

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

**SUSCETIBILIDADE *IN VITRO* DE *Malassezia*
pachydermatis FRENTE A AGENTES ANTIFÚNGICOS
E FRAÇÕES DE ÓLEOS ESSENCIAIS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Karine Bizzi Schlemmer

Santa Maria, RS, Brasil.

2014

**SUSCETIBILIDADE *IN VITRO* DE *Malassezia pachydermatis*
FRENTE A AGENTES ANTIFÚNGICOS E FRAÇÕES DE
ÓLEOS ESSENCIAIS**

Karine Bizzi Schlemmer

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.

2014

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Schlemmer, Karine Bizzi

Suscetibilidade in vitro de malassezia pachydermatis frente a agentes antifúngicos e frações de óleos essenciais / Karine Bizzi Schlemmer.-2014.

137 p.; 30cm

Orientador: Janio Moraes Santurio

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, RS, 2014

1. Malassezia pachydermatis 2. Suscetibilidade 3. In vitro I. Santurio, Janio Moraes II. Título.

© 2014

Todos os direitos autorais reservados a Karine Bizzi Schlemmer. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

E-mail: kabizzi@hotmail.com

**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

**SUSCETIBILIDADE *IN VITRO* DE *Malassezia pachydermatis* FRENTE A
AGENTES ANTIFÚNGICOS E FRAÇÕES DE ÓLEOS ESSENCIAIS**

elaborada por
Karine Bizzi Schlemmer

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Farmacologia

COMISSÃO EXAMINADORA:

Janio Moraes Santurio, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Sydney Hartz Alves, Dr. (UFSM)

Érico Silva de Loreto, Dr. (UFSM)

Santa Maria, 14 março de 2014.

AGRADECIMENTOS

A meus pais, Alceu e Neiva, pelo amor, carinho, ensinamentos e apoio em todas as horas. Por estarem ao meu lado em todas as minhas decisões.

As minhas irmãs, Josiane e Francine, pela amizade e incentivo, e por estarem sempre presentes.

Ao meu noivo, Lucas, pelo seu amor, apoio, por acreditar na minha capacidade e por não me deixar desanimar nos momentos mais difíceis.

Ao meu orientador, Prof^o Janio Santurio, pela oportunidade, pela confiança em meu trabalho, orientação, ensinamentos, por toda amizade, carinho e apoio demonstrados, que proporcionaram a realização deste trabalho.

A todos os colegas e amigos do LAPEMI, que me proporcionaram bons momentos de amizade, divertimento, companheirismo e troca de informações. Em especial agradeço a minha grande amiga, Francielli Kunz de Jesus, pelos ensinamentos desde o início, e pela amizade e carinho.

Aos colegas e amigos do Laboratório 4229, pelo apoio e amizade durante todos os anos de convivência.

A todos os meus amigos e amigas que estiveram ao meu lado durante a realização deste trabalho. Em especial as minhas queridas amigas Carine Zimmermann, Andressa Alves do Amaral e Gabrielle Black pelo enorme carinho sempre. Ao Régis pelo apoio e ajuda na realização deste trabalho.

Ao Prof^o Sydney Hartz Alves, por todos os ensinamentos, apoio, amizade e compreensão.

A Prof^a. Daniela Leal pela amizade, confiança, incentivo e principalmente pela oportunidade de iniciar na pesquisa.

Ao programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Maria e a CAPES pelo apoio financeiro fornecido através de bolsa de estudos.

“Insisto na caminhada.
O que não dá é pra ficar parado.
Se amanhã o que eu sonhei não for bem aquilo, eu tiro um arco-íris da cartola. E refaço. Colo.
Pinto e bordo.
Porque a força de dentro é maior.
Maior que todo mal que existe no mundo.
Maior que todos os ventos contrários.
É maior porque é do bem. E nisso, sim, acredito até o fim.
O destino da felicidade me foi traçado no berço.”

Caio Fernando de Abreu

RESUMO

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

SUSCETIBILIDADE *IN VITRO* DE *Malassezia pachydermatis* FRENTE A AGENTES ANTIFÚNGICOS E FRAÇÕES DE ÓLEOS ESSENCIAIS

Autora: Karine Bizzi Schlemmer

Orientador: Dr. Janio Morais Santurio

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 14 de março de 2014.

Malassezia pachydermatis é uma levedura pertencente à microbiota normal de animais e, usualmente, apontada como responsável por otites externas e recentemente por diversas formas de dermatites, principalmente em cães. Este estudo teve como objetivo avaliar a suscetibilidade *in vitro* de 26 isolados de *M. pachydermatis* frente aos antifúngicos fluconazol, itraconazol, cetoconazol, clotrimazol, miconazol, terbinafina e nistatina, e combinações desses com timol, carvacrol e cinamaldeído, através do método de “checkerboard”, baseado no documento M27-A3. Também foram avaliadas a atividade do itraconazol, cetoconazol e clotrimazol, em 20 isolados de *M. pachydermatis*, através da exposição simultânea e sequencial desses agentes utilizando-se a técnica de disco-difusão. Isoladamente, as concentrações inibitórias mínimas (CIMs) para o fluconazol variaram de 1-64 µg/mL, para o itraconazol 0,01-1 µg/mL, para o cetoconazol 0,01-0,5 µg/mL, para o clotrimazol 0,5-32 µg/mL, para o miconazol 2-32 µg/mL, para a terbinafina 0,12-32 µg/mL e para a nistatina 16-64 µg/mL. Altas taxas de sinergismo foram observadas nas combinações de nistatina + timol (88,46%), nistatina + carvacrol (88,46%), nistatina + cinamaldeído (73,07%), clotrimazol + timol (69,23%), clotrimazol + carvacrol (69,23%), miconazol + timol (65,38%), miconazol + carvacrol (76,92%) e miconazol + cinamaldeído (65,38%). No entanto, fluconazol + timol (53,84%), fluconazol + carvacrol (46,15%), fluconazol + cinamaldeído (65,38%), itraconazol + timol (61,53%), itraconazol + carvacrol (69,23%), itraconazol + cinamaldeído (65,38%), terbinafina + timol (73,07%), terbinafina + carvacrol (65,38%), terbinafina + cinamaldeído (73,07%) e clotrimazol + cinamaldeído (61,53%) tiveram altas taxas de indiferença. Cetoconazol combinado com timol, carvacrol e cinamaldeído apresentaram as maiores taxas de antagonismo (42,3%). A exposição prévia de *M. pachydermatis* ao itraconazol resultou em uma diminuição da zona de inibição, quando comparado com o itraconazol e cetoconazol usados simultaneamente ($p < 0,01$). Por outro lado, a exposição prévia do clotrimazol aumentou significativamente a zona de inibição ($p < 0,001$), quando comparado à exposição simultânea de clotrimazol e itraconazol. As associações de maior relevância merecem avaliação *in vivo*, a fim de verificar o potencial das mesmas no tratamento de infecções por *M. pachydermatis*.

Palavras-chave: *Malassezia pachydermatis*. Suscetibilidade. *In vitro*.

ABSTRACT

Master's Degree Dissertation
Postgraduate Program in Pharmacology
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

***IN VITRO* SUSCEPTIBILITY OF *Malassezia pachydermatis* AGAINST ANTIFUNGAL AGENTS AND ESSENTIAL OIL FRACTIONS**

Author: Karine Bizzi Schlemmer
Adviser: Dr. Janio Morais Santurio
Place and Date: March 14th, 2014, Santa Maria.

The yeast *Malassezia pachydermatis* belongs to the normal microbiota of animals, and is usually implicated as responsible for otitis media and recently by various forms of dermatitis, mainly in dogs. This study aimed to evaluate the *in vitro* susceptibility of 26 *M. pachydermatis* isolates against the antifungals fluconazole, itraconazole, ketoconazole, clotrimazole, miconazole, terbinafine and nystatin, and to the combinations of these with thymol, carvacrol and cinnamaldehyde by the checkerboard method, based on document M27-A3. The activity of itraconazole, ketoconazole and clotrimazole against 20 isolates of *M. pachydermatis*, through simultaneous and sequential exposure of these agents, was also evaluated by the disk-diffusion technique. The minimum inhibitory concentration (MIC) for fluconazole ranged from 1-64 µg/mL, itraconazole 0.01-1 µg/mL, ketoconazole 0.01-0.5 µg/mL, clotrimazole 0.5-32 µg/mL, miconazole 2-32 µg/mL, terbinafine 0.12-32 µg/mL and nystatin 16-64 µg/mL. High rates of synergism were observed in the combinations of nystatin + thymol (88.46%), nystatin + carvacrol (88.46%), nystatin + cinnamaldehyde (73.07%), clotrimazole + thymol (69.23%), clotrimazole + carvacrol (69.23%), miconazole + thymol (65.38%), miconazole + carvacrol (76.92%) and miconazole + cinnamaldehyde (65.38%). However, high rates of indifference were observed in the combinations of fluconazole + thymol (53.84%), carvacrol + fluconazole (46.15%), fluconazole + cinnamaldehyde (65.38%), thymol + itraconazole (61.53%), carvacrol + itraconazole (69.23%), itraconazole + cinnamaldehyde (65.38%), terbinafine + thymol (73.07%), terbinafine + carvacrol (65.38%), terbinafine + cinnamaldehyde (73.07%) and clotrimazole + cinnamaldehyde (61.53%). Ketoconazole combined with thymol, carvacrol and cinnamaldehyde had the highest rates of antagonism (42.3%). The prior exposure of *M. pachydermatis* to itraconazole resulted in a reduction of the inhibition halo when compared with itraconazole and ketoconazole used simultaneously ($p < 0.01$). Moreover, prior exposure of clotrimazole significantly increased the zone of inhibition ($p < 0.001$) when compared to the simultaneous exposure of itraconazole and clotrimazole. The most significant associations deserve *in vivo* evaluation in order to verify their potential in the treatment of infections caused by *M. pachydermatis*.

Keywords: *Malassezia pachydermatis*. Susceptibility. *In vitro*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Suscetibilidade ($\mu\text{g/mL}$) dos isolados de <i>Malassezia pachydermatis</i> frente a fluconazol (FCZ), itraconazol (ITZ), cetoconazol (CTZ), clotrimazol (CLZ), miconazol (MCZ), nistatina (NST) e terbinafina (TRB) isoladamente	89
Tabela 2 - MIC ($\mu\text{g/mL}$) de 26 isolados de <i>Malassezia pachydermatis</i> , frente a timol (TI), carvacrol (CAR) e cinamaldeído (CIN)	90
Tabela 3 - Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de fluconazol combinado com timol em isolados de <i>Malassezia pachydermatis</i>	91
Tabela 4 - Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de itraconazol combinado com timol em isolados de <i>Malassezia pachydermatis</i>	92
Tabela 5 - Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de cetoconazol combinado com timol em isolados de <i>Malassezia pachydermatis</i>	93
Tabela 6 - Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de clotrimazol combinado com timol em isolados de <i>Malassezia pachydermatis</i>	94
Tabela 7 - Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de miconazol combinado com timol em isolados de <i>Malassezia pachydermatis</i>	95
Tabela 8 - Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de nistatina combinada com timol em isolados de <i>Malassezia pachydermatis</i>	96
Tabela 9 - Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de terbinafina combinada com timol em isolados de <i>Malassezia pachydermatis</i>	97
Tabela 10 - Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de fluconazol combinado com carvacrol em isolados de <i>Malassezia pachydermatis</i>	98
Tabela 11 - Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de itraconazol combinado com carvacrol em isolados de <i>Malassezia pachydermatis</i>	99
Tabela 12 - Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de cetoconazol combinado com carvacrol em isolados de <i>Malassezia pachydermatis</i>	100
Tabela 13 - Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de clotrimazol combinado com carvacrol em isolados de <i>Malassezia pachydermatis</i>	101
Tabela 14 - Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de miconazol combinado com carvacrol em isolados de <i>Malassezia pachydermatis</i>	102
Tabela 15 - Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de nistatina combinada com carvacrol em isolados de <i>Malassezia pachydermatis</i>	103

Tabela 16 - Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de terbinafina combinada com carvacrol em isolados de <i>Malassezia pachydermatis</i>	104
Tabela 17 - Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de fluconazol combinado com cinamaldeído em isolados de <i>Malassezia pachydermatis</i>	105
Tabela 18 - Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de itraconazol combinado com cinamaldeído em isolados de <i>Malassezia pachydermatis</i>	106
Tabela 19 - Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de cetoconazol combinado com cinamaldeído em isolados de <i>Malassezia pachydermatis</i>	107
Tabela 20 - Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de clotrimazol combinado com cinamaldeído em isolados de <i>Malassezia pachydermatis</i>	108
Tabela 21 - Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de miconazol combinado com cinamaldeído em isolados de <i>Malassezia pachydermatis</i>	109
Tabela 22 - Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de nistatina combinada com cinamaldeído em isolados de <i>Malassezia pachydermatis</i>	110
Tabela 23 - Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de terbinafina combinada com cinamaldeído em isolados de <i>Malassezia pachydermatis</i>	111
Tabela 24 - Interações resultantes da combinação de fluconazol (FLZ) e timol (THI) frente aos isolados de <i>Malassezia pachydermatis</i>	112
Tabela 25 - Interações resultantes da combinação de itraconazol (ITZ) e timol (THI) frente aos isolados de <i>Malassezia pachydermatis</i>	113
Tabela 26 - Interações resultantes da combinação de cetoconazol (CTZ) e timol (THI) frente aos isolados de <i>Malassezia pachydermatis</i>	114
Tabela 27 - Interações resultantes da combinação de clotrimazol (CLZ) e timol (THI) frente aos isolados de <i>Malassezia pachydermatis</i>	115
Tabela 28 - Interações resultantes da combinação de miconazol (MCZ) e timol (THI) frente aos isolados de <i>Malassezia pachydermatis</i>	116
Tabela 29 - Interações resultantes da combinação de nistatina (NST) e timol (THI) frente aos isolados de <i>Malassezia pachydermatis</i>	117
Tabela 30 - Interações resultantes da combinação de terbinafina (TRB) e timol (THI) frente aos isolados de <i>Malassezia pachydermatis</i>	118
Tabela 31 - Interações resultantes da combinação de fluconazol (FLZ) e carvacrol (CRV) frente aos isolados de <i>Malassezia pachydermatis</i>	119
Tabela 32 - Interações resultantes da combinação de itraconazol (ITZ) e carvacrol (CRV) frente aos isolados de <i>Malassezia pachydermatis</i>	120

Tabela 33 - Interações resultantes da combinação de cetoconazol (CTZ) e carvacrol (CRV) frente aos isolados de <i>Malassezia pachydermatis</i>	121
Tabela 34 - Interações resultantes da combinação de clotrimazol (CLZ) e carvacrol (CRV) frente aos isolados de <i>Malassezia pachydermatis</i>	122
Tabela 35 - Interações resultantes da combinação de miconazol (MCZ) e carvacrol (CRV) frente aos isolados de <i>Malassezia pachydermatis</i>	123
Tabela 36 - Interações resultantes da combinação de nistatina (NST) e carvacrol (CRV) frente aos isolados de <i>Malassezia pachydermatis</i>	124
Tabela 37 - Interações resultantes da combinação de terbinafina (TRB) e carvacrol (CRV) frente aos isolados de <i>Malassezia pachydermatis</i>	125
Tabela 38 - Interações resultantes da combinação de fluconazol (FLZ) e cinamaldeído (CIN) frente aos isolados de <i>Malassezia pachydermatis</i>	126
Tabela 39 - Interações resultantes da combinação de itraconazol (ITZ) e cinamaldeído (CIN) frente aos isolados de <i>Malassezia pachydermatis</i>	127
Tabela 40 - Interações resultantes da combinação de cetoconazol (CTZ) e cinamaldeído (CIN) frente aos isolados de <i>Malassezia pachydermatis</i>	128
Tabela 41 - Interações resultantes da combinação de clotrimazol (CLZ) e cinamaldeído (CIN) frente aos isolados de <i>Malassezia pachydermatis</i>	129
Tabela 42 - Interações resultantes da combinação de miconazol (MCZ) e cinamaldeído (CIN) frente aos isolados de <i>Malassezia pachydermatis</i>	130
Tabela 43 - Interações resultantes da combinação de nistatina (NST) e cinamaldeído (CIN) frente aos isolados de <i>Malassezia pachydermatis</i>	131
Tabela 44 - Interações resultantes da combinação de terbinafina (TRB) e cinamaldeído (CIN) frente aos isolados de <i>Malassezia pachydermatis</i>	132
Tabela 45 - Resumo dos halos de inibição de 20 isolados de <i>M. pachydermatis</i> à exposição sequencial de KTZ e ITZ, através de disco-difusão	133
Tabela 46 - Resumo dos halos de inibição de 20 isolados de <i>M. pachydermatis</i> à exposição sequencial de KTZ e CTZ, através de disco-difusão.....	134
Tabela 47 - Resumo dos halos de inibição de 20 isolados de <i>M. pachydermatis</i> à exposição sequencial de ITZ e CTZ, através de disco-difusão	135

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 O gênero <i>Malassezia</i>	21
2.2 <i>Malassezia pachydermatis</i>	22
2.3 Agentes Antifúngicos	24
2.3.1 Poliênicos	25
2.3.1.1 Nistatina.....	26
2.3.2 Azólicos	26
2.3.2.1 Fluconazol	27
2.3.2.2 Itraconazol	28
2.3.2.3 Cetoconazol	29
2.3.2.4 Clotrimazol	30
2.3.2.5 Miconazol	30
2.3.3 Alilaminas.....	31
2.3.3.1 Terbinafina.....	31
2.4 Óleos essenciais	32
2.4.1 Timol e carvacrol.....	33
2.4.2 Cinamaldeído.....	34
3 OBJETIVOS	37
3.1 Objetivo geral	37
3.2 Objetivos específicos	37
4 MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1 Micro-organismos	39
4.2 Avaliação da susceptibilidade de <i>M. pachydermatis</i> frente aos antifúngicos	40
4.2.1 Agentes antifúngicos	40
4.2.2 Preparação dos inóculos e realização da técnica	40
4.2.3 Leitura dos testes	41
4.3 Avaliação da susceptibilidade de <i>M. pachydermatis</i> frente ao timol, carvacrol e cinamaldeído	41
4.3.1 Diluição do timol, carvacrol e cinamaldeído.....	42
4.3.2 Avaliação das combinações.....	42
4.4 Avaliação da exposição simultânea e sequencial de antifúngicos através da técnica de disco- difusão	43
4.4.1 Preparação do meio	43
4.4.2 Preparação do inóculo	43
4.4.3 Ensaios de disco-difusão	44
4.4.4 Leitura dos halos de inibição	45

5 MANUSCRITO 1 - IN VITRO ACTIVITY OF THIMOL, CARVACROL AND CINNAMALDEHYDE ALONE AND IN COMBINATION WITH ANTIFUNGALS AGAINST <i>Malassezia pachydermatis</i>	47
6 MANUSCRITO 2 - SEQUENTIAL EXPOSURE OF <i>Malassezia pachydermatis</i> TO AZOLES: ENHANCED OR DECREASED ACTIVITY?.....	59
7 DISCUSSÃO.....	63
8 CONCLUSÕES	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
10 LISTA DE TABELAS	89
11 ANEXOS.....	137

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Malassezia* caracteriza-se por leveduras lipofílicas que são encontradas na superfície cutânea e nas mucosas de mamíferos e aves. São conhecidas atualmente 14 espécies, sendo elas, *M. furfur*, *M. sympodialis*, *M. pachydermatis*, *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. restricta*, *M. slooffiae*, *M. caprae*, *M. equina*, *M. dermatis*, *M. japonica*, *M. yamatoensis*, *M. nana* e mais recentemente *M. cuniculi* (LOPES, 2008; CABANES et al., 2011). *M. pachydermatis* é a única espécie não-lipodependente, sendo frequentemente isolada da microbiota da pele e conduto auditivo de cães e gatos, apresentando caráter oportunista (GUILLOT; GHÉHO, 1995; GIRÃO et al., 2004). Essas leveduras se apresentam morfológicamente como esféricas, elipsoidais ou alongadas, que se reproduzem por brotamento unipolar (GUILLOT et al., 1998).

As leveduras do gênero *Malassezia* utilizam lipídios como fonte de carbono e necessitam da suplementação com ácidos graxos de cadeia longa para o crescimento *in vitro*, sendo assim denominadas lipodependentes. A exceção é *M. pachydermatis*, cuja suplementação é desnecessária, já que se trata da única espécie do gênero não-lipodependente (GUÉHO et al., 1996).

Apesar de *M. pachydermatis* se tratar de um micro-organismo zoofílico e geralmente considerado um agente não transmissível, tem ocorrido relatos de micoses sistêmicas em imunocomprometidos com transmissão a partir de animais. Além disso, também há a ocorrência de formação de biofilme por esta levedura em materiais hospitalares, representando uma preocupação atual nos hospitais e UTIs neonatais (CHANG et al., 1998; MORRIS et al., 2005; BIRCHARD; SHERDING, 2008; FIGUEIREDO et al., 2012).

Após o surgimento dos derivados azólicos esses têm se tornado os principais fármacos utilizados no tratamento da malasseziose (FARIA, 2010). Entretanto, tem sido descrito que o uso indiscriminado dos azóis ocasionou o surgimento de resistência em espécies suscetíveis (BRITO et al., 2009). Além disso, tem se observado o surgimento de resistência cruzada entre os antifúngicos do grupo dos azóis, devido à estrutura similar, por exemplo, com relação ao itraconazol e o posaconazol (GOODMAN; GILMAN, 1996; WILLIAMS et al., 2002; FERREIRA et al., 2005; QIAO et al., 2008).

Em resposta às falhas da terapêutica antifúngica, vários autores têm buscado estratégias que garantam o sucesso da atividade antifúngica. Entre essas estratégias a

combinação de fármacos tem merecido atenção (MUKHERJEE et al, 2005). Neste contexto, ressalta-se a importância de analisar as interações entre agentes antifúngicos, timol, carvacrol e cinamaldeído, frente a *M. pachydermatis*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O gênero *Malassezia*

O gênero *Malassezia* pertence à divisão Deuteromycotina, classe Blastomycetes, ordem Cryptococcales e a família Cryptococcaceae, caracterizando-se por possuir células esféricas ou elipsoides (forma de garrafa), com brotamento único em base larga. As características morfológicas do gênero incluem parede celular espessa, com diversas camadas, apresentando protuberâncias na parte interna da parede, correspondendo à invaginação da membrana plasmática. A reprodução é assexuada com produção de blastoconídeos por um processo monopolar repetitivo ou por brotamento, formando uma célula globosa, oval ou cilíndrica, adquirindo formato alongado quando se desliga da célula-mãe (COUTINHO, 2003).

Em 1853, Robin denominou o agente causador da pitiríase versicolor em humanos de *Microsporum furfur*, por associá-lo ao *M. audouinii* 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) descreveu detalhadamente essas estruturas fúngicas que receberam a denominação descrita por Robin (GUILLOT; GUÉHO, 1995b).

Em 1925, Weidman isolou a levedura de um rinoceronte indiano (*Rhinoceros unicornis*) com lesões de pele, sendo primeiramente denominada *Pityrosporum pachydermatis* devido à semelhança com *Pityrosporum* humano e com a característica de não apresentar lipodependência (GUILLOT; BOND, 1999). Em 1934, Lodder estudou essa característica e concluiu que a levedura isolada por Weidman crescia razoavelmente bem em meios de cultura sem suplementação com lipídios, diferindo das espécies *P. ovale* e *P. orbiculare*, cujo crescimento em tais condições era inexistente (GUILLOT; BOND, 1999).

Em 1955, Gustafson substituiu a nomenclatura de *P. pachydermatis* por *P. canis* e foi estabelecido, em 1974, 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 *M. pachydermatis* (GUILLOT; BOND, 1999).

As primeiras espécies reconhecidas do gênero *Malassezia* foram *M. furfur* e *M. pachydermatis*, e por décadas o gênero *Malassezia* foi limitado a essas duas espécies, uma lipodependente (*M. furfur*) e outra não lipodependente (*M. pachydermatis*) (SCHIOTTFELDT et al., 2002). Simmons e Guého, em 1990, identificaram a terceira espécie do gênero: *M. sympodialis*, reconhecida através de técnicas moleculares.

Em 1993, a taxonomia do gênero *Malassezia* foi reconhecida através do sequenciamento do rRNA (GUILLOT; GUÉHO, 1993). Em 1996, Guého et al. descreveram e nomearam sete espécies de *Malassezia*: *M. furfur*, *M. sympodialis*, *M. obtusa*, *M. globosa*, *M. restricta*, *M. slooffiae* e *M. pachydermatis*, essa última, a única lipídeo não dependente. Mais tarde, outras espécies de *Malassezia* foram descritas, incluindo *M. dermatis* (SUGITA et al., 2002), *M. japonica* (SUGITA et al., 2003), *M. nana* (HIRAI et al., 2004), *M. yamatoensis* (SUGITA et al., 2004), *M. equina* e *M. caprae* (CAFARCHIA et al., 2008).

Atualmente, o gênero *Malassezia* inclui catorze espécies, treze das quais são dependentes de lipídios e são mais frequentemente isoladas de seres humanos, ruminantes e equinos (*M. furfur*, *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. restricta*, *M. slooffiae*, *M. sympodialis*, *M. Dermatis*, *M. nana*, *M. japonica*, *M. yamatoensis*, *M. equina*, *M. caprae* e *M. cuniculi*). Por sua vez, a espécie *M. pachydermatis*, considerada lipofílica não dependente é comumente isolada de cães e gatos (CABAÑES et al., 2011).

2.2 *Malassezia pachydermatis*

M. 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 (GUSTAFFSON, 1960; BOND et al., 1995; BOND; ANTONY, 1995; KENNIS et al., 1996; CARLOTTI, 1997; BOND et al., 2000; NASCENTE et al., 2004).

As leveduras do gênero *Malassezia* em humanos estão associadas a quadros patológicos como pitiríase versicolor, dermatite seborreica e dermatite atópica, que anteriormente eram apenas associadas à espécie *M. furfur* (SCHIOTTFELDT et al., 2002). *M. pachydermatis* também tem sido referida como causadora de infecções sistêmicas no homem,

particularmente em pacientes imunodeprimidos e em neonatos internados em unidades de terapia intensiva, que fazem uso de alimentação parenteral lipídica através de cateter venoso (LAROCCO et al., 1988; WELBEL et al., 1994).

Em cães, a malasseziose está associada principalmente à otite externa, na qual há formação excessiva de cerume e prurido com presença de exsudato marrom escuro a negro, causando eritema do meato acústico externo (NASCENTE, 2006). Pela alta frequência de isolamento no conduto auditivo de cães com otite externa e na pele de animais com dermatite pruriginosa, torna-se um importante invasor patogênico secundário em várias espécies animais (BOND et al., 1995). Assim como os ácaros do gênero *Demodex sp.* e as bactérias do gênero *Staphylococcus sp.*, a levedura *M. pachydermatis* é constituinte da microbiota sapróbia cutânea de cães e gatos, embora seja um agente oportunista (NAHAS, 1997).

Os sinais clínicos são caracterizados por prurido moderado a intenso, alopecia local ou generalizada, escoriações, eritema e seborréia, geralmente apresentando odor corporal desagradável, rançoso e seborreico, pele espessada e áspera (WILKINSON; HARVEY, 1996). Nos casos crônicos podem ser observados hiperpigmentação, liquenificação e hiperkeratose. As lesões podem se desenvolver nos espaços interdigitais, parte ventral do pescoço, axilas, região perineal e dobras cutâneas (MEDLEAU; HNILICA, 2003).

Morfologicamente, *M. pachydermatis* se apresenta como células isoladas ou em grupos, medindo 1-3µm X 2-4µm, com formato oval ou com germinação unipolar de base larga, adquirindo o formato de “garrafa” (MÜLLER et al., 1989; LACAZ et al., 2002).

O isolamento de *M. pachydermatis* é realizado em meio de cultivo ágar Saboraud, acrescido de cloranfenicol e ciclohexamida, incubado sob temperaturas entre 27°C e 37°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). *M. pachydermatis* é particularmente sensível ao frio e a maioria das cepas tornam-se inviáveis após três meses em temperatura à 4°C (GUILLOT; BOND, 1999).

As colônias são opacas de coloração amarelo creme, passando a marrom alaranjado conforme o envelhecimento. A superfície é redonda ou em forma de cúpula, a medida transversal é de 1-3mm e a textura é seca, friável e granulosa, algumas vezes gordurosa (GUILLOT et al., 1996). Após sete dias de incubação à 37°C as leveduras são mantidas vivas na temperatura ambiente.

Apesar dessas características, pode-se também identificar a espécie *M. pachydermatis* através de 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

Apesar do crescente aumento do arsenal antifúngico nos últimos anos, o tratamento das infecções fúngicas ainda é limitado. Os agentes antifúngicos utilizados no tratamento de infecções fúngicas causadas por *M. pachydermatis* incluem principalmente os polienos e os derivados azólicos.

As semelhanças entre as células fúngicas e as células mamíferas dificultam o desenvolvimento da antifungoterapia, pois ambas são células eucarióticas com organelas semelhantes, incluindo-se também a replicação do DNA e síntese proteica. Por outro lado, as diferenças entre as paredes celulares dos mamíferos e dos fungos permitem que os processos de síntese dos componentes da parede celular dos fungos tornem-se alvo para antifúngicos, sem comprometer as células mamíferas. Por isto, inibidores da biossíntese da parede celular bacteriana, como as penicilinas, foram utilizados há anos devido à baixa toxicidade associada. Outros alvos de antifúngicos incluem agentes inibidores da biossíntese de DNA, a perturbação dos fusos mitóticos e interferência no metabolismo intermediário. A diferença mais amplamente explorada entre as células de mamíferos e a dos fungos é o fato da membrana celular fúngica conter ergosterol e outros esteróis, em oposição ao colesterol presente nas células dos mamíferos (BRANCH, 1988; PAPPAS et al., 2009).

A terapia antifúngica inicialmente era pouco efetiva e não específica, tendo sido o iodeto de potássio o primeiro composto utilizado em 1903, e até hoje ainda desempenha importante papel dentro da micologia, uma vez que continua sendo usado no tratamento da esporotricose, tanto nos animais como 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, sendo até hoje o fármaco de eleição no tratamento desta micose, uma vez que não atua em fungos leveduriformes (SIDRIM; ROCHA, 2004).

No início da década de 1950 surgem os derivados poliênicos, quando a nistatina aparece como opção terapêutica para infecções por leveduras, em particular *Candida sp.* O surgimento da anfotericina B, em 1956, representou um grande avanço no tratamento de

doenças fúngicas (HARDMAN; LIMBIRD, 1996; COMO; DISMUKERS, 1994), já que foi o primeiro fármaco eficaz no tratamento de micoses sistêmicas, sendo até hoje usado como "padrão ouro" na terapêutica antifúngica (ABAD et al., 2007). Entretanto, é um medicamento que apresenta grandes efeitos colaterais (HARDMAN; LIMBIRD, 1996; COMO; DISMUKERS, 1994).

Na mesma época foi descoberta a atividade antimicótica de um derivado pirimidínico, denominado flucitocina, 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), e o cetoconazol, que por mais de uma década foi considerado a droga de escolha no tratamento prolongado de micoses sistêmicas. Mais recentemente surgiram os triazólicos, representados pelo fluconazol (1990), itraconazol (1992), voriconazol (2002) entre outros ainda em estudo. Estes últimos deixaram de exercer tantos efeitos deletérios no hospedeiro além de apresentarem propriedades farmacocinéticas mais favoráveis produzindo uma terapia mais segura e eficaz. Surgiram ainda na década de 90 os derivados morfolínicos, as alilaminas e as equinocandinas, ampliando as opções terapêuticas em micoses (SIDRIM; ROCHA, 2004).

O tratamento das infecções fúngicas causadas por *M. pachydermatis* geralmente baseia-se na administração tópica de azóis ou nistatina, combinado com antibióticos e glicocorticoides (BOND, 2010). A aplicação tópica de nistatina, tiabendazol, cetoconazol, miconazol ou clotrimazol também é indicado (MACHADO et al., 2003).

Em infecções graves, a doença exige tratamentos longos ou altas doses de agentes antifúngicos (BOND, 2010). As atuais opções terapêuticas incluem a terapia sistêmica com cetoconazol ou itraconazol (NEGRE et al., 2008; NUTTALL et al., 2009; PATEL; FORYTHER, 2008) e/ou terapia tópica com derivados de azóis ou sulfeto de selênio e clorexidina (MASON; EVANS, 1991).

2.3.1 Poliênicos

Até a década de 1940, relativamente poucos agentes antifúngicos estavam disponíveis para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas. Neste contexto, o desenvolvimento dos

antifúngicos poliênicos representou um grande avanço na micologia médica (MAERTENS, 2004).

Os dois poliênicos disponíveis no mercado são nistatina e anfotericina B, cujo mecanismo de ação se baseia na desestabilização da membrana plasmática do fungo. Devido a sua toxicidade, a nistatina é usada somente para tratamento tópico (BEM-AMI et al., 2008).

2.3.1.1 Nistatina

A nistatina é um antifúngico extraído de culturas de *Streptomyces*, que foi descoberta em 1950 por Hazen e Brown, pesquisadoras dos Laboratórios de Pesquisas do Departamento de Saúde do Estado de Nova Iorque, EUA (TAVARES, 2001; GROESCHKE et al., 2006; HAC-WYDRO; DYNAROWICZ-LATKA, 2006a; HAC-WYDRO; DYNAROWICZ-LATKA, 2006b). A nistatina é praticamente insolúvel em água (MARTINDALE, 1999; TAVARES, 2001; TALLURY et al., 2007), etanol e clorofórmio, porém, é bem solúvel em dimetilformamida (MARTINDALE, 1999).

A ação antifúngica da nistatina ocorre através da sua interação com o ergosterol, o que provoca uma desorganização funcional devido à formação de canais transmembranares (TAVARES, 2001; HAC-WYDRO; DYNAROWICZ-LATKA, 2006a; SILVA et al., 2006). Essas alterações levam à perda da permeabilidade seletiva das células fúngicas, que culmina em danos celulares, e posteriormente, na morte celular (TAVARES, 2001; DOROCKA-BOBKOWSKA et al., 2003; CROY; KNOW, 2004; GROESCHKE et al., 2006; SILVA et al., 2006).

2.3.2 Azólicos

Os azólicos formam um grupo de compostos sintéticos, com estruturas químicas semelhantes e com amplo espectro de atividade antifúngica. São antifúngicos caracterizados por apresentarem um anel pentagonal na sua estrutura molecular, unido por uma ligação carbono-nitrogênio com outros anéis aromáticos. Estes agentes antifúngicos são classificados em imidazólicos quando o anel pentagonal possui três átomos de carbono e dois de nitrogênio

(miconazol e cetoconazol) e triazólicos quando o anel possui dois átomos de carbono e três de nitrogênio (fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol e ravuconazol) (CATALÁN; MOONTEJO, 2006).

Seu mecanismo de ação se faz também através da alteração da permeabilidade da membrana, essa alteração decorre da inibição da síntese do ergosterol, pois os azólicos se ligam às enzimas do complexo citocromo P450 do fungo e inibem a desmetilação do lanosterol, um precursor do ergosterol. Os triazólicos representam uma classe de novos antifúngicos com grande eficiência e baixa toxicidade. Possuem alta afinidade pelo citocromo P450 fúngico e baixa afinidade pelo citocromo P450 dos mamíferos. Em geral, os triazólicos demonstram um espectro de atividade muito mais amplo e reduzida toxicidade quando comparados aos imidazólicos (SPINOSA et al., 2002).

O tempo de meia vida dos azólicos é relativamente longo, possibilitando fazer a terapia em uma única dose ou duas doses diárias. Dentre os principais efeitos colaterais que os azólicos apresentam estão a hepatotoxicidade, intolerância gastrointestinal e hipersensibilidade. Cetoconazol pode causar ginecomastia e irregularidades menstruais (TAVARES, 2001).

Os azólicos em geral inibem uma grande variedade de fungos, entre eles dermatófitos, leveduras, *Aspergillus spp*, *Cladosporium spp*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Madurella mycetomatis*, *Mucor spp*, *Paracoccidioides brasiliensis* e *Phialophora spp*. (GILMAN et al., 1980).

2.3.2.1 Fluconazol

O fluconazol é um antifúngico relativamente recente, com ampla distribuição em todo o organismo. Ao contrário dos imidazóis e do itraconazol, o fluconazol atinge concentrações elevadas no líquido cefalorraquidiano, sendo, portanto, o medicamento de escolha para o tratamento da maioria das meningites fúngicas (SLAGLE, 2005).

O fluconazol cobriu muitas deficiências dos imidazólicos, por ser altamente solúvel em água, não ser alterado por mudanças na acidez gástrica, possuir menor risco de hepatotoxicidade, podendo ser administrado tanto por via oral, quanto intravenosa. Possui uma excelente biodisponibilidade, apresenta boa penetração cérebro-espinhal e alcança níveis de quase 80% no sangue (HAJJEH et al., 2004; COLOMBO et al., 2007). 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 (BENNETT, 2006).

2.3.2.2 Itraconazol

O itraconazol é um triazólico que apresenta atividade antifúngica contra espécies de *Candida sp.*, *Malassezia sp.*, *Cryptococcus neoformans*, *Blastomyces dermatitidis*, *H. capsulatum*, *C. immitis* e dermatófitos (BOSSCHE et al., 2003). Possui consideráveis vantagens sobre o fluconazol no tratamento de aspergilose e esporotricose, entretanto, o fluconazol demonstra um perfil farmacológico e toxicológico mais favorável (TERRELL, 1999).

Itraconazol é um agente antifúngico usado no tratamento de doenças causadas por fungos em humanos e também no tratamento da dermatofitose em gatos (RIGOPOULOS et al., 2004). Em gatos, a administração desse antifúngico por um período de até nove meses não induziu o aparecimento de reações adversas. A administração de doses elevadas de itraconazol produz efeitos embriotóxicos, também causando toxicidade maternal; portanto, como medida de segurança, não se recomenda o uso desse antifúngico durante a gestação (PAPICH et al., 2003; COSTA; GÓRNIK, 2006).

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 (GAMBICHLER et al., 2005). A eficácia da administração de 5 mg/kg por via oral a cada dois dias, durante três 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).

O itraconazol é administrado por via oral e, após absorção, sofre extenso metabolismo hepático. Estudos de farmacocinética mostraram que níveis terapêuticos ativos de itraconazol em humanos são mantidos por muito mais tempo em alguns tecidos infectados do que no plasma (BOSSCHE et al., 2003). É altamente lipossolúvel, com meia vida de 36 horas, sendo excretado na urina (BENNETT, 2003). 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 do fármaco nos tecidos queratinizados, especialmente na

pele, são cinco vezes superiores aos níveis plasmáticos (ARENAS, 1993; RICHARDSON; WARNOCK, 1993).

2.3.2.3 Cetoconazol

O cetoconazol mostra-se eficiente contra micoses superficiais e profundas (LACAZ et al., 2002). Entretanto, é comum a ocorrência de recidiva após tratamento aparentemente bem-sucedido (SILVA, 2006). Abrange desde *Malassezia* e outros dermatófitos, resistentes ou não à griseofulvina, até vários agentes de micoses profundas, destacando-se seu papel no tratamento da paracoccidioidomicose e da histoplasmose (LACAZ et al., 2002). Foi o primeiro azólico de uso oral no tratamento de micoses sistêmicas e até os dias de hoje, é utilizado em micoses dermatológicas e não dermatológicas na medicina veterinária de pequenos animais (JAHAM et al., 2000; FARIAS; GIUFRIDA, 2002).

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. Distribui-se amplamente por todos os tecidos e líquidos teciduais, porém só atinge concentrações terapêuticas no SNC quando administrado em doses altas (SILVA, 2006). O principal efeito adverso é a hepatotoxicidade, que é rara, mas que pode se tornar fatal. Outros efeitos colaterais que podem ocorrer consistem em distúrbios gastrintestinais e prurido (BENNETT, 2006). Em cães, tem-se relatado inapetência, prurido e alopecia como efeitos indesejáveis produzidos pelo cetoconazol. Observa-se ainda a elevação de enzimas hepáticas, aconselhando-se, portanto, monitorar os efeitos hepatotóxicos do cetoconazol através de dosagem sérica de transaminases hepáticas (APPELT; CAVALCANTE, 2008).

A absorção do cetoconazol é facilitada por pH ácido; assim, o aumento do pH estomacal, através de administração de antiácidos e antagonistas histaminérgicos H₂ (por exemplo, cimetidina e ranitidina), diminui a absorção deste antifúngico (COSTA; GÓRNIK, 2006). O cetoconazol é uma droga de segunda linha, por possuir menor afinidade pelas membranas fúngicas, quando comparada com o itraconazol e o fluconazol. Além disso, o cetoconazol acarreta maior toxicidade, pois possui maior afinidade pelas membranas celulares dos mamíferos (VALDÉS, 2005).

2.3.2.4 Clotrimazol

O clotrimazol é metabolizado principalmente por via hepática. Os efeitos colaterais mais comuns incluem 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 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% é indicado para cães no tratamento de otites externas com envolvimento de *M. pachydermatis* (LOBELL et al., 1995).

2.3.2.5 Miconazol

Miconazol é bastante utilizado 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 sanguíneas e hiponatremia (SILVA, 2006).

O miconazol é um imidazol de amplo espectro de atividade antifúngica e antibacteriana, particularmente em cocos Gram-positivos (*Staphylococcus* e *Streptococcus*). Este antifúngico é comumente utilizado por via tópica e, raramente, por via intravenosa, sendo a administração por esta última via restrita ao tratamento de infecções sistêmicas graves, pois desencadeia muitas reações adversas. Não é administrado por via oral, pois a absorção é muito pequena (COSTA; GÓRNIK, 2006).

Devido aos efeitos colaterais produzidos pela administração parenteral do miconazol, seu uso em micoses profundas nunca deve ser a primeira escolha. Entre os efeitos adversos

observados após a aplicação tópica do miconazol, são descritos queimação, prurido e irritação (COSTA; GÓRNIK, 2006).

2.3.3 Alilaminas

Os antifúngicos da classe das alilaminas (terbinafina e naftifina) também atuam na biossíntese do ergosterol, porém inibindo a enzima esqualeno-epoxidase. O mecanismo de ação se dá pela inibição de diferentes etapas na via de síntese do ergosterol, anteriores àquelas nas quais os derivados azólicos atuam. O sítio de inibição está centrado na esqualeno epoxidação, produzindo um acúmulo de precursores e ausência de outro intermediário do esterol, levando à morte fúngica (CARRILLO-MUÑOZ et al., 2006).

2.3.3.1 Terbinafina

A terbinafina é um antifúngico oral ou tópico usado para tratar dermatófitos e onicomicose, e tem sido avaliado também em combinações com outros agentes (VAZQUEZ, 2003). Terbinafina é um composto fungicida ceratinofílico, altamente lipofílico, pertencente ao grupo das alilaminas (COSTA; GÓRNIK, 2002). É altamente efetiva contra dermatófitos *in vitro* e *in vivo* (GHANNOUM; RICE, 1999; DAVIS; BALFOUR, 1995), bem como contra fungos filamentosos, dimórficos e dematiáceos, e algumas espécies de leveduras (BALFOUR; FAULDS, 1992). Atua especificamente numa etapa precoce da biossíntese do ergosterol (GHANNOUM et al., 1999), inibindo a enzima esqualeno-epoxidase, resultando em deficiência de esterol na membrana celular fúngica e acúmulo intracelular tóxico de esqualeno (N'DIAYE et al., 2006), resultando em morte celular. Também é metabolizada no fígado pelo sistema citocromo P-450 e os metabólitos são excretados na urina (BENNET, 2003).

A terbinafina não interfere no metabolismo de hormônios ou outros mecanismos, liga-se fortemente às proteínas plasmáticas, difundindo-se rapidamente através da derme e concentrando-se no estrato córneo lipofílico. Em humanos, menos de 5% da dose são absorvidos após aplicação tópica e a biotransformação resulta em metabólitos sem atividade fúngica excretados pela urina, com meia-vida de eliminação de 17 horas. Os efeitos colaterais

são leves ou moderados e temporários e os sintomas mais frequentes são gastrointestinais ou reações cutâneas sem gravidade (RICHARDSON; WARNOCK, 1993).

2.4 Óleos essenciais

Os óleos essenciais são originados do metabolismo secundário das plantas e possuem composição química complexa, destacando-se a presença de terpenos e fenilpropanoides (GONÇALVES et al., 2003; SILVA et al., 2003). Os constituintes químicos dos óleos aromáticos variam desde hidrocarbonetos terpênicos, alcoóis simples, fenóis, aldeídos, éteres, ácidos orgânicos, ésteres, cetonas, lactonas, cumarinas, até compostos contendo nitrogênio e enxofre (SIMÕES et al., 2004).

Estudos demonstram que cerca de 60% dos óleos essenciais possuem propriedades antifúngicas e 35% exibem propriedades antibacterianas (BHAVANANI; BALLOW, 1992). Vários estudos têm comprovado o efeito de compostos isolados, extraídos de óleos essenciais de plantas (ABDELGALEIL et al., 2008).

Carvacrol e timol, componentes majoritários do óleo essencial de *O. vulgare*, têm recebido ênfase na pesquisa de atividade antimicrobiana de óleos essenciais, de modo que a presença destes componentes, de forma isolada ou em combinação, é reconhecida como marcador de potencial antimicrobiano (FARIAS-ALVES et al., 2003).

O cinamaldeído, isolado a partir de *Cinnamomum zeylanicum*, tem sido identificado como o principal componente com atividade antimicrobiana da casca da canela (SINGH et al., 1995; UNLU et al., 2010). O gênero *Cinnamomum* é composto por cerca de 250 espécies, sendo a espécie *C. zeylanicum* uma das mais importantes devido ao valor apresentado pelos óleos essenciais, extraído tanto das folhas como da casca (YANG et al., 2005). Estudos sobre as atividades bioquímicas do *Cinnamomum* comprovam seu potencial, que inclui atividade antimicrobiana e antioxidante (SINGH et al., 2007).

2.4.1 Timol e carvacrol

O timol e o carvacrol são fenóis monoterpênicos biosintetizados em plantas a partir do γ -terpineno e p-cimeno. Por isso, estes últimos estão sempre presentes em óleos essenciais que contêm timol e carvacrol. Além disso, intermediários biosintéticos também podem estar presentes, como: terpinen-4-ol, álcool cumino e p-cimen-8-ol (BASER; DEMIRCI, 2007).

Timol e carvacrol são conhecidos por sua atividade antimicrobiana de amplo espectro, a qual foi alvo de algumas investigações *in vitro* (DORMAN; DEANS, 2000; LAMBERT et al., 2001) e *in vivo* (ADAM et al., 1998; MANOHAR et al., 2001). Botelho et al. (2007) relataram que timol e carvacrol inibem efetivamente o crescimento de patógenos orais como *Streptococcus mutans* e *C. albicans*, apresentando atividade antibacteriana e antifúngica. Nostro et al. (2007) demonstraram que o óleo essencial do orégano e seus principais constituintes, timol e carvacrol, inibiram o crescimento de biofilmes pré-formados de *Staphylococcus aureus* e *S. epidermidis* e interferiram com a formação desses biofilmes durante o crescimento planctônico.

O timol é encontrado abundantemente no óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham., o “alecrim-pimenta”, um exemplar típico do Nordeste brasileiro. Estudos anteriores demonstraram que o óleo essencial de espécimes nativos do Nordeste brasileiro possui cerca de 60% de timol em sua composição (FONTENELLE et al., 2007). Além disso, o timol também é encontrado no óleo essencial de alguns membros do gênero *Thymus* e *Origanum*, da família Lamiaceae, como *T. vulgaris* (tomilho) e *O. vulgare* (orégano) (HUDAIB et al., 2002). O timol tem sido usado no tratamento de enfermidades da pele e por inalação, associado a outras substâncias voláteis, para tratar enfermidades respiratórias (KORDALI et al., 2008).

O carvacrol, um isômero de posição do timol, é também encontrado no óleo essencial de *O. vulgare* (TIAN; LAI, 2006) bem como de outras espécies do mesmo gênero, como *O. minutiflorum* (SARER et al., 1996) e *O. onites* (VOKOU et al., 1988), compondo valores acima de 92% do seus óleos essenciais.

O composto fenólico carvacrol apresenta-se como o componente majoritário do óleo essencial de orégano (VALERO; SALMENRÓN, 2003) e, possivelmente, pode ser o principal responsável pela destacável atividade antimicrobiana deste óleo. Esses componentes apresentam capacidade de aumentar a permeabilidade da membrana citoplasmática microbiana causando uma considerável perda de ATP citoplasmático. Esse aumento de

permeabilidade pode estar relacionado a sua capacidade de interagir com a membrana citoplasmática, onde pode se dissolver na bicamada lipídica alinhando-se entre as cadeias de ácidos graxos. Tal distorção da estrutura física poderia causar a expansão e desestabilização da membrana citoplasmática, aumentando sua fluidez e resultando no incremento de sua permeabilidade passiva (ULTEE; SMID, 2001).

O carvacrol inibiu o crescimento de várias cepas de bactérias, por exemplo, *Escherichia coli* (DU et al., 2008) e *Bacillus cereus*. Sua baixa toxicidade, juntamente com o seu sabor e cheiro agradáveis, sugerem seu uso como aditivo alimentar para evitar a contaminação bacteriana (ULTEE; SMID, 2001). O carvacrol também provocou danos à membrana celular da bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, eo contrário de outros terpenos, foi capaz de inibir a proliferação da mesma (COX; MARKHAM, 2007).

Acredita-se, que o potencial antimicrobiano de compostos fenólicos, como carvacrol e timol, se apresente intimamente relacionado à presença de um grupo hidroxila (OH) no anel fenólico, particularidade que lhes confere um alto poder reativo (ULTEE et al., 2002). Em cepas de *S. aureus*, estes compostos inibem a atividade da enzima ATPase ligada à membrana citoplasmática (CEYLAN; FUNG, 2004).

Os compostos fenólicos são capazes de dissolverem-se na membrana microbiana, e, desta forma, penetrarem dentro da célula onde podem interagir com mecanismos essenciais para o metabolismo microbiano (MARINO et al., 2001). Perturbação da membrana citoplasmática, ruptura do fluxo de elétrons, perturbação do transporte ativo, inibição de atividade de enzimas, inativação da bomba de sódio e potássio e coagulação do conteúdo citoplasmático são alguns mecanismos envolvidos na promoção do efeito antimicrobiano do carvacrol e do timol. Acredita-se que nem todos esses mecanismos ocorram de forma separada, de modo que alguns deles, possivelmente, possam ser ativados como consequência de outros mecanismos previamente desencadeados (COX et al., 2001).

2.4.2 Cinamaldeído

O óleo essencial de canela, bem como a canela em pó, são empregados na preparação de alguns medicamentos na área farmacêutica (RUSSO et al., 2008). Seu óleo essencial é rico em cinamaldeído, acompanhado do ácido cinâmico, eugenol e linalol (LORENZI; MATOS, 2002).

O cinamaldeído é o principal constituinte do óleo essencial da casca de canela, *C. zeylanicum*, espécie da família Lauraceae que compreende cerca de 250 espécies distribuídas na Índia, China, Sri Lanka e Austrália. A composição do óleo essencial é muito variável, de 60 a 90% de aldeído cinâmico e 10% de eugenol na casca, 10% de aldeído cinâmico e 60 a 95% de eugenol nas folhas (ALBUQUERQUE, 1989). O cinamaldeído apresenta várias atividades como, por exemplo, antioxidante, antimicrobiana e antifúngica (SINGH et al., 2007).

Segundo Kim et al. (2012), o trans-cinamaldeído aumentou a atividade antifúngica *in vitro* da anfotericina B frente a *Candida* spp. e *Cryptococcus neoformans*. A anfotericina B liga-se ao ergosterol da membrana plasmática fúngica, alterando sua integridade e aumentando a permeabilidade desta. No entanto, este não é o único mecanismo de ação da anfotericina B; esta também induz ao estresse oxidativo na célula fúngica (OKAMOTO et al., 2004; AN et al., 2009; GONZÁLEZ-PÁRRAGA et al., 2011). O trans-cinamaldeído também provoca perturbações na homeostase do sistema antioxidante do fungo, ou seja, interfere no sistema de resposta ao estresse oxidativo fúngico, aumentando a atividade antifúngica da anfotericina B (KIM et al., 2012).

Shreaz et al. (2011) observaram que o cinamaldeído possui atividade fungicida e não fungioestática, através dos métodos de disco-difusão e “time kill curve” (curva de morte). Este estudo ressalta que o cinamaldeído, além de inibir a biossíntese do ergosterol, inibe a bomba de prótons (H^+ -ATPase) presente na membrana plasmática dos fungos. Este complexo enzimático gera um gradiente de membrana permitindo o transporte de nutrientes na célula fúngica. Portanto, a inibição desta bomba produz acidificação e morte celular.

Um estudo avaliou a atividade antifúngica do óleo de *C. cassia* (alto teor de cinamaldeído, 92,2%) e também sua atividade combinada à anfotericina B. O óleo essencial exibiu potente atividade frente a *C. albicans* e potencializou o efeito da anfotericina B (GIORDANI et al., 2006). Sinergismo *in vitro* também foi observado na associação de cinamaldeído e fluconazol frente a *Aspergillus fumigatus* e *Trichophyton rubrum* (KHAN; AHMAD, 2011).

Pozzatti et al. (2008), relataram que isolados de *C. albicans* resistentes ao fluconazol demonstraram sensibilidade ao óleo de canela. Um achado interessante nesse estudo foi o fato de que as CIMs dos isolados resistentes foram menores que para os isolados sensíveis ao fluconazol.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar combinações entre agentes antifúngicos, timol, carvacrol e cinamaldeído para definir interações sinérgicas, indiferentes ou antagônicas, *in vitro*, frente a isolados de *M. pachydermatis*.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar a suscetibilidade de *M. pachydermatis* frente aos fármacos fluconazol, itraconazol, cetoconazol, clotrimazol, miconazol, nistatina e terbinafina.

Avaliar a suscetibilidade de *M. pachydermatis* frente ao timol, carvacrol e cinamaldeído.

Investigar interações entre fluconazol, itraconazol, cetoconazol, clotrimazol, miconazol, nistatina e terbinafina com timol, carvacrol e cinamaldeído, para definir interações sinérgicas, indiferentes ou antagônicas frente a isolados de *M. pachydermatis* através do Índice de Concentração Inibitória Fracionária (ICIF).

Avaliar a susceptibilidade de isolados de *M. pachydermatis* ao itraconazol, cetoconazol e clotrimazol através da exposição sequencial e simultânea dessas drogas através da técnica de disco-difusão.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Micro-organismos

Foram utilizados 26 isolados de *M. pachydermatis* obtidos do conduto auditivo de cães. A distribuição das amostras, bem como os sinais clínicos, podem ser visualizados no Quadro 1.

Amostras	Sinais Clínicos
<i>Mp</i> 01	Otite
<i>Mp</i> 02	Otite
<i>Mp</i> 03	Otite
<i>Mp</i> 04	Otite
<i>Mp</i> 05	Otite
<i>Mp</i> 06	Otite
<i>Mp</i> 07	Otite
<i>Mp</i> 08	Sem sinais clínicos
<i>Mp</i> 09	Sem sinais clínicos
<i>Mp</i> 10	Sem sinais clínicos
<i>Mp</i> 11	Sem sinais clínicos
<i>Mp</i> 12	Sem sinais clínicos
<i>Mp</i> 13	Sem sinais clínicos
<i>Mp</i> 14	Sem sinais clínicos
<i>Mp</i> 15	Sem sinais clínicos
<i>Mp</i> 15	Sem sinais clínicos
<i>Mp</i> 17	Sem sinais clínicos
<i>Mp</i> 18	Sem sinais clínicos
<i>Mp</i> 19	Sem sinais clínicos
<i>Mp</i> 20	Sem sinais clínicos
<i>Mp</i> 21	Otite
<i>Mp</i> 22	Sem sinais clínicos
<i>Mp</i> 23	Otite
<i>Mp</i> 24	Sem sinais clínicos
<i>Mp</i> 25	Otite
<i>Mp</i> 26	Otite

Quadro 1 – Distribuição das 26 amostras de *M. pachydermatis* e sinais clínicos dos cães.

4.2 Avaliação da susceptibilidade de *M. pachydermatis* frente aos antifúngicos

A avaliação da susceptibilidade de *M. pachydermatis* frente aos fármacos antifúngicos foi realizada pelo método de microdiluição em caldo, seguindo o protocolo internacional M27-A3, para fungos leveduriformes, determinado pelo CLSI (2008). No presente estudo, a técnica foi adaptada para *M. pachydermatis*.

4.2.1 Agentes antifúngicos

Os antifúngicos utilizados foram: fluconazol (FLC, Pfizer Central Research, New York, EUA), itraconazol (ITZ, Janssen Beerse, Bélgica), clotrimazol (CTZ, Bayer Schering Pharma, New York, EUA), nitrato de miconazol (MNZ, Labware), cetoconazol (KTZ, Janssen Beerse, Bélgica), nistatina (Bristol-Myers Squibb Pharmaceuticals Research Institute, Wallingford, EUA) e terbinafina (TRB, Novartis[®], Basel, Suíça).

As soluções de fluconazol foram diluídas em água destilada estéril, enquanto que as demais soluções foram diluídas 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 para fluconazol (0,5 a 64 µg/mL), itraconazol (0,003 a 4 µg/mL), clotrimazol (0,125 a 16 µg/mL), miconazol (0,125 a 16 µg/mL), cetoconazol (0,003 a 4 µg/mL), nistatina (0,125 a 16 µg/mL) e terbinafina (0,125 a 16 µg/mL).

4.2.2 Preparação dos inóculos e realização da técnica

A partir de cultivos puros e com 48-72h de crescimento, no meio Dixon, obteve-se uma suspensão em solução salina acrescida de Triton, a qual foi ajustada em espectrofotômetro ($\lambda = 530$ nm) com transmitância de 90%. Após esta correção, a suspensão foi diluída (1:50) em água destilada estéril e novamente a 1:20 em caldo RPMI 1640 (Gibco

Laboratories) tamponado com ácido morfolinopropanossulfônico (MOPS) e acrescida de glicose, conforme o protocolo M27-A3 (CLSI, 2007).

Os testes foram realizados em microplacas de 96 poços. 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). As microplacas foram incubadas em estufa com temperatura controlada, a 35°C, durante 48 horas.

4.2.3 Leitura dos testes

Depois deste período foi realizada a leitura dos testes, determinando-se a CIM de cada fármaco, considerando a menor concentração na qual não houve crescimento leveduriforme.

Determinou-se ainda a CIM50 e a CIM90 (concentração de antifúngico capaz de inibir o crescimento de 50 e 90% dos isolados, respectivamente).

4.3 Avaliação da susceptibilidade de *M. pachydermatis* frente ao timol, carvacrol e cinamaldeído

No presente estudo, avaliou-se a atividade antifúngica do timol, carvacrol e cinamaldeído, obtidos comercialmente (Sigma Aldrich®, St. Louis, EUA), frente a 26 isolados de *M. pachydermatis*.

4.3.1 Diluição do timol, carvacrol e cinamaldeído

O timol, carvacrol e cinamaldeído foram solubilizados em metanol originando uma solução estoque na concentração de 640mg/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, 0,05 mg/mL e 0,025 mg/mL. Alíquotas de 100 µL das sete concentrações diferentes de cada fração foram dispensadas, sequencialmente, 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 e 25 µg/mL.

4.3.2 Avaliação das combinações

A avaliação da atividade antifúngica, quando dois agentes são combinados, foi obtida pelo método de “checkerboard”, baseado no documento M27-A3 (CLSI, 2008), com posterior determinação do ICIF (JOHNSON et al., 2004). Os testes foram realizados em caldo RPMI 1640 tamponado em pH 7 com MOPS.

As diluições dos agentes foram realizadas para que resultassem em uma concentração quatro vezes maior que a concentração final desejada. Isto se deve ao fato de que 50 µL de cada diluição de um determinado agente foi combinada a outros 50 µL de cada diluição do segundo agente; e a este volume foi somado 100 µL de inóculo em caldo RPMI 1640 depositados em cada poço da microplaca. As placas foram incubadas em estufa com temperatura controlada, a 35°C, durante 48 horas. Depois deste período foi realizada a leitura dos testes, que foram realizadas em dois sentidos; CIM A (menor concentração da droga A na combinação) e CIM B (menor concentração da droga B na combinação).

Para avaliar a interação entre os agentes, a concentração inibitória fracionária (CIF) foi calculada para cada combinação. As CIFs foram calculadas para cada agente pela divisão da concentração inibitória (ou efetiva) de cada agente na combinação, pela concentração

inibitória (ou efetiva) do agente sozinho. Os valores de CIF foram então somados para definir o índice de concentração inibitória fracionária (ICIF) resultante da combinação. Sinergismo foi definido como $ICIF \leq 0,5$. A indiferença será considerada quando $0,5 < ICIF \leq 4$, enquanto que antagonismo será definido quando $ICIF > 4$ (JOHNSON et al., 2004).

4.4 Avaliação da exposição simultânea e sequencial de antifúngicos através da técnica de disco- difusão

A exposição simultânea, ou seja, exposição da segunda droga após 15 minutos da inoculação das placas com o primeiro antifúngico, e a exposição sequencial, exposição da segunda droga após 16 horas da inoculação das placas com o primeiro antifúngico, foram realizadas por disco-difusão, de acordo com a metodologia descrita por Kontoyiannis et al. (2003), frente a 20 isolados de *M. pachydermatis*.

4.4.1 Preparação do meio

O meio utilizado no teste de disco-difusão foi o Ágar Muller Hinton, o qual foi reidratado em água destilada esterilizada, na concentração de 38g/mL e esterilizado em autoclave. A seguir, os antifúngicos (0, 0,003, 0,007, 0,01, 0,03 e 0,06 µg/mL), cetoconazol (0, 0,0009, 0,001, 0,003, 0,007 e 0,01 µg/mL) e clotrimazol (0, 0,25, 0,5, 1, 2 e 4 µg/mL) foram adicionados ao ágar não solidificado. Em seguida, alíquotas de 30 mL do Ágar Muller Hinton foram distribuídas em placas de Petri (90mm), de modo a obter-se volume suficiente para 4mm de espessura.

4.4.2 Preparação do inóculo

Todos os isolados a serem testados tiveram um cultivo recente realizado em ágar Dixon, por técnica de esgotamento, sendo incubados 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 (0,085% salina) acrescida de 0,05% de Tween, em tubos de hemólise esterilizados. A suspensão de leveduras 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.

4.4.3 Ensaio de disco-difusão

Amostras de cada inóculo previamente preparados no dia do ensaio foram homogeneamente distribuídas sobre a superfície do meio, com o auxílio de swab de algodão, semeando-se a suspensão de leveduras em três direções diferentes.

Para a análise simultânea dos antifúngicos, as placas contendo os antifúngicos no meio, foram inoculadas e ficaram em descanso por aproximadamente 15 minutos, permitindo a absorção do inóculo pela superfície do meio (KONTOYIANNIS et al., 2003). Posteriormente, os discos de papel estéreis de 6mm foram colocados no meio de cultivo, utilizando-se pinça esterilizada. Cada disco foi pressionado, suavemente, sobre a superfície do ágar com a ponta da pinça esterilizada. A seguir 10 μ L do segundo antifúngico foi adicionado nos discos, nas seguintes concentrações: itraconazol (10 μ g), cetoconazol (50 μ g) e clotrimazol (50 μ g). 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.

Para a análise da exposição sequencial dos antifúngicos, as placas contendo os antifúngicos no ágar foram semeadas e incubadas por 16h a 35°C (KONTOYIANNIS et al., 2003). Após esse período, os discos foram colocados no meio de cultivo e 10 μ L dos antifúngicos itraconazol, cetoconazol e clotrimazol foram adicionados sobre os discos, nas concentrações de 10 μ g, 50 μ g e 50 μ g respectivamente. As placas foram incubadas por mais 48h a 35°C, em estufa microbiológica.

4.4.4 Leitura dos halos de inibição

A leitura dos halos de inibição foi realizada após 48 e 72h de incubação, 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 ágar Muller Hinton.

**5 MANUSCRITO 1 - IN VITRO ACTIVITY OF THIMOL, CARVACROL
AND CINNAMALDEHYDE ALONE AND IN COMBINATION WITH
ANTIFUNGALS AGAINST *Malassezia pachydermatis***

Karine Bizzi Schlemmer¹, Francielli Pantella Kunz de Jesus², Andressa Alves do Amaral¹,
Gabrielle Black¹, Carine Eloise Prestes Zimmermann¹, Vanessa Machado¹, Sydney Hartz
Alves¹, Janio Morais Santurio¹

Submetido à revista Letters of Applied Microbiology

In vitro activity of thymol, carvacrol and cinnamaldehyde alone and in combination with antifungals against *Malassezia pachydermatis*

Karine Bizzi Schlemmer¹, Francielli Pantella Kunz de Jesus², Andressa Alves do Amaral¹,
Gabrielle Black¹, Carine Eloise Prestes Zimmermann¹, Vanessa Machado¹, Sydney Hartz
Alves¹, Janio Morais Santurio¹

¹Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

²Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV), Setor de Micologia, Faculdade de Veterinária (FAVET), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Address for correspondence:

Janio M. Santurio

Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Av. Roraima nº 1000, Prédio 20, sala 4139, Santa Maria - CEP 97105-900, RS, Brazil. Tel./fax: +55 55 3220-8906. E-mail: janio.santurio@gmail.com

Significance and impact of the study

This study provides the first demonstration of the *in vitro* antimicrobial activity of thymol, carvacrol and cinnamaldehyde, and of synergism when these compounds are combined with antifungal drugs against *M. pachydermatis*. These combinations might provide effective alternative treatments for *M. pachydermatis* due to their synergistic interactions.

Abstract

The fungi *Malassezia* spp. are normal commensal and occasional pathogens of skin and many veterinary species. We describe the *in vitro* activity of thymol, carvacrol and cinnamaldehyde alone and in combination with fluconazole, ketoconazole, itraconazole, clotrimazole, miconazole, terbinafine and nystatin against 26 isolates of yeast *Malassezia pachydermatis*. The assays were based on the M27-A3 technique developed by Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) and the checkerboard microdilution method. The main synergism observed was through the combination of nystatin+thymol (88.46%), nystatin+carvacrol (88.46%), miconazole+carvacrol (76.92%) and nystatin+cinnamaldehyde (73.07%). However, the antifungal activity of thymol, carvacrol and cinnamaldehyde against *M. pachydermatis* and the potential to generate synergistic combinations when are associated with antifungals were demonstrated. The synergisms that we observed *in vitro* against *M. pachydermatis* isolates are promising and warrant further analysis of their applications in experimental *in vivo* studies.

Keywords: *Malassezia pachydermatis*, thymol, carvacrol, cinnamaldehyde, synergism, *in vitro*.

Introduction

Malassezia spp. are normal commensal and occasional pathogens of human skin and many veterinary species (Batra et al. 2005; Bond 2010). Currently, the genus *Malassezia*

includes fourteen species, thirteen of which are lipid-dependent and most frequently recovered from humans, ruminants and horses (*M. furfur*, *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. restricta*, *M. slooffiae*, *M. sympodialis*, *M. dermatis*, *M. nana*, *M. japonica*, *M. yamatoensis*, *M. equine*, *M. caprae* and *M. cuniculi*) the non-lipid-dependent species, *M. pachydermatis*, is commonly recovered from dogs and cats (Cabañes et al. 2011). *M. pachydermatis* is part of the microbiota of both the ear canals and coats of dogs, cats and other species of animals (Chen and Hill 2005).

Treatment usually requires high doses of antifungal agents (Bond 2010). Antifungal triazoles are commonly used for treatment, and treatment should be continued until the clinical signs resolve, and the yeast are no longer observed during direct examination (Daigle 2007).

The antifungal activity of essential oils and their components, as well as their synergistic potential when associated with antifungals have been described in a considerable number of studies (Rózalska et al. 2011; Silva et al. 2011; Khan et al. 2012; Tabassum and Vidyasagar 2013). However, the *in vitro* susceptibility of *M. pachydermatis* to essential oils and their components alone or in combination with antifungal agents has not been described. In this context, this paper aims to assess the *in vitro* antimicrobial activity of thymol, carvacrol and cinnamaldehyde in combination with antifungal drugs against *M. pachydermatis* using the broth microdilution method standardised by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2008) in conjunction with a checkerboard technique for drug combination.

Results and discussion

Based on the parameters of susceptibility (MIC range, MIC₅₀, MIC₉₀ and geometric mean), which are shown in Table 1, strains exhibited lower MICs of fluconazole (1-64

µg/mL), itraconazole (0.01-1 µg/mL), ketoconazole (0.01-0.5 µg/mL), clotrimazole (0.5-32 µg/mL), miconazole (2-32 µg/mL), terbinafine (0.12-32 µg/mL) and nystatin (16-64 µg/mL). Table 2 shows the percentages of synergism, additivity and indifference that resulted from the combinations of thymol, carvacrol and cinnamaldehyde with fluconazole, itraconazole, ketoconazole, clotrimazole, miconazole, terbinafine and nystatin against the *M. pachydermatis* strains.

The highest synergistic interactions, based on the MIC values, were observed for the following combinations: nystatin+thymol (88.46%), nystatin+carvacrol (88.46%), miconazole+carvacrol (76.2%), nystatin+cinnamaldehyde (73.07%), clotrimazole+thymol (69.23%), clotrimazole+carvacrol (69.23%), clotrimazole+cinnamaldehyde (69.23%) and miconazole+thymol (65.38%). The other combinations produced synergistic interactions ranging from 11.53% to 46.15%. The highest percentages of indifference were observed for terbinafine combined with each of the three fractions of oils: thymol, carvacrol and cinnamaldehyde (approximately 70%). Antagonism effects were detected from the combinations of ketoconazole+thymol, ketoconazole+carvacrol and ketoconazole+cinnamaldehyde (approximately 40%), as well as the combinations of terbinafine+cinnamaldehyde (15.38%), terbinafine+thymol (7.69%), itraconazole+cinnamaldehyde (7.69%), terbinafine+carvacrol (3.84%) and fluconazole+cinnamaldehyde (3.84%) (Table 2).

This study demonstrated the *in vitro* antimicrobial activity of thymol, carvacrol and cinnamaldehyde as well as the synergistic potential of these compounds when combined with antifungal drugs. Among the associations analysed in this study, the most synergistic interactions against the *M. pachydermatis* strains were obtained through the combination of nystatin+thymol (88.46%), nystatin+carvacrol (88.46%), miconazole+carvacrol (76.92%) and nystatin+cinnamaldehyde (73.07%).

In our study, the nystatin+thymol and nystatin+carvacrol combinations showed the highest percentages of synergism against *M. pachydermatis*. Rosato et al. (2009) found synergistic interactions between nystatin and the essential oils of *Origanum vulgare*, *Pelargonium graveolens* and *Melaleuca alternifolia* against some *Candida* species.

In this context, it is important that studies investigate the mechanisms by which essential oils affect the pathogens such that the pathogens become more susceptible to antifungal compounds. This synergism may result in the use of lower effective doses of antifungal agents and/or cause resistant microorganisms to become susceptible, or at least more sensitive, to antifungal treatments.

Some previous studies reported that inhibition of microorganisms by essential oils seems to rely on different mechanisms of action (Aligiannis et al. 2001; Lambert et al. 2001; Sikkema et al. 1994; Sikkema et al. 1995; Trombetta et al. 2005). Toxin effects on membrane structure and function have been generally used to explain the antimicrobial action of essential oils and their monoterpenoid compounds (Kokkini et al. 1994; Sikkema et al. 1994; Sikkema et al. 1995). Some studies suggest that the antimicrobial action of essential oils may be a consequence of a negative effect on enzymes, including those involved in the production of energy and the synthesis of structural components of the microorganism, in addition to the destruction or inactivation of genetic material (Lambert et al. 2001; Trombetta et al. 2005).

Phenolic compounds present in essential oils may disturb membrane-embedded proteins and inhibit cellular respiration. Additionally, alterations in the ion-transport processes of the cell membrane and modifications in the activity of calcium channels can cause an increase in cell permeability and consequent release of vital intracellular constituents (Trombetta et al. 2005).

These results have direct impacts on the clinical treatment of *M. pachydermatis*. However, further studies using models of experimental malasseziosis are needed to reveal the

therapeutic efficacy of the *in vitro* synergism observed in this study, which can then be used to suggest the best treatment for malasseziosis.

In conclusion, we found that the combinations of nystatin with thymol, carvacrol and cinnamaldehyde may be effective alternatives for the treatment of *M. pachydermatis* because these combinations resulted in higher synergistic interactions. Additional studies using geographically and genetically diverse *M. pachydermatis* strains are needed for a better understanding of the susceptibility of this species to combinations of antifungal drugs and fractions essential oils.

Materials and methods

We evaluated 26 samples *M. pachydermatis* isolated from dogs with and without otitis. To perform the tests, the isolates were subcultured onto Dixon's media and incubated at 37°C for 48 hours.

The antifungal drugs fluconazole (FLC) (Pfizer Central Research, New York, NY), ketoconazole (KTZ) and itraconazole (ITZ) (Janssen Pharmaceutica®, São Paulo, Brazil), clotrimazole (CTZ) (Bayer Schering Pharma, New York, USA), miconazole nitrate (MCZ) (Labware), terbinafine (TRB) and nystatin (NYS) (Bristol-Myers Squibb Pharmaceuticals Research Institute, Wallingford, CT) were obtained commercially stock solution were diluted in dimethyl sulfoxide or distilled water and thymol (THY), carvacrol (CRV) and cinnamaldehyde (CI) (Sigma Aldrich®, St. Louis, USA) were obtained commercially and diluted in ethanol (640mg/ml, stock solutions) or distilled RPMI 1640® (1:100 work solutions).

RPMI-1640 medium employed was the broth; it was buffered with MOPS contained 2% dextrose. The inoculum was standardised by suspending the yeast (five colonies grown on Dixon's media) in saline solution containing Triton-X 100 (0.05%) and adjusted according to

M27-A3 protocol (CLSI 2008). All tests were performed in triplicate, and each series included a positive (diluted inoculum working solution) and a negative (RPMI-1640 alone) growth control. The plates were incubated at 37°C for 48 hours. After the incubation period, we observed the growth controls, and the MICs were determined.

Susceptibility tests were performed according to the CLSI M27-A3 microdilution technique (CLSI 2008). The interactions between the drugs and essential oils were evaluated using the broth microdilution checkerboard method, and the lowest fractional inhibitory concentration (FIC) was calculated for each agent by dividing the minimal inhibitory concentration (MIC) of each drug used in combination by the MIC of the drug alone. FIC values were then summed to determine the fractional inhibitory concentration index (FICI) resulting from the combination. A synergistic interaction was defined as $FICI \leq 0.5$, and indifference was defined as $0.5 < FICI \leq 4$, whereas antagonism was defined as $FICI > 4$ (Johnson et al. 2004).

Acknowledgements

This study was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil.

Conflicts of interest

No conflict of interest declared.

References

- Aligiannis, N., Kalpoutzakis, E., Mitaku, S., Chinou, I.B. (2001) Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *J. Agric. Food Chem* **49**, 4168-4170.
- Batra, R., Boekhout, T., Guého, E., Cabañes, F.J., Dawson, Jr T.L., Gupta, A.K. (2005) *Malassezia* Baillon, emerging clinical yeasts. *FEMS Yeast Res* **5**, 1101-13.

- Bond, R. (2010) Superficial veterinary mycoses. *Clin. Dermatol* **28**, 226–236.
- Cabañes, F.J., Veja, S., Castellá, G. (2011) *Malassezia cuniculi* sp. nov., a novel yeast species isolated from rabbit skin. *Med Mycol* **49**, 40-48.
- 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. (2008) *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard. CLSI document M27-A3*.
- Wayne, P.A: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Daigle, J.C. (2007) Clinical clues, diagnosis and treatment of *Malassezia dermatitis*. The North American Veterinary Conference Congress, Orlando, Florida, **21**, 317-318.
- Johnson, M.D., MacDougall, C., Ostrosky-Zeichner, L., Perfect, J.R., Rex, J.H. (2004) Combination antifungal therapy. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 693-715.
- Khan, M.S., Malik, A., Ahmad, I. (2012) Anti-candidal activity of essential oils alone and in combination with amphotericin B or fluconazole against multi-drug resistant isolates of *Candida albicans*. *Med Mycol* 50(1):33-42.
- Kokkini, S., Karousou, R., Vokou, D. (1994) Pattern of geographic variation of *Origanum vulgare* trichomes and essential oil content in Greece. *Bioch System Ecol* **22**, 517-528.
- Lambert, R.J.W., Skandamis, P.N., Coote, P.J. (2001) A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J Appl Microb* **91**, 453-462.
- Rosato, A., Vitali, C., Piarulli, M., Mazzotta, M., Argentieri, M.P., Mallamaci, R. (2009) *In vitro* synergic efficacy of the combination of Nystatin with the essential oils of *Origanum vulgare* and *Pelargonium graveolens* against some *Candida* species. *Phytomedicine* **16**, 972-5.

Rózalska, B., Sadowska, B., Wieckowska-Szakiel, M., Budzyńska, A. (2011) The synergism of antifungals and essential oils against *Candida* spp. evaluated by a modified gradient-diffusion method. *Med Dosw Mikrobiol* **63**, 163-9.

Sikkema, J., Bont, J.A.M., Poolman, B. (1994) Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J. Biol. Chem* **269**, 8022-8028.

Sikkema, J., Bont, J.A.M., Poolman, B. (1995) Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol. Rev* **59**, 201-222.

Silva, F., Ferreira, S., Duarte, A., Mendonça, D.I., Domingues, F.C. (2011) Antifungal activity of *Coriandrum sativum* essential oil, its mode of action against *Candida* species and potential synergism with amphotericin B. *Phytomedicine* **15**, 42-7.

Tabassum, N., Vidyasagar, G.M. (2013) Antifungal investigations on plant essential oils. A review. *Int J Pharm Pharmaceut Sci* **5**, 19-28.

Trombetta, D., Castelli, F., Sarpietro, M.G., Venuti, V., Cristani, M., Daniele, C., Saija, A., Mazzanti, G., Bisignano, G. (2005) Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antim. Agents and Chemoth* **49**, 2474-2478.

TABLESTable 1: *In vitro* activity of antifungal drugs against 26 *Malassezia pachydermatis* isolates.

Agents	Geometric Mean	MIC Range	MIC ₅₀	MIC ₉₀
Fluconazole	9.64	1-64	4	64
Itraconazole	0.07	0.01-1	0.03	0.5
Ketoconazole	0.05	0.01-0.5	0.03	0.12
Clotrimazole	4.22	0.5-32	4	8
Miconazole	9.90	2-32	8	32
Terbinafine	2.17	0.12-32	2	8
Nystatin	50.3	16-64	64	64

MIC: minimum inhibitory concentration; GM: geometric mean; MIC₅₀ and MIC₉₀: concentrations required to inhibit the growth of 50 and 90%, respectively, of the microorganisms used.

Table 2: Percentages of synergism (Syn), indifference (Ind) and antagonism (Ant) resulting from the combination of thymol (THY), carvacrol (CRV) and cinnamaldehyde (CI) with antifungal drugs against 26 *Malassezia pachydermatis* isolates.

Drug Combination				
Drugs	FICI* mean range (GM)	Interpretation (%)		
		Syn	Ind	Ant
FLZ + THY	0.03-2.5 (0.43)	46.15	53.84	0.00
ITZ + THY	0.09-3.04 (0.51)	38.46	61.53	0.00
KTZ + THY	0.12-6.00 (1.34)	19.23	38.46	42.30
CTZ + THY	0.03-3.00 (0.30)	69.23	30.77	0.00
MCZ + THY	0.03-2.03 (0.26)	65.38	34.61	0.00
TRB + THY	0.06-8.00 (0.97)	19.23	73.07	7.69
NST + THY	0.03-0.53 (0.14)	88.46	11.53	0.00
FLZ + CRV	0.12-2.12 (0.44)	53.84	46.15	0.00
ITZ + CRV	0.09-3.08 (0.55)	30.76	69.23	0.00
KTZ + CRV	0.25-6.00 (1.45)	19.23	38.46	42.30
CTZ + CRV	0.03-2.03 (0.27)	69.23	30.76	0.00
MCZ + CRV	0.02-3.00 (0.21)	76.92	23.07	0.00
TRB + CRV	0.09-5.00 (0.76)	30.77	65.38	3.84
NST + CRV	0.02-2.01 (0.15)	88.46	11.53	0.00
FLZ + CI	0.06-12.0 (0.71)	30.77	65.38	3.84
ITZ + CI	0.07-8.26 (0.81)	26.92	65.38	7.69
KTZ + CI	0.09-6.00 (1.65)	19.23	38.46	42.30
CTZ + CI	0.06-2.12 (0.51)	38.46	61.53	0.00
MCZ + CI	0.06-2.00 (0.34)	65.38	34.61	0.00
TRB + CI	0.07-4.5 (1.13)	11.53	73.07	15.38
NST + CI	0.06-1.25 (0.31)	73.07	26.92	0.00

FICI: fractional inhibitory concentration index; GM: geometric mean; FLZ: fluconazole; ITZ:

itraconazole; KTZ: ketoconazole; CTZ: clotrimazole; MCZ: miconazole; TRB: terbinafine;

NYZ: nystatin.

6 MANUSCRITO 2 - SEQUENTIAL EXPOSURE OF *Malassezia pachydermatis* TO AZOLES: ENHANCED OR DECREASED ACTIVITY?

Karine Bizzi Schlemmer^a, Francielli Kunz de Jesus^b, Régis Adriel Zanette^a, Carine Eloise Prestes Zimmermann^a, Claudia Lautert^b, Sydney Hartz Alves^a, Janio Morais Santurio^a

Publicado na revista Veterinary Microbiology



Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetmic

Letter to the Editor

Sequential exposure of *Malassezia pachydermatis* to azoles: Enhanced or decreased activity?

Keywords:

Malassezia pachydermatis

Azoles

Sequential exposure

in vitro

Treatment of *Malassezia pachydermatis* infections is usually based on topical application or systemic administration of azole derivatives, which have been reported to show satisfactory activity against clinical isolates in vitro (Carrillo-Muñoz et al., 2013). However, low susceptibility and cross-resistance to azoles have been recently reported (Cafarchia et al., 2012; Jesus et al., 2011). The concept that clinical failure is linked to increased minimum inhibitory concentrations (MICs) is debatable, because significantly higher concentrations are found in formulated products (Peano et al., 2012). One intriguing hypothesis is the impact of the antifungal selective pressure on *M. pachydermatis*. For example, when predisposing factors cannot be controlled, regular topical treatment or pulse oral therapy is desirable. Although the resistance mechanisms have not been characterized, *M. pachydermatis* isolates obtained from animals with disease are less sensitive to some antifungal agents than yeasts isolated from animals without disease (Cafarchia et al., 2012). The clinical question is whether the sequential exposure or the staggered administration of azoles would result in higher likelihood of subsequent failure of the drugs in vitro.

To that end, we tested 20 *M. pachydermatis* isolates obtained from dogs with and without otitis. Stock solutions of itraconazole (ITZ), ketoconazole (KTZ) and clotrimazole (CTZ) were prepared by dissolving the drugs in dimethyl sulfoxide (DMSO). The effects of the sequential (16 h apart) or simultaneous exposure to a drug on the activity of the subsequent drug were evaluated according to the methodology proposed elsewhere (Kontoyiannis et al., 2003), using increasing concentrations of the first drug in agar plates and a steady concentration of the second drug in 6 mm paper disks. We used the following drug concentrations: KTZ (0, 0.0009, 0.001, 0.003, 0.007 and 0.01 µg/ml in the plates and 50 µg in the disks),

CTZ (0, 0.25, 0.5, 1, 2 and 4 µg/ml in the plates and 50 µg in the disks) and ITZ (0, 0.003, 0.007, 0.01, 0.03 and 0.06 µg/ml in the plates and 10 µg in the disks). The concentrations added to MH-plates were based on dilutions below the MICs of the isolates, whereas the concentrations in the disks (10 µl of the stock solutions) were based on the M44-A document (CLSI, 2004), established for *Candida* spp. Mueller Hinton agar plates were then swab inoculated with 200 µl of a standardized suspension of *M. pachydermatis* (10⁶ yeasts/ml) of each isolate. Stock conidial suspensions were prepared from isolates subcultured onto Dixon's media and incubated at 37 °C for 48 h. After inoculation, in the sequential exposure experiment, the Mueller Hinton agar plates were incubated at 37 °C for 16 h before the disk containing the second drug was applied to the agar surface, whereas, in the simultaneous exposure, the disks were placed on the agar surface 15 min after the isolates were plated. The plates were then incubated at 37 °C and the diameter of the zone of growth inhibition was measured in millimeters at 48 h of incubation. All assays were conducted in triplicate in two different experiments.

The combination of the drugs, one in the plate and one in the disk, did not result in statistical different growth inhibition halos among the increasing concentrations of the drug in the plate (data not shown). Notwithstanding, previous exposure of *M. pachydermatis* isolates to ITZ resulted in decreased in vitro effects of KTZ when compared to the mean inhibition halos of both drugs used simultaneously ($p < 0.01$; Fig. 1). Surprisingly, this was not observed when KTZ was used first or when ITZ was followed by CTZ; in this last case, probably because CTZ did not show a substantial activity when used in the disks. Conversely, previous exposure to CTZ significantly increased ITZ activity ($p < 0.001$) but not KTZ activity when compared to the staggered use of both drugs.

To the authors' knowledge, there are no data assessing the potential presence of synergism (or antagonism) of the combination of different azoles against *M. pachydermatis* in vitro. However, resistance to azoles may be caused by different mechanisms, including mutation and overexpression of genes, and *M. pachydermatis* isolates exhibiting cross-resistance to azoles can be obtained in vitro (Jesus et al., 2011) and possibly after azole exposure in vivo (Cafarchia et al., 2012; Weiler et al., 2013). Therefore, clinicians should be aware of the possibility of decreased

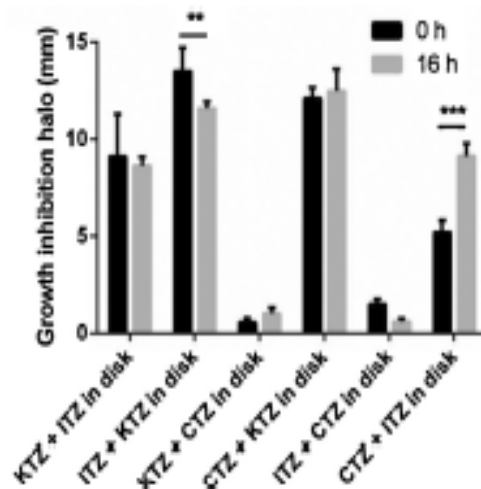


Fig. 1. Summary of the growth inhibition responses of 20 *M. pachydermatis* isolates to the sequential (16h) or staggered (0h) exposure to ketoconazole (KTZ), itraconazole (ITZ) and clotrimazole (CTZ). The diameter of the inhibition halo was subtracted from the disk paper size (6 mm) for statistical calculation (one-way repeated measures ANOVA followed by the Tukey's test). Values are presented as mean \pm SD, where ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

antifungal activity after ITZ exposure, a phenomenon observed with clinical isolates of *Candida* spp. (Santhanam et al., 2013). Conversely, the sequential exposure to CTZ increased the activity of ITZ, which is particularly interesting from a clinical point of view.

The relevance of this study needs to be validated with clinical isolates obtained from azole-treated animals. Due to the conflicting results, our findings should also stimulate further investigations considering a large number of antifungal combinations and including antibiotics commonly used in ear cleansers.

Acknowledgements

We thank the Brazilian agency CAPES for their financial support. All authors declare to have no conflict of interest.

References

- Caderchia, C., Nigrendo, L.A., Iatta, R., Montagna, M.T., Otranto, D., 2012. In vitro antifungal susceptibility of *Malassezia pachydermatis* from dogs with and without skin lesions. *Vet. Microbiol.* 155, 305–308.
- Castillo-Munoz, A.J., Rojas, F., Tur-Tur, C., de Los Angeles Souza, M., Diaz, G.O., Espada, C.M., Payá, M.J., Gianico, G., 2013. In vitro antifungal activity of topical and systemic antifungal drugs against *Malassezia* species. *Mycoses* 56, 571–575.
- Clinical and Laboratory Standards Institute, 2004. Reference Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeast: Informational Supplement, M44-A. CLSI, Wayne, PA.

- Jesus, F.P., Lautert, C., Zanette, R.A., Maki, D.J., Azevedo, M.J., Machado, M.L.S., Dutra, V., Botto, S.A., Alves, S.H., Santurio, J.M., 2011. In vitro susceptibility of fluconazole-susceptible and -resistant isolates of *Malassezia pachydermatis* against azoles. *Vet. Microbiol.* 152, 161–164.
- Kontoyiannis, D.P., Lewis, R.E., Linares, M.S., Albert, N.D., May, G.S., Rood, J.I., 2003. Sequential exposure of *Aspergillus fumigatus* to itraconazole and caspofungin: evidence of enhanced in vitro activity. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 47, 415–419.
- Prato, A., Beccati, M., Chivassa, E., Pasquetti, M., 2012. Evaluation of the antifungal susceptibility of *Malassezia pachydermatis* to clotrimazole, miconazole and thiazolidazole using a modified CLSI M27-A3 micro-dilution method. *Vet. Dermatol.* 23, 131–135.
- Santhanam, J., Yahaya, N., Aziz, M.N., 2013. Species distribution and antifungal susceptibility patterns of *Candida* species: is low susceptibility to itraconazole a trend in Malaysia? *Med. J. Malaysia* 68, 341–347.
- Weiler, C.B., Jesus, F.P.K., Nardi, G.H., Lento, É.S., Santurio, J.M., Coutinho, S.D., Alves, S.H., 2013. Susceptibility variation of *Malassezia pachydermatis* to antifungal agents according to isolate source. *Braz. J. Microbiol.* 44, 174–178.

Karine B. Schlemmer

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia,
Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brazil

Francieli P.K. Jesus

Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre,
Brazil

Régis A. Zanette

Carine E.P. Zimmerman
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia,
Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brazil

Claudia Lautert

Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre,
Brazil

Sydney H. Alves

Janio M. Santurio*
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia,
Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brazil

*Corresponding author at: Laboratório de Pesquisas
Micológicas, Departamento de Microbiologia e
Parasitologia, Campus UFSM, Prédio 20, Sala 4139,
Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900
Santa Maria, RS, Brazil.

Tel: +55 55 3220 8906; fax: +55 55 3220 8906

E-mail addresses: santurio@mail.ufsm.br
janio.santurio@gmail.com (J.M. Santurio)

7 February 2014

7 DISCUSSÃO

A epidemiologia das infecções fúngicas vem mudando ao longo das últimas duas décadas, em função do aumento da incidência de micoses oportunistas (GROLL et al., 2009). Diante disso, os testes de suscetibilidade tornaram-se cada vez mais importantes, principalmente devido ao aumento de infecções fúngicas e ao aparecimento de resistência aos agentes antifúngicos. No entanto, esses testes nem sempre são realizados na rotina laboratorial, onde na maioria dos casos o tratamento é iniciado apenas com base nos sintomas (SANTOS, 2010). Outro aspecto importante se refere a grande variabilidade de técnicas disponíveis para avaliação microbiológica, dificultando a comparação entre os resultados de sensibilidade/resistência dos micro-organismos. As pesquisas com testes de sensibilidade apresentam muitas variáveis, que interferem diretamente nos resultados, como a concentração do inóculo, a composição e pH do meio de cultura, temperatura e duração de incubação e as propriedades físico-químicas do agente antifúngico (RAMANI et al., 1997; LASS-FLORL et al., 2010).

Com a finalidade de padronizar os testes de suscetibilidade, o Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) estabeleceu normativas para a padronização de uma metodologia de avaliação da suscetibilidade *in vitro* dos micro-organismos. Dentre os métodos estabelecidos podemos citar: disco-difusão, macro e microdiluição em caldo (ZARDO; MEZZARI, 2004).

Desta forma, o protocolo M27-A3 (CLSI, 2008), representa a técnica padrão para avaliar a susceptibilidade das leveduras frente a compostos antifúngicos (VELEGRAKI et al., 2004; CANTO et al., 2009; NIJIMA et al., 2011). Apesar desse método ter sido apenas padronizado para *Candida* spp. e *Cryptococcus* spp., essa técnica foi fundamental para o reconhecimento de isolados com variados perfis de suscetibilidade de *M. pachydermatis* (NIJIMA et al., 2011). Porém, ainda não existe nenhum método padronizado para testes de suscetibilidade frente a óleos essenciais e suas frações (FENNEL et al., 2004), sendo o método de microdiluição em caldo o mais usado para tais estudos (OSTROSKY et al., 2008).

A associação de fármacos pode servir como uma alternativa para a superação da resistência antifúngica. Fármacos utilizados na clínica para o tratamento de diversas patologias, assim como frações de óleos essenciais, podem potencializar a atividade de agentes antifúngicos convencionais, reduzindo o tempo de resposta ao tratamento,

aumentando o espectro de atividade, reduzindo a dose e a toxicidade antifúngica. Além disso, pode diminuir o potencial dos micro-organismos em adquirir resistência a determinados antimicrobianos (JOHNSON et al., 2004).

No presente estudo escolhemos agentes antifúngicos que já são usados no tratamento da malasseziose e que demonstram atividade contra *M. pachydermatis*, assim como o timol, carvacrol e cinamaldeído, que têm apresentado atividade contra fungos (GALLUCCI et al., 2013; FARIA et al., 2011; GUO et al., 2009; KIM et al., 2012).

A nistatina foi isolada do *Streptomyces noursei*, em 1949, e até os dias atuais é largamente utilizada no tratamento de candidíase oral ou vaginal, especificamente para uso tópico. Na medicina veterinária, a nistatina está disponível associada a outros antibióticos para uso tópico, com indicação para o tratamento de otites externas por leveduras como *M. pachydermatis* (JAHAM, 2000). Em nosso estudo, a nistatina, isoladamente, não apresentou atividade frente a *M. pachydermatis*. No entanto, foi demonstrado que a combinação de nistatina com timol, carvacrol ou cinamaldeído, evidenciou alto percentual de sinergismo. Rosato et al. (2009) encontraram interações sinérgicas entre nistatina e o óleo essencial de *O. vulgare* e *Pelargonium graveolens* frente a algumas espécies de *Candida*. O que corrobora com os resultados frente a *M. pachydermatis* encontrados neste estudo. Essas combinações merecem atenção por terem demonstrado uma importante atividade frente a *M. pachydermatis*. Não há registros de estudos prévios avaliando a atividade do timol, carvacrol e do cinamaldeído frente a *M. pachydermatis*.

Os antifúngicos pertencentes ao grupo dos azóis representam a maior classe de antifúngicos utilizados no tratamento da malasseziose. Em relação aos casos sistêmicos, pode-se administrar o cetoconazol, itraconazol e fluconazol (NOBRE et al., 2002; MEDLEAU; HNILICA, 2003; ANDRADE, 2008). Além de fungicida, o cetoconazol demonstra ação anti-inflamatória e efeito no processo de corneificação, o que facilita a terapêutica. O itraconazol tem sido utilizado em isolados resistentes ao cetoconazol e também por apresentar efeitos adversos reduzidos quando comparados aos imidazóis (MEIRELES; NASCENTE, 2009).

Faria et al. (2011) avaliaram a atividade da anfotericina B, do fluconazol e do itraconazol em combinação com 13 compostos fenólicos, frente a nove linhagens de *Candida* e uma linhagem de *C. neoformans*. Todos os fármacos mostraram sinergismo quando foram associados ao timol frente aos isolados de *C. albicans*. No entanto, frente aos isolados de *C. neoformans*, apenas a combinação do timol com anfotericina B apresentou efeito sinérgico. No presente estudo, a associação do itraconazol tanto com timol, como com carvacrol e cinamaldeído, apresentou altos percentuais de indiferença contra *M. pachydermatis*.

Guo et al. (2009) compararam a combinação do fluconazol com timol frente a 25 isolados de *C. albicans* sensíveis e resistentes ao fluconazol. O fluconazol não demonstrou atividade frente a *C. albicans*. Porém, quando associado ao timol, o fluconazol demonstrou interações sinérgicas para 24 isolados de *C. albicans*. Amber et al. (2010) avaliaram a atividade antifúngica do óleo essencial *Ocimum sanctum* combinado com fluconazol e cetoconazol, frente a 74 isolados de *Candida*. A combinação do óleo de *O. sanctum* com fluconazol evidenciou indiferença em cinco isolados, enquanto que seis isolados mostraram indiferença quando combinados com cetoconazol. Os demais isolados mostraram efeito sinérgico para ambas as combinações. No presente estudo, a combinação de fluconazol com carvacrol demonstrou 53,84% de sinergismo frente aos isolados de *M. pachydermatis*, enquanto que as combinações de fluconazol com timol e fluconazol com cinamaldeído apresentaram altas taxas de indiferença. Contrariamente, Taguchi et al. (2013) avaliaram o efeito isolado de cinamaldeído frente a isolados de *C. albicans*. Os resultados apresentaram atividade fungicida e fungistática contra *C. albicans*, afetando a estrutura das células.

A terbinafina é um antifúngico pertencente ao grupo das alilaminas (BENNETT, 2006). Esta droga tem sido há muito tempo usada contra dermatófitos; no entanto, estudos recentes indicam uma atividade elevada de terbinafina *in vitro* contra uma grande variedade de fungos invasivos, tais como *Candida* spp., *Aspergillus* spp. ou *Penicillium marneffeii* (MOORE et al., 2001; RYDER et al., 1998). A terbinafina possibilita a administração conjunta com outras drogas e seus efeitos colaterais ou tóxicos são considerados leves (JAIN; SEHGAL, 2000). O presente estudo evidenciou sinergismo na combinação de terbinafina e cinamaldeído. No entanto, quando a terbinafina foi combinada com timol e carvacrol apresentou altos percentuais de indiferença.

Cabral et al. (2013) avaliaram a combinação de estatinas e azólicos, frente a isolados de *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida utilis*. Efeitos sinérgicos foram observados quando o clotrimazol, o fluconazol, o itraconazol, o cetoconazol e o miconazol foram combinados com atorvastatina, lovastatina, rosuvastatina e simvastatina. Sinergismo foi também confirmado pelo aumento da redução dos níveis de ergosterol celulares (*S. cerevisiae* 40% e *C. utilis* 22%). Frente a *M. pachydermatis*, o presente estudo evidenciou altos percentuais de sinergismo na combinação do clotrimazol e do miconazol com timol, carvacrol e cinamaldeído, com exceção da combinação de clotrimazol e cinamaldeído, que resultou em indiferença.

Em um estudo realizado por Manohar et al. (2001), as propriedades antifúngicas do óleo essencial de orégano obtido comercialmente e do composto carvacrol, foram avaliadas *in*

vitro, frente a *C. albicans*, demonstrando valores de 0,125mg/mL para o óleo essencial de orégano e de 0,25mg/mL para carvacrol. Além disso, a administração oral diária de 0,1mL do óleo puro em camundongos demonstrou ser efetivo na prevenção e tratamento da candidíase sistêmica.

Neste cenário, é importante investigar o mecanismo pelo qual estes compostos interagem com agentes patogênicos de tal modo a se tornarem mais suscetíveis aos antifúngicos. Alguns estudos sugerem que a atividade antimicrobiana pode ser atribuída ao prejuízo a diferentes enzimas, principalmente aquelas envolvidas com a produção de energia e/ou síntese de componentes estruturais dos micro-organismos (LAMBERT et al., 2001). Outra hipótese estudada é de que os óleos essenciais sensibilizam a bicamada fosfolipídica da membrana celular dos patógenos, causando um aumento da permeabilidade e perdas de constituintes intracelulares vitais, ou causando inibição ou danos nos sistemas enzimáticos (COX et al., 2000; SINGH et al., 2002). Alguns autores sugerem que a alteração na atividade dos canais de cálcio é a causa do aumento da permeabilidade e liberação dos constituintes intracelulares, assim como um decréscimo no ATP intracelular nas células enquanto que, simultaneamente, há aumento no ATP extracelular, ocasionando uma ruptura na membrana celular do micro-organismo (HELANDER et al., 1998; ALIGIANNIS et al., 2001; PONCE et al., 2003; SARTORATTO et al., 2004).

Velluti et al. (2003) sugerem que a atividade antimicrobiana de óleos essenciais está ligada à estrutura de seus componentes, sendo que a presença de um núcleo aromático e um grupo OH fenólico, formariam ligações de hidrogênio com os sítios ativos de enzimas microbianas alvo. Ainda se acredita que núcleos aromáticos, contendo um grupo funcional polar, sejam os responsáveis pela atividade antimicrobiana dos óleos essenciais (SIKKEMA et al., 1994; MILOS et al., 2000; LAMBERT et al., 2001; PORTE; GODOY, 2001).

Alguns estudos têm demonstrado que a *M. pachydermatis* pode desenvolver resistência aos azólicos, após terapias prolongadas. Jesus et al. (2011), demonstraram o potencial dos isolados de *M. pachydermatis* em adquirir resistência ao fluconazol. Ao avaliar a susceptibilidade destes isolados, foi possível observar um aumento significativo das CIMs a outros antifúngicos azólicos.

Weiler et al. (2013) compararam a susceptibilidade ao cetoconazol, fluconazol, itraconazol, voriconazol, clotrimazol, miconazol, nistatina e anfotericina B, em isolados de *M. pachydermatis* obtidos de cães e gatos saudáveis e com otite. Os MICs mais baixos foram observados com cetoconazol, itraconazol e voriconazol. O voriconazol apresentou as menores variações de CIMs com os MICs para os isolados obtidos de cães e gatos com otite variando

entre 0,01-0,25 $\mu\text{g} / \text{mL}$, enquanto os MICs dos isolados de cães saudáveis variaram de 0,01 a 0,125 $\mu\text{g} / \text{mL}$.

Diante disso, avaliamos a exposição sequencial e simultânea do itraconazol, cetoconazol e clotrimazol, através da técnica de disco-difusão, de acordo com a metodologia descrita por Kontoyiannis et al. (2003). A exposição sequencial do cetoconazol ao itraconazol resultou em diminuição dos halos de inibição comparado com a média dos halos de inibição quando o itraconazol foi exposto simultaneamente ao cetoconazol. No entanto, isto não foi observado quando o clotrimazol e o itraconazol foram usados simultaneamente, já que a exposição sequencial resultou em um aumento dos halos de inibição. Kontoyiannis et al. (2003) avaliaram a atividade sequencial e simultânea do itraconazol e da caspofungina frente a 10 isolados de *Aspergillus fumigatus*. Um aumento dos halos de inibição foi observado quando os antifúngicos foram usados simultaneamente. Este resultado sugere uma regulação entre ergosterol e síntese da parede celular.

É importante ressaltar que não existem estudos prévios que avaliam o potencial sinérgico ou antagônico da combinação de diferentes azólicos, frente a *M. pachydermatis*. Diante dos nossos resultados, ressalta-se a importância de mais estudos que avaliam o potencial sinérgico de combinações *in vitro* e *in vivo*.

8 CONCLUSÕES

A avaliação da suscetibilidade de *M. pachydermatis* aos antifúngicos isolados e combinados com frações de óleos essenciais permitiu verificar que:

- as combinações de nistatina com timol, carvacrol e cinamaldeído evidenciaram cerca de 80% de sinergismo;
- as combinações de clotrimazol com timol e carvacrol, assim como as combinações de miconazol com timol, carvacrol e cinamaldeído, apresentaram um percentual de aproximadamente 70% de sinergismo, enquanto que a combinação de clotrimazol e cinamaldeído demonstraram cerca de 70% de indiferença;
- as combinações de cetoconazol com timol, carvacrol ou cinamaldeído evidenciaram um percentual de 40% de antagonismo, não sendo, dessa forma, recomendadas no tratamento de infecções por *M. pachydermatis*;
- a exposição sequencial de cetoconazol ao itraconazol diminuiu o halo de inibição comparado com a exposição simultânea destes antifúngicos, no entanto, isto não foi observado quando o clotrimazol e o itraconazol foram usados simultaneamente, já que a exposição sequencial resultou em um aumento dos halos de inibição;
- as combinações com os maiores percentuais de sinergismo surgem como alternativas terapêuticas no tratamento de infecções por *M. pachydermatis*, e merecem ser avaliadas por meio de estudos *in vivo*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD, M. J.; ANSUATEGUI, M.; BERMEJO, P. Active antifungal substances from natural sources. **Arkivoc**, 7: 116-145, 2007.

ABDELGALEIL, S. A. M.; ABBASSY, M. A.; BELAL, A. S.; RASOUL, M. A. A. A. Bioactivity of two major constituents isolated from the essential oil of *Artemia judaica* L. **Bioresour Technol**, 99: 5947-50, 2008.

ADAM, K.; SIVROPOULOU, A.; KOKKINI, S.; LANARAS, T.; ARSENAKIS, M. Antifungal activity of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia*, and *Salvia fruticosa* essential oils against human pathogenic fungi. **J. Agric. Food Chem.**, 46: 1739–1745, 1998.

Aizawa, T.; Kano, R.; Nakamura, Y.; Watanabe, S.; Hasegawa, A. Molecular heterogeneity in clinical isolates of *Malassezia pachydermatis* from dogs. **Vet Microbiol.**, 70: 67-75, 1999.

ALBUQUERQUE, J. M. **Plantas medicinais de uso popular**. Brasília, ABEAS/MEC, p. 96, 1989.

ALIGIANNIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINOU, I. B. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **J. Agric. Food Chem.**, 49: 4168-4170, 2001.

AMBER, K.; AIJAZ, A.; IMMACULATA, X.; LUQMAN, K. A.; VNIKHAT, M. Anticandidal effect of *Ocimum sanctum* essential oil and its synergy with fluconazole and ketoconazole. **Phytomedicine**, 17: 921–925, 2010.

AN, M.; SHEN, H.; CAO, Y.; ZHANG, J.; CAI, Y.; WANG, R.; JIANG, Y. Allicin enhances the oxidative damage effect of amphotericin B against *Candida albicans*. **Int J Antimicrob Agents.**, 33: 258-263, 2009.

ANDRADE, S. F. **Manual de terapêutica veterinária**. 3. ed. São Paulo: Roca, p. 936, 2008.

APPELT, C. E.; CAVALCANTE, L. F. H. *Malassezia pachydermatis* em cães e sua susceptibilidade aos antifúngicos azóis. **Veterinária em Foco**, 6: 21-28, 2008.

ARENAS, R. Micologia médica ilustrada. México: Nueva editorial interamericana, cap.34: Antimicóticos; p.359-376, 1993.

ASPÍROZ, M. C.; MORENO, L. A.; RUBIO, M.C. Taxonomy of *Malassezia furfur*: state of art. **Rev Iberoam Micol.**, 14: 147-9, 1997.

BALFOUR, J.A.; FAULDS, D. Terbinafine. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in superficial mycoses. **Drugs**, 43: 259-84, 1992.

BASER, K.H.C.; DEMIRCI, F. Chemistry of Essential Oils. In: Berger RG Ed, Flavours and Fragrances: Chemistry, Bioprospecting and Sustainability. **Heidelberg Springer**, p.43-86, 2007.

BEN-AMI, R.; LEWIS, R. E.; KONTOYIANNIS, D. P. Immunocompromised hosts: immunopharmacology of modern antifungals. **Clin Infect Dis.**, 47: 226-235, 2008.

BENNET, J. E. Antimicrobianos (continuação) - Agentes antifúngicos. In: GOODMAN & GILMAN. As bases farmacológicas da terapêutica. 10. ed. Rio de Janeiro: Mc Graw-Hill, p. 971-983, 2003.

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

BHAVANANI, S. M.; BALLOW, C. H. New agents for Gram-positive bacteria. **Current Opinion in Microbiology**, 13: 528-534, 1992.

BIRCHARD, S. J.; SHERDING, R. G. **Manual Saunders - Clínica de Pequenos Animais**. 3. ed. São Paulo: Editora Roca, p. 2072, 2008.

BOND, R.; LAMPORT, A. I.; LLOYD, D. H. Colonisation status of *Malassezia pachydermatis* on the hair and in the hair follicle of healthy beagle dogs. **Research in Veterinary Science**, 68: 291-293, 2000.

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

BOND, R.; SAIJONMAA-KOULUMIES, L. E.; LLOYD, D. H. Population sizes and frequency of *Malassezia pachydermatis* at skin and mucosal Sites on healthy dogs. **J Small Anim Pract.**, 36: 147- 150, 1995.

BOND, R. Superficial veterinary mycoses. **Clin Dermatol.**, 28: 226-36, 2010.

BOSSCHE, H. V.; ENGELEN, M.; ROCHETTE, F. Antifungal agents of use in animal health- chemical, biochemical and pharmacological aspects. **J Vet Pharmacol Ther.**, 26: 5-29, 2003.

BOTELHO, M. A.; NOGUEIRA, N. A. P.; BASTOS, G. M.; FONSECA, S. G. C.; LEMOS, T. L. G; MATOS, F. J. A.; MONTENEGRO, D.; HEUKELBACH, J.; RAO, V. S.; BRITO, G. A. C. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. **Braz J Med Biol Res.**, 40: 349-356, 2007.

BRANCH, R. A. Prevention of Amphotericin B- Induced Renal Impairment. A Review on the Use of Sodium Supplementation. **Arch Intern Med.**, 148: 2389-2394, 1988.

BRITO, E. H. S.; FONTENELLE, R. O. S.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M. F. G. Candidose na medicina veterinária: um enfoque micológico, clínico e terapêutico. **Ciência Rural**, 39: 2655-2664, 2009.

CABAÑES, F. J.; VEJA, S.; CASTELLÁ, G. *Malassezia cuniculi* sp. nov., a novel yeast species isolated from rabbit skin. **Med Mycol.**, 49: 40-48, 2011.

CABRAL, M. E.; FIGUEROA, L. I. C.; FARINÃ, J. I. Synergistic antifungal activity of statin–azole associations as witnessed by *Saccharomyces cerevisiae*- and *Candida utilis*-bioassays and ergosterol quantification. **Rev Iberoam Micol.**, 30: 31-38, 2013.

CAFARCHIA, C.; GALLO, S.; DANESI, P.; CAPELLI, G.; PARADIES, P.; TRAVERSA, D.; GASSER, R. B.; OTRANTO, D. Assessing the relationship between *Malassezia* and Leishmaniasis in dogs with or without skin lesions. **Acta Tropica**, 107: 25-29, 2008.

CAFARCHIA, 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**, 28: 1176-1180, 2007.

CANTO, N. E.; ESPINEL-INGROFF, A.; PEMA, N. J. Trends in antifungal susceptibility testing using CLSI reference and commercial methods. **Expert Rev Anti Infect Ther.**, 7: 107–119, 2009.

CARLOTTI, D.N. Canine and feline superficial fungal skin infections. **Vet Q.**, 19: 45-46, 1997.

CARRILLO-MUÑOZ, A.J.; GIUSIANO, G.; EZKURRA, P. A.; QUINDÓS, G. Antifungal agents: Mode of action in yeast cells. **Rev Esp Quimioter.**, 19: 130-139, 2006.

CATALÁN, M.; MONTEJO, J. C. Antifúngicos sistêmicos. Farmacodinamia y farmacocinética. **Rev Iberoam Micol.**, 23: 39-49, 2006.

CEYLAN, E.; FUNG, D.Y. Antimicrobial Activity of Spices. **Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology**, 12: 1-55, 2004.

CHANG, H. J.; MILLER, H.L.; WATKINS, N.; ARDUINO, M. J.; ASHFORD, D. A.; MIDGLEY, G.; AGUERO, S. M.; PINTO-POWELL, R.; VON REYN, C. F.; EDWARDS, W.; MCNEIL, M. M.; JARVIS, W. R. An epidemic of *Malassezia pachydermatis* in an intensive care nursery associated with colonization of health care workers' pet dogs. **N Engl J Med.**, 338: 706-711, 1998.

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, M44 – A, 2004.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T.; SILVA, L. R.; DE ALMEIDA MONFARDINI, L. P.; CUNHA, A. K.; RADY, P.; ALVES, T.; ROSAS, R. C. Prospective observational study of candidemia in São Paulo, Brazil: incidence rate, epidemiology, and predictors of mortality. **Infect Control Hosp Epidemiol.**, 28: 570-576, 2007.

COMO, J. A.; DISMUKES, W. E. Oral azole drugs as systemic antifungal therapy. **N Engl J Med.**, 330: 263-271, 1994.

COSTA, E. O.; GÓRNIK, S. L. Agentes Anfifúngicos e Antivirais. In.: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 489-4, 2006.

COSTA, E. O.; GÓRNIK, S. L. Agentes Antifúngicos e Antivirais. In: SPINOSA, H.S., GÓRNIK, S.L., BERNARDI, M.M. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 430-442, 2002.

COUTINHO, S. D. A. Malasseziose: a Necessidade de se pesquisar as espécies lipodependentes em medicina veterinária. **Revista Brasileira Medicina Veterinária Pequenos Animais**, 01: 70-73, 2003.

COX, S. D.; GUSTAFSON, J. E.; MANN, C. M.; MARKHAM, J. L.; LIEW, Y. C.; HARTLAND, R. P.; BELL, H. C.; WARMINGTON, J. R.; WYLLIE, S. G. Tea tree oil causes K⁺ leakage and inhibits respiration in *Escherichia coli*. **Lett Appl Microbiol.**, 26: 355-358, 1998.

COX, S. D.; MARKHAM, J. L. Susceptibility and intrinsic tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* to selected plant volatile compounds. **J Appl Microbiol.**, 103: 930–936, 2007.

COX, S. D.; MANN, C. M.; MARKHAM, J. L.; BELL, H. C.; GUSTAFSON, J. E.; WARMINGTON, J. R.; WYLLIE, S. G. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **J Appl Microbiol.**, 88: 170–175, 2000.

COX, S. D.; MANN, C. M.; MARKHAM, J. L.; GUSTAFSON, J. E.; WARMINGTON, J. R.; WYLLIE, S. G. Determining the Antimicrobial Actions of Tea Tree Oil. **Molecules**, 6: 87-91, 2001.

CROY, S. R.; KNOWN, G. S. The effects of Pluronic block aggregation state of nystatin. **J Control Release**, 95: 161-171, 2004.

DAVIS, R.; BALFOUR, J. A. Terbinafine. A pharmacoeconomic evaluation of its use in superficial fungal infections. **Pharmacoeconomics**, 8: 253-69, 1995.

DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **J Appl Microbiol.**, 88: 308–316, 2000.

DOROCCA-BOBKOWSKA, B.; KONOPKA, K.; DUZGUNES, N. Influence of antifungal polyenes on the adhesion of *Candida albicans* and *Candida glabrata* to human epithelial cells *in vitro*. **Arch Oral Biol.**, 48: 805-814, 2003.

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.

DU, W. X.; OLSEN, C. W.; AVENA-BUSTILLOS, R. J.; MCHUGH, T. H.; LEVIN, C. E.; FRIEDMAN, M. Storage Stability and Antibacterial Activity against *Escherichia coli* O157:

H7 of Carvacrol in Edible Apple Films Made by Two Different Casting Methods. **J Agric Food Chem.**, 56: 3082–3088, 2008.

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

EICHENBERG, M. L. **Suscetibilidade antifúngica da *Malassezia pachydermatis* isolada de cães com otite externa através do método de microdiluição em caldo.** 2000. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) Curso de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2000.

FARIA, R. O. **Avaliação da terapia com β (1-3) glucana associada ao fluconazol na criptococose experimental.** 2010. 70f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Veterinária, Universidade do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

FARIA, N. C. G.; KIM, J. H.; GONÇALVES, L. A. P.; MARTINS, M. L., CHAN, K. L.; CAMPBELL, B. C. Enhanced activity of antifungal drugs using natural phenolics against yeast strains of *Candida* and *Cryptococcus*. **Lett Appl Microbiol.**, 52: 506-13, 2011.

FARIAS-ALVES, V.; SICCHIROL-LAVRADOS, M. A.; PEREIRA-DE-MARTINIS, E. C. Bacteriocins exposure and food ingredients influence on growth and virulence of *Listeria monocytogenes* in a model meat gravy system. **Journal of Food Safety**, Oxford, 23: 201-217, 2003.

FARIAS & GIUFRIDA. Antifúngicos. In: Manual de Terapêutica Veterinária. ANDRADE, S. F. São Paulo: Roca, p. 59-70, 2002.

FENNEL, C. W.; LINDSEY, K. L.; MC GAW, L. J.; SPARG, S. G.; STAFFORD, G. I.; ELGORASHI, E. E.; GRACE, O. M.; VAN STADEN, J. Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: Pharmacological screening and toxicology. **J Ethnopharmacol.**, 94: 205-217, 2004.

FERREIRA, M. E.; COLOMBO, A. L.; PAULSEN, I.; REN, Q.; WORTMAN, J.; HUANG, J.; GOLDAMN, M. H.; GOLDMAN, G. H. The ergosterol biosynthesis pathway, transporter genes, and azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. **Med Mycol.**, 43: 313-319, 2005.

FIGUEIREDO, L. A.; CAFARCHIA, C.; DESANTIS, S.; OTRANTO, D. Biofilm formation of *Malassezia pachydermatis* from dogs. **Vet Microbiol.**, 160: 126-131, 2012.

FONTENELLE, R. O.; MORAIS, S. M.; BRITO, E. H.; KERNTOPF, M. R.; BRILHANTE, R. S.; CORDEIRO, R. A.; TOMÉ, A. R.; QUEIROZ, M. G.; NASCIMENTO, N. R.; SIDRIM, J. J.; ROCHA, M. F. Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **J Antimicrob Chemother.**, 59: 934-40, 2007.

GALLUCCI, M. N.; CAREZZANO, M. E.; OLIVA, M. M.; DEMO, M. S.; PIZZOLITTO, R. P.; ZUNINO, M. P.; ZYGADLO, J. A.; DAMBOLENA, J. S. In vitro activity of natural phenolic compounds against fluconazole-resistant *Candida* species: a quantitative structure activity relationship analysis. **J Applied Microbiol.**, ISSN 1364-5072.

GAMBICHLER, T.; BREUCKMANN, F.; BOMS, S.; ALTMAYER, P.; KREUTER, A. Narrowband UVB phototherapy in skin conditions beyond psoriasis. **J Am Acad Dermatol.**, 52: 660–670, 2005.

GHANNOUM, M. A.; RICE, L. B. Antifungal Agents: Mode of Action, Mechanisms of Resistance, and Correlation of These Mechanisms with Bacterial Resistance. **Clin Microbiol Rev.**, 12: 501–517, 1999.

GILMAN, A. G.; GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. The pharmacological basis of therapeutics. 6. ed. New York : Macmillan publishing Co. Inc., 1980.

GIORDANI, R. ; REGLI, P.; KALOUSTIAN, J.; PORTUGAL, H. Potentiation of antifungal activity of amphotericin b by essential oil from *Cinnamomum cassia*. **Phytother Res.**, 20: 58-61, 2006.

GIRÃO, M. D.; PRADO, M. R.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Viabilidade de cepas de *Malassezia pachydermatis* mantidas em diferentes métodos de conservação. **Revi. Soc. Bras. Med. Trop.**, 37: 229-233, 2004.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. México: McGraw Hill, 9 ed., p. 1436, 1996.

GONÇALVES, L. A. J.; BARBOSA, L. C. A.; AZEVEDO, A. A.; CASALI, V. W. D.; NASCIMENTO, E. A. Produção e composição do óleo essencial de Alfavaquinha (*Ocimum seilloi* Benth.) em resposta a dois níveis de radiação solar. **Rev. Bras. Pl. Med.**, 6: 8-14, 2003.

GONZÁLEZ-PÁRRAGA, P.; SÁNCHEZ-FRESNEDA, R.; ZARAGOZA, O.; ARGÜELLES, J. C. Amphotericin B induces trehalose synthesis and simultaneously activates

an antioxidant enzymatic response in *Candida albicans*. **Biochim Biophys Acta**, 1810: 777-783, 2011.

GROESCHKE, J.; SOLASSOL, L.; BRESSOLLE, F.; PINGUET, F. Stability of amphotericin B and nystatin in antifungal mouthrinses containing sodium hydrogen carbonate. **J Pharm Biomed Anal.**, 42: 362- 366, 2006.

GROLL, A. H.; MCNEIL, G. L. Current challenges in the diagnosis and management of invasive infections: report from the 15th International Symposium on Infections in the Immunocompromised Host: Thessaloniki, Greece, p. 22–25, 2008.

GUÉHO, E.; MIDGLEY, G.; GUILLOT, J. The genus *Malassezia* with description of four new species. **Antonie van Leeuwenhoek**, 69: 337- 355, 1996.

GUILLOT, J.; BOND, R. *Malassezia pachydermatis*: a review. **Med Mycol.**, 37: 295-306, 1999.

GUILLOT, J.; BREUGNOT, C.; DE BARROS, M.; CHERMETTE, R. Usefulness of modified Dixon's medium for quantitative culture of *Malassezia* species from canine skin. **J Vet Diagn Invest.**, 10: 384–386, 1998.

GUILLOT, J.; GUÉHO, E.; CHÉVRIER, G. . CHERMETTE, R. Epidemiological analysis of *Malassezia pachydermatis* isolates by partial sequencing of the large subunit ribosomal RNA. **Res Vet Sci.**, 62: 22–25, 1997.

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

GUILLOT, J.; GUÉHO, E. The diversity *Malassezia* yeast confirmed by rRNA sequence and nuclear DNA comparison. **Antonie Van Leeuwenhoek**, 67: 173-176, 1995b.

GUILLOT, J.; GUÉHO, E.; LESOURD, M.; MIDGLEY, G.; CHÉVRIER, G.; DUPONT, B. Identification of *Malassezia furfur* species. A practical approach. **J Mycol Médicale**, 6: 103-10, 1996.

GUILLOT, J.; GUÉHO, E.; MIALOT, M.; CHERMETTE, R. Importance des levures du genre *Malassezia* en dermatologie vétérinaire. **Le Point Vétérinaire**, 29: 21-31, 1998.

GUO, N.; LIU, J.; WU, X.; BI, X.; MENG, R.; WANG, X.; XIANG, H.; DENG, X.; YU, L. Antifungal activity of thymol against clinical isolates of fluconazole-sensitive and -resistant *Candida albicans*. **J Med Microbiol.**, 58: 1074–1079, 2009.

GUSTAFSON, B. A. The occurrence of yeasts belonging to genus *Pityrosporum* in different kinds of animals. **Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica**, 48: 51-55, 1960.

HAC-WYDRO, K.; DYNAROWICZ-LATKA, P. Interaction between nystatin and natural membrane lipids in Langmuir monolayers- the role of a phospholipids in the mechanism of polyenes mode of action. **Biophys Chem.**, 123: 154-161, 2006a.

HAC-WYDRO, K.; DYNAROWICZ-LATKA, P. Nystatin in Langmuir monolayers at the air/water interface. **Colloids Surf B Biointerfaces**, 53: 64-71, 2006b.

HAJJEH, R. A.; SOFAIR, A. N.; HARRISON, L. H.; LYON, G. M.; ARTHINGTON-SKAGGS, B. A.; MIRZA, S. A.; PHELAN, M.; MORGAN, J.; LEE-YANG, W.; CIBLAK, M. A.; BRANDT, M. E.; WARNOCK, D. W. Incidence of bloodstream infections due to *Candida* species and *in vitro* susceptibilities of isolates collected from 1998 to 2000 in a population-based active surveillance program. **J Clin Microbiol**, 42: 1519-1527, 2004.

HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. As bases farmacológicas da terapêutica. 9. ed. Rio de Janeiro: **Mac Graw-Hill Interamericana**, 1996.

HELANDER, I. M.; ALAKOMI, H. L.; LATVA-KALA, K.; MATTILA-SANDHOLM, T.; POL, I.; SMID, E. J.; GORRIS, J. G. M.; WRIGHT, A. V. Characterization of the action of selected essential oil components on gram negative bacteria **J Agric Food Chem.**, 46: 3590-3595, 1998.

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 lipiddependent yeast species isolated from animals. **Int J Syst Evol Microbiol.**, 54: 623-7, 2004.

HUDAIB, M.; SPERONI, E.; DI PIETRA, A.M.; CAVRINI, V. GC/MS evaluation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil composition and variations during the vegetative cycle. **J Pharm Biom Anal.**, 29: 691–700, 2002.

JAHAM, C.; PAREDES, M.; PAPICH, M. G. **Traditional Antifungal Dermatologic Agents. Compendium**, 22: 5, 2000.

JAIN, S.; SEHGAL, V. N. Terbinafine, a unique oral antifungal: current perceptions. **Int J Dermatol.**, 39: 412-23, 2000.

JESUS, F. P. K.; LAUTERT, C.; ZANETTE, R. A.; MAHL, D. L.; AZEVEDO, M. I.; MACHADO, M. L. S.; DUTRA, V.; BOTTON, S. A.; ALVES, S. H.; SANTURIO, J. M. *In vitro* susceptibility of fluconazole-susceptible and -resistant isolates of *Malassezia pachydermatis* against azoles. **Vet Microbiol.**, 152: 161–164, 2011.

JOHNSON, M. D.; Mac DOUGALL, C.; ZEICHNER, L. O.; PERFECT, J. R.; REX, J. H. Combination antifungal therapy. **Antim Agents Chemotherapy**, 48: 693–715, 2004.

KHAN, M. S. A.; AHMAD, I. Antifungal activity of essential oils and their synergy with fluconazole against drug-resistant strains of *Aspergillus fumigatus* and *Trichophyton rubrum*. **Appl Microbiol Biotechnol.**, 90: 1083-1094, 2011.

KIM, J. H.; FARIA, N. C. G.; MARTINS, M. DE L.; CHAN, K. L.; CAMPBELL, B. C. Enhancement of antimycotic activity of amphotericin B by targeting the oxidative stress response of *Candida* and *Cryptococcus* with natural dihydroxybenzaldehydes. **Front Microbiol.**, 3: 1-6, 2012.

KONTOYIANNIS, D. P.; LEWIS, R. E.; LIONAKISA, M. S.; ALBERT, N. D.; MAY, G. S.; RAAD, I. I. Sequential exposure of *Aspergillus fumigatus* to itraconazole and caspofungin: evidence of enhanced in vitro activity. **Diagn Microbiol Infect Dis.**, 47: 415–419, 2003.

KORDALI, S.; CAKIR, A.; OZER, H.; CAKMAKCI, R.; KESDEK, M.; METE, E. Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from *Turkish Origanum acutidens* and its three components, cavacrol, thymol and ρ -cymene. **Bioresource Technology**, doi: 10.1016/j.biortech.2008.04.048, 2008.

LACAZ, C. DA S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E. M.; DE MELO, N. T. **Tratado de microbiologia médica**. São Paulo: Sarvier, 2002.

LAMBERT, R. J. W.; SKANDAMIS, P. N.; COOTE, P. J.; NYCHAS, G. J. E. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **J Appl Microbiol.**, 91: 453–462, 2001.

LAROCCO, M.; DORENBAUM, A.; ROBINSON, A.; PICKERING, L. K. Recovery of *Malassezia pachydermatis* from eight infants in a neonatal intensive care nursery: clinical. **Pediatr Infect Dis J.**, 7: 398-40, 1988.

LASS-FLORL, C.; PERKHOFER, S.; MAYER, A. *In vitro* susceptibility testing in fungi: a global perspective on a variety of methods. **Mycoses**, 53: 1-11, 2010.

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

LOPES, R. J. Dermatitis canina por *Malassezia*. **REDVET - Revista electrónica de Veterinaria**, 9, 2008.

LORENZI, H; MATOS, F. J. A. Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum, p. 512, 2002.

MACHADO, M. L. S.; APPELT, C. E.; FERREIRO, L.; GUILLOT, J. Otites e dermatites por *Malassezia* spp em cães e gatos. **Clínica Veterinária**, 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.**, 22: 46-52, 2010.

MAERTENS, J. A. History of the development of azole derivatives. **Clin Microbiol Infect.**, 10: 1-10, 2004.

MANOHAR, V.; INGRAM, C.; GRAY, J.; TALPUR, N. A.; ECHARD, B. W.; BAGCHI, D.; PREUSS, G. Antifungal activities of origanum oil against *Candida albicans*. **Mol Cell Biochem.**, 228: 111-117, 2001.

MARINO, M.; BERSANI, C.; COMI, G. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from *Lamiaceae* and *Compositae*. **Int J Food Microbiol.**, 67: 3187-195, 2001.

MARTINDALE. The Complete Drug Reference. 32. ed. London: **Pharmaceutical Press**, p.386, 1999.

MASON, K. V.; EVANS, A. G. Dermatitis associated with *Malassezia pachydermatis* in 11 dogs. **J Am Anim Hosp Assoc.**, 27: 13-20, 1991.

MATTEL, A.; MADRID, I.; SANTIN, R.; ALBANO, A. P.; SCHURBERT, R. N.; ANTUNES, T. A.; MEINERZ, A. R.; CARAPETO, L. P., SAMPAIO, D. P.; MEIRELES, M.

C. A. Isolamento de Leveduras em instrumentos de tosa de pequenos animais. **Anais do 35º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**. Gramado – RS, 2008.

MCDOUGALL P. N.; FLEMING, P. J.; SPELLER, D. C. E.; DAISH, P.; SPEIDEL, B. D. Neonatal systemic candidiasis: a failure to respond to intravenous miconazole in two neonates. **Arch Dis Child.**, 57: 884-886, 1982.

MEDLEAU, L.; HNILICA, K. A. **Dermatologia de Pequenos Animais: Atlas Colorido e Guia Terapêutico**. São Paulo: Roca, p. 11-72, 2003.

MEIRELES, M. C. A.; NASCENTE, P. S. **Micologia Veterinária**. Pelotas: Universitária UFPEL, p. 543, 2009.

MILOS, M.; MASTELIC, J.; JERKOVIC, I. Chemical composition and antioxidant effect of glycosidically bound volatile compounds from oregano (*Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum*). **Food Chemistry**, 71: 79-83, 2000.

MOORE, C. B.; WALLS, C. M.; DENNING, D. W. *In Vitro* activities of terbinafine against *Aspergillus* species in comparison with those of itraconazole and amphotericin B. **Antimicrob Agents Chemother.**, 45: 1882–1885, 2001.

MORRIS, D. O.; O'SHEA, K.; SHOFER, F. S.; RANKIN, S. *Malassezia pachydermatis* carriage in dog owners. **Emerg Infect Dis.**, 11: 83-8, 2005.

MUKHERJEE, P. K.; SHEEHAN, D. J.; HITCHCOCK, C. A.; GHANNOUM, M. A. Combination treatment of invasive fungal infections. **Clinical Microbiology Reviews**, 18: 163-194, 2005.

MULLER, G. H.; KIRK, R. W.; SCOTT, D. W. Ear dermatoses. In: *Small Animal Dermatology*. 4. ed. Philadelphia: W.B Saunders, p.807-827, 1989.

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

NASCENTE, P. S. **Estudo da população de *Malassezia pachydermatis* em otite externa canina e avaliação da sensibilidade *in vitro* e *in vivo* frente a antifúngicos**. 2006. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Faculdade de Veterinária – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

N'DIAYE, B. ; DIENG, M. T.; PEREZ, A.; STOCKMEYER, M.; BAKSHI, R. Clinical efficacy and safety of oral terbinafina in fungal mycetoma. **Int J Dermatol.**, 45: 154-157, 2006.

NEGRE, A.; BENSIGNOR, E.; GUILLOT, J. Evidence-based veterinary dermatology: a systemic review of intervention for *Malassezia dermatitis* in dogs. **ESVD and ACVD**, 20: 1-12, 2008.

NEGRONI, R.; RUBINSTEIN, P.; HERRMANN, A.; GIMENEZ, A. Results of miconazole therapy in twenty-eight patients with paracoccidioidomycosis (South American blastomycosis). **Proc R Soc Med.**, 70: 24-28, 1977.

NIJIMA, M.; KANO, R.; NAGATA, M.; HASEGAWA, A.; KAMATA, H. An azoles-resistant isolate of *Malassezia pachydermatis*. **Vet Microbiol.**, 149: 288–290, 2011.

NOBRE, M. O.; NASCENTE, P. S.; MEIRELES, M. C. A.; FERREIRO, L. Drogas antifúngicas para pequenos e grandes animais. **Ciência Rural**, 32: 175-184, 2002.

NOSTRO, A.; ROCCARO, A. S.; BISIGNANO, G.; MARINO, A.; CANNATELLI, A.; PIZZIMENTI, F. C.; CIONI, P. L.; PROCOPIO, F.; BLANCO, A. R. Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **J Med Microbiol.**, 56: 519–523, 2007.

NUTTALL, T.; HARVEY, R. G.; MCKEEVER, P. J. *Malassezia dermatitis*. In: A Color Handbook of Skin Diseases of the Dog and Cat, **Manson Publishing Ltd**, London, p. 57–59, 2009.

OKAMOTO, Y.; AOKI, S.; MATAGA, I. Enhancement of amphotericin B activity against *Candida albicans* by superoxide radical. **Mycopathologia**, 158: 9-15, 2004.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 18: 301-307, 2008.

PAPICH, M. G.; HEIT, M. C.; RIVIERE, J. E. Fármacos Antifúngicos e Antivirais. In.: ADAMS, H. R. **Farmacologia e Terapêutica em Veterinária**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.767-775, 2003.

PAPPAS, P. G.; KAUFFMAN, C. A.; ANDES, D.; BENJAMIN JR, D. K.; CALANDRA, T. F.; EDWARDS JR, J. E.; FILLER, S. G.; FISHER, J. F.; KULLBERG, B. J.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; REBOLI, A. C.; REX, J. H.; WALSH, T. J.; SOBEL, J. D. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. **Clin Infect Dis.**, 48: 503-535, 2009.

PATEL, A.; FORYTHER, P. *Malassezia dermatitis*. In: Small Animal Dermatology, Saunders Elsevier, St Louis, p. 45–48, 2008.

PONCE, A. G.; FRITZ, R.; DEL VALLE, C.; ROURA, S. I. Antimicrobial activity of essential oil on the native microflora of organic Swiss chard. **LWT - Food Science and Technology**, 36: 679-684, 2003.

PORTE, A.; GODOY, R. L. O. Alecrim (*Rosmarinus officinalis L.*): Propriedades antimicrobianas e químicas do óleo essencial. **Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, 19: 193-210, 2001.

POZZATTI, P.; SCHEID, L. A.; SPADER, T. B.; ATAYDE, M. L.; SANTURIO, J. M.; ALVES, 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.**, 54: 950-956, 2008.

QIAO, J.; LIU, W.; LI, R. Antifungal resistance mechanisms of *Aspergillus*. **Japanese Journal Medical Mycology**, 49: 157-63, 2008.

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

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.**, 151: 1071–1075, 2004.

ROLAN, P. E.; SOMOGYI, A. A.; DREW, M. J. R.; COBAIN, W. G.; SOUTH, D.; BOCHNER, F. Phenytoin intoxication during treatment with parenteral miconazole. **Br Med J (Clin Res Ed)**, 287: 1760, 1983.

Rosato, A.; Vitali, C.; Piarulli, M.; Mazzotta, M.; Argentieri, M.P.; Mallamaci, R. In vitro synergic efficacy of the combination of Nystatin with the essential oils of *Origanum vulgare* and *Pelargonium graveolens* against some *Candida* species. **Phytomedicine**, 16: 972-5, 2009.

RUSSO, M.; GALLETTI, G. C.; BOCCHINI, P.; CARNACINI, A. Essential Oil Chemical Composition of Wild Populations of Italian Oregano Spice (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart): A Preliminary Evaluation of Their Use in Chemotaxonomy by Cluster Analysis. 1. Inflorescences **J. Agric. Food Chem.**, 46: 3741– 3746, 2008.

RYDER, N S.; WAGNER, S.; LEITNER, I. *In vitro* activities of terbinafine against cutaneous isolates of *Candida albicans* and other pathogenic yeasts. **Antimicrob Agents Chemother.**, 42: 1057–1061, 1998.

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, cap.54. p.799-807, 1987.

SARER, E.; PANCALI, S.; YILDIZ, S. Chemical composition and antimicrobial composition of essential oil of *Origanum minutiflorum* O. Shwarz et P.H. Davis. **J Fac Pharm Ankara**, 25: 29-38, 1996.

SARTORATTO, A.; DUARTE, M. C. T.; DELARMELENA, C.; REHDER, V. L.G.; FIGUEIRA, G.M.; MACHADO, A. L. M. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Braz. J. Microbiol.**, 35: 275-280, 2004.

SAWYER, P. R.; BROGDEN, R. N.; PINDER, R. M., et al. Clotrimazole: a review of its antifungal activity and therapeutic efficacy. **Drugs**, 9: 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. Patol. Med. Lab.**, 38: 199-204, 2002.

SHREAZ, S.; BHATIA, R.; KHAN, N.; MURALIDHAR, S.; BASIR, S. F.; MANZOOR, N.; KHAN, L. A. Spice oil cinnamaldehyde exhibits potent anticandidal activity against fluconazole resistant clinical isolates. **Fitoterapia**, 82: 1012-1020, 2011.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos**. São Paulo: Guanabara Koogan, 2004.

SIKKEMA, J.; BONT, J. A. M.; POOLMAN, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiol Rev.**, 59: 201-222, 1995.

SILVA, L. ; COUTINHO, A.; FEDOROV, A.; PRIETO, M. Nystatin-Induced Lipid Vesicles Permeabilization is Strongly Dependent of Sterol Structure. **Biochim Biophys Acta**, 1758: 452-459, 2006.

SINGH, G.; MAURYA, S.; de LAMPASONA, M. P.; CATALAN, C. A. N. Comparison of chemical, antioxidant and antimicrobial studies of cinnamon leaf and bark volatile oils, oleoresins and their constituents. **Food Chem Toxicol.**, 45: 1650–1661, 2007.

SLAGLE, D. C. Agente Antifúngicos. In.: CRAIG, C. R.; STITZEL, R. E. **Farmacologia Moderna com Aplicações Clínicas**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 565-567, 2005.

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

SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 752, 2002.

SUGITA, T.; TAKASHIMA, M.; KODAMA, M.; TSUBOI, R.; NISHIKAWA, A. Description of a new yeast species, *Malassezia japonica*, and its detection in patients with atopic dermatitis and healthy subjects. **J Clin Microbiol.**, 41: 4695-4699, 2003.

SUGITA, T.; TAKASHIMA, M.; SHINODA, T. ; SUTO, H.; UNNO, T.; TSUBOI, R.; OGAWA, H.; NISHIKAWA, A. New yeast species, *Malassezia dermatis*, isolated from patients with atopic dermatitis. **J Clin Microbiol.**, 40: 1363-1367, 2002.

SUGITA, T.; TAJIMA, M.; TAKASHIMA, M.; AMAYA, M.; SAITO, M.; TSUBOI, R.; NISHIKAWA, A. A new yeast, *Malassezia yamatoensis*, isolated from a patient with seborrhoeic dermatitis, and its distribution in patients and healthy subjects. **Microbiol Immunol.**, 48: 579-583, 2004.

SUNG, J. P.; GRENDahl, J. G.; LEVINE, H. B. Intravenous and intrathecal miconazole therapy for systemic mycoses. **West J Med.**, 126: 5-13, 1977.

TAGUCHI, Y.; HASUMI, Y.; ABE, S.; NISHIYAMA, Y. The effect of cinnamaldehyde on the growth and the morphology of *Candida albicans*. **Med Mol Morphol.**, 46: 8–13, 2013.

TALLURY, P.; RANDALL, M. K.; THAW, K. L.; PREISSER, J. S.; KALACHANDRA, S. Effects of solubilizing surfactants and loading of antiviral, antimicrobial and antifungal on their release from ethylene vinyl acetate copolymer. **Dent Mater.**, 23: 977-982, 2007.

TAVARES, W. **Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Antiinfeciosos**. 3. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2001, p. 20, 21, 747, 748,749, 758, 759.

TIAN, H.; LAI, D. M. Analysis on the volatile oil in *Origanum vulgare*. **Journal Chinese Medicinal materials**, 29: 920–921, 2006.

TERRELL, C. L. Antifungal agents. Part II. The azoles. **Mayo Clin Proc.**, 74: 78-100, 1999.

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

ULTEE, A.; SMID, E. J. Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. **Int J Food Microbiol.**, 64: 373–378, 2001.

UNLU, M.; ERGENE, E.; UNLU, G. V.; ZEYTIÑOGLU. H. S.; VURAL, N. Composition, antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity of essential oil from *Cinnamomum zeylanicum* Blume (*Lauraceae*). **Food Chem Toxicol.**, 48: 3274-80, 2010.

VALDÉS, B. S. G. Estructura y Actividad de los Antifúngicos. **Revista Cubana de Farmácia**, 39: 01-10, 2005.

VALERO, M.; SALMERÓN, M. C. Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth. **Int J Food Microbiol.**, 85: 73–81, 2003.

VAZQUEZ, J. A. Combination antifungal therapy against *Candida* species: the new frontier – are we there yet? **Med Mycol.**, 41: 355-368, 2003.

VELEGRAKI, A.; ALEXOPOULOS, E. C.; KRITIKOU, S.; GAITANIS, G. 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.**, 242: 3589–3593, 2004.

VELLUTI, A.; SANCHIS, V.; RAMOS, A. J.; EGIDO, J.; MARI, S. Inhibitory effect of cinnamon, clove, lemongrass, oregano and palmarose essential oils on growth and fumonisin B₁ production by *Fusarium proliferatum* in maize grain. **Int J Food Microbiol.**, 89: 145–154, 2003.

VOKOU, D.; KOKKIMI, S.; BESSIERE, J. M. *Origanum onites* (Lamiaceae) in Greece: distribution, volatile oil yield and composition. **Economic Botany**, 42: 402-412, 1988.

ZARDO, V.; MEZZARI, A. Os antifúngicos nas infecções por *Candida* sp. **NewsLab**, 63: 136-146, 2004.

WEILER, C. B.; JESUS, F. P. K.; NARDI, G. H.; LORETO, E. S.; SANTURIO, J. M.; COUTINHO, S. D.; ALVES, S. H. Susceptibility variation of *Malassezia pachydermatis* to antifungal agents according to isolate source. **Braz. J. Microbiol.**, 44: 174-178, 2013.

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

WILLIAMS, D. A.; FOYE, W. O.; LEMKE, T. L. **Foye's Principles of Medicinal Chemistry**. 5. ed. Philadelphia: Lippincot Williams & Wilkins, p.1114, 2002.

WILKSON, G. T.; HARVEY, R. G. **Dermatologia dos pequenos animais - Guia para o diagnóstico**. 2. ed. São Paulo: Manole, p. 304, 1996.

YANG, Y. C.; LEE, H. S.; LEE, S. H.; CLARK, J. M.; AHN, Y. J. **Inter J Parasitol.**, 35: 1595, 2005.

10 LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Suscetibilidade ($\mu\text{g/mL}$) de isolados de *Malassezia pachydermatis*, frente a fluconazol (FCZ), itraconazol (ITZ), cetoconazol (CTZ), clotrimazol (CLZ), miconazol (MCZ), nistatina (NST) e terbinafina (TRB) isoladamente.

Isolados	MICFCZ	MICITZ	MICCTZ	MICCLT	MICMCZ	MICNST	MICTRB
<i>Mp</i> 01	4	0,03	<0,0078	8	16	64	16
<i>Mp</i> 02	8	0,125	0,03	1	8	64	0,125
<i>Mp</i> 03	4	0,03	<0,0078	2	4	64	1
<i>Mp</i> 04	8	0,06	<0,0078	2	4	64	2
<i>Mp</i> 05	64	1	0,5	>16	>16	64	1
<i>Mp</i> 06	16	0,25	0,06	2	8	64	1
<i>Mp</i> 07	32	0,06	0,125	16	>16	32	4
<i>Mp</i> 08	2	0,015	<0,0078	1	2	64	0,25
<i>Mp</i> 09	32	0,03	0,03	4	>16	64	4
<i>Mp</i> 10	32	0,125	0,06	>16	>16	64	32
<i>MP</i> 11	4	0,03	<0,0078	2	8	64	2
<i>Mp</i> 12	4	0,03	<0,0078	4	8	64	4
<i>Mp</i> 13	8	0,125	0,015	2	4	64	1
<i>Mp</i> 14	4	0,06	0,015	2	8	64	1
<i>Mp</i> 15	4	0,03	<0,0078	2	8	64	1
<i>Mp</i> 15	64	0,5	0,25	4	8	64	1
<i>Mp</i> 17	64	0,5	0,06	8	16	32	4
<i>Mp</i> 18	4	0,015	<0,0078	0,5	4	64	2
<i>Mp</i> 19	32	0,25	0,03	8	16	64	0,5
<i>Mp</i> 20	1	<0,03	0,06	8	8	32	8
<i>Mp</i> 21	64	0,5	0,25	>16	>16	16	16
<i>Mp</i> 22	4	0,06	0,015	8	16	32	8
<i>Mp</i> 23	64	0,5	0,125	8	2	64	2
<i>Mp</i> 24	4	0,03	<0,0078	4	16	32	2
<i>Mp</i> 25	2	0,015	<0,0078	2	16	32	4
<i>Mp</i> 26	4	0,03	<0,0078	4	8	32	2

*CIM: Concentração Inibitória Mínima; *Mp*: *Malassezia pachydermatis*.

Tabela 2: MIC ($\mu\text{g/mL}$) de 26 isolados de *Malassezia pachydermatis*, frente a timol (TI), carvacrol (CAR) e cinamaldeído (CIN).

Isolados	MICTI	MICCAR	MICCIN
<i>Mp</i> 01	800	800	25
<i>Mp</i> 02	800	800	100
<i>Mp</i> 03	800	800	100
<i>Mp</i> 04	800	800	200
<i>Mp</i> 05	800	800	400
<i>Mp</i> 06	400	400	100
<i>Mp</i> 07	800	1,600	100
<i>Mp</i> 08	200	200	25
<i>Mp</i> 09	400	400	200
<i>Mp</i> 10	1,600	1,600	200
<i>MP</i> 11	400	400	50
<i>Mp</i> 12	1,600	800	200
<i>Mp</i> 13	400	200	25
<i>Mp</i> 14	400	400	50
<i>Mp</i> 15	400	400	50
<i>Mp</i> 15	400	400	100
<i>Mp</i> 17	800	800	50
<i>Mp</i> 18	200	200	100
<i>Mp</i> 19	800	800	200
<i>Mp</i> 20	400	800	100
<i>Mp</i> 21	6,400	3,200	6,400
<i>Mp</i> 22	800	800	100
<i>Mp</i> 23	200	400	100
<i>Mp</i> 24	800	800	100
<i>Mp</i> 25	800	800	200
<i>Mp</i> 26	400	200	200

*CIM: Concentração Inibitória Mínima.

Tabela 3: Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de fluconazol combinado com timol, em isolados de *Malassezia pachydermatis*.

Isolados	CIM ($\mu\text{g/mL}$) Fluconazol		CIM ($\mu\text{g/mL}$) Timol	
	Sem combinação	Na combinação	Sem combinação	Na combinação
<i>Mp</i> 01	4	0,25	800	800
<i>Mp</i> 02	8	1	800	400
<i>Mp</i> 03	4	0,50	800	12,5
<i>Mp</i> 04	8	2	800	200
<i>Mp</i> 05	64	1	800	12,5
<i>Mp</i> 06	16	8	800	12,5
<i>Mp</i> 07	32	16	800	12,5
<i>Mp</i> 08	2	0,25	200	200
<i>Mp</i> 09	32	4	400	12,5
<i>Mp</i> 10	32	8	1,600	200
<i>Mp</i> 11	4	1	400	12,5
<i>Mp</i> 12	4	0,25	1,600	100
<i>Mp</i> 13	8	4	400	12,5
<i>Mp</i> 14	4	0,25	400	400
<i>Mp</i> 15	4	2	400	12,5
<i>Mp</i> 16	64	8	400	12,5
<i>Mp</i> 17	64	8	800	100
<i>Mp</i> 18	4	2	200	400
<i>Mp</i> 19	32	16	800	12,5
<i>Mp</i> 20	1	0,25	400	400
<i>Mp</i> 21	64	0,25	>3,200	1,600
<i>Mp</i> 22	4	0,50	800	800
<i>Mp</i> 23	64	16	200	12,5
<i>Mp</i> 24	4	0,25	800	400
<i>Mp</i> 25	2	0,25	800	1,600
<i>Mp</i> 26	4	0,25	400	50

*CIM: Concentração Inibitória Mínima; *Mp*: *Malassezia pachydermatis*.

Tabela 4: Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de itraconazol combinado com timol, em isolados de *Malassezia pachydermatis*.

Isolados	CIM ($\mu\text{g/mL}$) Itraconazol		CIM ($\mu\text{g/mL}$) Timol	
	Sem combinação	Na combinação	Sem combinação	Na combinação
<i>Mp</i> 01	0,03	0,016	800	25
<i>Mp</i> 02	0,125	0,031	800	200
<i>Mp</i> 03	0,03	0,016	800	100
<i>Mp</i> 04	0,06	0,016	800	25
<i>Mp</i> 05	1	0,500	800	12,5
<i>Mp</i> 06	0,25	0,062	800	12,5
<i>Mp</i> 07	0,06	0,016	800	25
<i>Mp</i> 08	0,015	0,016	200	400
<i>Mp</i> 09	0,03	0,016	400	25
<i>Mp</i> 10	0,125	0,016	1,600	25
<i>Mp</i> 11	0,03	0,016	400	50
<i>Mp</i> 12	0,03	0,016	1,600	50
<i>Mp</i> 13	0,125	0,125	400	12,5
<i>Mp</i> 14	0,06	0,016	400	400
<i>Mp</i> 15	0,03	0,031	400	100
<i>Mp</i> 16	0,5	0,125	400	12,5
<i>Mp</i> 17	0,5	0,062	800	12,5
<i>Mp</i> 18	0,015	0,016	200	25
<i>Mp</i> 19	0,25	0,016	800	25
<i>Mp</i> 20	<0,03	0,016	400	25
<i>Mp</i> 21	0,5	0,016	>3,200	1,600
<i>Mp</i> 22	0,06	0,016	800	200
<i>Mp</i> 23	0,5	0,031	200	12,5
<i>Mp</i> 24	0,03	0,016	800	25
<i>Mp</i> 25	0,015	0,016	800	1,600
<i>Mp</i> 26	0,03	0,016	400	50

*CIM: Concentração Inibitória Mínima; *Mp*: *Malassezia pachydermatis*.

Tabela 5: Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de cetoconazol combinado com timol, em isolados de *Malassezia pachydermatis*.

Isolados	CIM ($\mu\text{g/mL}$) Cetoconazol		CIM ($\mu\text{g/mL}$) Timol	
	Sem combinação	Na combinação	Sem combinação	Na combinação
<i>Mp</i> 01	<0,0078	0,016	800	200
<i>Mp</i> 02	0,03	0,016	800	800
<i>Mp</i> 03	<0,0078	0,016	800	50
<i>Mp</i> 04	<0,0078	0,016	800	50
<i>Mp</i> 05	0,5	0,25	800	12,5
<i>Mp</i> 06	0,06	0,625	800	12,5
<i>Mp</i> 07	0,125	0,016	800	25
<i>Mp</i> 08	<0,0078	0,016	200	50
<i>Mp</i> 09	0,03	0,016	400	50
<i>Mp</i> 10	0,06	0,016	1,600	25
<i>Mp</i> 11	<0,0078	0,016	400	50
<i>Mp</i> 12	<0,0078	0,016	1,600	50
<i>Mp</i> 13	0,015	0,016	400	50
<i>Mp</i> 14	0,015	0,016	400	25
<i>Mp</i> 15	<0,0078	0,016	400	400
<i>Mp</i> 16	0,25	0,016	400	25
<i>Mp</i> 17	0,06	0,016	800	800
<i>Mp</i> 18	<0,0078	0,016	200	25
<i>Mp</i> 19	0,03	0,016	800	25
<i>Mp</i> 20	0,06	0,016	400	100
<i>Mp</i> 21	0,25	0,016	>3,200	1,600
<i>Mp</i> 22	0,015	0,016	800	400
<i>Mp</i> 23	0,125	0,031	200	12,5
<i>Mp</i> 24	<0,0078	0,016	800	25
<i>Mp</i> 25	<0,0078	0,016	800	1,600
<i>Mp</i> 26	<0,0078	0,016	400	25

*CIM: Concentração Inibitória Mínima; *Mp*: *Malassezia pachydermatis*.

Tabela 6: Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de clotrimazol combinado com timol, em isolados de *Malassezia pachydermatis*.

Isolados	CIM ($\mu\text{g/mL}$) Clotrimazol		CIM ($\mu\text{g/mL}$) Timol	
	Sem combinação	Na combinação	Sem combinação	Na combinação
<i>Mp</i> 01	8	0,063	800	200
<i>Mp</i> 02	1	0,5	800	400
<i>Mp</i> 03	2	0,016	800	100
<i>Mp</i> 04	2	0,5	800	200
<i>Mp</i> 05	>16	4	800	12,5
<i>Mp</i> 06	2	2	800	50
<i>Mp</i> 07	16	2	800	100
<i>Mp</i> 08	1	0,063	200	100
<i>Mp</i> 09	4	0,063	400	50
<i>Mp</i> 10	>16	2	1,600	12,5
<i>Mp</i> 11	2	0,25	400	50
<i>Mp</i> 12	4	0,125	1,600	12,5
<i>Mp</i> 13	2	0,063	400	100
<i>Mp</i> 14	2	1	400	12,5
<i>Mp</i> 15	2	0,5	400	12,5
<i>Mp</i> 16	4	0,25	400	12,5
<i>Mp</i> 17	8	2	800	100
<i>Mp</i> 18	0,5	0,5	200	400
<i>Mp</i> 19	8	4	800	12,5
<i>Mp</i> 20	8	4	400	12,5
<i>Mp</i> 21	>16	0,063	>3,200	1,600
<i>Mp</i> 22	8	2	800	50
<i>Mp</i> 23	8	2	200	12,5
<i>Mp</i> 24	4	0,25	800	12,5
<i>Mp</i> 25	2	0,063	800	1,600
<i>Mp</i> 26	4	1	400	12,5

*CIM: Concentração Inibitória Mínima; *Mp*: *Malassezia pachydermatis*.

Tabela 7: Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de miconazol combinado com timol, em isolados de *Malassezia pachydermatis*.

Isolados	CIM ($\mu\text{g/mL}$) Miconazol		CIM ($\mu\text{g/mL}$) Timol	
	Sem combinação	Na combinação	Sem combinação	Na combinação
<i>Mp</i> 01	16	8	800	12,5
<i>Mp</i> 02	8	1	800	100
<i>Mp</i> 03	4	0,25	800	50
<i>Mp</i> 04	4	0,063	800	200
<i>Mp</i> 05	>16	0,5	800	12,5
<i>Mp</i> 06	8	2	800	100
<i>Mp</i> 07	>16	4	800	12,5
<i>Mp</i> 08	2	0,063	200	400
<i>Mp</i> 09	>16	0,5	400	12,5
<i>Mp</i> 10	>16	1	1,600	12,5
<i>Mp</i> 11	8	1	400	12,5
<i>Mp</i> 12	8	0,25	1,600	100
<i>Mp</i> 13	4	1	400	12,5
<i>Mp</i> 14	8	4	400	12,5
<i>Mp</i> 15	8	1	400	12,5
<i>Mp</i> 16	8	4	400	12,5
<i>Mp</i> 17	16	4	800	100
<i>Mp</i> 18	4	4	200	12,5
<i>Mp</i> 19	16	8	800	12,5
<i>Mp</i> 20	8	0,063	400	100
<i>Mp</i> 21	>16	0,063	>3,200	1,600
<i>Mp</i> 22	16	4	800	12,5
<i>Mp</i> 23	2	0,063	200	100
<i>Mp</i> 24	16	8	800	12,5
<i>Mp</i> 25	16	0,063	800	1,600
<i>Mp</i> 26	8	0,5	400	12,5

*CIM: Concentração Inibitória Mínima; *Mp*: *Malassezia pachydermatis*.

Tabela 8: Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de nistatina combinado com timol, em isolados de *Malassezia pachydermatis*.

Isolados	CIM ($\mu\text{g/mL}$) Nistatina		CIM ($\mu\text{g/mL}$) Timol	
	Sem combinação	Na combinação	Sem combinação	Na combinação
<i>Mp</i> 01	64	16	800	12,5
<i>Mp</i> 02	64	8	800	12,5
<i>Mp</i> 03	64	2	800	12,5
<i>Mp</i> 04	64	8	800	12,5
<i>Mp</i> 05	64	0,25	800	25
<i>Mp</i> 06	64	8	800	12,5
<i>Mp</i> 07	32	2	800	12,5
<i>Mp</i> 08	64	4	200	12,5
<i>Mp</i> 09	64	0,5	400	12,5
<i>Mp</i> 10	64	8	1,600	12,5
<i>Mp</i> 11	64	4	400	12,5
<i>Mp</i> 12	64	0,25	1,600	100
<i>Mp</i> 13	64	4	400	12,5
<i>Mp</i> 14	64	8	400	12,5
<i>Mp</i> 15	64	4	400	12,5
<i>Mp</i> 16	64	2	400	12,5
<i>Mp</i> 17	32	16	800	12,5
<i>Mp</i> 18	64	8	200	12,5
<i>Mp</i> 19	64	32	800	12,5
<i>Mp</i> 20	32	16	400	12,5
<i>Mp</i> 21	16	0,250	>3,200	1,600
<i>Mp</i> 22	32	8	800	12,5
<i>Mp</i> 23	64	16	200	12,5
<i>Mp</i> 24	32	8	800	12,5
<i>Mp</i> 25	32	4	800	100
<i>Mp</i> 26	32	2	400	50

*CIM: Concentração Inibitória Mínima; *Mp*: *Malassezia pachydermatis*.

Tabela 9: Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de terbinafina combinado com timol, em isolados de *Malassezia pachydermatis*.

Isolados	CIM ($\mu\text{g/mL}$) Terbinafina		CIM ($\mu\text{g/mL}$) Timol	
	Sem combinação	Na combinação	Sem combinação	Na combinação
<i>Mp</i> 01	16	16	800	12,5
<i>Mp</i> 02	0,125	0,125	800	25
<i>Mp</i> 03	1	0,125	800	50
<i>Mp</i> 04	2	0,125	800	800
<i>Mp</i> 05	1	1	800	12,5
<i>Mp</i> 06	1	0,5	800	800
<i>Mp</i> 07	4	4	800	100
<i>Mp</i> 08	0,25	0,125	200	200
<i>Mp</i> 09	4	0,5	400	50
<i>Mp</i> 10	32	0,125	1,600	1,600
<i>Mp</i> 11	2	2	400	12,5
<i>Mp</i> 12	4	0,125	1,600	50
<i>Mp</i> 13	1	0,125	400	400
<i>Mp</i> 14	1	0,125	400	400
<i>Mp</i> 15	1	0,125	400	400
<i>Mp</i> 16	1	0,125	400	400
<i>Mp</i> 17	4	2	800	800
<i>Mp</i> 18	2	8	200	800
<i>Mp</i> 19	0,5	0,125	800	800
<i>Mp</i> 20	8	16	400	12,5
<i>Mp</i> 21	16	2	>3,200	100
<i>Mp</i> 22	8	8	800	800
<i>Mp</i> 23	2	8	200	800
<i>Mp</i> 24	2	0,125	800	800
<i>Mp</i> 25	4	2	800	400
<i>Mp</i> 26	2	0,125	400	100

*CIM: Concentração Inibitória Mínima; *Mp*: *Malassezia pachydermatis*.

Tabela 10: Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de fluconazol combinado com carvacrol, em isolados de *Malassezia pachydermatis*.

Isolados	CIM ($\mu\text{g/mL}$) Fluconazol		CIM ($\mu\text{g/mL}$) Carvacrol	
	Sem combinação	Na combinação	Sem combinação	Na combinação
<i>Mp</i> 01	4	2	800	12,5
<i>Mp</i> 02	8	2	800	200
<i>Mp</i> 03	4	0,25	800	50
<i>Mp</i> 04	8	2	800	200
<i>Mp</i> 05	64	0,25	800	200
<i>Mp</i> 06	16	4	400	200
<i>Mp</i> 07	32	8	1,600	400
<i>Mp</i> 08	2	4	200	12,5
<i>Mp</i> 09	32	4	400	12,5
<i>Mp</i> 10	32	4	1,600	12,5
<i>Mp</i> 11	4	0,25	400	50
<i>Mp</i> 12	4	0,25	800	50
<i>Mp</i> 13	8	4	200	12,5
<i>Mp</i> 14	4	4	400	400
<i>Mp</i> 15	4	2	400	200
<i>Mp</i> 16	64	8	400	12,5
<i>Mp</i> 17	64	8	800	12,5
<i>Mp</i> 18	4	4	200	12,5
<i>Mp</i> 19	32	16	800	12,5
<i>Mp</i> 20	1	0,25	800	800
<i>Mp</i> 21	64	0,25	3,200	1,600
<i>Mp</i> 22	4	2	800	400
<i>Mp</i> 23	64	16	400	12,5
<i>Mp</i> 24	4	1	800	200
<i>Mp</i> 25	2	0,25	800	1,600
<i>Mp</i> 26	4	0,5	200	12,5

*CIM: Concentração Inibitória Mínima; *Mp*: *Malassezia pachydermatis*.

Tabela 11: Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de itraconazol combinado com carvacrol, em isolados de *Malassezia pachydermatis*.

Isolados	CIM ($\mu\text{g/mL}$) Itraconazol		CIM ($\mu\text{g/mL}$) Carvacrol	
	Sem combinação	Na combinação	Sem combinação	Na combinação
<i>Mp</i> 01	0,03	0,016	800	50
<i>Mp</i> 02	0,125	0,016	800	25
<i>Mp</i> 03	0,03	0,016	800	100
<i>Mp</i> 04	0,06	0,016	800	12,5
<i>Mp</i> 05	1	0,016	800	400
<i>Mp</i> 06	0,25	0,062	400	100
<i>Mp</i> 07	0,06	0,016	1,600	400
<i>Mp</i> 08	0,015	0,016	200	50
<i>Mp</i> 09	0,03	0,016	400	100
<i>Mp</i> 10	0,125	0,016	1,600	25
<i>Mp</i> 11	0,03	0,016	400	100
<i>Mp</i> 12	0,03	0,016	800	50
<i>Mp</i> 13	0,125	0,062	200	12,5
<i>Mp</i> 14	0,06	0,125	400	400
<i>Mp</i> 15	0,03	0,016	400	400
<i>Mp</i> 16	0,5	0,125	400	12,5
<i>Mp</i> 17	0,5	0,062	800	12,5
<i>Mp</i> 18	0,015	0,016	200	25
<i>Mp</i> 19	0,25	0,016	800	25
<i>Mp</i> 20	<0,03	0,016	800	25
<i>Mp</i> 21	0,5	0,016	3,200	1,600
<i>Mp</i> 22	0,06	0,016	800	1,600
<i>Mp</i> 23	0,5	0,016	400	25
<i>Mp</i> 24	0,03	0,016	800	25
<i>Mp</i> 25	0,015	0,016	800	1,600
<i>Mp</i> 26	0,03	0,016	200	25

*CIM: Concentração Inibitória Mínima; *Mp*: *Malassezia pachydermatis*.

Tabela 12: Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de cetoconazol combinado com carvacrol, em isolados de *Malassezia pachydermatis*.

Isolados	CIM ($\mu\text{g/mL}$) Cetoconazol		CIM ($\mu\text{g/mL}$) Carvacrol	
	Sem combinação	Na combinação	Sem combinação	Na combinação
<i>Mp</i> 01	<0,0078	0,016	800	100
<i>Mp</i> 02	0,03	0,016	800	400
<i>Mp</i> 03	<0,0078	0,016	800	50
<i>Mp</i> 04	<0,0078	0,016	800	1,600
<i>Mp</i> 05	0,5	0,125	800	12,5
<i>Mp</i> 06	0,06	0,016	400	400
<i>Mp</i> 07	0,125	0,016	1,600	200
<i>Mp</i> 08	<0,0078	0,016	200	50
<i>Mp</i> 09	0,03	0,016	400	25
<i>Mp</i> 10	0,06	0,016	1,600	25
<i>MP</i> 11	<0,0078	0,016	400	50
<i>Mp</i> 12	<0,0078	0,016	800	25
<i>Mp</i> 13	0,015	0,016	200	25
<i>Mp</i> 14	0,015	0,016	400	200
<i>Mp</i> 15	<0,0078	0,016	400	50
<i>Mp</i> 15	0,25	1	400	12,5
<i>Mp</i> 17	0,06	0,031	800	400
<i>Mp</i> 18	<0,0078	0,016	200	25
<i>Mp</i> 19	0,03	0,016	800	100
<i>Mp</i> 20	0,06	0,016	800	50
<i>Mp</i> 21	0,25	0,016	3,200	1,600
<i>Mp</i> 22	0,015	0,016	800	400
<i>Mp</i> 23	0,125	0,016	400	50
<i>Mp</i> 24	<0,0078	0,016	800	25
<i>Mp</i> 25	<0,0078	0,016	800	1,600
<i>Mp</i> 26	<0,0078	0,016	200	100

*CIM: Concentração Inibitória Mínima; *Mp*: *Malassezia pachydermatis*.

Tabela 13: Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de clotrimazol combinado com carvacrol, em isolados de *Malassezia pachydermatis*.

Isolados	CIM ($\mu\text{g/mL}$) Clotrimazol		CIM ($\mu\text{g/mL}$) Carvacrol	
	Sem combinação	Na combinação	Sem combinação	Na combinação
<i>Mp</i> 01	8	4	800	12,5
<i>Mp</i> 02	1	0,063	800	25
<i>Mp</i> 03	2	0,063	800	50
<i>Mp</i> 04	2	0,25	800	200
<i>Mp</i> 05	>16	8	800	12,5
<i>Mp</i> 06	2	0,25	400	400
<i>Mp</i> 07	16	2	1,600	200
<i>Mp</i> 08	1	0,5	200	12,5
<i>Mp</i> 09	4	0,063	400	50
<i>Mp</i> 10	>16	1	1,600	12,5
<i>MP</i> 11	2	0,5	400	12,5
<i>Mp</i> 12	4	0,063	800	50
<i>Mp</i> 13	2	0,125	200	12,5
<i>Mp</i> 14	2	0,5	400	100
<i>Mp</i> 15	2	0,5	400	12,5
<i>Mp</i> 15	4	0,5	400	12,5
<i>Mp</i> 17	8	4	800	200
<i>Mp</i> 18	0,5	0,5	200	12,5
<i>Mp</i> 19	8	2	800	12,5
<i>Mp</i> 20	8	0,063	800	100
<i>Mp</i> 21	>16	8	3,200	400
<i>Mp</i> 22	8	4	800	12,5
<i>Mp</i> 23	8	1	400	12,5
<i>Mp</i> 24	4	0,063	800	400
<i>Mp</i> 25	2	0,063	800	1,600
<i>Mp</i> 26	4	0,5	200	12,5

*CIM: Concentração Inibitória Mínima; *Mp*: *Malassezia pachydermatis*.

Tabela 14: Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de miconazol combinado com carvacrol, em isolados de *Malassezia pachydermatis*.

Isolados	CIM ($\mu\text{g/mL}$) Miconazol		CIM ($\mu\text{g/mL}$) Carvacrol	
	Sem combinação	Na combinação	Sem combinação	Na combinação
<i>Mp</i> 01	16	2	800	12,5
<i>Mp</i> 02	8	0,063	800	25
<i>Mp</i> 03	4	0,063	800	100
<i>Mp</i> 04	4	1	800	25
<i>Mp</i> 05	>16	8	800	12,5
<i>Mp</i> 06	8	4	400	12,5
<i>Mp</i> 07	>16	4	1,600	100
<i>Mp</i> 08	2	2	200	400
<i>Mp</i> 09	>16	2	400	12,5
<i>Mp</i> 10	>16	0,5	1,600	12,5
<i>MP</i> 11	8	0,25	400	12,5
<i>Mp</i> 12	8	4	800	12,5
<i>Mp</i> 13	4	2	200	12,5
<i>Mp</i> 14	8	2	400	400
<i>Mp</i> 15	8	1	400	12,5
<i>Mp</i> 15	8	2	400	12,5
<i>Mp</i> 17	16	0,5	800	200
<i>Mp</i> 18	4	0,125	200	12,5
<i>Mp</i> 19	16	4	800	12,5
<i>Mp</i> 20	8	0,063	800	100
<i>Mp</i> 21	>16	0,063	3,200	1,600
<i>Mp</i> 22	16	4	800	12,5
<i>Mp</i> 23	2	0,5	400	12,5
<i>Mp</i> 24	16	0,5	800	12,5
<i>Mp</i> 25	16	0,063	800	1,600
<i>Mp</i> 26	8	0,5	200	12,5

*CIM: Concentração Inibitória Mínima; *Mp*: *Malassezia pachydermatis*.

Tabela 15: Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de nistatina combinado com carvacrol, em isolados de *Malassezia pachydermatis*.

Isolados	CIM ($\mu\text{g/mL}$) Nistatina		CIM ($\mu\text{g/mL}$) Carvacrol	
	Sem combinação	Na combinação	Sem combinação	Na combinação
<i>Mp</i> 01	64	0,25	800	400
<i>Mp</i> 02	64	8	800	12,5
<i>Mp</i> 03	64	0,25	800	50
<i>Mp</i> 04	64	16	800	12,5
<i>Mp</i> 05	64	8	800	12,5
<i>Mp</i> 06	64	2	400	12,5
<i>Mp</i> 07	32	16	1,600	12,5
<i>Mp</i> 08	64	8	200	12,5
<i>Mp</i> 09	64	0,25	400	50
<i>Mp</i> 10	64	8	1,600	12,5
<i>MP</i> 11	64	2	400	12,5
<i>Mp</i> 12	64	0,5	800	12,5
<i>Mp</i> 13	64	4	200	12,5
<i>Mp</i> 14	64	8	400	12,5
<i>Mp</i> 15	64	8	400	12,5
<i>Mp</i> 15	64	2	400	12,5
<i>Mp</i> 17	32	16	800	12,5
<i>Mp</i> 18	64	16	200	12,5
<i>Mp</i> 19	64	2	800	12,5
<i>Mp</i> 20	32	0,125	800	1,600
<i>Mp</i> 21	16	4	3,200	200
<i>Mp</i> 22	32	0,25	800	100
<i>Mp</i> 23	64	0,25	400	100
<i>Mp</i> 24	32	2	800	12,5
<i>Mp</i> 25	32	8	800	25
<i>Mp</i> 26	32	2	200	12,5

*CIM: Concentração Inibitória Mínima; *Mp*: *Malassezia pachydermatis*.

Tabela 16: Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de terbinafina combinado com carvacrol, em isolados de *Malassezia pachydermatis*.

Isolados	CIM ($\mu\text{g/mL}$) Terbinafina		CIM ($\mu\text{g/mL}$) Carvacrol	
	Sem combinação	Na combinação	Sem combinação	Na combinação
<i>Mp</i> 01	16	0,125	800	200
<i>Mp</i> 02	0,125	0,125	800	800
<i>Mp</i> 03	1	0,125	800	100
<i>Mp</i> 04	2	0,125	800	400
<i>Mp</i> 05	1	0,125	800	25
<i>Mp</i> 06	1	0,125	400	800
<i>Mp</i> 07	4	0,125	1,600	1,600
<i>Mp</i> 08	0,25	0,125	200	200
<i>Mp</i> 09	4	0,125	400	50
<i>Mp</i> 10	32	16	1,600	400
<i>MP</i> 11	2	0,5	400	200
<i>Mp</i> 12	4	0,125	800	50
<i>Mp</i> 13	1	0,125	200	400
<i>Mp</i> 14	1	2	400	12,5
<i>Mp</i> 15	1	0,125	400	400
<i>Mp</i> 15	1	1	400	12,5
<i>Mp</i> 17	4	0,125	800	1,600
<i>Mp</i> 18	2	8	200	200
<i>Mp</i> 19	0,5	0,125	800	1,600
<i>Mp</i> 20	8	0,125	800	1,600
<i>Mp</i> 21	16	1	3,200	400
<i>Mp</i> 22	8	0,125	800	1,600
<i>Mp</i> 23	2	0,125	400	100
<i>Mp</i> 24	2	0,125	800	100
<i>Mp</i> 25	4	4	800	12,5
<i>Mp</i> 26	2	0,25	200	100

*CIM: Concentração Inibitória Mínima; *Mp*: *Malassezia pachydermatis*.

Tabela 17: Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de fluconazol combinado com cinamaldeído, em isolados de *Malassezia pachydermatis*.

Isolados	CIM ($\mu\text{g/mL}$) Fluconazol		CIM ($\mu\text{g/mL}$) Cinamaldeído	
	Sem combinação	Na combinação	Sem combinação	Na combinação
<i>Mp</i> 01	4	2	25	12,5
<i>Mp</i> 02	8	0,25	100	100
<i>Mp</i> 03	4	0,25	100	100
<i>Mp</i> 04	8	0,5	200	100
<i>Mp</i> 05	64	0,25	400	100
<i>Mp</i> 06	16	0,25	100	100
<i>Mp</i> 07	32	0,25	100	100
<i>Mp</i> 08	2	2	25	12,5
<i>Mp</i> 09	32	0,5	200	12,5
<i>Mp</i> 10	32	8	200	12,5
<i>MP</i> 11	4	2	50	12,5
<i>Mp</i> 12	4	0,25	200	100
<i>Mp</i> 13	8	4	25	12,5
<i>Mp</i> 14	4	2	50	12,5
<i>Mp</i> 15	4	0,25	50	50
<i>Mp</i> 15	64	8	100	12,5
<i>Mp</i> 17	64	16	50	12,5
<i>Mp</i> 18	4	0,5	100	200
<i>Mp</i> 19	32	0,25	200	100
<i>Mp</i> 20	1	8	100	400
<i>Mp</i> 21	64	0,25	>3,200	400
<i>Mp</i> 22	4	0,25	100	200
<i>Mp</i> 23	64	8	100	12,5
<i>Mp</i> 24	4	8	100	12,5
<i>Mp</i> 25	2	0,25	200	400
<i>Mp</i> 26	4	0,25	200	50

*CIM: Concentração Inibitória Mínima; *Mp*: *Malassezia pachydermatis*.

Tabela 18: Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de itraconazol combinado com cinamaldeído, em isolados de *Malassezia pachydermatis*.

Isolados	CIM ($\mu\text{g/mL}$) Itraconazol		CIM ($\mu\text{g/mL}$) Cinamaldeído	
	Sem combinação	Na combinação	Sem combinação	Na combinação
<i>Mp</i> 01	0,03	0,016	25	25
<i>Mp</i> 02	0,125	0,062	100	12,5
<i>Mp</i> 03	0,03	0,016	100	50
<i>Mp</i> 04	0,06	0,016	200	1,600
<i>Mp</i> 05	1	0,016	400	25
<i>Mp</i> 06	0,25	0,062	100	50
<i>Mp</i> 07	0,06	0,031	100	12,5
<i>Mp</i> 08	0,015	0,016	25	100
<i>Mp</i> 09	0,03	0,016	200	50
<i>Mp</i> 10	0,125	0,016	200	25
<i>Mp</i> 11	0,03	0,0625	50	12,5
<i>Mp</i> 12	0,03	0,016	200	25
<i>Mp</i> 13	0,125	0,062	25	12,5
<i>Mp</i> 14	0,06	0,016	50	200
<i>Mp</i> 15	0,03	0,062	50	12,5
<i>Mp</i> 15	0,5	0,125	100	12,5
<i>Mp</i> 17	0,5	0,125	50	12,5
<i>Mp</i> 18	0,015	0,016	100	25
<i>Mp</i> 19	0,25	0,016	200	25
<i>Mp</i> 20	<0,03	0,016	100	25
<i>Mp</i> 21	0,5	0,016	>3,200	400
<i>Mp</i> 22	0,06	0,062	100	12,5
<i>Mp</i> 23	0,5	0,031	100	12,5
<i>Mp</i> 24	0,03	0,016	100	25
<i>Mp</i> 25	0,015	0,016	200	20
<i>Mp</i> 26	0,03	0,016	200	25

*CIM: Concentração Inibitória Mínima; *Mp*: *Malassezia pachydermatis*.

Tabela 19: Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de cetoconazol combinado com cinamaldeído, em isolados de *Malassezia pachydermatis*.

Isolados	CIM ($\mu\text{g/mL}$) Cetoconazol		CIM ($\mu\text{g/mL}$) Cinamaldeído	
	Sem combinação	Na combinação	Sem combinação	Na combinação
<i>Mp</i> 01	<0,0078	0,016	25	25
<i>Mp</i> 02	0,03	0,016	100	100
<i>Mp</i> 03	<0,0078	0,016	100	100
<i>Mp</i> 04	<0,0078	0,016	200	100
<i>Mp</i> 05	0,5	0,016	400	25
<i>Mp</i> 06	0,06	0,062	100	100
<i>Mp</i> 07	0,125	0,016	100	100
<i>Mp</i> 08	<0,0078	0,016	25	50
<i>Mp</i> 09	0,03	0,016	200	100
<i>Mp</i> 10	0,06	0,016	200	25
<i>Mp</i> 11	<0,0078	0,016	50	50
<i>Mp</i> 12	<0,0078	0,016	200	100
<i>Mp</i> 13	0,015	0,016	25	50
<i>Mp</i> 14	0,015	0,016	50	25
<i>Mp</i> 15	<0,0078	0,016	50	50
<i>Mp</i> 15	0,25	0,031	100	12,5
<i>Mp</i> 17	0,06	0,062	50	12,5
<i>Mp</i> 18	<0,0078	0,016	100	25
<i>Mp</i> 19	0,03	0,016	200	100
<i>Mp</i> 20	0,06	0,031	100	12,5
<i>Mp</i> 21	0,25	0,016	>3,200	400
<i>Mp</i> 22	0,015	0,031	100	50
<i>Mp</i> 23	0,125	0,031	100	12,5
<i>Mp</i> 24	<0,0078	0,016	100	50
<i>Mp</i> 25	<0,0078	0,016	200	200
<i>Mp</i> 26	<0,0078	0,016	200	25

*CIM: Concentração Inibitória Mínima; *Mp*: *Malassezia pachydermatis*.

Tabela 20: Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de clotrimazol combinado com cinamaldeído, em isolados de *Malassezia pachydermatis*.

Isolados	CIM ($\mu\text{g/mL}$) Clotrimazol		CIM ($\mu\text{g/mL}$) Cinamaldeído	
	Sem combinação	Na combinação	Sem combinação	Na combinação
<i>Mp</i> 01	8	4	25	12,5
<i>Mp</i> 02	1	0,5	100	12,5
<i>Mp</i> 03	2	0,063	100	25
<i>Mp</i> 04	2	0,063	200	100
<i>Mp</i> 05	>16	4	400	12,5
<i>Mp</i> 06	2	1	100	50
<i>Mp</i> 07	16	8	100	12,5
<i>Mp</i> 08	1	1	25	12,5
<i>Mp</i> 09	4	0,063	200	100
<i>Mp</i> 10	>16	4	200	12,5
<i>Mp</i> 11	2	0,5	50	12,5
<i>Mp</i> 12	4	0,25	200	12,5
<i>Mp</i> 13	2	0,125	25	12,5
<i>Mp</i> 14	2	0,25	50	12,5
<i>Mp</i> 15	2	0,5	50	12,5
<i>Mp</i> 15	4	0,5	100	12,5
<i>Mp</i> 17	8	8	50	12,5
<i>Mp</i> 18	0,5	0,063	100	200
<i>Mp</i> 19	8	0,063	200	100
<i>Mp</i> 20	8	4	100	12,5
<i>Mp</i> 21	>16	0,063	>3,200	400
<i>Mp</i> 22	8	0,063	100	200
<i>Mp</i> 23	8	4	100	12,5
<i>Mp</i> 24	4	2	100	12,5
<i>Mp</i> 25	2	0,063	200	200
<i>Mp</i> 26	4	1	200	12,5

*CIM: Concentração Inibitória Mínima; *Mp*: *Malassezia pachydermatis*.

Tabela 21: Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de miconazol combinado com cinamaldeído, em isolados de *Malassezia pachydermatis*.

Isolados	CIM ($\mu\text{g/mL}$) Miconazol		CIM ($\mu\text{g/mL}$) Cinamaldeído	
	Sem combinação	Na combinação	Sem combinação	Na combinação
<i>Mp</i> 01	16	4	25	12,5
<i>Mp</i> 02	8	1	100	12,5
<i>Mp</i> 03	4	0,5	100	12,5
<i>Mp</i> 04	4	0,5	200	12,5
<i>Mp</i> 05	>16	0,016	400	25
<i>Mp</i> 06	8	2	100	12,5
<i>Mp</i> 07	>16	8	100	12,5
<i>Mp</i> 08	2	0,5	25	12,5
<i>Mp</i> 09	>16	1	200	12,5
<i>Mp</i> 10	>16	4	200	12,5
<i>Mp</i> 11	8	0,5	50	12,5
<i>Mp</i> 12	8	1	200	12,5
<i>Mp</i> 13	4	2	25	12,5
<i>Mp</i> 14	8	0,5	50	12,5
<i>Mp</i> 15	8	4	50	12,5
<i>Mp</i> 15	8	2	100	12,5
<i>Mp</i> 17	16	8	50	12,5
<i>Mp</i> 18	4	4	100	12,5
<i>Mp</i> 19	16	0,063	200	50
<i>Mp</i> 20	8	4	100	12,5
<i>Mp</i> 21	>16	0,063	>3,200	400
<i>Mp</i> 22	16	4	100	12,5
<i>Mp</i> 23	2	0,063	100	100
<i>Mp</i> 24	16	0,5	100	12,5
<i>Mp</i> 25	16	0,063	200	400
<i>Mp</i> 26	8	1	200	12,5

*CIM: Concentração Inibitória Mínima; *Mp*: *Malassezia pachydermatis*.

Tabela 22: Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de nistatina combinado com cinamaldeído, em isolados de *Malassezia pachydermatis*.

Isolados	CIM ($\mu\text{g/mL}$) Nistatina		CIM ($\mu\text{g/mL}$) Cinamaldeído	
	Sem combinação	Na combinação	Sem combinação	Na combinação
<i>Mp</i> 01	64	16	25	12,5
<i>Mp</i> 02	64	1	100	12,5
<i>Mp</i> 03	64	0,25	100	50
<i>Mp</i> 04	64	8	200	12,5
<i>Mp</i> 05	64	0,25	400	100
<i>Mp</i> 06	64	8	100	12,5
<i>Mp</i> 07	32	0,5	100	12,5
<i>Mp</i> 08	64	16	25	12,5
<i>Mp</i> 09	64	8	200	12,5
<i>Mp</i> 10	64	8	200	12,5
<i>Mp</i> 11	64	8	50	12,5
<i>Mp</i> 12	64	1	200	50
<i>Mp</i> 13	64	8	25	12,5
<i>Mp</i> 14	64	16	50	12,5
<i>Mp</i> 15	64	8	50	12,5
<i>Mp</i> 15	64	8	100	12,5
<i>Mp</i> 17	32	32	50	12,5
<i>Mp</i> 18	64	16	100	12,5
<i>Mp</i> 19	64	8	200	12,5
<i>Mp</i> 20	32	16	100	12,5
<i>Mp</i> 21	16	0,5	>3,200	200
<i>Mp</i> 22	32	16	100	12,5
<i>Mp</i> 23	64	8	100	12,5
<i>Mp</i> 24	32	4	100	12,5
<i>Mp</i> 25	32	8	200	25
<i>Mp</i> 26	32	4	200	12,5

*CIM: Concentração Inibitória Mínima; *Mp*: *Malassezia pachydermatis*.

Tabela 23: Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de terbinafina combinado com cinamaldeído, em isolados de *Malassezia pachydermatis*.

Isolados	CIM ($\mu\text{g/mL}$) Terbinafina		CIM ($\mu\text{g/mL}$) Cinamaldeído	
	Sem combinação	Na combinação	Sem combinação	Na combinação
<i>Mp</i> 01	16	8	25	12,5
<i>Mp</i> 02	0,125	0,125	100	100
<i>Mp</i> 03	1	0,125	100	50
<i>Mp</i> 04	2	0,125	200	100
<i>Mp</i> 05	1	0,125	400	50
<i>Mp</i> 06	1	0,125	100	100
<i>Mp</i> 07	4	0,125	100	200
<i>Mp</i> 08	0,25	0,5	25	12,5
<i>Mp</i> 09	4	0,125	200	50
<i>Mp</i> 10	32	0,125	200	200
<i>Mp</i> 11	2	0,125	50	100
<i>Mp</i> 12	4	0,125	200	100
<i>Mp</i> 13	1	4	25	12,5
<i>Mp</i> 14	1	0,5	50	12,5
<i>Mp</i> 15	1	0,125	50	200
<i>Mp</i> 15	1	0,125	100	200
<i>Mp</i> 17	4	0,125	50	200
<i>Mp</i> 18	2	0,125	100	200
<i>Mp</i> 19	0,5	0,125	200	100
<i>Mp</i> 20	8	4	100	12,5
<i>Mp</i> 21	16	0,125	>3,200	400
<i>Mp</i> 22	8	0,125	100	200
<i>Mp</i> 23	2	2	100	12,5
<i>Mp</i> 24	2	0,125	100	400
<i>Mp</i> 25	4	0,125	200	400
<i>Mp</i> 26	2	0,125	200	100

*CIM: Concentração Inibitória Mínima; *Mp*: *Malassezia pachydermatis*.

Tabela 24: Interações resultantes da combinação de fluconazol (FCZ) e timol (THI) frente aos isolados de *Malassezia pachydermatis*.

Isolados	FICFLZ	FICTHI	ICIF	Resultado
<i>Mp</i> 01	0,062	1	1,06	Indif
<i>MP</i> 02	0,125	0,5	0,625	Indif
<i>MP</i> 03	0,125	0,015	0,140	Sinerg
<i>Mp</i> 04	0,25	0,25	0,5	Sinerg
<i>Mp</i> 05	0,015	0,015	0,031	Sinerg
<i>MP</i> 06	0,5	0,031	0,531	Indif
<i>Mp</i> 07	0,5	0,015	0,515	Indif
<i>Mp</i> 08	0,125	1	1,125	Indif
<i>Mp</i> 09	0,125	0,031	0,156	Sinerg
<i>Mp</i> 10	0,25	0,125	0,375	Sinerg
<i>Mp</i> 11	0,25	0,031	0,281	Sinerg
<i>Mp</i> 12	0,062	0,062	0,125	Sinerg
<i>Mp</i> 13	0,5	0,031	0,531	Indif
<i>Mp</i> 14	0,062	1	1,062	Indif
<i>Mp</i> 15	0,5	0,031	0,531	Indif
<i>Mp</i> 16	0,125	0,031	0,156	Sinerg
<i>Mp</i> 17	0,125	0,125	0,25	Sinerg
<i>Mp</i> 18	0,5	2	2,5	Indif
<i>Mp</i> 19	0,5	0,015	0,515	Indif
<i>Mp</i> 20	0,25	1	1,25	Indif
<i>Mp</i> 21	0,003	0,25	0,253	Sinerg
<i>Mp</i> 22	0,125	1	1,125	Indif
<i>Mp</i> 23	0,25	0,062	0,312	Sinerg
<i>Mp</i> 24	0,062	0,5	0,562	Indif
<i>Mp</i> 25	0,125	2	2,125	Indif
<i>Mp</i> 26	0,062	0,125	0,187	Sinerg

**Mp*: *Malassezia pachydermatis*; Sinerg: Sinergismo; Indif: Indiferença; Antag: Antagonismo.

Tabela 25: Interações resultantes da combinação de itraconazol (ITZ) e timol (THI) frente aos isolados de *Malassezia pachydermatis*.

Isolados	FICITZ	FICTHI	ICIF	Resultado
<i>Mp</i> 01	0,520	0,031	0,552	Indif
<i>MP</i> 02	0,25	0,25	0,5	Sinerg
<i>MP</i> 03	0,520	0,125	0,645	Indif
<i>Mp</i> 04	0,260	0,031	0,291	Sinerg
<i>Mp</i> 05	0,5	0,015	0,515	Indif
<i>MP</i> 06	0,25	0,031	0,281	Sinerg
<i>Mp</i> 07	0,260	0,031	0,291	Sinerg
<i>Mp</i> 08	1,041	2	3,041	Indif
<i>Mp</i> 09	0,520	0,062	0,583	Indif
<i>Mp</i> 10	0,125	0,015	0,140	Sinerg
<i>Mp</i> 11	0,520	0,125	0,645	Indif
<i>Mp</i> 12	0,520	0,031	0,552	Indif
<i>Mp</i> 13	1	0,031	1,031	Indif
<i>Mp</i> 14	0,260	1	1,260	Indif
<i>Mp</i> 15	1,041	0,25	1,291	Indif
<i>Mp</i> 16	0,25	0,031	0,281	Sinerg
<i>Mp</i> 17	0,125	0,015	0,140	Sinerg
<i>Mp</i> 18	1,041	0,125	1,166	Indif
<i>Mp</i> 19	0,062	0,031	0,093	Sinerg
<i>Mp</i> 20	1,041	0,062	1,104	Indif
<i>Mp</i> 21	0,031	0,25	0,281	Sinerg
<i>Mp</i> 22	0,260	0,25	0,510	Indif
<i>Mp</i> 23	0,062	0,062	0,125	Sinerg
<i>Mp</i> 24	0,520	0,031	0,552	Indif
<i>Mp</i> 25	1,041	2	3,041	Indif
<i>Mp</i> 26	0,520	0,125	0,645	Indif

**Mp*: *Malassezia pachydermatis*; Sinerg: Sinergismo; Indif: Indiferença; Antag: Antagonismo.

Tabela 26: Interações resultantes da combinação de cetoconazol (CTZ) e timol (THI) frente aos isolados de *Malassezia pachydermatis*.

Isolados	FICCTZ	FICTHI	ICIF	Resultado
<i>Mp</i> 01	4,006	0,25	4,256	Antag
<i>MP</i> 02	0,520	1	1,520	Indif
<i>MP</i> 03	4,006	0,062	4,068	Antag
<i>Mp</i> 04	4,006	0,062	4,068	Antag
<i>Mp</i> 05	0,5	0,015	0,515	Indif
<i>MP</i> 06	1,041	0,031	1,072	Indif
<i>Mp</i> 07	0,125	0,031	0,156	Sinerg
<i>Mp</i> 08	4,006	0,25	4,256	Antag
<i>Mp</i> 09	0,520	0,125	0,645	Indif
<i>Mp</i> 10	0,260	0,015	0,276	Sinerg
<i>Mp</i> 11	4,006	0,125	4,131	Antag
<i>Mp</i> 12	4,006	0,0313	4,037	Antag
<i>Mp</i> 13	1,041	0,125	1,166	Indif
<i>Mp</i> 14	1,041	0,062	1,104	Indif
<i>Mp</i> 15	4,006	1	5,006	Antag
<i>Mp</i> 16	0,062	0,062	0,125	Sinerg
<i>Mp</i> 17	0,260	1	1,260	Indif
<i>Mp</i> 18	4,006	0,125	4,131	Antag
<i>Mp</i> 19	0,520	0,031	0,552	Indif
<i>Mp</i> 20	0,260	0,25	0,510	Indif
<i>Mp</i> 21	0,062	0,25	0,312	Sinerg
<i>Mp</i> 22	1,041	0,5	1,541	Indif
<i>Mp</i> 23	0,25	0,062	0,312	Sinerg
<i>Mp</i> 24	4,006	0,031	4,037	Antag
<i>Mp</i> 25	4,006	2	6,006	Antag
<i>Mp</i> 26	4,006	0,0625	4,068	Antag

**Mp*: *Malassezia pachydermatis*; Sinerg: Sinergismo; Indif: Indiferença; Antag: Antagonismo.

Tabela 27: Interações resultantes da combinação de clotrimazol (CLZ) e timol (THI) frente aos isolados de *Malassezia pachydermatis*.

Isolados	FICCLZ	FICTHI	ICIF	Resultado
<i>Mp</i> 01	0,0078	0,25	0,257	Sinerg
<i>MP</i> 02	0,5	0,5	1	Indif
<i>MP</i> 03	0,0078	0,125	0,132	Sinerg
<i>Mp</i> 04	0,25	0,25	0,5	Sinerg
<i>Mp</i> 05	0,125	0,02	0,140	Sinerg
<i>MP</i> 06	1	0,125	1,125	Indif
<i>Mp</i> 07	0,125	0,125	0,25	Sinerg
<i>Mp</i> 08	0,062	0,5	0,562	Indif
<i>Mp</i> 09	0,015	0,125	0,140	Sinerg
<i>Mp</i> 10	0,062	0,007	0,070	Sinerg
<i>Mp</i> 11	0,125	0,125	0,25	Sinerg
<i>Mp</i> 12	0,031	0,007	0,039	Sinerg
<i>Mp</i> 13	0,031	0,25	0,281	Sinerg
<i>Mp</i> 14	0,5	0,031	0,531	Indif
<i>Mp</i> 15	0,25	0,031	0,281	Sinerg
<i>Mp</i> 16	0,062	0,031	0,093	Sinerg
<i>Mp</i> 17	0,25	0,125	0,375	Sinerg
<i>Mp</i> 18	1	2	3	Indif
<i>Mp</i> 19	0,5	0,02	0,515	Indif
<i>Mp</i> 20	0,5	0,03	0,531	Indif
<i>Mp</i> 21	0,002	0,25	0,251	Sinerg
<i>Mp</i> 22	0,25	0,062	0,312	Sinerg
<i>Mp</i> 23	0,25	0,062	0,312	Sinerg
<i>Mp</i> 24	0,0625	0,015	0,078	Sinerg
<i>Mp</i> 25	0,031	2	2,031	Indif
<i>Mp</i> 26	0,25	0,031	0,281	Sinerg

**Mp*: *Malassezia pachydermatis*; Sinerg: Sinergismo; Indif: Indiferença; Antag: Antagonismo.

Tabela 28: Interações resultantes da combinação de miconazol (MCZ) e timol (THI) frente aos isolados de *Malassezia pachydermatis*.

Isolados	FICMCZ	FICTHI	ICIF	Resultado
<i>Mp</i> 01	0,5	0,015	0,515	Indif
<i>MP</i> 02	0,125	0,125	0,25	Sinerg
<i>MP</i> 03	0,062	0,062	0,125	Sinerg
<i>Mp</i> 04	0,015	0,25	0,265	Sinerg
<i>Mp</i> 05	0,015	0,015	0,031	Sinerg
<i>MP</i> 06	0,25	0,25	0,5	Sinerg
<i>Mp</i> 07	0,125	0,015	0,140	Sinerg
<i>Mp</i> 08	0,031	2	2,031	Indif
<i>Mp</i> 09	0,015	0,031	0,046	Sinerg
<i>Mp</i> 10	0,031	0,007	0,039	Sinerg
<i>Mp</i> 11	0,125	0,031	0,156	Sinerg
<i>Mp</i> 12	0,031	0,062	0,093	Sinerg
<i>Mp</i> 13	0,25	0,031	0,281	Sinerg
<i>Mp</i> 14	0,5	0,031	0,531	Indif
<i>Mp</i> 15	0,125	0,031	0,156	Sinerg
<i>Mp</i> 16	0,5	0,031	0,531	Indif
<i>Mp</i> 17	0,25	0,125	0,375	Sinerg
<i>Mp</i> 18	1	0,062	1,062	Indif
<i>Mp</i> 19	0,5	0,015	0,515	Indif
<i>Mp</i> 20	0,007	0,25	0,257	Sinerg
<i>Mp</i> 21	0,002	0,25	0,251	Sinerg
<i>Mp</i> 22	0,25	0,015	0,265	Sinerg
<i>Mp</i> 23	0,031	0,5	0,531	Indif
<i>Mp</i> 24	0,5	0,015	0,515	Indif
<i>Mp</i> 25	0,003	2	2,003	Indif
<i>Mp</i> 26	0,062	0,031	0,093	Sinerg

**Mp*: *Malassezia pachydermatis*; Sinerg: Sinergismo; Indif: Indiferença; Antag: Antagonismo.

Tabela 29: Interações resultantes da combinação de nistatina (NST) e timol (THI) frente aos isolados de *Malassezia pachydermatis*.

Isolados	FICNST	FICTHI	ICIF	Resultado
<i>Mp</i> 01	0,25	0,015	0,265	Sinerg
<i>MP</i> 02	0,125	0,015	0,140	Sinerg
<i>MP</i> 03	0,031	0,015	0,046	Sinerg
<i>Mp</i> 04	0,125	0,015	0,140	Sinerg
<i>Mp</i> 05	0,003	0,031	0,035	Sinerg
<i>MP</i> 06	0,125	0,031	0,156	Sinerg
<i>Mp</i> 07	0,062	0,015	0,078	Sinerg
<i>Mp</i> 08	0,062	0,062	0,125	Sinerg
<i>Mp</i> 09	0,007	0,031	0,039	Sinerg
<i>Mp</i> 10	0,125	0,007	0,132	Sinerg
<i>Mp</i> 11	0,062	0,031	0,093	Sinerg
<i>Mp</i> 12	0,003	0,062	0,066	Sinerg
<i>Mp</i> 13	0,062	0,031	0,093	Sinerg
<i>Mp</i> 14	0,125	0,031	0,156	Sinerg
<i>Mp</i> 15	0,062	0,031	0,093	Sinerg
<i>Mp</i> 16	0,031	0,031	0,062	Sinerg
<i>Mp</i> 17	0,5	0,015	0,515	Indif
<i>Mp</i> 18	0,125	0,062	0,187	Sinerg
<i>Mp</i> 19	0,5	0,015	0,515	Indif
<i>Mp</i> 20	0,5	0,031	0,531	Indif
<i>Mp</i> 21	0,015	0,25	0,265	Sinerg
<i>Mp</i> 22	0,25	0,015	0,265	Sinerg
<i>Mp</i> 23	0,25	0,062	0,312	Sinerg
<i>Mp</i> 24	0,25	0,015	0,265	Sinerg
<i>Mp</i> 25	0,125	0,125	0,25	Sinerg
<i>Mp</i> 26	0,062	0,125	0,187	Sinerg

**Mp*: *Malassezia pachydermatis*; Sinerg: Sinergismo; Indif: Indiferença; Antag: Antagonismo.

Tabela 30: Interações resultantes da combinação de terbinafina (TRB) e timol (THI) frente aos isolados de *Malassezia pachydermatis*.

Isolados	FICTRB	FICTHI	ICIF	Resultado
<i>Mp</i> 01	1	0,016	1,015	Indif
<i>MP</i> 02	1	0,031	1,031	Indif
<i>MP</i> 03	0,125	0,062	0,187	Sinerg
<i>Mp</i> 04	0,063	1	1,062	Indif
<i>Mp</i> 05	1	0,016	1,015	Indif
<i>MP</i> 06	0,5	2	2,5	Indif
<i>Mp</i> 07	1	0,125	1,125	Indif
<i>Mp</i> 08	0,5	1	1,5	Indif
<i>Mp</i> 09	0,5	0,125	0,25	Sinerg
<i>Mp</i> 10	0,004	1	1,003	Indif
<i>Mp</i> 11	1	0,031	1,031	Indif
<i>Mp</i> 12	0,031	0,031	0,062	Sinerg
<i>Mp</i> 13	0,125	1	1,125	Indif
<i>Mp</i> 14	0,125	1	1,125	Indif
<i>Mp</i> 15	0,125	1	1,125	Indif
<i>Mp</i> 16	0,125	1	1,125	Indif
<i>Mp</i> 17	0,125	1	1,5	Indif
<i>Mp</i> 18	4	4	8	Antag
<i>Mp</i> 19	0,25	1	1,250	Indif
<i>Mp</i> 20	2	0,031	2,031	Indif
<i>Mp</i> 21	0,125	0,016	0,140	Sinerg
<i>Mp</i> 22	1	1	2	Indif
<i>Mp</i> 23	4	4	8	Antag
<i>Mp</i> 24	0,063	1	1,062	Indif
<i>Mp</i> 25	0,5	0,5	1	Indif
<i>Mp</i> 26	0,063	0,25	0,312	Sinerg

**Mp*: *Malassezia pachydermatis*; Sinerg: Sinergismo; Indif: Indiferença; Antag: Antagonismo.

Tabela 31: Interações resultantes da combinação de fluconazol (FLZ) e carvacrol (CRV) frente aos isolados de *Malassezia pachydermatis*.

Isolados	FICFLZ	FICCRV	ICIF	Resultado
<i>Mp</i> 01	0,5	0,015	0,515	Indif
<i>MP</i> 02	0,25	0,25	0,5	Sinerg
<i>MP</i> 03	0,062	0,062	0,125	Sinerg
<i>Mp</i> 04	0,25	0,25	0,5	Sinerg
<i>Mp</i> 05	0,003	0,25	0,253	Sinerg
<i>MP</i> 06	0,25	0,5	0,75	Indif
<i>Mp</i> 07	0,25	0,25	0,5	Sinerg
<i>Mp</i> 08	2	0,062	2,062	Indif
<i>Mp</i> 09	0,125	0,031	0,156	Sinerg
<i>Mp</i> 10	0,125	0,007	0,132	Sinerg
<i>Mp</i> 11	0,062	0,125	0,187	Sinerg
<i>Mp</i> 12	0,062	0,062	0,125	Sinerg
<i>Mp</i> 13	0,5	0,062	0,562	Indif
<i>Mp</i> 14	1	1	2	Indif
<i>Mp</i> 15	0,5	0,5	1	Indif
<i>Mp</i> 16	0,125	0,031	0,156	Sinerg
<i>Mp</i> 17	0,125	0,015	0,140	Sinerg
<i>Mp</i> 18	1	0,062	1,062	Indif
<i>Mp</i> 19	0,5	0,015	0,515	Indif
<i>Mp</i> 20	0,25	1	1,25	Indif
<i>Mp</i> 21	0,003	0,5	0,503	Indif
<i>Mp</i> 22	0,5	0,5	1	Indif
<i>Mp</i> 23	0,25	0,031	0,281	Sinerg
<i>Mp</i> 24	0,25	0,25	0,5	Sinerg
<i>Mp</i> 25	0,125	2	2,125	Indif
<i>Mp</i> 26	0,125	0,062	0,187	Sinerg

**Mp*: *Malassezia pachydermatis*; Sinerg: Sinergismo; Indif: Indiferença; Antag: Antagonismo.

Tabela 32: Interações resultantes da combinação de itraconazol (ITZ) e carvacrol (CRV) frente aos isolados de *Malassezia pachydermatis*.

Isolados	FICITZ	FICCRV	ICIF	Resultado
<i>Mp</i> 01	0,520	0,062	0,583	Indif
<i>MP</i> 02	0,125	0,031	0,156	Sinerg
<i>MP</i> 03	0,52	0,125	0,645	Indif
<i>Mp</i> 04	0,26	0,015	0,276	Sinerg
<i>Mp</i> 05	0,015	0,5	0,515	Indif
<i>MP</i> 06	0,25	0,25	0,5	Sinerg
<i>Mp</i> 07	0,26	0,25	0,510	Indif
<i>Mp</i> 08	1,041	0,25	1,291	Indif
<i>Mp</i> 09	0,52	0,25	0,770	Indif
<i>Mp</i> 10	0,125	0,015	0,140	Sinerg
<i>Mp</i> 11	0,52	0,25	0,770	Indif
<i>Mp</i> 12	0,52	0,062	0,583	Indif
<i>Mp</i> 13	0,5	0,062	0,562	Indif
<i>Mp</i> 14	2,083	1	3,083	Indif
<i>Mp</i> 15	0,52	1	1,520	Indif
<i>Mp</i> 16	0,25	0,031	0,281	Sinerg
<i>Mp</i> 17	0,125	0,015	0,140	Sinerg
<i>Mp</i> 18	1,041	0,125	1,166	Indif
<i>Mp</i> 19	0,062	0,031	0,093	Sinerg
<i>Mp</i> 20	1,041	0,031	1,072	Indif
<i>Mp</i> 21	0,031	0,5	0,531	Indif
<i>Mp</i> 22	0,260	2	2,260	Indif
<i>Mp</i> 23	0,031	0,062	0,093	Sinerg
<i>Mp</i> 24	0,52	0,031	0,552	Indif
<i>Mp</i> 25	1,041	2	3,041	Indif
<i>Mp</i> 26	0,520	0,125	0,645	Indif

**Mp*: *Malassezia pachydermatis*; Sinerg: Sinergismo; Indif: Indiferença; Antag: Antagonismo.

Tabela 33: Interações resultantes da combinação de cetoconazol (CTZ) e carvacrol (CRV) frente aos isolados de *Malassezia pachydermatis*.

Isolados	FICCTZ	FICCRV	ICIF	Resultado
<i>Mp</i> 01	4,006	0,125	4,131	Antag
<i>MP</i> 02	0,52	0,5	1,020	Indif
<i>MP</i> 03	4,006	0,062	4,068	Antag
<i>Mp</i> 04	4,006	2	6,006	Antag
<i>Mp</i> 05	0,25	0,015	0,265	Sinerg
<i>MP</i> 06	0,26	1	1,260	Indif
<i>Mp</i> 07	0,125	0,125	0,25	Sinerg
<i>Mp</i> 08	4,006	0,25	4,256	Antag
<i>Mp</i> 09	0,52	0,062	0,583	Indif
<i>Mp</i> 10	0,26	0,015	0,276	Sinerg
<i>Mp</i> 11	4,006	0,125	4,131	Antag
<i>Mp</i> 12	4,006	0,031	4,037	Antag
<i>Mp</i> 13	1,041	0,125	1,166	Indif
<i>Mp</i> 14	1,041	0,5	1,541	Indif
<i>Mp</i> 15	4,006	0,125	4,131	Antag
<i>Mp</i> 16	1	0,031	1,031	Indif
<i>Mp</i> 17	0,52	0,5	1,020	Indif
<i>Mp</i> 18	4,006	0,125	4,131	Antag
<i>Mp</i> 19	0,52	0,125	0,645	Indif
<i>Mp</i> 20	0,26	0,062	0,322	Sinerg
<i>Mp</i> 21	0,062	0,5	0,562	Indif
<i>Mp</i> 22	1,041	0,5	1,541	Indif
<i>Mp</i> 23	0,125	0,125	0,25	Sinerg
<i>Mp</i> 24	4,006	0,031	4,037	Antag
<i>Mp</i> 25	4,006	2	6,006	Antag
<i>Mp</i> 26	4,006	0,5	4,506	Antag

**Mp*: *Malassezia pachydermatis*; Sinerg: Sinergismo; Indif: Indiferença; Antag: Antagonismo.

Tabela 34: Interações resultantes da combinação de clotrimazol (CLZ) e carvacrol (CRV) frente aos isolados de *Malassezia pachydermatis*.

Isolados	FICCLZ	FICCRV	ICIF	Resultado
<i>Mp</i> 01	0,5	0,015	0,515	Indif
<i>MP</i> 02	0,062	0,031	0,093	Sinerg
<i>MP</i> 03	0,031	0,062	0,093	Sinerg
<i>Mp</i> 04	0,125	0,25	0,375	Sinerg
<i>Mp</i> 05	0,25	0,015	0,265	Sinerg
<i>MP</i> 06	0,125	1	1,125	Indif
<i>Mp</i> 07	0,125	0,125	0,25	Sinerg
<i>Mp</i> 08	0,5	0,0625	0,562	Indif
<i>Mp</i> 09	0,015	0,125	0,140	Sinerg
<i>Mp</i> 10	0,031	0,007	0,039	Sinerg
<i>Mp</i> 11	0,25	0,031	0,281	Sinerg
<i>Mp</i> 12	0,015	0,062	0,078	Sinerg
<i>Mp</i> 13	0,062	0,062	0,125	Sinerg
<i>Mp</i> 14	0,25	0,25	0,5	Sinerg
<i>Mp</i> 15	0,25	0,0313	0,281	Sinerg
<i>Mp</i> 16	0,125	0,031	0,156	Sinerg
<i>Mp</i> 17	0,5	0,25	0,75	Indif
<i>Mp</i> 18	1	0,062	1,062	Indif
<i>Mp</i> 19	0,25	0,015	0,265	Sinerg
<i>Mp</i> 20	0,007	0,125	0,132	Sinerg
<i>Mp</i> 21	0,25	0,125	0,375	Sinerg
<i>Mp</i> 22	0,5	0,015	0,515	Indif
<i>Mp</i> 23	0,125	0,031	0,156	Sinerg
<i>Mp</i> 24	0,015	0,5	0,515	Indif
<i>Mp</i> 25	0,031	2	2,031	Indif
<i>Mp</i> 26	0,125	0,062	0,187	Sinerg

**Mp*: *Malassezia pachydermatis*; Sinerg: Sinergismo; Indif: Indiferença; Antag: Antagonismo.

Tabela 35: Interações resultantes da combinação de miconazol (MCZ) e carvacrol (CRV) frente aos isolados de *Malassezia pachydermatis*.

Isolados	FICMCZ	FICCRV	ICIF	Resultado
<i>Mp</i> 01	0,125	0,015	0,140	Sinerg
<i>MP</i> 02	0,007	0,031	0,039	Sinerg
<i>MP</i> 03	0,015	0,125	0,140	Sinerg
<i>Mp</i> 04	0,25	0,031	0,281	Sinerg
<i>Mp</i> 05	0,25	0,015	0,265	Sinerg
<i>MP</i> 06	0,5	0,031	0,531	Indif
<i>Mp</i> 07	0,125	0,062	0,187	Sinerg
<i>Mp</i> 08	1	2	3	Antag
<i>Mp</i> 09	0,062	0,031	0,093	Sinerg
<i>Mp</i> 10	0,015	0,007	0,023	Sinerg
<i>Mp</i> 11	0,031	0,031	0,062	Sinerg
<i>Mp</i> 12	0,062	0,015	0,078	Sinerg
<i>Mp</i> 13	0,5	0,062	0,562	Indif
<i>Mp</i> 14	0,25	1	1,25	Indif
<i>Mp</i> 15	0,125	0,031	0,156	Sinerg
<i>Mp</i> 16	0,25	0,031	0,281	Sinerg
<i>Mp</i> 17	0,25	0,25	0,5	Sinerg
<i>Mp</i> 18	0,031	0,062	0,093	Sinerg
<i>Mp</i> 19	0,25	0,015	0,265	Sinerg
<i>Mp</i> 20	0,007	0,125	0,132	Sinerg
<i>Mp</i> 21	0,002	0,5	0,501	Indif
<i>Mp</i> 22	0,25	0,015	0,265	Sinerg
<i>Mp</i> 23	0,25	0,031	0,281	Sinerg
<i>Mp</i> 24	0,031	0,015	0,046	Sinerg
<i>Mp</i> 25	0,003	2	2,003	Indif
<i>Mp</i> 26	0,062	0,062	0,125	Sinerg

**Mp*: *Malassezia pachydermatis*; Sinerg: Sinergismo; Indif: Indiferença; Antag: Antagonismo.

Tabela 36: Interações resultantes da combinação de nistatina (NST) e carvacrol (CRV) frente aos isolados de *Malassezia pachydermatis*.

Isolados	FICNST	FICCRV	ICIF	Resultado
<i>Mp</i> 01	0,003	0,5	0,503	Indif
<i>MP</i> 02	0,125	0,015	0,140	Sinerg
<i>MP</i> 03	0,003	0,062	0,066	Sinerg
<i>Mp</i> 04	0,25	0,015	0,265	Sinerg
<i>Mp</i> 05	0,125	0,015	0,140	Sinerg
<i>MP</i> 06	0,25	0,031	0,281	Sinerg
<i>Mp</i> 07	0,062	0,007	0,070	Sinerg
<i>Mp</i> 08	0,125	0,062	0,187	Sinerg
<i>Mp</i> 09	0,003	0,125	0,128	Sinerg
<i>Mp</i> 10	0,125	0,007	0,132	Sinerg
<i>Mp</i> 11	0,031	0,031	0,062	Sinerg
<i>Mp</i> 12	0,007	0,015	0,023	Sinerg
<i>Mp</i> 13	0,062	0,062	0,125	Sinerg
<i>Mp</i> 14	0,125	0,031	0,156	Sinerg
<i>Mp</i> 15	0,125	0,031	0,156	Sinerg
<i>Mp</i> 16	0,031	0,031	0,062	Sinerg
<i>Mp</i> 17	0,5	0,015	0,515	Indif
<i>Mp</i> 18	0,25	0,062	0,312	Sinerg
<i>Mp</i> 19	0,031	0,015	0,046	Sinerg
<i>Mp</i> 20	0,016	2	2,015	Indif
<i>Mp</i> 21	0,25	0,062	0,312	Sinerg
<i>Mp</i> 22	0,007	0,125	0,132	Sinerg
<i>Mp</i> 23	0,003	0,25	0,253	Sinerg
<i>Mp</i> 24	0,062	0,015	0,078	Sinerg
<i>Mp</i> 25	0,25	0,031	0,281	Sinerg
<i>Mp</i> 26	0,062	0,062	0,125	Sinerg

**Mp*: *Malassezia pachydermatis*; Sinerg: Sinergismo; Indif: Indiferença; Antag: Antagonismo.

Tabela 37: Interações resultantes da combinação de terbinafina (TRB) e carvacrol (CRV) frente aos isolados de *Malassezia pachydermatis*.

Isolados	FICTRB	FICCRV	ICIF	Resultado
<i>Mp</i> 01	0,008	0,25	0,257	Sinerg
<i>MP</i> 02	1	1	2	Indif
<i>MP</i> 03	0,125	0,125	0,25	Sinerg
<i>Mp</i> 04	0,063	0,5	0,562	Indif
<i>Mp</i> 05	0,125	0,031	0,156	Sinerg
<i>MP</i> 06	0,125	2	2,125	Indif
<i>Mp</i> 07	0,031	1	1,031	Indif
<i>Mp</i> 08	0,5	1	1,5	Indif
<i>Mp</i> 09	0,031	0,125	0,156	Sinerg
<i>Mp</i> 10	0,5	0,25	0,75	Indif
<i>Mp</i> 11	0,25	0,5	0,75	Indif
<i>Mp</i> 12	0,031	0,063	0,093	Sinerg
<i>Mp</i> 13	0,125	2	2,125	Indif
<i>Mp</i> 14	2	0,031	2,031	Indif
<i>Mp</i> 15	0,125	1	1,125	Indif
<i>Mp</i> 16	1	0,031	1,031	Indif
<i>Mp</i> 17	0,031	2	2,031	Indif
<i>Mp</i> 18	4	1	5	Antag
<i>Mp</i> 19	0,25	2	2,25	Indif
<i>Mp</i> 20	0,016	2	2,015	Indif
<i>Mp</i> 21	0,063	0,125	0,187	Sinerg
<i>Mp</i> 22	0,016	2	2,015	Indif
<i>Mp</i> 23	0,063	0,25	0,312	Sinerg
<i>Mp</i> 24	0,063	0,125	0,187	Sinerg
<i>Mp</i> 25	1	0,016	1,015	Indif
<i>Mp</i> 26	0,125	0,5	0,625	Indif

**Mp*: *Malassezia pachydermatis*; Sinerg: Sinergismo; Indif: Indiferença; Antag: Antagonismo.

Tabela 38: Interações resultantes da combinação de fluconazol (FLZ) e cinamaldeído (CIN) frente aos isolados de *Malassezia pachydermatis*.

Isolados	FICFLZ	FICCIN	ICIF	Resultado
<i>Mp</i> 01	0,5	0,5	1	Indif
<i>MP</i> 02	0,031	1	1,031	Indif
<i>MP</i> 03	0,062	1	1,062	Indif
<i>Mp</i> 04	0,062	0,5	0,562	Indif
<i>Mp</i> 05	0,003	0,25	0,253	Sinerg
<i>MP</i> 06	0,015	1	1,015	Indif
<i>Mp</i> 07	0,007	1	1,007	Indif
<i>Mp</i> 08	1	0,5	1,5	Indif
<i>Mp</i> 09	0,015	0,062	0,078	Sinerg
<i>Mp</i> 10	0,25	0,062	0,312	Sinerg
<i>Mp</i> 11	0,5	0,25	0,75	Indif
<i>Mp</i> 12	0,062	0,5	0,562	Indif
<i>Mp</i> 13	0,5	0,5	1	Indif
<i>Mp</i> 14	0,5	0,25	0,75	Indif
<i>Mp</i> 15	0,062	1	1,062	Indif
<i>Mp</i> 16	0,125	0,125	0,25	Sinerg
<i>Mp</i> 17	0,25	0,25	0,5	Sinerg
<i>Mp</i> 18	0,125	2	2,125	Indif
<i>Mp</i> 19	0,007	0,5	0,507	Indif
<i>Mp</i> 20	8	4	12	Antag
<i>Mp</i> 21	0,003	0,062	0,066	Sinerg
<i>Mp</i> 22	0,062	2	2,062	Indif
<i>Mp</i> 23	0,125	0,125	0,25	Sinerg
<i>Mp</i> 24	2	0,125	2,125	Indif
<i>Mp</i> 25	0,125	2	2,125	Indif
<i>Mp</i> 26	0,062	0,25	0,312	Sinerg

**Mp*: *Malassezia pachydermatis*; Sinerg: Sinergismo; Indif: Indiferença; Antag: Antagonismo.

Tabela 39: Interações resultantes da combinação de itraconazol (ITZ) e cinamaldeído (CIN) frente aos isolados de *Malassezia pachydermatis*.

Isolados	FICITZ	FICCIN	ICIF	Resultado
<i>Mp</i> 01	0,52	1	1,520	Indif
<i>MP</i> 02	0,5	0,125	0,625	Indif
<i>MP</i> 03	0,52	0,5	1,020	Indif
<i>Mp</i> 04	0,26	8	8,260	Antag
<i>Mp</i> 05	0,015	0,062	0,078	Sinerg
<i>MP</i> 06	0,25	0,5	0,75	Indif
<i>Mp</i> 07	0,52	0,125	0,645	Indif
<i>Mp</i> 08	1,041	4	5,041	Antag
<i>Mp</i> 09	0,52	0,25	0,770	Indif
<i>Mp</i> 10	0,125	0,125	0,25	Sinerg
<i>Mp</i> 11	2,083	0,25	2,333	Indif
<i>Mp</i> 12	0,52	0,125	0,645	Indif
<i>Mp</i> 13	0,5	0,5	1	Indif
<i>Mp</i> 14	0,26	4	4,260	Antag
<i>Mp</i> 15	2,083	0,25	2,333	Indif
<i>Mp</i> 16	0,25	0,125	0,375	Sinerg
<i>Mp</i> 17	0,25	0,25	0,5	Sinerg
<i>Mp</i> 18	1,041	0,25	1,291	Indif
<i>Mp</i> 19	0,062	0,125	0,187	Sinerg
<i>Mp</i> 20	1,041	0,25	1,291	Indif
<i>Mp</i> 21	0,031	0,062	0,093	Sinerg
<i>Mp</i> 22	1,041	0,125	1,166	Indif
<i>Mp</i> 23	0,062	0,125	0,187	Sinerg
<i>Mp</i> 24	0,52	0,25	0,770	Indif
<i>Mp</i> 25	1,041	1	2,041	Indif
<i>Mp</i> 26	0,52	0,125	0,645	Indif

**Mp*: *Malassezia pachydermatis*; Sinerg: Sinergismo; Indif: Indiferença; Antag: Antagonismo.

Tabela 40: Interações resultantes da combinação de cetoconazol (CTZ) e cinamaldeído (CIN) frente aos isolados de *Malassezia pachydermatis*.

Isolados	FICCTZ	FICCIN	ICIF	Resultado
<i>Mp</i> 01	4,006	1	5,006	Antag
<i>MP</i> 02	0,52	1	1,520	Indif
<i>MP</i> 03	4,006	1	5,006	Antag
<i>Mp</i> 04	4,006	0,5	4,506	Antag
<i>Mp</i> 05	0,031	0,062	0,093	Sinerg
<i>MP</i> 06	1,041	1	2,041	Indif
<i>Mp</i> 07	0,125	1	1,125	Indif
<i>Mp</i> 08	4,006	2	6,006	Antag
<i>Mp</i> 09	0,52	0,5	1,020	Indif
<i>Mp</i> 10	0,26	0,125	0,385	Sinerg
<i>Mp</i> 11	4,006	1	5,006	Antag
<i>Mp</i> 12	4,006	0,5	4,506	Antag
<i>Mp</i> 13	1,041	2	3,041	Antag
<i>Mp</i> 14	1,041	0,5	1,541	Indif
<i>Mp</i> 15	4,006	1	5,006	Antag
<i>Mp</i> 16	0,125	0,125	0,25	Sinerg
<i>Mp</i> 17	1,041	0,25	1,291	Indif
<i>Mp</i> 18	4,006	0,25	4,256	Antag
<i>Mp</i> 19	0,52	0,5	1,020	Indif
<i>Mp</i> 20	0,52	0,125	0,645	Indif
<i>Mp</i> 21	0,062	0,062	0,125	Sinerg
<i>Mp</i> 22	2,083	0,5	2,583	Indif
<i>Mp</i> 23	0,25	0,125	0,375	Sinerg
<i>Mp</i> 24	4,006	0,5	4,506	Antag
<i>Mp</i> 25	4,006	1	5,006	Antag
<i>Mp</i> 26	4,006	0,125	4,131	Antag

**Mp*: *Malassezia pachydermatis*, Sinerg: Sinergismo; Indif: Indiferença; Antag: Antagonismo.

Tabela 41: Interações resultantes da combinação de clotrimazol (CLZ) e cinamaldeído (CIN) frente aos isolados de *Malassezia pachydermatis*.

Isolados	FICCLZ	FICCIN	ICIF	Resultado
<i>Mp</i> 01	0,5	0,5	1	Indif
<i>MP</i> 02	0,5	0,125	0,625	Indif
<i>MP</i> 03	0,031	0,25	0,281	Sinerg
<i>Mp</i> 04	0,031	0,5	0,531	Indif
<i>Mp</i> 05	0,125	0,03	0,156	Sinerg
<i>MP</i> 06	0,5	0,5	1	Indif
<i>Mp</i> 07	0,5	0,125	0,625	Indif
<i>Mp</i> 08	1	0,5	1,5	Indif
<i>Mp</i> 09	0,015	0,5	0,515	Indif
<i>Mp</i> 10	0,125	0,06	0,187	Sinerg
<i>Mp</i> 11	0,25	0,25	0,5	Sinerg
<i>Mp</i> 12	0,062	0,062	0,125	Sinerg
<i>Mp</i> 13	0,062	0,5	0,562	Indif
<i>Mp</i> 14	0,125	0,25	0,375	Sinerg
<i>Mp</i> 15	0,25	0,25	0,5	Sinerg
<i>Mp</i> 16	0,125	0,125	0,25	Sinerg
<i>Mp</i> 17	1	0,25	1,25	Indif
<i>Mp</i> 18	0,125	2	2,125	Indif
<i>Mp</i> 19	0,007	0,5	0,507	Indif
<i>Mp</i> 20	0,5	0,13	0,625	Indif
<i>Mp</i> 21	0,002	0,062	0,064	Sinerg
<i>Mp</i> 22	0,007	2	2,007	Indif
<i>Mp</i> 23	0,5	0,13	0,625	Indif
<i>Mp</i> 24	0,5	0,125	0,625	Indif
<i>Mp</i> 25	0,031	1	1,031	Indif
<i>Mp</i> 26	0,25	0,062	0,312	Sinerg

**Mp*: *Malassezia pachydermatis*; Sinerg: Sinergismo; Indif: Indiferença; Antag: Antagonismo.

Tabela 42: Interações resultantes da combinação de miconazol (MCZ) e cinamaldeído (CIN) frente aos isolados de *Malassezia pachydermatis*.

Isolados	FICMCZ	FICCIN	ICIF	Resultado
<i>Mp</i> 01	0,25	0,5	0,75	Indif
<i>MP</i> 02	0,125	0,125	0,25	Sinerg
<i>MP</i> 03	0,125	0,125	0,25	Sinerg
<i>Mp</i> 04	0,125	0,062	0,187	Sinerg
<i>Mp</i> 05	0,015	0,062	0,078	Sinerg
<i>MP</i> 06	0,25	0,125	0,375	Sinerg
<i>Mp</i> 07	0,25	0,125	0,375	Sinerg
<i>Mp</i> 08	0,25	0,5	0,75	Indif
<i>Mp</i> 09	0,031	0,062	0,093	Sinerg
<i>Mp</i> 10	0,125	0,062	0,187	Sinerg
<i>Mp</i> 11	0,062	0,25	0,312	Sinerg
<i>Mp</i> 12	0,5	0,062	0,187	Sinerg
<i>Mp</i> 13	0,5	0,5	1	Indif
<i>Mp</i> 14	0,062	0,25	0,312	Sinerg
<i>Mp</i> 15	0,5	0,25	0,75	Indif
<i>Mp</i> 16	0,25	0,125	0,375	Sinerg
<i>Mp</i> 17	0,125	0,25	0,75	Indif
<i>Mp</i> 18	1	0,125	1,125	Indif
<i>Mp</i> 19	0,003	0,25	0,253	Sinerg
<i>Mp</i> 20	0,5	0,125	0,625	Indif
<i>Mp</i> 21	0,002	0,062	0,064	Sinerg
<i>Mp</i> 22	0,25	0,125	0,375	Sinerg
<i>Mp</i> 23	0,031	1	1,031	Indif
<i>Mp</i> 24	0,031	0,125	0,156	Sinerg
<i>Mp</i> 25	0,003	2	2,003	Indif
<i>Mp</i> 26	0,125	0,062	0,187	Sinerg

**Mp*: *Malassezia pachydermatis*; Sinerg: Sinergismo; Indif: Indiferença; Antag: Antagonismo.

Tabela 43: Interações resultantes da combinação de nistatina (NST) e cinamaldeído (CIN) frente aos isolados de *Malassezia pachydermatis*.

Isolados	FICNST	FICCIN	ICIF	Resultado
<i>Mp</i> 01	0,25	0,5	0,75	Indif
<i>MP</i> 02	0,015	0,125	0,140	Sinerg
<i>MP</i> 03	0,003	0,5	0,503	Indif
<i>Mp</i> 04	0,125	0,0625	0,187	Sinerg
<i>Mp</i> 05	0,003	0,25	0,253	Sinerg
<i>MP</i> 06	0,125	0,125	0,25	Sinerg
<i>Mp</i> 07	0,015	0,125	0,140	Sinerg
<i>Mp</i> 08	0,25	0,5	0,75	Indif
<i>Mp</i> 09	0,125	0,062	0,187	Sinerg
<i>Mp</i> 10	0,125	0,062	0,187	Sinerg
<i>Mp</i> 11	0,125	0,25	0,375	Sinerg
<i>Mp</i> 12	0,015	0,25	0,265	Sinerg
<i>Mp</i> 13	0,125	0,5	0,625	Indif
<i>Mp</i> 14	0,25	0,25	0,5	Sinerg
<i>Mp</i> 15	0,125	0,25	0,375	Sinerg
<i>Mp</i> 16	0,125	0,125	0,25	Sinerg
<i>Mp</i> 17	1	0,25	1,25	Indif
<i>Mp</i> 18	0,25	0,125	0,375	Sinerg
<i>Mp</i> 19	0,125	0,062	0,187	Sinerg
<i>Mp</i> 20	0,5	0,125	0,625	Indif
<i>Mp</i> 21	0,031	0,031	0,062	Sinerg
<i>Mp</i> 22	0,5	0,125	0,625	Indif
<i>Mp</i> 23	0,125	0,125	0,25	Indif
<i>Mp</i> 24	0,125	0,125	0,25	Sinerg
<i>Mp</i> 25	0,25	0,125	0,375	Sinerg
<i>Mp</i> 26	0,125	0,062	0,187	Sinerg

**Mp*: *Malassezia pachydermatis*; Sinerg: Sinergismo; Indif: Indiferença; Antag: Antagonismo.

Tabela 44: Interações resultantes da combinação de terbinafina (TRB) e cinamaldeído (CIN) frente aos isolados de *Malassezia pachydermatis*.

Isolados	FICTRB	FICCIN	ICIF	Resultado
<i>Mp</i> 01	0,5	0,5	1	Indif
<i>MP</i> 02	1	1	2	Indif
<i>MP</i> 03	0,125	0,5	0,625	Indif
<i>Mp</i> 04	0,063	0,5	0,562	Indif
<i>Mp</i> 05	0,125	0,125	0,25	Sinerg
<i>MP</i> 06	0,125	1	1,125	Indif
<i>Mp</i> 07	0,031	2	2,031	Indif
<i>Mp</i> 08	2	0,5	2,5	Indif
<i>Mp</i> 09	0,031	0,25	0,281	Sinerg
<i>Mp</i> 10	0,004	1	1,003	Indif
<i>Mp</i> 11	0,063	2	2,062	Indif
<i>Mp</i> 12	0,031	0,5	0,531	Indif
<i>Mp</i> 13	4	0,5	4,5	Antag
<i>Mp</i> 14	0,5	0,25	0,75	Indif
<i>Mp</i> 15	0,125	4	4,125	Antag
<i>Mp</i> 16	0,125	2	2,125	Indif
<i>Mp</i> 17	0,031	4	4,031	Antag
<i>Mp</i> 18	0,063	2	2,062	Indif
<i>Mp</i> 19	0,25	0,5	0,75	Indif
<i>Mp</i> 20	0,5	0,125	0,625	Indif
<i>Mp</i> 21	0,008	0,062	0,070	Sinerg
<i>Mp</i> 22	0,016	2	2,015	Indif
<i>Mp</i> 23	1	0,125	1,125	Indif
<i>Mp</i> 24	0,063	4	4,062	Antag
<i>Mp</i> 25	0,031	2	2,031	Indif
<i>Mp</i> 26	0,063	0,5	0,562	Indif

**Mp*: *Malassezia pachydermatis*; Sinerg: Sinergismo; Indif: Indiferença; Antag: Antagonismo.

Tabela 45: Resumo dos halos de inibição de 20 isolados de *M. pachydermatis* à exposição sequencial de KTZ e ITZ, através de disco-difusão.

Sequência de administração das drogas	Média do raio da zona de inibição (mm) \pm SD
A. KTZ seguido por ITZ no disco (10μg)	
Concentração do KTZ nas placas (μ g/mL)	
0 (ITZ sozinho)	8,45 \pm 4,29
0,0009	9,10 \pm 4,68
0,001	7,90 \pm 4,41
0,003	8,40 \pm 4,65
0,007	8,80 \pm 4,58
0,01	9,10 \pm 3,95
B. ITZ seguido por KTZ no disco (50μg)	
Concentração do ITZ nas placas (μ g/mL)	
0 (KTZ sozinho)	10,9 \pm 4,19
0,003	11,7 \pm 4,71
0,007	11,5 \pm 4,73
0,01	11,6 \pm 4,89
0,03	11,5 \pm 4,83
0,06	12,1 \pm 4,87
C. Exposição simultânea do KTZ (nas placas) e ITZ no disco (10μg)	
Concentração do KTZ nas placas (μ g/mL)	
0 (ITZ sozinho)	9,45 \pm 4,31
0,0009	7,15 \pm 2,91
0,001	10,7 \pm 4,36
0,003	9,80 \pm 4,54
0,007	5,97 \pm 2,89
0,01	11,7 \pm 5,52
D. Exposição simultânea do ITZ (nas placas) e KTZ no disco (50μg)	
Concentração do ITZ nas placas (μ g/mL)	
0 (KTZ sozinho)	11,8 \pm 4,67
0,003	14,4 \pm 5,14
0,007	11,4 \pm 4,71
0,01	13,8 \pm 4,98
0,03	13,9 \pm 4,98
0,06	14,7 \pm 6,23

KTZ: cetoconazol; ITZ: itraconazol
SD: desvio padrão

Tabela 46: Resumo dos halos de inibição de 20 isolados de *M. pachydermatis* à exposição sequencial de KTZ e CTZ, através de disco-difusão.

Sequência de administração das drogas	Média do raio da zona de inibição (mm) \pm SD
A. KTZ seguido por CTZ no disco (50 μ g)	
Concentração de KTZ nas placas (μ g/mL)	
0 (CTZ sozinho)	1,05 \pm 1,57
0,0009	1,27 \pm 3,17
0,001	1,20 \pm 1,79
0,003	0,70 \pm 1,59
0,007	0,70 \pm 1,62
0,01	1,30 \pm 1,72
B. CTZ seguido por KTZ no disco (50 μ g)	
Concentração de CTZ nas placas (μ g/mL)	
0 (KTZ sozinho)	11,88 \pm 3,97
0,25	11,1 \pm 3,48
0,5	12,4 \pm 4,34
1	11,80 \pm 4,51
2	13,6 \pm 5,37
4	14,1 \pm 5,43
C. Exposição simultânea de KTZ (nas placas) e CTZ no disco (50 μ g)	
Concentração de KTZ nas placas (μ g/mL)	
0 (CTZ sozinho)	0,80 \pm 1,39
0,0009	0,22 \pm 1,72
0,001	0,65 \pm 0,98
0,003	0,77 \pm 1,21
0,007	0,50 \pm 1,10
0,01	0,50 \pm 1,14
D. Exposição simultânea de CTZ (nas placas) e KTZ no disco (50 μ g)	
Concentração de CTZ nas placas (μ g/mL)	
0 (KTZ sozinho)	11,23 \pm 4,39
0,25	11,70 \pm 5,05
0,5	12,0 \pm 4,73
1	12,80 \pm 5,41
2	12,63 \pm 5,27
4	12,2 \pm 5,72

KTZ: cetoconazol; CTZ: clotrimazol

SD: desvio padrão

Tabela 47: Resumo dos halos de inibição de 20 isolados de *M. pachydermatis* à exposição sequencial de ITZ e CTZ, através de disco-difusão.

Sequência de administração das drogas	Média do raio da zona de inibição (mm) \pm SD
A. ITZ seguido de CTZ no disco (50 μ g)	
Concentração de ITZ nas placas (μ g/mL)	
0 (CTZ sozinho)	0,65 \pm 1,34
0,003	0,65 \pm 1,22
0,007	0,60 \pm 1,50
0,01	0,30 \pm 0,80
0,03	0,80 \pm 1,73
0,06	0,65 \pm 1,26
B. CTZ seguido de ITZ no disco (10 μ g)	
Concentração de CTZ nas placas (μ g/mL)	
0 (ITZ sozinho)	
0,25	8,95 \pm 4,06
0,5	8,57 \pm 3,80
1	8,45 \pm 3,89
2	9,12 \pm 5,20
4	9,55 \pm 4,66
C. Exposição simultânea de ITZ (nas placas) e CTZ no disco (50 μ g)	
Concentração de ITZ nas placas (μ g/mL)	
0 (CTZ sozinho)	1,15 \pm 2,05
0,003	1,45 \pm 2,01
0,007	1,50 \pm 1,76
0,01	1,35 \pm 1,66
0,03	1,95 \pm 3,84
0,06	1,60 \pm 1,53
D. Exposição simultânea de CTZ (nas placas) e ITZ no disco (10 μ g)	
Concentração de CTZ nas placas (μ g/mL)	
0 (ITZ sozinho)	4,45 \pm 4,72
0,25	5,20 \pm 4,21
0,5	4,47 \pm 4,46
1	5,77 \pm 5,35
2	5,55 \pm 4,26
4	5,80 \pm 5,92

ITZ: itraconazol; CTZ: clotrimazol

SD: desvio padrão

11 ANEXOS

Rightslink Printable License

<https://s100.copyright.com/App/PrintableLicenseFrame.jsp?publ...>

ELSEVIER LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Apr 15, 2014

This is a License Agreement between Regis A Zanette ("You") and Elsevier ("Elsevier") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Elsevier, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

Supplier	Elsevier Limited The Boulevard, Langford Lane Kidlington, Oxford, OX5 1GB, UK
Registered Company Number	1982084
Customer name	Regis A Zanette
Customer address	Campus UFSM, Predio 20, Sala 4139 Santa Maria, RS 97105900
License number	3370231377850
License date	Apr 15, 2014
Licensed content publisher	Elsevier
Licensed content publication	Veterinary Microbiology
Licensed content title	Sequential exposure of <i>Malassezia pachydermatisto</i> azoles: enhanced or decreased activity?
Licensed content author	Karine B. Schlemmer, Francielli K. Jesus, Régis A. Zanette, Carine E.P. Zimmermann, Claudia Lautert, Sydney H. Alves, Janio M. Santurio
Licensed content date	3 April 2014
Licensed content volume number	
Licensed content issue number	
Number of pages	1
Start Page	0
End Page	0
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	full article
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	No
Title of your thesis/dissertation	SUSCETIBILIDADE IN VITRO DE <i>Malassezia pachydermatis</i> FRENTE A AGENTES ANTIFÚNGICOS E FRAÇÕES DE ÓLEOS ESSENCIAIS
Expected completion date	Apr 2014
Estimated size (number of pages)	126
Elsevier VAT number	GB 494 6272 12