



Ciências Biológicas: Campo Promissor em Pesquisa 4

Jesus Rodrigues Lemos
(Organizador)

 **Atena**
Editora
Ano 2020



Ciências Biológicas: Campo Promissor em Pesquisa 4

Jesus Rodrigues Lemos
(Organizador)

 **Atena**
Editora
Ano 2020

2020 by Atena Editora

Copyright © Atena Editora

Copyright do Texto © 2020 Os autores

Copyright da Edição © 2020 Atena Editora

Editora Chefe: Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira

Diagramação: Natália Sandrini de Azevedo

Edição de Arte: Luiza Batista

Revisão: Os Autores



Todo o conteúdo deste livro está licenciado sob uma Licença de Atribuição Creative Commons. Atribuição 4.0 Internacional (CC BY 4.0).

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores. Permitido o download da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

Conselho Editorial

Ciências Humanas e Sociais Aplicadas

Profª Drª Adriana Demite Stephani – Universidade Federal do Tocantins

Prof. Dr. Álvaro Augusto de Borba Barreto – Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Alexandre Jose Schumacher – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso

Profª Drª Angeli Rose do Nascimento – Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Antonio Carlos Frasson – Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof. Dr. Antonio Gasparetto Júnior – Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais

Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho – Universidade de Brasília

Prof. Dr. Carlos Antonio de Souza Moraes – Universidade Federal Fluminense

Profª Drª Cristina Gaio – Universidade de Lisboa

Profª Drª Denise Rocha – Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Deyvison de Lima Oliveira – Universidade Federal de Rondônia

Prof. Dr. Edvaldo Antunes de Farias – Universidade Estácio de Sá

Prof. Dr. Elio Martins Senhora – Universidade Federal de Roraima

Prof. Dr. Fabiano Tadeu Grazioli – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões

Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Prof. Dr. Gustavo Henrique Cepolini Ferreira – Universidade Estadual de Montes Claros

Profª Drª Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionale delle Figlie di Maria Ausiliatrice

Prof. Dr. Julio Cândido de Meirelles Júnior – Universidade Federal Fluminense

Profª Drª Keyla Christina Almeida Portela – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso

Profª Drª Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins

Prof. Dr. Luis Ricardo Fernando da Costa – Universidade Estadual de Montes Claros

Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte

Prof. Dr. Marcelo Pereira da Silva – Universidade Federal do Maranhão

Profª Drª Miranilde Oliveira Neves – Instituto de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará

Profª Drª Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa

Profª Drª Rita de Cássia da Silva Oliveira – Universidade Estadual de Ponta Grossa

Profª Drª Sandra Regina Gardacho Pietrobon – Universidade Estadual do Centro-Oeste

Profª Drª Sheila Marta Carregosa Rocha – Universidade do Estado da Bahia

Prof. Dr. Rui Maia Diamantino – Universidade Salvador

Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Júnior – Universidade Federal do Oeste do Pará

Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande

Prof. Dr. Alexandre Leite dos Santos Silva – Universidade Federal do Piauí
Prof. Dr. Carlos Eduardo Sanches de Andrade – Universidade Federal de Goiás
Profª Drª Carmen Lúcia Voigt – Universidade Norte do Paraná
Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Fabrício Menezes Ramos – Instituto Federal do Pará
Prof. Dr. Juliano Carlo Rufino de Freitas – Universidade Federal de Campina Grande
Profª Drª Luciana do Nascimento Mendes – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. Marcelo Marques – Universidade Estadual de Maringá
Profª Drª Neiva Maria de Almeida – Universidade Federal da Paraíba
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista

Conselho Técnico Científico

Prof. Me. Abrão Carvalho Nogueira – Universidade Federal do Espírito Santo
Prof. Me. Adalberto Zorzo – Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza
Prof. Me. Adalto Moreira Braz – Universidade Federal de Goiás
Prof. Dr. Adaylson Wagner Sousa de Vasconcelos – Ordem dos Advogados do Brasil/Seccional Paraíba
Prof. Me. André Flávio Gonçalves Silva – Universidade Federal do Maranhão
Profª Drª Andreza Lopes – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento Acadêmico
Profª Drª Andrezza Miguel da Silva – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia
Prof. Dr. Antonio Hot Pereira de Faria – Polícia Militar de Minas Gerais
Profª Ma. Bianca Camargo Martins – UniCesumar
Profª Ma. Carolina Shimomura Nanya – Universidade Federal de São Carlos
Prof. Me. Carlos Antônio dos Santos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Prof. Ma. Cláudia de Araújo Marques – Faculdade de Música do Espírito Santo
Profª Drª Cláudia Taís Siqueira Cagliari – Centro Universitário Dinâmica das Cataratas
Prof. Me. Daniel da Silva Miranda – Universidade Federal do Pará
Profª Ma. Daniela da Silva Rodrigues – Universidade de Brasília
Profª Ma. Dayane de Melo Barros – Universidade Federal de Pernambuco
Prof. Me. Douglas Santos Mezacas – Universidade Estadual de Goiás
Prof. Dr. Edvaldo Costa – Marinha do Brasil
Prof. Me. Eduardo Gomes de Oliveira – Faculdades Unificadas Doctum de Cataguases
Prof. Me. Eliel Constantino da Silva – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita
Prof. Me. Euvaldo de Sousa Costa Junior – Prefeitura Municipal de São João do Piauí
Profª Ma. Fabiana Coelho Couto Rocha Corrêa – Centro Universitário Estácio Juiz de Fora
Prof. Dr. Fabiano Lemos Pereira – Prefeitura Municipal de Macaé
Prof. Me. Felipe da Costa Negrão – Universidade Federal do Amazonas
Profª Drª Germana Ponce de Leon Ramírez – Centro Universitário Adventista de São Paulo
Prof. Me. Gevair Campos – Instituto Mineiro de Agropecuária
Prof. Dr. Guilherme Renato Gomes – Universidade Norte do Paraná
Prof. Me. Gustavo Krahl – Universidade do Oeste de Santa Catarina
Prof. Me. Helton Rangel Coutinho Junior – Tribunal de Justiça do Estado do Rio de Janeiro
Profª Ma. Jaqueline Oliveira Rezende – Universidade Federal de Uberlândia
Prof. Me. Javier Antonio Albornoz – University of Miami and Miami Dade College
Profª Ma. Jéssica Verger Nardeli – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
Prof. Me. Jhonatan da Silva Lima – Universidade Federal do Pará
Prof. Me. José Luiz Leonardo de Araujo Pimenta – Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria Uruguay
Prof. Me. José Messias Ribeiro Júnior – Instituto Federal de Educação Tecnológica de Pernambuco

Profª Ma. Juliana Thaisa Rodrigues Pacheco – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Kamilly Souza do Vale – Núcleo de Pesquisas Fenomenológicas/UFPA
Profª Drª Karina de Araújo Dias – Prefeitura Municipal de Florianópolis
Prof. Dr. Lázaro Castro Silva Nascimento – Laboratório de Fenomenologia & Subjetividade/UFPR
Prof. Me. Leonardo Tullio – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Ma. Lilian Coelho de Freitas – Instituto Federal do Pará
Profª Ma. Liliani Aparecida Sereno Fontes de Medeiros – Consórcio CEDERJ
Profª Drª Lívia do Carmo Silva – Universidade Federal de Goiás
Prof. Me. Lucio Marques Vieira Souza – Secretaria de Estado da Educação, do Esporte e da Cultura de Sergipe
Prof. Me. Luis Henrique Almeida Castro – Universidade Federal da Grande Dourados
Prof. Dr. Luan Vinicius Bernardelli – Universidade Estadual do Paraná
Prof. Dr. Michel da Costa – Universidade Metropolitana de Santos
Prof. Dr. Marcelo Máximo Purificação – Fundação Integrada Municipal de Ensino Superior
Prof. Me. Marcos Aurelio Alves e Silva – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo
Profª Ma. Marileila Marques Toledo – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri
Prof. Me. Ricardo Sérgio da Silva – Universidade Federal de Pernambuco
Prof. Me. Rafael Henrique Silva – Hospital Universitário da Universidade Federal da Grande Dourados
Profª Ma. Renata Luciane Polsaque Young Blood – UniSecal
Profª Ma. Solange Aparecida de Souza Monteiro – Instituto Federal de São Paulo
Prof. Me. Tallys Newton Fernandes de Matos – Faculdade Regional Jaguaribana
Prof. Dr. Welleson Feitosa Gazel – Universidade Paulista

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) (eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)	
C569	Ciências biológicas [recurso eletrônico] : campo promissor em pesquisa 4 / Organizador Jesus Rodrigues Lemos. – Ponta Grossa, PR: Atena, 2020. Formato: PDF Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader Modo de acesso: World Wide Web Inclui bibliografia ISBN 978-65-5706-140-4 DOI 10.22533/at.ed.404202406 1. Ciências biológicas – Pesquisa – Brasil. I. Lemos, Jesus Rodrigues.
CDD 570	
Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422	

Atena Editora
Ponta Grossa – Paraná - Brasil
www.atenaeditora.com.br
 contato@atenaeditora.com.br

APRESENTAÇÃO

Este volume da obra “Ciências Biológicas: Campo promissor em Pesquisa 4” vem trazer ao leitor, em seus capítulos, informações diversas imbuídas em diferentes campos do conhecimento de Ciências da Vida, como o próprio título do e-book sugere: uma área extremamente promissora, dinâmica e passível de aquisição de novas informações a todo momento, vindo, de forma comprometida e eficaz, a atualizar o leitor interessado nesta grande área do conhecimento.

Pesquisadores de diferentes gerações, e diferentes regiões do país, motivados por uma força motriz que impulsiona a busca de respostas às suas perguntas, trazem dados resultantes da dedicação à Ciência, ansiando responder suas inquietações e compartilhar com o leitor, de forma cristalina e didática, seus alcances técnico-científicos, satisfazendo a função precípua da ciência que é a de melhorar a qualidade de vida do homem, enquanto executante do seu papel cidadão e ser social.

Somente por uma questão de ordenação, os 28 capítulos deste volume foram sequenciados levando-se em consideração, primeiramente, estudos, em diferentes vertentes, com organismos vivos, animais e plantas, seguidos por pesquisas oriundas de aspectos didático-pedagógicos, aquelas relacionadas aos progressos de situações-problemas em vegetais, animais e humanos e, por fim, interações entre diferentes organismos no espaço ambiental com um todo.

Em todas estas áreas, as pesquisas conduzem o leitor a acompanhar descobertas/avanços que proporcionam, indubitavelmente, um quadro mais robusto, e que acresce ao que até então se tem conhecimento naquele campo de estudo, das diferentes subáreas das Ciências Biológicas, com viés também para a saúde e bem estar humanos.

Neste sentido, a heterogeneidade deste volume, extremamente rico, irá contribuir consideravelmente tanto na formação de jovens graduandos e pós-graduandos, quanto ser atrativo para profissionais atuantes nas áreas escolar, técnica e acadêmica aqui abordadas, não eximindo também o leitor “curioso” interessado nas temáticas aqui trazidas.

Portanto, aproveitem os assuntos dos seus interesses e boa leitura!

Jesus Rodrigues Lemos

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	1
SINCRONIZAÇÃO DE RITMOS DIÁRIOS EM POPULAÇÕES DE FORMIGAS SAÚVA (<i>ATTA SEXDENS</i>)	
Mila Maria Pamplona Barbosa	
Bruna Rezende Malta de Sá	
Gisele Akemi Oda	
André Frazão Helene	
DOI 10.22533/at.ed.4042024061	
CAPÍTULO 2	16
CONTRIBUTION TOWARDS THE STUDY OF LEAF ANATOMY OF <i>SMILAX BRASILIENSIS</i> SPRENG. (SMILACACEAE)	
Myriam Almeida Barbosa	
Marlúcia Souza Pádua Vilela	
Luciana Alves Rodrigues dos Santos Lima	
Ana Hortência Fonseca Castro	
DOI 10.22533/at.ed.4042024062	
CAPÍTULO 3	28
ACANTHACEAE DOS JARDINS DO MUSEU DE BIOLOGIA MELLO LEITÃO, SANTA TERESA-ES: ESPAÇO NÃO FORMAL E O ENSINO DE BOTÂNICA	
Elisa Mitsuko Aoyama	
Alexandre Indriunas	
DOI 10.22533/at.ed.4042024063	
CAPÍTULO 4	41
FORMAÇÃO DE BANCO DE SEMENTES (GERMOPLASMA) COM PLANTAS NATIVAS DA REGIÃO NORTE DO PIAUÍ	
Iara Fontenele de Pinho	
Maria da Conceição Sampaio Alves Teixeira	
Jesus Rodrigues Lemos	
DOI 10.22533/at.ed.4042024064	
CAPÍTULO 5	56
REGISTRO DE PLANTAS HOSPEDEIRAS DE CHRYSOMELIDAE NO SUDOESTE DO PARANÁ, COM ÊNFASE EM ALTICINI (GALERUCINAE)	
Lucas Frarão	
Adelita Maria Linzmeier	
DOI 10.22533/at.ed.4042024065	
CAPÍTULO 6	67
TOBACCO MIXTURE IN THE FIGHT AGAINST COWPEAAPHID DURING THE GROWTH AND DEVELOPMENT OF <i>V. UNGUICULATA</i>	
Marcelo Ferreira de Souza	
José Ivo Soares	
Ana Cristina Macedo de Oliveira	
Sebastião Erailson de Sousa Santos	
Maíres Alves Cordeiro	
Jeyce Layse Bezerra Silva	
Maria Regina de Oliveira Cassundé	
Ananda Jackellynne Vaz da Silva	
Lucas Ermeson Soares das Neves	

José Wiliam Pereira Brito
Karol Águida Santos Rocha
Italo Ferreira da Silva

DOI 10.22533/at.ed.4042024066

CAPÍTULO 7 74

WOULD THE VOLATILE TERPENES OF *MESOSPHAERUM SUAVEOLENS* HAVE A PHYTOTOXIC EFFECT?

José Weverton Almeida Bezerra
Rafael Pereira da Cruz
Thaís da Conceição Pereira
Maria Haiele Nogueira da Costa
Emanoel Messias Pereira Fernando
Helder Cardoso Tavares
Talita Leite Beserra
Kleber Ribeiro Fidelis
José Iago Muniz
Maria Aurea Soares de Oliveira
Talina Guedes Ribeiro
Maria Arlene Pessoa da Silva

DOI 10.22533/at.ed.4042024067

CAPÍTULO 8 83

CONHECIMENTO TRADICIONAL DE MICROARTRÓPODES EM UMA COMUNIDADE RURAL DA CAATINGA

Francisco Éder Rodrigues de Oliveira
Mikael Alves de Castro
Marlos Dellan de Souza Almeida
Célio Moura Neto
Helba Araújo de Queiroz Palácio
Jefferson Thiago Souza

DOI 10.22533/at.ed.4042024068

CAPÍTULO 9 98

MALASSEZIA PACHYDERMATIS ISOLADAS DE OTITES DE CÃES E GATOS: IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E SUSCEPTIBILIDADE IN VITRO A ÓLEOS ESSENCIAIS

Raquel Santos da Silva
Ludmilla Tonani
Marcia Regina von Zeska Kress

DOI 10.22533/at.ed.4042024069

CAPÍTULO 10 111

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL OBTIDO DAS FOLHAS DE CROTON SP SOBRE ATRAÇÃO PARA A OVIPOSIÇÃO DO *AEDES AEGYPTI*

Daniel Lobo Sousa
Roseliz Campelo Pachêco
Quirlan Queite Araújo Anjos
Thaimara Gomes Costa
Débora Cardoso da Silva
Simone Andrade Gualberto

DOI 10.22533/at.ed.40420240610

CAPÍTULO 11 116

O ENSINO DE BIOLOGIA SOB A ÓTICA DISCENTE: UM RECORTE AMOSTRAL NA ESCOLA TÉCNICA ESTADUAL EM BARREIRAS - BAHIA

Camila de Carvalho Moreira

Fábio de Oliveira

DOI 10.22533/at.ed.40420240611

CAPÍTULO 12 127

GLOSSÁRIO ONLINE DE BOTÂNICA COMO RECURSO DIDÁTICO PARA O ENSINO MÉDIO

Rebeca Melo Barboza

Bruno Edson-Chaves

Eliseu Marlônio Pereira de Lucena

DOI 10.22533/at.ed.40420240612

CAPÍTULO 13 141

ECOPEDAGOGIA: EDUCAÇÃO PARA O MEIO AMBIENTE

Magda Regina Santiago

Márcio Marastoni

Pero Torquato Moreira

DOI 10.22533/at.ed.40420240613

CAPÍTULO 14 152

ASPECTOS DA SENESCÊNCIA CELULAR EM INDIVÍDUOS IDOSOS SAUDÁVEIS

Thalyta Nery Carvalho Pinto

Juliana Ruiz Fernandes

Gil Benard

DOI 10.22533/at.ed.40420240614

CAPÍTULO 15 165

ANÁLISE *IN SILICO* DA INTERAÇÃO ENTRE AS PROTEÍNAS P53 E CREBBP E SUA RELAÇÃO COM LINFOMAS

Katheryne Lohany Barros Barbosa

Marcos Antonio Batista de Carvalho Júnior

Olívia Basso Rocha

Lívia do Carmo Silva

Gabriela Danelli Rosa

Jackeliny Garcia Costa

Kleber Santiago Freitas

DOI 10.22533/at.ed.40420240615

CAPÍTULO 16 173

EFEITO DO EXTRATO DE *UNCARIA TOMENTOSA* E PALMITATO SOBRE A MORTE CELULAR DE MIOBLASTOS C2C12

Bruna Letícia de Freitas

Jeniffer Farias dos Santos

Carla Roberta de Oliveira Carvalho

Viviane Abreu Nunes

DOI 10.22533/at.ed.40420240616

CAPÍTULO 17 184

ALTERAÇÕES NA INTERAÇÃO DAS PROTEINAS P53 E TPP1 COMO CAUSA DA ENDOMETRIOSE

Olivia Basso Rocha

Marcos Antonio Batista de Carvalho Junior

Katheryne Lohany Barros Barbosa

Kleber Santiago Freitas

Livia do Carmo Silva

Gabriela Danelli Rosa

Jackelin Garcia Costa

DOI 10.22533/at.ed.40420240617**CAPÍTULO 18** 192OBTENÇÃO DE SUBSTÂNCIAS INIBITÓRIAS SEMELHANTES ÀS BACTERIOCINAS POR *LACTOCOCCUS LACTIS* UTILIZANDO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR: EFEITO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA FRENTE A MICROORGANISMO CAUSADOR DE CÁRIE

Liz Caroline Mendes Alves

Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira

DOI 10.22533/at.ed.40420240618**CAPÍTULO 19** 209

EFEITOS DO TOLUENO SOBRE O APARELHO RESPIRATÓRIO E REPRODUTOR DE RATOS WISTAR

Ana Rosa Crisci

Marcos Leandro Paoleli dos Santos

Paulo Henrique da Silva Santos

Ângelo Rafael Bueno Rosa

Betina Ferreira Lacerda

Wilson Roberto Malfará

Lucila Costa Zini Angelotti

DOI 10.22533/at.ed.40420240619**CAPÍTULO 20** 221ESTUDO DA INTERAÇÃO E ENSAIO DE MUTAGÊNESE VISANDO O COMPLEXO ENOS-CALMODULINA POR ABORDAGENS *IN SILICO*

Marcos Antonio Batista de Carvalho Júnior

Olívia Basso Rocha

Katheryne Lohany Barros Barbosa

Livia do Carmo Silva

Gabriela Danelli Rosa

Jackelin Garcia Costa

Kleber Santiago Freitas

DOI 10.22533/at.ed.40420240620**CAPÍTULO 21** 230

ESTUDO MORFOLÓGICO DO TESTÍCULO DE RATOS COM OBESIDADE HIPOTALÂMICA TRATADOS EM PLATAFORMA VIBRATÓRIA

Gabrielly de Barros

Fernando Antonio Briere

Suellen Ribeiro da Silva Scarton

Célia Cristina Leme Beu

DOI 10.22533/at.ed.40420240621

CAPÍTULO 22 235

ESTUDO MORFOMÉTRICO E ESTEREOLÓGICO EM PLACENTAS DE RATAS COM DIABETES MELLITUS GESTACIONAL INDUZIDO POR ESTREPTOZOTOCINA

Raquel de Mendonça Rosa-Castro
Izadora Renosto
Euro Marques Junior

DOI 10.22533/at.ed.40420240622

CAPÍTULO 23 249

RELAÇÃO ENTRE AGROTÓXICOS E CÂNCER: UMA ANÁLISE DO GLIFOSATO

Júlio César Silva de Souza
Tatianny de Assis Freitas Souza

DOI 10.22533/at.ed.40420240623

CAPÍTULO 24 261

ESTUDO DAS ALTERAÇÕES TÍMICAS RELACIONADAS COM A IDADE DURANTE A INFECÇÃO POR *TRYPANOSOMA CRUZI*

Rafaela Pravato Colato
Vânia Brazão
Fabricia Helena Santello
Andressa Duarte
José Clóvis do Prado Jr.

DOI 10.22533/at.ed.40420240624

CAPÍTULO 25 272

O POLIMORFISMO DO GENE GSTM1 EM PACIENTES COM ATROSCLEROSE

Isabela Barros Lima
Andreia Marcelino Barbosa
Iasmim Ribeiro da Costa
Ulisses dos Santos Vilarinho
Lilian Castilho de Araújo Gianotti
Débora Acyole Rodrigues de Moraes
Kátia Karina Verolli de Oliveira Moura

DOI 10.22533/at.ed.40420240625

CAPÍTULO 26 279

SÍFILIS GESTACIONAL: DESAFIOS ENFRENTADOS POR ENFERMEIROS E AGENTES COMUNITÁRIOS DE SAÚDE DA ATENÇÃO PRIMÁRIA

Mary Kathleen Marques Xavier
Tarciana Alves Menezes
Daniela de Aquino Freire
Thaís da Silva Oliveira
Juliana da Rocha Cabral
Andreza Cavalcanti Vasconcelos
Martha Sthefanie Borba Costa
Viviane de Souza Brandão Lima

DOI 10.22533/at.ed.40420240626

CAPÍTULO 27 **289**

OCORRÊNCIA DE FORAMINIFERA (PROTOCTISTA, GRANULORETICULOSA) NA PRAIA DE ITAGUÁ, UBATUBA, SP

Paulo Sergio de Sena

Ana Paula Barros de Jesus

DOI 10.22533/at.ed.40420240627

CAPÍTULO 28 **295**

INTERAÇÃO DE LECTINAS DE TOXOPLASMA GONDII COM RECEPTORES DO TIPO TOLL DE CÉLULAS NATURAL KILLER

Irislene Simões Brigo

Cássia Aparecida Sebastião

Cristina Ribeiro de Barros Cardoso

Maria Cristina Roque Antunes Barreira

Camila Figueiredo Pinzan

DOI 10.22533/at.ed.40420240628

SOBRE O ORGANIZADOR..... **297****ÍNDICE REMISSIVO** **298**

MALASSEZIA PACHYDERMATIS ISOLADAS DE OTITES DE CÃES E GATOS: IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E SUSCEPTIBILIDADE IN VITRO A ÓLEOS ESSENCIAIS

Data de aceite: 18/06/2020

Raquel Santos da Silva

Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas

Ribeirão Preto – SP – Brasil

Link Lattes: <http://lattes.cnpq.br/0158676439244009>

Ludmilla Tonani

Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas

Ribeirão Preto – SP – Brasil

Link Lattes: <http://lattes.cnpq.br/2223866522704252>

Marcia Regina von Zeska Kress

Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas

Ribeirão Preto – SP – Brasil

Link Lattes: <http://lattes.cnpq.br/8032658250894594>

Link Orcid: <http://orcid.org/0000-0003-1239-7722>

infecções do canal auditivo de cães e gatos. A patogenia da *Malassezia* sp. está relacionada com o sistema imune do hospedeiro e aos fatores de virulência do fungo. A emergência de linhagens de *M. pachydermatis* resistentes aos antifúngicos comerciais resulta na busca de novas alternativas terapêuticas. Os óleos essenciais são compostos aromáticos voláteis altamente concentrados, que são extraídos de plantas e possuem grande diversidade de atividades como, entre outros, a ação antibacteriana e antifúngica. Assim, o objetivo deste estudo foi isolar e identificar, por método molecular, isolados clínicos de *M. pachydermatis* do ouvido externo de gatos e cães domésticos com otite e avaliar a susceptibilidade aos antifúngicos comerciais cetoconazol, miconazol, itraconazol e posaconazol, e a atividade antifúngica dos óleos essenciais de Alecrim pimenta, Cravo-da-Índia, Menta, Tomilho branco, Manjericão, Alecrim e Limão-Tahiti. Adicionalmente, a toxicidade dos óleos essenciais foi avaliada no modedo invertebrado *Galleria mellonella*. Um total de 28 cepas de *M. pachydermatis* foram isoladas e identificadas pelo sequenciamento da região *Internal Transcribed Spacer* (ITS) do DNA ribossomal. O teste de atividade antifúngica revelou que cetoconazol, miconazol e posaconazol apresentaram baixa concentração inibitória mínima (CIM) para os isolados clínicos de *M. pachydermatis*.

RESUMO: *Malassezia pachydermatis* é uma levedura polimórfica que faz parte da microbiota de pele e mucosa e é frequente causadora de

pachydermatis. Entretanto, alguns isolados clínicos apresentam alta CIM de miconazol ($16 \mu\text{g ml}^{-1}$) e cetoconazol ($4 \mu\text{g ml}^{-1}$). Os óleos essenciais de Alecrim pimenta, Cravo-da-Índia, Menta e Tomilho Branco apresentaram alta atividade antifúngica contra os isolados clínicos do fungo patogênico *M. pachydermatis* e baixa toxicidade à *G. mellonella*. Embora ensaios adicionais sejam necessários para a aplicação desses óleos essenciais no tratamento de infecções causadas por *M. pachydermatis*, a eficácia antifúngica e a baixa toxicidade mostram um uso promissor desses óleos essenciais no tratamento de infecções fúngicas.

PALAVRAS-CHAVE: *Malassezia pachydermatis*, antifúngicos comerciais, óleos essenciais, toxicidade, *Galleria mellonella*.

MALASSEZIA PACHYDERMATIS ISOLATED FROM DOGS AND CATS WITH OTITIS EXTERNA: MOLECULAR IDENTIFICATION AND ESSENTIAL OILS SUSCEPTIBILITY

ABSTRACT: *Malassezia pachydermatis* is a polymorphic yeast that is part of the skin and mucosa microbiota and a frequent infection-causing agent of ear canal and skin of dogs and cats. *Malassezia* sp. pathogenesis in lesions is related with the host immune system as well as the fungus virulence factors. The emergence of *M. pachydermatis* resistant strains to commercial antifungal results in the search for new therapeutic alternatives. Essential oils are highly concentrated volatile aromatic compounds that are extracted from plants and have a wide range of activities such as, among others, antibacterial and antifungal effect. In addition, the toxicity of essential oils was evaluated in the invertebrate moleria *Galleria mellonella*. A total of 28 strains of *M. pachydermatis* were isolated and identified by the sequencing of the Internal Transcribed Spacer - ITS region of the ribosomal DNA. The antifungal activity test revealed that ketoconazole, miconazole and posaconazole showed low MICs for the clinical isolates of *M. pachydermatis*. However, some clinical isolates have a high MIC of miconazole ($16 \mu\text{g ml}^{-1}$) and ketoconazole ($4 \mu\text{g ml}^{-1}$). The essential oils of Rosemary Pepper, Clove, Mint and White Thyme showed high antifungal activity against clinical isolates of the pathogenic fungus *M. pachydermatis* and low toxicity to *G. mellonella*. Although additional tests are necessary for the application of these essential oils in the treatment of infections caused by *M. pachydermatis*, the antifungal effectiveness and low toxicity shows a promising use of these essential oils in the treatment of fungal infection.

KEYWORDS: *Malassezia pachydermatis*, commercial antifungals, essential oils, toxicity, *Galleria mellonella*.

1 | INTRODUÇÃO

Malassezia pachydermatis pertence a um grupo de fungos leveduriformes e lipofílicos que coloniza a pele e mucosa de mamíferos, incluindo gatos e cães saudáveis, sendo a principal espécie fúngica isolada do canal auditivo de cães saudáveis e com otite (Guého-Kellerman et al., 2010, Forster et al., 2018). Embora *M. pachydermatis* seja prevalente em cães, as espécies mais isoladas de gatos inclui principalmente *M. nana*, seguido de *M. sympodialis*, *M. globosa*, *M. furfur* e *M. slooffiae* (Bond et al., 2020). A patogenia da

Malassezia sp. nas lesões está relacionada com o sistema imune do hospedeiro bem como aos fatores de virulência do fungo, nos quais compõe o grupo de enzimas esterase, lipase, fosfatase ácida, lipoxigenase, protease e fosfolipase. Assim, a ocorrência de otite canina e felina está relacionada com o processo inflamatório associado com a elevação da população de *M. pachydermatis* (Scott et al., 2013). Esta condição dificulta o gerenciamento da doença, e o sucesso do tratamento depende do controle do crescimento excessivo de leveduras e o concomitante crescimento de bactérias, com tratamentos antimicrobianos tópicos ou sistêmicos, além da identificação e correção de possíveis fatores predisponentes (Bond et al., 2020).

As opções de tratamento de otite causada por *M. pachydermatis* em cães e gatos domésticos incluem a terapia sistêmica e principalmente a terapia tópica, com diversos antifúngicos comerciais em associação com antibacterianos. Os derivados azólicos cetoconazol, miconazol e itraconazol são os mais utilizados, além da terbinafina e tiabendazole (Negre et al., 2009). Os procedimentos de referência para o teste *in vitro* de susceptibilidade de *M. pachydermatis* aos antifúngicos não estão disponíveis. Apesar disso, estudos de susceptibilidade *in vitro* mostram que linhagens de *M. pachydermatis* potencialmente resistentes aos antifúngicos terbinafina (Rougier et al., 2007) nistatina e derivados azólicos (Jesus et al. 2011, Angileri et al., 2019) estão sendo isoladas de cães. A ocorrência de resistência aos antifúngicos leva à insuficiência de tratamento antimicrobiano. Assim, existe uma forte necessidade de um desenvolvimento de novos medicamentos para a cura de infecções provocadas por espécies fúngicas resistentes e multirresistentes.

Os óleos essenciais são compostos aromáticos voláteis (p. ex terpenos e fenilpropanóides) altamente concentrados extraídos de plantas; possuem grande diversidade de atividades já descritas na literatura como, entre outros, efeito antibacteriano e antifúngico (Angioni et al., 2004, Manion and Widder, 2017; Bismark et al., 2019). A atividade antifúngica dos óleos essenciais ocorre por diferentes mecanismos, que podem ser o rompimento da membrana celular, a inibição da atividade da mitocôndria, além de inibição da formação do biofilme (Nazzaro et al., 2017). Existem diversos estudos mostrando a atividade *in vitro* de óleos essenciais contra espécies do gênero *Malassezia*. Estudos realizados com *Malassezia* sp. demonstraram que o óleo essencial de *Zataria multiflora* (Avishan ou Zatar) e *Thymus kotschyanus* (Tomilho) apresentaram fortes propriedades antifúngicas contra a levedura (Khosravi et al., 2016); em outro, o tratamento realizado com uma mistura de óleos essenciais pode limitar as recaídas fúngicas em comparação com o tratamento convencional (Nardoni et al., 2014). Poucos trabalhos mostram a atividade antifúngica dos óleos essenciais contra *M. pachysermatis*. Entre eles, é mostrado que o óleo essencial de orégano e tomilho e seus principais componentes fenólicos (carvacrol, timol) foram fungicidas contra *M. pachydermatis* (Sim et al., 2019). A interação sinérgica também foi estudada entre componentes de óleo essencial e azóis ou nistatina contra *M. pachydermatis*. Entre eles foi testado o clotrimazol e óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree), *Mentha piperita* (Hortelã Pimenta) e *Origanum vulgare* (Orégano) (Bohmova et al., 2019), e a combinação dos antifúngicos comerciais miconazol e/ou nistatina com os componentes fenólicos carvacrol ou timol

(Schlemmer et al., 2019) que foram eficazes contra *M. pachydermatis*.

O objetivo deste trabalho foi identificar isolados clínicos de *M. pachydermatis* de ouvido externo de gatos e cães domésticos com otite por ferramenta molecular e avaliar a susceptibilidade aos antifúngicos comerciais cetoconazol, miconazol, itraconazol e posaconazol e a atividade antifúngica dos óleos essenciais de Alecrim pimenta, Cravo-da-Índia, Menta, Tomilho branco, Manjericão, Alecrim e Limão-Tahiti.

2 | MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Isolamento e identificação molecular dos isolados clínicos de *M. pachydermatis*

Isolados clínicos de *M. pachydermatis* foram selecionados a partir de amostras de secreção de ouvido de cães e gatos com otite. As secreções foram cultivadas em ágar Sabouraud Dextrose (Oxford), enriquecidas com azeite de oliva 1,0% (v/v), tween 80 0,1% (v/v) e incubadas a 37°C por 48 horas. As colônias isoladas foram selecionadas e as leveduras conservadas em meio de cultura Caldo Sabouraud Dextrose acrescido de glicerol (Sigma-Aldrich) 30% (v/v) em freezer -80°C, para as futuras análises. Todo o estudo foi realizado com a aprovação pela Comissão de Ética no uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (CEUA FCFRP-USP), sendo registrado em 24/11/2016 sob o nº 16.1.930.60.9 em novembro/2016.

Os isolados clínicos foram identificados por método molecular. Para isso, as leveduras foram cultivadas em meio de cultura Sabouraud Dextrose em caldo enriquecido com azeite de oliva 1,0% (v/v), tween 80 0,1% (v/v) e incubadas a 37°C por 72 horas. As leveduras foram ressuspensas em tampão de extração (Tris-HCl 200 mM, pH 8,5, NaCl 250 mM, EDTA 25 mM, SDS 0,5% (p/v)) e rompidas pela adição de pérolas de vidro (Sigma-Aldrich), fenol:clorofórmio (1:1) e agitação mecânica. Após centrifugação a 13000 g por 10 minutos, o DNA foi precipitado do sobrenadante pela adição de igual volume de isopropanol. Após nova centrifugação a 13000 g por 10 minutos, o DNA genômico foi eluído em água livre de Rnase (Promega). A região *Internal Transcribed Spacer* - ITS do DNA ribossomal foi amplificada por PCR com os primers ITS1 (5' – TCCGTAGGTGAAACCTGCGG - 3') e ITS4 (5' – TCCTCCGCTTATTGATATGC - 3') (White et al., 1990), utilizando a enzima *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* (Thermo Fisher Scientific), de acordo com normas do fabricante. Cada sequência gerada foi analisada no programa ChromasPro (Technelysium Pty Ltd, Australia) e comparada com sequências depositadas no banco de dados no GenBank, utilizando a ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST).

2.2 Os antifúngicos e os óleos essenciais

Os antifúngicos e respectivas concentrações testadas neste trabalho foram Cetoconazol (Pfizer) 0,03 a 16 µg mL⁻¹, Itraconazol (Merck Sharp & Dohme) 0,03 a 16 µg mL⁻¹, Miconazol (Sigma-Aldrich) 0,03 a 16 µg mL⁻¹ e Posaconazol (Sigma-Aldrich) 0,0019 a 1 µg

mL^{-1} . Os óleos essenciais foram Alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) (Pronat) 0,0039% a 2% (v/v), Cravo-da-Índia (*Syzygium aromaticum*) (CEPLAC) 0,0039% a 2% (v/v), Menta (*Mentha* sp.) (Lapiendrius) 0,0039% a 2% (v/v), Tomilho branco (*Thymus vulgaris*) (*Destilaria Bauru*) 0,0039% a 2% (v/v), Manjericão (*Ocimum basilicum*) (*Destilaria Bauru*) 0,0058% a 3% (v/v), Alecrim (*Rosmarinus officinalis*) (*Destilaria Bauru*) 0,0058% a 3% (v/v), Limão-Tahiti (*Citrus aurantifolia*) (Citrosuco) 0,0058% a 3% (v/v). Os antifúngicos e óleos essenciais foram diluídos em 1% (v/v) de Dimetil sulfóxido (DMSO).

2.3 Teste de susceptibilidade in vitro

Os testes de susceptibilidade aos antifúngicos e óleos essenciais foram realizado de acordo com as recomendações do *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI), protocolo M27-A3 (CLSI, 2008), com modificações. As leveduras foram inoculadas em ágar Sabouraud Dextrose (Oxford) enriquecido com azeite de oliva 1,0% (v/v) e tween 80 0,1% (v/v) e incubadas a 37°C por 48 horas. As suspensões das leveduras foram ajustadas a 5×10^4 células mL^{-1} em meio de cultura RPMI-1640 tamponado com MOPS (ácido 3-(N-morfolino) propano sulfônico) 0,165 mol L^{-1} pH 7,0 acrescido de meio de cultura para *Malassezia* (dextrose 1,8% (p/v), peptona bacteriológica 1% (p/v), glicerol 1% (v/v), tween 80 0,05% (v/v)) (Rincón et al., 2006). As linhagens controle do experimento foram *Aspergillus flavus* ATCC®204304™ e *Candida parapsilosis* ATCC®22019™. Os testes de susceptibilidade nas placas de microdiluição em caldo foram incubados a 37°C com leitura visual das linhagens controle em 48 horas e dos isolados clínicos de *M. pachydermatis* em 72 horas de incubação. Os resultados foram expressos relatando a concentração inibitória mínima (CIM), que é a menor concentração capaz de inibir o crescimento fúngico e, além disso, pela média geométrica (MG-CIM), que indica a tendência central dos valores de CIM obtidos para cada antifúngico e óleo essencial.

2.4 Teste de toxicidade dos óleos essenciais em *Galleria mellonella*

A toxicidade dos óleos essenciais foi avaliada pelo modelo invertebrado alternativo de toxicidade *Galleria mellonella*, de acordo com Paziani et al. (2019), com modificações. Grupos de 5 larvas no sexto instar de desenvolvimento e pesando 200 ± 50 mg foram inoculadas com 5 μL de óleos essenciais, utilizando micro seringa de Hamilton modelo 7000.5KH de 10 μL . Os óleos essenciais foram diluídos em PBS1X acrescido de 0,05% (v/v) de Tween 80, nas seguintes concentrações finais: Alecrim pimenta 0,007%, 0,014% e 0,028%; Cravo -da-Índia 0,042%, 0,084% e 0,168%; Menta 0,020%, 0,040% e 0,080%; Tomilho branco 0,025%, 0,050% e 0,100%; Manjericão 0,217%, 0,434% e 0,868%; Alecrim 0,104, 0,209% e 0,419%; Limão-Tahiti 0,461%, 0,922% e 1,84%. O controle do experimento foram larvas inoculadas com PBS1X acrescido de 0,05% (v/v) de Tween 80. Após a inoculação, as larvas permaneceram em temperatura de 37°C, totalmente privadas de ração e iluminação direta. Durante o tempo experimental, foi realizada a limpeza a cada 12 h para a retirada da pré-pupa de todas as larvas, para retardar o processo de metamorfose do inseto. Foram feitas

avaliações da sobrevivência das larvas a cada 24 h, durante 10 dias.

2.5 Análise estatística

Para o teste de toxicidade adotou-se o método estatístico Long-rank (Mantel-Cox) com a finalidade de avaliar a significância das diferenças entre as curvas de sobrevivência. Valores de P inferiores a 0,05 foram considerados significativos e o resultado foi considerado estatisticamente diferente. Todas as análises foram feitas utilizando o programa GraphpadPrism (v 7.0; Graphpad Software, La Jolla, CA, USA).

3 | RESULTADOS

3.1 Animais domésticos, isolados clínicos e a identificação molecular

Este estudo analisou isolados clínicos fúngicos de canal auditivo externo de 15 gatos e cães domésticos com otite, sendo 8 gatos domésticos (*Felis catus*) e 7 cães domésticos (*Canis lupus familiaris*). Entre os gatos havia dois machos e 6 fêmeas e entre os cães havia 4 machos, duas fêmeas e um cão com gênero não identificado. Entre os 28 isolados clínicos estudados neste trabalho, 14 foram isolados de gatos e 17 isolados de cães, nos meses outubro e novembro de 2016 (tabela 1). A identificação dos isolados clínicos foi pelo sequenciamento da região ITS do DNA ribossomal, o qual revelou que 100% dos isolados clínicos são *Malassezia pachydermatis* (tabela 2).

ID animal	Espécie	Raça	G	ID isolado clínico	Data de coleta	Sítio coleta
01	<i>Felis catus</i>	Persa	M	LMC 7001.01	Out 2016	OD
				LMC 7001.02	Out 2016	OE
02	<i>Felis catus</i>	SRD	M	LMC 7002.01	Out 2016	OD
				LMC 7002.02	Out 2016	OE
03	<i>Felis catus</i>	Persa	F	LMC 7003.01	Out 2016	OD
				LMC 7003.02	Out 2016	OE
04	<i>Felis catus</i>	SRD	F	LMC 7004.01	Out 2016	OD
				LMC 7004.02	Out 2016	OE
05	<i>Felis catus</i>	Persa	F	LMC 7005.02	Out 2016	OE
				LMC 7005.04	Out 2016	OE
06	<i>Felis catus</i>	Persa	F	LMC 7006.02	Out 2016	OE
				LMC 7007.01	Out 2016	OD
07	<i>Felis catus</i>	Exótico	F	LMC 7007.02	Out 2016	OE
				LMC 7008.01	Nov 2016	OD
08	<i>Canis lupus familiaris</i>	SRD	M	LMC 7008.02	Nov 2016	OE
				LMC 7009.02	Out 2016	OE
09	<i>Felis catus</i>	Exótico	F	LMC 7010.01	Nov 2016	OD
10	<i>Canis lupus familiaris</i>	Maltes	F	LMC 7010.02	Nov 2016	OE
				LMC 7011.01	Nov 2016	OD
11	<i>Canis lupus familiaris</i>	Buldogue	M	LMC 7011.02	Nov 2016	OE
				LMC 7012.01	Nov 2016	OD
12	<i>Canis lupus familiaris</i>	Shih-tzu	M			

35	<i>Canis lupus familiaris</i>	SRD	-	LMC 7012.02 LMC 7035.01 LMC 7035.02	Nov 2016 Nov 2016 Nov 2016	OE OD OE
36	<i>Canis lupus familiaris</i>	SRD	M	LMC 7036.01 LMC 7036.02	Nov 2016 Nov 2016	OD OE
37	<i>Canis lupus familiaris</i>	SRD	F	LMC 7037.01 LMC 7037.02	Nov 2016 Nov 2016	OD OE

Tabela 1: Animais e isolados clínicos de *M. pachydermatis* deste trabalho. ID, identificação; *Felis catus*, gato doméstico; *Canis lupus familiaris*, cão doméstico; SRD, sem raça definida; G, gênero do animal; M, macho; F, fêmea; OD, orelha direita; OE, orelha esquerda; -, não informado.

Isolado Clínico	GenBank	Identificação molecular	Max Score	E value	Identidade (%)	ID GenBank
LMC7001.01	KY104148.1	<i>M. pachydermatis</i>	1153	0,0	99,7	MT248902
LMC7001.02	KY104148.1	<i>M. pachydermatis</i>	1003	0,0	99,3	MT248903
LMC7002.01	KY104148.1	<i>M. pachydermatis</i>	1184	0,0	99,7	MT248904
LMC7002.02	KY104148.1	<i>M. pachydermatis</i>	1247	0,0	99,7	MT248905
LMC7003.01	KY104148.1	<i>M. pachydermatis</i>	1210	0,0	99,7	MT248906
LMC7003.02	KY104148.1	<i>M. pachydermatis</i>	1210	0,0	99,7	MT248907
LMC7004.01	KY104148.1	<i>M. pachydermatis</i>	1171	0,0	99,4	MT248908
LMC7004.02	KY104148.1	<i>M. pachydermatis</i>	1210	0,0	99,7	MT248909
LMC7005.02	KY104148.1	<i>M. pachydermatis</i>	1216	0,0	99,7	MT248910
LMC7005.04	KY104148.1	<i>M. pachydermatis</i>	1099	0,0	98,6	MT248911
LMC7006.02	KY104148.1	<i>M. pachydermatis</i>	974	0,0	98,9	MT248912
LMC7007.01	KY104148.1	<i>M. pachydermatis</i>	1216	0,0	99,7	MT248913
LMC7007.02	KY104148.1	<i>M. pachydermatis</i>	1210	0,0	99,7	MT248914
LMC7008.01	FJ545240.1	<i>M. pachydermatis</i>	1221	0,0	99,6	MT248915
LMC7008.02	KY104153.1	<i>M. pachydermatis</i>	1107	0,0	98,3	MT248916
LMC7009.02	KY104153.1	<i>M. pachydermatis</i>	1203	0,0	99,7	MT248917
LMC7010.01	FJ545240.1	<i>M. pachydermatis</i>	1166	0,0	99,9	MT248918
LMC7010.02	FJ545240.1	<i>M. pachydermatis</i>	1173	0,0	100	MT248919
LMC7011.01	FJ545240.1	<i>M. pachydermatis</i>	1210	0,0	100	MT248920
LMC7011.02	FJ545240.1	<i>M. pachydermatis</i>	1192	0,0	100	MT248921
LMC7012.01	KY104148.1	<i>M. pachydermatis</i>	1232	0,0	99	MT248922
LMC7012.02	KY104148.1	<i>M. pachydermatis</i>	1186	0,0	99,4	MT248923
LMC7035.01	KY104153.1	<i>M. pachydermatis</i>	1079	0,0	99,7	MT248924
LMC7035.02	KY104153.1	<i>M. pachydermatis</i>	1074	0,0	99,4	MT248925
LMC7036.01	FJ545240.1	<i>M. pachydermatis</i>	1243	0,0	100	MT248926
LMC7036.02	KY104153.1	<i>M. pachydermatis</i>	1085	0,0	98,7	MT248927
LMC7037.01	FJ545240.1	<i>M. pachydermatis</i>	1238	0,0	99,9	MT248928
LMC7037.02	FJ545240.1	<i>M. pachydermatis</i>	1243	0,0	100	MT248929

Tabela 2: Identificação molecular dos isolados clínicos *M. pachydermatis* pelo sequenciamento da região ITS do DNA ribossomal.

3.2 Susceptibilidade *in vitro* dos isolados clínicos de *M. pachydermatis* aos antifúngicos e óleos essenciais

Os 28 isolados clínicos de *M. pachydermatis* foram testados quanto a sua susceptibilidade aos antifúngicos comerciais da classe dos azóis (cetoconazol, miconazol,

itraconazol e posaconazol). Os intervalos de CIM e MG-CIM para cetoconazol foram entre 0,031 - 4 $\mu\text{g ml}^{-1}$ e 0,142 $\mu\text{g ml}^{-1}$ para cetoconazol, 0,5 - 16 $\mu\text{g ml}^{-1}$ e 5,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ para miconazol, 0,031 - 0,062 $\mu\text{g ml}^{-1}$ e 0,038 $\mu\text{g ml}^{-1}$ para itraconazol e 0,015 - 0,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ e 0,051 $\mu\text{g ml}^{-1}$ para posaconazol (tabela 3). Estes resultados mostram que cetoconazol e miconazol apresentaram altas CIM para os isolados clínicos de *M. pachydermatis*.

A atividade antifúngica de óleos essenciais foi avaliada contra os isolados clínicos de *M. pachydermatis*. Foi observado que os intervalos de CIM e MG-CIM foram, respectivamente, 0,004 – 0,016% e 0,008% para Alecrim pimenta, 0,016 – 0,031% e 0,043% para Cravo-da-Índia, 0,016 – 0,125% e 0,031 para Menta, 0,016 – 0,031% e 0,026% para Tomilho Branco, 0,094 – 0,75% e 0,239% para Manjericão, 0,094 – 3% e 0,477% para Alecrim e 0,188 – 1,5% e 0,49% para Limão-Tahiti (tabela 4). Assim, observamos que os óleos essenciais de Manjericão, Alecrim e Limão-Tahiti apresentaram altas CIM para os isolados clínicos de *M. pachydermatis*, em comparação com as baixas CIM encontradas para os óleos essenciais de Alecrim pimenta, Cravo-da-Índia, Menta e Tomilho Branco.

Isolado Clínico	Cetoconazol	Miconazol	Itraconazol	Posaconazol
LMC7001.02	0,031	16	0,062	0,062
LMC7002.01	2	8	0,031	0,062
LMC7002.02	0,031	16	0,031	0,015
LMC7003.01	2	16	0,031	0,062
LMC7003.02	0,031	8	0,031	0,031
LMC7004.01	0,031	16	0,031	0,031
LMC7004.02	0,125	16	0,031	0,062
LMC7005.02	0,031	16	0,031	0,031
LMC7005.04	0,031	16	0,031	0,062
LMC7006.02	0,125	16	0,031	0,062
LMC7007.01	0,062	16	0,031	0,062
LMC7007.02	0,125	16	0,031	0,062
LMC7008.01	1	16	0,031	0,031
LMC7008.02	4	16	0,031	0,031
LMC7009.02	0,031	2	0,031	0,062
LMC7010.01	0,031	1	0,031	0,015
LMC7010.02	0,031	0,5	0,031	0,062
LMC7011.01	0,5	16	0,031	0,062
LMC7011.02	0,5	16	0,031	0,062
LMC7012.01	1	2	0,031	0,031
LMC7012.02	0,031	1	0,062	0,015
LMC7035.02	0,031	2	0,031	0,031
LMC7036.01	1	2	0,031	0,125
LMC7036.02	0,031	1	0,062	0,031
LMC7037.01	0,5	1	0,250	0,5
LMC7037.02	0,5	1	0,125	0,5
Média Geométrica (MG)	0,142	5,657	0,038	0,051

Tabela 3: Concentração inibitória mínima (CIM, $\mu\text{g ml}^{-1}$) dos antifúngicos contra os isolados clínicos de *M. pachydermatis*.

Isolado Clínico	Alecrim Pimenta	Cravo-da-Índia	Menta	Tomilho Branco	Manjericão	Alecrim	Limão-tahiti	
LMC7001.01	0,004	0,062	0,062	0,031	0,188	0,375	0,375	
LMC7001.02	0,004	0,062	0,031	0,031	0,188	0,375	0,375	
LMC7002.01	0,004	0,031	0,062	0,031	0,188	1,5	0,375	
LMC7002.02	0,008	0,062	0,062	0,031	0,375	0,750	0,188	
LMC7003.01	0,016	0,062	0,016	0,031	0,188	0,188	0,188	
LMC7003.02	0,016	0,062	0,016	0,031	0,188	0,188	0,375	
LMC7004.01	0,016	0,062	0,031	0,031	0,375	0,375	0,375	
LMC7004.02	0,008	0,062	0,016	0,031	0,375	0,750	0,375	
LMC7005.02	0,004	0,062	0,016	0,031	0,188	0,375	0,750	
LMC7005.04	0,004	0,062	0,016	0,031	0,188	0,375	0,375	
LMC7006.02	0,008	0,062	0,031	0,031	0,375	0,375	0,375	
LMC7007.01	0,008	0,062	0,125	0,031	0,750	3	0,375	
LMC7007.02	0,008	0,062	0,062	0,031	0,750	3	0,750	
LMC7008.01	0,004	0,031	0,062	0,031	0,375	1,5	0,750	
LMC7008.02	0,016	0,062	0,125	0,031	0,375	0,750	0,375	
LMC7009.02	0,008	0,031	0,031	0,016	0,094	0,375	1,5	
LMC7010.01	0,008	0,062	0,125	0,031	0,750	3	0,750	
LMC7010.02	0,008	0,016	0,016	0,016	0,094	0,094	0,375	
LMC7011.01	0,008	0,031	0,016	0,016	0,094	0,094	0,375	
LMC7011.02	0,008	0,031	0,016	0,016	0,188	0,188	0,375	
LMC7012.01	0,008	0,031	0,008	0,016	0,188	0,375	0,750	
LMC7012.02	0,008	0,031	0,008	0,016	0,094	0,188	0,750	
LMC7035.02	0,008	0,031	0,031	0,031	0,094	0,375	0,375	
LMC7036.01	0,016	0,031	0,062	0,031	0,375	0,375	0,375	
LMC7037.01	0,008	0,031	0,031	0,031	0,375	0,750	1,5	
LMC7037.02	0,008	0,016	0,016	0,016	0,188	0,375	1,5	
Média Geométrica (MG)		0,008	0,043	0,031	0,026	0,239	0,477	0,490

Tabela 4: Concentração inibitória mínima (CIM, %) dos óleos essenciais contra os isolados clínicos de *M. pachydermatis*. OF,

3.3 Toxicidade dos óleos essenciais em *G. mellonella*

A toxicidade dos óleos essenciais foi avaliada no modelo invertebrado alternativo *G. mellonella*. As concentrações testadas foram selecionadas de acordo com os valores de CIM encontrados para cada composto. Foi observado que as concentrações testadas dos óleos essenciais de Alecrim pimenta, Cravo-da-Índia, Menta e Tomilho Branco causaram alta taxa de sobrevivência das larvas de *G. mellonella* em 10 dias de experimento, indicando baixa toxicidade para estes compostos ($P>0,05$). Os óleos essenciais de Manjericão, Alecrim e Limão-Tahiti causaram alta mortalidade de larvas ($P<0,05$), principalmente com as maiores concentrações testadas, indicando que estes compostos são tóxicos nestas concentrações. Já o controle do experimento (PBS1x Tween 80) manteve a maioria das larvas vivas até o

final do experimento (figura 1).

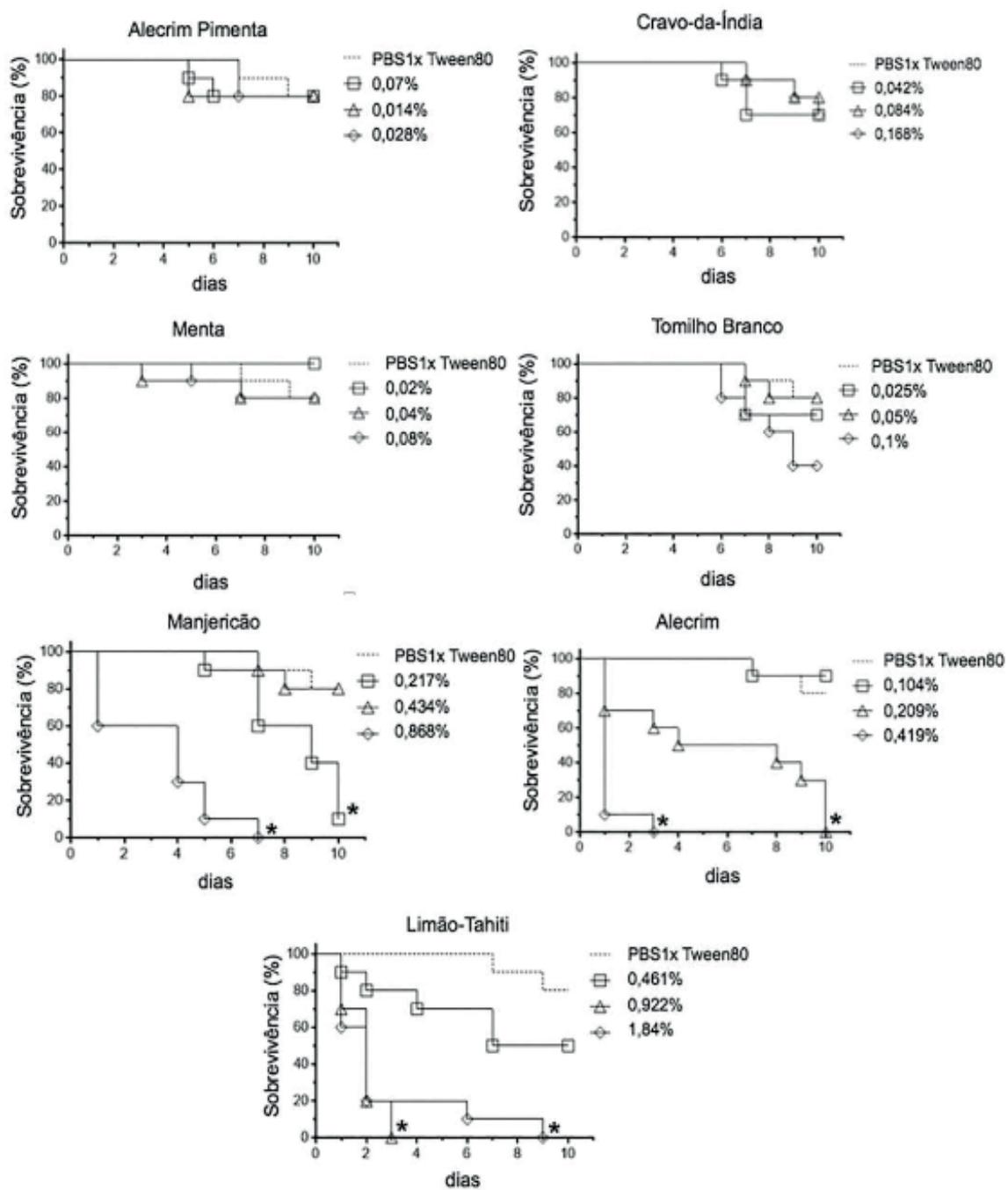


Figura 01: Avaliação da toxicidade dos óleos essenciais no modelo invertebrado *G. mellonella*. *, $P < 0,05$.

4 | DISCUSSÃO

Este trabalho mostra a identificação molecular e susceptibilidade aos antifúngicos comerciais e óleos essenciais de cepas clínicas de *M. pachydermatis* isoladas do ouvido externo de gatos e cães com otite. *M. pachydermatis* é uma levedura comensal na pele e mucosa de cães e gatos (Paterson et al., 2018). Este fungo pode se tornar um patógeno oportunista, sendo *M. pachydermatis* a levedura mais frequente em otites caninas (1 a 3 Bismark) e causador regular de otite felina (Paterson et al., 2018).

O tratamento das otites causadas por *M. pachydermatis* é baseado em aplicação tópica e sistêmica de antifúngico comercial (cetoconazol, itraconazol, miconazol, posaconazol, clotrimazol, nistatina, terbinafina), combinada com antibióticos para o controle de infecções bacterianas (Nuttall, 2016; Paterson et al., 2018). Existem diversas publicações que mostram a eficácia destes antifúngicos contra *Malassezia* sp. (Peano et al., 2017). Entretanto, poucos estudos que compararam a eficácia deste produto tópico e sua atividade contra a *M. pachydermatis* nos casos de otite canina e felina foram descritos (Negre et al., 2009). Observamos que cetoconazol, miconazol, itraconazol e posaconazol são eficazes contra os isolados clínicos de *M. pachydermatis*. Entretanto, alguns isolados clínicos apresentam alta CIM de miconazol ($16 \mu\text{g ml}^{-1}$) e cetoconazol ($4 \mu\text{g ml}^{-1}$). Da mesma forma, existem relatos de isolados de *M. pachydermatis* resistentes a cetoconazol e itraconazol (Nijima et al., 2011, Kano et al., 2018). Assim, com a existência de cepas de *M. pachydermatis* resistentes aos antifúngicos azólicos, a busca de novas alternativas terapêuticas, como os óleos essenciais, pode ser uma alternativa de tratamento para otite de cães e gatos. Os óleos essenciais são conhecidos por sua capacidade de proteção das plantas contra insetos, vetores, herbívoros e microrganismos patogênicos (Sharifi-Rad et al., 2017), revelando assim uma potencial atividade antimicrobiana. Em nosso trabalho, os óleos essenciais Alecrim pimenta, Cravo-da-Índia, Menta e Tomilho Branco apresentaram atividade contra os isolados clínicos de *M. pachydermatis*. Existem poucos estudos de atividade antifúngica de óleos essenciais contra isolados clínicos de *M. pachydermatis* (Bismark et al., 2019). Os trabalhos de atividade antifúngica apresentam variações metodológicas e diferentes óleos essenciais, dificultando a comparação dos resultados. Mesmo assim, é evidente a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais, inclusive contra *M. pachydermatis* (Rusenova e Parvanov, 2009; Váczi et al., 2018). Os óleos essenciais de Alecrim pimenta, Cravo-da-Índia, Menta e Tomilho Branco apresentaram alta atividade antifúngica contra os isolados clínicos do fungo patogênico *M. pachydermatis* e baixa toxicidade à *G. mellonella*. Assim, a utilização destes óleos essenciais é promissora. Contudo, ensaios adicionais são necessários para a aplicação destes óleos essenciais no tratamento de otites caninas e felina causadas por *M. pachydermatis*.

5 | SUPORTE FINANCEIRO

Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (processo n° 2015/05853-7), e a aluna Raquel Santos da Silva recebeu bolsa de iniciação científica do Conselho Nacional de Pesquisa - CNPq.

6 | AGRADECIMENTOS

Especial agradecimento à correção ortográfica da Profa. Dra. Erica Luisa Ziegler.

REFERÊNCIAS

- ANGILERI, M.; PASQUETTI, M.; DE LUCIA, M.; PEANO, A. Azole resistance of *Malassezia pachydermatis* causing treatment failure in a dog. **Med. Mycol. Case Rep.** v. 23, p. 58–61, 2019. doi: 10.1016/j.mmcr.2018.12.004
- ANGIONI, A.; BARRA, A.; CERETI, E.; BARILE, D.; COISSON, J. D.; ARLORIO, M.; DESSI, S.; CORONEO, V.; CABRAS, P. Chemical composition, plant genetic differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, p. 3530-3535, 2004.
- BISMARK, D.; DUSOLD, A.; HEUSINGER, A.; MÜLLER, E. Antifungal in vitro Activity of Essential Oils against Clinical Isolates of *Malassezia pachydermatis* from Canine Ears: A Report from a Practice Laboratory. **Complement Med Res.**, v. 27, p. 1-12, novembro, 2019 doi: 10.1159/000504316.
- BOHMOVA, E.; CONKOVA, E.; HARCAROVA, M.; SIHELSKA, Z. Interactions between clotrimazole and selected essential oils against *Malassezia pachydermatis* clinical isolates. **Pol. J. Vet. Sci.**, v. 22, p. 173–175, 2019. doi: 10.24425/pjvs.2019.127082
- BOND, R.; MORRIS, D. O.; GUILLOT, J.; BENSIGNOR, E.; ROBSON, D.; MASON, K. V.; et al. Biology, diagnosis and treatment of *Malassezia dermatitis* in dogs and cats. clinical consensus guidelines of the world association for veterinary dermatology. **Vet. Dermatol.**, v. 31, p. 75, 2020. doi: 10.1111/vde.12834
- FORSTER, S. L.; REAL, T.; DOUCETTE, K. P.; KING, S. B. A randomized placebo-controlled trial of the efficacy and safety of a terbinafine, florfenicol and betamethasone topical ear formulation in dogs for the treatment of bacterial and/or fungal otitis externa. **BMC Vet. Res.**, v. 14, p. 262, 2018. doi: 10.1186/s12917-018-1589-7
- GUÉHO-KELLERMAN, E.; BOEKHOUT, T.; BEGEROW, D. Biodiversity, phylogeny and ultrastructure in *Malassezia* and the Skin. In: BOEKHOUT, T.; GUÉHO-KELLERMANN, E.; MAYSER, P.; VELEGRAKI, A. **Science and Clinical Practice**, Berlin, Springer, p. 17–63, 2010. doi: 10.1007/978-3-642-03616-3_2
- JESUS, F. P.; LAUTERT, C.; ZANETTE, R. A.; MAHL, D. L.; AZEVEDO, M. I.; MACHADO, M. L.; et al. In vitro susceptibility of fluconazole-susceptible and -resistant isolates of *Malassezia pachydermatis* against azoles. **Vet. Microbiol.**, v. 152, p. 161–164, 2010. doi: 10.1016/j.vetmic.2011.04.027
- KHOSRAVI, A. R.; SHOKRI, H.; FAHIMIRAD, S. Efficacy of medicinal essential oils against pathogenic *Malassezia* sp. isolates. **J Mycol Med.**, v. 26, n. 1, p. 28-34, março, 2016. doi: 10.1016/j.mycmed.2015.10.012.
- MANION, C. R.; ANDWIDDER, R. M. Essentials of essential oils. **Am. J. Health Syst. Pharm.**, v. 74, p. e153–e162, 2017. doi: 10.2146/ajhp151043
- NARDONI, S.; MUGNAINI, L.; PISTELLI, L.; LEONARDI, M.; SANNA, V.; PERRUCCI, S.; PISSERI, F.; MANCIANTI, F. Clinical and mycological evaluation of an herbal antifungal formulation in canine *Malassezia* dermatitis. **J Mycol Med.**, v. 24, n. 3, p. 234-240, Setembro, 2014. doi: 10.1016/j.mycmed.2014.02.005.
- NAZZARO, F.; FRATIANNI, F.; COPPOLA, R.; FEO, V. Essential Oils and Antifungal Activity. **Pharmaceuticals**, v. 10, n. 4, p. E86, Basiléia, Novembro, 2017.
- NEGRE, A.; BENSIGNOR, E.; GUILLOT, J. Evidence-based veterinary dermatology: a systematic review of interventions for *Malassezia* dermatitis in dogs. **Vet Dermatol.**, v. 20, n. 1, p. 1–12, 2009. doi: 10.1111/j.1365-3164.2008.00721.x
- NUTTALL, T. Successful management of otitis externa. **In Pract.**, v. 38, n. 2, p. 17–21, 2016.
- PATERSON, S. *Malassezia* otitis — frequently asked questions. **Companion animal**, v. 23, n. 9, Setembro, 2018.

PAZIANI, M. H.; TONANI, L.; MENEZES, H. D.; BACHMANN, L.; WAINWRIGHT, M.; BRAGA, G. U. L.; VON ZESKA KRESS, M. R. Antimicrobial photodynamic therapy with phenothiazinium photosensitizers in non-vertebrate model *Galleria mellonella* infected with *Fusarium keratoplasticum* and *Fusarium moniliforme*. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 25, p. 197–203, 2019. doi.org/10.1016/j.pdpdt.2018.12.010

PEANO, A. et al., Methodological Issues in Antifungal Susceptibility Testing of *Malassezia pachydermatis*. **J. Fungi**, v. 3, p. 37, 2017. doi:10.3390/jof3030037

RINCÓN, S.; CEPERO, M. C.; ESPINEL-INGROFL, A. A modified christensen's urea and clsi broth microdilution method for testing susceptibilities of six *Malassezia* species to voriconazole, itraconazole, and ketoconazol. **J. Clin. Microbiology**, v. 44, n. 9, p. 3429-3431, 2006.

ROUGIER, S.; BORELL, D.; PHEULPIN, S.; WOEHRLÉ, F.; BOISRAMÉ, B. A comparative study of two antimicrobial/anti-inflammatory formulations in the treatment of canine otitis externa. **Vet. Dermatol.**, v. 16, p. 299–307, 2005.

RUSENOVA, N.; PARVANOV, P. Antimicrobial activities of twelve essential oils against microorganisms of veterinary importance. **Trakia J Sci.**, v. 1, n. 7, p. 37–43, 2009.

SCHLEMMER, K. B.; JESUS, F. P. K.; TONDOLO, J. S. M.; WEIBLEN, C.; AZEVEDO, M. I.; MACHADO, V. S.; et al. In vitro activity of carvacrol, cinnamaldehyde and thymol combined with antifungals against *Malassezia pachydermatis*. **J. Mycol. Med.**, v. 29, p. 375–377, 2019. doi: 10.1016/j.mycmed.2019.08.003

SCOTT, D.W.; MILLER,W.H.; GRIFFIN, C.E. Otitis externa. In: **Müller and Kirk's Small Animal Dermatology**, 7th ed.; WB Saunders Co.: pp. 741–773. Philadelphia, PA, USA, 2013

SIM, J. X. F.; KHAZANDI, M.; CHAN, W. Y.; Trott, D. J.; DEO, P. Antimicrobial activity of thyme oil, oregano oil, thymol and carvacrol against sensitive and resistant microbial isolates from dogs with otitis externa. **Vet. Dermatol.**, v. 30, p. 524–e159, 2019. doi: 10.1111/vde.12794

SHARIFI-RAD, J.; SUREDA, A.; TENORE, G. C.; DAGLIA, M.; SHARIFI-RAD, M.; VALUSSI, M.; et al. Biological Activities of Essential Oils: From Plant Chemoecologyto Traditional Healing Systems. **Molecules**, v. 22, n. 1, p. E70, Janeiro, 2017.

VÁCZI, P.; ČONKOVÁ, E.; MARCINČÁKOVÁ, D.; SIHELSKÁ, Z. Antifungal Effect of Selected Essential Oils on *Malassezia pachydermatis* Growth. **Folia Vet.**, v. 2, n. 62, p. 67–72, 2018.

WHITE, T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. **Rev. Res. Gate.**, v. 38, p. 315-322, 1990.