁰. Assim, o presente estudo foi embasado na técnica M27-A3 nos testes de microdiluição em caldo³ e na técnica M44-A para os testes de disco-difusão⁴. Na ausência de *breakpoints* específicos para *M. pachydermatis* utilizamos aqueles estabelecidos para *Candida* spp. Numa tentativa de estabelecer diferenças e similaridades próprias de *M. pachydermatis*.

Até o presente, as metodologias de testes de susceptibilidade através do método de microdiluição em caldo empregados para a maioria das espécies do gênero *Malassezia*, têm variado significativamente, do padrão proposto pelo CLSI. A adição de uma fonte de ácidos graxos de cadeia longa como o Tween ao RPMI 1640, tem por objetivo favorecer o crescimento de espécies do gênero *Malassezia* lipidiodependentes, metodologia proposta por Velegraki *et al.*, (2004)¹¹.

Em nosso estudo não foi necessário o acréscimo de uma fonte de lipídios, pois faz saber-se que *M. pachydermatis* é a única espécie do gênero não lipidiodependente. A leitura dos testes não foi prejudicada, pois se utilizou o meio padronizado pelo CLSI, RPMI 1640 glicosado e tamponado, eliminando assim interferentes. Diferente de outros autores que

utilizaram o RPMI 1640 modificado contendo uma fonte de lipídios, para a espécie *M. pachydermatis*^{7,11, 12, 13, 14, 15, 17}. As CIMs obtidas pela microdiluição em caldo são resultados quantitativos de incontestável valor em situações de fungemias. Por outro lado, na prática clínica veterinária, onde a malasseziose constitui-se numa micose superficial, a determinação das CIMs é pouco indicada, podendo ser vantajosamente substituído pelos testes de disco-difusão. Na disco-difusão, os halos de inibição são categorias correspondendo a definições como sensível, intermediário ou resistente. Neste estudo buscou-se comparar os resultados destas duas técnicas frente *M. pachydermatis*.

A adição de antifúngicos tópicos como miconazol, clotrimazol e nistatina nos testes, justificam-se pelo fato de que a maior parte das formulações comerciais de uso veterinário para tratamento da malasseziose superficial contém estes antifúngicos e há uma carência de estudos enfocando o perfil de susceptibilidade de *M. pachydermatis* a estes agentes antimicóticos¹⁰.

Os testes de microdiluição em caldo evidenciaram em ordem decrescente de susceptibilidade: anfotericina B (100%) seguida de fluconazol (97.83%), cetoconazol (95.66%), itraconazol (93.47%), itraconazol (93.47%), clotrimazol (86.96%) e miconazol (86.96%) e para o método de disco-difusão: nistatina (97.83%); itraconazol e anfotericina B (95.60%), cetoconazol (91.33%); fluconazol (89,14%), miconazol e clotrimazol (86,96%). Apesar do grau de concordância entre as técnicas para os isolados de *M. pachydermatis*, serem semelhantes, nota-se que a técnica de disco-difusão é mais sensível na detecção de isolados resistentes aos antifúngicos tópicos e sistêmicos testados (Tabela 1). Este dado é importante uma vez que a escolha do teste pode ser essencial na escolha do antifúngico ideal, garantindo desta forma o sucesso terapêutico das infecções causadas por *M. pachydermatis*.

Estudos realizados por Velegraki *et al.*(2004)¹¹, através do método de microdiluição em caldo, com um isolado de *M. pachydermatis* apresentaram CIMs para itraconazol (0,06 µg/mL), fluconazol (16 µg/mL), cetoconazol (0,06 µg/mL) e para anfotericina-B (0,12 µg/mL). Um estudo adicional, utilizando a mesma metodologia, através do método de microdiluição em caldo utilizando RPMI 1640 acrescido de uma fonte lipídica, evidenciou sensibilidade em 100% dos isolados ao cetoconazol, itraconazol, fluconazol e anfotericina B

15.

Gupta *et al.* (1999)¹⁷ ao avaliarem a susceptibilidade de 4 isolados de *Malassezia* spp., frente antifúngicos azólicos evidenciaram CIMs inferiores a 0,03 µg/mL para cetoconazol e itraconazol. Faergemann *et al.*, (2006)¹⁶ estudaram a susceptibilidade de uma cepa padrão de *M. pachydermatis* frente fluconazol, com CIM inferior a 0,02 µg/mL. Em nosso estudo, evidenciou-se para 90% dos isolados CIMs para anfotericina B ($\leq 0,25$ µg/mL), nistatina ($\leq 0,03$ µg/mL), miconazol (≤ 1 µg/mL) e para clotrimazol, cetoconazol, fluconazol e itraconazol ($\leq 0,01$ µg/mL). Brito *et al.* (2009)¹³, ao estudarem 20 isolados de *M. pachydermatis*, encontraram CIMs para cetoconazol ($< 0,03$ µg/mL, n=20), itraconazol ($\leq 0,03$, n=19), fluconazol (8, n=20) e anfotericina B (0,25, n=20).

As técnicas de microdiluição e disco-difusão detectaram a presença de um isolado, de otite canina, resistente ao fluconazol (CIM: 8 µg/mL) (12 mm), itraconazol (CIM:1 µg/mL) (9 mm), miconazol (CIM:8 µg/mL) (9 mm) e clotrimazol (CIM:16 µg/mL) (8 mm). Dados semelhantes ao encontrado por Nijima *et al.*,(2010)¹², que detectaram nas CIMs, através da microdiluição em caldo e ETEST[®], um isolado resistente aos antifúngicos azólicos cetoconazol (CIM:1 µg/mL; 2 µg/mL) e itraconazol (CIM:2 µg/mL; 8 µg/mL). Outro estudo realizado com 17 amostras de *M. pachydermatis*, ao comparar as técnicas de microdiluição em caldo e ETEST[®], encontrou 11,8% dos isolados resistentes ao cetoconazol (Nascente *et al.*, 2009)⁷.

Um importante estudo realizado por Piérard *et al.*, (2003)¹⁹, detectou em cobaias com malasseziose cutânea induzida, após duas semanas de tratamento com itraconazol, apenas 19.6% de inibição do crescimento de *M. pachydermatis*, em contrapartida para as demais espécies do gênero a média de inibição do crescimento foi de 44,96%. Este estudo demonstrou que existem diferenças significativas no perfil de susceptibilidade entre as espécies do gênero *Malassezia* spp.

A dificuldade na interpretação dos resultados gerados pelos métodos de microdiluição em caldo e disco-difusão deve-se principalmente ao fato de não existir uma técnica padronizada e *breakpoints* estabelecidos para esta espécie. Os dados gerados por estudos anteriores a este estabeleceram metodologias diferenciadas à proposta pelo CLSI, onde o meio de cultivo, a temperatura e o tempo de incubação foram alterados, diminuindo a confiabilidade e possibilidade de comparação dos resultados gerados por estes trabalhos com os nossos. Por este motivo a interpretação de nossos resultados, foi baseada nos pontos de corte propostos pelo CLSI para espécies do gênero *Candida* spp.

Apesar de 97,82% dos isolados serem sensíveis aos antifúngicos, a detecção de um isolado de *M. pachydermatis* resistente para diferentes azólicos testados, alerta para a necessidade de padronização de *breakpoints* para esta espécie, para triagem laboratorial da sensibilidade deste fungo a antifúngicos, pois se faz necessário que estudos de vigilância epidemiológica sejam realizados continuamente para evidenciar mudanças no perfil microbiológico em função de práticas terapêuticas na malasseziose.

Agradecimentos

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos ao primeiro autor, modalidade GM, mestrado. Ao Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI, Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil), pela orientação e condições oferecidas para o estudo.

Aos Doutores Mauro Luís da Silva Machado (Médico veterinário do hospital de Clínicas Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil) e Valéria Dutra (Universidade Federal do Mato Grosso, Cuiabá, Mato grosso, Brasil), pelo isolamento e identificação molecular das amostras.

Conflito de interesse

Os autores não declararam nenhum conflito de interesse.

Referências

1. Nimura L, Niwano Y, S Yashiduka, *et al.* Comparison of *in vitro* antifungal activities of topical antimicrotics launched in 1990 in Japan Intern J Antimicrob Agents 2001; 18: 173-178.
2. Boekhout T, Guého E, P Mayser, *et al.* *Malassezia* and the Skin. Science and clinical Practice. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1ª edição, 2010. 229-247.
3. CLSI- Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. Approved Guideline M27 – A3, 2007.
4. CLSI- Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for antifungal Disk Diffusion susceptibility testing of yeast, informational supplement. Approved Guideline, M44 – A, 2004.
5. Nascente OS, Nobre MO, ARM Meinerz, *et al.* Ocorrência de *Malassezia pachydermatis* em cães e gatos. Rev. Bras. Med. Vet., 2004, 26: 79-82.
6. Fera MT, Camera EL and Sarro A. New triazoles and echinocandins: mode of action, *in vitro* activity and mechanisms of resistance. Expert Rev. Anti Infect. Ther. 2009, 7: 981-998.

7. Nascente PS, Cleff MB, ARM Meinerz, *et al.* Comparison of the broth microdilution technique and ETEST to ketoconazole front *Malassezia pachydermatis*. *Braz. J. Vet. Res. Anim.Sci.* 2009, 46: 222-227.
8. Sugita T, Taqkashima M, M kodama, *et al.* Description of a new yeast species, *Malassezia japónica*, and its detection in patientes with atopic dermatitis and healthy subjects. *J. Clin. Microbiol.*, 2003, 41: 4695-4699.
9. Dimopoulos G, Velegraki A, Falagas ME *et. al.* A 10-year survey on antifungal susceptibility of candidemia isolates from intensive care unit patients in Greece. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53: 1242–1244.
10. Boekhout T, Kellermann EG, Mayser P, *et. al.* *Malassezia* and the Skin Science and Clincial Practice. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, DOI: 10.1007/978-3-642-03616-3, 2010: 229-252.
11. Velegraki A, Alexopoulos EC, Kritikou S, *et. al.* Use of fatty acid RPMI 1640 media for testing susceptibilities of eight *Malassezia* species to the new triazole posaconazole and to six established antifungal agents by a modified NCCLS M27–A2 microdilution method and Etest. *J Clin Microbiol*, 2004, 42:3589–3593.
12. Nijima M, Kano R, Nagata M, *et. al.* Na azole-resistance isolate of *Malassezia pachydermatis*. *Veterinary Microbiology*, 2010, DOI: 10.1016/j. vetmic. 2010.10.010.
13. Brito EHS, Fontenelle ROS, Brilhante RSN, *et. al.* The anatomical distribution and antimicrobial susceptibility of yeast species from healthy dogs. *The Veterinary Journal.* 2009, v. 182, p. 320-326.
14. Prado MR, Brito EHS, Brilhante RSN, *et. al.* Subculture on potato dextrose agar as a complement to the broth microdilution assay for *Malassezia pachydermatis*. *Journal of Microbiological Methods*, 2008, v. 75, p. 341-343.
15. Brito, EHS, Fontenelle, ROS, Brilhante, RSN, *et. al.* Phenotypic characterization and

- in vitro* antifungal sensitivity of *Candida* spp. and *Malassezia pachydermatis* strains from dogs. The Veterinary Journal. 2007, 174: 147-53.
16. Faergeman J, Ausma J and Borgers M. *In vitro* activity of R126638 and Ketoconazole against *Malassezia* Species. Acta Derm Venerreol, 2006, v. 86, p. 312-315.
 17. Gupta AK, Kohll Y, J Faergemann, *et al.* *In vitro* susceptibility of seven *Malassezia* species to ketoconazole, voriconazole, itraconazole and terbinafíne. Br J Dermatol, 2000, 142: 758-765.
 18. Piérard, GE, Arrese, JE & PC Franchimont. Itraconazolee corneofungimetry bioassay on *Malassezia* species. Mycoses. 2003, 47: 418-21.
 19. Nakano Y, Wada W, H Tani, *et al.* Effects of β - Thujaplicin on Ani-*Malassezia pachydermatis* remedy for Canine Otitis Externa. J. Vet. Med. Sci. 2005, 67: 1243-47.

Tabela 1. Comparação da susceptibilidade de isolados de *Malassezia pachydermatis* frente antifúngicos tópicos e sistêmicos, através das técnicas de disco-difusão e microdiluição em caldo.

ATF	Microdiluição em caldo						Disco-difusão						Concordância entre técnicas %
	S	%	SDD	%	R	%	S	%	SDD	%	R	%	
AB^{a, c}	46	100	-	-	-	-	44	95.66	2	4.34	-	-	95.65
NY[*]	-	-	-	-	-	-	45	97.83	-	-	1	2.17	-
CTZ^{a, c}	40	86.96	5	10.86	1	2.17	40	86.96	5	10.86	1	2.17	97.82
MCZ^{a, c}	40	86.96	5	10.86	1	2.17	40	86.96	5	13.04	1	2.17	97.82
KTZ^{a, c}	44	95.66	2	4.34	-	-	42	91.32	4	8.69	-	-	95.65
FLZ^{a, b}	45	97,83	-	-	1	2.17	41	89.14	3	6.52	2	4.34	91.31
ITZ^{a, c}	43	93.48	2	4.34	1	2.17	44	95.66	1	2.17	1	2.17	97.82

**Breakpoints* não estabelecidos para microdiluição em caldo; ATF – Antifúngicos; AB- anfotericina B; NY- nistatina; CTZ- clotrimazol; MCZ- miconazol; KTZ- cetoconazol; FLZ- fluconazol; ITZ- itraconazol; S – sensível; S-DD, sensibilidade dose dependente; R- resistente; ^a *breakpoints* estabelecidos pelo protocolo M27-A3; ^b *breakpoints* estabelecidos pelo protocolo M44-A; ^c *breakpoints* estabelecidos pelo fabricante (CECON).

Tabela suplementar (não será publicada)

Tabela 1. Valores de CIM₅₀ e CIM₉₀ para o teste de microdiluição (M27-A3).

Antifúngicos	Microdiluição em caldo	
	CIM₅₀ (µg/mL)	CIM₉₀ (µg/mL)
Nistatina	0,03	1
Anfotericina-B	0,25	0,5
Clotrimazol	0,01	2
Miconazol	1	4
Cetoconazol	0,03	4
Fluconazol	0,01	4
Itraconazol	0,01	0,03

CIM₅₀- Menor concentração de antifúngico capaz de inibir 50% dos isolados de *M. pachydermatis*, CIM₉₀- Menor concentração de antifúngico capaz de inibir 90% dos isolados de *M. pachydermatis*.

CAPÍTULO 2

Atividade *in vitro* de isolados do fungo *Malassezia pachydermatis* sensíveis e resistentes ao fluconazol frente a antifúngicos azólicos.

CAPÍTULO 2

***In vitro* activity of fluconazole-sensitive and resistant isolates of the fungus *Malassezia pachydermatis* against azolic antifungals.**

Artigo submetido ao *Veterinary Microbiology*

***In vitro* susceptibility of fluconazole-susceptible and -resistant isolates of *Malassezia pachydermatis* against azoles**

Jesus, F.P.K.^a, Lautert, C.^a, Zanette, R.A.^a, Mahl, D.L.^a, Azevedo, M.I.^a, Machado M.L.S.^b, Dutra V.^b, Botton, S.A.^{a,c}, Alves, S.H.^a, Santurio, J.M.^{a,*}

^aLaboratório de Pesquisas Micológicas, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

^bDepartamento de Veterinária Preventiva – Universidade Federal do Mato Grosso, Cuiabá, MT, Brazil

^cDepartamento de Medicina Veterinária Preventiva, UFSM, Santa Maria, RS, Brazil.

*Corresponding author: santurio@smail.ufsm.br

Address: Campus UFSM, Prédio 20, Sala 4139, Postal Code 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil. Tel/fax: +55 55 32208906

In vitro susceptibility of fluconazole-susceptible and -resistant isolates of *Malassezia pachydermatis* against azoles

Abstract

Objectives: The aims of this study were to evaluate the *in vitro* activity of FLZ (Fluconazole), KTZ (Ketoconazole), ITZ (Itraconazole), and VRZ (Voriconazole); as well to study the cross-resistant among azoles against *M. pachydermatis* wild clinical isolates and to the same isolates which were *in vitro* induced fluconazole-resistance.

Methods: Two techniques were used: 1) a broth microdilution method based on protocol M27-A3 of the Clinical and Laboratory Standards Institute to determine the minimum inhibitory concentration (MIC); 2) the Fekete-Forgács method to induce fluconazole resistance *in vitro*. The isolates were divided into two groups: group 1 corresponded to the clinical isolates that were susceptible to fluconazole ($n=30$) and group 2 formed by the same isolates showing fluconazole resistance which were induced *in vitro* ($n=30$).

Results: The groups showed differences in susceptibility ($p < 0.001$). The isolates from group 1 were susceptible to azoles: KTZ (MIC 0.01-1.0 $\mu\text{g/mL}$), ITZ (MIC 0.01-1.0 $\mu\text{g/mL}$), VRZ (MIC 0.01-4.0 $\mu\text{g/mL}$), and FLZ (MIC 0.01-4.0 $\mu\text{g/mL}$); the isolates from group 2 demonstrated a wider range of MICs to azoles: ITZ (MIC 0.06-64.0 $\mu\text{g/mL}$), KTZ (MIC 0.25-32.0 $\mu\text{g/mL}$), VRZ (MIC 2.0-128.0 $\mu\text{g/mL}$), and FLZ (MIC 64.0-128.0 $\mu\text{g/mL}$).

Conclusions: It was demonstrated that *M. pachydermatis* FLZ-resistant isolates show cross-resistance with other azoles, reinforcing the importance of susceptibility tests as a guide to the therapeutic prescription of antifungals in medical and veterinary mycology.

Keywords: Malasseziosis; antifungal; azoles cross-resistance; microdilution.

Introduction

Malassezia pachydermatis is considered part of the microbiota of both the ear canal and the coats of dogs, cats and other species of domestic and wild animals (Chen and Hill, 2005). This species has been associated with clinical cases of external otitis and dermatitis in animals, which may be either localized or generalized. The proliferation of this fungus is associated with disturbances in the local or systemic immune system (Guillot and Bond, 1999). Although this species is not a threat to the life of the animal, it can cause pruritus when it becomes pathogenic (Machado *et al.*, 2010). In addition to azole derivatives, the treatment options for *M. pachydermatis* infection include chlorhexidine and selenium sulphide. In most cases of ear diseases caused by *M. pachydermatis*, topical treatment is effective, and oral treatment should only be recommended after a recurrence. Recent studies have demonstrated the susceptibility of the genus *Malassezia* to azoles (Ashbee, 2007; Brito *et al.*, 2007; Gupta *et al.*, 2000; Hammer *et al.*, 2000; Miranda *et al.*, 2007; Nakano *et al.*, 2005; Piérard *et al.*, 2004; Sickafoose *et al.*, 2010); however, strains which were resistant to azoles were previously characterized by Nijima *et al.* (2010).

In this study, we evaluated the *in vitro* antifungal activity of fluconazole, ketoconazole, itraconazole, and voriconazole against clinical isolates of *M. pachydermatis* known as susceptible ($n=30$) or resistant ($n=30$) to fluconazole.

Materials and methods

Fungi

Two groups of *M. pachydermatis* isolates were studied. The first group included 30 isolates that were previously characterized as susceptible to fluconazole and were isolated from clinical cases of animals with external otitis and dermatitis. The second group included

isolates generated from the susceptible group through the *in vitro* resistance induction method described by Fekete-Forgács *et al.* (2000). The standard strain *C. albicans* (ATCC 28367) was employed as a positive control for the tests. *M. pachydermatis* isolates were maintained in Dixon's broth containing 20% glycerol and stored at -80°C. To perform the tests, the isolates were subcultured onto Dixon's media and incubated at 37°C for 48 hours. Each isolate was previously identified as *M. pachydermatis* in the study performed by Machado *et al.* (2010) following molecular methods.

In vitro Antifungal Activity

The antifungals were previously diluted to obtain the stock solutions: ketoconazole (16.0-0.007 µg/mL), itraconazole (16.0-0.007 µg/mL) and voriconazole (64.0-0.125 µg/mL) (Janssen Research Foundation) were diluted in Dimethyl sulfoxide (DMSO; Wako Pure Chemicals), and fluconazole (64.0-0.125 µg/mL) (Pfizer) was diluted in sterile water. The MICs were determined using a microdilution technique based on protocol M27-A3 CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2007). The medium employed was RPMI 1640 broth; it was buffered with MOPS and added of dextrose 2%. The inoculum was standardized by suspending the yeasts (five colonies grown on Dixon's media) in saline solution containing Triton-X 100 (0.05%) and adjusted according to protocol M27-A3. All tests were performed in triplicate and each series included a positive (diluted inoculum working solution) and a negative (RPMI 1640 alone) control for growth. The plates were incubated at 37°C for 48 hours. After the incubation period, we observed the growth controls and MICs were read.

Statistical Analysis

The Mann-Whitney U test was used to compare two independent samples in order to evaluate the different groups (susceptible *versus* resistant isolates).

Results

M. pachydermatis showed a well development on RPMI 1640 broth employed in the susceptibility tests. The yeasts which their MICs increased after the subcultures with FLZ were characterized as FLZ-resistant isolates. The variation and geometric means of the MICs ($\mu\text{g/mL}$) and the MIC₅₀ and MIC₉₀ ($\mu\text{g/mL}$) of the two studied groups are presented in Table 1. *Candida albicans* ATCC 28367, showed the following MICs: KTZ ($\leq 0.01 \mu\text{g/mL}$), ITZ ($\leq 0.007 \mu\text{g/mL}$), FLZ ($\leq 0.5 \mu\text{g/mL}$), and VRZ ($\leq 0.01 \mu\text{g/mL}$), indicating that the tests were correct. The MIC results for the isolates in group 1 (fluconazole-susceptible) showed that 100% ($n=30$) of the isolates were susceptible to fluconazole and ketoconazole, 83% ($n=25$) were susceptible to voriconazole and 80% ($n=24$) were susceptible to itraconazole. Since there are not breakpoints nor standardized techniques for susceptibility tests with *M. pachydermatis*, we employed the breakpoints ($\mu\text{g/mL}$) established by the CLSI (2007) guideline for *Candida* spp. The CLSI suggests that strains which are sensitive to fluconazole should demonstrate MICs $\leq 8.0 \mu\text{g/mL}$. The isolates in group 1 had MICs between $0.01 \mu\text{g/mL}$ and $4.0 \mu\text{g/mL}$ and they were considered resistant when the MICs were $\geq 64.0 \mu\text{g/mL}$. All of the isolates subcultured with fluconazole according to Fekete-Forgács method acquired resistance to FLZ ($n=30$) ($p < 0.001$) and the fluconazole MICs in group 2 ranging from $64.0 \mu\text{g/mL}$ to $128.0 \mu\text{g/mL}$. Based on the breakpoints established for *Candida* spp to itraconazole our isolates were considered itraconazole-sensitive and itraconazole-resistant if they demonstrated MICs $\leq 0.125 \mu\text{g/mL}$ and $\geq 1.0 \mu\text{g/mL}$. The MICs to itraconazole were $0.01 \mu\text{g/mL}$ to $4.0 \mu\text{g/mL}$ in group 1 and $0.06 \mu\text{g/mL}$ to $64.0 \mu\text{g/mL}$ in group 2 ($p < 0.001$).

Differences were observed in the comparisons established for the susceptibility of *M. pachydermatis* to voriconazole ($p < 0.001$); the MICs varied from $0.01 \mu\text{g/mL}$ to $4.0 \mu\text{g/mL}$ for the isolates in group 1 and for isolates in group 2 varied from $2.0 \mu\text{g/mL}$ to $128.0 \mu\text{g/mL}$. The breakpoints for *Candida* spp. suggested by protocol M27-A3 of the CLSI are ≤ 1.0

$\mu\text{g}/\text{mL}$ for sensitive strains and $\geq 4.0 \mu\text{g}/\text{mL}$ for resistant strains. The susceptibility tests of the group 2 isolates to KTZ, ITZ and VRZ revealed 100% of resistance to fluconazole.

Discussion

In the last years the *in vitro* susceptibility tests have been standardized for the main fungi isolated from systemic mycosis; however a lot of species still require these studies. These techniques are recommended for selecting the most effective antifungal agents for the treatment of fungemias and localized or generalized mycoses which involve risk of death. In this area, the studies with *M. pachydermatis* are incipient.

The azoles have been frequently used in veterinary medicine to treat fungal infections. A good clinical response to fluconazole was observed in patients with extensive lesions; however due to the lack of fungicidal effects of this triazole, an incomplete eradication of the fungi may cause recurrence (Nijima *et al.*, 2010). The prolonged and repetitive treatment required by the recurrent fungal infections may increase the resistance of the microorganism(s) to fluconazole (Fera *et al.*, 2009).

The results obtained here for group 1 were consistent with those reported by Ashbee (2007), Eichemberg *et al.* (2003), Garau *et al.* (2003), Nakano *et al.* (2005), and Piérard *et al.* (2004); however, they differ from those described by Brito *et al.* (2007), Gupta *et al.* (2000) and Velegraki *et al.* (2004). These discrepancies may be due to, among other factors, differences in the methodology used such as the media employed for the susceptibility tests because those tests with *Malassezia* genus are not standardized yet. In this study, we employed the RPMI 1640 broth recommended for the *in vitro* susceptibility testing of yeasts. This broth does not support the growth of lipid-dependent *Malassezia* species; however it is

important to emphasize that *M. pachydermatis* is an exception within its genus; it is lipophilic but not lipid-dependent. Therefore Guého *et al.* (1996) when described four new *Malassezia* species proposed the ability to grow on glucose-peptone agar (without lipid supplementation) as a differential physiologic test in order to separate *M. pachydermatis* from other *Malassezia* species. Reinforcing this affirmation, Hoog and Guarro (1995) in their comprehensive study of fungi identification pointed that *M. pachydermatis* grows on YPDA media without 1% olive oil. Then we preferred to carry out this study with RPMI 1640 as purposed by CLSI in order to prevent interferences by the supplementation with lipid sources. We must emphasize that the previous growth tests were done on Dixon's media to avoid the depletion of the lipid reserves and to sustain a good growth in the RPMI 1640 broth.

In order to study a situation that may occur in patients of veterinary clinic under azole-therapy, the azole resistant-*Malassezia* (Group 2) were generated after repeated *in vitro* exposure to fluconazole (Fekete-Forgács, 2000).

Genetic and molecular analyses have determined that the efflux pumps encoded by the *CDR* genes alter the fungal response to all of the azoles that are commonly used in clinical settings, whereas efflux pumps encoded by the *MDR1* genes seem to be specific for fluconazole (White, 2003). These findings have clinical implications because strains that are resistant to fluconazole due to the expression of the *MDR1* gene should be susceptible to other azoles, while strains that express the *CDR* gene should develop cross-resistance to the other azoles (Espinel-Ingroff *et al.*, 1999). Could our resistant isolates (Group 2) express the *CDR* gene, after the prolonged exposure to fluconazole during the induction of fluconazole-resistance process? It is a hypothesis that waits confirmation. On the other hand, this observation would justify the cross-resistance among the azoles studied: ITZ (0.06-64 µg/mL), KTZ (0.25-32 µg/mL) and VRZ (2-128 µg/mL). Similar data have been described for

Candida glabrata (Sanguinetti *et al.*, 2005; Vermitsky and Edlind, 2004) where fluconazole-resistant isolates showed extensive cross-resistance to other azoles.

Conclusion

This *in vitro* study demonstrated the ability of *M. pachydermatis* to acquire resistance when submitted to prolonged exposure to fluconazole and that this phenomenon showed cross-resistance to other azoles. These findings may have significant impact in medical and veterinary mycology, what reinforce the importance of susceptibility tests of the pathogenic microorganisms in order to define the correct therapy.

Acknowledgements

The authors thank to National Council for Scientific and Technological Development of Brazil (CNPq) for a Master's Scholarship to Francielli Pantella Kunz de Jesus and Mycology Research Laboratory (Laboratório de Pesquisas Micológicas/LAPEMI, Universidade Federal de Santa Maria/UFSM, Rio Grande do Sul, Brazil) for scientific and financial support.

Funding

Financial support was provided by CNPq and LAPEMI, Brazil.

Transparency declaration

None to declare

References

- Ashbee, H.R., 2007. Review: Update on the genus *Malassezia*, *Med. Mycol.* 45, 287-303.
- Brito, E.H.S., Fontenelle, R.O.S., Brilhante, R.S.N., Cordeiro, R.A., Soares Júnior, F.A., Monteiro, A.J., Sidrim, J.J.C., Rocha, M.F.G. 2007. Phenotypic characterization and *in vitro* antifungal sensitivity of *Candida* spp. and *Malassezia pachydermatis* strains from dogs. *Vet.*

J. 174, 147-53.

Chen, T.A., Hill P.B., 2005. The biology of *Malassezia* organisms and their ability to induce immune responses and skin disease. *Vet. Dermatol.* 16, 4-26.

Clinical and Laboratory Standards Institute, 2007. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast: Approved Guideline M27 – A3. CLSI, Wayne, PA, USA. 28, 1-25.

Eichenberg, M.L., Appelt, C.E., Berg, V., Muschner, A.C., Nobre, M.O., Matta, D., Alves, S.H., Ferreiro, L., 2003. Susceptibility of *Malassezia pachydermatis* to azole antifungal agents evaluated by a new broth microdilution method. *Acta Sci. Vet.* 31, 75-80.

Espinel-Ingroff, A., White, T., Pfaller, M.A., 1999. Antifungal agents and susceptibility tests. In: MURRAY, P. R. et al. (Editors). *Manual of clinical microbiology*. 7. ed. Washington D.C: American Society for Microbiology, pp. 1640-1652.

Fekete-Forgács, K., Gyurc, L., Lenkey, B., 2000. Changes of virulence factors accompanying the phenomenon of induced fluconazole resistance in *Candida albicans*. *Mycoses.* 43, 273 – 279.

Fera, M.T., Camera, E.L.C., De Sarro, A., 2009. New triazoles and echinocandins: mode of action, *in vitro* activity and mechanisms of resistance. *Expert Rev. Anti Infect. There.* 7, 981-998.

Garau, M., Pereiro, Jr M., Del Palacio, A., 2003. *In vitro* susceptibilities of *Malassezia* species to a new triazole, albaconazole (UR-9825), and other antifungal compounds. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 2342-2344.

Guého, E., Midgley, G., Guillot, J., 1996. The genus *Malassezia* with description of four new species. *Antonie Leeuwenhoek*, 69: 337-355.

Guilot, J., Bond, R., 1999. *Malassezia pachydermatis*: a review. *Med. Mycol.* 37, 295-306.

- Gupta, A.K, Kohli, Y., Li, A., Faerfemann, J., Summerbell, R., 2000. *In vitro* susceptibility of the seven *Malassezia* species to ketoconazole, voriconazole, itraconazole and terbinafine. Br. J. Dermatol. 142, 758-765.
- Hammer, K.A., Carson, C.F., Riley, T.V., 2000. *In vitro* activities of Ketoconazole, Econazole, Miconazole and *Malaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil against *Malassezia* Species. Antimicrob. Agents Chemother. 44, 467-469.
- Hoog, G. S., Guarro, I., 1995. Atlas of clinical fungi. Central Bureau voor Schimmelcultures/University Rovira I Virgili, Paris. 720p.
- Machado, M.L.S., Ferreiro, L., Ferreira, R.R., Corbellini, L.G., Deville, M., Berthelemy, M., Guillot, J., 2010. *Malassezia* dermatitis in dogs in Brazil: diagnosis, evaluation of clinical signs and molecular identification. Vet. Dermatol. 22, 46-52.
- Miranda, K.C., Araujo, C.R., Costa, C.R., Passos, X.S., Fernandes, O.F.L., Silva, M.R.R., 2007. Antifungal activities of azole agents against the *Malassezia* species. Int. J. Antimicrob. Agents. 29, 281-284.
- Nakano, Y., Wada, W., Tani, H., Sasai, K., Baba, E., 2005. Effects of β - Thujaplicin on Ani-*Malassezia pachydermatis* remedy for Canine Otitis Externa. J. Vet. Med. Sci. 67, 1243-1247.
- Nijima, M., Kano, R., Nagata, M., Hasegawa, A., Kamata, H., 2010. An azole-resistant isolate of *Malassezia pachydermatis*. Vet. Microbiol. DOI: 10.1016/j.vetmic.2010.10.010.
- Piérard, G.E., Arrese, J.E., Franchimont, P.C., 2004. Itraconazole corneofungimetry bioassay on *Malassezia* species. Mycoses. 47, 418-421.
- Sanguinetti, M., Posteraro, B., Fiori, B., Ranno, S., Torelli, R., Fadda, G., 2005. Mechanisms of azoles resistance in clinical isolates of *Candida glabrata* collected during a hospital survey of antifungal resistance. Antimicrob. Agents Chemother. 49, 668-679.
- Sickafoose, L., Hosgood, G., Snook, T., Westermeyer, R., Merchant, S., 2010. Vet. Ther. 11, 1-13.

Velegraki, A., Alexopoulos, E.C., Kritikou, S., Gaitanis, G., 2004. Use of fatty acid RPMI 1640 media for testing susceptibilities of eight *Malassezia* species to the new triazole posaconazol and six established antifungal agents by a modified NCCLS M27-A2 microdilution method and Etest. *J.Clin. Microbiol.* 42, 3589-93.

Vermitsky, J.P., Edlind, T.D., 2004. Azoles resistance in *Candida glabrata*: coordinate up regulation of multidrug transporters and evidence for a Pdr1-like transcription factor. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 3773-3781.

White, T.C., 2003. Mechanisms of resistance to antifungal agents. In: *Manual of Clinical Microbiology*. 8 ed. Washington DC: American Society for Microbiology. 2, pp.1869-1879.

Table 1. The *in vitro* susceptibility to azole antifungal agents ($\mu\text{g/mL}$) of *M. pachydermatis* isolates sensitive (FLZ-S) and resistant (FLZ-R) to fluconazole.

Agents	Group	MG¹	Range²	MIC₅₀³	MIC₉₀⁴
Fluconazole	FLZ-S	0.859	0.01-4.0	2.0	4.0
	FLZ-R	84.448	64.0-128.0	64.0	128.0
Itraconazole	FLZ-S	0.071	0.01-1.0	0.125	0.5
	FLZ-R	12.885	0.06-64.0	16.0	64.0
Ketoconazole	FLZ-S	0.046	0.01-1	0.03	0.06
	FLZ-R	10.556	0.25-32.0	16.0	32.0
Voriconazole	FLZ-S	0.127	0.01-4	0.25	2.0
	FLZ-R	25.398	2.0-128.0	32.0	64.0

¹Geometric mean of the MIC; ²Interval between the minimum and maximum MICs of the isolates; ³MIC₅₀ = Minimum concentration of antifungal capable of inhibiting the growth of 50% of the isolates; ⁴MIC₉₀ = Minimum concentration of antifungal capable of inhibiting the growth of 90% of the isolates.

TABELAS SUPLEMENTARES (NÃO PUBLICADAS)

Tabela 1- Distribuição das 30 amostras de *M. pachydermatis* provenientes de cães, induzidas a resistência ao fluconazol, classificadas pelos MICs, sinais clínicos e produção da enzima urease.

ISOLADOS	SINAIS CLÍNICOS	UREASE	MIC/ RESISTENTES (µg/mL)
12 AM	DAPP	+	64
22 CM	ATOPIA	+	64
37 BM	DERMATITE SEBORRÉICA	+	128
39 BM	ATOPIA	+	64
49 AM	SARNA DEMODÉCICA	+	64
64 AM	ATOPIA	+	128
70 AM	ATOPIA	+	128
84 CM	PÊNFIGO	+	64
95 BM	ATOPIA	+	128
97 BM	ATOPIA	+	64
98 AM	ATOPIA	+	64
99 AS	SEM SINAIS CLÍNICOS	+	128
113 CM	ATOPIA	+	128
114 AS	OTITE	+	64
115 CM	DAPP	+	128
175 CM	SEM SINAIS CLÍNICOS	+	64
467	OTITE	+	64
470	OTITE	+	64
474	OTITE	+	64
476	OTITE	+	128
494	OTITE	+	128
503	OTITE	+	64
528	OTITE	+	64
540	OTITE	+	128
563	OTITE	+	128
589	OTITE	+	128
631	OTITE	+	64
651	OTITE	+	64
671	OTITE	+	64
674	OTITE	+	64

+, isolados que produziram a enzima urease; MIC, concentração inibitória Mínima.

Tabela 2. Valores de p e sua significância nas comparações entre os dois grupos de isolados FS e FR de *M. pachydermatis*, respectivamente sensíveis e resistentes ao fluconazol.

Antifúngico testado	Comparações	Valores de p
FLUCONAZOL	FS × FR	$p < 0,0001^{**}$
CETOCONAZOL	FS × FR	$p < 0,0001^{**}$
VORICONAZOL	FS × FR	$p < 0,0001^{**}$
ITRACONAZOL	FS × FR	$p < 0,0001^{**}$

**Significativo $p < 0,01$; FS: grupo de isolados sensíveis ao fluconazol; FR: Grupo de isolados resistentes ao fluconazol.

CAPÍTULO 3

Avaliação da atividade antifúngica de óleos essenciais frente isolados de *Malassezia pachydermatis* sensíveis e resistentes ao fluconazol.

CAPÍTULO 3

Avaliação da atividade antifúngica de óleos essenciais frente isolados de *Malassezia pachydermatis* sensíveis e resistentes ao fluconazol.

Artigo a ser submetido no *Australian Veterinary Journal*.

Avaliação da atividade antifúngica de óleos essenciais de condimentos frente isolados de *Malassezia pachydermatis* sensíveis e resistentes ao fluconazol.

Resumo

Objetivo: O presente estudo avaliou o perfil de susceptibilidade isolados de *M. pachydermatis* sensíveis (n=30) e resistentes (n=30) ao fluconazol frente óleos essenciais de *Cinnamomum zeylanicum* (Canela), *Origanum vulgare* (Orégano) e *Lippia graveolens* (Orégano mexicano).

Materiais e métodos: O estudo envolveu dois grupos da espécie *M. pachydermatis*, o primeiro continha isolados sensíveis ao fluconazol (FS, n=30) e o segundo foi composto de isolados resistentes ao fluconazol (FR, n=30).

Resultados: As concentrações médias de óleos essenciais, capaz de inibirem o crescimento de *M. pachydermatis* foram respectivamente, 51,16 µg/mL (orégano), 67,51 µg/mL (orégano mexicano) e 109,53 µg/mL (canela). Além disso, o perfil de atividade antifúngica dos óleos não variou entre os dois grupos estudados, mas as variações das atividades entre os óleos foram significativas ($p < 0.05$).

Conclusão: As menores CIMs foram observadas com o óleo essencial de orégano e orégano mexicano frente *M. pachydermatis* fluconazol resistente, é um achado que consolida a importância destes óleos essenciais para estudos futuros voltados a terapêutica desta micose.

Evaluation of the antifungal activity of essential oils of condiments against fluconazole-sensitive and -resistant *Malassezia pachydermatis* isolates.

Abstract

Materials and methods: The present study evaluated the susceptibility profile of fluconazole-sensitive (n=30) and fluconazole resistant (n=30) *M. pachydermatis* isolates against essential oils of *Cinnamomum zeylanicum* (cinnamon), *Origanum vulgare* (Oregano) and *Lippia graveolens* (Mexican oregano).

Results: the lowest and the highest concentrations of essential oils that inhibited the growing of *M. pachydermatis* were 51.16 µg/mL (oregano), 67.51 µg/mL (orégano mexicano) and 109.53 µg/mL (cinnamon), respectively. Although the antifungal activity profile did not differ between both groups studied, disparity among the activities of the oils were statistically significant ($p < 0.05$).

Conclusion: The lowest MICs were observed for the oregano and Mexican oregano essential oils. The present findings highlight the importance of the essential oils in further therapeutic studies against *M. pachydermatis*.

Introdução

As micoses oportunistas de difícil tratamento, têm se tornado um importante problema de saúde pública nas últimas décadas, devido ao aumento de indivíduos severamente imunocomprometidos e particularmente vulneráveis a infecções. Um grande número de fungos oportunistas emerge na atualidade como importantes patógenos ao homem e animais com preocupante perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos existentes, demonstrando alarmantes percentuais de resistência (1).

Em adição, o pequeno número de antifúngicos disponíveis para utilização medicamentosa, a toxicidade e insucesso terapêutico, tem orientado a maioria dos estudos farmacológicos para a síntese e pesquisa de novos compostos antimicrobianos mais eficazes e com diferentes mecanismos de ação (2). Os óleos essenciais derivados de plantas aromáticas vêm sendo utilizados há séculos na medicina tradicional, devido as suas características antimicrobianas como amplo espectro de ação, incluindo atividades antifúngicas e antibacterianas (3).

Malassezia pachydermatis é um fungo saprófito da pele de mamíferos, apontado como principal agente etiológico de otites e dermatites em cães e gatos com histórico de doenças endócrinas, estados de hipersensibilidade, anomalias de queratinização ou administração prolongada de glicocorticóides e antibacterianos. Apesar da presença desta levedura na pele de animais saudáveis, já ter sido amplamente demonstrada, acredita-se que *M. pachydermatis* atue como um microorganismo oportunista em situações em que ocorram modificações no microclima da pele e imunossupressão (4,5).

O presente estudo avaliou o perfil de susceptibilidade de isolados de *M. pachydermatis* sensíveis e resistentes ao fluconazol, frente óleos essenciais de *Cinnamomum zeylanicum* (Canela), *Origanum vulgare* (Orégano) e *Lippia graveolens* (Orégano mexicano).

Materiais e métodos

Microorganismos

Isolados clínicos de animais, provenientes de lesões de otite e dermatite canina, foram utilizados neste estudo. 30 isolados sensíveis ao fluconazol (FS) (n=30) e isolados induzidos a resistência ao fluconazol (FR) (n=30). A identificação dos isolados foi confirmada por PCR-REA (Machado *et. al.*, 2010).

Óleos essenciais

Foi avaliada a atividade antifúngica dos óleos das seguintes espécies vegetais: *Origanum vulgare* L., *Cinnamomum zeylanicum* e *Lippia graveolens*. Os óleos essenciais de orégano e canela foram adquiridos comercialmente através da empresa Essential 7 (Roswell, New México, USA). O óleo de *Lippia graveolens* foi adquirido da empresa Agroindustrial Don Pablo (Chihuahua, Chihuahua, México). As análises qualitativas e semiquantitativas dos principais constituintes químicos dos óleos essenciais foram realizadas através de duas técnicas: cromatografia gasosa (CG), de onde se obteve os índices de retenção (Índices de Kovats) dos compostos, e cromatografia gasosa acoplada em espectrômetro de massas (CG-EM). Os constituintes majoritários presentes nos óleos essenciais foram: Z-isoeugenol (93,3%) para a canela; carvacrol (56,8%) e o-cimeno (32,2%) para orégano mexicano e carvacrol (92,6%) para o orégano.

Atividade antifúngica

A avaliação da atividade antifúngica foi baseada na determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de acordo com Pozzatti et al (2008) (3). As diluições das soluções estoque foram realizadas no meio NYP esterelizado por filtração (N-acetylglucosamine [0,221g/L], Yeast Nitrogen Base [3,35 g/L], proline [0,115 g/L], NaH_2PO_4 [1,62 g/L], K_2HPO_4 [4,6 g/L], onde a concentração final de metanol foi $\leq 1\%$ v/v). Através de microdiluição seriada foram obtidas concentrações de 6,25 $\mu\text{g/mL}$ a 3200 $\mu\text{g/mL}$ e alíquotas de 100 μL de cada concentração foram dispensadas em duplicata em placas de microdiluição contendo 96 poços. Os subcultivos dos isolados de *M. pachydermatis* foram realizados com 24 horas de antecedência. As colônia eram suspensas em solução de NaCl a 0,85% acrescido de Triton-X 0.05%; a turbidez era ajustada na escala 5 de Mc Farland. A turbidez foi ajustada em espectrofotômetro ($\lambda=530\text{nm}$) o que equivale a $1-5 \times 10^6$ CFU/mL. Alíquotas de 100 μL da suspensão de células eram adicionadas aos poços contendo o óleo essencial previamente diluído e controles positivo (inóculo diluído em RPMI 1640) e negativo (apenas RPMI 1640); a seguir as microplacas eram incubadas a 37°C por 48h. A Concentração Inibitória Mínima foi determinada pela leitura da menor concentração de óleo essencial capaz de inibir o crescimento do fungo *M. pachydermatis*. As amostras dos poços onde não era evidenciado crescimento eram repicadas para placas contendo ágar Dixon, incubadas a 35°C por 24/48h.

A Concentração Fungicida Mínima (CFM) foi determinada pela menor concentração de óleo essencial na qual o subcultivo não evidenciou crescimento fúngico no meio de Dixon.

Análise estatística

As comparações das atividades antifúngicas (CIMs e CFMs) dos óleos essenciais frente *M. pachydermatis* nos dois grupos FS e FR foram avaliados pelo teste das comparações múltiplas Tukey's ($p < 0,05$).

Resultados

As CIMs e CFMs dos óleos essenciais testados frente a *M. pachydermatis*, estão demonstradas na Tabela 1. Baseado na habilidade dos óleos essenciais inibirem o crescimento de *M. pachydermatis*, pode-se determinar a concentração inibitória mínima (CIM) dos óleos para os grupos FS e FR. A variação nos MICs entre os grupos de *M. pachydermatis* FS e FR foi respectivamente de 6,25 – 200 $\mu\text{g/mL}$ para *O. vulgare*; 6,25 – 400 $\mu\text{g/mL}$ para *L. graveolens* e 12,25 – 400 $\mu\text{g/mL}$ para *C. zeylanicum*. Considerando a média geométrica dos MICs dos respectivos óleos, foi possível determinar a eficiência fungicida (CFM) dos óleos essenciais avaliados neste estudo. A variação das CFM para os dois diferentes grupos de *M. pachydermatis* FS e FR foi respectivamente 50 – 3200 $\mu\text{g/mL}$ para *C. zeylanicum*, 50 – 1600 $\mu\text{g/mL}$ para *L. graveolens* e 25 – 800 $\mu\text{g/mL}$ para *O. vulgare*.

Quando comparadas as atividades CFM entre os diferentes grupos FS *versus* FR para os óleos essenciais de canela, orégano e orégano mexicano não foram observadas diferenças significativas referente à atividade de cada óleo isoladamente, entre os diferentes grupos FR e FS ($p < 0,05$).

Discussão

Atualmente, com o aumento de micoses superficiais e sistêmicas, refratárias a tratamentos antifúngicos, tem-se evidenciado o interesse na busca por novos compostos com propriedades antimicrobianas, inclusive com efeito fungicida. Recentes testes com óleos essenciais demonstraram a atividade antimicrobiana contra uma gama de microorganismos patogênicos

como as espécies *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, incluindo variantes resistentes (3, 7, 8, 9).

Pozzatti et al (2008) (3), ao estudarem a atividade de óleos essenciais de condimentos, com espécies de *Candida albicans* e *Candida dubliniensis*, sensíveis e resistentes ao fluconazol, relataram concentrações inibitórias e fungicidas para os óleos essenciais, onde o óleo de orégano demonstrou os menores valores de CIMs frente a todos os isolados, seguido pelo orégano mexicano, canela, tomilho e pelo gengibre, o qual apresentou a menor atividade antifúngica. Resultados semelhantes foram encontrados em nosso estudo que ao comparar a atividade dos óleos essenciais de canela, orégano e orégano mexicano nos dois diferentes grupos, foi possível observar que as CIMs de orégano (FS e FR: 6,25 – 200 µg/ml), orégano mexicano (FS e FR: 6,25 – 400 µg/ml) e canela (FS e FR: 12,25 – 400 µg/ml) não apresentaram variações significativas ($P > 0,05$) frente isolados de *M. pachydermatis* sensíveis e resistentes ao fluconazol.

Os achados deste estudo são instigantes, uma vez que isolados de *M. pachydermatis* resistentes a azólicos demonstraram-se sensíveis aos óleos essenciais de orégano e orégano mexicano, este fato sugere que estes óleos essenciais associados com azólicos podem apresentar propriedades sinérgicas em tratamentos, pois apesar de possuírem mecanismos de ação diferentes, os mesmos são complementares no processo de destruição de microorganismos. É amplamente conhecido que os azóis inibem a síntese do ergosterol dos fungos através da ligação à enzima lanosterol 14- α -demetilase, o que provoca alterações na membrana citoplasmática fúngica, impedindo o desenvolvimento do mesmo (10).

Rao et al (2010) (11), ao estudarem os constituintes terpenóides fenólicos como o carvacrol, timol e eugenol, observaram que os mesmos, atuam principalmente através do influxo de cálcio do meio extracelular, do vacúolo e de outros compartimentos celulares, gerando a dessensibilização dos canais iônicos e conseqüentemente alteram a osmolaridade celular, além disso concluíram que o carvacrol diferente do timol e do eugenol, possui um grupo hidroxila em sua estrutura, possibilitando trocas de elétrons instáveis facilitando a entrada de H^+ e cátions monovalentes como K^+ para o interior da célula fúngica, gerando um aumentando da permeabilidade da membrana celular. Estas alterações conduzem à deterioração de processos essenciais à sobrevivência da célula tais como o transporte de elétrons, o transporte de proteínas, passos da fosforilação e outras reações dependentes de enzimas (12,7).

Através da análise da composição química dos óleos essenciais utilizados em nosso estudo, foi possível quantificar as frações de cada composto presente nos diferentes óleos essenciais. Em nosso estudo o constituinte majoritário para os óleos essenciais, de orégano (92,6%) e

orégano mexicano (56,8%), foi o carvacrol. Rao et. al. (2010) (11), propuseram que compostos contendo altas concentrações de terpenóides fenólicos possuem uma ação antimicrobiana mais acentuada quando comparados a outros constituintes, resultados semelhantes aos encontrados em nosso estudo, onde a atividade antifúngica frente isolados de *M. pachydermatis* sensíveis e resistentes ao fluconazol, foi mais acentuada para os óleos essenciais de orégano e orégano mexicano. No entanto apesar do óleo essencial de canela não possuir como composto majoritário um terpenóide fenólico, também apresentou atividade antifúngica frente os dois diferentes grupos de isolados de *M. pachydermatis*.

Conclusão

Baseado nas médias geométricas das CFMs geradas pelos óleos essenciais, conclui-se que concentrações acima de 195.42 µg/mL de óleo essencial de orégano, 332.49 µg/mL de óleo essencial de orégano mexicano e 448.8 µg/mL de óleo essencial de canela, possuem ação fungicida *in vitro* sobre *M. pachydermatis*, independente da sensibilidade ou resistência ao fluconazol. A atividade destes óleos essenciais de *M. pachydermatis* fluconazol resistente é um achado que consolida a importância destes óleos para estudos futuros voltados a terapêutica destas micoses.

Agradecimentos

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos, modalidade GM, mestrado. Ao Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI, Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil), pela orientação e condições oferecidas para o estudo. Ao Doutor Mauro Luís da Silva Machado (Veterinário do Hospital de Clínicas Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil).

Conflito de interesse

Os autores não declararam nenhum conflito de interesse.

Referências

1. Pfaller MA & Diekema DJ. Rare and emerging opportunistic fungal and pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *J. Clin. Microbiol.* 2004, 42: 4419-4431.
2. Fera MT, Camera EL and Sarro A. New triazoles and echinocandins: mode of action, *in vitro* activity and mechanisms of resistance. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 2009, 7: 981-998.
3. Pozzatti P, Scheid LA, T.B Spader, *et al.* *In vitro* activity of essential oils extracted from plants used as spices against fluconazole-resistant and fluconazole-susceptible *Candida* spp. *Can J Microbiol.* 2008, 54: 950- 956.
4. Guillot J & BOND R. *Malassezia pachydermatis*: a review. *Med Mycol*, 1999, 37: 295-306.
5. Plant JD, Rosenkrantz WS, Griffin EC, *et al.* factors associated with and prevalence of high *Malassezia pachydermatis* numbers on dog skin. *J Am Vet Med Assoc*, 1992, 201: 879-882.
6. Machado MLS, Ferreira L, Ferreira, RR, *et al.* *Malassezia dermatitis* in dogs in Brazil: diagnosis, evaluation of clinical signs and molecular identification. *Vet. Dermatol.* 2010, 22, 46-52.
7. Arfa AB, *et al.* Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical Structure. *Letters in Applied Microbiology*, 2006, 43: 149–154.
8. Pinto E, *et al.* Antifungal activity of the essential oil of *Thymus pulegioides* on *Candida*, *Aspergillus* and *dermatophyte* species. *Journal of Medical Microbiology*, 2006, 55: 1367-1373.
9. De Martino L, De Feo V, Fratianni F, *et al.* Chemistry, antioxidant, antibacterial and antifungal activities of volatile oils and their components. *Nat Prod Commun.* 2009, 4: 1741-1750.
10. Goodman LS, Gilman A. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 9. ed. Rio de Janeiro: MacGraw-Hill, 1996, 1:1436.
11. Rao A, Zhang Y, Muend S, *et al.* Mechanism of antifungal activity of terpenoid phenols resembles calcium stress and inhibition of the tor pathway. *Antimicrob. Agents Chemother*, DOI: 10.1128/AAC.01050-10,2010.
12. Ultee A, Bennik MH, Moezelaar R, *et al.* The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol.* 2002, 68: 1561-1568.

Tabela 1. Susceptibilidade de isolados do fungo *Malassezia pachydermatis* frente óleos essenciais de canela, orégano mexicano e orégano.

Óleo essencial	Atividade Antifúngica							
	FS (n=30)				FR (n=30)			
	CIM	MG ($\mu\text{g/mL}$)	CFM	MG	CIM	MG ($\mu\text{g/mL}$)	CFM	MG
<i>C. zeylanicum</i>	12.5 - 400	109.53	50 - 3200	445.65	12.5 - 400	112.41	50 - 3200	448.8
<i>L. graveolens</i>	6.25 - 400	67.51	50 - 1600	296.21	6.25 - 400	85.06	50 - 1600	332.49
<i>O. vulgare</i>	6.25 - 200	51.16	25 - 800	174.11	6.25 - 200	69.9	25 - 800	195.42

FS: grupo de isolados de *M. pachydermatis* sensíveis ao fluconazol; FR: grupo de isolados de *M. pachydermatis* resistentes ao fluconazol; GM: média geométrica; n: número de isolados testados; CIM: concentração mínima de óleo essencial capaz de inibir o crescimento de isolados do fungo *Malassezia pachydermatis*; CFM: concentração mínima de óleo essencial capaz de exercer ação fungicida sobre isolados do fungo *M. pachydermatis*.

Tabelas suplementares (não publicadas)

Tabela 1. Valores de CIM₅₀ e CIM₉₀ dos óleos essenciais, frente aos isolados de *M. pachydermatis* sensíveis (FS) e resistentes (FR) ao fluconazol.

Óleo essencial	CFM			
	FS (n=30)		FR (n=30)	
	CIM ₅₀ (µg/mL)	CIM ₉₀ (µG/ML)	CIM ₅₀ (µG/ML)	CIM ₉₀ (µG/ML)
<i>C. zeylanicum</i>	100	400	100	400
<i>L. graveolens</i>	100	200	100	200
<i>O. vulgaris</i>	50	400	50	400

CIM₅₀: concentração mínima de óleo essencial capaz de inibir o crescimento de 50% DOS isolados de *Malassezia pachydermatis*. CIM₉₀ concentração mínima de óleo essencial capaz de inibir o crescimento de 90% dos isolados de *Malassezia pachydermatis*.

Tabela 2. Concentração Fungicida Mínima (CFM) da atividade de cada óleo em estudo frente a susceptibilidade do fungo *Malassezia pachydermatis* no grupo sensível ao fluconazol (FS) e no grupo resistente ao fluconazol (FR).

Essential oil	CFM			
	FS (n=30)		FR (n=30)	
	CFM ₅₀ (µg/mL)	CFM ₉₀ (µG/ML)	CFM ₅₀ (µG/ML)	CFM ₉₀ (µG/ML)
<i>C. zeylanicum</i>	400	1600	400	1600
<i>L. graveolens</i>	200	800	200	800
<i>O. vulgaris</i>	200	1600	200	1600

CFM: Menor concentração de óleo com atividade fungicida frente *Malassezia pachydermatis*; GM: média geométrica; n: número de isolados testados; $Mp^S \times Mp^R$ comparação das CFMs entre os grupos de *M. pachydermatis* sensível versus resistente ao fluconazol. Teste de Mann-Whitney, $P < 0,05$.

Tabela 3. Composição química dos óleos essenciais.

Composto	IR	%		
		Canela	O. mexicano	Orégano
α -tujeno	930		1,10	
α -pineno	939			
Canfeno	954			
β -pineno	979			
Mirceno	991			
<i>p</i> -cimeno	1025			
<i>o</i> -cimeno	1026		32,2	4,60
Limoneno	1029			
1,8-cineol	1031			
γ -terpineno	1060		3,67	0,90
Linalol	1097			
cis-tujona	1102			
trans-tujona	1114			
Cânfora	1146			
Borneol	1169			
Neral	1238			
Geranial	1267			
Timol	1290		2,17	1,90
Carvacrol	1299		56,8	92,6
Eugenol	1359			
Acetato de Geranil	1381			
Z-isoeugenol	1407	93,30		
Z-cariofileno	1409			
E-cariofileno	1419	2,47		
α -curcumeno	1481			
Zingibereno	1494			
α -farneseno	1506			
β -bisaboleno	1506			
Sesquifelandreno	1523			
Acetato de eugenol	1523	1,80		
Benzoato de benzila	1760	2,43		
Total		100	95,94	100

Compostos listados em ordem de eluição; IR = índice de retenção (calculado).

4. DISCUSSÃO

Nos últimos anos, o gênero *Malassezia* vem merecendo destaque na micologia veterinária e humana, principalmente devido a recidivas encontradas no tratamento das espécies afetadas e ao aumento do número de casos. É mundialmente aceito que *M. pachydermatis* é uma levedura comensal e um patógeno oportunista secundário, cuja sua proliferação muitas vezes reflete a presença de fatores predisponentes em cães e subjacentes às doenças primárias. Fatores predisponentes incluem orelhas pendulares, canal auditivo externo estreito, orelhas peludas e natação (BOEKHOUT *et al.*, 2010). Apesar do uso bastante amplo da combinação de produtos comercialmente disponíveis para o tratamento de infecções causadas por *M. pachydermatis* há poucos dados de ensaios clínicos descrevendo a sua eficácia. Isso pode refletir em parte, a ausência de testes de susceptibilidade padronizados para este gênero.

Assim como os ácaros de gênero *Demodex* sp. e as bactérias do gênero *Staphylococcus* sp., *M. pachydermatis* é constituinte da microbiota sapróbica cutânea de cães e gatos, embora seja um agente oportunista (NAHAS, 1997). Esta etiologia diversificada pode mascarar a malasseziose ou dificultar o seu isolamento e identificação. O processo de isolamento e identificação exige uma série de testes laboratoriais envolvendo provas bioquímicas e moleculares que podem retardar os testes de triagem de susceptibilidade deste fungo frente agentes antifúngicos tornando sua correlação com a prática clínica inviável (BOEKHOUT *et al.*, 2010). Desta forma, se faz necessário, a padronização de testes laboratoriais que possibilitem uma triagem rápida e segura da susceptibilidade de *M. pachydermatis* frente agentes antifúngicos.

O interesse na padronização de testes de suscetibilidade para verificar a atividade antifúngica de triazólicos e novos triazólicos frente *Malassezia pachydermatis* se faz necessário devido ao uso destes medicamentos rotineiramente na clínica médica e veterinária no tratamento de dermatoses causadas por esta levedura. Nos trabalhos publicados várias técnicas foram realizadas e propostas para testes de sensibilidade de *M. pachydermatis* para a atividade antifúngica (GUPTA *et al.*, 2000; GARAU *et al.*, 2003), mas nenhuma das técnicas utilizadas baseia-se nos protocolos propostos pelo CLSI.

Um ponto crítico nos testes de suscetibilidade *in vitro* é o meio de cultivo utilizado nos ensaios. O caldo RPMI 1640 tem sido indicado para testes de suscetibilidade *in vitro* de

leveduras e fungos filamentosos, demonstrando bons resultados de reprodutibilidade (M27-A3, 2008). Para os testes de susceptibilidade de *M. pachydermatis*, este estudo propôs pequenas alterações na metodologia à proposta pelo Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI, nos protocolos M27-A3 & M27-S3 (2008), para fungos filamentosos. Devido às dificuldades na aquisição do inóculo, para assegurar a concentração final em cada poço de $0,5 \times 10^3$ - $2,5 \times 10^3$ UFC/mL, utilizou-se solução salina acrescida de tween com o objetivo de tornar as células mais solúveis. As demais etapas como inoculação, concentração dos antifúngicos, tempo de incubação e temperatura, não foram modificadas.

O primeiro capítulo buscou comparar e adaptar duas técnicas de susceptibilidade, a microdiluição em caldo (M27A-3) e disco-difusão (M44-A) frente antifúngicos tópicos e sistêmicos frequentemente utilizados na clínica médica e veterinária no tratamento de infecções superficiais e sistêmicas causadas por este agente no homem e em animais. Apesar de *M. pachydermatis* não ser incluída nestes protocolos, há uma crescente necessidade e interesse no reconhecimento do perfil de susceptibilidade deste agente, já que tem sido relatada como uma importante micose oportunista em diferentes espécies animais (BOEKHOUT *et al.*, 2010).

Os 46 isolados de *M. pachydermatis* testados apresentaram crescimento visível e homogêneo de células leveduriformes em caldo RPMI, em 48 horas a 37⁰C, permitindo fácil leitura das CIMs. A maioria dos artigos consultados apresenta grande diversidade no valor das CIMs. Este fator pode ser atribuído ao fato de utilizarem outros meios de cultivo que têm variado significativamente em relação ao padrão proposto pelo CLSI (GARAU *et al.*, 2003; GUPTA *et al.*, 2000; MIRANDA *et al.*, 2007).

O objetivo principal dos testes de susceptibilidade é o reconhecimento da resistência de microorganismos a drogas após tratamentos prolongados ou que apresentem altas taxas de recidiva. Devido a escassez de dados de susceptibilidade obtidos através dos métodos de disco-difusão e microdiluição em caldo, não há um padrão emergente espécie-dependente indicando respostas ao uso de azólicos. Os *breakpoints* para o gênero *Malassezia*, referentes a altas taxas de recidivas ainda não foram estabelecidos (SCHLEMAN *et al.*, 2000; WEISS *et al.*, 1991; MASSURE *et al.*, 1997). Os dados estabelecidos nos protocolos são referentes a isolados do gênero *Candida* spp. e foram aqui adaptados para *M. pachydermatis*. Por este motivo não podem ser correlacionados de maneira direta a clínica médica, antes de ensaios *in vivo*.

O primeiro capítulo propôs a adaptação de duas técnicas padronizadas pelo CLSI a disco-difusão (2004) e microdiluição em caldo (2007) para fungos filamentosos. Entre os objetivos deste estudo foi avaliar qual a melhor técnica para triagem laboratorial da susceptibilidade de *M. pachydermatis*. Embora que o grau de concordância entre as técnicas de disco-difusão e microdiluição em caldo, apresentarem-se semelhantes para os diferentes antifúngicos: itraconazol (97, 82%), clotrimazol (97,82%), miconazol (97,82%), cetoconazol (95,65%), anfotericina-B (95,65%) e fluconazol (91,31%); o método de disco-difusão (n=2) foi mais sensível na detecção de isolados resistentes ao fluconazol, quando comparado aos resultados obtidos na microdiluição em caldo (n=1). Mas ambas as técnicas detectaram a presença de um isolado resistente aos antifúngicos fluconazol (8 µg/mL; 11 mm), clotrimazol (16 µg/mL; 9 mm), miconazol (8 µg/mL; 8 mm) e itraconazol (1 µg/mL; 11 mm).

Casos de recidivas da infecção fúngica são frequentemente relatados na clínica veterinária, sugerindo falhas no tratamento. As falhas terapêuticas destas infecções podem ser atribuídas à resistência clínica ou microbiológica. A diferenciação entre ambas as resistências é ainda bastante obscura, o que aumenta a importância de estudos para reconhecer o perfil de sensibilidade de cepas clínicas de *M. pachydermatis* e o espectro de ação dos antifúngicos. Além disso, com a disponibilidade de novos antifúngicos e estratégias terapêuticas, a detecção de resistência poderá ter significativo impacto no momento de eleger uma alternativa terapêutica.

O segundo capítulo deste estudo, foi direcionado para o estudo da resistência a antifúngicos. Utilizou a técnica de indução de resistência *in vitro* descrita por Fekete-Forgács *et al.* (2000), para estudo de isolados resistentes. Esta técnica demonstrou o potencial que os isolados de *M. pachydermatis* apresentam em adquirir resistência ao fluconazol. Ao estudar a susceptibilidade destes isolados com resistência induzida, foi possível observar um aumento significativo das CIMs a outros antifúngicos azólicos. Os MICs obtidos, dos isolados de *M. pachydermatis* resistentes ao FLC variaram 64 a 128µg/mL (n=30). Os resultados demonstram mudanças significativas ($p<0,001$). Os intervalos de MICs dos isolados com resistência induzida ao fluconazol foram para ITZ (0,06µg/mL -64µg/mL), KTZ (0,25µg/mL -32µg/mL) e VRZ (2µg/mL -128µg/mL).

Estes resultados sugerem que isolados resistentes a um antifúngico azólico manifestam resistência cruzada a outros agentes desta classe. Esta habilidade de adquirir resistência secundária é preocupante e alerta para a necessidade de triagem da susceptibilidade deste

fungo, já que este gênero tem sido atualmente relatado em infecções invasivas no homem e em animais (TIRODKER *et al.*, 2003 & ASHBEE *et al.*, 2002).

O terceiro capítulo buscou estudar a atividade de óleos essenciais frente isolados de *M. pachydermatis* sensíveis e resistentes ao fluconazol. Direcionou-se o estudo para óleos essenciais sabidamente ativos contra espécies de *Candida* (POZZATTI *et al.*, 2008). Os resultados obtidos neste estudo (Capítulo 3) demonstraram atividade antifúngica dos óleos essenciais de canela, orégano e orégano mexicano frente a isolados sensíveis e resistentes de *M. pachydermatis*. A melhor atividade antifúngica foi evidenciada em testes com o óleo essencial de orégano, seguido de orégano mexicano e canela. A atividade dos óleos essenciais de orégano e orégano mexicano pode ser atribuída ao composto químico carvacrol presente nestes condimentos como composto majoritário (RAO *et al.*, 2010).

A atividade antifúngica de compostos terpenóides fenólicos foi recentemente descrita por Rao *et al.* (2010), que atribuem como principal mecanismo de ação alterações no influxo de Ca^{2+} mobilizando Ca^{2+} intracelular de vacúolo e de outros compartimentos celulares, gerando a dessensibilização dos canais iônicos e conseqüentemente alterando a osmolaridade celular. Além disso concluíram que o carvacrol, diferente do timol e do eugenol, possui um grupo hidroxila em sua estrutura, possibilitando trocas de elétrons instáveis facilitando a entrada de H^+ e cátions monovalentes como K^+ para o interior da célula fúngica, gerando um aumento da permeabilidade da membrana celular. Estas alterações conduzem à deterioração de processos essenciais à sobrevivência da célula tais como o transporte de elétrons, o transporte de proteínas, passos da fosforilação e outras reações dependentes de enzimas (ULTEE *et al.*, 2002).

A avaliação da susceptibilidade de *M. pachydermatis* é importante não só para avaliar o perfil de susceptibilidade aos antifúngicos convencionalmente utilizados, mas também para testar novos compostos com atividade antifúngica como derivados sintéticos de antifúngicos (RUKAYADI *et al.*, 2007), terpenóides fenólicos naturais, óleos essenciais, tais como óleo de *Melaleuca alternifolia* “Tea tree” (WESELER *et al.*, 2002) e avaliação da atividade antifúngica da própolis frente *M. pachydermatis* (CARDOSO *et al.*, 2010). Apesar destes aspectos, os achados *in vitro* obtidos neste estudo mostram que *M. pachydermatis* pode desenvolver resistência a azólicos, após terapias prolongadas. Apesar dos dados de susceptibilidade apresentados pelas cepas sensíveis de *M. pachydermatis* sugerirem que o fluconazol ainda é uma droga segura para terapêutica da maioria dos casos de malasseziose superficial ou invasiva, é fundamental que estudos de vigilância epidemiológica sejam

realizados continuamente para evidenciar mudanças no perfil microbiológico em função de práticas terapêuticas.

As CIMs dos óleos essenciais não evidenciaram alterações significativas entre isolados sensíveis e resistentes ao fluconazol. Estas terapêuticas alternativas devem ser exploradas experimentalmente através de estudos *in vivo* para confirmar o potencial terapêutico de óleos essenciais contra *M. pachydermatis*. A atividade dos óleos essenciais de orégano e orégano mexicano frente a *M. pachydermatis* fluconazol - resistente é um achado que consolida a importância destes óleos para estudos futuros voltados a terapêutica desta micose.

5. CONCLUSÕES

1. Em ambas as metodologias, as amostras testadas apresentaram padrões de sensibilidade aos antifúngicos avaliados, embora se observe que as porcentagens dos isolados tenham diferido entre as metodologias. A técnica de disco-difusão foi capaz de evidenciar resistência de isolados caracterizados como sensíveis ou com sensibilidade dose-dependente pela técnica de microdiluição em caldo.
2. Ambas as técnicas, microdiluição em caldo e disco-difusão permitiram a detecção de um isolados de *M. pachydermatis* resistente, aos antifúngicos azólicos: fluconazol (8 µg/mL; 11 mm), clotrimazol (16 µg/mL; 9 mm), miconazol (8 µg/mL; 8 mm) e itraconazol (1 µg/mL; 11 mm).
3. Os isolados induzidos à resistência *in vitro* ao fluconazol (100%) evidenciaram resistência cruzada frente aos demais azólicos, itraconazol (93%), cetoconazol (97%) e voriconazol (100%).
4. Baseado nas médias geométricas das CFMs geradas pelos óleos essenciais, conclui-se que concentrações acima de 195.42 µg/mL de óleo essência de orégano, 332.49 µg/mL de óleo essencial de orégano mexicano e 448.8 µg/mL de óleo essencial de canela, possuem ação fungicida *in vitro* sobre o fungo *M. pachydermatis*, independente da sensibilidade ou resistência ao fluconazol.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIZAWA, T.; KANO, R.; NAKAMURA, Y. Molecular heterogeneity in clinical isolates of *Malassezia pachydermatis* from dogs. *Vet Microbiol*, v.70, p.67–75, 1999.

AIZAWA, T.; KANO, R.; NAKAMURA, Y., WATANABE S. e HASEGAWA A. The genetic diversity of clinical isolates of *Malassezia pachydermatis* from dogs and cats. *Med Mycol*, v.39, p.329–334, 2001.

AKERSTEDT, J. & VOLLSET, I. *Malassezia pachydermatis* whit especial reference to canine skin disease. *British veterinary journal*, v. 152, p. 269-281, 1996.

ALVES, S. H.; MILAN E. P.; MORETTI-BRANCHINI, M. L.; NISHIMURA, K., FUKUSHIMA, K.; OLIVEIRA, L. O.; COSTA; J. M. e COLOMBO, A.L. First isolation of *Candida dubliniensis* in Rio Grande do Sul, Brazil. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 39, n. 3, p.165-168, 2001.

ARENAS, R. *Micologia medica ilustrada*. México : Nueva editorial interamericana, 1993. Cap.34.: Antimicóticos; p.359-376.

ASHBEE, H.R.; EVANS, E.G. Immunology of diseases associated with *Malassezia* species. *Clin Microbiol Rev* 15:21–57, 2002.

ASPIROZ, C.; MORENO, L.A.; REZUSTA, A. Differentiation of three biotypes of *Malassezia* species on normal human skin. Correspondence with *M. globosa*, *M. sympodialis* and *M. restricta*. *Mycopathol* 145:69-74, 1999.

BAILLON, E.H. *Traité de botanique médicale cryptogamique suivi du tableau*. Faculté de Médecine de Paris, p. 234, 1889.

BARBANOJ, M.J.; ANTONIJOAN, R.; GEA, G.; et al. Eberconazole cream: topical and general tolerability, sensitization potential and systemic availability. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, v.27, p.227–234, 2005.

BARBER, G.R.; BROWN, A.E.; KIEHN, T.E.; FITZROY, F.; EDWARDS, M. S.^a e DONALD ARMSTRONG, M.D. Catheter-related *Malassezia furfur* fungemias in immunocompromised patients. *Am J Med*, v.95, p.365–370, 1993.

BAXTER, M. *Pityrosporum pachydermatis* in pendulous and erect ears of dogs. New Zealand Vet J. v. 24, p. 69-70, 1975.

BENNETT, J. E. Antimicrobial Agents: Antifungal agents, Chapter 48. In: Goodman & Gilman (ed.). The Pharmacological Basis of Therapeutics, 11th Ed., Digital Edition Set ISBN: 0-07-146804-8, 2006.

BOEKHOUT, T., KAMP M.; GUÉHO, E. Molecular typing of *Malassezia* species with PFGE and RAPD. Med Mycol, v.36, p.365–372, 1998.

BOEKHOUT T., GUÉHO E., MAYSER, P. *Malassezia* and the Skin. Science and clinical Practice. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1ª edição, p. 229-247, 2010.

BOND, R. & ANTHONY, R.M. Characterization of markedly lipid-dependent *Malassezia pachydermatis* isolates from healthy dogs. J Appl Bacteriol, v.78, p.537–542, 1995.

BOND, R.; FERGUSON, E. A.; CURTIS, C. F.; GRAIC, J. M.; LLOYD, D. H. Factors associated with elevated cutaneous *Malassezia pachydermatis* population in dogs with pruritic skin disease. J Small anim Pract. V. 37, p. 103-107, 1996.

BOND, R. & LLOYD DH. Skin and mucosal populations of *Malassezia pachydermatis* in healthy and seborrhoeic basset hounds. Vet Dermatol, v.8, p.101–106, 1997.

BRUMMER, E.; KAMEI, K.; MIYAJI, M. Damage to yeast cells of *Cryptococcus neoformans* by voriconazole and fluconazole: a culture and microscopic study. Med Mycol, v.36, n.4, p.227-233, 1998.

CABAÑES, J.; THEELEN, B.; CASTELLÁ, G.; BOEKHOUT, T. Two new lipid-dependent *Malassezia* species from domestic animals. FEMS Yeast Research, v. 7, p. 1064-1076, 2007.

CÁCERES, A. Plantas de uso medicinal en Guatemala. Guatemala: Editorial Universitaria, 1999, 402 págs.

CARDOSO, R.L.; MABONI, F.; MACHADO, G.; ALVES, S.H.; VARGAS, A.C. Antimicrobial activity of propolis extract against *Staphylococcus coagulase positive* and *Malassezia pachydermatis* of canine otitis. Veterinary Microbiology, v.142, p. 432–434, 2010.

CARFACHIA, C.; GALLO, S.; ROMITO, D.; CAPELLI, G.; CHERMETTE, R.; GUILLOT, J.; OTRNTO, D. Frequency, body distribution, and population size of *Malassezia* species in healthy dogs and in dogs with localized cutaneous lesions. *Journal of Veterinary Diagnosis and Investigation*, v. 17, p. 316-322, 2005.

CARFACHIA, C.; LATROFA, M.S.; TESTINI, G.; PARISI, A.; GUILLOT, J.; GASSER, R.B. Multilocus mutation scanning for the analysis of genetic variation within *Malassezia* (Basidiomycota: Malasseziales). *Electrophoresis*, v. 28, p. 1176-1180, 2007.

CARFACHIA, C.; GASSER R.B., LATROFA M.S. Genetic variants of *Malassezia pachydermatis* from canine skin: body distribution and phospholipase activity. *FEMS Yeast Research*, v. 8, p.451-459, 2008.

CHAMI, N.; CHAMI, F.; BENNIS, S.; TROUILLAS, J. and REMMAL, A. Antifungal Treatment with Carvacrol and Eugenol of Oral Candidiasis in Immunosuppressed Rats. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 8, n. 3, 2004.

CHEN, T.A.; HILL P.B. The biology of *Malassezia* organisms and their ability to induce immune responses and skin diseases. *Veterinary Dermatology*, v.16, p. 4-26, 2005.

CHENGAPA, M. M.; MADDUX, R. L.; GREER, S. C. A microbiologic survey of clinically normal and otitic canine ear canals. *Vet Med Small Anim Clin*, v. 12, p. 343, 1983.

CHRYSSANTHOU, E.; BROBERGER, U.; PETRINI, B. *Malassezia pachydermatis* fungaemia in a neonatal intensive care unit. *Acta Paediatrica*, v.90, p.323-327, 2001.

CLSI- Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. Approved Guideline M27 – A3, 2007.

CLSI- Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for antifungal Disk Diffusion susceptibility testing of yeast. Approved Guideline, v.23, n.6 M44 – A, 2004.

COWAN, M. M. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, v.12, n.4, p. 564-582, 1999.

COWEN, L.E. The evolution of fungal drug resistance: modulating the trajectory from genotype to phenotype. *Nature Reviews Microbiology*. v. 6, n. 3, p. 187-198, 2008.

DANKNER WM, SPECTOR SA, FIERER J. *Malassezia* fungemia in neonates and adults: complication of hyperalimentation. *Rev Infect Dis*, v.9, p.743–753, 1987.

DENNING, D.W.; FAVERO, A.; GLUCKMAN, E., et al. The efficacy and tolerability of UK 109,496 (voriconazole) in the treatment of invasive aspergilosis (IA). Disponível on line na Internet em 16 de dezembro de 2000. <http://www.aspergillus>.

DORMAN, H. J. D. & DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, v. 88, p. 308-316, 2000.

DRENO, B.; CHOSIDOW, O.; REVUZ, J.; MOYSE, D. Lithium gluconate 8% vs ketoconazole 2% in the treatment of seborrhoeic dermatitis: a multicentre, randomized study. *Br J Dermatol* 148:1230–1236, 2003.

DWORECKA-KASAK, B.; TOKA, F. N. Whats new about *Malassezia pachydermatis*. *Mikol Lek*, v. 6, n. 3, p. 133-143, 1999.

EICHSTEDT, D.T. Pilzbildung in der Pityriasis versicolor. *Froriep's Neue Notizen aus dem Gebiete der Natur-und Heilkunde*, v. 853, p. 270-271, 1846.

EUCAST, Method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). *Clin Microbiol Infect* 14:398–405, 2008.

FEKETE-FORGÁCS, K.; GYURC, L.; LENKEY, B. Changes of virulence factors accompanying the phenomenon of induced fluconazole resistance in *Candida albicans*. *Mycoses*, v. 43, p.273 –279, 2000.

GAMBICHLER, T.; BREUCKMANN, F.; BOMS, S.; et al. Narrowband UVB phototherapy in skin conditions beyond psoriasis. *J Am Acad Dermatol*, v.52, p.660–670, 2005.

GARAU, M.; PEREIRO M. JR.; DEL PALACIO A. *In vitro* susceptibilities of *Malassezia* species to a new triazole, albaconazole (UR-9825), and other antifungal compounds. *Antimicrob Agents Chemother*, v.47, p.2342–2344, 2003.

GRIFFIN, C. limpeza e terapia tópica das otites. *A hora Veterinária*, v. 94, p. 17-25, 1996.

GUILLOT, J. Taxonomie et phylogénie des levures du genre *Malassezia*. Thèse de Doctorat d'Université, Univ Paris XII, Sciences de la Vie et de la Santé, option Parasitologie, Paris, 1995.

GUILLOT, J.; GUÉHO, E.; HERMETTE, R. Confirmation of the nomenclatural status of *Malassezia pachydermatis*. *Antonie van Leeuwenhoek* v. 67, p. 173–176, 1995a.

GUILLOT, J.; GUÉHO, E. The diversity of *Malassezia* yeasts confirmed by rRNA sequence and nuclear DNA comparisons. *Antonie van Leeuwenhoek*, V. 67, P.297–314, 1995b.

GUILLOT, J.; GUÉHO, E.; LESOURD, M.; et al. Identification of *Malassezia* species. A practical approach. *J Mycol Méd*, v.6, p.103–110, 1996.

GUILLOT, J., GUÉHO, E., CHÉVRIER, G. et al. Epidemiological analysis of *Malassezia pachydermatis* isolates by partial sequencing of the large subunit ribosomal RNA. *Res Vet Sci*, v.62, p.22–25, 1997.

GUILLOT, J.; BREUGNOT, C.; DE BARROS, M.; CHERMETTE, R. Usefulness of modified Dixon's medium for quantitative culture of *Malassezia* species from canine skin. *Journal Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 10, p, 384–386, 1998.

GUILLOT, J. & BOND, R.; *Malassezia pachydermatis*: a review. *Med Micology*, v.37, p. 295- 306, 1999.

GUÉHO, E., MIDGLEY, G., GUILLOT, J. The genus *Malassezia* with description of four new species. *Antonie Leeuwenhoek*, v. 69, n. 6, p. 337-355, 1996.

GUPTA, A. K.; KOHLL, Y.; SUMMERBELL, R. C. Molecular differentiation of seven *Malassezia* species. *J Clin Microbiol*, v. 38, n. 5, p.1869-1875, 2000.

GUSTAFSON, B.A. Otitis externa in the dog. A bacteriological and experimental study. *Royal Veterinary College of Sweden*, Stockholm, 1955.

HAZEN, K.C. et al. Influence of fluconazole at subinhibitory concentrations on cell surface hydrophobicity and phagocytosis of *Candida albicans*. *FEMS Microbiology Letters*. v. 183, p. 89-94, 2000.

HIRAI, A.; KANO, R.; MAKIMURA, K.; DUART, E. R.; HAMDAN, J. S.; LACHANCE, M. A.; YAMAGUCHI, H.; HASEGAWA, A. *Malassezia nana* sp. Nov., a novel lipid-dependent yeast species isolated from animais. *J Syst Evol Microbiol*, v. 54, p. 623-627, 2004.

HUANG, H. An introduction to *Malassezia* associated otitis in dogs. *J Chin Soc Vet Sci*, v. 20, n. 3, p. 211-216, 1994.

JOHNSON, M.D.; Mac DOUGALL, C.; ZEICHNER, L.O.; PERFECT, J. R. and REX, J. H. Combination antifungal therapy. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 48, p. 693-715, 2004.

KAPPE, R. Antifungal activity of the new azole UK-109,496 (voriconazole). *Mycoses*, v.42, n.2, p.83-86, 1999.

KEDDIE, F. M. Electrón microscopy of *Malassezia fúrfur* in tinea versicolor. *Sabouraudia*, v. 5, n. 1, p. 134-137,1996.

KOGA, H.; NANJOH, Y.; MAKIMURA, K.; TSUBOI, R. *In vitro* antifungal activities of luliconazole, a new topical imidazole. *Med Mycol*, v.29, p.1-8, 2008.

LACAZ, C. S.; POTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N. T. *Tratado de Micologia Médica Lacaz*. São Paulo: Sarvier, p. 1104, 2002.

LANGONI, H.; FESSEL, Y. M. N.; LISTONI, F. J. P.; FAVA, N. Microflora aeróbica de ouvido de cães sem otite. *Arq Brás Med Zootec*, v. 43, n. 3, p. 255-260, 1991.

LAROCCO, M.; DORENBAUM, A.; ROBINSON, A.; PICKERING, L. K. recovery of *Malassezia pachydermatis* from eighth infants in a neonatalintensive care mursey: clinical *Pediat Infect Dis J*. v. 7, n. 6, p. 398-40, 1988.

LARSSON, C. E.; LARSSON, M. H. M. A.; AMARAL, R. C.; GANDRA, C. R. P.; HAGIWARA, M. K.; FERNANDES, W. R. dermatitis in dogs caused by *Malassezia pachydermatis* . *Ars Vet*, v. 4. p. 63-68, 1988.

LEGENDRE, A.M.; ROHRBACH, B.W.; TOAL, R.L.; RINALDI, M. G.; GRACE, L. L.; JONES, J. B. Treatment of blastomycosis with itraconazole in 112 dogs. *J Vet Intern Med*, v.10, n.6, p.365-371, 1996.

LOBELL, R.; WEINGARTEN, A.; SIMMONS, R. Um novo agente para o tratamento da otite externa canina. *A Hora Vet*, v.88, p.29-33, 1995.

LODDER, J.; KERGER-VAN-RIJ, N.J.W. Genus 3. *Pityrosporum* Sabouraud. In: *The Yeasts, a taxonomic study*, 1st edn. North-Holland, Amsterdam, p. 440–445, 1952.

LORENZI, H; MATOS, F. J. A. *Plantas Mediciniais no Brasil: Nativas e Exóticas*. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2002.

MACHADO, M. L. S.; APPELT, C. E.; FERREIRO, L.; GUILLOT, J. Otites e dermatites por *Malassezia* spp em cães e gatos. *Clínica Veterinária*, n. 44, p. 27-34, 2003.

MACHADO, M. L. S., FERREIRO, L., FERREIRA, R. R., CORBELLINI, L. G., DEVILLE, M., BERTHELEMY, M., GUILLOT, J. *Malassezia* dermatitis in dogs in Brazil: diagnosis, evaluation of clinical signs and molecular identification. *Vet. Dermatol.*, v. 22, n. 4, p. 46-52, 2010.

MANAVATHU, E.K.; CUTRIGHT, J.L.; LOEBENBERG, D. and CHANDRASEKAR P. H. A comparative study of the *in vitro* susceptibilities of clinical and laboratory-selected resistant isolates of *Aspergillus* spp. to amphotericin B, itraconazole, voriconazole and posaconazole (SCH 56592). *J Antimicrob Chemother*, v.46, n.2, p.229-234, 2000.

MANOHAR, V.; INGRAM, C.; GRAY, J.; TALPUR, N. A.; ECHARD, B. W.; BAGCHI, D. and PREUSS, H. G. Antifungal activities of origanum oil against *Candida Albicans*. *Molecular and cellular Biochemistry*, v. 228, n. 1/2, p. 111-117, 2001.

MAYSER, P.; HAZE, P.; PAPAVALASSILIS, C.; PICKEL, M.; GRUENDER, K.; GUÉHO, E. Differentiation of *Malassezia* spp. selectivity of cremophor EL, castor oil and ricinoleic acid for *Malassezia furfur*. *Br J Dermatol*, v.137, p.208–213, 1997.

MASSURE, O.; MINOUI, A.; LEGALL, P.; et al. Etude prospective de la colonisation des catheters vasculaires par les levures *Malassezia*. *J Mycol Méd*, v.7, p.33–36, 1997.

MCDOUGALL P.N.; FLEMING, P. J.; SPELLER, D. C. E.; DAISH, P. and SPEIDEL, B. D. Neonatal systemic candidiasis: a failure to respond to intravenous miconazole in two neonates. *Archives of Disease in Childhood*. v. 57, n. 11, p. 884-886.

MIRANDA, K.C.; DE ARAUJO, C.R.; COSTA C.R.; PASSOS, X. S.; FERNANDES, O. F. L.; SILVA, M. R. R. Antifungal activities of azole agents against the *Malassezia* species. *Int J Antimicrob Agents*, v.29, p.281–284, 2007.

MUIR, D.; MARTIN, P.; KENDALL, K.; MALIK, R. Invasive hyphomycotic rhinitis in a cat due *Metarhizium anisopliae*. *Med Mycol*, v.36, n1, p.51-54, 1998.

NAHAS, C. R. Contribuição ao estudo da pitirosporose canina. São Paulo, 1997. 98 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, 1997.

NARDONI, S.; MANCIANTI, F.; CORAZZA, M.; RUM, A. Occurrence of *Malassezia* species in healthy and dermatologically diseased dogs. *Mycopathology*, v. 157, p. 383-388, 2004.

NEGRONI, R.; RUBINSTEIN, P.; HERRMANN, A. and GIMENEZ, A. Results of miconazole therapy in twenty-eight patients with paracoccidioidomycosis (South American blastomycosis). *Proceedings of the Royal Society of Medicine*. v. 70, Suppl 1, p. 24-28, 1977.

NIMURA; NIWANO, Y.; YASHIDUKA, S.; FUKUMOTO, R. Comparison of m vitro antifungal activities of topical antimicrotics launched in 1990 in Japan *Intern J Antimicrob agents*, v. 18, p. 173-178, 2001.

NOBRE, M. O.; MEIRELLES, M. C. A.; GASPAR, L. F.; PEREIRA, D.; SCHRAMM, R.; SCHUCH, L. F.; SOZA, L. *Malassezia pachydermatis* e outros agentes infecciosos nas otites externas e dermatites em cães. *Ciência Rural*, v. 28, n. 3, p. 447-452, 1998.

PLANT, J. D.; ROSENKRANTZ, W. S.; GRIFFIN, E. C. factores associated with and prevalence of high *Malassezia pachydermatis* numbers on dog skin. *J Am Vet Med Assoc*, v. 201, n. 6, p. 879-882, 1992.

PLOTNICK, A.N.; BOSHOVEN, E.W.; ROSYCHUK, R.A. Primary cutaneous coccidioidomycosis and subsequent drug eruption to itraconazole in a dog. *J Am Anim Hosp Assoc*, v.33, n.2, p.139-143, 1997.

POWELL, D.A.; AUNGST, J.; SNEDDEN, S.; HANSEN, N.; BRADY, M. Broviac catheter-related *Malassezia furfur* sepsis in five infants receiving intravenous fat emulsions. *J Pediatr*, v.105, p.987-990, 1984.

POZZATTI, P.; SCHEID, L.A.; SPADER, T.B.; ATAYDE, M. L.; SANTURI, J. M.; AVES, S. H. *In vitro* activity of essential oils extracted from plants used as spices against fluconazole-resistant and fluconazole-susceptible *Candida* spp. *Can J Microbiol*, v.54, p.950-956, 2008.

PRADO, M.R., BRITO, E.H., BRILHANTE, R.S.; CORDEIRO, R. A.; LEITE, J. J. G.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Subculture on potato dextrose agar as a complement to the broth microdilution assay for *Malassezia pachydermatis*. J Microbiol Methods, v.75, p.341–343, 2008.

QUALE, J.M.; LANDMAN, D.; ZAMAN, D.; BURNEY, S.; SATHE, S.S. *In vitro* activity of *Cinnamomum zeylanicum* against azole resistant and sensitive *Candida* species and a pilot study of cinnamon for oral candidiasis. American Journal of Chinese Medicine, v. 24, n. 2, p.103-9, 1996

RAO, A.; ZHANG, Y.; MUEND, S. and RAO, R. Mechanism of antifungal activity of terpenoid phenols resembles calcium stress and inhibition of the tor pathway. Antimicrob. Agents Chemother, DOI: 10.1128/AAC.01050-10, 2010.

RIBEIRO, V. L. DA S.; PEREIRA, S. A.; DIECKMAN, A. M. Ocorrência de *Malassezia pachydermatis* em número elevado nos condutos auditivos externos sãos e com otite externa. In: INTEGRAÇÃO CIENTÍFICA DA MEDICINA VETERINÁRIA DO CONE SUL, I, 1997. Gramado. Anais... Gramado-RS: SOVERGS. p. 149, 1997.

RICHARDSON and M.D.; WARNOCK, D.W. Fungal infection – Diagnosis and management. London : Blackwell, 1993. Cap.3: Antifungal drugs: 17-43.

RICHET, H.M.; McNEIL, M.M.; EDWARDS, M.C. and JARVIS, W.R. Cluster of *Malassezia furfur* pulmonary infections in infants in a neonatal intensive-care unit. J Clin Microbiol, v.27, p.1197–1200, 1989.

RIGOPOULOS, D.; IOANNIDES, D.; KALOGEROMITROS, D. Pimecrolimus cream 1% versus. betamethasone 17-valerate 0.1% cream in the treatment of seborrhoeic dermatitis: a randomized open-label clinical trial. Br J Dermatol, v.151, p.1071–1075, 2004.

ROBIN, C. Histoire naturelle des vegetaux parasites. Bailliére, Paris, 1853.

ROLAN, P.E.; SOMOGYI, A. A.; DREW, M. J. R.; COBAIN, W. G.; SOUTH, D.; BOCHNER, F. Phenytoin intoxication during treatment with parenteral miconazole. British Medical Journal (Clinical Research Ed). v. 287, n. 6407, p. 1760, 1983.

RUBIN, A.I.; BAGHERI, B.; SCHER.; R.K. Six novel antimycotics. Am J Clin Dermatol, v.3, p.71–81, 2002.

RUKAYADI, Y. & HWANG, J.K. *In vitro* anti-*Malassezia* activity of xanthorrhizol isolated from *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. *Lett Appl Microbiol*, v.44, p.126–130, 2007.

SALGUEIRO, L.R.; CAVALEIRO, C.; GONÇALVES, M. J.; PROENÇA da CUNHA, A. Antimicrobial activity and chemical composition of the essential oil of *Lippia graveolens* from Guatemala. *Planta Medica*, v. 69, n. 1, p. 80-3, 2003.

SANDE, M.A.; MANDELL, G.L. Drogas antimicrobianas – Drogas antimicóticas e antivirais. In: GOODMAN, L.; GILMAN, A.G. *As bases farmacológicas da terapêutica*. Rio de Janeiro : Guanabara, 1987. Cap.54. p.799-807.

SAWYER, P.R.; BROGDEN, R.N.; PINDER, R.M., et al. Clotrimazole: a review of its antifungal activity and therapeutic efficacy. *Drugs*, v.9, n.6, p.424-447, 1975.

SCHIOTTFELDT, F. S.; TRAMONTIN, S. W.; NAPPI, B. P.; SANTOS, J. I. Reclassificação taxonômica de espécies do gênero *Malassezia*: revisão de literatura sobre as implicações clínico laboratoriais. *J Bras Pato Med Laborat*, v. 38, n. 3, p.199-204, 2002.

SCHLEMAN, K.A.; TULLIS, G.; BLUM, R. Intracardiac mass complicating *Malassezia furfur* fungemia. *Chest* 118:1828–1829, 2000.

SHATTUCK, K.E.; COCHRAN, C.K.; ZABRANSKY, R.J.; PASARELL, L.; DAVIS, J. C.; MALLOY, M. H. Colonization and infection associated with *Malassezia* and *Candida* species in a neonatal unit. *J Hosp Infect*, v.34, p.123–129, 1996.

SIDRIM, J. J. C. & ROCHA, M.F.G. *Micologia Médica á Luz de Autores contemporâneos*. São Paulo: Guanabara Koogan, 2004.

SIEGEL, J. *Estatística não-paramétrica*. 1 ed. São Paulo: McGraw do Brasil; p.313, 1981.

SILVA, P. Fármacos antifúngicos. In: P. Silva (ed.), *Farmacologia*, 7th ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil, 2006, p. 1072-1074.

SIMÕES, C. M. O. (organizador) et al. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC, 1999.

SLOOF, W. C. *Pityrosporum sabouraud*. apud: LOODER, J. ed. *The yeasts*, 2a ed, Amsterdam, North-holland, p. 1167-1168, 1971.

SMITH, S.A.; ANDEWS, G.; BILLER, D.S. Management of nasal aspergilosis in a dog with a single, noninvasive intranasal infusion of clotrimazole. *J Am Anim Hosp Assoc*, v.34, n.6, p.487-492, 1998.

SMITH-PALMER, A; STEWART, J.; FYFE, L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Letters in Applied Microbiology*, v. 26, n. 2, p. 118-122, 1998.

SOUZA, M. P. et al. Constituintes químicos ativos de plantas medicinais brasileiras. Fortaleza: Edições UFC/Laboratório de Produtos Naturais, 1991.

SUGITA, T.; SUTO, H.; UNNO, T.; TSUBOT, R.; OGAWA, H.; SHINODA, T.; NISHIKAWA, A. Molecular analysis of *Malassezia* microflora on the skin of atopic dermatitis patients and healthy subjects. *J Clin Microbiol*, v.39, n.10, p. 3486-3490, 2001.

SUGITA, T.; TAQKASHIMA, M.; KODAMA, M.; TSUBOL, R.; NISHIKAWA, A. description of a new yeast species, *Malassezia* japónica, and its detection in patients with atopic dermatitis and healthy subjects. *J Clin Microbiol*, v. 41, n. 10, p. 4695-4699, 2003.

SUGITA, T.; TAJIMA, M.; AMAYA, M.; TSUBOI, R.; NISHIKAWA, A. Genotype analysis of *Malassezia restricta* as the major cutaneous flora in patients with atopic dermatitis and healthy subjects. *Microbiol Immunol*, v.48, p.755-759, 2004.

SUNG, J.P.; GRENDahl, J.G.; LEVINE, H.B. Intravenous and intrathecal miconazole therapy for systemic mycoses. *The Western Journal of Medicine*. v. 126, n. 1, p. 5-13, 1977.

TAMPIERI, M.P. et al. The inhibition of *Candida albicans* by selected essential oils and their major components. *Mycopathologia*, v. 159, n. 3, p. 339-45, 2005.

TIRODKER, U.; NATARO, J.; SMITH, S.; LasCasas, L.; FAIRCHILD, K. D. Detection of fungemia by polymerase chain reaction in critically ill neonates and children. *J Perinatol*, v.23, p.117-122, 2003.

ULTEE, A.; BENNIK, M.H. and MOEZELAAR, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol*, v.68, p.1561-1568, 2002.

WEIDMAN, F.D. Exfoliative dermatitis in the Indian rhinoceros (*Rhinoceros unicornis*), white description of a new species: *Pityrosporum pachydermatis*. *Rep Lab Mus Comp Zoo Soc Philadelphia*, p. 36-43, 1925.

WEISS, S.J.; SCHOCH, P.E.; CUHNA, B.A. *Malassezia furfur* fungemia associated with central venous catheter lipid emulsion infusion. *Heart Lung*, v.20, p.87–90, 1991.

WELBEL, S. F.; MCNEIL, M. N.; PRAMANICK, A. Nosocomial *Malassezia pachydermatis* bloodstream infections in a neonatal intensive care unit. *Pediatric Infect Dis J*, v. 13, p. 104-108, 1994.

WESELER, A.; GEISS, H.K.; SALLER, R.; et al. Antifungal effect of Australian tea tree oil on *Malassezia pachydermatis* isolated from canines suffering from cutaneous skin disease. *Schweiz Arch Tierheilkd*, v.144, p.215–221, 2002.

WU, T. et al. Enhanced Extracellular Production of Aspartyl Proteinase, a Virulence factor, by *Candida albicans* isolates following growth in subinhibitory concentrations of fluconazole. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. v. 44, n. 5, p. 1220-1208, 2000.