

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA**

DIOGO COELHO DE PÁDUA OLIVEIRA

**Identificação molecular,
susceptibilidade aos antifúngicos e
inibição fotodinâmica antimicrobiana no
gênero *Malassezia***

**Belo Horizonte
Fevereiro-2014**

DIOGO COELHO DE PÁDUA OLIVEIRA

**Identificação molecular, susceptibilidade aos
antifúngicos e inibição fotodinâmica
antimicrobiana no gênero *Malassezia***

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Silva Cisalpino

Co-Orientadoras:

Profa. Dra. Betânia Maria Soares

Profa. Dra. Susana Johann

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Microbiologia.

Belo Horizonte

Fevereiro-2014

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Silva Cisalpino

Co-Orientadoras:

Profa. Dra. Betânia Maria Soares

Profa. Dra. Susana Johann

COLABORADORES

Para a realização deste projeto contamos com os seguintes colaboradores:

- Laboratório de Taxonomia, Biodiversidade e Biotecnologia de Fungos – Prof. Dr. Carlos Rosa e Marina Moura (Iniciação científica).
- Laboratório de Sistemática e Biomoléculas de Fungos – Prof. Dr. Luiz Rosa.
- Laboratório de Bioengenharia – Professor Dr. Marcos Pinotti e a Dra. Rosana de Carvalho Cruz (pos-doutora).
- Laboratório de Micologia – Professor Dr. Daniel de Assis Santos e Juliana Ribeiro (Doutoranda).
- Marcelo Amarante Guimarães – Médico Veterinário.
- Dr. Marcus Vinícius Lucas Ferreira (Empresa Aptivalux) - LED.

Apoio Financeiro: CNPq e CAPES

Dedicatoria

Dedico este trabalho aos meus pais, José Antonio de Pádua Oliveira e Maria Célia Coelho de Pádua Oliveira que mesmo sem entender muito bem as particularidades de um doutoramento, sempre torceram e principalmente me apoiaram de forma incontestável.

AGRADECIMENTOS

Ao bom e generoso Deus que nunca me abandonaste. Mostraste-me o quanto é grandiosa a vida.

À professora e minha orientadora Patrícia Silva Cisalpino. Eu não teria palavras suficientes para expressar a minha gratidão e admiração pela senhora. Obrigado; pois, me recebeu e me acolheu quando eu mais precisei. Acreditou no meu trabalho e me ensinou a fazer Ciência de uma forma inspiradora. Agradeço também pelas sábias palavras e conselhos que guardo por toda a minha vida. Sentirei saudade de nossas conversas! Enfim, foi um grande prazer e uma honra tê-la como minha orientadora. À senhora, deixo esta homenagem:

"O professor medíocre conta. O bom professor explica. O professor superior demonstra. O grande professor inspira."

William Arthur Ward

Às minhas co-orientadoras professoras Betânia Soares e Susana Johann. Muito obrigado por me aceitarem como aluno. Betânia você me iniciou e me ofereceu todo o suporte para aprender a trabalhar, com essa fantástica técnica, que é a terapia fotodinâmica antimicrobiana. Agradeço, também, pela enorme disponibilidade em me receber no Laboratório de Bioengenharia sempre que precisei, com a maior atenção. Susana muito obrigado por me ensinar a fazer o ensaio de determinação da CIM e me dar em seguida a grande oportunidade, que considero um presente, que foi trabalhar com a taxonomia molecular de uma levedura tão fantástica e particular. Obrigado também por me acolher no seu laboratório.

Aos professores Carlos Rosa e Luiz Rosa. Sou extremamente grato por abrirem as portas dos seus laboratórios e por todo o suporte, sem restrição, que vocês me ofereceram.

Ao professor Daniel Assis por gentilmente disponibilizar todos os antimicóticos usados na determinação da CIM. Obrigado, também, pela disponibilidade em me receber, conselhos e sugestões para experimentação.

Ao professor Marcos Pinotti por conceder o uso dos equipamentos do laboratório de Bioengenharia.

À Professora Maria Aparecida Stoianoff por ser tão gentil e cortez comigo e pelas boas sugestões para este trabalho.

À Professora Viviane Gouveia pela boa receptividade no seu laboratório.

Ao professor Carlos Taborda por fornecer amostras de *Malassezia pachydermatis*.

À professora Daniele da Gloria, pela boa convivência e disponibilidade de usar os equipamentos do LIMHO.

À professora Elizabeth Splangler que sempre torceu por mim e por se preocupar com o meu bem estar.

À professora Sueli pela boa convivência.

À minha “fada madrinha” Rosana Cruz que tanto me ajudou, principalmente na reta final deste trabalho. Obrigado pela disposição em me auxiliar em árduos experimentos e pelo suporte com a estatística.

À minha querida colega de pós graduação e amiga Juliana Ribeiro, que sempre me ajudou de forma incontestável todas as vezes que precisei. Agradeço também pelo enorme suporte nos experimentos de bioquímica celular.

Ao medico veterinário Marcelo Amarante Guimarães, pela boa vontade de contribuir com este trabalho e por fornecer material para o isolamento das amostras.

À Marina Moura que sempre que pode me acudiu nas horas mais difíceis.

Às minhas queridas colegas do laboratório de Biologia de Micro-Organismos Luciana Oliveira e super Fernadinha Lourenço. Vocês duas sempre foram grandes colegas e amigas verdadeiras. Sou grato também pela agradável companhia nos almoços e lanches da tarde.

À Ludmila Baltazar e Marco Aurélio Soares pela boa convivência.

À Gilvania ou simplesmente Gil, por prestar assistência técnica com tamanha eficiência e dedicação. Sentirei falta da sua boa prosa.

Ao meu grande amigo e colega de pós graduação Rodrigo Holanda. Saiba que a nossa amizade é para sempre. Amigos verdadeiros e sinceros como você são raros.

Ao gaúcho mais cruzeirense que conheço, vulgo Fabio Bond. Obrigado pela amizade, coleguismo e por tornar os meus dias no laboratório mais bem humorados.

À todos os colegas do LIMHO, sem excessão, pela ótima convivência. De modo especial para:

À Paty Campi por me ajudar sempre que precise

À minha querida amiga Renatinha Lacerda, obrigado, por seu afeto, atenção e sinceridade comigo.

Ao “grande” Talles; amigo Leal!

Aos meus queridos irmãos Daniel e Gabriel, pela amizade e torcida.

Aos de órgãos de fomento (CAPES e CNPq) do governo Brasileiro por prestar todo o suporte necessários ao desenvolvimento desta pesquisa.

EPÍGRAFE

“Seja idealista nos seus sonhos, busque o que realmente lhe faça feliz. Seja luz pela brisa em dia sereno ou seja infinito no amanhecer em um dia especial. Tenha paz em sentimentos na plenitude que honre a razão. Tenha certeza da vida como uma louca paixão, pois o amor é luz que ilumina meu coração.”

Julio Akuai

RESUMO

O gênero *Malassezia* agrupa 14 espécies de leveduras lipofílicas e/ou lipodependentes, presentes na microbiota indígena humana e de animais, envolvidas na patogenese da pitiríase versicolor, dermatite seborréica e da otite, esta ocorrendo em animais. O tratamento convencional das malassezioses baseia-se em antifúngicos sendo frequente a ocorrência de recidivas. A inibição fotodinâmica antimicrobiana (aIFD) tem mostrado potencial para embasar alternativas terapêuticas viáveis. No presente trabalho, realizou-se a identificação molecular específica de amostras de *Malassezia* (41 amostras de humanos e 10 de cães), a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de seis antifúngicos (caspofungina, cetoconazol, clotrimazol, isoconazol, itraconazol, miconazol) e a aplicação da aIFD empregando dois fotoabsorvedores (Azul de ortotoulidina e substância C) e fontes de luz emitindo em 630nm (vermelho) e 430nm (azul). Tentativas de agrupamento prévio das amostras com base na similaridade genética por PCR *fingerprinting* com o iniciador (GTG)₅ foram ineficazes na tipagem de espécies. Sucessivamente, 34 amostras foram identificadas por sequenciamento empregando-se os iniciadores NL1/NL4 a partir da região D1D2 do gene ribossômico. O sequenciamento revelou 7 espécies: *M. furfur*, *M. globosa*, *M. pachydermatis*, *M. slooffiae*, *M. sympodialis*, *M. yamatoensis* e *M. japonica*. Esta é a primeira descrição da ocorrência dessas duas últimas espécies na América Latina. Os resultados de determinação das CIM mostraram valores elevados para caspofungina (>16 µg/mL) sugestivos de resistência natural. Os valores de CIM₅₀ e CIM₉₀ obtidos para as demais drogas foram, de modo geral, mais elevados do que os registrados na literatura para espécies de *Malassezia* spp. Para *M. furfur*, estes valores (CIM₅₀ e CIM₉₀) foram: cetoconazol - 0,25 e 2 µg/mL; isoconazol - 4 e 16 µg/mL; itraconazol - 0,125 e 8 µg/mL; para o clotrimazol e o miconazol foram obtidos os mesmos valores de 2 e 16 µg/mL. Para o gênero *Malassezia* essas concentrações foram: cetoconazol - 1 e 16 µg/mL; isoconazol - 8 e 16 µg/mL; itraconazol - 0,125 e 16 µg/mL; o clotrimazol - 8 µg/mL e 64 µg/mL; miconazol - 4 µg/mL e 16 µg/mL. O cálculo da equivalência molar das concentrações efetivas das drogas testadas demonstrou ser o itraconazol a droga mais eficiente. Nos modelos de aIFD o tratamentos dos grupos com a luz vermelha e a luz azul permitiram uma redução da viabilidade celular de *Malassezia* sp. em 1,4 Log₁₀ UFC/mL e de 1,7 Log₁₀ UFC/mL, respectivamente.

Palavras-chave: *Malassezia*, taxonomia molecular, determinação de concentração inibitória mínima de antifúngicos, inibição fotodinâmica antimicrobiana.

Summary

The genus *Malassezia* clustering 14 species of lipophilic and/or lipodependent yeasts present in human and animals indigenous microbiota. The genus is involved in the pathogenesis of pityriasis versicolor, seborrheic dermatitis and otitis, this occurring in animals. Conventional treatment of malassezioses is based on antifungals although recurrences are frequent. Antimicrobial photodynamic inhibition (aPDI) has been showing potential to support viable therapeutic alternatives. In the present work, it was carried out the specific molecular identification of *Malassezia* samples (41 samples from humans and 10 from dogs), the determination of minimum inhibitory concentration (MIC) of six antifungals (caspofungin, ketoconazole, clotrimazole, isoconazole, itraconazole, miconazole) and the application of aIFD employing two photoabsorbers (orthotoulidine blue and C substance) and light sources emitting at 630nm (red) and 430nm (blue). Previous attempts of grouping the samples based on genetic similarity by PCR fingerprinting with primer (GTG)₅ were ineffective for species typing. Subsequently, 34 samples were identified by sequencing employing the primers NL1/NL4 from the D1/D2 region of the ribosomal gene. Sequencing revealed seven species: *M. furfur*, *M. globosa*, *M. pachydermatis*, *M. slooffiae*, *M. sympodialis*, *M. yamatoensis* and *M. japonica*. This is the first description of the occurrence of the latter two species in Latin America. The results of MIC determination showed high values (> 16 mg/mL) for caspofungina, suggestive of natural resistance. The MIC₅₀ and MIC₉₀ values obtained for the other drugs were generally higher than those reported in literature for species of *Malassezia* spp. To *M. furfur*, these values (MIC₅₀ and MIC₉₀) were ketoconazole – 0.25 and 2 µg/mL; isoconazole – 4 and 16 µg/mL; itraconazole - 0.125 and 8 µg/mL; for clotrimazole and miconazole the same values were obtained of 2 and 16 µg/mL. For the genus *Malassezia*, these were the MIC₅₀ and MIC₉₀ values determined: ketoconazole - 1 and 16 µg/mL; isoconazole – 8 and 16 µg/mL, itraconazole - 0.125 and 16 µg/mL, clotrimazole - 8 µg/mL and 64 µg/mL; miconazole - 4 µg/mL and 16 µg/mL. The calculation of the molar equivalence of the tested drugs indicated itraconazole as the most efficient drug. In the aIFD models with the red light and blue light allowed the reduction of *Malassezia* cell viability of 1.4 log₁₀ CFU/mL and 1.7 log₁₀ CFU/ mL, respectively.

Key-Word: *Malassezia*, molecular taxonomy, determination of minimum inhibitory concentration of antifungals, antimicrobial photodynamic inhibition.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Micromorfologia das células de <i>Malassezia spp.</i>	28
Figura 2: Micrografia eletrônica de uma célula de <i>M. pachydermatis</i>	29
Figura 3: O complexo de genes do rRNA utilizados para o sequenciamento ou taxonomia molecular para espécies do gênero <i>Malassezia</i>	35
Figura 4: Lesões características de pitíriase versicolor podem ser observadas em 3 manifestações diferentes.....	38
Figura 5: Micromorfologia de <i>Malassezia spp</i> apresentando-se leveduriforme e como pseudo-hifas, conhecida como “macarrão com almondegas”.....	39
Figura 6: Lesões características de dermatite seborreica.....	40
Figura 7: Folliculite pitirospórica em pacientes hígidos e pacientes com AIDS.....	40
Figura 8: Estrutura molecular do azul de ortotoluidina.....	47
Figura 9: Padrões de bandas obtidos pela separação eletroforética em gel de agarose dos produtos de PCR, empregando o iniciador (GTG) ₅ para 20 amostras de <i>M. furfur</i> , de diferentes pacientes e origens geográficas variadas.....	74
Figura 10: Padrões de bandas obtidos pela separação eletroforética em gel de agarose dos produtos de PCR, empregando o iniciador (GTG) ₅ para 10 amostras de <i>M. pachydermatis</i> , de diferentes animais de duas origens geográficas (BH –Minas Gerais, e SP- São Paulo).....	75
Figura 11: Padrões de bandas obtidos pela separação eletroforética em gel de agarose dos produtos de PCR, empregando o iniciador (GTG) ₅ para 10 amostras de <i>M. sympodialis</i> , de diferentes origens geográficas.....	76
Figura 12: Padrões de bandas obtidos pela resolução eletroforética em gel de agarose dos produtos de PCR empregando o iniciador (GTG) ₅ para 4 amostras de <i>M. globosa</i> , de diferentes origens geográficas.....	77
Figura 13: Padrões de bandas obtidos pela resolução eletroforética em gel de agarose dos produtos de PCR empregando o iniciador (GTG) ₅ para 2 amostras de <i>M. slooffiae</i> , de diferentes origens geográficas.....	78

Figura 14: Padrões de bandas obtidos pela resolução eletroforética em gel de agarose dos produtos de PCR empregando o iniciador (GTG) ₅ para 3 amostras de <i>M. japonica</i> , de diferentes origens geográficas.....	79
Figura 15: Padrões de bandas obtidos pela resolução eletroforética em gel de agarose dos produtos de PCR empregando o iniciador (GTG) ₅ para 02 amostras de <i>M. yamatoensis</i> , de mesma origem geográfica (BH-MG).....	80
Figura 16: Padrão de banda obtido pela resolução eletroforética em gel de agarose dos produtos de PCR empregando os iniciadores (NL1/NL4) para 04 amostras (BH1, BH2, T1, T4) de <i>Malassezia</i> spp.	81
Figura 17: Redução da viabilidade celular (Log ₁₀ UFC/mL) por inibição fotodinâmica antimicrobiana (aIFD) empregando a amostra teste MIE referente à espécie <i>M. furfur</i> e o diodo de emissão de luz (LED) a 630nm e usando-se o fotoabsorvedor azul de ortotoluidina (AOT) na concentração de 25 µM e como substâncias candidatas a carreadores Tween 40 (T40), Tween 80 (T80), Glicerol (GL) e Dimetil sulfóxido (DMSO).....	93
Figura 18: Redução da viabilidade celular (Log ₁₀ UFC/mL) por inibição fotodinâmica antimicrobiana (aIFD) da amostra teste MIE referente à espécie <i>M. furfur</i> após o uso do diodo de emissão de luz (LED) a 630 nm com doses de 48, 54 e 60 J/cm ² e usando-se o fotoabsorvedor azul de ortotoluidina (AOT) na concentração de 25 µM suplementado com DMSO a 0,25%.....	94
Figura 19: Redução da viabilidade celular (Log ₁₀ UFC/mL) por Inibição fotodinâmica antimicrobiana (aIFD) da amostra teste MIE referente à espécie <i>M. furfur</i> após o uso do diodo de emissão de luz (LED) a 630nm e dose de irradiação de 60 J/cm ² usando-se o fotoabsorvedor azul de ortotoluidina (AOT) na concentração de 25 µM suplementado com DMSO à 0,25% e variando os tempos de incubação em 5, 3, e 1 minuto.....	95
Figura 20: Redução da viabilidade celular (Log ₁₀ UFC/mL) por Inibição fotodinâmica antimicrobiana (aIFD) de 47 amostras do gênero <i>Malassezia</i> compreendendo as espécies <i>M. furfur</i> , <i>M. sympodialis</i> , <i>M. pachydermatis</i> , <i>M. globosa</i> , <i>M. slooffiae</i> , <i>M. yamatoensis</i>	98
Figura 21: Atividade da superóxido dismutase para as amostras MZ2 (susceptível à aIFD), 4850 (média resistência a aIFD), T5 (média resistência a aIFD) e 5389 (resistente à IFD).....	99
Figura 22: Atividade da Lacase para a amostra MZ2 (não resistente à aIFD) e amostra 5389 (resistente à aIFD).....	100
Figura 23: Quantificação do ergosterol da membrana celular fúngica para as amostras MZ2 (não resistente à aIFD) e 5389 (resistente à aIFD).....	101

Figura 24: Redução da viabilidade celular (Log_{10} UFC/mL) por Inibição fotodinâmica antimicrobiana (aIFD) empregando a amostra teste 5389 da espécie *M. furfur*, o LED azul emitindo a 430 nm, o fotoabridor substancia C e variando as doses de irradiação em 12, 24 e $32\text{J}/\text{cm}^2$ 102

Figura 25: Redução da viabilidade celular (Log_{10} UFC/mL) por Inibição fotodinâmica antimicrobiana (aIFD) empregando a amostra teste 5389 pertencente à espécie *M. furfur*, o LED azul emitindo a 430 nm, com dose de irradiação de $24\text{ J}/\text{cm}^2$ e variando as concentrações do fotoabridor substancia C (25, 50 e 100 μM) 103

Figura 26: Redução da viabilidade celular (Log_{10} UFC/mL) por Inibição fotodinâmica antimicrobiana (aIFD) empregando a amostra teste 5389 referente à espécie *M. furfur*, o LED azul emitindo a 430 nm, com dose de irradiação de $24\text{ J}/\text{cm}^2$ e o fotoabridor substancia C a $100\text{ }\mu\text{M}$ adicionado de DMSO variando de 0,25%, 0,5%, 0,75% e 1% e água ultra-pura..... 104

Figura 27: Redução da viabilidade celular (Log_{10} UFC/mL) por Inibição fotodinâmica antimicrobiana (aIFD) empregando-se todas as amostras de *M. furfur*, LED azul a 430nm com dose de irradiação de $24\text{J}/\text{cm}^2$ 105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Variação da micromorfologia das diferentes espécies de <i>Malassezia</i>	31
Tabela 2: Características físico-químicas e fisiológicas das diferentes espécies de <i>Malassezia</i>	32
Tabela 3: Origem das amostras de <i>Malassezia</i> : isoladas de pacientes humanos e ou cães, cidade e estado, local das lesões e hipótese de diagnóstico.....	56
Tabela 4: Representação das posições dos controles e das concentrações ($\mu\text{g/mL}$) dos antifúngicos caspofungina, cetoconazol, itraconazol, isoconazol e miconazol para a determinação da CIM.....	63
Tabela 5: Representação das posições dos controles e das concentrações ($\mu\text{g/mL}$) para a determinação da CIM para o clotrimazol.....	64
Tabela 6: Características físico-químicas dos Diodos de Emissão de luz (LED).....	65
Tabela 7: Condições experimentais para os testes de otimização da aIFD.....	66
Tabela 8: Veículos testados em associação com o azul de ortotoluidina (AOT).....	67
Tabela 9: Amostras de <i>M. furfur</i> agrupadas por meio dos padrões de bandas observados a partir da separação eletroforética dos produtos obtidos por PCR (GTG) ₅ , formando 12 grupos distintos.....	73
Tabela 10: Amostras de <i>M. pachydermatis</i> agrupadas por meio dos padrões de bandas observados a partir da resolução eletroforética dos produtos obtidos por PCR (GTG) ₅ , formando 7 grupos distintos.....	75
Tabela 11: Amostras de <i>M. sympodialis</i> agrupadas por meio dos padrões de bandas observados a partir da resolução eletroforética dos produtos obtidos por PCR (GTG) ₅ , formando 7 grupos distintos.....	76
Tabela 12: Amostras de <i>M. globosa</i> agrupadas por meio dos padrões de bandas observados a partir da resolução eletroforética dos produtos obtidos por PCR (GTG) ₅ , formando 3 grupos distintos.....	77

Tabela 13: Amostras de <i>M. slooffiae</i> , não agrupadas por meio dos padrões de bandas observados a partir da resolução eletroforética dos produtos obtidos por PCR (GTG) ₅ , formando 2 grupos distintos.....	78
Tabela 14: Amostras de <i>M. japonica</i> agrupadas por meio dos padrões de bandas observados a partir da resolução eletroforética dos produtos obtidos por PCR (GTG) ₅ , formando 3 grupos distintos.....	79
Tabela 15: Amostras de <i>M. yamatoensis</i> , não agrupadas. Dois padrões de bandas foram observados a partir da resolução eletroforética dos produtos obtidos por PCR (GTG) ₅	80
Tabela 16: Identificação específica das amostras estudadas com base no sequenciamento da região D1/D2 da subunidade maior do gene rRNA, sua origem e percentual (%) de identidade com sequências de bancos de dados públicos e do número de <i>gaps</i> obtidos para possibilitar o alinhamento das amostras.....	82
Tabela 17: Amostras estudadas e sua identificação específica obtidas pelas técnicas <i>fingerprinting</i> e do sequenciamento do RNA ribossomal, cidade e estado onde foram isoladas e as doenças relacionadas.....	84
Tabela 18: Espécies do gênero <i>Malassezia</i> associadas as malassezioses (pitíriase versicolor, dermatite seborreica e otite) e seus respectivos número de casos.....	86
Tabela 19: Valores da CIM ₅₀ e CIM ₉₀ obtidos e variação da CIM para todas as amostras estudadas referentes ao gênero <i>Malassezia</i>	88
Tabela 20: Valores de CIM ₅₀ e CIM ₉₀ obtidos e variação da CIM para as amostras de <i>Malassezia furfur</i>	88
Tabela 21: Redução da viabilidade celular (Log ₁₀ UFC/mL) por inibição fotodinâmica antimicrobiana (aIFD), empregando a amostra teste MIE referente à espécie <i>M. furfur</i> e o diodo de emissão de luz (LED) a 630 nm e o fotoabsorvedor azul de ortotoluidina (AOT) nas concentrações 150 µM, 100 µM, 50 µM e 25 µM.....	91
Tabela 22: Redução da viabilidade celular (Log ₁₀ UFC/mL) por inibição fotodinâmica antimicrobiana (aIFD) da amostra teste MIE referente à espécie <i>M. furfur</i> após o uso do diodo de emissão de luz (LED) com emissão a 630 nm e usando-se o fotoabsorvedor azul de ortotoluidina (AOT) nas concentrações 20 µM, 15 µM, 10 µM e 5 µM.....	96

Tabela 23: Redução da viabilidade celular (Log10 UFC/mL) por Inibição fotodinâmica antimicrobiana (aIFD) das amostras 4850 e 5389, da espécie <i>M. furfur</i> , após o uso do diodo de emissão de luz (LED) emitido a 630nm e usando-se o fotoabsorvedor azul de ortotoluidina (AOT) na concentração de 5 µM.....	97
Tabela 24: Amostras isoladas e sua identificação específicas obtidas através do sequenciamento e posterior análise no BLAST.....	140
Tabela 25: Valores de CIM, após 72 horas de incubação, dos antimicrobianos cetoconazol, itraconazol, clotrimazol, miconazol, isoconazol e caspofungina frente a 19 amostras de <i>Malassezia furfur</i> cultivados em placa de 96 poços em caldo ureia de Christensen a aproximadamente 30°C.....	141
Tabela 26: Valores de CIM, após 72 horas de incubação, dos antimicrobianos cetoconazol, itraconazol, clotrimazol, miconazol, isoconazol e caspofungina frente a 10 amostras de <i>Malassezia pachydermatis</i> cultivados em placa de 96 poços com o meio caldo ureia de Christensen a aproximadamente 30°C.....	141
Tabela 27: Valores de CIM, após 72 horas de incubação, dos antimicrobianos cetoconazol, itraconazol, clotrimazol, miconazol, isoconazol e caspofungina frente a 10 amostras de <i>Malassezia sympodialis</i> cultivados em placa de 96 poços com caldo ureia de Christensen a aproximadamente 30°C.....	142
Tabela 28: Valores de CIM, após 72 horas de incubação, dos antimicrobianos cetoconazol, itraconazol, clotrimazol, miconazol, isoconazol e caspofungina frente a 4 amostras de <i>Malassezia globosa</i> cultivados em placa de 96 poços com caldo ureia de Christensen a aproximadamente 30°C.....	142
Tabela 29: Valores de CIM, após 72 horas de incubação, dos antimicrobianos cetoconazol, itraconazol, clotrimazol, miconazol, isoconazol e caspofungina frente a 3 amostras de <i>Malassezia slooffiae</i> cultivados em placa de 96 poços com caldo ureia de Christensen a aproximadamente 30°C.....	142
Tabela 30: Valores de CIM, após 72 horas de incubação, dos antimicrobianos cetoconazol, itraconazol, clotrimazol, miconazol, isoconazol e caspofungina frente a 3 amostras de <i>Malassezia japonica</i> cultivados em placa de 96 poços com caldo ureia de Christensen a aproximadamente 30°C.....	143
Tabela 31: Valores de CIM, após 72 horas de incubação, dos antimicrobianos cetoconazol, itraconazol, clotrimazol, miconazol, isoconazol e caspofungina frente a 2 amostras de <i>Malassezia yamatoensis</i> cultivados em placa de 96 poços com caldo ureia de Christensen a aproximadamente 30°C.....	143

LISTA DE ABREVIATURAS

% Percentual

ABS Absorbância

AIDS *Acquired Immune Deficiency Syndrome* (Síndrome da imunodeficiência adquirida)

aIFD *Antimicrobial Photodynamic inhibition* (Inibição Fotodinâmica antimicrobiana)

AMB Anfotericina B

ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária

aPDT *Antimicrobial Photodynamic Therapy* (Terapia Fotodinâmica antimicrobiana)

AsGaAl arsênio, gálio e alumínio

AOT Azul de Ortoluidina

ATCCs *American Type Culture Collection* (Coleção de cultura da Universidade da Georgia, Atlanta (GA), Estados Unidos da América)

CFM Concentração Fungicida Mínima

CIM Concentração Inibitória Mínima

CLSI *Clinical and Laboratory Standards Institute* (Instituto de Padronizações Clínicas e Laboratoriais)

cm² centímetros quadrados

cm³ centímetros cúbicos

DMSO Dimetilsulfóxido

DM Dermatite Seborreica

EUA Estados Unidos da América

LED *Light Emitting Diode* (Diodo Emissor de Luz)

FDA *Food and Drug Administration*

FA Fotoabsorvedores

h horas

He-Ne hélio-neônio

IFD *Photodynamic inhibition* (Inibição Fotodinâmica)

IGS *Intergenic Spacer region* (Região Espaçadora Intergenica)

InGaAlP índio, gálio, alumínio e fósforo

ITS *Internal Transcribed Spacer* (Espaçador Interno Transcrito)

J joules

J/cm² Joules por centímetro quadrado

LED *Light-Emitting Diode* (Diodo Emissor de Luz)

M molar

m minutos

mL mililitros

mm milímetros

mm² milímetros quadrados

mW miliwatt

nm nanômetros

PBS *Phosphate Buffered Saline* (Tampão Fosfato Salino)

PDT *Photodynamic Therapy* (Terapia Fotodinâmica)

pH potencial de hidrogênio

PV Pitiríase Versicolor

ROS *Reactive Oxygen Species* (Espécies reativas do oxigênio)

RFLP *Restriction fragment length polymorphism* (Polimorfismo de fragmentos de restrição)

SOD Superóxido dismutase

TFD Terapia Fotodinâmica

UFC Unidades Formadoras de Colônias

URM *University Recife Mycologia* (Coleção de cultura da Universidade Federal de Pernambuco, Recife (PE), República Federativa do Brasil)

μL microlitros

μM micromolar

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
2. REVISÃO DE LITERATURA	27
2.1.1 O Gênero <i>Malassezia</i>	27
2.1.2 Características Morfofisiológicas e Moleculares do Gênero <i>Malassezia</i>	30
2.1.3 Doenças Associadas ao Gênero <i>Malassezia</i>	36
2.1.4 Tratamento.....	41
2.2 SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS.....	42
2.3 INIBIÇÃO FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA.....	44
2.3.1 Fotoabsorvedores.....	46
2.3.1.1 Azul de Ortoluidina.....	46
2.3.1.2 Utilização de Corantes Naturais na Medicina.....	47
2.3.2 Fontes de Irradiação.....	48
2.4 MECANISMOS BIOQUÍMICOS DE PROTEÇÃO CELULAR.....	48
2.5 A EXPERIÊNCIA DO GRUPO DE PESQUISA EM INIBIÇÃO FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA.....	50
3. JUSTIFICATIVA	52
4. OBJETIVOS	54
4.1 OBJETIVO GERAL.....	54
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	54
5. MATERIAIS E MÉTODOS	55
5.1 ORIGENS DOS ISOLADOS DE <i>Malassezia</i> spp.....	56
5.2 MANUTENÇÃO DOS ISOLADOS DE <i>Malassezia</i> spp.....	57

5.3 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS AMOSTRAS DE LEVEDURAS.....	57
5.3.1 Extração do DNA Total.....	57
5.3.2 Agrupamento das Amostras por Meio de Perfis Eletroforéticos Obtidos por PCR <i>Fingerprinting</i>	58
5.3.3 Amplificação por PCR Específica Usando-se os Iniciadores NL1 e NL4.....	59
5.3.4 Purificação dos produtos de PCR.....	60
5.3.5 Sequenciamento.....	60
5.3.6 Análise dos Resultados do Sequenciamento.....	60
5.4 ENSAIOS DE DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE ANTIFÚNGICOS.....	61
5.4.1 Preparo do Inóculo das Amostras para Realizar a Determinação de Concentração Inibitória Mínima.....	61
5.4.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima de Antifúngicos.....	62
5.5 AVALIAÇÃO DE <i>MALASSEZIA</i> SPP. À INIBIÇÃO FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA (aIFD).....	65
5.5.1 Isolados de <i>Malassezia</i> spp Usados para a Inibição Fotodinâmica.....	64
5.5.2 Preparo e Padronização do Inóculo para Inibição Fotodinâmica Antimicrobiana.....	64
5.5.3 Fontes de Luz.....	64
5.5.4 Otimização dos Fotoabsorvedores.....	65
5.5.4.1 Azul de ortotoluidina.....	65
5.5.4.2 Avaliação das atividades da lacase, superóxido dismutase (SOD)....	67
5.5.4.3 Mensuração da produção de ergosterol de amostras do gênero <i>Malassezia</i>	68
5.5.4.4 Substância C.....	69
6. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	71
7. RESULTADOS.....	72
7.1 CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR.....	72

7.1.1 Agrupamento das Amostras pela Técnica de <i>Fingerprinting</i> (GTG) ₅	72
7.1.2 Sequenciamento da Região D1/D2 do Gene da Subunidade Maior rRNA e Identificação das Espécies.....	81
7.1.3 Espécies Identificadas.....	83
7.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DE ANTIFÚNGICOS PARA AS AMOSTRA DO GÊNERO <i>Malassezia</i> IDENTIFICADAS.....	87
7.3 INIBIÇÃO FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA (AIFD).....	90
7.3.1 Padronização da Concentração do Azul de Ortotoluidina.....	90
7.3.2 Seleção da Substância Carreadora.....	91
7.3.3 Padronização da Dose de Irradiação.....	93
7.3.4 Padronização do Tempo de Incubação.....	94
7.3.5 Padronização da Concentração do Ortotoluidina (AOT).....	96
7.3.6 Teste da aIFD Para as Demais Amostras.....	97
7.4 AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES DAS ENZIMAS CATALÍTICAS LACASE, SUPEROXIDO DISMUTASE (SOD).....	98
7.5 MENSURAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ERGOSTEROL DE AMOSTRAS DO GÊNERO <i>Malassezia</i>	100
7.6 LED AZUL E SUBSTÂNCIA C.....	101
7.6.1 Concentrações Iniciais de Substância C e Dose de Irradiação.....	101
7.6.2 Concentrações mais Elevadas de Substância C.....	102
7.6.3 Análise do Percentual de Dimetilsulfóxido (DMSO).....	103
7.6.4 Teste da aIFD com LED azul mais Substância C Frente a Todas as Amostras <i>M. furfur</i>	104
8. DISCUSSÃO	106
9. CONCLUSÕES	118
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	119
11. ANEXOS	139

1. INTRODUÇÃO

O Reino Fungi é vasto, abrangendo um número estimado entre 1,5 até 5 milhões de espécies e apresenta grande diversidade, que abriga desde leveduras unicelulares, fungos filamentosos, muitas vezes descritos como mofos ou bolores, cogumelos e líquens. Há, também, entre os fungos, aqueles que são patogênicos tanto para plantas quanto para os animais. Os fungos se organizam no supergrupo Opisthokonta de eucariotos, junto com os animais com os quais compartilharam um ancestral comum num período que remonta a 1 bilhão de anos (Stajick et al., 2009; Heitman, 2011).

As relações evolutivas entre os diferentes grupos de fungos vêm sendo redesenhadas nos últimos dez anos por meio de estudos filogenéticos com base molecular. As espécies do reino Fungi são tradicionalmente assinaladas em quatro Phyla: - Chytridiomycota e Zygomycota (filos basais com linhagens polifiléticas para os quais estão previstas subdivisões para abrigar as linhagens monofiléticas, o que fará com que o total venha a ser entre oito e dez filos), e os filos de derivação mais recente (sub-reino Dykaria, 98 % dos fungos já descritos), Ascomycota (64% dos fungos já descritos) e Basidiomycota, que abrigam linhagens monofiléticas (Stajick et al., 2009; Heitman, 2011).

Os fungos capazes de infectar vertebrados existem em todos os Phyla e as evidências são de que a virulência apareceu independentemente, múltiplas vezes. Os eucariotos, como fungos e protozoários, vêm aumentando sua incidência entre os microrganismos patogênicos e a resistência a drogas é uma preocupação crescente, pois há poucas drogas e vacinas disponíveis quando se compara com as utilizadas contra bactérias e vírus. Entre os *Zygomycota*, citam-se como patógenos espécies dos gêneros *Mucor* e *Rhizopus*; entre os *Ascomycota* citam-se alguns dos mais bem sucedidos patógenos, nos gêneros *Pneumocystis*, *Candida*, *Aspergillus*, *Trichophyton*, e gêneros correspondentes a fungos patogênicos dimórficos como *Histoplasma*, *Coccidioides* e *Paracoccidioides*. Entre os *Basidiomycota* podemos citar os gêneros *Cryptococcus* e *Malassezia*. Conquanto compartilhem algumas propriedades gerais, como a termotolerância, a estabilidade dos componentes microbianos ao pH dos tecidos e do soro do hospedeiro (tolerância alcalina) e capacidade de resposta microbiana ao estresse, os fungos patogênicos apresentam

características peculiares nas estratégias de virulência de cada patógeno bem sucedido (Casadevall, 2005; Stajick et al., 2009; Heitman, 2011).

Entre os fungos patogênicos para animais, os mais extensivamente estudados foram aqueles que causam doenças humanas. De um modo geral, os fungos patogênicos podem ser divididos em dois grupos, dependendo da sua fonte de infecção. O primeiro grupo é constituído por agentes adquiridos a partir do ambiente externo, a maioria vivendo livre nos solos, e inclui agentes de micoses superficiais, subcutâneas e profundas. O segundo grupo é de origem endógena ao hospedeiro mamífero, e inclui *Candida* spp. e outras poucas espécies tais como *Malassezia* spp., que são considerados parte da microbiota comensal e presumivelmente adquiridos por transmissão a partir de outros hospedeiros. Os fungos comensais estão adaptados aos seus hospedeiros e as doenças que vem a causar estão geralmente associadas à ecologia e ao status imunológico do hospedeiro (Casadevall, 2005).

As micoses superficiais são prevalentes em todo o mundo, particularmente em países tropicais como o Brasil. Geralmente são causadas por dermatófitos e restritas às camadas córneas. Os dermatófitos mais prevalentes são dos gêneros *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*, e a espécie *T. rubrum*, um dermatófito antropofílico, destaca-se por sua capacidade de causar infecções crônicas e recorrentes. Apesar de raramente apresentarem risco à vida dos indivíduos, as dermatomicoses podem afetar a qualidade de vida, representando importante causa de morbidade e gastos financeiros. A crescente incidência dessas micoses tem ocorrido devido ao aumento do número de hospedeiros imunocomprometidos (pacientes com infecção pelo HIV, transplantados, pacientes em uso de quimioterápicos, corticoides e antibioticoterapia, recém-nascidos prematuros), à adaptação microbiana (desenvolvimento de resistência a drogas antifúngicas), o comportamento humano, ao desenvolvimento econômico e ao uso do solo, ao comércio e às viagens internacionais, além do aprimoramento do diagnóstico laboratorial (Nucci e Marr, 2005; Rotta et al., 2012).

As micoses subcutâneas, também chamadas micoses de implantação, entre as quais podemos citar esporotricose, eumicetoma, cromoblastomicose, feohifomicose, zigomicose e lacaziose, se desenvolvem a partir de um sítio de trauma transcutâneo. Essas doenças têm importante impacto em saúde pública, sendo difíceis de tratar, e sendo comum a recorrência. Tais micoses são importantes

na América Latina e, conquanto possam se manifestar em pessoas imunocomprometidas, a população imunocompetente é o seu principal alvo. A maioria dos agentes etiológicos são encontrados nos solos, vegetais e na matéria orgânica em decomposição. As populações acometidas são de baixo nível sócio-econômico, vivendo em áreas rurais e frequentemente envolvidas em atividades agropecuárias. Essas micoses podem claramente ser consideradas doenças negligenciadas. É interessante mencionar que as micoses subcutâneas podem, em alguns casos, evoluir para formas disseminadas e invasivas (Queiroz-Telles et al., 2011).

Entre as micoses profundas, podemos mencionar aquelas endêmicas, comuns a determinadas regiões geográficas, como a coccidioidomicose, que ocorre em áreas semidesérticas, a histoplasmose e a paracoccidioidomicose, que ocorrem preferencialmente em regiões tropicais, e a blastomicose, que ocorre em climas temperados. Essas micoses compartilham um aspecto importante da sua patogênese pois, o inóculo penetra no hospedeiro a partir do trato respiratório, por inalação de propágulos. Além das micoses profundas de caráter endêmico, é interessante lembrar a importância crescente das micoses sistêmicas causadas por agentes invasivos heterogêneos, como *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*, frequentemente associadas a pacientes com alterações primárias ou secundárias de imunidade (Criado et al., 2011; Bonifaz et al., 2011; Queiroz-Telles et al., 2011; Galimberti et al., 2012).

Entre os fungos patogênicos de origem endógena, os gêneros *Candida* e *Malassezia*, membros da microbiota humana normal, são capazes de, em condições particulares, transitarem de comensais, associados às mucosas e à pele, para patógenos. Para *Candida albicans*, foram identificados vários fatores e atividades que contribuem para a manifestação de seu potencial patogênico, como moléculas que mediam a aderência e invasão de células do hospedeiro, secreção de hidrolases, transição morfofisiológica de leveduras para hifas, sensoriamento de contato, tigmiotropismo, formação de biofilme, mudança fenotípica, entre outros. Avançou muito, também, a atual compreensão de como e quando esses mecanismos e fatores contribuem para a transição do fungo da sua condição de comensal para patógeno, ou da situação de colonização (infecção) do hospedeiro para a de causador de uma doença infecciosa (Mayer et al., 2013).

O gênero *Malassezia* agrupa espécies que estão presentes no ser humano e

nos animais domésticos e não domesticados. Existe uma gama de doenças que estão previamente relacionadas a essa levedura. Atualmente não se sabe ao certo qual, ou quais as situações que podem induzir a patogenicidade das leveduras do gênero *Malassezia*. Problemas para controlar a sudorese, modificando dessa forma o pH e deficiências do sistema imunológico são fatores que parecem estar associados a patogenicidade de leveduras do gênero *Malassezia*. As doenças de maior destaque são pitíriase versicolor, eczema atópico, caspa e dermatite seborréica. Essas duas últimas doenças tem grande apelo econômico. Basta lembrar que só no ano de 2004 nos Estados Unidos da América, foram gastos 1,4 bilhões de dólares em cosméticos e fármacos para combater a caspa e a dermatite seborreica e que, esta última, afeta mais de 50 % dos humanos no mundo (Bickers, 2006). Ademais, estima-se que 7 bilhões de pessoas estejam colonizadas por alguma ou mais de uma espécie do gênero *Malassezia*, estando sujeitas a manifestar alguma malasseziose, em virtude de algum desequilíbrio homeostático. Para a medicina veterinária, a espécie *M. pachydermatis* é o principal agente causador de otite do ouvido médio em animais de companhia. A importância do gênero nos últimos anos levou ao sequenciamento integral do genoma das espécies *M. globosa* e *M. sympodialis* e parte do genoma de *M. restricta*. Foi observado no genoma de *M. sympodialis* um número limitado de genes relacionados a biossíntese de proteínas. Pode-se verificar também que tanto no genoma de *M. sympodialis* quanto no de *M. globosa* faltam genes para a síntese de ácidos graxos, explicando a lipodependência das leveduras em relação ao hospedeiro (Xu et al., 2007; Gioti et al., 2013).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1.1 O gênero *Malassezia*

A primeira vez em que houve associação da etiologia fúngica com a doença pitiríase versicolor (PV), foi em 1846, quando o cirurgião Karl Ferdinand Eichstedt observou formas de levedura e filamentosas numa biopsia de paciente. Com base nesses achados, Charles Philippe Robin nomeou a espécie, até então desconhecida, como *Microsporon furfur* (1853). Algumas décadas mais tarde (1873), Sebastiano Rivolta notou que células de duplo contorno e com brotamento estavam relacionadas com psoríases e nomeou o agente como *Cryptococcus psoriase*. Um ano depois, Louis-Charles Malassez (1874) observou células fúngicas com aspecto ovoide e brotamento unipolar. Nesse mesmo estudo, constatou-se a capacidade do fungo em penetrar nos folículos pilosos e que estava sempre presente em indivíduos com caspa e *tinea*. A partir desses últimos fatos, sugeriu-se uma relação estreita do microrganismo com a patogênese da caspa. No entanto, Baillon, em 1889, por discordar da etiologia comum de algumas dermatofitoses e da PV, substituiu o antigo nome pelo novo gênero *Malassezia* e, por conseguinte, a espécie *M. furfur* (Hey e Migdley, 2010; Gaitanis et al., 2013). Existiu um contra-senso na literatura em relação à sinonímia do gênero *Malassezia* com *Pityrosporum*, dada a grande semelhança entre os dois gêneros, o que justificaria a sinonímia de *Pityrosporum orbiculare* e *M. furfur*. No entanto, *Pityrosporum* entrou em desuso e prevaleceu a prioridade da nomenclatura *Malassezia* (Batra et al., 2005).

As leveduras do gênero *Malassezia* estão presentes na microbiota de muitos animais, inclusive na do ser humano, vivendo como organismos comensais na pele e no couro cabeludo. No entanto, em alguns casos, podem se tornar patogênicos sob a influência de fatores predisponentes que envolvem tanto as condições do microambiente cutâneo quanto alterações do sistema imune do hospedeiro (Hey e Migdley, 2010; Cafarchia et al., 2011; Gaitanis et al., 2013).

O gênero *Malassezia* agrupa leveduras basidiomicéticas, lipofílicas (*M. pachydermatis*) e/ou lipodependentes que apresentam reprodução assexuada por brotamento unipolar ou simpodial (*M. sympodialis*) a partir da célula-mãe (Figura 1 A e B). Outra característica importante é a possibilidade de formarem pseudohifas (Figura 1 C). É interessante observar que o sequenciamento genômico revelou a

presença de genes para *mating type* indicativos da existência de reprodução sexuada nesse gênero (Xu et al., 2007; Gioti et al., 2013).

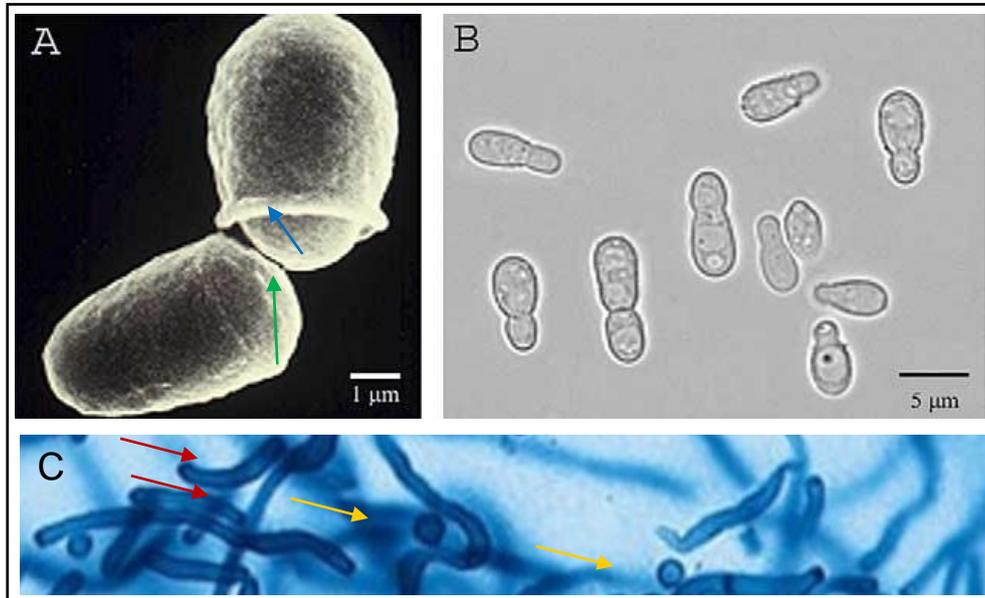


Figura 1: Micromorfologia das células de *Malassezia spp.* Em A, micrografia de varredura na qual se observa a cicatriz na célula-mãe (seta azul) e o início de um brotamento (seta verde) na espécie *M. pachydermatis*. Em B, é observada a espécie *M. furfur* sob microscopia de campo claro. A micromorfologia de *Malassezia spp.* nos formatos leveduriforme (setas amarelas) e de pseudohifas (setas vermelhas) são observadas em microscopia óptica (C). Fonte: Batra et al., 2005 (Figuras A e B), (Figura C) (Modificada).

A parede celular de *Malassezia spp.* é constituída de açúcares, cerca de 70%, proteínas (~10%) e lipídios (~17%) e é composta por multicamadas, sendo espessa em comparação a de outras leveduras. A parede tem cerca de 0,12 µm e constitui cerca de 30% do peso total da célula. Essa estrutura está envolta por uma camada lamelar (Figura 2) e varia de acordo com a disponibilidade de diferentes lipídios. A camada lamelar se cora com sulfato de azul do Nilo, o que indica a presença de lipídios na sua formação. Tem importante função na adesão da levedura à pele de humanos e à superfície interior de cateteres (Ashbee e Evans, 2002; Batra et al., 2005; Hey e Migdley, 2010).

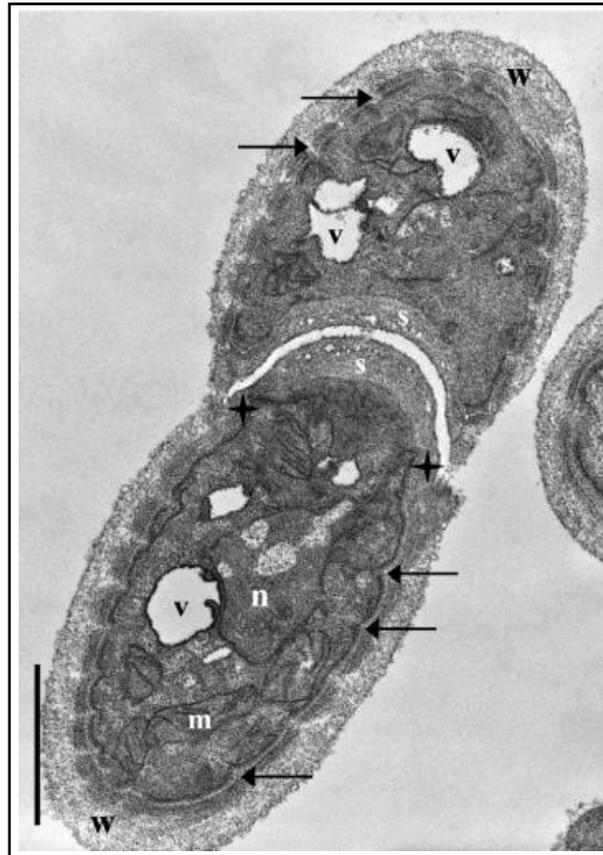


Figura 2: Micrografia eletrônica de uma célula de *M. pachydermatis*. Duas células no final da citocinese e antes da separação. Núcleo (n), mitocôndria (m), vacúolo (V), a parede celular lamelar (w), septo(s). As setas denotam a disposição dentada no lado interior da parede da célula que corresponde a invaginações da membrana plasmática. Os asteriscos indicam as covas perto da base de brotamento. **Barra: 1,0 micrometro**. Fonte David, Gabriel e Kopecká. 2007.

A diferenciação das espécies pela forma tradicional é feita por meio de testes de assimilação de lipídios e ácidos graxos (métodos bioquímicos), sendo levadas em consideração também as características da micromorfologia. As mais usadas são a assimilação dos Tweens 20, 40, 60 e 80, e o cremofor, um derivado do óleo de mamona que também é muito utilizado. Atualmente, as metodologias de biologia molecular têm sido consideradas de grande importância para o agrupamento taxonômico do gênero *Malassezia*. O suporte das ferramentas moleculares se faz muito importante, uma vez que as características morfológicas entre as espécies são muito sutis, o que pode gerar dúvidas e erros. Como exemplo, pode ser citado o estudo das regiões D1/D2 do gene do RNA ribossomal 28S (rRNA28S) e as regiões ITS, *Internal Transcribed Spacer* (Espaceador Interno Transcrito), que têm auxiliado na diferenciação das espécies de *Malassezia* (Batra et al., 2005).

Em 1996, a partir de estudos com base na morfologia, fisiologia e biologia molecular, houve uma mudança na classificação do gênero *Malassezia* em sete

espécies: *M. globosa*; *M. restricta*; *M. obtusa*; *M. slooffiae*; *M. sympodialis*; *M. furfur* (sendo essas lipodependentes) e *M. pachydermatis* como não dependente de lipídios (Tragiannidis et al., 2009). A partir de 2002, outras sete novas espécies de *Malassezia* foram citadas na literatura: *M. dermatis*, *M. japonica*, *M. yamatoensis*, *M. nana*, *M. caprae*, *M. equina* e *M. cuniculi* (Sugita et al., 2003; Sugita et al., 2004; Tragiannidis et al., 2009; Batra et al., 2011).

2.1.2 Características Morfofisiológicas e Moleculares do Gênero *Malassezia*

As técnicas laboratoriais para a identificação do gênero e das espécies de *Malassezia* resumem-se em testes morfológicos, físico-químicos e moleculares. Os dois primeiros são muito utilizados em laboratórios clínicos, por serem de mais simples execução e por possuírem um custo financeiro mais acessível. Os laboratórios acadêmicos utilizam, além das ferramentas morfofisiológicas, as técnicas moleculares. Entre as características morfológicas mais importantes para a diferenciação das espécies, ao serem observadas por técnicas de microscopia, está o diâmetro das células, a cicatriz ou colar que separa a célula-mãe da célula-filha, o formato do broto e o agrupamento das leveduras. Macroscopicamente, as colônias apresentam diferenças que dão indícios para a diferenciação das espécies, tais como: cor, formato, textura e se possuem brilho ou são foscas (Schlottfeldt et al., 2002). Um bom exemplo para a importância dos aspectos morfológicos na identificação das espécies pode ser citado para as espécies *M. furfur* e *M. globosa*. Apesar de ambas as espécies possuírem as mesmas necessidades físico-químicas conhecidas, *M. globosa* apresenta formato exclusivamente esférico e *M. furfur* possui uma enorme capacidade de produzir filamentos em cultura primária (Kellermann et al., 2011a). A Tabela 2 apresenta algumas das variações micromorfológicas observadas em diferentes espécies do gênero *Malassezia*.

Tabela 1: Variação da micromorfologia das diferentes espécies de *Malassezia*.

Espécies	Formato
<i>M. caprae</i>	Globosa, Elipsoidal
<i>M. cuniculi</i>	Globosa
<i>M. dermatis</i>	Globosa, Elipsoidal
<i>M. equina</i>	Globosa, Elipsoidal
<i>M. furfur</i>	Globosa, Elipsoidal, Cilíndrica
<i>M. globosa</i>	Globosa
<i>M. japonica</i>	Globosa
<i>M. nana</i>	Elipsoidal
<i>M. obtusa</i>	Elipsoidal, Cilíndrica
<i>M. pachydermatis</i>	Elipsoidal
<i>M. restricta</i>	Globosa, Elipsoidal
<i>M. slooffiae</i>	Elipsoidal, Cilíndrica
<i>M. sympodialis</i>	Elipsoidal
<i>M. yamatoensis</i>	Elipsoidal

Fonte: (Kellermann *et al.*, 2011)

As espécies que pertencem ao gênero *Malassezia* possuem uma plasticidade muito grande com relação à temperatura. Algumas espécies são menos tolerantes à variação de temperatura, enquanto outras têm uma maior resistência. Como exemplo, pode-se citar *M. furfur*, que consegue crescer em temperaturas de 40°C, enquanto *M. obtusa* não cresce em temperaturas acima de 38° C. O meio de Dixon é um meio de cultura muito eficiente para o cultivo de leveduras do gênero *Malassezia*. A esse meio são adicionados diferentes ácidos graxos, tais como o Tween 40 e o glicerol monooleato. Dessa forma, o Agar Dixon modificado é um importante meio de cultura para o isolamento das diferentes espécies do gênero *Malassezia*, as quais necessitam de fontes externas de lipídios. No entanto, *M. pachydermatis*, por não ser lipodependente, não necessita do acréscimo de ácidos graxos em cultura para o seu desenvolvimento. Essa última espécie pode ser cultivada em ágar Sabouraud, sem a necessidade da adição de fonte de ácidos graxos, o que a diferencia das demais espécies (Guillot *et al.*, 1996; Guillot, 2008).

Outros aspectos bioquímicos também são significativos para a diferenciação das espécies, como a presença de reação de catalase positiva, bem como o desenvolvimento de colônias com a adição de cremofor (óleo de mamona polietoxilado). O principal componente químico do cremofor é o grupo hidroxila do triglicerídeo de óleo de mamona, que possui também etoxilados, como o óxido de etileno para formar ésteres polietilenoglicol (Schlottfeldt *et al.*, 2002). A Tabela 2

apresenta, de forma geral, os principais aspectos morfológicos e as condições físico-químicas para o desenvolvimento das diversas espécies de *Malassezia*.

Tabela 2: Características físico-químicas e fisiológicas das diferentes espécies de *Malassezia*.

Espécies	Tween				Cremofor	Urease	Catalase	Meio Dixon		
	20	40	60	80				32°C	37°C	40°C
<i>M. caprae</i>	+	+	+	+	-	+	+	+	±	-
<i>M. cuniculi</i>	-	-	-	-	-	+	+	±	+	+
<i>M. dermatis</i>	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-
<i>M. equina</i>		+	+	+	-	+	+	+	±	-
<i>M. furfur</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>M. globosa</i>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
<i>M. japonica</i>			+	+	-	+	+	+	+	-
<i>M. nana</i>		+	+	+	-	+	+	+	+	-
<i>M. obtusa</i>	_*	-	_*	_*	-	+	+	+	±	-
<i>M. pachydermatis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>M. restricta</i>	-	-	-	-	-	+	-	+	±	-
<i>M. slooffiae</i>	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
<i>M. sympodialis</i>	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
<i>M. yamatoensis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

Indeterminado (|), * Necessita de sinergismo.

Fonte: Schlottfeldt et al., 2002; Cafarchia et al., 2011; Kellermann et al., 2011.

Nos últimos anos, as metodologias de biologia molecular também têm se apresentado como uma importante ferramenta para a caracterização das espécies de *Malassezia* (Mirhendi et al., 2005). O estudo, e posterior análise para triagem molecular em *Malassezia*, é focado em metodologias que permitam a amplificação de regiões alvo do genoma, as quais possam apresentar variações de bases, mutações, regiões caracteristicamente polimórficas do DNA ou redundantes (microssatélites) (Gaitanis et al., 2009a). Gaitanis e colaboradores (2009a), revisando métodos moleculares utilizados na tipagem de isolados de *Malassezia*, verificaram que podem ser divididos em dois tipos: aqueles que detectam variantes genéticas numa mesma espécie, e aqueles que utilizam seletivamente marcadores para amplificar DNA polimórfico, empregando, nesse caso, rRNA e estudando as variações de sequência nos genes ribossomais ou em suas regiões intergênicas.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) possui diversas variações de técnica para auxiliar na caracterização molecular de *Malassezia*. Entre tais técnicas, as que empregam perfis de bandas em gel, correspondendo a impressões moleculares (*Fingerprinting methods*) são muito utilizadas. Têm, como intuito, caracterizar e estabelecer similaridade genética entre amostras do fungo e suas variações. A mais usada é a amplificação aleatória de DNA polimórfico “*random amplification of polymorphic DNA*” (RAPD) e o polimorfismo de tamanho de fragmentos amplificados “*Amplified Fragment Length Polymorphism*” (AFLP) (GUPTA et al., 2004a).

Duarte e Hamdan (2010) empregaram a técnica de PCR-RAPD, com 8 diferentes oligonucleotídeos iniciadores, para comparar os perfis de amplificação de DNA polimórfico, visando avaliar a diversidade genética de 27 amostras de *Malassezia* isoladas de ouvido externo de animais: 14 amostras de bovinos, 4 de cães, 7 amostras de seres humanos, e 2 amostras de referência, previamente identificadas por meio de testes convencionais e por sequenciamento parcial do gene rDNA 28S, pertencentes às espécies *M. furfur*, *M. slooffiae* e *M. pachydermatis*. As análises dos fenogramas mostraram variações intraespecíficas entre as amostras com a ocorrência de padrões distintos, tipos genéticos específicos de gado bovino, de cães e de seres humanos. As análises dos padrões eletroforéticos revelaram heterogeneidade nos perfis obtidos para *M. furfur* e *M. slooffiae* isoladas de gado bovino e de seres humanos, e entre as amostras de *M. pachydermatis* isoladas de cães e de bovinos, achados que podem ter aplicações epidemiológicas.

Gaitanis e colaboradores (2009b) utilizaram o iniciador M13 (5'-GAGGGTGGCGGTTCT-'3) para obter impressões moleculares de diversas amostras de *M. furfur* com o intuito de investigar associações fitogeográficas. Havia relatos na literatura de que as taxas de isolamento de diferentes espécies do gênero *Malassezia* de indivíduos com pele saudável ou doente mostravam variações geográficas. As amostras foram coletadas de escandinavos que residiam na Grécia e comparadas com amostras coletadas de nativos gregos, além de búlgaros e chineses residentes na Grécia. Os resultados mostraram que as amostras gregas formaram um grupo distinto em relação às isoladas de outros grupos étnicos, que, por sua vez, mostraram-se agrupadas de modo relacionado com a origem dos hospedeiros. Esses dados sugerem que exista uma associação com a origem

geográfica do hospedeiro em relação à condição da pele subjacente (saudável ou doente). O autor também afirma que *M. furfur* poderia ser provável candidato eucarioto para estudos filogeográficos.

Ko e colaboradores (2011) usando a técnica de PCR-RFLP estudaram como a frequência e distribuição de leveduras do gênero *Malassezia* poderia variar de acordo com a idade, sexo e o tipo de alimentação do portador. Para tanto, foi utilizado um grupo total de 30 pacientes do sexo masculino e 30 pacientes do sexo feminino, sendo 20 pacientes na puberdade, 20 pacientes, com aproximadamente 25 anos e 20 pacientes acima dos 30 anos diagnosticados com foliculite ptirosfórica. Um grupo controle a esses pacientes também foi formado. Os resultados mostram que 23,9% dos pacientes com acne apresentavam *M. restricta*, sendo essa a espécie com maior percentual. No entanto, *M. globosa* se apresentou com maior percentual em pacientes saudáveis.

Os genes e as regiões intergênicas dos rRNAs tem sido muito utilizados na taxonomia molecular para as espécies do gênero *Malassezia*. As principais vantagens de se utilizar o rRNA são a existência de múltiplas cópias no interior do genoma o que aumenta a eficiência da amplificação, e ser uma região com uma variação de sequências suficientes, garantindo a diferenciação das amostras (Gaitanis et al., 2009a). A região D1/D2 da subunidade maior do gene do rRNA 28S é muito bem estudada para os fungos, tendo como objetivo o sequenciamento da região visando a comparação de sequências por alinhamento e a identificação específica da amostra (Lachance et al., 1999; Hinrikson et al., 2005). Outras regiões importantes que visam ao sequenciamento são o ITS1 e ITS2 *Internal Transcribed Spacer* (Espaçador Interno Transcrito). Makimura e colaboradores (2000) utilizando o ITS1, verificaram a amplificação de fragmentos, cujo tamanho variou de 162 a 266 pb e permitiu diferenciar 7 espécies de *Malassezia* (*M. pachydermatis*, *M. furfur*, *M. sympodialis*, *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. restricta* e *M. slooffiae*). Registraram, ainda, a existência de subgrupos dentro de *M. furfur*, *M. sympodialis*, *M. slooffiae* e *M. pachydermatis*. Por outro lado, entre os métodos que se baseiam no sequenciamento, estudos realizados por Cafarchia e colaboradores (2011) demonstraram que a subunidade maior do RNA ribossomal fornece as melhores características como marcadores genéticos para *Malassezia* spp. Como exemplo são citados sete espécies de *Malassezia* (*M. furfur*, *M. obtusa*, *M. globosa*, *M. slooffiae*, *M. sympodialis*, *M. pachydermatis* e *M. restricta*), que foram distinguidas com base

em diferenças nucleotídicas de 26 a 70% em variantes intraespecíficas. De fato, a região D1/D2 do RNA ribossomal 28S, já há algum tempo, consolidou-se como importante ferramenta para a indicação e estudo da presença de novas espécies de *Malassezia* (Batra et al., 2005; Kellermann et al., 2011). A figura 3 apresenta regiões importantes do gene do rRNA utilizadas para taxonomia molecular de *Malassezia*.

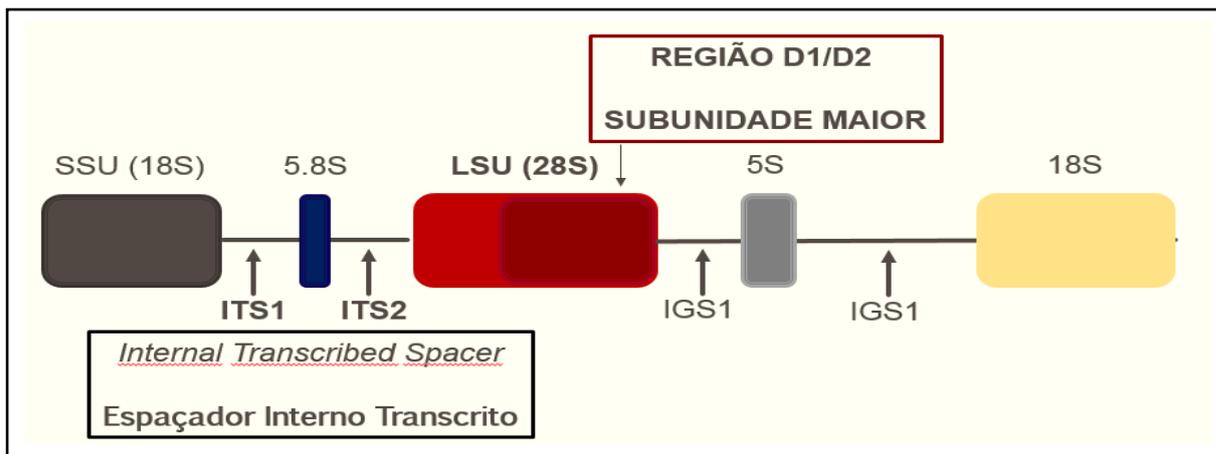


Figura 3: O complexo de genes do rRNA utilizados para o sequenciamento ou taxonomia molecular para espécies do gênero *Malassezia*. Fonte: Gaitanis et al., 2009 (moificado).

Kobayashi e colaboradores (2011) compararam os genótipos de isolados de *M. pachydermatis* provenientes de cães com pele saudável e de cães com dermatite atópica para verificar a influência na produção da fosfolipase A2. Para esse estudo, foram coletadas amostras de 24 cães com pele saudável e 21 cães com dermatite atópica. Os autores obtiveram um total de 131 isolados, de locais como pavilhão auditivo externo e região interdigital dos dedos. O DNA genômico foi extraído e a região IGS foi amplificada. O estudo obteve 9 subtipos da região IGS com base no tamanho, que variaram de 552 a 898 pb. Em particular, o subtipo 3D esteve presente na grande maioria dos cães com dermatite atópica. Observou-se também que os níveis de fosfolipase A2 eram mais elevados nas regiões onde se encontravam amostras de *M. pachydermatis* do subtipo 3D. Tais estudos indicam que o subtipo 3D da região IGS pode ser um marcador de amostras de *M. pachydermatis* que induzem fosfolipase A2, enzima que pode estar envolvida no processo inflamatório de dermatite atópica em cães.

Lyakhovitsky e colaboradores (2013), usando técnicas moleculares estudaram o papel e influência das espécies que compõem o gênero *Malassezia* na

pitiríase versicolor, uma vez que a *Malassezia furfur* é considerada o principal agente etiológico da doença. Foram coletadas amostras de 75 pacientes em um ambulatório de dermatologia, sendo 35 mulheres e 40 homens que apresentavam pitiríase versicolor. O DNA das amostras foi extraído e o PCR foi feito das regiões rRNA 28S e ITS1 e ITS2. Após constatar a presença de produtos de PCR, as regiões rRNA 28s e ITS1 e ITS2 foram sequenciadas. Os resultados demonstraram que a espécie mais comum entre os pacientes foi *M. globosa* relacionada com 97,3% dos pacientes com ptíriase versicolor. Em outros 3% dos casos, *M. globosa* coexistiu com *M. restricta*.

Paulino e colaboradores (2008), utilizando a técnica PCR em tempo real multiplex para amplificar a região ITS2, realizaram um estudo em que compararam as espécies de *Malassezia* presentes em 6 locais do corpo (antebraço direito e esquerdo, couro cabeludo, testa e parte superior e inferior do dorso) de uma voluntária de 33 anos, a qual apresentava pele saudável, e de dois diferentes sítios de um outro paciente, com 58 anos, que apresentava pitiríase (dedo e cotovelo). Os resultados apontaram produtos de PCR em número de até 1×10^{10} para *M. restricta* e *M. globosa* tanto para a lesão do dedo quanto do cotovelo. Os autores afirmam que o método é sensível e específico, o que representa uma alternativa mais rápida e mais rentável do que a clonagem ou do que realizar análises a partir de bibliotecas de DNA. Outro trabalho envolvendo PCR em tempo real foi realizado por Sugita e colaboradores (2006), de modo a avaliar a carga genômica de *Malassezia* em amostras clínicas de dermatite atópica. Ambos os trabalhos, envolvendo a técnica de PCR em tempo real, têm grande importância, uma vez que não houve a necessidade de realizar a cultura para isolar o DNA, passo primordial para as técnicas de PCR convencionais. Ainda nesse sentido, é importante ressaltar que a recuperação de colônias de *M. globosa* e *M. restricta* usando meios artificiais é baixa. Assim, verifica-se a importância das técnicas de biologia molecular para a taxonomia de *Malassezia*, pois do seu emprego resultou a descrição das mais novas espécies do gênero.

2.1.3 Doenças associadas ao gênero *Malassezia*

O gênero *Malassezia* é descrito como sendo parte da microbiota indígena da pele humana, e de outros mamíferos e aves, atuando no local como comensais (Gupta et al., 2004b). No entanto, pode levar a um quadro patológico quando sob influência de fatores que variam desde as condições de saúde do hospedeiro, condições físico-químicas do ambiente e condições inerentes a cada uma das diferentes espécies de *Malassezia* (Crespo et al., 2000a; Schlottfeldt et al., 2002).

Entre as doenças associadas às *Malassezia* podem ser citadas: pitíriase versicolor, dermatite seborreica, foliculite pitirospórica, dermatite atópica, papilomatose confluyente reticulada de Gougerot e Carteaud (Crespo et al., 2000; Gupta et al., 2004b; Gupta e Kohli, 2004; Guillot et al., 2008). As de maior significância clínica serão descritas abaixo com maiores detalhes.

A pitíriase versicolor (PV) é uma doença benigna e que geralmente não causa maiores complicações em pacientes hígidos. No entanto, as recidivas são comuns. A PV está associada principalmente com a espécie *M. globosa*. Existem diversas formas clínicas da PV. A sua forma mais comum é a que induz hipopigmentação da pele também conhecida como pitíriase alba, gerando, dessa forma, manchas esbranquiçadas (Figura 4A). Uma forma mais rara é a que apresenta manchas hiperpigmentadas com formato ovoide (Figura 4B). A PV pode gerar descamação superficial da camada córnea apresentando-se, inicialmente, como lesões maculosas bem delimitadas e geralmente com diâmetro inferior a um centímetro. Contudo, com a evolução do quadro clínico pode ocorrer a fusão das manchas. A PV é assintomática. No entanto, 33% dos pacientes relatam coceira e/ou ardência quando transpiram, além de vermelhidão (Figura 4C). As lesões eritematosas podem, com o tempo, tornar-se pruriginosas (Mayser e Preus, 2012).



Figura 4: Lesões características de pitiríase versicolor podem ser observadas em 3 manifestações diferentes. Na figura A observa-se uma hipopigmentação da pele. Na figura B, observa-se uma hiperpigmentação. Em alguns casos pode ocorrer lesões eritematosas, que estão aqui ilustradas na figura C. Fonte: Mayser e Preuss, 2013 (Figura A), fotos cedidas gentilmente pelo Instituto Superior de Medicina (ISMD) (Figuras B e C).

As lesões ocasionadas por PV ocorrem geralmente na face, tronco e membros superiores. Diversos estudos tentam explicar as diferenças de tonalidade das lesões. Tudo indica que as lesões hiperpigmentadas são devidas ao aumento dos melanossomos e à distribuição acentuada desses na epiderme. As lesões com características hipopigmentadas podem estar relacionadas com a inibição da enzima dopa-tirosinase que converte L-Dopa em melanina. A enzima seria inibida pelo ácido dicarboxílico (ácido azelaico) produzido pelo fungo, quando em ambiente favorável, como, por exemplo, pele com excesso de secreção lipídica (Youngchim et al., 2013).

Ao serem observados ao microscópio, raspados da pele de pacientes que apresentavam a PV, denotam uma modificação na morfologia das leveduras que se transformam em pseudo-hifas. Uma das características dos raspados de lesões de PV em microscopia é a presença simultânea das pseudo-hifas e de leveduras agrupadas de forma irregular com a parede espessa. As pseudo-hifas têm papel patogênico na doença, uma vez que podem transpor a camada córnea da pele. A presença de pseudo-hifas, juntamente com a forma de levedura, é comumente

descrita metaforicamente “macarrão com almôndegas” (Figura 5) (Saghazadeh et al., 2010).

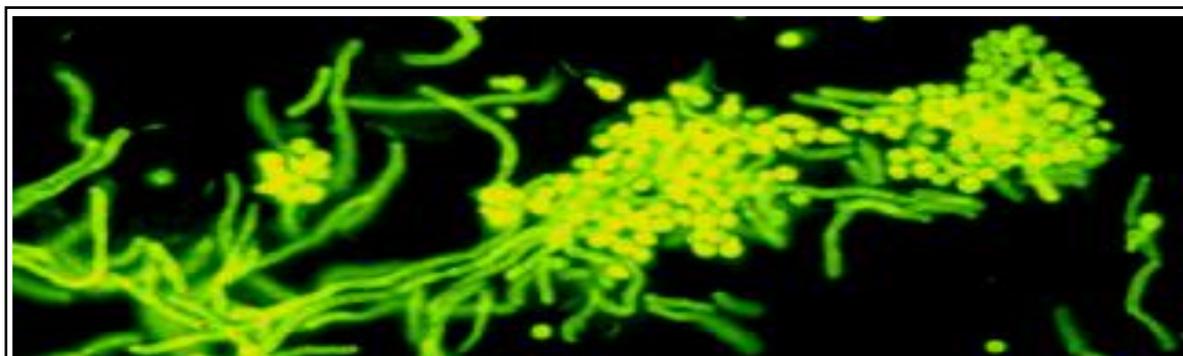


Figura 5: Micromorfologia de *Malassezia* spp. apresentando-se leveduriforme e como pseudo-hifas, conhecido como “macarrão com almôndegas”. Fonte: Mayser e Preus, 2012 (Modificado).

A PV ocorre com mais frequência em adolescentes e adultos jovens, por apresentarem uma sudorese mais acentuada. Entretanto, já foi descrita em pessoas idosas e crianças. Há indícios de que fatores genéticos do indivíduo, bem como de sorotipos específicos de algumas amostras de *Malassezia* possam estar envolvidos com a patogênese da doença (Mayser e Preus, 2012).

Os países de clima tropical apresentam a grande maioria dos casos de PV descritos no mundo. A incidência em países de clima quente pode atingir 66%, não passando de 3% em países de clima temperado.

Os quadros de dermatite seborreica (DM) estão associados, principalmente, às espécies *M. globosa*, *M. sympodialis*, *M. furfur*, e *M. slooffiae*. De acordo com a literatura, esse é o segundo quadro patológico mais comum associado à *Malassezia* (Nakabayashi et al., 2000). Geralmente, a doença é caracterizada por lesões com formação de eritema dispersas pelo couro cabeludo, podendo apresentar-se em outras partes do corpo como tórax, aurículas e face, com ou sem presença de prurido (Figura 6A). Estudos publicados ao longo dos anos demonstraram que as maiores complicações de DM estão associadas a pacientes com AIDS. De fato, até 80% dos casos de DM no mundo foram confirmados em pacientes com AIDS. Ademais, pacientes com imunodeficiência apresentam um quadro clínico mais grave da doença com evolução mais lenta para a cura. Pacientes nessas condições podem apresentar DM de forma crônica, com lesões em regiões do corpo que não ocorreriam em indivíduos hígidos (Bergbrant et al., 1999; Schlottfeldt et al., 2002) (Figura 6 B).



Figura 6: Lesões características de dermatite seborreica. Mulher jovem apresentando dermatite seborreica na face, com recidiva nos últimos 8 anos (A). Paciente com AIDS apresentando dermatite seborreica de forma atípica (B). Fonte Gaitanis *et al.*, 2013 (Figura 6A); Schwartz *et al.*, 2006 (Figura 6B)

As espécies *M. furfur*, *M. globosa* e *M. pachydermatis* estão associadas à foliculite pitirospórica (FP), que pode ocorrer tanto no ser humano como em cães e gatos (Chang *et al.*, 1998). As espécies *M. restricta*, *M. globosa*, e *M. sympodialis* são responsáveis pela maior parte dos casos. A doença inicia-se após a multiplicação acentuada da levedura na luz do folículo piloso, induzindo um processo inflamatório. As lesões consistem em pequenas pápulas eritematosas dispersas, principalmente, no dorso, e podem ser observadas, também, nos braços e pernas. Em alguns casos, podem evoluir para pústulas. O suor excessivo e a alta umidade são fatores que predispõem a um crescimento exacerbado das espécies de *Malassezia*, favorecendo a manifestação da FP (Figuras 7A e 7B). Os casos mais graves são observados em pacientes imunocomprometidos, nos quais as lesões se espalham rapidamente, inclusive para a face, e podem vir acompanhadas de febre superior a 39°C (Figura 7C) (Gupta e Kohli, 2004; Gaitanis *et al.*, 2013)

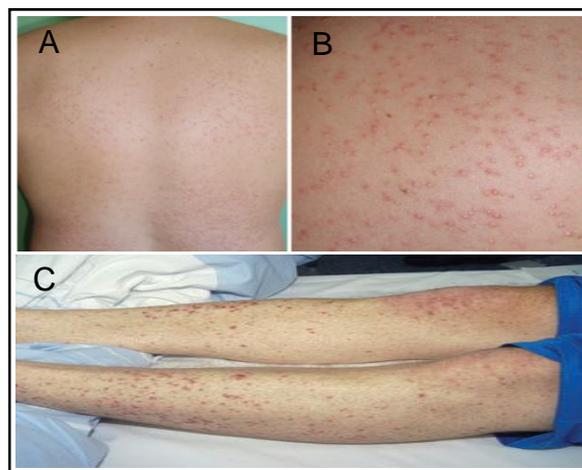


Figura 7: Foliculite pitirospórica em pacientes hígidos e pacientes com AIDS. Jovem trabalhador de 34 anos da construção civil apresentando foliculite pitirospórica no dorso (A) e uma visão mais detalhada das lesões é mostrada na figura (B). Paciente com AIDS apresentando foliculite pitirospórica disseminada, com lesões maculopapulares (C). Fonte: Gaitanis *et al.*, 2012 (Figuras 7A e 7B); Tragiannidis *et al.*, 2009 (Figura 7C).

Em pacientes imunocomprometidos ou imunossuprimidos são relatados casos de malassezioses invasivas. A maioria das infecções invasivas são associadas às espécies *M. furfur* e *M. pachydermatis*. Para esta última espécie há relatos de surtos nosocomiais em neonatos em unidades de terapia intensiva. As infecções invasivas por *Malassezia* estão associadas a cateterização e há casos reportados na literatura de veiculação para neonatos de agentes de saúde proprietários de cães (Tragiannidis et al., 2009; Arendrup et al 2013).

2.1.4 Tratamento

O tratamento tradicional das doenças associadas à *Malassezia* spp. consiste basicamente em três ações:

- Casos de pequena gravidade: controlar a sudorese excessiva do corpo e suspender a utilização de cremes ou loções hidratantes nas áreas da pele que estão afetadas. É, porém, uma situação um pouco complexa porque pode estar intimamente ligado à manutenção de hábitos de higiene adequados como, tomar banho logo após exercícios físicos ou trabalho braçal. As ações supracitadas podem não só evitar os casos primários como também podem evitar as frequentes recidivas (Gupta e Kohli, 2004).
- Casos de média gravidade: a cada caso clínico, o médico pode sugerir um tratamento tópico, com o uso de xampus ou sabonetes específicos para o tratamento de dermatomicoses, os quais são utilizados apenas nas áreas afetadas (Strippoli et al., 1997). Para o tratamento tópico de casos com gravidade média, atualmente, existem muitos fármacos na literatura que podem ser empregados. O hipossulfito de sódio, sulfeto de selênio e ácido salicílico são os mais utilizados (Odds et al., 2003).
- Casos de maior gravidade: juntamente com o uso de sabonetes ou xampus, utiliza-se algum tipo de antimicótico, tanto no tratamento tópico para lesões localizadas e persistentes quanto para o tratamento sistêmico, com lesões difusas localizadas em todo o corpo (Strippoli et al., 1997). A combinação dos fármacos com drogas de amplo espectro deve ser empregada nos casos mais

graves. Os derivados azólicos, como o cetoconazol, devem ser administrados por, no mínimo, 10 dias em dosagem de pelo menos 200 mg/ dia. Os fármacos derivados triazólicos também são descritos na literatura clínica. O itraconazol deve ser usado na dosagem de 200mg/ dia, durante cinco dias ou fluconazol 400mg, dose única. Os pontos negativos da administração dos triazólicos são: recidivas frequentes, principalmente para a PV em humanos e otite em cães e gatos, e efeitos colaterais como náuseas e dores abdominais (Leeming et al.,1997; Strippoli et al.,1997; Gupta e Kohli, 2004; Sidrim et al., 2004).

2.2 SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

Apesar de a cura sem maiores complicações abranger a grande maioria dos pacientes com quadros associados à *Malassezia* spp., as recidivas tem se mostrado cada vez mais frequentes. Ademais, a resistência aos fármacos tem sido relatada na literatura, havendo duas causas mais prováveis (Martinez et al., 2001; Lyskova et al., 2007). A primeira ocorre devido ao término do tratamento de forma precoce, sendo o paciente, muitas vezes, o responsável pela interrupção. A segunda está relacionada à má avaliação da dosagem a ser administrada. Em particular, para leveduras do gênero *Malassezia*, a situação se agrava, uma vez que existem poucos estudos de ensaios com antifúngicos descritos na literatura (Odds et al.,2003; Gupta e Kohli, 2004).

De acordo com o EUCAST (*European committee on antimicrobial susceptibility testing*) *breakpoint* é definido quando constata-se que a susceptibilidade clínica é menor ou igual a uma determinada concentração (mg/L) que é capaz de inibir o crescimento de um determinado micro-organismo. No entanto para o CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*), *breakpoint* para leveduras são colocados em uma de cinco categorias. Essas categorias incluem susceptibilidade, susceptibilidade intermediária, susceptibilidade dose dependente, resistência e a não susceptibilidade. Para a interpretação de *breakpoints* deve-se observar a combinação exata entre micro-organismos e drogas, exigindo a integração da distribuição da concentração da CIM, parâmetros farmacocinéticos, farmacodinâmicos, e a relação entre a atividade *in vitro* e *in vivo* (Pfaller et al.,2006;

Pfaller et al., 2010).

End points ou pontos finais de leitura dos testes de CIM podem ser lidos por espectrofotometro ou de forma visual, através da turbidez do meio. A turbidez pode ser graduada em escala de modo a verificar uma redução de pelo menos 50%, por exemplo (CLSI M27A3).

Para *Malassezia* spp., não existem dados oficiais do CLSI, relativos aos perfis de resistência e susceptibilidade aos antifúngicos usados na clínica laboratorial. Os valores descritos para *Candida* spp. como ponto de corte são adotados arbitrariamente para *Malassezia* spp. em estudos clínicos e acadêmicos. O documento CLSI M27 A3 define, como ponto final de leitura para a maioria dos azólicos, quando se trabalha com microdiluição, a condição em que existe uma diminuição da turvação de cerca de 50% (Carfachia et al., 2012; Carrilo-Muñoz et al., 2013).

Carfachia e colaboradores (2012) estudaram a susceptibilidade *in vitro* de 30 isolados clínicos de *M. pachydermatis* frente a fluconazol, cetoconazol e itraconazol, usando os meios indicados pelo protocolo do CLSI: caldo ureia de Christensen (CUB), caldo Sabouraud dextrose com 1% de tween 80 (SDB) e caldo Dixon (DXB) além do mRPMI 1640 que é recomendado pelo CLSI. Foi avaliado, também, o melhor tempo de incubação, 48 e 72 horas, com o intuito de otimizar a determinação da susceptibilidade do fungo aos azólicos. Os resultados mostram que o melhor tempo de crescimento de *M. pachydermatis* nos caldos CUB, SDB e DXB foi de 48 horas a 32°C. O cultivo em RPMI registrou crescimentos muito baixos. Em particular, o melhor crescimento foi registrado em caldo SDB. Não foram registradas diferenças estatísticas de CIM após 48 e 72 horas. Para o itraconazol, registraram-se valores de CIM inferiores aos observados para o cetoconazol e fluconazol. Com base no estudo desenvolvido, os autores afirmam que o meio recomendam o SDB com um inóculo de $1-5 \times 10^6$ CFU/mL e com um tempo de incubação de 48 horas a 32 °C.

Carrilo-Muñoz e colaboradores (2013) avaliaram a suscetibilidade de isolados clínicos de *M. globosa*, *M. furfur*, *M. sympodialis*, *M. slooffiae*, *M. restricta* e de *M. pachydermatis*, num total de 76 amostras, frente a 16 antimicóticos: sulfato de selênio, piritionato de zinco, amorolfina, miconazol, ciclopiroxolamina, tioconazol, cetoconazol, clotrimazol, terbinafina, voriconazol, posaconazol, albaconazol, ravuconazol, itraconazol e fluconazol. O meio utilizado para a determinação da CIM foi o RPMI 1640 suplementado com bile de boi a 0,5%. As amostras foram

incubadas por 72 horas a 32°C e o inóculo testado foi $2-3 \times 10^4$ CFU/mL. Os valores mais elevados de CIM foram obtidos para *M. furfur*, indicando uma baixa susceptibilidade dessa espécie à maioria dos antifúngicos testados. Os triazóis ofereceram um bom padrão de atividade, *in vitro*, contra as diferentes espécies de *Malassezia* testadas, com exceção do fluconazol, que foi menos ativo para *M. furfur*, *M. globosa*, *M. slooffiae* e *M. restricta*. Além disso, os menores valores de CIM foram observados para *M. sympodialis* e *M. pachydermatis*. Os autores afirmam que, de acordo com os dados obtidos, o cetoconazol e itraconazol provaram ser os melhores antifúngicos testados no trabalho. Assim, demonstraram e confirmaram a importância clínica de ambos os azólicos no tratamento das Malassezioses.

Miranda e colaboradores (2007), ao determinarem a concentração inibitória mínima (CIM) de 95 isolados referentes às espécies *M. furfur*, *M. sympodialis*, *M. obtusa*, e *M. globosa*, verificaram a suscetibilidade dessas leveduras frente aos antimicóticos fluconazol, itraconazol, cetoconazol e voriconazol. As amostras tiveram menor susceptibilidade ao fluconazol (aproximadamente 10% das amostras testadas apresentaram CIM superior a 16 µg/mL). Ademais, observou-se uma variação entre os antifúngicos de valores <0,03 µg/mL até 4 µg/mL para o cetoconazol, < 0,03 µg/mL a >16 µg/mL para o voriconazol, < 0,125 a > 64 µg/mL para o fluconazol e < 0,03 µg/mL a 16 µg/mL para o itraconazol.

Não obstante, Nijima e colaboradores (2011) realizaram a determinação da CIM de amostra clínica de *M. pachydermatis* isolada de um cão com o quadro clínico de otite externa. Os resultados demonstraram que a amostra apresentava resistência frente ao itraconazol e ao cetoconazol. De acordo com os autores, esse foi o primeiro caso de resistência de *M. pachydermatis* na medicina veterinária, verificada por meio de testes *in vitro*. No sul do Brasil, Jesus e colaboradores, também em 2011, verificaram a resistência de *M. pachydermatis* para fluconazol, além de ser constatada uma resistência cruzada para outros azólicos, por meio de testes *in vitro*. A resistência de *M. pachydermatis* à caspofungina foi verificada pela primeira vez por Prado e colaboradores (2008), tendo observado a CIM e a concentração fungicida mínima (CFM) de 256 µg/mL. Outro estudo com 51 isolados de *M. pachydermatis* avaliou a susceptibilidade aos antifúngicos clotrimazol, miconazol e tiabendazol. Os resultados evidenciaram que todos os isolados foram inibidos pelos três azólicos. No entanto, as concentrações variaram de 2 a 8 µg/mL para o clotrimazol, 1 a 4 µg/mL para o miconazol e 16 a 32 µg/mL para o tiabendazol

(Peano et al., 2012). Esses dados reforçam a importância de conhecer os resultados de testes da susceptibilidade como guias terapêuticos na prescrição de antifúngicos.

2.3 INIBIÇÃO FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA E TERAPIA FOTODINÂMICA

A terapia fotodinâmica "*Photodynamic Therapy*" (PDT) pode ser definida como a administração de uma droga ou de um corante atóxico conhecido como fotoabsorvedor (FA), seguida da irradiação de luz sobre a lesão, podendo o fotoabsorvedor agir de modo sistêmico e/ou tópico, em lesões de etiologia diversa, infecciosas ou degenerativas. A fonte de luz pode ser visível (geralmente no comprimento de onda correspondente à luz vermelha) que, na presença de oxigênio, leva à geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) (*reactive oxygen species*). Como consequência é observada a morte celular e a destruição dos agentes etiológicos e/ou tecidos doentes (Allison et al., 2004; Gomez et al., 2011; Kharkwall et al., 2011).

A PDT tem sido usada tanto na medicina humana quanto na medicina veterinária (Selman et al., 1996; Jacobs e Rosen, 2000; Lee et al., 2010; Tsipursky et al., 2011; Kharkwall et al., 2011). A cronologia da terapia fotodinâmica na medicina ocidental moderna iniciou-se em 1903, quando Niels Finsen, descobriu que o tratamento com luz poderia controlar as manifestações cutâneas da tuberculose. Os seus trabalhos utilizando a luz como forma de tratamento, apesar de preliminares, lhe renderam o prêmio Nobel ainda em 1903, dada a importância do achado. Naquele mesmo ano, Hereon Henrian von Tappeiner descobriu que o oxigênio era de fundamental importância para desenvolver boas reações estimuladas pela luz. Assim, foi criado o termo terapia fotodinâmica com a concepção básica que é utilizada até os dias atuais (Emilio, 2008).

Na oncologia, os estudos com PDT são os mais desenvolvidos atualmente. De fato, já é uma forma de tratamento empregada há bastante tempo, pois os primeiros trabalhos descritos datam da década de 70 do século XX. A utilização da PDT na oncologia levantou a hipótese de que, da mesma forma, a luz poderia tratar com sucesso outras enfermidades, tais como raquitismo e hiperbilirrubinemia neonatal (Castano, 2004; Castano et al., 2006). Atualmente, para diferenciar o tratamento oncológico em que usa o termo *Photodynamic Therapy* (PDT) (Terapia

Fotodinâmica) do tratamento de doenças de origem infecciosa, passou a ser empregado o termo *antimicrobial photodynamic therapy* (aPDT) (Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana).

A aPDT tem sido utilizada como tratamento alternativo para as doenças associadas à *Malassezia* spp. Lee e colaboradores (2010) testaram a eficiência da forma comercial do metil aminolevulinato (MAL) em creme (Metivix®, Galderma, França), juntamente com o diodo emissor de luz, com comprimento de onda em 630 nm para o tratamento de foliculite pitirospórica. Os autores trataram seis pacientes, sendo três homens e três mulheres, com idades entre 23 e 47 anos. O estudo relata que quatro pacientes obtiveram uma melhora expressiva, em um paciente foi possível observar uma melhora moderada e para um paciente não foi observado nenhuma diferença, quando comparado antes e após o tratamento. Esses dados demonstram o potencial que a aPDT possui para o tratamento de infecções fúngicas. Entretanto, dados experimentais *in vitro* são necessários para o melhor norteamto do uso da aPDT em humanos e animais. Em estudos *in vitro*, essa técnica é denominada de aIFD (Inibição Fotodinâmica antimicrobiana - “*Antimicrobial Photodynamic Inhibition*”). O aperfeiçoamento da técnica poderá trazer como consequência a sua utilização de forma mais eficaz, segura e consciente para os pacientes.

2.3.1 Fotoabsorvedores

Os fotoabsorvedores são substâncias capazes de induzir a formação de oxigênio singleto e/ou de agentes reativos do oxigênio, após o estímulo com o comprimento de onda adequado oriundo de uma fonte de luz, eliminando a célula alvo (Allison et al., 2004; Dai et al., 2012).

Um bom fotoabsorvedor exibe as seguintes características (Allison et al., 2004):

- Toxicidade: deve ser empregado sem causar intoxicação e danos ao paciente. Também não deve gerar subprodutos tóxicos.

- Custo: um fotoabsorvedor caro pode inviabilizar o tratamento.
- Mutagenicidade / carcinogenicidade: o fotoabsorvedor não pode curar uma doença e induzir a outras.
- Meia-vida: deve-se saber muito bem a meia vida do fotoabsorvedor.
- Seletividade do alvo: deve-se ter um fotoabsorvedor que se acumule em maior volume e permaneça mais tempo apenas nos tecidos doentes.
- Fotossensibilidade: deve-se ter um fotoabsorvedor que reaja o mínimo possível em presença de luz solar, caso seja absorvido pela pele.
- Administração: facilidade de administrá-lo ao paciente pelas vias aéreas ou pele.

2.3.1.1 Azul de ortotoluidina

O Azul de ortotoluidina (AOT) é um composto químico derivado da fenotiazina. Possui pequenas moléculas e estrutura semelhante à clorofila e à hemoglobina. O AOT é um corante muito empregado em técnicas citológicas. É atóxico para seres humanos e animais de companhia, como cães e gatos. *In vitro* é capaz de inativar microrganismos. Possui uma alta excitação de suas moléculas quando exposto a luz vermelha que possui comprimento de onda de 633 nm podendo, assim, induzir a formação de oxigênio singleto e/ou de agentes reativos do oxigênio (Tremblay et al., 2002). De acordo com as características supracitadas, tem sido usado com fotoabsorvedor (Bevilacqua, 2006). A figura 8 mostra a estrutura molecular do AOT.

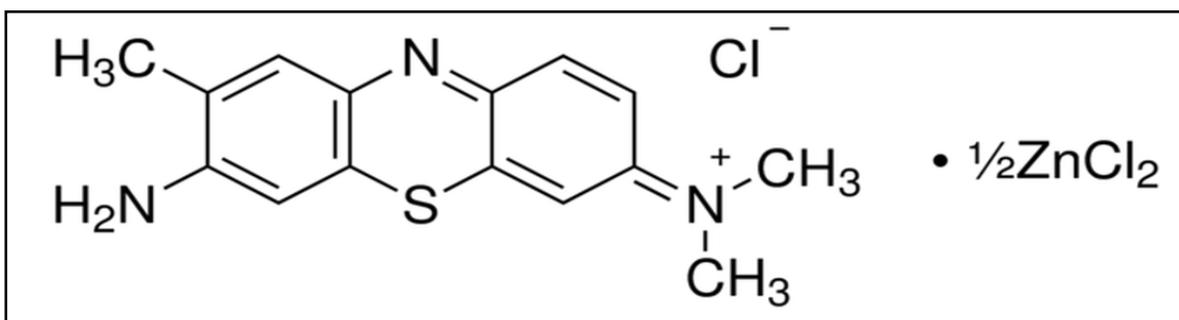


Figura 8: Estrutura molecular do azul de ortotoluidina.

2.3.1.2 Utilização de corantes naturais na medicina

A busca de novas substâncias naturais que possam ser utilizadas como drogas ou possam conduzir ao tratamento de doenças ganhou maior relevância a partir do final do século XX (Cowan et al., 1999). Para o Brasil, esse último fato é de enorme significação, uma vez que o país possui a maior biodiversidade de flora de todo o mundo. Dentre produtos naturais que vêm sendo mais utilizados, podem-se ressaltar aqueles derivados ou extraídos de frutos e sementes. As sementes são ricas em bons compostos fotoquímicos (Karbori e Jorge, 2005). A fitoterapia para o tratamento de doenças de pele tem sido usada por milhares de anos. Os remédios fitoterápicos, incluindo aqueles para doenças de pele, estão ganhando popularidade entre os pacientes (Shenefelt, 2011). Alguns corantes naturais tem se destacado como fotoabsorvedores. Entre eles, pode-se destacar a hipericina, que é um subproduto da erva de São João (*Hypericum perforatum*). A hipericina possui coloração avermelhada e sua estrutura molecular é formada por múltiplos anéis benzênicos (Agostinis et al., 2002). Tem sido aplicada como fotoabsorvedor para os mais diversos tipos de câncer (Olivio et al., 2006; Kacerovská et al., 2008; Barras et al., 2013). Para as doenças infecciosas, a hipericina, em estudos antigos também tem demonstrado ser um eficiente fotoabsorvedor contra vírus (Lenard et al., 1993). Mais recentemente, um trabalho acadêmico que determinou a resistência de amostras de *Candida albicans* frente a azólicos mostrou, também, que a hipericina, quando usada como fotoabsorvedor, foi muito eficiente na redução de colônias das amostras de *Candida albicans* (Paz-Cristobal et al., 2014). Dessa forma, podemos notar que alguns corantes naturais possuem um bom potencial para serem fotoabsorvedores.

2.3.2 Fontes de Irradiação

A fonte de irradiação mais usada inicialmente para a PDT foi o LASER, (*light amplification by stimulated emission of radiation*) amplificação de luz por emissão estimulada de irradiação. Atualmente, porém o LED (*light emitting diode*) diodo de

emissão de luz, apresenta vantagens que tornam o seu uso mais comum com a versatilidade e o menor custo de aquisição e manutenção (Zeitouni et al., 2001). O LASER e o LED emitem uma luz monocromática, sempre mantendo, assim, apenas um comprimento de onda. O LASER, todavia, tende a possuir feixe de luz mais paralelo e constante e o LED possui feixe de luz divergente perdendo potência de irradiação em distâncias maiores (Bagnato, 2001; Emilio 2008). Entretanto, as propriedades físicas da coerência da luz em relação ao LASER são irrelevantes quanto comparadas ao LED para a terapia fotodinâmica, já que há perda parcial da coerência logo que haja contato com a camada córnea. A luz vermelha é mais utilizada em PDT porque apresenta um comprimento de onda que melhor consegue penetrar nos tecidos. Ademais, os comprimentos de onda menores junto à escala do ultravioleta podem induzir a lesões teciduais indesejadas, o que seria uma desvantagem para o paciente. Desse modo, o uso de LED é uma boa opção para aplicação na PDT (Emilio, 2008).

2.3 Mecanismos Bioquímicos de Proteção Celular

Os fungos possuem uma gama de estratégias de defesa que empregam o sistema antioxidante contra os radicais livres gerados pelo hospedeiro e que, nesse caso, podem funcionar como mecanismo de escape e que são relatados a seguir em trabalhos científicos.

Baltazar e colaboradores (2012) avaliaram a atividade da inibição fotodinâmica antimicrobiana (aIFD) para *Trichophyton rubrum*, a produção de óxido nítrico durante o tratamento da aIFD e a susceptibilidade do fungo ao antifúngico tópico ciclopiroxolamina. Os resultados mostraram que as melhores condições da aIFD foram 48J/cm², usando o LED que emite comprimento de onda de 630 nm. A melhor concentração para o AOT foi 10mg/L. Essas condições inibiram até 98% do crescimento fúngico. A concentração inibitória mínima (CIM) de ciclopiroxolamina foi de 2 mg/L para 90% das amostras. Os autores demonstraram que aIFD induziu a produção de óxido nítrico, O₂⁻ e ONOO na célula fúngica, ROS *reactive oxygen species* (espécies reativas do oxigênio) que foram cruciais para induzir a morte de *T. rubrum*.

É interessante mencionar que os mecanismos antioxidantes de defesa celular

foram também estudados por Ferreira e colaboradores (2013), os quais testaram diferentes parâmetros para avaliar o efeito do estresse oxidativo causado pela anfotericina B e azólicos no fungo *Cryptococcus gattii*. Foi mensurada a peroxidação lipídica, o teor de ergosterol e a produção de ROS. Os dados demonstram que o itraconazol levou à formação de ROS e à peroxidação de lipídios em células de *C. gattii* nas fases iniciais do tratamento, o que não aconteceu com o fluconazol. Tal fenômeno aumentou as atividades das enzimas do sistema antioxidante (catalase, peroxidase e superóxido dismutase) e foram confirmados por observação de sinergismo entre o inibidor da catalase e o itraconazol. A Anfotericina B causou a peroxidação lipídica em células de *C. gattii* por meio de uma produção ainda maior de radicais oxidativos e nitrosativos e aumento da atividade da peroxidase. Esses dados foram confirmados pelo sinergismo entre os inibidores da superóxido dismutase, catalase e anfotericina B. Além disso, o efeito desse antifúngico foi antagonizado pelo eliminador de peroxinitrito. Esses dados demonstram que a produção de radicais oxidativos e nitrosativos pelo fungo desempenham um importante papel na capacidade de resistência por *C. gattii* frente ao itraconazol e anfotericina B.

2.5 A Experiência do Grupo de Pesquisa em Inibição Fotodinâmica Antimicrobiana

Nosso grupo tem obtido resultados significativos na aplicação da inibição fotodinâmica antimicrobiana aIFD, *in vitro*, em fungos patogênicos. Soares e colaboradores publicaram recentemente artigos que abordam a utilização da aIFD para o controle do crescimento de leveduras do gênero *Candida* e da espécie *Cryptococcus gattii*. No primeiro artigo, Soares e colaboradores (2009) demonstraram, por meio da aIFD, empregando como fotoabsorvedor o azul de ortotoluidina (AOT), que foi possível promover a inibição do crescimento *in vitro* e a adesão de *Candida* spp a células do epitélio bucal. Em 2011, empregando mais uma vez o AOT em aIFD, os mesmos autores demonstraram a eficácia da técnica no controle de *C. gattii*, *in vitro*. Um dos destaques relativos à eficácia do tratamento com aIFD foi observado quando um isolado de *C. gattii* que apresentou alto valor de CIM para o itraconazol ($\geq 2 \mu\text{g/mL}$) e para fluconazol ($\geq 64 \mu\text{g/mL}$), sugestivo de resistência, foi eliminado nas condições padrão estabelecidas experimentalmente

para aIFD. É importante, ainda, mencionar que o fluconazol falhou ao ser empregado no tratamento do caso clínico a partir do qual foi isolada a referida amostra. Um ponto também importante, no artigo, foi a observação de que a suscetibilidade de diferentes isolados de *C. gattii* mostrou-se variável ao tratamento com aIFD. Paralelamente, pode-se observar que o processo de aIFD dos fungos com LED e AOT desencadeou a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Foi notado que havia uma diferença de produção de ROS entre as amostras de *C. gattii*, sendo os níveis mais elevados nas amostras 23/10993, seguidos de 99/6934 e da ATCC 24065 (Soares et al.,2011).

Baltazar (2013) testou a capacidade da inibição fotodinâmica antimicrobiana para *Trichophyton rubrum*. No referido trabalho, a autora utilizou o azul de ortotoluidina em combinação com o LED vermelho que possui comprimento de onda 630 nm, frente a 12 amostras de *Trichophyton rubrum*. Os resultados obtidos foram de até 98% de inibição dependendo da amostra de *T. rubrum* e das condições experimentais. Além disso, após comparar a eficiência em induzir a morte celular pela aIFD em relação ao antifúngico ciclopiroxilamina, verificou-se que a técnica que utiliza o corante e LED foi mais eficiente.

Portanto, nesses trabalhos, consideramos reforçadas as evidências de que a técnica de aIFD poderia ser empregada como tratamento alternativo para o controle de doenças infecciosas associadas a fungos.

3. JUSTIFICATIVA

O aumento das doenças fúngicas tem sido relatado, nos dias atuais, por diversas causas, entre elas o aumento da resistência dos fungos aos agentes antifúngicos disponíveis comercialmente, o que também inclui as leveduras do gênero *Malassezia*. Anteriormente, *M. furfur* era a espécie associada à maioria dos casos de malasseziose. Atualmente, diferentes espécies dessa levedura têm sido isoladas dos pacientes acometidos. Os métodos de identificação de espécies baseados em microscopia, cultura e testes bioquímicos são laboriosos, dispendiosos e, portanto, inviáveis à rotina laboratorial. Assim, os testes moleculares têm representado grande importância, uma vez que são rápidos e de alta precisão, tornando a identificação de amostras isoladas mais confiável.

Dados relativos aos perfis de suscetibilidade de espécies do gênero *Malassezia* aos antifúngicos são escassos. Contudo, já há relatos consistentes da ocorrência de amostras clínicas resistentes. O tratamento convencional para as enfermidades associadas à *Malassezia* spp, em alguns casos, não tem apresentado efetividade, podendo a doença ser dificilmente controlada e sequelas estéticas podem permanecer nos pacientes acometidos. O problema se agrava ainda mais em pacientes imunocomprometidos, nos quais as manifestações clínicas são mais graves e a disseminação sistêmica pode ocorrer. As recidivas de doenças relacionadas a *Malassezia*, como a dermatite seborréica e a pitíriase versicolor são comuns e comprometem a qualidade de vida e o bem estar das pessoas afetadas. Ainda nesse contexto, é importante mencionar que, só nos Estados Unidos da América (EUA), os custos diretos e indiretos, apenas para o tratamento da dermatite seborréica, ultrapassaram a cifra de 1,4 bilhões de dólares, em 2004 (Bickers et al., 2006).

Devido à dificuldade e altos custos apresentados com o tratamento antifúngico convencional e os crescentes relatos de resistência antifúngica, terapias alternativas têm sido requeridas, como terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT), a qual foi revista no presente trabalho. A aPDT tem sido relatada, como um tratamento muito eficaz e promissor. De fato, a variação dessa técnica já é extensivamente utilizada para o tratamento de neoplasias da pele em humanos e animais de companhia. No entanto, as aplicações da inibição fotodinâmica para o tratamento de doenças infecciosas, sobretudo as relacionadas às leveduras do

gênero *Malassezia*, são muito pouco estudadas e, portanto, pouco descritas na literatura.

Portanto, tornam-se importantes trabalhos científicos, cujos objetivos atendam a viabilização dos métodos diagnósticos pela identificação molecular das amostras isoladas de pacientes acometidos por malassezioses, bem como a monitorização da susceptibilidade das leveduras por meio de abordagens experimentais para a determinação de concentrações inibitórias mínimas de antimicrobianos. Estudos para tratamento alternativo das patologias relacionadas às *Malassezia* spp. têm sido igualmente requeridos, sendo que a padronização das condições, *in vitro*, para a realização da inibição fotodinâmica antimicrobiana (aIFD), pode contribuir para o estabelecimento de parâmetros básicos para o desenvolvimento de protocolos experimentais.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Identificar por métodos moleculares e avaliar a susceptibilidade de amostras do gênero *Malassezia* a antifúngicos de uso clínico e à inibição fotodinâmica antimicrobiana (aIFD).

4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Identificar, até o nível de espécie, amostras de leveduras isoladas de casos clínicos de seres humanos e de animais com características morfofisiológicas compatíveis com o gênero *Malassezia*;

- Determinar a CIM dos antimicrobianos frente a isolados clínicos do gênero *Malassezia*, utilizando a técnica de microdiluição.

- Padronizar as condições para a realização de aIFD por meio de experimentos piloto com amostras da espécie *Malassezia furfur*.

- Verificar a eficiência da aIFD na redução de colônias de *Malassezia* spp empregando os fotoabsorvedores azul de ortotoluidina e substância C, este derivado de um corante natural.

- Investigar a participação das enzimas Lacase e Superóxido dismutase (SOD) na neutralização de ROS e avaliar a integridade das membranas de amostras de *Malassezia* após serem submetidas a aIFD com base na mensuração da produção do ergosterol.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 ORIGENS DOS ISOLADOS DE *Malassezia* spp.

No presente trabalho, foram utilizados 51 isolados clínicos de *Malassezia* spp. As amostras 4813, 4850, 5389, 5982 foram doadas pela Coleção de Culturas Micoteca URM do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco. As amostras nomeadas de SP4, SP5, SP6, SP7, SP8 e SP9 foram gentilmente doadas pelo Prof. Dr. Carlos P. Taborda, da Universidade de São Paulo. As amostras intituladas BH1, BH2, BH3 e BH4 foram isoladas a partir de amostras coletadas do canal auditivo de cães, pelo médico veterinário Marcelo Amarante Guimarães (CRMV-MG 8188), em clínicas veterinárias de Belo Horizonte-MG. O restante dos isolados clínicos foi gentilmente cedido pelo Laboratório de Biotecnologia e Ecologia de Leveduras do departamento de microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. As amostras clínicas humanas do presente trabalho foram aprovadas para o uso pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da UFMG (protocolo CAAE - 0648.0.203.000-11) (Anexo1). A tabela 3 relaciona as amostras utilizadas, identificadas por número e nome, a cidade e o estado brasileiro de onde foram isoladas as leveduras e o local das lesões, quando presentes.

Tabela 3 – Origem das amostras de *Malassezia* spp. : isoladas de pacientes humanos e/ou de cães, cidade e estado, local das lesões e Situação Clínica.

Nº	Nome da amostra	Cidade/Estado	Local da Lesão	Situação Clínica
1	MIE	Belo Horizonte-	Antebraço	Pitíriase versicolor
2	A31A	Belo Horizonte-	Disseminado	Pitíriase versicolor
3	MZ4	Belo Horizonte-	Dorso	Pitíriase versicolor
4	A8	Belo Horizonte-	Barriga-Dorso	Pitíriase versicolor
5	SC1	Belo Horizonte-	Região Dorsal	Pitíriase versicolor
6	5464A1	Belo Horizonte-	Nuca	Pitíriase versicolor
7	A13	Belo Horizonte-	Nuca	Dermatite Seborreica
8	SC3	Belo Horizonte-	Dorso	Pitíriase versicolor
9	MZ2	Belo Horizonte-	Disseminado	Pitíriase versicolor
10	A16	Belo Horizonte-	Nuca	Dermatite Seborreica
11	A38A	Belo Horizonte-	Dorso-Nuca	Pitíriase versicolor
12	A39B	Belo Horizonte-	Disseminado	Pitíriase versicolor
13	A38C1	Belo Horizonte-	Axila	Pitíriase versicolor
14	BH1	Belo Horizonte-	Canal auditivo de cão	Otite
15	BH2	Belo Horizonte-	Canal auditivo de cão	Otite
16	BH3	Belo Horizonte-	Canal auditivo de cão	Otite
17	BH4	Belo Horizonte-	Canal auditivo de cão	Otite
18	A18A	Belo Horizonte-	Canal auditivo de ser humano	Pele saudável
19	SC4	Belo Horizonte-	Dorso	Pitíriase versicolor
20	SC1A	Belo Horizonte-	Região Dorsal	Pitíriase versicolor
21	A16A	Belo Horizonte-	Couro cabeludo	Dermatite Seborreica
22	A16.1	Belo Horizonte-	Nuca	Dermatite Seborreica
23	MID	Belo Horizonte-	Antebraço	Pitíriase versicolor
24	A53A	Belo Horizonte-	Disseminado	Pitíriase versicolor
25	A46	Belo Horizonte-	Antebraço	Pitíriase versicolor
26	A28A	São Paulo-SP	Barriga-Dorso	Pitíriase versicolor
27	A28.2	São Paulo- SP	Barriga-Dorso	Pitíriase versicolor
28	A69 A 2.1	Palmas-TO	Braço	Dermatite Seborreica
29	T1	Palmas-TO	Face	Pitíriase versicolor
30	T4	Palmas-TO	Braço	Dermatite Seborreica
31	T5	Palmas-TO	Dorso	Pitíriase versicolor
32	T7	Palmas-TO	Tórax	Pitíriase versicolor
33	T8b	Palmas-TO	Couro cabeludo	Dermatite Seborreica
34	T19	Palmas-TO	Braço	Pitíriase versicolor
35	4813	Recife-PE	Pele	Não relatado
36	4850	Recife-PE	Pele	Não relatado
37	5389	Recife-PE	Pele	Não relatado
38	5982	Recife-PE	Pele	Não relatado
39	SP4	São Paulo-SP	Canal auditivo de cão	Otite
40	SP5	São Paulo-SP	Canal auditivo de cão	Otite
41	SP6	São Paulo-SP	Canal auditivo de cão	Otite
42	SP7	São Paulo-SP	Canal auditivo de cão	Otite
43	SP8	São Paulo-SP	Canal auditivo de cão	Otite
44	SP9	São Paulo-SP	Canal auditivo de cão	Otite
45	A57	São Paulo-SP	Tórax	Pitíriase versicolor
46	A78A	São Paulo-SP	Região Dorsal	Pitíriase versicolor
47	A87	São Paulo-SP	Barriga-Dorso	Pitíriase versicolor
48	A88	São Paulo-SP	Tórax	Pitíriase versicolor
49	A89b	São Paulo-SP	Tórax	Pitíriase versicolor
50	97	São Paulo-SP	Disseminado	Pitíriase versicolor
51	98A	São Paulo-SP	Disseminado	Dermatite Seborreica

5.2 MANUTENÇÃO DOS ISOLADOS DE *Malassezia* spp.

Os isolados das diferentes espécies de *Malassezia* foram cultivados em meio ágar Dixon modificado, cujos componentes são 3,6% extrato de malte; 0,6% peptona; 2% bile de boi; 1,8% Agar agar; 1% tween 40; 0,5% glicerol mono-oleato; 0,5g/L cloranfenicol e 0,5g/L cicloheximida. As amostras foram incubadas em estufa BOD a aproximadamente 30°C por 72 horas para posterior repique de acordo com Schlottfeldt e colaboradores (2002).

Os isolados de *Malassezia* spp. foram conservados por meio de duas metodologias. Primeiramente as amostras foram transferidas para placas de Petri estéreis de 60x 15 mm contendo Agar Dixon modificado, e incubadas em estufa BOD a 30°C. Após 72 horas, as placas contendo as colônias obtidas foram acondicionadas em geladeira (Eletrolux™, Br) a 8° C, para posterior repique a cada 30 dias. As mesmas leveduras também foram cultivadas em caldo Dixon. Após 120 horas de cultivo em estufa a 30°C, os isolados de *Malassezia* spp. obtidos foram transferidas para tubos criogênicos e adicionados de glicerol estéril para 15% final. As amostras foram congeladas por 2 horas em freezer (Eletrolux™, Br) - 20° C e, posteriormente, foram estocadas em freezer (Termo Scientific™, EUA) - 80° C. Após 24 horas de congelamento -80° C uma alíquota foi descongelada para verificar a viabilidade das amostras

5.3 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS AMOSTRAS DE LEVEDURAS

5.3.1 Extração do DNA Total

Os isolados foram incubados em estufa BOD (Fanem™, Br) a 30°C. O ágar Dixon modificado (formulação item 5.2) foi usado como meio nutriente e o tempo de incubação foi de 72 h. Após o crescimento, as colônias foram transferidas para tubos tipo Eppendorf de 1,5mL, ressuspensão-se em 500 µL de tampão de lise contendo: 25mL de solução de Tris 1M + HCl; 5 mL de EDTA 0,5M; 10 ml NaCl 5M; 50 mL SDS 10%; 410 mL de água destilada estéril. A mistura foi levada ao agitador orbital (Biosan™, EUA) a 250 rpm por 30 minutos e, em seguida para, ao banho seco (AccuBlock™, EUA), em que as amostras foram incubadas a 65° C por 60 minutos. Posteriormente, foram adicionados 500 µL de fenol: clorofórmio: álcool

isoamílico (25:24:1) e, em seguida, fez-se uma centrifugação em microcentrifuga (Hero Lab™, EUA) a 9169 g por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido com auxílio de pipeta para outro tubo Eppendorff e, posteriormente, adicionaram-se 65 µL de acetato de sódio 3M e 75 µL de NaCl 1M. As soluções foram homogeneizadas por inversão e incubadas em gelo por 30 minutos. Foi feita uma nova centrifugação (Jouan™, Br) a 9169 g, por 10 minutos a 4°C. Foram retirados 500 µL do sobrenadante, transferindo-se novamente para outro tubo tipo Eppendorff e adicionaram-se 250 µL de álcool isopropílico para a precipitação do DNA. A solução foi homogeneizada por inversão e centrifugada a 11180 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e adicionaram-se 500 µL de etanol 70%, gelado. O tubo foi centrifugado novamente a 5031 g por 5 minutos, descartando-se o sobrenadante. O processo anterior foi repetido mais uma vez. Os tubos contendo o DNA foram deixados à temperatura ambiente durante a noite, para evaporação de todo o excesso de etanol e demais resíduos voláteis. A reidratação foi feita com a adição de 20 µL de tampão TE (2 ml Tris 1M + HCl ; 0,4 mL EDTA 0,5M; 197,6 mL de água destilada estéril). A solução foi homogeneizada em agitador do tipo vortex por 15s e incubada em banho-maria a 37° C por 45 min. Por fim, foi realizado a leitura em espectrofotômetro (Nanodrop™, EUA) para aferir a concentração e verificar a qualidade do DNA.

5.3.2 Agrupamento das Amostras por Meio de Perfis Eletroforéticos Obtidos por PCR *Fingerprinting*

Os agrupamentos das amostras isoladas por meio de similaridade foram feitos usando a técnica do PCR *fringerprinting* (Yarrow, 1998). Para tanto, é utilizado um iniciador de microssatélites (GTG)₅ (Lieckfeldt et al., 1993). As reações foram feitas de acordo com protocolo já padronizado do Laboratório de Biotecnologia e Ecologia de Leveduras. A mistura para a reação apresenta um volume final de 25 µL. A descrição específica de cada reagente e dos seus respectivos volumes e concentrações estão expostas a seguir: tampão (2,5 µL) 10X, MgCl₂ (1,5 µL) a 1,5 M, dNTP`s (FERMENTAS™, CAN) (2,0 µL) a 0,05mM, iniciador (GTG)₅ com volume de (2,0 µL) a 10 pmol/ µL, enzima Taq DNA polimerase (MBI FERMENTAS™, CAN) (0,2 µL) a 1,25 U/ µL, dimetil sulfóxido DMSO (0,5 µL) (SIGMA™, USA), betaína (1,0

μL) (SIGMA™, USA), H₂O ultrapura (13,3 μL) e DNA total (2 μL) a 70 ng/ μL . As reações foram realizadas usando-se um termociclador (EPPENDORF Mastercycler™). O programa de ciclagem consistiu em uma desnaturação inicial a 94° C por 2 minutos, seguida por 40 ciclos de 45 s de desnaturação a 93° C, 1 minuto de anelamento do iniciador a 50° C, 1 minuto de extensão a 72 ° C e, finalmente, uma extensão por 6 minutos a 72 ° C.

Os amplicons obtidos por meio da PCR foram visualizados e analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE 0,5X (54g de tris base, 27,5g de ácido bórico, 20 mL de EDTA 0,5M, pH 8,0), durante aproximadamente 120 minutos a 70V. Os géis obtidos foram corados com GelRed™ (BIOTIUM, USA), visualizados sob luz ultravioleta e documentados fotograficamente usando-se um sistema de fotodocumentação (Vilber Loumart™, FR). As amostras com perfis de bandas semelhantes foram agrupadas segundo perfis característicos.

5.3.3 Amplificação por PCR Específica Usando-se os Iniciadores NL1 e NL4

A reação de PCR para a amplificação da região D1/D2 da subunidade maior do gene rRNA permite a obtenção de um segmento útil para o sequenciamento visando a identificação molecular. Para tanto, foram utilizados os iniciadores NL-1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') e NL-4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') (Lachance et al.,1999). A mistura para a reação de PCR possui um volume final de 50 μL . A descrição específica de cada reagente e dos seus respectivos volumes e concentrações estão expostos a seguir: tampão (5,0 μL) 10X, MgCl₂ (2 μL) a 1,5 M, dNTP`s (FERMENTAS™, CAN) (2,0 μL) a 10 mM, 1 μL dos iniciadores NL1 e NL 4 a 10 pmol/ μL , enzima Taq DNA polimerase (FERMENTAS™, CAN) (0,2 μL) a 1,25 U/ μL , dimetil sulfóxido DMSO (1,0 μL) (SIGMA™, USA), betaína (2,0 μL), H₂O ultrapura (34,8 μL) e DNA total (2 μL) a 70 ng/ μL . As reações de PCR foram realizadas utilizando-se o termociclador PCR (EPPENDORF™, USA). O programa de ciclagem consistiu em uma desnaturação inicial a 95°C por 5 min, seguida por 35 ciclos de 15s de desnaturação a 94°C, 25s de anelamento do iniciador a 54°C, 20s de extensão a 68°C e uma extensão final por 10 min a 68°C.

Os produtos de PCR (~ 600 pb) foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE 0,5X (54 g de Tris-HCl, 27,5 g de ácido bórico, 20 mL

de EDTA 0,5M, pH 8,0) com o uso de GelRed™ (BIOTIUM™, USA), durante aproximadamente 45 minutos a 90V. O gel foi visualizado sob luz ultravioleta e fotografado pelo sistema de fotodocumentação de gel (Vilber Lourmat™, Fr).

5.3.4 Purificação dos Produtos de PCR

Para a purificação dos produtos de PCR, adicionou-se igual volume de Polietilenoglicol 20% em NaCl 2,5 M ao tubo de reação. Após uma incubação a 37°C por 15 minutos, foi feita a centrifugação em microcentrífuga (Herolab™, EUA) a 11180g por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado com auxílio de pipeta. A seguir, foram adicionados 125 µL de etanol 70-80% gelado, e foi realizada uma nova centrifugação a 11180g por 2 minutos. O etanol foi removido também com ajuda de microcentrífuga e pipeta. Uma nova centrifugação a 11180g por 10 minutos foi realizada. Após esse procedimento o DNA foi deixado à temperatura ambiente para evaporação de todo o excesso de etanol. A reidratação foi realizada com a adição de 10 µL de água ultrapura, homogeneização em agitador do tipo vortex por 15 segundos e incubação a 37°C por 10 minutos.

5.3.5 Sequenciamento

As reações de sequenciamento foram realizadas seguindo o seguinte protocolo: 1 µL dos iniciadores NL 1 ou NL 4 a 10 pmol/ µL, DNA 50 a 200 ng/ µL, H₂O ultra pura q.s.p num volume final de 7,5 µL. As amostras foram sequenciadas por eletroforese capilar em aparelho ABI3130, utilizando-se polímero POP7 e BigDye v3.1. Os procedimentos foram realizados no Laboratório de Genética da Escola de Veterinária da UFMG, em parceria com a empresa MYLEUS.

5.3.6 Análise dos Resultados do Sequenciamento

Os arquivos obtidos do sequenciamento pelo Laboratório de Genética da Escola de Veterinária da UFMG foram traduzidos pelo programa DNA BASER

v3.5.3. As sequências de DNA foram analisadas utilizando o programa BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool* - versão 2.215 do BLAST 2.0), disponível no portal NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) desenvolvido pelo *National Center For Biotechnology Information* (NCBI) (ALTSCHUL et al., 1997). As sequências obtidas foram comparadas com as sequências já armazenadas no banco de dados do GenBank e as sequências similares foram alinhadas usando o programa.

O critério para identificação prevê que o isolado deverá apresentar similaridade de 97% ou mais na sequência analisada em relação a uma outra já identificada e depositada no GenBank para a confirmação da espécie. Com base na literatura foi aceito até sete mutações em relação a sequência da espécie já depositada no *GenBank*. Foi também descontado da relação de similaridade o número de *Gaps* obtidos durante o alinhamento das duas sequências (Kurtzman et al., 2011).

5.4 ENSAIOS DE DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE ANTIFÚNGICOS

5.4.1 Preparo do Inóculo das Amostras para Realizar a Determinação de Concentração Inibitória Mínima

Os isolados de *Malassezia* spp. foram incubados em estufa BOD a 30° C. O repique foi feito obedecendo-se a um intervalo de 72 horas. As amostras que estavam congeladas ou conservadas em geladeira foram repicadas 3 vezes, obedecendo aos critérios acima descritos. Dessa forma, foram experimentadas para os testes de CIM e para aIFD. Para a contagem das células, foi preparada uma suspensão das leveduras em água destilada estéril (0,04% tween 80). A suspensão foi ajustada em câmara de Neubauer de modo a obter 1×10^6 UFC/mL. Posteriormente, foram lidas em espectrofotômetro, segundo as condições abaixo: - *M. globosa* foi mensurada em comprimento de onda de 660nm e a absorbância (ABS) obtida foi de 1. As demais espécies foram quantificadas em comprimento de onda de 530nm e a ABS, entre 0,425 a 0,435 (Rincon et al., 2006). As 51 amostras aqui testadas estão expostas na tabela 4 e sua origem está descrita no item 5.1

5.4.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima de Antifúngicos

Para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para os isolados de *Malassezia* spp. utilizou-se o meio ureia de Christensen (Difco™, EUA) suplementado com 0,1% Tween 80 e 0,5% Tween 40 (Sigma™, EUA), pH 5,2 (Rincon *et al.*, 2006).

Os antifúngicos testados no presente trabalho foram a caspofungina (CANCIDAS™ Merck Sharp & Dohme Farmacêutica, Br) cetoconazol (Sigma-Aldrich, EUA) clotrimazol (Bayer, Ger), itraconazol (Sigma-Aldrich, EUA) isoconazol (Cristália, Br) e miconazol (Cristália, Br). Todos os antifúngicos citados acima foram gentilmente doados pelo Prof. Dr. Daniel de Assis Santos, do laboratório de Micologia do departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Todas as drogas estavam em sua forma pura liofilizada e foram mantidas a -20° C em frasco protegido da luz.

O preparo dos antifúngicos foi feito pesando-se 5 mg do fármaco em balança de precisão e posteriormente dissolvendo-o em 5 mL dimetilsulfóxido (DMSO) para todas as drogas, exceto a caspofungina, que foi diluída em água ultra pura. Desse modo, foi obtida uma solução estoque 1mg/mL para todas as drogas. Posteriormente foi feito um cálculo, de modo a se obter o dobro da maior concentração da faixa intervalar a ser testada. Diluições seriadas foram realizadas em tubos de centrífuga novos e estéreis para se obter as outras concentrações menores (Tabela 4 e Tabela 5). O experimento foi estabelecido em microplacas de acrílico de fundo chato contendo 96 poços. Em cada poço foi colocado em linha, de modo decrescente 100 µL da concentração da droga a ser testada e 100 µL do inóculo, totalizando um volume de 200 µL.

O ponto final de leitura usado no presente trabalho, foi a concentração da droga que apresentou 90% de inibição do crescimento das amostras de leveduras (Rincon *et al.*, 2006). Esse critério teve como referências aquele empregado para outras leveduras de importância clínica, consultado o CLSI, publicações científicas para *Malassezia* spp. e de outras leveduras como as do complexo *Candida* e *Trichophyton rubrum*, entre outras (CLSI M27A3; Santos *et al.*, 2006).

Os antifúngicos caspofungina, cetoconazol, itraconazol, isoconazol e miconazol foram usados nas concentrações: 16 µg/mL, 8 µg/mL, 4 µg/mL, 2 µg/mL, 1 µg/mL, 0,5 µg/mL, 0,25 µg/mL, 0,125 µg/mL, 0,062 µg/mL e 0,031 µg/mL.

Adicionalmente, foram acrescentados na coluna lateral 1 entre as linhas A a D da microplaca o controle negativo de esterilidade, contendo somente meio ureia de Christensen devidamente suplementado (glicerol 1% e Tween 80 0,5%) e esterilizado (Rincon et al., 2006). A coluna 1, entre as linhas E a H, foi usada como controle negativo da citotoxicidade (CC) do DMSO, contendo meio acrescido de DMSO a uma concentração de 1% e inóculo. Por fim, para o controle positivo (CP) foi usada toda a coluna 12, que abrange o crescimento das leveduras. Essa coluna continha meio ureia de Christensen devidamente suplementado e o inóculo. A tabela 4, exposta abaixo, exemplifica a posição dos controles e das concentrações dos antifúngicos caspofungina, cetoconazol, itraconazol, isoconazol e miconazol na placa de 96 poços.

Tabela 4: Representação das posições dos controles e das concentrações ($\mu\text{g/mL}$) dos antifúngicos caspofungina, cetoconazol, itraconazol, isoconazol e miconazol para a determinação da CIM

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Amostras
A	CM	0,03	0,062	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	CP	MZ 1
B	CM	0,03	0,062	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	CP	MZ 2
C	CM	0,03	0,062	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	CP	MZ 4
D	CM	0,03	0,062	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	CP	4813
E	CC	0,03	0,062	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	CP	5389
F	CC	0,03	0,062	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	CP	5464 A1
G	CC	0,03	0,062	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	CP	4850
H	CC	0,03	0,062	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	CP	5982

CM- Controle de esterilidade do meio; CC- controle de citotoxicidade; CP- Controle do crescimento

Para o clotrimazol, foram usadas as concentrações: 64 $\mu\text{g/mL}$; 32 $\mu\text{g/mL}$; 16 $\mu\text{g/mL}$; 8 $\mu\text{g/mL}$; 4 $\mu\text{g/mL}$; 2 $\mu\text{g/mL}$; 1 $\mu\text{g/mL}$; 0,5 $\mu\text{g/mL}$; 0,25 $\mu\text{g/mL}$; 0,125 $\mu\text{g/mL}$ e 0,062 $\mu\text{g/mL}$. Para o clotrimazol foi feito somente o controle positivo, (CP) uma vez que apresentava uma diluição a mais que as demais drogas. Foi feito o controle positivo na coluna 12 com a mesma finalidade dos outros antifúngicos. A tabela 5, exposta abaixo, exemplifica a posição do controle positivo e das concentrações usadas para o CIM com o clotrimazol na placa de 96 poços.

Tabela 5: Representação das posições dos controles e das concentrações ($\mu\text{g/mL}$) para a determinação da CIM para o clotrimazol.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Amostras
A	0,062	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	CP	MZ 1
B	0,062	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	CP	MZ 2
C	0,062	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	CP	MZ 4
D	0,062	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	CP	4813
E	0,062	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	CP	5389
F	0,062	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	CP	5464 A1
G	0,062	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	CP	4850
H	0,062	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	CP	5982

CP- Controle de crescimento

A leitura da CIM foi feita após 72 horas de incubação em estufa BOD a 30°C. A leitura dos resultados foi obtida de forma visual pela análise das placas, registrando-se como concentração inibitória mínima a diluição em que foi observada a inibição de 90% do crescimento da amostra (Rincon et al., 2006). Cada ensaio foi realizado por, no mínimo, 3 vezes, e em duplicata.

5.5 AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE DE *Malassezia* spp. À INIBIÇÃO FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA (AIFD)

5.5.1 Isolados de *Malassezia* spp. Usados para a Inibição Fotodinâmica

Durante todo o processo de otimização do protocolo experimental para aIFD, foi empregada a amostra pertencente à espécie *M. furfur* nomeada MIE. Uma vez que foram determinadas as condições experimentais capazes de causar a maior redução fúngica, tais condições foram testadas em 46 amostras da levedura.

5.5.2 Preparo e Padronização do Inóculo para Inibição Fotodinâmica Antimicrobiana

Para a contagem e ajuste do inóculo, bem como a manutenção e condições de incubação das amostras de *Malassezia* spp. durante toda a experimentação, para o aIFD, obedeceu-se à mesma metodologia já descrita no item 5.4.1.

5.5.3 Fontes de Luz

As fontes de luz utilizadas, no presente trabalho, foram os Diodos de Emissão de luz (LEDs) emitindo nos comprimentos de onda de 430 nm (luz azul) e 630 nm (luz vermelha). Os tempos de exposição ao LED utilizados neste trabalho foram empregados a partir de resultados obtidos pelo nosso grupo (SOARES, 2008; SOARES et al., 2011) e com conhecimento adquirido na literatura corrente (EMILIO, 2008). As características dos LED aqui utilizadas estão expostas na Tabela 6.

Tabela 6: Características físico-químicas dos Diodos de Emissão de luz (LED).

Nome da Luz	Fonte de Luz	Comprimento de Onda	Potência	Intensidade	Área do feixe	Meio
Diodo de Emissão de luz LED	Monocromática Vermelha	630 nm	100 mW	100 mW/cm ²	1,0 cm ²	-Índio -Gálio, -Alumínio - Fósforo (InGaAlP)
Diodo de Emissão de luz LED	Monocromática Azul	430 nm	100 mW	100 mW/cm ²	1,5 cm ²	-Índio -Gálio, -Alumínio - Fósforo (InGaAlP)

Fonte:(Soares *et al.*, 2011)

5.5.4 Otimização dos Fotoabsorvedores (FAs)

5.5.4.1 Azul de ortotoluidina

Na primeira etapa de padronização referente à concentração dos fotoabsorvedores (FAs) procedeu-se de acordo com o trabalho de Soares (2008).

O azul de ortotoluidina (AOT) (SIGMA™, EUA) foi testado inicialmente diluído em água ultra pura nas condições: - Para os grupos controle e teste que apresentaram o AOT, foi respeitado um tempo de incubação do inóculo com o fotoabsorvedor de 5 minutos, para associação do corante à superfície da levedura. Foram testadas quatro diluições, sendo: 25, 50, 100 e 150 micromolar (μM); a dose de irradiação testada inicialmente foi de 60 J/cm^2 . O inóculo testado estava em uma concentração aproximada de 1×10^6 células/mL e foi colocado em placas pretas (Optiplat™, EUA) de 96 poços. A cor escura da placa tem como objetivo evitar a perda de energia. A tabela 7 mostra o detalhes sobre a otimização inicial.

Tabela 7: Condições experimentais para os testes de otimização da aIFD.

Grupos controles	- Inóculo sem tratamento (controle positivo de crescimento do micro-organismo). - AOT nas concentrações de 25, 50, 100 e 150 (μM). - Irradiação LED por 10 minutos (60 J/cm^2).
Grupo teste	AOT (SIGMA™, USA) nas concentrações de 25, 50, 100 e 150 (μM) irradiado por 10 minutos (60 J/cm^2) com luz emitida pelo LED (aIFD).

No entanto, devido à dificuldade de associação do FA em solução aquosa à superfície da celular, foi necessário testar diferentes veículos para o AOT (SIGMA™, USA). Foram testados os seguintes veículos, utilizando o protocolo acima descrito: 1% de tween 40 (SIGMA™, USA), 0,1% de tween 80 (SIGMA™, USA), 0,5% de glicerol (SIGMA™, USA), e suas combinações, de acordo com a tabela 8. O tempo de incubação do FA com a amostra foi de 5 minutos e a dose energia usada foi de 60 J/cm^2 .

Tabela 8: Veículos testados em associação com o azul de ortotoluidina (AOT).

SOLUÇÃO 1	25µM de AOT + H ₂ O qsp ultra pura
SOLUÇÃO 2	25µM de AOT + 1% de tween 40 (SIGMA™, USA) + 0,1% de tween 80 (SIGMA®) + H ₂ O q.s.p ultra pura
SOLUÇÃO 3	25µM de AOT + 1% de tween 40 (SIGMA™, USA) + H ₂ O q.s.p ultra pura
SOLUÇÃO 4	25µM de AOT + 0,1% de tween 80 (SIGMA™, USA) + H ₂ O q.s.p ultra pura
SOLUÇÃO 5	25 µM de AOT + 0,5% glicerol (SIGMA™, USA) + H ₂ O q.s.p ultra pura
SOLUÇÃO 6	25 µM de AOT + DMSO (SIGMA™, USA) 0,25% + água ultra pura q.s.p.

Todas as soluções citadas acima foram selecionadas por serem as que apresentaram as maiores absorbâncias, após testes de espectrofotometria realizados no laboratório de Bioengenharia (LABBIO) - UFMG.

Após selecionado o veículo, foram testados as doses irradiações sendo estas (60, 54 e 48 J/cm²) referentes nas presentes condições irradiação à 10, 9 e 8 minutos. O tempo de incubação do FA com o inóculo foi de 5 minutos a concentração do AOT foi de 25 µM e percentual do DMSO foi de 0,25%.

Posteriormente foram testados 3 tempos de incubação do FA, 5 minutos, 3 minutos e 1 minuto. A concentração do AOT foi de 25 µM, o percentual do DMSO foi de 0,25% e a dose de energia usada foi de 60 J/cm².

Finalmente foram testadas concentrações menores de AOT sendo estas: 5 µM, 10 µM, 15 µM, 20 µM usando o DMSO como carreador com um percentual de 0,25%, o tempo de incubação foi de 5 minutos e a dose energia usada foi de 60 J/cm²

Todos os testes de padronização com o AOT foram feitos em duplicata. Os testes de otimização foram repetidos no mínimo 3 vezes em duplicata, para realizar um tratamento estatístico.

5.5.4.2 Avaliação das atividades da Lacase e Superóxido Dismutase (SOD)

Para avaliar a diferença de susceptibilidade das amostras de leveduras à aIFD, as atividades da lacase, superóxido dismutase e o conteúdo de ergosterol

foram mensurados.

As amostras de *Malassezia* spp. foram selecionadas de acordo com a resistência apresentada para o tratamento com o LED vermelho, juntamente com o uso do AOT. Foram utilizadas 4 amostras distintas, sendo 1 muito resistente a aIFD (5389), 2 amostras com resistência moderada (4850 e T5) e 1 amostra muito sensível ao tratamento da aIFD (MZ2). O ajuste do número de células de todas as amostras, foi realizado com o auxílio de um espectrofotômetro de acordo com item 4.4. Posteriormente, as amostras, foram tratadas pela aIFD usando-se uma energia de 60 J/cm², e com concentração da solução de AOT 25µM acrescentada de 0,25% de DMSO. O tempo de incubação foi de 5 minutos.

Lacase: Para se obter uma concentração de células que permitisse tornar o experimento viável, cada amostra foi tratada pela técnica de aIFD sete vezes consecutivas. A atividade da lacase foi mensurada pelo acúmulo de produtos cromogênicos intermediários, que foram produzidos durante a oxidação da L-dopa. Para tanto, 1400 µL de sobrenadante de cada amostra tratada foram adicionados a 1400 µL de solução contendo L-dopa 20 mM. A solução de L-dopa foi preparada em PBS 1X. Em seguida, o inóculo foi adicionado a solução de L-dopa que foi incubada a 35°C por 16 horas. Após o tempo estabelecido para incubação, foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 450 nm, em triplicata. A solução de L-dopa foi usada como branco. Também foram feitas leituras em triplicatas de um grupo não tratado das duas respectivas amostras usadas no presente experimento, para posterior comparação nos resultados finais (Ferreira, et al., 2013).

SOD: Após o tratamento com a aIFD, a superóxido dismutase foi imediatamente quantificada. Para obter uma quantidade maior de leveduras, foi realizado o tratamento de 3 alíquotas de cada amostra, de forma sucessiva. A atividade SOD foi mensurada pela inibição da auto-oxidação do pirogalol. O controle foi realizado com 100 µL de meio de trituração mais 100 µL de pirogalol (20 mM), (SIGMA™, USA), diluído em PBS (pH 8,5). Nas amostras, 100 µL de extrato livre de células foram adicionados ao pirogalol e a inibição da auto-oxidação foi monitorada a cada 30 segundos, durante 30 minutos a 420 nm (Baltazar et al., 2012; Ferreira et al., 2013). As unidades de SOD foram consideradas como auto-oxidação do pirogalol por 200µL, calculado a seguir:

Unidade de SOD mL⁻¹ amostra = [(A-B) / A x 50 x 100] x 0.6 (fator de diluição)

Os resultados foram expressos em U mg⁻¹ de proteína.

5.5.4.3 Mensuração da produção de ergosterol de amostras do gênero *Malassezia*

Ergosterol: Para obter uma concentração de células que permitisse tornar a experimentação viável, cada amostra foi tratada pela técnica de aIFD sete vezes consecutivas. A quantificação de ergosterol da membrana celular fúngica foi realizada de acordo com (Arthington-Skaggs et al., 1999), com modificações (Santos et al., 2012; Ferreira et al., 2013). Após o período de incubação a 35°C/ 24 h, os tubos foram submetidos a centrifugação (Jouan, model BR4i) a 1,643 x g por 5 minutos, a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi removido. As células foram lavadas com água esterilizada e o peso úmido de cada pellet foi determinado. Para a extração dos lipídios, 3 mL de solução etanólica de hidróxido de potássio 25% foram adicionados a cada massa celular e agitados por 1 minuto. Os tubos foram incubados em banho-maria a 85°C por 1 hora e então resfriados à temperatura ambiente. Uma mistura de 1 mL de água esterilizada e 3 mL de n-heptano (Sigma-Aldrich) foi adicionado, seguido pela agitação em vórtex por 3 minutos. Por fim, o sobrenadante foi removido e a leitura foi feita em espectrofotômetro a 282 nm. Os resultados foram expressos como percentual de ergosterol em comparação ao controle de crescimento.

5.5.4.4 Substância C

Devido à tendência dos estudos em aIFD em avaliar a eficácia de fotoabsorvedores naturais, foi testada a substância C, no presente trabalho. Esse fotoabsorvedor foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Marcos Pinotti e está sob segredo de patente. A substância C foi diluída em água ultra pura e DMSO nas concentrações 25 µM, 50 µM e 100 µM. O tempo de incubação do inóculo com a substância C foi fixado em 5 minutos. Os tempos de exposição ao Diodo de Emissão de Luz (LED) azul foram de três, seis e oito minutos, que equivalem a 12, 24 e 32

J/cm², respectivamente. Tais testes de otimização foram repetidos no mínimo três vezes em duplicata, para realizar um tratamento estatístico. Durante o processo de otimização, foi utilizada a amostra 5389 pertencente à espécie *M. furfur*. As condições experimentais, substância C a 100 µM diluída em água ultra pura e irradiação de seis minutos com LED com luz azul foram selecionadas por ocasionar maior redução da viabilidade da levedura e foram utilizadas em 19 amostras de *M. furfur*.

6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram analisados por meio de métodos não paramétricos. Para os experimentos com aIFD e para os testes de susceptibilidade a drogas antifúngicas, foram utilizados os testes de Friedman e Wilcoxon. O intervalo de confiança foi de 95% em todas as análises, e valores de $P < 0,05\%$ foram considerados estatisticamente significativos (Sampaio, 2002).

7. RESULTADOS

7.1 CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

7.1.1 Agrupamento das Amostras pela Técnica de *Fingerprinting* (GTG)₅

As 51 amostras foram agrupadas, inicialmente, segundo as que possuíam o mesmo padrão de bandas ou padrões muito similares, observados após a separação eletroforética dos produtos gerados a partir da utilização da técnica de PCR *fingerprinting* empregando-se o iniciador (GTG)₅. Esse procedimento visou agrupar as amostras com base em similaridade genética, de modo a referenciar grupos para o sequenciamento de um número menor de amostras, com possibilidade de redução de custos e de tempo.

Conquanto tenha sido possível realizar o agrupamento de certo número de amostras segundo padrões similares, o extenso polimorfismo de tamanho e de número de bandas observado não permitiu que essa etapa resultasse numa economia de tempo ou de recursos, indicando a necessidade de sequenciamento da maioria das amostras para uma identificação específica e precisa dos isolados. Em função disso, os resultados das análises por *fingerprinting* serão apresentados para o conjunto das amostras identificadas em cada uma das espécies.

Foram identificadas 7 espécies de *Malassezia* (*M. furfur*, *M. globosa*, *M. japonica*, *M. pachydermatis*, *M. sloffiae*, *M. yamatoensis* e *M. sympodialis*) por sequenciamento da região D1/D2 da subunidade maior do gene ribossomal (resultados que serão apresentados mais detalhadamente no sub-item 6.1.2 deste capítulo). Apresentam-se a seguir, por meio de tabelas e figuras, os padrões de bandas observados após a PCR com o iniciador (GTG)₅ para as amostras pertencentes a cada uma dessas espécies.

A figura 9, painéis A, B, C e D exibem os padrões de bandas obtidos por separação em gel de agarose dos produtos da técnica de PCR *fingerprinting* (GTG)₅ para as amostras identificadas como *M. furfur*. As 20 amostras de *M. furfur* apresentaram 10 padrões distintos de bandas (Tabela 9). Pode-se notar que sete dos 10 grupos obtidos são representados por amostras individuais, amostras únicas cujos padrões de PCR *fingerprinting* não revelaram semelhanças com os demais. No entanto, 13 das 20 amostras puderam ser organizadas em três grupos distintos: o

grupo 1 com três amostras, todas de mesma origem geográfica, o grupo 5 com quatro amostras sendo todas de mesma origem geográfica, e o grupo 8 com quatro amostras com duas origens geográficas distintas. Nesse grupo, o padrão de bandas obtido para as amostras de Recife (5389 e 5982) foi muito parecido com o de duas amostras isoladas em Belo Horizonte (A16 e A39B) (figura 9, painéis A, B, C e D). Ressalta-se que nem todos os geis que defiram os padrões bandas estão expostos nesta tese.

Tabela 9: Amostras de *M. furfur* agrupadas por meio dos padrões de bandas observados a partir da separação eletroforética dos produtos obtidos por PCR (GTG)₅, formando 12 grupos distintos (visualizados na figura 9).

Grupos	Amostras Agrupadas
1	A16 (BH-MG), A16A (BH-MG), SC1A (BH-MG)
2	A38A (BH-MG)
3	A78A (SP-SP)
4	A69A2.1 (PA-TO)
5	T1 (PA-TO), T5 (PA-TO), T7 (PA-TO), T8b (PA-TO)
6	T4 (PA-TO)
7	T19 (PA-TO) 5389 (RC-PE), 5982 (RC-PE), A16 (BH-MG), A39B (BH-MG) 4813 (RE-PE)
8	4850 (RE-PE)
9	MID (BH-MG)
10	MIE (BH-MG)

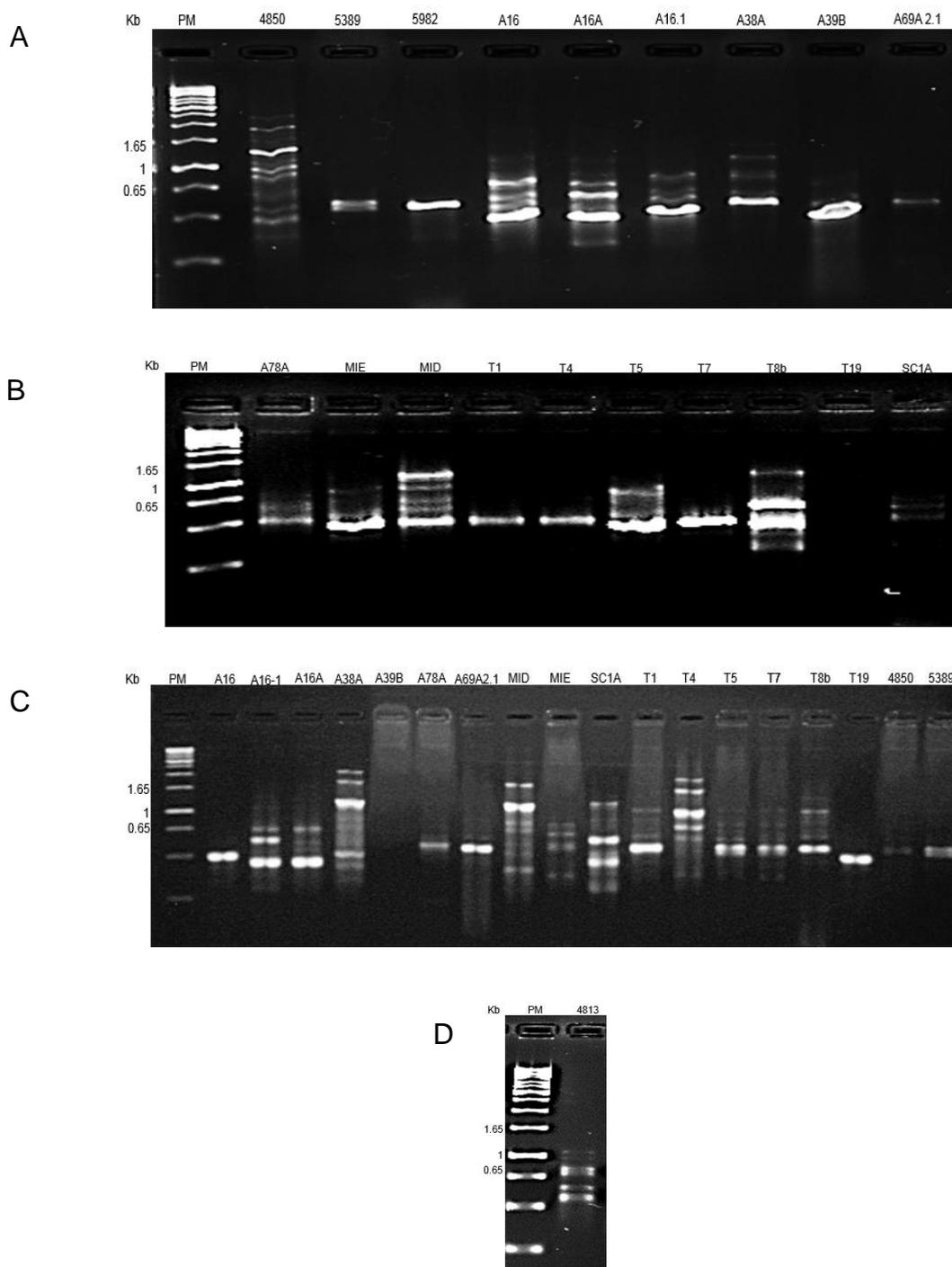


Figura 9: Padrões de bandas obtidos pela separação eletroforética em gel de agarose dos produtos de PCR, empregando o iniciador (GTG)₅ para 20 amostras de *M. furfur*, de diferentes pacientes e origens geográficas variadas. Os painéis A, B, C e D representam a separação eletroforética realizada em 4 géis distintos. Os padrões de tamanho molecular (1 kb ladder Invitrogen™, EUA) estão apresentados na primeira canaleta. Os números e letras acima das canaletas representam os nomes das amostras.

As dez amostras de *M. pachydermatis*, por sua vez, apresentaram sete padrões distintos de bandas, como pode ser observado na figura 10 e tabela 10. Mais uma vez, houve padrões exclusivos de amostras, com 5 grupos que apresentaram uma única amostra cada um. Dois dos grupos formados apresentaram mais de uma amostra, sendo o primeiro com amostras de Belo Horizonte (Grupo 3: BH3 e BH4) e o segundo com amostras da cidade de São Paulo (Grupo 7: SP6, SP7 e SP9). A figura 10 exhibe os padrões de bandas obtidos pela técnica de *fingerprinting* (GTG)₅, em gel de agarose, para as amostras de *M. pachydermatis*.

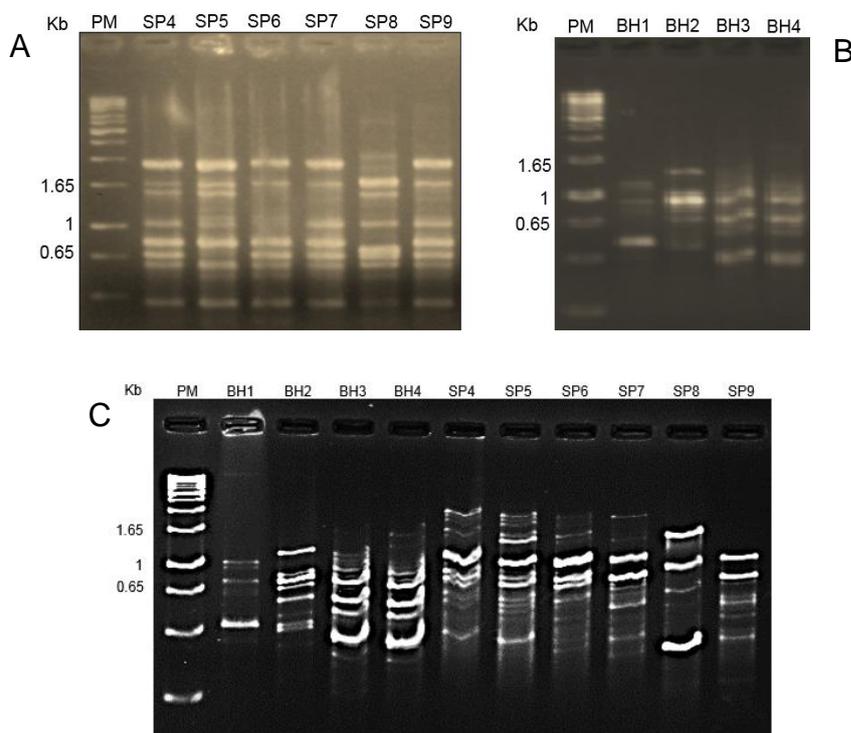


Figura 10: Padrões de bandas obtidos pela separação eletroforética em gel de agarose dos produtos de PCR, empregando o iniciador (GTG)₅ para 10 amostras de *M. pachydermatis*, de diferentes animais de duas origens geográficas (BH – Minas Gerais, e SP- São Paulo). Os painéis A, B e C apresentam a separação eletroforética de bandas realizadas em três géis distintos. Os padrões de tamanho molecular (1 kb ladder Invitrogen™, EUA) estão apresentados na primeira canaleta. Os números e letras acima das canaletas representam os nomes das amostras.

Tabela 10: Amostras de *M. pachydermatis* agrupadas por meio dos padrões de bandas observados a partir da resolução eletroforética dos produtos obtidos por PCR (GTG)₅, formando 7 grupos distintos (visualizados na figura 10).

Grupos	Amostras Agrupadas
1	BH1 (BH-MG)
2	BH2 (BH-MG)
3	BH3 (BH-MG), BH4 (BH-MG)
4	SP4 (RP-SP)
5	SP5 (RP-SP)
6	SP8 (RP-SP)
7	SP6 (SP-SP), SP7 (SP-SP), SP9 (SP-SP)

A espécie *M. sympodialis*, representada por dez amostras, revelou sete padrões de bandas. A maioria das amostras (6/10, amostras A8, A18A, A28A, SC1, SC3 e SC4) não se agrupou, permanecendo como perfis individuais após a resolução eletroforética dos produtos amplificados. Contudo, foram observados padrões similares para quatro amostras, três das quais oriundas da capital do estado de São Paulo (A28.2, A57, A88) e uma amostra originária de Belo Horizonte/MG (A53A). A figura 11 apresenta os perfis eletroforéticos em gel de agarose obtidos a partir da PCR *fingerprinting* (GTG)₅, e a Tabela 11 apresenta os 7 grupos formados para *M. sympodialis*.

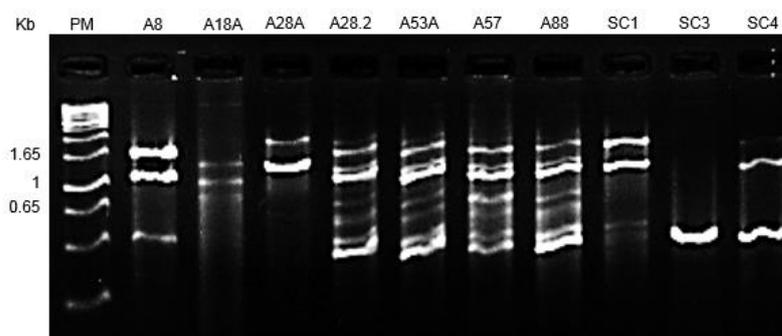


Figura 11: Padrões de bandas obtidos pela separação eletroforética em gel de agarose dos produtos de PCR, empregando o iniciador (GTG)₅ para 10 amostras de *M. sympodialis*, de diferentes origens geográficas. Os painéis A e B apresentam a resolução eletroforética. Os padrões de tamanho molecular (1 kb ladder Invitrogen™, EUA) estão apresentados na primeira canaleta. Os números e letras acima das canaletas representam os nomes das amostras.

Tabela 11: Amostras de *M. sympodiales* agrupadas por meio dos padrões de bandas observados a partir da resolução eletroforética dos produtos obtidos por PCR (GTG)₅, formando 7 grupos distintos (visualizados na figura 11).

Grupos	Amostras agrupadas
1	A8 (BH-MG)
2	A18A (BH-MG)
3	A28A (SP-SP)
4	A28.2 (SP-SP), A53A (BH-MG), A57(SP-SP), A88 (SP-SP)
5	SC1 (SP-SP)
6	SC3 (SP-SP)
7	SC4 (SP-SP)

As quatro amostras de *M. globosa* formaram três grupos cujos padrões de bandas estão apresentados na figura 12 e citados na tabela 12. O primeiro grupo foi

representado pelas amostras A13 e A31A, provenientes de Belo Horizonte-MG. Os outros dois padrões representam amostras individuais, A87 (grupo 2) e MZ4 (grupo 3), ambas do município de São Paulo/SP.

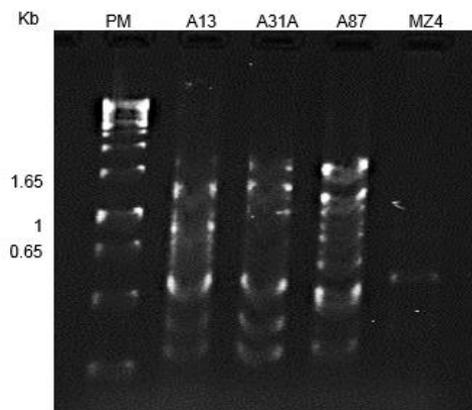


Figura 12: Padrões de bandas obtidos pela resolução eletroforética em gel de agarose dos produtos de PCR empregando o iniciador (GTG)₅ para 4 amostras de *M. globosa*, de diferentes origens geográficas. Os padrões de tamanho molecular (1 kb ladder Invitrogen™, EUA) estão apresentados na primeira canaleta. Os números e letras acima das canaletas representam os nomes das amostras.

Tabela 12: Amostras de *M. globosa* agrupadas por meio dos padrões de bandas observados a partir da resolução eletroforética dos produtos obtidos por PCR (GTG)₅, formando 3 grupos distintos (visualizados na figura 12).

Grupos	Amostras agrupadas
1	A13 (BH-MG), A31A (BH-MG)
2	A87 (SP-SP)
3	MZ4 (SP-SP)

A espécie *M. slooffiae* foi representada por duas amostras que apresentaram padrões de bandas particulares. Os padrões obtidos usando a técnica de PCR *fingerprinting* (GTG)₅ para as amostras A46 e 98A podem ser observados na figura 13 e citados na tabela 13. A amostra A46 foi isolada em Belo Horizonte-MG e a amostra 98A foi isolada em São Paulo-SP.

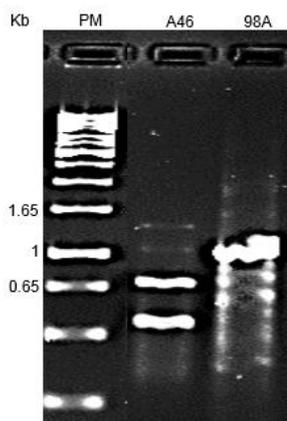


Figura 13: Padrões de bandas obtidos pela resolução eletroforética em gel de agarose dos produtos de PCR empregando o iniciador (GTG)₅ para 2 amostras de *M. slooffiae*, de diferentes origens geográficas. Os padrões de tamanho molecular (1 kb ladder Invitrogen™, EUA) estão apresentados na primeira canaleta. Os números e letras acima das canaletas representam os nomes das amostras.

Tabela 13: Amostras de *M. slooffiae*, não agrupadas por meio dos padrões de bandas observados a partir da resolução eletroforética dos produtos obtidos por PCR (GTG)₅, formando 2 grupos distintos (visualizados na figura 13).

Grupos	Amostras agrupadas
1	A46 (BH-MG)
2	98A (SP-SP)

As três amostras de *M. japonica*, também não puderam ser agrupadas, pois houve diferenças nos padrões de bandas cujos perfis estão apresentados na figura 14. A amostra A38C1 foi isolada em Belo Horizonte-MG e as amostras A89B e 97A foram isoladas em São Paulo/SP (Tabela 14).

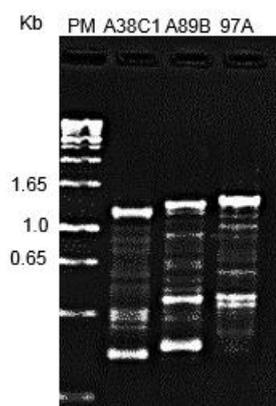


Figura 14: Padrões de bandas obtidos pela resolução eletroforética em gel de agarose dos produtos de PCR empregando o iniciador (GTG)₅ para 3 amostras de *M. japonica*, de diferentes origens geográficas. Os padrões de tamanho molecular (1 kb ladder Invitrogen™, EUA) estão apresentados na primeira canaleta. Os números e letras acima das canaletas representam os nomes das amostras.

Tabela 14: Amostras de *M. japonica* agrupadas por meio dos padrões de bandas observados a partir da resolução eletroforética dos produtos obtidos por PCR (GTG)₅, formando 3 grupos distintos (visualizados na figura 14).

Grupos	Amostras agrupadas
1	A38C1 (BH-MG)
2	A89B (SP-SP)
3	97A (SP-SP)

As duas amostras da espécie *M. yamatoensis* também não se agruparam, mostrando dois padrões distintos (figura 15). Ambas as amostras (MZ2 e 5464A1) foram isoladas em Belo Horizonte-MG (Tabela 15). O padrões de bandas obtidos a partir da técnica de PCR *Fingerprinting* (GTG)₅ estão exibidos na figura 15.

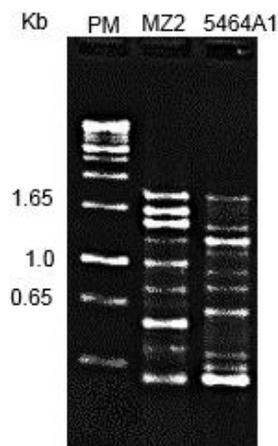


Figura 15: Padrões de bandas obtidos pela resolução eletroforetica em gel de agarose dos produtos de PCR empregando o iniciador (GTG)₅ para 02 amostras de *M. yamatoensis*, de mesma origem geográfica (BH-MG). Os padrões de tamanho molecular (1 kb ladder Invitrogen™, EUA) estão apresentados na primeira canaleta. Os números e letras acima das canaletas representam os nomes das amostras.

Tabela 15: Amostras de *M. yamatoensis*, não agrupadas. Dois padrões de bandas foram observados a partir da resolução eletroforética dos produtos obtidos por PCR (GTG)₅ (visualizados na figura 15).

Grupos	Amostras agrupadas
1	MZ2 (BH-MG)
2	5464A1 (BH-MG)

Em função da heterogeneidade genética revelada pelo PCR fingerprinting para as 51 amostras de *Malassezia* estudadas, foram considerados, no presente trabalho, 36 grupos, o que indicou a necessidade de sequenciamento, preferencialmente, de todas as amostras. Os resultados do sequenciamento foram satisfatórios até o momento para 34 amostras, como será apresentado a seguir, enquanto que, para as outras, ainda serão obtidos os dados definitivos que permitirão a conclusão do artigo que será derivado desta tese, visando a publicação em revista científica especializada.

7.1.2 Sequenciamento da Região D1/D2 do Gene da Subunidade Maior rRNA e Identificação das Espécies

A próxima meta após as tentativas de agrupamento, foi amplificar e sequenciar a região D1/D2 do gene da subunidade maior do ribossomo para obter a identificação específica das amostras. Dessa forma, 34 amostras foram sequenciadas com êxito a partir do iniciador NL1 e/ou NL4. As amostras sequenciadas e as respectivas espécies obtidas podem ser vistas na tabela 16. Os dados são referentes a sequências de amostras depositadas no Genbank com as quais foram comparadas as sequências das amostras obtidas no presente trabalho (estão expostas no anexo 2 na tabela 24), estimando-se a similaridade dos alinhamentos. A figura 16 mostra a banda obtida a partir da amplificação da região D1/D2.

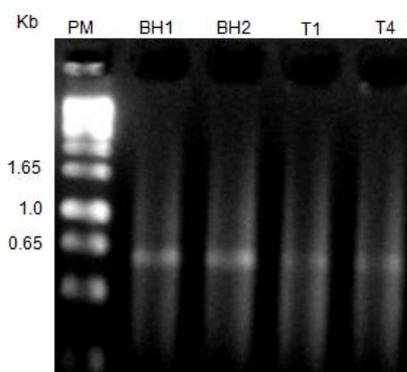


Figura 16: Padrão de banda obtido pela resolução eletroforetica em gel de agarose dos produtos de PCR empregando os iniciadores (NL1/NL4) para 04 amostras (BH1, BH2, T1, T4) de *Malassezia* spp. O padrão de tamanho molecular (1 kb ladder Invitrogen™, EUA) estão apresentados na primeira canaleta. Os números e letras acima das canaletas representam os nomes das amostras.

Tabela 16: Identificação específica das amostras estudadas com base no sequenciamento da região D1/D2 da subunidade maior do gene rRNA, sua origem e percentual (%) de identidade com sequências de bancos de dados públicos e do número de *gaps* obtidos para possibilitar o alinhamento das amostras.

N°	Amostra	Espécie	Identidade das sequências	Gaps
1	A16.1	<i>M. furfur</i>	403/403 (100%)	0/403
2	A16A	<i>M. furfur</i>	452/452 (100%)	0/452
3	A38A	<i>M. furfur</i>	363/368 (100%)	0/368
4	MID	<i>M. furfur</i>	462/462 (100%)	0/462
5	MIE	<i>M.furfur</i>	524/532 (98%)	6/532
6	A78A	<i>M. furfur</i>	229/235 (97%)	1/235
7	A69A 2.1	<i>M.furfur</i>	313/314 (99%)	0/314
8	T1	<i>M.furfur</i>	510/510 (100%)	0/510
9	T4	<i>M.furfur</i>	504/505 (99%)	1/505
10	T5	<i>M.furfur</i>	328/328 (100%)	0/328
11	4813	<i>M.furfur</i>	549/553 (99%)	4/553
12	4850	<i>M.furfur</i>	549/550 (99%)	1/550
13	5389	<i>M.furfur</i>	544/551 (99%)	5/551
14	5982	<i>M. furfur</i>	572/574 (99%)	1/574
15	A31A	<i>M.globosa</i>	331/336 (99%)	0/336
16	A87	<i>M.globosa</i>	435/435 (100%)	0/435
17	MZ4	<i>M.globosa</i>	412/437 (94%)	22/437
18	A38C1	<i>M. japonica</i>	518/519 (99%)	0/519
19	A89B	<i>M. japonica</i>	374/374 (100%)	0/374
20	97	<i>M. japonica</i>	501/502 (99%)	0/502
21	BH1	<i>M. pachydermatis</i>	532/532 (100%)	0/532
22	BH2	<i>M. pachydermatis</i>	454/454 (100%)	0/454
23	BH3	<i>M. pachydermatis</i>	431/431 (100%)	0/431
24	BH4	<i>M. pachydermatis</i>	449/449 (100%)	0/449
25	SP5	<i>M. pachydermatis</i>	463/463 (100%)	0/463
26	SP6	<i>M. pachydermatis</i>	400/402 (99%)	0/402
27	A46	<i>M. sloofiae</i>	426/426 (100%)	0/426
28	98A	<i>M. sloofiae</i>	354/354 (100%)	0/354
29	A28.2	<i>M. sympodialis</i>	456/456 (100%)	0/456
30	A53A	<i>M. sympodialis</i>	498/498 (100%)	0/498
31	A57	<i>M. sympodialis</i>	466/467 (99%)	0/467
32	A88	<i>M. sympodialis</i>	463/463 (100%)	0/463
33	MZ2	<i>M.yamatoensis</i>	458/471 (100%)	12/471
34	5464A	<i>M.yamatoensis</i>	549/552 (99%)	1/552

7.1.3 Espécies Identificadas

Entre as 51 amostras pesquisadas foram identificadas sete espécies distintas: *M. furfur*, *M. globosa*, *M. japonica*, *M. pachydermatis*, *M. slooffiae*, *M. yamatoensis*, *M. sympodialis*. Desse total, 20 amostras (39%) foram identificadas como sendo da espécie *M. furfur*. As espécies *M. pachydermatis* e *M. sympodialis* somaram 10 amostras cada uma o que equivale a 20% do total de amostras e *M. globosa* contou com 4 amostras (~8%). *M. japonica* contou 3 amostras (~6%) e *M. slooffiae* e *M. yamatoensis* foram identificadas com 2 amostras cada uma (4%). É importante ressaltar que *M. japonica* e *M. yamatoensis* não haviam sido descritas na América Latina sendo esta a sua primeira identificação em nosso meio. Na tabela 17 são encontradas informações que permitem correlacionar as espécies do gênero *Malassezia* identificadas neste trabalho com as doenças diagnosticadas clinicamente na ocasião da coleta.

Tabela 17: Amostras estudadas com suas respectivas espécies obtidas pelas técnicas *fingerprinting* e do sequenciamento do RNA ribossomal, cidade e estado onde foram isoladas e as doenças relacionadas.

N°	Amostra	Doença	Cidade/Estado	Espécie
1	MIE	Pitiríase versicolor	Belo Horizonte-MG	<i>M. furfur</i>
2	5982	Não relatado	Recife-PE	<i>M. furfur</i>
3	5389	Não relatado	Recife-PE	<i>M. furfur</i>
4	4850	Não relatado	Recife-PE	<i>M. furfur</i>
5	4813	Não relatado	Recife-PE	<i>M. furfur</i>
6	A16	Dermatite seborreica	Belo Horizonte-MG	<i>M. furfur</i>
7	A38A	Pitiríase versicolor	Belo Horizonte-MG	<i>M. furfur</i>
8	A39B	Pitiríase versicolor	Belo Horizonte-MG	<i>M. furfur</i>
9	T1	Pitiríase versicolor	Palmas- TO	<i>M. furfur</i>
10	T4	Dermatite seborreica	Palmas- TO	<i>M. furfur</i>
11	T5	Pitiríase versicolor	Palmas -TO	<i>M. furfur</i>
12	T7	Pitiríase versicolor	Palmas -TO	<i>M. furfur</i>
13	T8b	Dermatite seborreica	Palmas -TO	<i>M. furfur</i>
14	T19	Pitiríase versicolor	Palmas -TO	<i>M. furfur</i>
15	SC1A	Pitiríase versicolor	Belo Horizonte-MG	<i>M. furfur</i>
16	A16A	Dermatite seborreica	Belo Horizonte-MG	<i>M. furfur</i>
17	A16.1	Dermatite seborreica	Belo Horizonte-MG	<i>M. furfur</i>
18	A78A	Pitiríase versicolor	São Paulo-SP	<i>M. furfur</i>
19	A69A2.1	Dermatite seborreica	Palmas -TO	<i>M. furfur</i>
20	MID	Pitiríase versicolor	Belo Horizonte-MG	<i>M. furfur</i>
21	BH1	Otite	Belo Horizonte-MG	<i>M. pachydermatis</i>
22	BH2	Otite	Belo Horizonte-MG	<i>M. pachydermatis</i>
23	BH3	Otite	Belo Horizonte-MG	<i>M. pachydermatis</i>
24	BH4	Otite	Belo Horizonte-MG	<i>M. pachydermatis</i>
25	SP4	Otite	São Paulo-SP	<i>M. pachydermatis</i>
26	SP5	Otite	São Paulo-SP	<i>M. pachydermatis</i>
27	SP6	Otite	São Paulo-SP	<i>M. pachydermatis</i>
28	SP7	Otite	São Paulo-SP	<i>M. pachydermatis</i>
29	SP8	Otite	São Paulo-SP	<i>M. pachydermatis</i>
30	SP9	Otite	São Paulo-SP	<i>M. pachydermatis</i>
31	A28A	Pitiríase versicolor	São Paulo-SP	<i>M. sympodialis</i>
32	A8	Pitiríase versicolor	Belo Horizonte-MG	<i>M. sympodialis</i>
33	SC1	Pitiríase versicolor	Belo Horizonte-MG	<i>M. sympodialis</i>
34	SC3	Pitiríase versicolor	Belo Horizonte-MG	<i>M. sympodialis</i>
35	SC4	Pitiríase versicolor	Belo Horizonte-MG	<i>M. sympodialis</i>
36	A57	Pitiríase versicolor	São Paulo-SP	<i>M. sympodialis</i>
37	A18A	Pele saudável	Belo Horizonte-MG	<i>M. sympodialis</i>
38	A88	Pitiríase versicolor	São Paulo-SP	<i>M. sympodialis</i>
39	A28.2	Pitiríase versicolor	São Paulo-SP	<i>M. sympodialis</i>
40	A53A	Pitiríase versicolor	Belo Horizonte-MG	<i>M. sympodialis</i>
41	MZ4	Pitiríase versicolor	Belo Horizonte-MG	<i>M. globosa</i>
42	A13	Dermatite seborreica	Belo Horizonte-MG	<i>M. globosa</i>
43	A87	Pitiríase versicolor	São Paulo-SP	<i>M. globosa</i>
44	A31A	Pitiríase versicolor	Belo Horizonte-MG	<i>M. globosa</i>
45	A38C1	Pitiríase versicolor	Belo Horizonte-MG	<i>M. japonica</i>
46	A89B	Pitiríase versicolor	São Paulo-SP	<i>M. japonica</i>
47	97A	Pitiríase versicolor	São Paulo-SP	<i>M. japonica</i>
48	98A	Dermatite seborreica	São Paulo-SP	<i>M. slooffiae</i>
49	A46	Pitiríase versicolor	Belo Horizonte-MG	<i>M. slooffiae</i>
50	5464 A1	Pitiríase versicolor	Belo Horizonte-MG	<i>M. yamatoensis</i>
51	MZ2	Pitiríase versicolor	Belo Horizonte-MG	<i>M. yamatoensis</i>

Para as quatro amostras originárias do Recife e, até então, identificadas apenas por meio de testes morfofisiológicos, não há dados de origem clínica disponíveis. Ressalte-se, ainda, que uma amostra, identificada como *M. sympodialis*, foi isolada a partir de pele saudável (hígida). Para as 10 amostras isoladas de animais, todas de cães com otite, a identificação específica foi *M. pachydermatis* (100%). Para as demais amostras, 36 isolados clínicos humanos, pode-se notar a associação com pitíriase versicolor em 28 casos, 77% das manifestações clínicas, e com dermatite seborreica em oito casos (22%). As espécies associadas com os casos de pitíriase versicolor foram identificadas como *M. furfur* em 10 casos (~36%), como *M. sympodialis* em 9 casos (~32%), como *M. globosa* e *M. japonica* em 3 casos cada (~11% cada), como *M. yamatoensis* em 2 casos (7%) e como *M. slooffiae* em 1 caso (3%). As amostras associadas à dermatite seborreica foram identificadas como *M. furfur* em 6 casos (75%), como *M. globosa* em um caso (12%) e como *M. slooffiae* em um caso (12%).

Quando consideramos a questão da origem geográfica das amostras, verificou-se que, dos 28 casos de pitíriase versicolor, 16 eram de BH/MG, oito de São Paulo/SP, e quatro de Palmas/TO. Nos casos das dermatites, 5 casos eram oriundos de BH/MG, dois de Palmas/TO e um caso de São Paulo/SP. É interessante observar que, das 16 amostras de BH que se associaram à pitíriase versicolor, cinco são *M. furfur* (31%), seis são *M. sympodialis* (38%), duas são *M. yamatoensis* (13%), uma é *M. japonica* (6%), uma é *M. slooffiae* (6%) e uma é *M. globosa* (6%). Nos casos de dermatites seborréicas oriundas de BH/MG, em quatro identificou-se a espécie *M. furfur* e, em um caso, *M. globosa*. O número de casos de pitíriase versicolor, dermatite seborreica e otite e a associação com as espécies do gênero *Malassezia* podem ser vistas na tabela 18.

Tabela 18: Espécies do gênero *Malassezia* associadas as malasseziozes (pitíriase versicolor, dermatite seborreica e Otite) e seus respectivos número de casos.

Espécies	Número de casos de malasseziozes x espécies		
	Pitíriase versicolor	Dermatite seborreica	Otite
<i>M. pachydermatis</i>	-	-	10
<i>M. furfur</i>	10	6	-
<i>M. sympodialis</i>	9	-	-
<i>M. globosa</i>	3	1	-
<i>M. japonica</i>	3	-	-
<i>M. slooffiae</i>	1	1	-
<i>M. yamatoensis</i>	2	-	-

7.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DE ANTIFÚNGICOS PARA AS AMOSTRAS DO GÊNERO *MALASSEZIA* IDENTIFICADAS

A determinação da CIM foi feita para as 51 amostras clínicas (sete espécies: *M. furfur*, *M. globosa*, *M. japonica*, *M. pachydermatis*, *M. slooffiae*, *M. yamatoensis* e *M. sympodialis*). No presente trabalho, calculou-se a CIM₅₀ e a CIM₉₀, ou seja, as concentrações das drogas capazes de inibir o crescimento de 50% (26 amostras) e de 90% (46) das amostras pesquisadas. Os dados correspondentes às leituras de CIM realizadas para cada uma das amostras podem ser encontrados no Anexo 3, e estão organizados em 7 Tabelas (Tabelas 25 a 31), uma para cada espécie identificada.

É importante ressaltar que somente a espécie *M. furfur* possuía um número suficiente de amostras para a realização de uma análise estatística em separado. As demais amostras que compreendem as 6 outras espécies identificadas não apresentaram número suficiente de amostras para permitir tratamento estatístico e foram consideradas na análise global de resultados de CIM para o gênero *Malassezia*.

A análise global da CIM para o gênero *Malassezia* (todas as amostras e espécies) revelou para a caspofungina, sem exceções, concentração >16 µg/mL, sendo 16 µg/mL a maior concentração testada; a CIM₅₀ e CIM₉₀ para o cetoconazol corresponderam a 1 µg/mL e a 16 µg/mL, respectivamente, e a variação apresentada foi de 0,031 µg/mL a 16 µg/mL; o isoconazol apresentou CIM₅₀ de 8 µg/mL e CIM₉₀ de 16 µg/mL com uma variação entre 0,125 µg/mL a 16 µg/mL; o itraconazol apresentou CIM₅₀ de 0,125 µg/mL e CIM₉₀ de 16 µg/mL, com uma variação de 0,031 µg/mL a 16 µg/mL; o clotrimazol apresentou CIM₅₀ de 8 µg/mL e CIM₉₀ de 64 µg/mL. A variação da CIM obtida para o clotrimazol foi de 0,5 µg/mL a 64 µg/mL. A CIM₅₀ para o miconazol foi de 4 µg/mL e a CIM₉₀ de 16 µg/mL. As variações das concentrações do miconazol obtidas foram de 0,031 µg/mL a 16 µg/mL. Esses dados sugerem resistência natural de espécies do gênero *Malassezia* à caspofungina e a mesma tendência para o isoconazol. A tabela 18 exibe os valores obtidos da CIM₅₀ e CIM₉₀ e das variações da CIM para o gênero *Malassezia*.

Tabela 19: Valores da CIM₅₀ e CIM₉₀ obtidos e variação da CIM (µg/mL) para todas as amostras estudadas referentes ao gênero *Malassezia*.

Gênero <i>Malassezia</i>						
n=51						
	Cetoconazol	Itraconazol	Clotrimazol	Miconazol	Isoconazol	Caspofungina
CIM 50	1	0,125	8	4	8	> 16
CIM 90	16	16	64	16	16	> 16
Variação da CIM	0,031 - 16	0,031 - 16	0,5 - 64	0,031 - 16	0,5 - 16	> 16

Concentração = µg/mL

Para *M. furfur*, que representou 20 (39%) das 51 amostras estudadas, a CIM₅₀ referente ao cetoconazol foi de 0,25 µg/mL e a CIM₉₀ foi 2 µg/mL. A CIM para o cetoconazol variou de 0,031 µg/mL a 16 µg/mL. Para o isoconazol os valores de CIM₅₀ e CIM₉₀ foram de 4 µg/mL e 16 µg/mL, respectivamente, e a CIM variou de 0.125 µg/mL a 16 µg/mL; para o itraconazol, a CIM₅₀ alcançou 0,125 µg/mL e a CIM₉₀ foi de 8 µg/mL, obtendo-se uma variação de 0,031 µg/mL a 16 µg/mL. O clotrimazol e o miconazol apresentaram os mesmos valores de CIM₅₀ e CIM₉₀ que foram, respectivamente, 2 µg/mL e 16 µg/mL. No entanto, a CIM variou de 1 µg/mL a 32 µg/mL para o clotrimazol e para o miconazol a CIM variou de 0,5 µg/mL à 16 µg/mL. A tabela 20 exhibe os valores obtidos da CIM₅₀ e CIM₉₀ e a variação da CIM para as drogas antifúngicas para as amostras de *Malassezia furfur*.

Tabela 20: Valores de CIM₅₀ e CIM₉₀ obtidos e variação da CIM (µg/mL) para as amostras de *Malassezia furfur*.

<i>Malassezia furfur</i>						
n=19						
	Cetoconazol	Itraconazol	Clotrimazol	Miconazol	Isoconazol	Caspofungina
CIM 50	0,25	0,125	2	2	4	> 16
CIM 90	2	8	16	16	16	> 16
Variação da CIM	0,031 - 16	0,031 - 8	1 - 32	0,5 - 16	0,125 - 16	> 16

Concentração = µg/mL

Para verificar qual dos antimicóticos foi o mais eficiente, os resultados de CIM obtidos em concentração ($\mu\text{g/mL}$) foram convertidos para molaridade. Quando calculada a equivalência molar para o gênero *Malassezia*, pode-se observar que houve diferença estatisticamente significativa em relação aos antifúngicos usados quando se avaliou a correlação entre eles (Friedman) e a matriz pareada dos antifúngicos (Wilcoxon). Com exceção de alguns isolados (MIE, SC1A, BH1, BH2, BH3, 98A) não relevantes para a análise estatística, o itraconazol mostrou-se mais eficiente frente ao gênero *Malassezia*, uma vez que menores concentrações da droga seriam suficientes para a inibição *in vitro* do crescimento do fungo.

Para a espécie *M. furfur*, esses dados indicaram que não houve diferença estatística entre as drogas clotrimazol e miconazol, e clotrimazol e isoconazol; mesmo com faixas intervalares diferentes (entre o clotrimazol para as demais drogas). O itraconazol e cetoconazol apresentaram diferença estatística muito pequena, ($p=0,0498$), porém o itraconazol apresentou menores valores de CIM (equivalência molar). Dessa forma consideramos que o itraconazol deve ser a droga mais eficiente para inibição de *M. furfur in vitro*.

7.3 INIBIÇÃO FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA (aIFD)

7.3.1 Padronização da Concentração do Azul de Ortoluidina

Os testes iniciais foram feitos usando o diodo de emissão de luz (LED) vermelho emitindo em 630 nanômetros (nm). O fotoabsorvedor usado foi o azul de ortoluidina (AOT). O tempo de incubação inicial foi de 5 minutos e o tempo de irradiação inicial foi de 60 J/cm² (10 minutos). Para o presente teste, foi utilizada a amostra teste foi a MIE, pertencente à espécie *Malassezia furfur* e o AOT foi empregado na concentrações de 150, 100, 50 e 25 micromolar (µM).

Os resultados mostram que não houve redução significativa ($p>0,05$) do número de células viáveis presentes nos grupos controles experimentais, sendo essas o controle positivo de crescimento e os grupos referentes isoladamente, ao LED e às diversas concentrações de AOT, e sem o uso da luz (Grupo 1 a 6) (Tabela 21). Portanto, a luz emitida em 630 nm e o fotoabsorvedor (FA), quando utilizados isoladamente, não causaram toxicidade para a levedura. Em relação aos grupos tratados por aIFD, nos quais foram empregadas as concentrações de 150 µM, 100 µM e 50 µM de AOT, irradiadas pela luz emitida pelo LED (Grupos 7 a 9) não houve uma redução significativa do número de células, permanecendo, dessa forma, com valores semelhantes em relação aos dos grupos controles. No entanto, quando foi usada a concentração de 25 µM de AOT, irradiado pelo LED (Grupo 10), pode-se observar uma redução de 1,04 LOG₁₀ UFC/mL das células viáveis em relação à média total dos grupos controle (Tabela 21). Apesar de o resultado do grupo 10 não ter apresentado uma redução estatisticamente significativa de células viáveis em relação aos grupos controles, selecionou-se a concentração de 25 µM do AOT para os futuros testes de padronização.

Tabela 21: Redução da viabilidade celular (Log 10 UFC/mL) por inibição fotodinâmica antimicrobiana (aIFD), empregando a amostra teste MIE da espécie *M. furfur* e o diodo de emissão de luz (LED) a 630 nm e o fotoabsorvedor azul de ortotoluidina (AOT) nas concentrações 150 µM, 100 µM, 50 µM e 25 µM. O tempo de incubação foi de 5 minutos. A dose de irradiação usada foi de 60 J/cm².

Grupos	Valores da duplicata		MÉDIA
	Log10 número de células viáveis/ mL		Log10 número de células viáveis/ mL
G1	6,48	6,48	6,48
G2	6,48	6,48	6,48
G3	6,24	6,21	6,23
G4	6,48	6,48	6,48
G5	6,45	6,44	6,45
G6	6,10	6,08	6,09
G7	6,08	6,13	6,11
G8	6,46	6,44	6,45
G9	6,41	6,36	6,39
G10	5,43	5,20	5,32

Grupos Controle da experimentação: G1: sem tratamento, G2: irradiação por 10 minutos por diodo de emissão de luz (LED) à 630 nm sem a adição do azul de ortotoluidina (AOT), G3: 150 µM de AOT mais 5 minutos de incubação sem uso do LED, G4: 100 µM de AOT mais 5 minutos de incubação sem uso do LED, G5: 50 µM de AOT mais 5 minutos de incubação sem uso do LED e G6: 25 µM de AOT mais 5 minutos de incubação sem uso do LED. **Grupos tratados:** G7: aIFD usando 150 µM de AOT mais 5 minutos de incubação e 10 minutos de irradiação do LED; G8: aIFD usando 100 µM de AOT mais 5 minutos de incubação e 10 minutos de irradiação do LED, G9: aIFD usando 50 µM de AOT mais 5 minutos de incubação e 60 J/cm² de dose de irradiação do LED e G10: aIFD usando 25 µM de AOT mais 5 minutos de incubação e 60 J/cm² de dose de irradiação do LED.

7.3.2 Seleção da Substância Carreadora

Após a seleção da concentração de 25 µM do AOT, para uso como fotoabsorvedor, foram realizados experimentos com o intuito de eleger uma substância que pudesse carrear mais facilmente o AOT para dentro das células. Deste modo, foram padronizadas soluções com o AOT a uma concentração de 25 µM e suplementado com: Tween 40 a 1%, Tween 40 a 1% simultaneamente com Tween 80 a 0,1%, somente Tween 80 a 0,1%, glicerol a 0,5% e DMSO a 0,25%. O tempo de incubação ficou fixado em 5 minutos. A dose de irradiação com o LED, em

comprimento de onda de 630 nm, foi de 60 J/cm². A amostra usada para os testes de otimização foi a MIE.

Os resultados apresentados demonstraram que não houve redução significativa no número de células viáveis em nenhum dos grupos controles experimentais (Figura 17, grupos 1 a 8), sendo estes: o controle positivo de crescimento, o controle apenas da irradiação pelo LED, somente com AOT, e também aos grupos em que foram usadas as diversas substâncias para auxiliar o carreamento do AOT e não foi realizado a irradiação. Esses resultados demonstraram que quando usados isoladamente o LED, bem como o AOT, mesmo quando usados com o Tween 40 e 80, glicerol e DMSO, não apresentaram qualquer citotoxicidade para a levedura nas concentrações aqui apresentadas. No entanto, para todos os grupos tratados (aIFD) houve uma redução significativa de células viáveis em relação aos grupos dos controles (Figura 17, grupos 9 a 14). Os grupos 13 e 14 foram os mais eficientes, pois atingiram uma redução de aproximadamente 6,5 Log₁₀ UFC/mL. O DMSO foi a substância selecionada como carreadora (grupo 14). Para esses grupos foram usados, como substâncias carreadoras, o glicerol a 0,5% e o DMSO a 0,25% (Figura 17). Os grupos menos eficientes na redução da viabilidade celular foram o grupo 11 seguido do grupo 12. Para esses respectivos grupos o AOT foi suplementado com Tween 40 a 1% e Tween 80 a 0,1%. Os grupos 9 e 10 obtiveram resultados parecidos; tendo, ambos, alcançado uma redução de aproximadamente de 5 Log₁₀ UFC/mL (Figura 17). No entanto, não foram tão eficientes quanto os grupos 13 e 14 que obtiveram uma redução total. Apesar do grupo 13, que se refere ao glicerol 0,5%, ter gerado excelentes resultados, decidiu-se trabalhar com DMSO, uma vez que em trabalhos anteriores, *in vitro* e *in vivo*, o nosso grupo obteve bons resultados com o DMSO como substância carreadora.

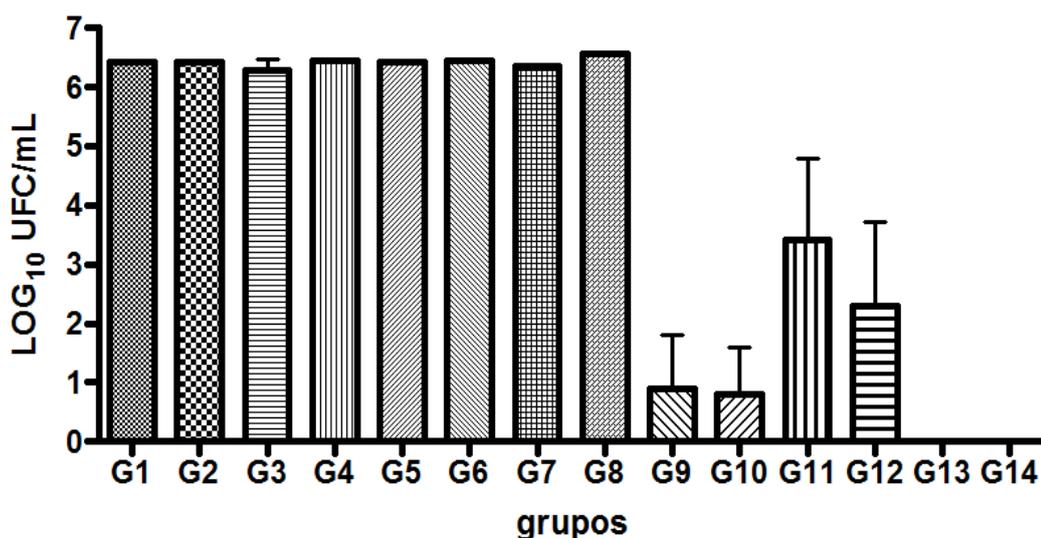


Figura 17: Redução da viabilidade celular (Log 10 UFC/mL) por inibição fotodinâmica antimicrobiana (aIFD) empregando a amostra teste MIE da espécie *M. furfur* e o diodo de emissão de luz (LED) a 630nm e usando-se o fotoabsorvedor azul de ortotoluidina (AOT) na concentração de 25 µM e como substancias candidatas a carreadores Tween 40 (T40), Tween 80 (T80), Glicerol (GL) e Dimetil sulfóxido (DMSO). **Grupos Controles da experimentação:** G1: sem tratamento, G2: 60 J/cm² de dose de irradiação por diodo de emissão de luz (LED) à 630 nm sem a adição do azul de ortotoluidina (AOT) com qualquer carreador. G3: 25 µM de AOT mais 5 minutos de incubação sem uso do LED, G4: 25 µM de AOT e suplementado com 1% de T40 e 0,1% de T80 mais 5 minutos de incubação sem uso do LED, G5: 25 µM de AOT e suplementado com 1% de T40 mais 5 minutos de incubação sem uso do LED, G6: 25 µM de AOT e suplementado com 0,1% de T80 mais 5 minutos de incubação sem uso do LED, G7: 25 µM de AOT e suplementado com 0,5% de GL mais 5 minutos de incubação sem uso do LED, G8: 25 µM de AOT e suplementado com 0,25% de DMSO mais 5 minutos de incubação sem uso do LED. **Grupos tratados:** G9: aIFD usando 25 µM de AOT mais 5 minutos de incubação e 60 J/cm² de dose de irradiação do LED, G10: aIFD usando 25 µM de AOT e suplementado com 1% de T40 e 0,1% de T80 mais 5 minutos de incubação e 60 J/cm² de dose de irradiação do LED, G11: aIFD usando 25 µM de AOT e suplementado com 1% de T40 mais 5 minutos de incubação e 60 J/cm² de dose de irradiação do LED, G12: aIFD usando 25 µM de AOT e suplementado com 0,1% de T80 mais 5 minutos de incubação e 60 J/cm² de dose de irradiação do LED, G13: aIFD usando 25 µM de AOT e suplementado com 0,5% de glicerol mais 5 minutos de incubação e 60 J/cm² de dose irradiação do LED e G14: aIFD usando 25 µM de AOT e suplementado com 0,25% de DMSO mais 5 minutos de incubação e 60 J/cm² de dose irradiação do LED.

7.3.3 Padronização da dose de irradiação

A partir da seleção do DMSO como substância carreadora a ser usada juntamente com AOT, o foco da padronização passou a ser a quantidade (intensidade) de irradiação do LED. Para tanto, foram feitos experimentos para verificar qual o menor tempo de irradiação que possibilitaria a maior redução do número de células viáveis. Desse modo, foram escolhidos 48, 54 e 60 J/cm² como dose de irradiação a serem testados com o LED vermelho emitindo a 630 nm. O fotoabsorvedor AOT a 25 µM foi suplementado com o DMSO para 0,25%. O tempo de incubação foi de 5 minutos e a amostra testada foi a MIE referente a espécie *M. furfur*.

Os resultados mostraram que nenhum dos grupos controle experimentais sofreu quaisquer redução significativa na viabilidade celular (Figura 18, grupos 1 a 6). Estes dados corroboram os resultados anteriores, expostos no presente trabalho,

demonstrando novamente que o uso do LED ou AOT, quando aplicados isoladamente, não são suficientes para levar à morte celular. O DMSO quando usado a 0,25% também não demonstrou citotoxicidade (Figura 18 grupo 6). Para o grupo 7, em que se empregou a aIFD como dose de irradiação 48 J/cm², não houve uma diferença significativa na redução de células viáveis em relação ao controle sem tratamento. Observou-se uma diferença significativa da redução de células viáveis quando a aIFD foi feita com dose irradiação de 54 e 60 J/cm² (Figura 18 grupos 8 e 9). Particularmente, o grupo 9, em que se empregou 60 J/cm² como dose de irradiação, foi o mais eficiente.

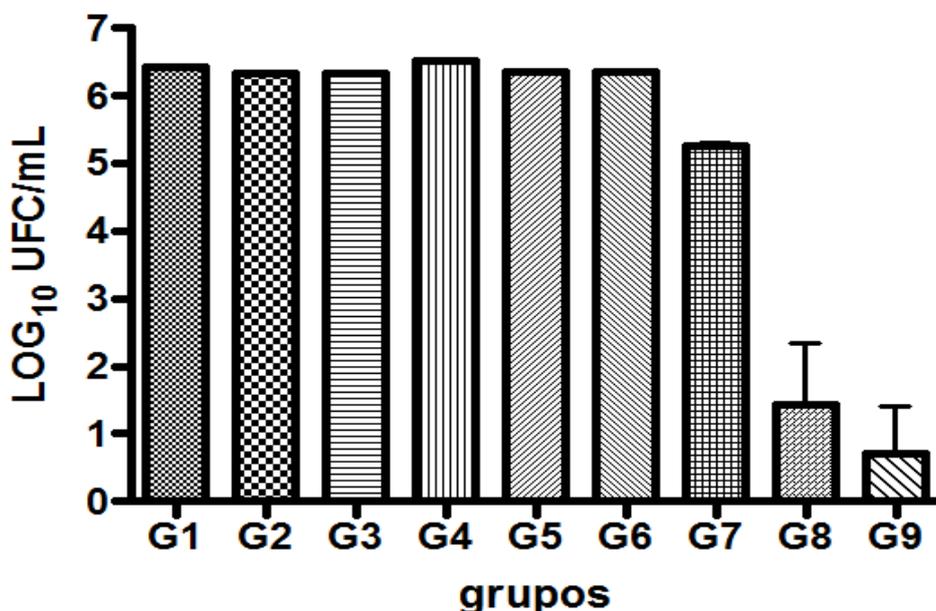


Figura 18: Redução da viabilidade celular (Log 10 UFC/mL) por inibição fotodinâmica antimicrobiana (aIFD) da amostra teste MIE referente à espécie *M. furfur* após o uso do diodo de emissão de luz (LED) a 630 nm com doses de 48, 54 e 60 J/cm² e usando-se o fotoabsorvedor azul de ortotoluidina (AOT) na concentração de 25 µM suplementado com DMSO a 0,25%. **Grupos Controles da experimentação:** G1: sem tratamento, G2: dose de irradiação de 48 J/cm² por diodo de emissão de luz (LED) a 630 nm. G3: dose de irradiação por 54 J/cm² por diodo de emissão de luz (LED) a 630 nm, G4: dose de irradiação de 60 J/cm² por diodo de emissão de luz (LED) a 630 nm, G5: 25 µM de AOT e suplementado com 0,25% de DMSO mais 5 minutos de incubação sem uso do LED, G6: 0,25% de DMSO mais 5 minutos de incubação sem uso do LED. **Grupos tratados** G7: aIFD usando 25 µM de AOT e suplementado com 0,25% de DMSO mais 5 minutos de incubação e 48 J/cm² como dose de irradiação do LED, G8: aIFD usando 25 µM de AOT e suplementado com 0,25% de DMSO mais 5 minutos de incubação e 54 J/cm² como dose de irradiação do LED e G9: aIFD usando 25 µM de AOT e suplementado com 0,25% de DMSO mais 5 minutos de incubação e 60 J/cm² como dose de irradiação do LED vermelho (630nm).

7.3.4 Padronização do Tempo de Incubação

Após ser fixada a dose de irradiação em 60 J/cm², o interesse do estudo passou a ser a padronização do tempo de incubação. Para tanto, foram testados

três tempos de incubação (5 minutos, 3 minutos e 1 minuto). A concentração do AOT usada foi de 25 μM com DMSO a 0,25% e a amostra teste foi, mais uma vez a MIE.

Os resultados para os grupos controle experimentais foram extremamente parecidos e ademais nenhum dos grupos sofreu quaisquer reduções significativas na viabilidade celular (Figura 19 grupos 1 a 5). Em relação aos grupos tratados, os grupos 6 e 7, que representam um tempo de incubação de 5 e 3 minutos, respectivamente, apresentaram redução significativa no número de células viáveis. No entanto, o grupo 7 apresentou uma redução de 6.5 Log_{10} UFC/mL, sendo, portanto, o mais eficiente. Quando o tempo de incubação usado foi de apenas 1 minuto (grupo 8) não houve diferença significativa em relação aos grupos controle na diminuição da viabilidade celular.

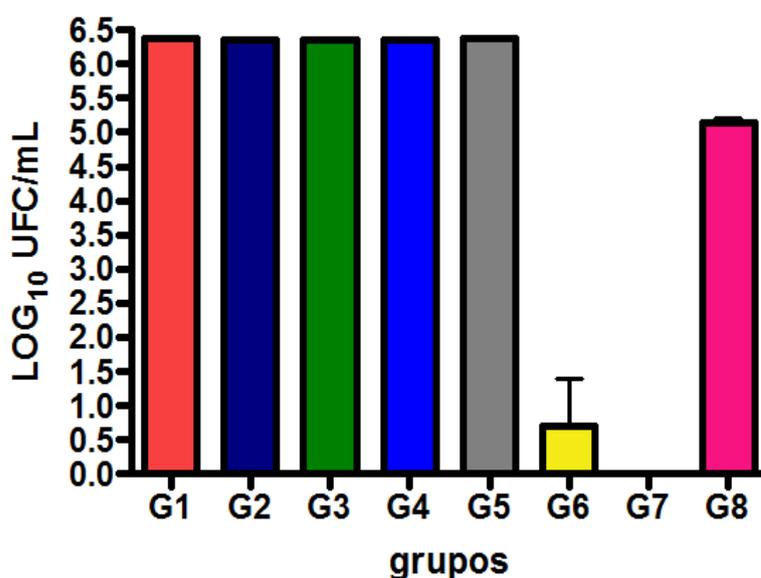


Figura 19: Redução da viabilidade celular (Log 10 UFC/mL) por Inibição fotodinâmica antimicrobiana (aIFD) da amostra teste MIE referente à espécie *M. furfur* após o uso do diodo de emissão de luz (LED) a 630nm e dose de irradiação de 60 J/cm^2 usando-se o fotoabsorvedor azul de ortotoluidina (AOT) na concentração de 25 μM suplementado com DMSO à 0,25% e variando os tempos de incubação em 5, 3, e 1 minuto. **Grupos Controles da experimentação:** G1: sem tratamento, G2: dose de irradiação de 60 J/cm^2 por diodo de emissão de luz (LED) à 630 nm, G3: 25 μM de AOT e suplementado com 0,25% de DMSO mais 5 minutos de incubação e sem uso do LED, G4: 25 μM de AOT e suplementado com 0,25% de DMSO mais 3 minutos de incubação e sem uso do LED, G5: 25 μM de AOT e suplementado com 0,25% de DMSO mais 1 minutos de incubação sem uso do LED. **Grupos tratados** G6: aIFD usando 25 μM de AOT e suplementado com 0,25% de DMSO mais 5 minutos de incubação e 60 J/cm^2 dose de irradiação do LED, G7: aIFD usando 25 μM de AOT e suplementado com 0,25% de DMSO mais 3 minutos de incubação e 60 J/cm^2 dose de irradiação do LED e G8: aIFD usando 25 μM de AOT e suplementado com 0,25% de DMSO mais 1 minutos de incubação e 60 J/cm^2 dose de irradiação do LED.

7.3.5 Padronização da Concentração do Ortotoluidina (AOT)

Tendo definido o tempo de pré-irradiação em 3 minutos, o próximo objetivo foi tentar diminuir a concentração do AOT, mas sem que houvesse perda na eficiência da redução de viabilidade celular. Desse modo, foram feitos experimentos usando o AOT nas concentrações de 20, 15, 10 e 5 μM . O tempos de incubação e a dose de irradiação foram mantidos em 3 minutos e em 60 J/cm^2 e a concentração do DMSO foi mantida em 0,25%. A amostra teste usada foi MIE.

Os resultados demonstraram que os grupos controle da experimentação não sofreram alterações significativas na viabilidade celular (Tabela 22, grupos 1 a 3). Pode-se notar também que o número de células viáveis, expressos em LOG_{10} UFC/mL, permaneceu muito próximo em relação aos grupos controles do que foi verificado em resultados anteriores. Com relação aos grupos tratados, observou-se 100% de morte para todos, mesmo quando usadas concentrações muito baixas de 5 μM (Tabela 22, grupo 7).

Tabela 22: Redução da viabilidade celular (Log_{10} UFC/mL) por Inibição fotodinâmica antimicrobiana (aIFD) da amostra teste MIE referente à espécie *M. furfur* após o uso do diodo de emissão de luz (LED) com emissão a 630 nm e usando-se o fotoabsorvedor azul de ortotoluidina (AOT) nas concentrações 20 μM , 15 μM , 10 μM e 5 μM . O tempo de incubação foi de 3 minutos e a dose de irradiação foi de 60 J/cm^2 .

Grupos	Repetições						MÉDIA
	LOG_{10} UFC/mL						
G1	6,33	6,32	6,31	6,37	6,35	6,34	6,34
G2	6,31	6,35	6,30	6,32	6,38	6,33	6,33
G3	6,30	6,35	6,39	6,37	6,33	6,36	6,35
G4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Grupos Controles da experimentação: G1: sem tratamento, G2: 60 J/cm^2 de dose de irradiação por diodo de emissão de luz (LED) à 630 nm sem a adição do azul de ortotoluidina (AOT), G3: 20 μM de AOT mais 3 minutos de incubação sem uso do LED. **Grupos tratados:** G4: aIFD usando 20 μM de AOT mais 3 minutos de incubação e 60 J/cm^2 de dose de irradiação do LED; G5: aIFD usando 15 μM de AOT mais 3 minutos de incubação e 60 J/cm^2 de dose de irradiação do LED, G6: aIFD usando 10 μM de AOT mais 3 minutos de incubação e 60 J/cm^2 de dose de irradiação do LED e G7: aIFD usando 5 μM de AOT mais 3 minutos de incubação e 60 J/cm^2 de dose de irradiação do LED.

7.3.6 Teste da aIFD para as Demais Amostras

O teste da concentração de AOT foi finalizado e, com isso, as condições de padronização ficaram estabelecidas da seguinte forma: tempo de incubação 3 minutos, dose de irradiação 60 J/cm², concentração do AOT 5 µM e percentual do DMSO a 0,25%. A partir disso a próxima meta foi aplicar aIFD para múltiplas amostras em acordo com a padronização estabelecida. As amostras iniciais usadas foram 4850 e 5389 ambas pertencentes a espécie *M. furfur*.

Os resultados mostram que não houve uma diminuição significativa de viabilidade celular dos dois grupos controles, 1 e 2, (Tabela 23, controle positivo de crescimento e controle da citotoxicidade do AOT suplementado com DMSO). O grupo tratado, para as duas amostras testadas, não apresentou uma redução significativa do número de células viáveis em relação aos grupos controles. Houve uma redução de 1,27 Log₁₀ UFC/mL para a amostra 4850 e 1,39 Log₁₀ UFC/mL para a amostra 5389 (Tabela 23, grupo 3).

Tabela 23: Redução da viabilidade celular (Log₁₀ UFC/mL) por Inibição fotodinâmica antimicrobiana (aIFD) das amostras 4850 e 5389, da espécie *M. furfur*, após o uso do diodo de emissão de luz (LED) com emissão de 630nm e usando-se o fotoabsorvedor azul de ortotoluidina (AOT) na concentração de 5 µM. O tempo de incubação foi de 3 minutos e dose de irradiação de 60 J/cm².

Amostras	4850			5389		
			Média			Média
G1	6,46	6,44	6,45	6,44	6,51	6,46
G2	6,45	6,45	6,45	6,52	6,50	6,51
G3	5,08	5,26	5,18	5,18	5,00	5,09
	Redução de: 1,27LOG			Redução de: 1,39LOG		

Grupos Controles da experimentação: G1: sem tratamento, G2: 20 µM de AOT mais 3 minutos de pré-irradiação sem uso do LED. **Grupo tratado:** G3: aIFD usando 5 µM de AOT e suplementado com 0,25% de DMSO mais 3 minutos de pré-irradiação e 60 J/cm² de dose de irradiação do LED. As amostras testadas foram a 4850 e 5389 referentes a espécie *M. furfur*.

A partir de então, novos testes de padronização foram feitos com as amostras 4850 e 5389 com o intuito de diminuir a viabilidade celular. Dessa forma, foi modificada a concentração de uso do AOT para 25 µM e também se modificou o tempo de incubação para 5 minutos. As demais condições experimentais foram mantidas. Com as novas condições otimizadas, foi feito um novo experimento. As condições finais de padronização ficaram estabelecidas da seguinte forma: tempo de incubação de 5 minutos, dose de irradiação 60 J/cm², concentração do AOT 25 µM e

percentual do DMSO 0,25%. Foram testadas as espécies: *M. furfur*, *M. globosa*, *M. japonica*, *M. slooffiae*, *M. pachydermatis*, *M. yamatoensis* e *M. sympodialis*, somando um total de 47 amostras.

Os resultados demonstraram que os dois grupos controles de experimentação (Figura 20) permaneceram inalterados quanto à viabilidade celular. Quanto ao grupo tratado, pode-se notar uma redução significativa de 1,4 Log₁₀ UFC/mL em relação à média dos grupos controles. No entanto, este resultado permaneceu insatisfatório.

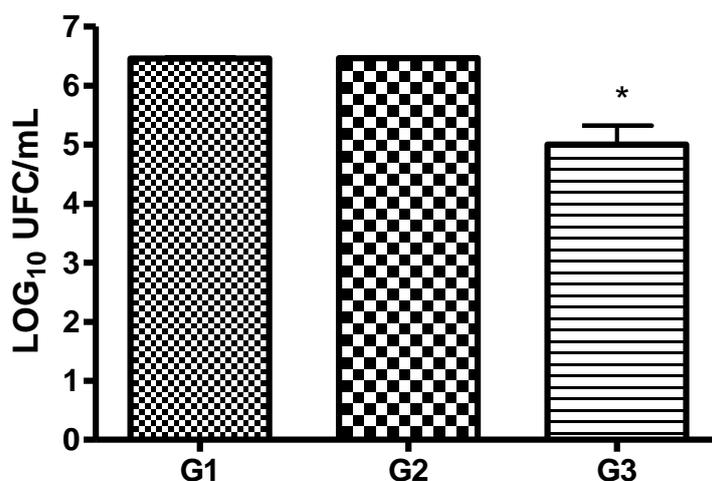


Figura 20: Redução da viabilidade celular (Log₁₀ UFC/mL) por Inibição fotodinâmica antimicrobiana (aIFD) de 47 amostras do gênero *Malassezia* compreendendo as espécies *M. furfur*, *M. sympodialis*, *M. pachydermatis*, *M. globosa*, *M. slooffiae*, *M. yamatoensis*. **Grupos Controle da experimentação:** G1: sem tratamento, G2: 25 µM de AOT suplementado de 0,25% de DMSO mais 5 minutos de incubação sem uso do LED. **Grupo tratado:** G3: aIFD usando 25 µM de AOT e suplementado com 0,25% de DMSO mais 5 minutos de incubação e 60 J/cm² de dose de irradiação do LED.

Os resultados globais demonstraram que para esse modelo de aIFD, usando-se o AOT como fotoabsorvedor, ainda seriam necessários novos testes para torna-los mais eficiente.

7.4 AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES DAS ENZIMAS CATALÍTICAS LACASE, SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)

Para verificar as prováveis causas da resistência das leveduras, frente ao modelo de tratamento *in vitro* com o LED vermelho, foram feitas análises bioquímicas com o objetivo de analisar se algumas amostras de leveduras possuíam algum mecanismo para interromper ou neutralizar a formação de oxigênio singlete ou de espécies reativas do oxigênio. Com esse objetivo, foi feita a mensuração da enzima superóxido dismutase (SOD) para verificar a perda oxidativa nas reações

e/ou a interrupção na formação de espécies reativas de oxigênio. Para tanto, foram utilizadas quatro amostras, sendo uma amostra muito resistente (5389), duas amostras com resistência intermediária (4850, T5) e uma amostra que foi susceptível ao tratamento pela aIFD usando-se o LED vermelho (630 nm), mantendo-se todas as condições padronizadas e empregadas anteriormente.

Os resultados demonstraram que a amostra resistente (5389) produziu uma quantidade estatisticamente maior de SOD em relação às outras três amostras 4850, T5 e MZ2 (Figura 21). Este dado indica a capacidade que algumas amostras do gênero *Malassezia* teriam em produzir SOD, a qual poderia estar relacionada a maior resistência ao tratamento por aIFD usando-se a luz vermelha.

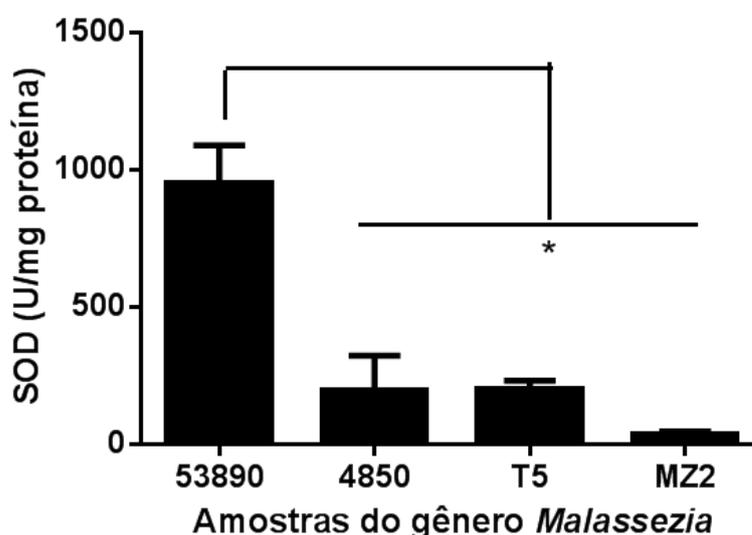


Figura 21: Atividade da superóxido dismutase para as amostras MZ2 (susceptível à aIFD), 4850 (media resistência a aIFD), T5 (media resistência a aIFD) e 5389 (resistente à IFD). $P > 0,005$

Em seguida, foi mensurada a formação da enzima lacase para verificar se existiria alguma relação entre a sua produção e a resistência fúngica ao tratamento por aIFD usando-se o LED vermelho (630 nm). Estes dados são exibidos na figura 22. Para a realização do experimento foram utilizadas duas amostras: a amostra MZ2, susceptível ao tratamento pela aIFD com LED vermelho, e a amostra 5389 que foi muito resistente ao mesmo tratamento. Os resultados demonstraram que para a amostra susceptível, MZ2, não houve diferença estatística na produção de lacase entre o grupo tratado e o grupo não tratado. No entanto, para a amostra 5389, resistente ao tratamento, observou-se diferença estatística na produção de lacase entre o grupo tratado e o grupo não tratado, diferença que foi também registrada comparativamente aos dois grupos, não tratado e tratado, da amostra MZ2,

susceptível ao tratamento. Mais uma vez, verificou-se que a produção de enzimas catalíticas oxidativas, no caso a lacase, poderia estar relacionada a um padrão de menor susceptibilidade de algumas amostras do gênero *Malassezia* ao tratamento pela aIFD com o LED vermelho (630 nm) e AOT como fotoabsorvedor.

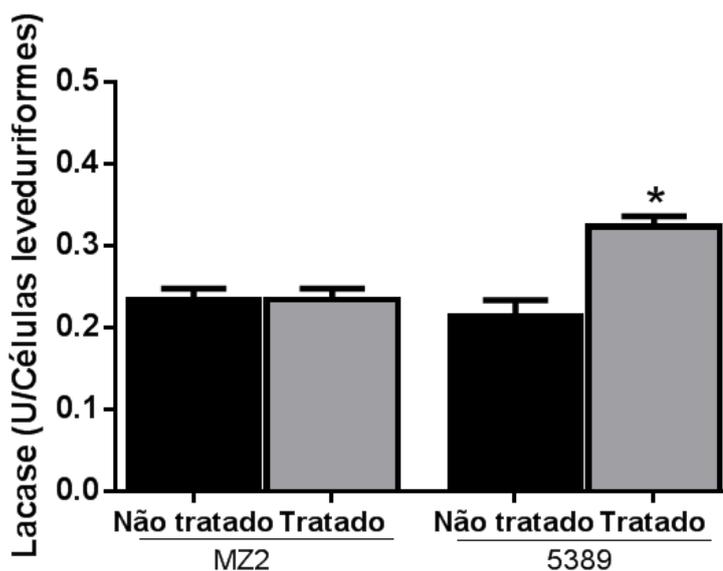


Figura 22: Atividade da Lacase para as amostras MZ2 (não resistente à aIFD) 5389 (resistente à IFD). Uma unidade enzimática foi calculada através do número de células de *Malassezia* versus a atividade de lacase após 16 horas de incubação.

7.5 MENSURAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ERGOSTEROL DE AMOSTRAS DO GÊNERO *Malassezia*

Posteriormente foi pesquisada a integridade da membrana celular fúngica após o tratamento com aIFD, nas condições previamente descritas. Para atender a esse objetivo, foi mensurada a quantidade de ergosterol entre uma amostra susceptível (MZ2) e uma amostra resistente (5389) à aIFD. Os resultados apresentados na figura 23 mostraram que os grupos tratados das duas amostras apresentaram níveis mais elevados de ergosterol do que os grupos não tratados. A amostra 5389 resistente à aIFD apresentou níveis ainda mais elevados de ergosterol e uma diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos tratados e aos grupos não tratados. De fato, a amostra resistente, quando tratada, produziu mais ergosterol comparativamente à amostra não resistente, para os seus dois grupos, não tratado e tratado. Quando comparados aos dois grupos da amostra não

resistente (MZ2), tratado e não tratado, observou-se que o grupo tratado apresentou uma quantidade maior de ergosterol e uma diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo não tratado.

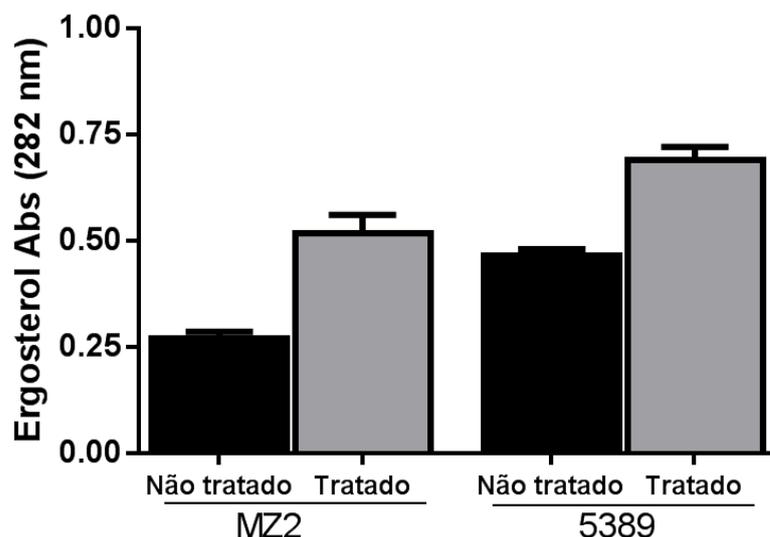


Figura 23: Quantificação do ergosterol da membrana celular fúngica para as amostras MZ2 (Não resistente à aIFD) e 5389 (resistente à aIFD). Os resultados foram expressos de modo a comparar o percentual de ergosterol em relação ao controle de crescimento.

7.6 LED AZUL E SUBSTÂNCIA C

7.6.1 Concentrações Iniciais de Substância C e Dose de Irradiação

Um segundo modelo de aIFD usando o LED de luz azul que emite em 430 nm também foi testado. O fotoabsorvedor que foi usado em conjunto com o LED de luz azul foi a substância C e a sua formulação está sob processo de patente (Laboratório de Bioengenharia da UFMG - LABBIO). Os testes de aIFD foram feitos com a amostra 5389 da espécie *M. furfur*. Inicialmente foram testadas as concentrações de 5,0 μM e 10 μM para a padronização da substância C. Concomitantemente, foram utilizadas três doses de irradiação, sendo estas: 3 minutos (12 J/cm^2), 6 minutos (24 J/cm^2) e 8 minutos (32 J/cm^2). Cada dose de irradiação foi testada com cada uma das duas concentrações iniciais. O tempo de incubação do inóculo com a substância C foi de cinco minutos para todos os experimentos, sem exceções. Os resultados demonstram que os grupos controles de experimentação (Figura 24, grupos 1 a 6) não sofreram alterações significativas na viabilidade celular. O mesmo resultado foi

observado para os grupos tratados (Figura 24, grupos 7 a 10) que não sofreram uma diminuição na viabilidade celular. Em particular, o grupo 10 obteve a maior redução de número de células viáveis.

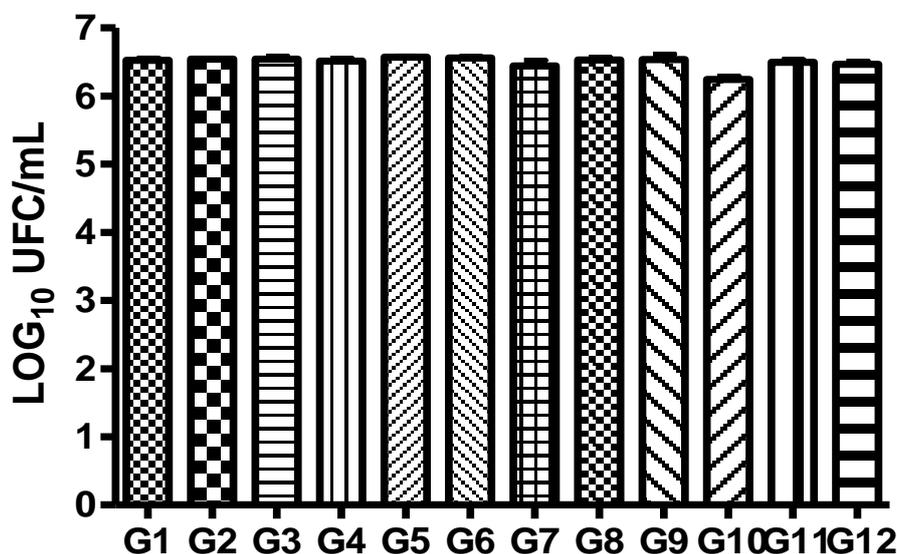


Figura 24: Redução da viabilidade celular (Log_{10} UFC/mL) por Inibição fotodinâmica antimicrobiana (aIFD) empregando a amostra teste 5389 referente à espécie *M. furfur*, o LED azul emitindo a 430 nm, o fotoabsorvedor substância C e variando as doses de irradiação em 12, 24 e 32 J/cm². **Grupos Controles da experimentação 1:** G1: sem tratamento, G2: *M. furfur* + dose de irradiação de 12 J/cm², G3: *M. furfur* + dose de irradiação de 24 J/cm², G4: *M. furfur* + dose de irradiação de 32 J/cm², G5: *M. furfur* + Substância C 5 μM , G6: *M. furfur* + Substância C 10 μM . **Grupos tratados:** G7: aIFD (Substância C 5 μM + 12 J/cm²), G8: aIFD (Substância C 5 μM + 24 J/cm²) G9: aIFD (Substância C 5 μM + 32 J/cm²), G10: aIFD (Substância C 10 μM + 12 J/cm²), G11: aIFD (Substância C 10 μM + 24 J/cm²), G12: aIFD (Substância C 10 μM + 32 J/cm²).

7.6.2 Concentrações mais Elevadas de Substância C

A partir dos dados anteriores, foram usadas concentrações maiores para a padronização. Os resultados demonstram que nenhum dos grupos controles experimentais apresentou diminuição significativa da viabilidade celular (Figura 25, grupos 1 a 4). Particularmente, os valores de Log_{10} UFC/mL dos grupos controles em que se usou a substância C foram muito parecidos com os grupos controles em que se usou AOT como foto absorvedor. Com relação aos grupos tratados, a redução mais interessante foi observada no grupo 10 (aIFD - Corante C 100 μM + 24 J/cm²), em relação à média dos grupos tratados. Quando comparados os resultados do grupo 10 com os dos grupos controles observou-se diferença, com redução de 1,2 Log_{10} UFC/mL. A figura 25 mostra os resultados da padronização obtidos com a substância C empregado junto com o LED Azul.

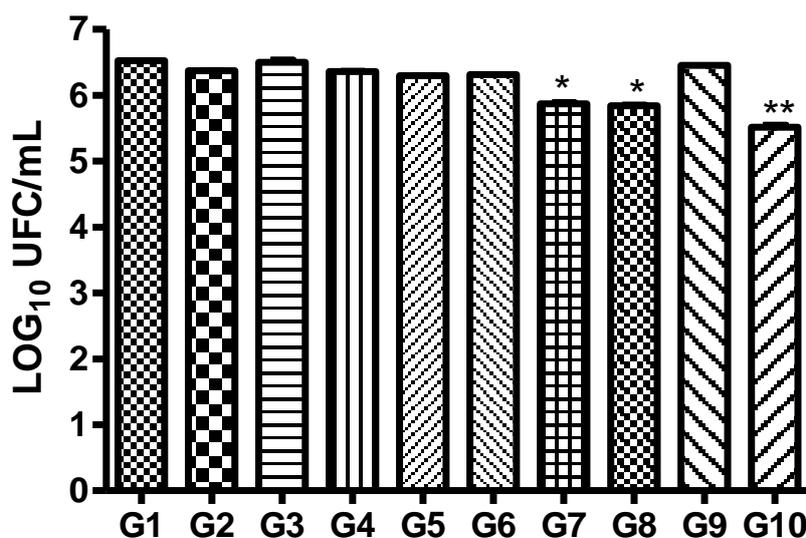


Figura 25: Redução da viabilidade celular (Log_{10} UFC/mL) por Inibição fotodinâmica antimicrobiana (aIFD) empregando a amostra pilto 5389 referente à espécie *M. furfur*, o LED azul emitindo a 430 nm, com dose de irradiação de 24 J/cm^2 e variando as concentrações do fotoabsorvedor substância C (25, 50 e $100 \mu\text{M}$). **Grupos Controles da experimentação 1:** G1: sem tratamento, G2: *M. furfur* + Substância C $25 \mu\text{M}$, G3: *M. furfur* + Substância C $50 \mu\text{M}$, G4: *M. furfur* + Substância C $100 \mu\text{M}$. **Grupos tratados:** G5: aIFD (Substância C $25 \mu\text{M}$ + 12 J/cm^2), G6: aIFD (Substância C $25 \mu\text{M}$ + 24 J/cm^2) G7: aIFD (Substância C $50 \mu\text{M}$ + 12 J/cm^2), G8: aIFD (Substância C $50 \mu\text{M}$ + 24 J/cm^2), G9: aIFD (Substância C $100 \mu\text{M}$ + 12 J/cm^2), G10: aIFD (Substância C $100 \mu\text{M}$ + 24 J/cm^2).

7.6.3 Análise do percentual de dimetil sulfóxido (DMSO)

Posteriormente, com as condições da concentração da substância C e a dose de irradiação já estabelecidas em $100 \mu\text{M}$ e 24 J/cm^2 , respectivamente, analisou-se se o acréscimo de DMSO poderia influenciar no carreamento da substância C para o interior da célula. Deste modo, adicionou-se DMSO a 0,25%, 0,75% e 1,0% em relação ao volume de substância C. Foi proposto também um grupo tratado em que se empregou água ultra-pura no lugar do DMSO. Os resultados demonstram que os grupos controles da experimentação (Figura 26, grupo 1 a 6) não sofreram qualquer diferença significativa na concentração de células viáveis. No entanto, todos os grupos tratados (Figura 26, grupo 7 a 11) mostraram uma diferença significativa em relação aos grupos controles. Em particular, o grupo 11 foi o que apresentou o melhor resultado com uma redução de 4.6 Log_{10} UFC/mL em relação à média dos grupos controles.

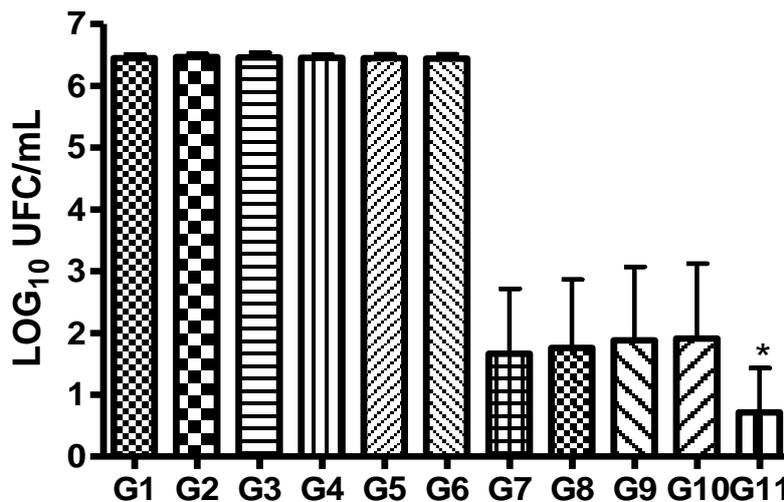


Figura 26: Redução da viabilidade celular (Log_{10} UFC/mL) por Inibição fotodinâmica antimicrobiana (aFD) empregando a amostra teste 5389 referente à espécie *M. furfur*, o LED azul emitindo a 430 nm, com dose de irradiação de 24 J/cm^2 e o fotoabsorvedor substância C a $100 \mu\text{M}$ adicionado de DMSO variando de 0,25%, 0,5%, 0,75% e 1% e água ultra-pura. **Grupos Controles da experimentação:** G1: sem tratamento, G2: *M. furfur* + Substância C $100 \mu\text{M}$ + H_2O , G3: *M. furfur* + Substância C $100 \mu\text{M}$ + 0,25% de DMSO, G4: *M. furfur* + Substância C $100 \mu\text{M}$ + 0,5% de DMSO, G5: *M. furfur* + Substância C $100 \mu\text{M}$ + 0,75% de DMSO e G6: *M. furfur* + Substância C $100 \mu\text{M}$ + 1% de DMSO **Grupos tratados:** G7: aFD (Substância C $100 \mu\text{M}$ + 24 J/cm^2 + 0,25% de DMSO), G8: aFD (Substância C $100 \mu\text{M}$ + 24 J/cm^2 + 0,5% de DMSO) G9: aFD (Substância C $100 \mu\text{M}$ + 24 J/cm^2 + 0,75% de DMSO), G10: aFD (Substância C $100 \mu\text{M}$ + 24 J/cm^2 + 1% de DMSO), G11: aFD (Substância C $100 \mu\text{M}$ + 24 J/cm^2 + H_2O).

7.6.4 Teste da aFD com LED azul mais substância C frente a todas as amostras de *M. furfur*

Após a padronização, foi feito o teste da aFD para todas as amostras pertencentes à espécie *M. furfur*. As condições finais estabelecidas indicam que a melhor condição para o tratamento com 5 minutos de incubação, $100 \mu\text{M}$ de substância C e uma dose de irradiação de 24 J/cm^2 (6 minutos). Os resultados demonstraram que os dois grupos controles de experimentação (Figura 27, grupos 1 e 2) permaneceram inalterados quanto à viabilidade celular. Quanto ao grupo tratado (Figura 27, grupo 3) pode-se notar uma redução significativa de $1,7 \text{ Log}_{10}$ UFC/mL em relação à média dos grupos controle. Estes dados indicam que mais experimentos devem ser realizados com terapia fotodinâmica usando-se o LED azul de modo a obter melhores condições para induzir à morte celular um número maior de amostras de *furfur*.

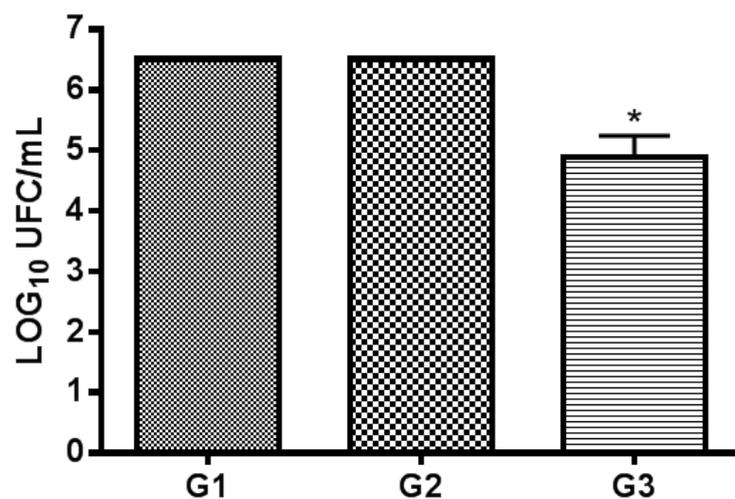


Figura 27: Redução da viabilidade celular (Log_{10} UFC/mL) por Inibição fotodinâmica antimicrobiana (aIFD) empregando-se todas as amostras de *M. furfur*, LED azul a 430nm com dose de irradiação de $24\text{J}/\text{cm}^2$. **Grupos Controle da experimentação:** G1: sem tratamento, G2: $100\ \mu\text{M}$ de substancia C mais 5 minutos de incubação sem uso do LED mais inóculo. **Grupo tratado:** G3: aIFD usando $100\ \mu\text{M}$ de substância C mais 5 minutos de incubação e $24\ \text{J}/\text{cm}^2$ de dose de irradiação do LED.

8. DISCUSSÃO

No presente trabalho, realizou-se a identificação molecular de uma coleção de amostras de leveduras do gênero *Malassezia* com base no sequenciamento, alinhamento e comparação de sequências das regiões D1/D2 do gene codificador da subunidade maior do DNA ribossomal. É interessante observar que, até a década passada, a identificação de espécies do gênero *Malassezia* era realizada essencialmente por métodos microbiológicos e bioquímicos (metabólicos). Desde a sua introdução, os métodos moleculares se fizeram muito úteis para a taxonomia das espécies do gênero *Malassezia* (Guillot e Guého, 1995; Guého et al., 1996). Fell e colaboradores (2000) realizaram a taxonomia molecular dos Basidiomicetos, utilizando, pela primeira vez, as regiões D1/D2 do gene codificador da subunidade maior do DNA ribossomal. Para tanto, foram usadas 337 amostras representando 230 espécies. Os resultados demonstraram que a maioria das amostras poderia ser identificada a partir da região D1/D2. De fato, sete novas espécies foram descobertas a partir do uso taxonômico da região D1/D2, com ou sem o auxílio combinado da região ITS dos genes ribossomais, acrescido ao já tradicional emprego de técnicas bioquímicas e micromorfológicas, visando à identificação específica de amostras do gênero *Malassezia* (Carfachia et al., 2012). As sete novas espécies são: *M. dermatis* (Sukita et al., 2002), *M. equina* (Nell et al., 2002), *M. japonica* (Sukita et al., 2003), *M. nana* (Hirai et al., 2004), *M. yamatoensis* (Sukita et al., 2004), *M. caprae* (Cabañes et al., 2007) e *M. cuniculi* (Cabañes et al., 2011). As citações e sucessiva utilização após a sua introdução demonstram a importância de se utilizar a região D1/D2 para a classificação sistemática de amostras das espécies do gênero *Malassezia*, corroborando, dessa forma, os dados do presente trabalho.

Em função da existência dos múltiplos padrões polimórficos observados neste estudo, 36 padrões distintos gerados entre 51 amostras de sete espécies, considerou-se a PCR *fingerprinting* (GTG)₅ foi ineficaz para o agrupamento com base em similaridade genética, objetivando uma triagem preliminar de espécies do gênero *Malassezia*. Para *Malassezia* spp. não existem na literatura científica artigos referentes à utilização de (GTG)₅ com o intuito de agrupar amostras visando a sua identificação preliminar, sendo esta a primeira vez que tal técnica foi utilizada com esse objetivo. Apesar de ter-se mostrado pouco eficiente no presente trabalho, o iniciador (GTG)₅ encontra emprego significativo no agrupamento por similaridade

genética de outros grupos microbianos como objetivo sua identificação. Não obstante, García-Hernández e colaboradores (2012) com o intuito de identificar e caracterizar, *in vitro*, amostras de leveduras para verificar o seu potencial probiótico em aves de produção, utilizaram, dentre outros iniciadores, o oligonucleotídeo (GTG)₅ de modo a agrupar por similaridade genética amostras de leveduras. Realmente, ali foram observados padrões de bandas muito similares por PCR *fingerprinting* (GTG)₅ para as amostras que pertenciam à mesma espécie, tendo-se revelado, nesse caso, uma abordagem eficiente. Brandão e colaboradores (2011) tiveram, dentre outros objetivos, o de estudar a diversidade e a frequência de leveduras em lagos da região da Patagônia argentina. Para o agrupamento das amostras, foram utilizados os oligonucleotídeos sintéticos (GTG)₅ e a sequência do fago M13 (GAGGGTGGCGGTTCT). Os resultados demonstraram que o conjunto de MSP-PCR *fingerprinting* (amplificação de polimorfismo de microssatélites, a partir de PCR) foi satisfatório, uma vez que de um total de 149 amostras de leveduras isoladas geraram-se apenas 12 grupos.

Alguns outros métodos de tipagem molecular têm-se mostrado úteis na caracterização das espécies do gênero *Malassezia*. Theelen e colaboradores (2001) utilizaram as metodologias de AFLP e RAPD para agrupar amostras das espécies: *M. furfur*, *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. pachydermatis*, *M. restricta*, *M. slooffiae* e *M. sympodialis* isoladas nos EUA e na Europa. Os agrupamentos gerados pela técnica AFLP apresentaram bons resultados, e para a técnica de RAPD, foi observada considerável heterogeneidade dentre as amostras de *M. furfur*. Da mesma forma, Gupta e colaboradores (2004b) utilizaram a metodologia de AFLP *fingerprint* para agrupar amostras de *Malassezia* oriundas da Europa e da América do Norte. Os resultados também foram, de certa forma, satisfatórios ao utilizar o AFLP para agrupar amostras de *Malassezia*. Porém, o autor também observou um polimorfismo extenso entre as amostras de uma mesma espécie.

Do ponto de vista do diagnóstico clínico das malassezioses estudadas no presente trabalho, verificou-se que as 10 amostras de origem veterinária foram obtidas de cães que apresentavam otite e pertencem à espécie *M. pachydermatis*. Essa espécie, de acordo com a literatura, faz parte da microbiota indígena de gatos e de cães. Com relação às patologias correlacionadas aos cães, pode-se dizer que as otites externas e do ouvido médio são causadas por múltiplos fatores e estão entre as causas mais frequentes de adoecimento de animais (Rosser et al., 2004).

Ademais, *M. pachydermatis* é responsável por até 80% dos casos de otite externa (Crespo et al., 2000b; Reme et al., 2006; Saridomichelakis et al., 2007).

Quanto à predominância de espécies identificadas em casos clínicos humanos, a maioria das amostras isoladas pertenceu à espécie *M. furfur* (39%), seguindo-se *M. sympodialis* com 20% das amostras. Em proporções menores, encontrou-se *M. globosa* (~8%), *M. japonica* (~6%), *M. slooffiae* e *M. yamatoensis*, cada uma das duas últimas com cerca de 4% das amostras. Todas as espécies acima mencionadas já foram relacionadas à etiologia das malassezioses.

É preciso destacar que algumas espécies identificadas neste trabalho, mais precisamente, *M. japonica* e *M. yamatoensis*, são de raro isolamento e ainda não havia descrição de seu isolamento e identificação no Brasil ou mesmo, até onde se pode certificar, esse relato era também ausente da América Latina e na América do Norte.

Quando, no presente trabalho, se buscou a especificidade do diagnóstico clínico, verificou-se que as amostras aqui identificadas eram oriundas predominantemente de casos de pitíriase versicolor (77% dos casos), seguindo-se a dermatite seborreica (22%). Do ponto de vista epidemiológico, a proporcionalidade de doenças relacionadas à *Malassezia* é muito particular, já que muitas variáveis estão envolvidas tais como o clima (temperatura e umidade), a idade e o estado de saúde do hospedeiro (Batra et al., 2005; Gaitanis et al., 2012). Os casos de pitíriase versicolor possuem uma prevalência maior em lugares mais quentes, enquanto os de dermatite seborreica estão relacionados às condições de imunocompetência do hospedeiro (Gaitanis et al., 2012).

Os resultados observados na literatura, apesar de contraditórios, apresentam uma prevalência de associação principalmente das espécies *M. globosa* ou *M. sympodialis* com os casos de pitíriase versicolor. Em um estudo epidemiológico na Turquia, com 97 pacientes que apresentavam pitíriase versicolor, observou-se que aproximadamente 47% dos casos estavam associados com *M. globosa*, seguida das espécies *M. furfur* com aproximadamente 36 % e *M. slooffiae* com 15 % (Karakas et al., 2009). Na Índia, Chaudhary e colaboradores (2010) fizeram um levantamento epidemiológico para verificar que espécies estavam associadas à pitíriase versicolor, em pacientes humanos. A coleta de amostras foi realizada a partir de 87 casos pré-selecionados e a identificação das espécies envolvidas foi feita a partir de testes bioquímicos e análise da micromorfologia. Os resultados demonstraram que

aproximadamente 57% dos casos estavam associados a *M. globosa*, e em segundo plano, estavam envolvidas as espécies *M. sympodialis* com 17.2%, *M. furfur* e *M. obtusa* com aproximadamente 6% dos casos para cada espécie. Na Argentina, Ramadán e colaboradores (2012), ao realizar um levantamento epidemiológico em 264 pacientes com pitíriase versicolor, para verificar quais eram as espécies envolvidas, constataram, após testes bioquímicos e micromorfológicos, que 51% dos casos, aproximadamente, estavam envolvidos com *M. sympodialis*, seguindo-se *M. globosa* em 40% dos casos e *M. furfur* por 7%. Para o presente trabalho, observou-se uma prevalência de 36% dos casos de pitíriase versicolor para a espécie *M. furfur*, e seguida das espécies *M. sympodialis* com aproximadamente 32% dos casos, *M. globosa* e *M. japonica* com aproximadamente 11% cada. Desta forma, os dados da literatura supracitados não corroboram os do presente trabalho uma vez que a prevalência observada aqui foi para *M. furfur*. Por outro lado, *M. sympodialis* foi a segunda espécie e encontra respaldo na literatura supracitada. Contudo, nossos dados são similares aqueles de Miranda e colaboradores (2006), que realizaram um levantamento epidemiológico no estado de Goiás (Brasil), em 842 pacientes portadores de infecções fúngicas superficiais. Após uma triagem realizada por testes bioquímicos e micromorfológico, foram selecionadas 95 amostras, as quais pertenciam às espécies do gênero *Malassezia*, em que todos os casos estavam relacionados à pitíriase versicolor. Os resultados demonstraram a prevalência de *M. furfur* em aproximadamente 77% dos casos, seguida de ~11% de *M. sympodialis*, *M. obtusa* com ~8% e *M. globosa* com apenas 2% dos casos aproximadamente. Os resultados apresentados, de forma geral, demonstraram uma clara necessidade de mais estudos para uma melhor compreensão dos aspectos epidemiológicos, de ocorrência e prevalência das diversas espécies de *Malassezia* associadas à pitíriase versicolor. De fato, Gaitanis e colaboradores (2012) afirmam que os dados epidemiológicos atuais, bem como a ausência de conhecimento aos fatores de virulência de espécies distintas e as características de *M. globosa* não permitem uma conclusão definitiva sobre a prevalência dessa espécie em relação aos casos de pitíriase versicolor. Tal fato deixa em aberto a discussão sobre o real envolvimento das espécies do gênero *Malassezia* como agentes causais da pitíriase versicolor.

As espécies *M. globosa* e *M. restricta* são mais comumente isoladas da pele humana saudável e/ou com dermatite seborreica (Gupta e Kohli 2004; Gaitanis et al.,

2012). Em um levantamento epidemiológico feito na Argentina, com 226 pacientes que apresentavam lesões na pele característicos de dermatite seborreica, foram isoladas 141 amostras pertencentes ao gênero *Malassezia*. Por meio de técnicas moleculares, concluiu-se que 43% dos casos estavam associados a *M. globosa*, seguido por *M. furfur* apresentando 20% e *M. sympodialis* com 17% (Sosa et al.,2013). Da mesma forma, na China, Zhang e colaboradores (2013) coletaram amostras de pele de 146 pacientes que apresentavam sinais clínicos de dermatite seborreica. Após o isolamento das amostras e da taxonomia feita por técnicas moleculares, concluiu-se que as espécies *M. globosa* e/ou *M. restricta* estavam presentes em 87% e 81% dos pacientes, respectivamente; juntas, somavam mais de 50% dos casos de dermatite seborreica. Nos resultados obtidos no presente trabalho, observou-se uma prevalência da espécie *M. furfur* com aproximadamente 75% dos casos, seguida das espécies *M. slooffiae* e *M. globosa* com ~6% para cada espécie. Assim, os dados da literatura não confirmam os obtidos no presente trabalho. Existem algumas causas prováveis que podem levar a essa discordância. Em diversos trabalhos, não é descrito se os pacientes tinham AIDS ou eram imunossuprimidos e, de acordo com Gaitanis e colaboradores (2012), o fato de serem portadores do HIV se associa a múltiplas doenças de pele, sendo que, para a dermatite seborreica há uma prevalência de 20 a 40% dos casos para os pacientes soro-positivos e de até 80% daqueles que desenvolvem a AIDS. Deve-se, também, levar em consideração que o número de amostras, no presente trabalho, coletados de pacientes apresentando dermatite seborreica, foi menor em relação aos coletados nos trabalhos argentino e chinês, o que pode ter interferido no percentual final do resultado da associação da espécie com a patologia.

As 51 amostras de sete espécies de *Malassezia* foram testadas, neste trabalho, para determinar a CIM frente a seis antimicóticos (caspofungina, cetoconazol, clotrimazol, isoconazol, itraconazol, miconazol). É interessante resgatar as condições de execução desses testes, previamente à discussão comparativa de dados de CIM com aqueles de outros autores, pois, dados conflitantes de susceptibilidade *in vitro* a drogas antimicrobianas podem decorrer dos vários tipos de ensaios realizados. Isso se deve ao fato de diferentes autores empregarem diferentes metodologias, como a difusão em Agar (difusão de discos em Agar) ou a microdiluição em caldo quando a técnica é a de microdiluição, frequentemente empregam-se diferentes meios de cultura como o meio RPMI 1640 ou o meio de

Leeming-Notman ou o caldo Dixon. Variam-se, ainda, as condições de tempo de leitura, entre 48 a 96 horas, a suplementação dos meios de cultura que pode incluir glicerol, sais biliares, tween 40, 60 e/ou tween 80, tamanho do inóculo variando de 1×10^5 até 1×10^6 células/ml, e temperaturas de incubação entre 30°C e 37°C, entre outros aspectos, como a própria faixa intervalar. Essas variações metodológicas podem influir nos valores de CIM obtidos pelos diferentes autores (Velegraki et al., 2004; Miranda et al., 2007; Carfachia et al., 2012; Peano et al., 2012; Carrillo-Muñoz et al., 2013). Adotamos a técnica da microdiluição em caldo, segundo Rincon e colaboradores (2006), com as seguintes condições: meio de cultura ureia de Christensen suplementado com 0.1% tween 80 e 0.5% tween 40, adotando-se inóculo de 1×10^6 células/mL, obtido por meio de condições distintas para *M. globosa* (leitura a 660nm com ABS = 1.0) e para as demais espécies de *Malassezia* (leitura a 530nm com ABS= 0,425-0,435), tempo de incubação de 72 horas em temperatura de ~30°C, leitura visual de forma a comparar 90% de inibição do teste em relação ao controle positivo de crescimento.

Os testes para caspofungina revelaram uma CIM >16 µg/ml para todas as amostras, sem exceções. Prado e colaboradores (2008) trabalhando com 50 amostras de *M. pachydermatis* ao realizar a CIM para caspofungina, relataram que todas as amostras apresentaram CIM de > 256 µg/ml, uma concentração extremamente elevada quando comparada ao ponto de corte da caspofungina para espécies de *Candida* ≤ a 2 µg/ml (CLSI M27A3). Resultados semelhantes foram obtidos por Brito e colaboradores (2009), que avaliaram a susceptibilidade à caspofungina de diferentes espécies de leveduras do gênero *Candida* e de 20 amostras de *M. pachydermatis*. Os resultados mostraram sensibilidade de todas as espécies do gênero *Candida* à caspofungina. No entanto, todas as amostras de *M. pachydermatis* foram resistentes à caspofungina. Nossos resultados e aqueles da literatura demonstram a possibilidade de existir uma resistência natural de *M. pachydermatis* para caspofungina. Para as demais espécies de *Malassezia*, não foram encontrados dados na literatura que pudessem informar a CIM para caspofungina. É interessante lembrar que o mecanismo de ação da caspofungina, uma equinocandina, baseia-se na inibição da enzima β-1,3-glucana sintetase, agindo, portanto, na inibição da biossíntese da parede celular dos fungos. Por outro lado, Kruppa e colaboradores (2009) identificaram, surpreendentemente, polímeros de β-(1,6)-D-glucana como o principal carboidrato das paredes celulares de *M.*

sympodialis.

A análise global dos dados aqui obtidos para as amostras do gênero *Malassezia* relativos ao cetoconazol mostraram CIM₅₀ de 1 µg/mL e CIM₉₀ de 16 µg/mL, com uma variação de 0,031 µg/mL a 16 µg/mL. Os dados da literatura exibem resultados com CIM₅₀ e CIM₉₀ para cetoconazol menores do que os obtidos no presente trabalho. Miranda e colaboradores (2007), trabalhando com isolados clínicos obtiveram para cetoconazol CIM₉₀ de 0.25 µg/mL quando testando *M. furfur* e uma variação entre 0,3 a 4 µg/mL, sendo que a faixa intervalar estudada foi de 0.3 à 16 µg/mL. Jesus e colaboradores (2011), trabalhando com amostras de *M. pachydermatis* observaram, uma CIM₅₀ para o cetoconazol de 0.03 µg/mL e uma CIM₉₀ de 0.06 µg/mL para amostras que sabidamente não eram resistentes ao fluconazol. A faixa intervalar trabalhada foi de 0,007 a 16 µg/mL. Weiler e colaboradores encontraram CIM₅₀ de 0,06 µg/mL e CIM₉₀ de 0,5 µg/mL numa faixa intervalar de 0,007 a 16 µg/mL.

Os valores de CIM₅₀ para miconazol e isoconazol foram respectivamente 4 e 8 µg/mL. Os valores do CIM₉₀ foram de 16 µg/mL para ambos os fármacos. Não foram publicados, ainda, na literatura, trabalhos que abordem a determinação da susceptibilidade *in vitro* do gênero *Malassezia* ao isoconazol. Para o miconazol, os artigos publicados são em sua maioria de importância veterinária. Dessa forma, Peano e colaboradores (2012) realizaram a determinação da CIM de 51 isolados de *M. pachydermatis* obtidos de cães com otite. A CIM₅₀ foi de 2 µg/mL e a CIM₉₀ foi de 4 µg/mL numa faixa intervalar testada de 0,03 à 16 µg/mL. Weiler e colaboradores (2013) encontraram CIM₅₀ de 0,25 µg/mL e CIM₉₀ de 0,5 µg/mL para o miconazol, numa faixa testada de 0.125 a 64 µg/mL. As terapias tópicas parecem ser as mais práticas e mais populares para tratar as otites por *Malassezia* e há diferentes preparações contendo clotrimazol e miconazol, em formulações amplamente utilizadas. As suspensões empregadas usualmente contêm também glicocorticoides e antibacterianos (Peano et al., 2012).

Para o clotrimazol observou-se, no presente trabalho, CIM₅₀ de 8 µg/mL e CIM₉₀ de 64 µg/mL com variação entre 0,5 a 64 µg/mL. Peano e colaboradores (2012) encontraram CIM₅₀ de 4 µg/mL e CIM₉₀ de 8 µg/mL, numa faixa intervalar testada de 0,03 a 16 µg/mL. Weiler e colaboradores (2013) encontraram CIM₅₀ de 0.25 µg/mL e CIM₉₀ de 0,5 µg/mL para o clotrimazol, numa faixa testada de 0.125 a 64 µg/mL.

Quanto ao itraconazol, essa foi a droga à qual o gênero *Malassezia* apresentou maior sensibilidade *in vitro*. Os seus valores foram de 0,125 µg/mL para a CIM₅₀ e a CIM₉₀ foi de 16 µg/mL e uma variação intervalar de 0,031 a 16 µg/mL. Esses valores de itraconazol são mais elevados do que os obtidos na literatura. Rincon e colaboradores (2006) obtiveram uma CIM₅₀ de 0.125 µg/mL e uma CIM₉₀ de 0.25 µg/mL frente a amostras da espécie *M. furfur* e para *M. globosa* a CIM₅₀ foi de 4 µg/mL e a CIM₉₀ foi de ≥ 8 µg/mL Carfachia e colaboradores (2012) obtiveram um CIM₅₀ de 0.06 µg/mL e um CIM₉₀ de 0.125 µg/mL frente a amostras da espécie *M. pachydermatis*.

As CIM obtidas no presente trabalho para o gênero *Malassezia* foram mais elevadas quando comparadas a outros autores. No entanto, como ainda não existem valores estabelecidos pelo CLSI versão M27-A3 para as espécies lipodependentes de *Malassezia*, não há como afirmar, de fato, se as concentrações obtidas neste trabalho indicariam resistência das espécies lipodependentes do gênero *Malassezia* aos diferentes antimicrobianos testados. De acordo com Nascente e colaboradores (2009), o método de microdiluição em caldo foi adaptado para *M. pachydermatis*, e foi testado por Eichenberg e colaboradores, em 2003. Porém, os meios utilizados para a microdiluição causam controvérsias e divergências para a definição dos valores indicativos de sensibilidade ou resistência de *M. pachydermatis* e isso parece ocorrer para as demais espécies do gênero (Carfachia et al., 2012).

Quando se realizou a conversão para molaridade o itraconazol foi a droga mais eficiente na inibição de *Malassezia in vitro*. Esses dados são corroborados pela literatura uma vez que as drogas de primeira escolha para o tratamento das Malassezioses são o itraconazol e o cetoconazol (Chen e Hill, 2005; Kose et al., 2005). Entretanto, as variações da CIM obtidas para as drogas de primeira escolha são expressivas, implicando a necessidade se realizar mais testes e em condições padronizadas, para se determinar concentrações mais exatas, de modo a auxiliar mais eficientemente a terapêutica (Eichenberg et al., 2003). Quando comparados os valores de CIM₅₀ da espécie *M. furfur* em relação aos valores de CIM₅₀ obtidos para o gênero *Malassezia*, pode-se notar que a espécie apresentou, de modo geral, menores valores. Houve exceções para o itraconazol o qual permaneceu com o mesmo valor (0,125 µg/mL) para o gênero e para a espécie e a caspofungina, em que todos os valores obtidos foram superiores a 16 µg/mL. Com relação à CIM₉₀,

observou-se a mesma tendência, tendo a espécie registrado valores menores do que para o gênero. As exceções são para isoconazol e miconazol, que permaneceram com os mesmos valores para CIM₉₀ (16 µg/mL), tanto para a espécie.

A terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) é uma técnica que começou a apresentar publicações de maior impacto acadêmico e de importância médica no final dos anos 60 e início dos anos 70 do século XX. Nessa época, os primeiros trabalhos foram realizados em lesões virais, *in vivo*, sem uma padronização criteriosa (Bockstahler et al., 1975). No entanto, após a publicação de artigos científicos que alegavam a ineficácia da técnica, houve uma diminuição significativa nas linhas pesquisas que envolviam aPDT (Myers et al., 1975). Nos últimos 15 anos, contudo, a aIFD, ou seja, as análises *in vitro* da aplicação de corantes e luz na redução da viabilidade celular de microrganismos envolvidos em processos patogênicos, ganharam novamente a atenção da comunidade científica com a publicação de trabalhos de relevância (Lyon et al., 2011; Soares et al., 2011; Costa et al., 2012; Cohen e Bergkvist, 2013). Para o gênero *Malassezia*, as publicações são extremamente escassas e envolvem muitas vezes trabalhos práticos ou empíricos de sua utilização na clínica médica. A maioria dessas publicações não observa padronizações das condições de utilização *in vitro* contra os agentes etiológicos (Lee et al., 2010; Aspiroz et al., 2011). De fato, pouco se conhece sobre o potencial de utilização do LED e seus efeitos antifúngicos. Recentemente, foi publicado um trabalho que demonstra a imunomodulação quando utilizado somente o LED emitindo nos comprimentos de ondas a 380 nm e 392.5 nm, induzindo uma resposta imune contra espécies do gênero *Malassezia* (Wi et al., 2012).

Os resultados desse trabalho relativos à aplicação da aIFD na redução da viabilidade celular de leveduras do gênero *Malassezia* dividem-se em duas abordagens. Na primeira, buscou-se desenvolver as condições experimentais para a redução da viabilidade celular empregando o AOT e o LED vermelho, emitindo a 630 nm, e as amostras *M. furfur* MIE, *M. furfur* 5389 e *M. furfur* 4850. Na segunda abordagem, utilizou-se como fotoabsorvedor a substância C e o LED azul, emitindo a 430nm, empregando-se a amostra teste 5389 referente à espécie *M. furfur*. Foram adotados grupos controle minuciosos para cada conjunto de experimentos, de modo a avaliar os efeitos de cada componente individual desses conjuntos, na redução da viabilidade celular de *Malassezia*, como as fontes de luz, o fotoabsorvedor e os

eventuais carreadores utilizados, como o DMSO.

Após experimentos de padronização empregando 3 amostras testes de *M. furfur*, estabeleceram-se as condições para a aIFD empregando o AOT e o LED vermelho do seguinte modo: - concentração do AOT de 25 µM e percentual do DMSO de 0,25%, tempo de incubação (pré-irradiação) de 5 minutos, dose de irradiação de 60 J/cm². Essas condições foram aplicadas a 47 amostras das sete espécies: *M. furfur*, *M. globosa*, *M. japonica*, *M. slooffiae*, *M. pachydermatis*, *M. yamatoensis* e *M. sympodialis*. Os resultados demonstraram que os dois grupos controle de experimentação permaneceram inalterados quanto à viabilidade celular. Quanto ao grupo tratado, pôde-se notar uma redução significativa de 1,4 Log₁₀ UFC/mL em relação à média dos grupos controle. No entanto, esse resultado permaneceu insatisfatório.

São vários os fatores que podem ter influenciado na má eficiência da redução da viabilidade celular usando-se a aIFD. A primeiro deles é a parede celular, presente em fungos e levedura, que constitui uma barreira e dificulta a penetração de compostos químicos para dentro da célula, agindo também de forma seletiva (Dai et al., 2012). Para as espécies do gênero *Malassezia* observa-se também uma camada lamelar que envolve toda a parede celular. O tamanho da camada lamelar pode variar de acordo com a espécie e a quantidade de nutrientes à disposição. Verifica-se também uma quantidade de lipídios variável de acordo com a espécie envolvida o que poderia influenciar na seletividade e carreamento de substâncias para dentro da célula (Ashbee e Evans, 2002).

A concentração de 25 µM de AOT aparentemente não foi capaz de produzir uma grande redução da viabilidade celular para o conjunto das amostras testadas (47 amostras). De acordo com Dai e colaboradores (2012), a concentração excessiva de um corante pode interferir no desempenho da fonte de luz interferindo dessa forma na produção de ROS, e afirmam que a completa e eficiente produção de ROS, depende da combinação exata entre a concentração do fotoabsorvedor, o tempo de incubação e da dose de energia aplicada.

Mesmo com o auxílio do carreador DMSO a 0,25%, o qual na fase de padronização, permitiu obter uma redução total do número de células viáveis em relação aos grupos controles, os resultados finais ficaram aquém do esperado. O DMSO foi empregado com o objetivo de carrear os fotoabsorvedores para o interior das células de *Malassezia*. O DMSO é um importante solvente aprótico que pode

solubilizar uma variedade de substâncias polares e apolares, as quais teriam baixa solubilidade em outros solventes. O DMSO é usado em várias situações terapêuticas humanas como um sistema para “*delivery*” de drogas. Há autores que empregam o DMSO como um solvente em materiais biológicos havendo relatos de que essas moléculas alterariam a permeabilidade de parede celular e facilitariam o transporte de substâncias através da membrana. Alega-se que em concentrações inferiores a 1%, o DMSO geralmente não interfere na viabilidade celular (Jacob e Herschler, 1986; Bakar et al., 2011). Contudo, recentemente, relatou-se toxicidade para células de linhagens de neuronais de retina de ratos com doses baixas (2-4%) e mostraram que mesmo concentrações tão baixas quanto de 0,1% causaram apoptose nas células retiniais. Os autores recomendaram o uso *in vivo* de concentrações inferiores a 1% (v/v) (Galvao et al., 2013). Em nosso meio, Ferreira (2012), em trabalhos *in vivo*, utilizaram o DMSO como substância carreadora para o azul de metileno, sendo esse corante usado como fotoabsorvedor para o tratamento de lesões causadas por *M. pachydermatis* em gatos. Os resultados demonstraram completa reabilitação do animal.

Na busca por responder quais seriam as prováveis causas da resistência das leveduras ao modelo de tratamento, *in vitro*, com o LED vermelho, foram feitas análises bioquímicas para detectar a atividade das enzimas SOD e catalase das leveduras, atividades que, se presentes, poderiam antagonizar a produção de radicais de oxigênio livre decorrentes do processo de aIFD. Realizou-se a dosagem de ergosterol que permitiria avaliar a integridade das membranas celulares após a aplicação da aIFD. Os resultados demonstraram que a amostra *M. furfur* 5389, com menor susceptibilidade ao tratamento pela aIFD, produziu uma quantidade estatisticamente maior de SOD em relação às outras três amostras de *M. furfur* 4850, T5 e MZ2. Para a produção da enzima lacase, os resultados demonstraram que a amostra susceptível *M. furfur* MZ2 não apresentou diferença estatística na produção de lacase entre o grupo tratado e o grupo não tratado. Entretanto, para a amostra *M. furfur* 5389, com menor susceptibilidade ao tratamento, observou-se diferença estatística na produção de lacase entre o grupo tratado e o grupo não tratado. À semelhança do que se relata no presente trabalho, recentemente, Ferreira e colaboradores (2013) observaram que a exposição de *Cryptococcus gattii* aos antifúngicos itraconazol e à anfotericina B induziu a formação de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, o que aumentou a atividade das enzimas do sistema

antioxidante, como SOD e peroxidase.

Com relação aos níveis de ergosterol observados após tratamento das leveduras com a aIFD, os resultados mostraram que os grupos tratados das duas amostras *M. furfur* 5389 e MZ2 apresentaram níveis mais elevados de ergosterol do que os grupos não tratados. Pode-se sugerir que tenha havido ação lesiva sobre a membrana celular, seguida de reconstituição de seus lipídios com base no aumento da biossíntese de ergosterol. A amostra *M. furfur* 5389 com menor susceptibilidade à aIFD apresentou níveis mais elevados de ergosterol e uma diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo não tratado correspondente. Esses achados indicam que seria interessante aprofundar a pesquisa desse parâmetro num grupo microbiano cujo metabolismo de lipídios é estratégico para a sua sobrevivência na pele humana e/ou de animais (Xu et al., 2007; Gioti et al., 2013).

No segundo modelo de aIFD que usou o LED com luz azul, emitindo a 430nm, testando-se a substância C na condição de fotoabsorvedor, as condições padronizadas resultaram no uso da concentração de 100 μM da substância C, dose de irradiação de 24 J/cm^2 sem acréscimo de carreador resultando numa redução de 4.6 Log_{10} UFC/mL para a amostra teste 5389 e, sucessivamente, quando aplicado ao conjunto das 20 amostras de *M. furfur*, obteve-se uma redução significativa de 1,7 Log_{10} UFC/mL em relação à média dos grupos controle. Também nesse modelo de aIFD com o LED de luz azul e a substância C, podemos alegar as mesmas hipóteses da barreira celular e mecanismos bioquímicos que se discutiram para o modelo anterior. Seria interessante se os mesmos estudos bioquímicos relativos à mensuração da atividade de SOD e lacase fossem realizados. Ademais, deve-se observar que o comprimento de onda da luz na cor azul a 430 nm tem uma menor capacidade de penetração para o interior da célula em relação ao comprimento de onda da luz vermelha de 630 nm (Emilio, 2008). Para um micro-organismo como *Malassezia* spp. que possuem camadas lamelares espessas essa diferença poderia influenciar na penetração da luz. Ainda, é importante ressaltar que, no modelo com o LED na cor azul e substância C, foram testadas apenas as amostras da espécie *M. furfur*, as quais eram majoritárias. No entanto, experimentos com as demais amostras deverão ser realizados para uma melhor compreensão dos efeitos sobre a viabilidade celular nesse gênero, utilizando o LED com luz azul, emitindo a 430nm, e testando-se a substância C na condição de fotoabsorvedor.

9. CONCLUSÕES

A identificação molecular específica de amostras de *Malassezia* por sequenciamento da região D1/D2 do gene ribossômico foi efetiva e revelou 7 espécies entre as amostras estudadas. Essa abordagem revelou três aspectos relevantes sendo o primeiro a codominância de *M. furfur* e *M. sympodialis* na casuística de pitiríase versicolor; o segundo, a dominância de *M. furfur* nos casos de dermatite seborreica, em nosso meio, e por ultimo, permitiu a identificação pela primeira vez, das espécies de *M. yamatoensis* e *M. japonica* associadas a casos clínicos nas Americas.

A PCR *fingerprinting* com o iniciador (GTG)₅ foi ineficaz na tipagem de espécies do gênero *Malassezia*, sendo recomendável o estudo de outros métodos ou o emprego de outros iniciadores.

Os resultados de determinação das CIM mostraram valores elevados para caspofungina (>16 µg/mL) sugestivos de resistência natural. Os valores de CIM₅₀ e CIM₉₀ obtidos para as demais drogas foram, de modo geral, mais elevados do que os registrados na literatura para espécies de *Malassezia spp.* Para algumas dessas, drogas o conhecimento de dados de susceptibilidade *in vitro* será útil, pois, na literatura, esses dados são escassos e as terapias tópicas que são mais práticas e mais populares dispõem de diferentes preparações contendo as drogas testadas, como clotrimazol e miconazol, que encontram aplicação na terapêutica das malassezioses. O itraconazol demonstrou ser a droga mais eficiente *in vitro*. Nos modelos de aIFD, os tratamentos das amostras com o LED, usando-se a luz vermelha e a luz azul, associados a seus respectivos fotoabsorvedores, permitiram uma redução da viabilidade celular de *Malassezia sp.* em 1,4 Log₁₀ UFC/mL e de 1,7 Log₁₀ UFC/mL, respectivamente. Esses índices, conquanto ainda abaixo do desejável indicam que a sistematização da aIFD pode resultar em terapêutica antimicrobiana promissora nas malassezioses.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTINIS, P.; VANTIEGHEM, A.; MERLEVEDE, W.; de WITTE, P.A. Hypericin in cancer treatment: more light on the way. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.** p. 221-241, 2002.

ALLISON, R.R.; BAGNATO, V.S.; CUENCA, R.; DOWNIE, G.H.; SIBATA, C.H. The future of photodynamic therapy in oncology. **Future Oncol.** v. 2, pp. 53-71, 2006.

ALLISON, R.R.; DOWNIE, G.H.; CUENCA, R.; Hu, X.H.; CHILDS, C.J.H.; SIBATA, C.H. Photosensitizers in clinical PDT. **P. P and Therapy.** v. 1, p. 27-42, 2004.

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic. Acids. Res. Rev.** v. 25, p.3389-3402, 1997.

ARTHINGTON-SKAGGS, B.A.; JRADI, H.; DESAI, T.; MORRISON, C.J. Quantitation of ergosterol content: novel method for determination of fluconazole susceptibility of *Candida albicans*. **J. Clin. Microbiol.** v. 10, 3332-3337, 1999.

ASPIROZ, C.; GILABERTE, Y.; PAZ-CIRISTOBAL, P.; REZUSTA, A. Distal onycholysis resolved with photodynamic therapy in an elderly patient on multiple medicatio. **Enferm. Infec. Microbiol. Clin.** v. 29, p. 626-628, 2011.

ASHBEE, H.R.; EVANS, E.G.V. Immunology diseases associated with *Malassezia* species. **Clin. Micro. Review.** v. 15, p. 21- 57, 2002.

BAGNATO, V.S. Os fundamentos da luz laser. Física na Escola (USP). v.2, p. 4-9, 2001.

BAKAR, B.; KOSE, E.A.; SONAL, S.; ALHAN, A.; KILINC, K.; KESKIL, I.S. Evaluation of the neurotoxicity of DMSO infused into the carotid artery of rat. **Injury**. v. 43, p. 315-322, 2012.

BALTAZAR, L.D.M. **Inibição Fotodinâmica em *Trichophyton rubrum*, *Sporothrix* spp. e *Paracoccidioides brasiliensis*: ensaios *in vitro* e *in vivo***. (Tese de Doutorado) Belo Horizonte, Universidade Federal de Minas Gerais, pp. 118. (2013).

BALTAZAR, L.D.M.; SOARES, B.M.; CARNEIRO, H.C.; AVILA, T.V.; GOUVEIA, L.F.; SOUZA, D.G.; FERREIRA, M.V.; PINOTTI, M.; SANTOS, DE. A.; CISALPINO, S.P. Photodynamic inhibition of *Trichophyton rubrum*: in vitro activity and the role of oxidative and nitrosative bursts in fungal death. **J. Antimicrobiol Chemother**. v. 7, p. 354-361, 2012.

BARRAS, A.; BOUSSEKEY, L.; COURTADE.; BOUKHERROUB, R. Hypericin-loaded lipid nanocapsules for photodynamic cancer therapy in vitro. **Nanoscale** v. 5, p. 10562-10572, 2013.

BATRA, M.; BANSAL, C.; TULSYAN, S. Granulomatous rosacea: unusual presentation as solitary plaque. **Dermatol. Online. J.** p. 17-19, 2011.

BATRA, R.; BOEKHOUT, T.; GUERO, E.; CABANES, F.J.; DAWSON, T.L.. JR.; GUPTA, A.K. *Malassezia* Baillon, emerging clinical yeasts. **FEMS. Yeast Res.** v. 5, p. 1101-1113, 2005.

BERGBRANT, I.M.; ANDERSSON, B.; FAERGMANN, J. Cell-mediated immunity to *Malassezia furfur* in patients with seborrhoeic dermatitis and pityriasis versicolor. **Clin. Exp. Dermatol.** v. 24, p. 402-406, 1999.

BEVILACQUA, I., S. **AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA RADIAÇÃO LED ASSOCIADA AO AZUL DE TOLUIDINA NA REDUÇÃO BACTERIANA E NA FORMAÇÃO DO BIOFILME DENTÁRIO PELO *Streptococcus mutans*** (Dissertação mestrado) São Jose dos Campos, Universidade do Vale do Paraíba pp. 4, 2006.

BICKERS, D.R.; LIM, H.W.; MARGOLIS, D.; WEINSTOCK, M.A.; GOODMAN, C.; FAULKNER, E.; GOULD, C.; GEMMEN, E.; DALL, T. The burden of skin diseases: 2004 a joint project of the American Academy of Dermatology Association and the Society for Investigative Dermatology. J. Am. Acad. Dermatol. v. 55, p. 490-500, 2006.

BONIFAZ, A.; VÁZQUEZ-GONZALEZ, D.; PERUSQUÍA-ORTIZ, A.M. Endemic systemic mycoses: coccidioidomycosis, histoplasmosis, paracoccidioidomycosis and blastomycosis. J. Dtsch. Dermatol. Ges. p. 705-714, 2011.

BRANDÃO, L.R.; LIBKIND, D.; VAZ, A.B.; ESPÍRITO SANTO L.C.; MOLINÉ, M.; de GÁRCIA V, van BROOCK, M.; ROSA, C.A. Yeasts from an oligotrophic lake in Patagonia (Argentina): diversity, distribution and synthesis of photoprotective compounds and extracellular enzymes. FEMS Microbiol. Ecol. p. 1-13, 2011.

BRITO, E.H.; FONTENELLE, R.O.; BRILHANTE, R.S.; CORDEIRO, R.A.; MONTEIRO, A.J.; SIDRIM, J.J.; ROCHA, M.F. The anatomical distribution and antimicrobial susceptibility of yeast species isolated from healthy dogs. Vet. J. v.182, p. 320-326, 2009.

BOCKSTAHLER, L.E.; LYTLE, C.D.; HELLMAN, K.B.; A review of photodynamic therapy for herpes simplex: Benefits and potential risks. NY. J. Dent. v. 45, p. 148–157, 1975.

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

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

CASEDAVALL, A. Fungal virulence, vertebrate endothermy, and dinosaur extinction: is there a connection? **Fungal Genetics and Biol.** p.98-106.

CARFACHIA, C.; FIGUEREDO, L.A.; FAVUZZI, V.; SURICO, M.R.; COLAO, V.; LATTA, R.; MONTAGNA, M.T.; OTRANTO D. Assessment of the antifungal susceptibility of *Malassezia pachydermatis* in various media using a CLSI protocol. **Vet. Microbiol.** p. 536-540, 2012.

CARFARCHIA, C.; GASSER, R.B.; FIGUEREDO, L.A.; LATROFA, M.S.; OTRANTO, D. Advances in the identification of *Malassezia*. **Mol. Cell. Probes.** v. 25, p. 1-7, 2011.

CARRILO-MUNÓZ, A.J.; ROJAS, F.; TUR-TUR, C.; de LOS ANGELES SOSA, M.; DIEZ, G.O. ESPADA, C.M.; PAYÁ, M.J.; GIUSIANO, G. In vitro antifungal activity of topical and systemic antifungal drugs against *Malassezia* species. **Mycoses.** v. 56, 571-575, 2013.

CASTANO, A.P.; MROZ, P.; HAMBLIN, M.R. Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. **Nat. Rev. Cancer.** v. 6, p. 535-545, 2006.

CASTANO, A.P. Mechanisms in photodynamic therapy: part one - photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **P. P and Therapy.** v. 1, p. 279-293, 2004.

CLSI. 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, 3^a Ed. M27–A3. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, Wayne, PA.

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. An epidemic of *Malassezia pachydermatis* in an intensive care nursery associated with colonization of health care workers' pet dogs. **N Engl J Med.** v. 338, p. 706-711, 1998.

CHAUDHARY, R.; SINGH, S.; BANERJEE, T.; TILAK, R. Prevalence of different *Malassezia* species in pityriasis versicolor in central India. **Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.** v. 76, p. 159-164, 2010.

CHEN, T.; HILL, P.B.; The biology *Malassezia* of organisms and the ability to induce immune responses and skin disease. **Vet. Derm.** v. 16. p. 4-26, 2005.

CHENG, T.S.; CHEN, W.C.; LIN, Y.Y.; TSAI, C.H.; LIAO, C.I.; SHYU, H.Y.; Ko, C.J.; TZENG, S.F.; Huang, C.Y.; YANG, P.C.; HSIAO, P.W.; LEE, M.S. Curcumin-targeting pericellular serine protease matriptase role in suppression of prostate cancer cell invasion, tumor growth, and metastasis. **Can. Prev. Res. (Phila).** v. 6, p. 495-505, 2013.

COHEN, B.A.; BERGKVIST, M. Targeted in vitro photodynamic therapy via aptamer-labeled, porphyrin-loaded virus capsids. **J. Photochem. Photobiol. B.** v. 121, p. 63-74, 2013.

COSTA, L.; FAUSTINO, M.A.; NEVES, M.G.; CUNHA, A.; ALMEIDA, A. Photodynamic inactivation of mammalian viruses and bacteriophages. **Viruses.** v. 47, p. 1034-1074, 2012.

COWAN, M.M. Plants products as a antimicrobial agents. **Clin. Micro. Rev.** v.12, p. 564-589, 1999.

CRIADO, P.R.; OLIVEIRA, C.B.; DANTAS, K.C.; TAKIGUTI, F.A.; BENINI L.V.; Vasconcellos C. Superficial mycosis and the immune response elements. **Ana. Bras. Dermatol.** p. 726-732, 2011.

CRESPO, M.J.; ABARCA, M.L.; CABANES, F.J. Evaluation of different preservation and storage methods for *Malassezia* spp. **Jour. Clin Microbiol.** v. 38, p. 3872-3875, 2000a.

CRESPO, M.J.; ABARCA, M.L.; CABAÑES, F.J. Atypical lipid-dependent *Malassezia* species isolated from dogs with otitis externa. **J. Clin. Microbiol.** v. 38, p. 2383-2385, 2000b.

DAI, T.; FUCHS, B.B.; COLEMAN, J.J.; PRATES, R.A.; ASTRAKASS, C.; DENIS, T.G.; RIBEIRO, M.S.; MYLONAKIS, E.; HAMBLIN, M.R.; TEGOS, G.P. Concepts and principles of photodynamic therapy as an alternative antifungal discovery platform. **Front. Mic. Review.** v. 3 p. 1-16, 2012.

DAVID, M.; GABRIEL, M.; KOPECKA, M. Microtubular and actin cytoskeletons and ultrastructural characteristics of the potentially pathogenic basidiomycetous yeast *Malassezia pachydermatis*. **Cell Bio. Inter.** v. 31, p. 16-23, 2007.

DUARTE, E.R.; HAMDAN, J.S. RAPD differentiation of *Malassezia* spp. from cattle, dogs and humans. **Mycoses.** p. 48-56, 2010.

EICHENBERG, M.L.; APPELT, C.E.; BERG, V.; MUSCHNER, A.C.; NOBRE, M.O.; MATTA, D.; ALVES, S.H; FERREIRO, L. Susceptibility of *Malassezia pachydermatis* to azole antifungal agents evaluated by new broth microdilution method. **Act. Sci. Vet.** v. 31, p. 75-80, 2003.

EMILIO, C.R.. **COMPARAÇÃO DA EFICÁCIA DO ÁCIDO 5-AMINOLEVULÍNICO COM A DE SEU METIL ÉSTER UTILIZANDO-SE A TERAPIA FOTODINÂMICA NO TRATAMENTO DE CARCINOMA ESPINOCELULAR FELÍNO.** (Tese de Doutorado). São Paulo, Universidade de São Paulo, pp. 127, 2008.

FELL, J.W.; BOEKHOUT, T.; FONSECA, A.; SCORZETTI G, STATZELL-TALLMAN, A. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* p. 1351-1371, 2000.

FERREIRA, G.F.; BALTAZAR, L.D.M.; SANTOS, J.R.; MONTEIRO, A.S.; FRAGA, L.A.; RESENDE STOIANOFF, M.A.; SANTOS, D.A. The role of oxidative and nitrosative bursts caused by azoles and amphotericin B against the fungal pathogen *Cryptococcus gatti*. *J. Antimicrobiol. Chemother.* v.68, p. 1801-1811, 2013.

FERREIRA, L.F.L. A utilização da terapia fotodinâmica no tratamento da inflamação e infecção dos sacos anais em felinos. **PUC MINAS.** 2012.

GARCÍA-HERNÁNDEZ, Y.; RODRÍGUEZ, Z.; BRANDÃO, L.R.; ROSA, C.A.; NICOLI, J.R.; ELÍAS IGLESIAS, A.; PERÉZ-SANCHEZ, T.; SALABARRÍA, R.B.; HALAIHEL, N. Identification and in vitro screening of avian yeasts for use as probiotic. *Res. Vet Sci.* p. 798-802, 2012.

GAITANIS, G.; VELEGRAKI, A.; MAYSER, P.; BASSUKAS, I.D. Skin diseases associated with *Malassezia* yeasts: Facts and controversies. *Clin. Derm.* v. 31, p. 455-463, 2013.

GAITANIS, G.; MAGIATIS, P.; HANTSCHKE, M.; BASSUKAS, I.D.; VELEGRAKI, A. The *Malassezia* genus in skin and systemic diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* p. 106-141, 2012.

GAITANIS, G.; BASSUKAS I.D.; VELEGRAKI, A.
The range of molecular methods for typing *Malassezia*. **Curr. Opin. Infect. Dis.** 119-125, 2009a.

GAITANIS, G.; VELEGRAKI, A.; ALEXOPOLUS, E.C.; KAPSANAKI-GOTSI, E.; ZISOVAL, L.; RAN, Y.; ZHANG, H.; ARSENIS, G.; BASSUKAS, I.D.; FAERGEMANN, J. *Malassezia furfur* fingerprints as possible markers for human phylogeography. **ISME J.** p. 498-502, 2009b.

GALIMBERTI, R.; TORRE, A.C.; BARTÁN, M.C.; RODRIGUEZ-CHIAPPETTA, F. Emerging systemic fungal infections. **Clin. Dermatol.** p. 633-650, 2012.

GALVAO, J.; DAVIS, B.; TILLEY, M.; NORMANDO, E.; DUCHEN, M.R.; CORDEIRO MF. Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. **FASEB J. ONLINE.** 2013.

GIOTI, A.; NYSDTEDT, B.; LI, W.; XU J.; ANDERSON, A.; AVERETTE, A.F.; MÜNCH, K.; KAPPAUF, C.; KINGSBURY, J.M.; KRAAK, B.; WALKER, L.A.; JOHANSSON, H.J.; HOLM, T.; LEHTIÖ, J.; STAJICH, J.E.; MIECZKOWSKIL, P.; KAHMANN, R.; KENNELL, J.C.; CARDENAS, M.E.; LUNDEBERG, J.; SAUNDERS, C.W.; BOEKHOUT, T.; DAWSON, T.L.; MUNRO, C.A.; de GROOT, P.W.; BULTER, G.; HEITMAN, J.; SCHEYNIUS, A. Genomic insights into the atopic eczema-associated skin commensal yeast *Malassezia sympodialis*. **M. Bio.** p. 1-4, 2013.

GOMEZ, C.; COSTELA, A.; GARCIA-MORENO, I.; LLANES, F.; TEIJON, J.M.; BLANCO, M.D. Skin laser treatments enhancing transdermal delivery of ALA. **Jour. Pharm. Sci.** v. 100, p. 223-231, 2011.

GUEHO, E.; MIDGLEY, G.; GUILLOT, J. The genus *Malassezia* with description of four new species. **Antonie Van Leeuwenhoek.** p. 337-355, 1996.

GUILLOT, J.; GUEHO, E.; LESOURD, M.; MIDGLEY, G.; CHERVRIER, G.; DUPONT, B. Identification of *Malassezia* species. A practical approach. **Jour de mycologie medicale**. v. 6, p. 103-110, 1996.

GUILLOT, J.; GUEHO, E.; The diversity of *Malassezia* yeasts confirmed by rRNA sequence and nuclear DNA comparisons. **Antonie Van Leeuwenhoek**. p. 297-314, 1995.

GUILLOT, J.; HADINA, S.; GUEHO, E. The genus *Malassezia*: old facts and new concepts. **Parasitol**. v. 50, p. 77-79, 2008.

GUPTA, A.K.; BATRA, R.; BLUHM, R.; BOEKNOUT, T.; DAWSON, T.L. Skin diseases associated with *Malassezia* species. **Jour. Am. Acad. Dermatol**. v. 51, p. 785-798, 2004a.

GUPTA, A.K., Boekhout, T., Theelen, B., Summerbell, R., and Batra, R. Identification and typing of *Malassezia* species by amplified fragment length polymorphism and sequence analyses of the internal transcribed spacer and large-subunit regions of ribosomal DNA. **Jour. Clin. Microbiol**. v. 42, p. 4253-4260, 2004b.

GUPTA, A.K.; KOHLI, Y. Prevalence of *Malassezia* species on various body sites in clinically healthy subjects representing different age groups. **Med. Mycol**. v. 42, p. 35-42, 2004.

HEITMAN, J. Diversity in the realm of eukaryotic microbe form and function. **Curr. Opi. Microbiol**. p. 631-633, 2011.

HEY, R.J.; MIDGLEY, G. *Malassezia* yeast from a historical perspective restivado de: *Malassezia* and the Skyn - **Science and Clinical Practice**. New York, 2010 - Springer.

HINRIKSON, H.P.; HURST, S.F.; LOTT, T.J.; WARNOCK, D.W, MORRISON, C.J. Targets for Molecular Identification of Internal Transcribed Spacer 2 Regions as D1-D2, Internal Transcribed Spacer 1, and Assessment of Ribosomal Large-Subunit. **J. Clin. Microbiol.** p. 2092-2103, 2005.

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

JACOB, S.W.; HURSCHLER, R. Pharmacology of DMSO. **Cryobiology.** v. 23, p. 14-27, 1986.

JACOBS, T.M.; ROSEN, G.M. Photodynamic therapy as a treatment for esophageal squamous cell carcinoma in a dog. **Jour. Am. Anim. Hosp. Assoc.** v. 36, p. 257-261, 2000.

JESUS, F.P.K.; LAURET, C.; ZANETT, R.A.; MAHL, D.L.; AZEVEDO, M.I.; MACHADO, M.L.S.; DUTTRA, V.; BOTTON, S.A.; ALVES, S.H.; SANTURION, J.M. In vitro susceptibility of fluconazole-susceptible and -resistant isolates of *Malassezia pachydermatis* against azole. **Vet. Microbiol.** v. 152, p. 161-164, 2011.

KABORI, C.N.; JORGE, N. Caracterização de sementes e frutas como aproveitamento de resíduos industriais. **Cien. Agroc.** v. 29, p. 1008-1014, 2005.

KACEROVSKÁ, D.; PIZINGER, K.; MAJER, F.; SMÍD F. Photodynamic therapy of nonmelanoma skin cancer with topical hypericum perforatum extract--a pilot study. **Photochem. Photobiol.** p. 779-785, 2008.

KARAKAS, M.; TURAC-BIÇER A.; LLKIT, M.; DURDU, M.; SEYDAOGLU, G. Epidemiology of pityriasis versicolor in Adana, Turkey. **J. Dermatol.** v. 36, p.377-382, 2009.

KHARKWAL, G.B.; SHARMA, S.K.; HUANG, Y.Y.; DAI, T.; HAMBLIN, M.R. Photodynamic therapy for infections: clinical applications. **Lasers Surg. Med.** v. 43, p. 755-767, 2011.

KELLERMAN, E.G.; BATRA, R.; BOEKHOUT, T. The yeast: a taxonomic study. 5^a Ed. Chapter– 148 -*Malassezia*. Elsevier, Amsterdam, 2011.

KO, J.H.; LEE, Y.W.; CHOE, Y.B.; AHN, K.J. Epidemiologic Study of *Malassezia* Yeasts in Patients with *Malassezia* Folliculitis by 26S rDNA PCR-RFLP Analysis. **Ann. Dermatol.** p.177-184, 2011.

KOBAYASHI, T.; KANO, R.; NAGATA, M.; HASEGAWA, A.; KAMATA, H. Genotyping of *Malassezia pachydermatis* isolates from canine healthy skin and atopic dermatitis by internal spacer 1 (IGS1) region analysis. **Vet Dermatol.** p. 401-405, 2011.

KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W.; BOEKHOUT, T. Chapter 10 – Gene Sequence Analyses and other DNA-Based Methods for Yeast Species Recognition . In: C.P, KURTZMAN and J.W, Fell, The yeasts, a taxonomic study. 5^a Ed. Elsevier, Amsterdam, p. 137-144, 2011.

KRUPPA, M.D.; LOWMAN, D.W.; CHEN, Y.H.; SELANDER, C.; SCHEYNIUS, A.; MONTEIRO, M.A.; WILLIAMS, DL. Identification of (1->6)-beta-D-glucan as the major carbohydrate component of the *Malassezia sympodialis* cell wall. **Carbohydr. Res.** p. 2474-2479, 2009.

LACHANCE, M.A.; BOWLES, J.M.; STAMER, W.T.; BARKER, J.S. *Kodamaea kakaduensis* and *Candida tolerans*, two new ascomycetous yeast species from Australian Hibiscusflowers. **Can. J. Microbiol.** v.45, p.172-177, 1999.

LEE, J.W.; KIM, B.J.; KIM, M.N. Photodynamic therapy: new treatment for recalcitrant *Malassezia folliculitis*. **Lasers Surg. Med.** v. 42, p. 192-196, 2010.

LEEMING, J.P.; SANSOM, J.E.; BURTON, J.L. Susceptibility of *Malassezia furfur* subgroups to terbinafine. **Br. J. Dermatol.** v. 137, p. 764-767, 1997.

LENARD, J., RABSON, A.; VANDEROEF, R. Photodynamic inactivation of infectivity of human immunodeficiency virus and other enveloped viruses using hypericin and rose bengal: Inhibition of fusion and syncytia formation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v.90, p. 158-162, 1993.

LIECKFELTLD, E.; MEYER W.; BÖNER T. Rapid identification and differentiation of yeasts by DNA and PCR fingerprinting. **J. Basic. Microbiol.** v. 33, p.413-425, 1993.

LYAKHOVTSKY, A.; SHEMER, A.; AMICHAJ, B. Molecular analysis of *Malassezia* species isolated from Israeli patients with pityriasis versicolor. **Int. J. Dermatol.** v. 51, p. 231-233, 2013.

LYON, J.P.; MOREIRA, L.M.; de MORAES, P.C.; dos SANTOS, F.V.; de RESENDE, M.A. Photodynamic therapy for pathogenic fungi. **Mycoses.** v. 54, p. 265-271, 2011.

LYSKOVA, P.; YDRZALOVA, M.; MAZUROVA, J. Identification and antimicrobial susceptibility of bacteria and yeasts isolated from healthy dogs and dogs with otitis externa. **J. Vet. Med. A.Physiol. Patho.I Clin. Med.** v. 54, p. 559-563, 2007.

MARTINEZ, A.; FERRER, S.; SANTOS, I.; JIMENEZ, E.; SPARROWE, J.; REGADERA, J.; De Las HERAS, F.G.; GARGALLO-VIOLA, D. Antifungal activities of two new azasordarins, GW471552 and GW471558, in experimental models of oral and vulvovaginal candidiasis in immunosuppressed rats. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 45, p. 3304-3309, 2001.

MAKIMURA, K.; TAMURA, Y.; KUDDO, M.; UCHIDA, K.; SAITO, H.; YAMAGUCHI, H. Species identification and strain typing of *Malassezia* species stock strains and clinical isolates based on the DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 regions. **J. Med. Microbiol.** p. 29-35, 2000.

MAYER, K.; KAPPELLE, M.; KAEFERSTEIN, A.; WENBLING, M.; BEKEREDJIAN-DING, I.; LEUTHER, C.; VON-LILIENFELD-TOALM, BROSSART, P.; WOLF, D. Successful management of *Candida krusei* monoarthritis after allo. **SCT. B. Mar. Trans.** p. 1585-1586, 2013.

MAYSER, P.; PREUSS J. Pityriasis versicolor: Aktuelles zu einer alten Erkrankung. **Leitthema.** v.11, p. 859-867, 2012.

MIRANDA, K.C.; ARAÚJO, C.R.; COSTA, C.R.; PASSOS, X.S.; FERNANDES, O.F.L.; SILVA, M.R.R. Antifungal activities of ozoles agents against the *Malassezia* species. **Int. Jour. Anti. Ag.** v. 29, p. 281-284, 2007.

MIRANDA, K.C.; ARAÚJO, C.R.; SOARES, A.J.; de AQUINO LEMOS, J.; SOUZA, L.K.; do ROSÁRIO RODRIGUES SILVA, M. Identification of *Malassezia* species in patients with pityriasis versicolor in Goiânia-GO. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v. 39, p. 582-583, 2006.

MIRHENDI, H.; MAKIMURA, K.; ZOMORONDIAN, K.; YAMADA, T.; SUGITA, T.; YAMAGUSHI, H. A simple PCR RFLP methods for identification and differentiation of 11 *Malassezia* species. **Journal of Microbiology Methods.** v. 61, p. 281-284, 2005.

MYERS, M.G.; OXMAN, M.N.; CLARK, J.E.; ARNDT, K.A. Failure of neutral-red photodynamic inactivation in recurrent herpes simplex virus infections. **N. Engl. J. Med.** v. 293, p. 945-949, 1975.

NASCENTE, P.S.; MEINERS, A.P.M.; de FARIA, R.O.; DAMÉ SCHUCH, L.F.; MEIRELES, M.C.A.; de MELLO, J.R.B. CLSI método de Microdiluição em caldo para teste de suscetibilidade da *Malassezia pachydermatis* frente ao tiabendazol. **Braz. J. Microbiol.** v. 40, p. 1-4, 2009.

NAKABAYASHI, A.; SEI.; GUILLO, J. Identification of *Malassezia* species isolated from patients with seborrhoeic dermatitis, atopic dermatitis, pityriasis versicolor and normal subjects. **Med. Mycol.** v. 38, p. 337-341, 2000.

NELL, A.; JAMES, S.A.; BOND, C.J.; HUNT, B.; HERRTAGE, M.E. Identification and distribution of a novel *Malassezia* species yeast on normal equine skin. **Vet Rec.** p. 395-398, 2002.

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

NUCCI, M.; MARR, K.A. Emerging fungal diseases. **Clin. Infect. Dis.** p. 521-526, 2005.

ODDS, F.C.; BROWN, A.J.; GOW, N.A. Antifungal agents: mechanisms of action. **Trends Microbiol.** v. 11, p. 272-279, 2003.

OLIVO, M.; DU, H.Y.; BAY, B.H. Hypericin lights up the way for the potential treatment of nasopharyngeal cancer by photodynamic therapy. **Curr. Clin. Pharmacol.** p. 217-222, 2006.

PAULINO, L.C.; TSENG, C.H.; BLASER, M.J. Analysis of *Malassezia* microbiota in healthy superficial human skin and in psoriatic lesions by multiplex real-time PCR. **FEMS Yeast Res.** p.460-461, 2008.

PAZ-CRISTOBAL, M.P.; ROYO, D.; REZUSTA, A.; ANDRÉS-CIRIANOL E, ALEJANDRE, M.C.; MEIS, J.F.; REVILLO, M.J.; ASPIROZ, C.; NONELL, S.; GILABERTE, Y. Photodynamic fungicidal efficacy of hypericin and dimethyl methylene blue against azole-resistant *Candida albicans* strains. **Mycoses**. v. 1, p. 35-42, 2014.

PEANO, A.; MACCIMO, B.; CHIAVASSA, E.; PASQUETTI, M. Evaluation of the antifungal susceptibility of *Malassezia pachydermatis* to clotrimazole, miconazole and thiabendazole using a modified CLSI M27-A3 microdilution. **Method. Vet. Derm.** v. 23, p. 131-136, 2012.

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

QUEIROZ-TELLES, F.; NUCCI, M.; COLOMBO, A.L.; TOBÓN, A.; RESTREPO, A. Mycoses of implantation in Latin America: an overview of epidemiology, clinical manifestations, diagnosis and treatment. **Med. Mycol.** p.225.236, 2011.

RAMADÁN, S.; SORTINO, M.; BULACIO, L.; MAROZZI, M.L.; LÓPEZ, C.; RAMOS, L. Prevalence of *Malassezia* species in patients with pityriasis versicolor in Rosario, Argentina. **Rev. Iberoam. Micol.** v. 29, p. 14-19, 2012.

REME, C.A.; PIN, D.; COLLINOT, C.; CADIERGUES, M.C.; JOYCE J.A.; FONTAINE, J. The efficacy of an antiseptic and microbial anti-adhesive ear cleanser in dogs with otitis externa. **Vet. Ther.** v. 7, p. 15-26, 2006.

RINCON, S.; CEPERO de GARCIA, M.C.; ESPINEL-INGROFF, A. A modified Christensen's urea and CLSI broth microdilution method for testing susceptibilities of six *Malassezia* species to voriconazole, itraconazole, and ketoconazole. **J. Clin. Microbiol.** v. 44, p. 3429-3431, 2006.

ROTTA, I.; OTUKI, M.F.; SANCHES, A.C.; CORRER, C.;J. Efficacy of topical antifungal drugs in different dermatomycoses: a systematic review with meta-analysis. **Ver. Assoc. Med. Bras.** p.308-318, 2012.

ROSSER, E.J.Jr.; Causes of otitis externa. **Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.** v. 34, p. 459-468, 2004.

SAGHAZADEH, M.; FARSH, S.; HASHEMI, J.; MANSOURI, P.; KHOSRAVI, A.R. Identification of *Malassezia* species isolated from patients with seborrheic dermatitis, atopic dermatitis, and normal subjects. **Journal de Mycologie Médicale.** v. 20, p. 279-282, 2010.

SAMPAIO, I.B.M. Estatística Aplicada a Experimentação Animal, 2ª Edição, **FEPMVZ**, Belo Horizonte, 2002.

SARIDOMICHELAKIS, M.N.; FARMAKI, R.; LEONTIDES, L.S.; KOUTINAS, A.F. Aetiology of canine otitis externa: a retrospective study of 100 cases. **Vet. Dermatol.** v.18, p.341-347, 2007.

SANTOS, D.A.; BARROS, M.E.S.; HAMDAN, J.S. Establishing a Method of Inoculum Preparation for Susceptibility Testing of *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes*. **Jour. Clin. Mic.** v. 44, p. 98-101, 2006.

SANTOS, J.R.; GOUVEIA, L.F.; TAYLOR, E.L.; RESENDE-STOIANOFF, M.A.; PIANETTI, G.A.; CÉSAR, I.C.; SANTOS, D.A. Dynamic interaction between fluconazole and amphotericin B against *Cryptococcus gattii*. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 5, 2553-2558, 2012.

SHENEFELT, P.D. Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects. Capítulo 18. 2ªEd. **Boca Raton.** 2011.

SCHLOTTELDT, F.S.; TRAMONTIN, S.W.; NAPPI, B.P.; SANTOS, J.I. Reclassificação taxonômica de espécies do gênero *Malassezia*: revisão da literatura sobre as implicações clinicolaboratoriais. **Jor. Bras de Pat. Med. Lab.** v. 38, p. 199 -204, 2002.

SCHWARTZ, R.A.; JANUSZ, C.A.; JANNIGER, C.K. Seborrheic dermatitis: an overview. **Am. Fam. Physician** v. 74, p. 125-130, 2006.

SELMAN, S.H.; KECK, R.W.; HAMPTON, J.A. Transperineal photodynamic ablation of the canine prostate. **J. Urol.** v. 156, p. 258-260, 1996.

SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. Micologia medica à luz de autores contemporâneos. Capítulo 6, p. 51 - 55. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2004.

SOARES, B.M.; ALVES, O.A.; FERREIRA, M.V.L.; AMORIN, J.C.F.; SILVEIRA, L.B.; PRATES, R.A.; SOUZA, R.G. *Cryptococcus gattii*: In Vitro Susceptibility to Photodynamic Inactivation. **Photochemistry and Photobiology.** v. 87, p. 357-364, 2011.

SOARES, B.M.; da Silva, D.L.; SOUSA, G.R.; AMORIM, J.C.; de RESENDE, M.A.; PINOTTI, M.; CISALPINO, P.S. In vitro photodynamic inactivation of *Candida* spp. growth and adhesion to buccal epithelial cells. **Jour. Photochem Photobiol.** v. 94, p. 65-70, 2009.

SOARES, B.M. **Inibição Fotodinamica em Fungos: Abordagem experimental em *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., *Sporothrix* spp., *Malassezia furfur*.** (Tese de Doutorado) Belo Horizonte, Universidade Federal de Minas Gerais, p. 118, (2008).

SOSA, Mde. L.; ROJAS, F.; MANGIATERRA, M.; GIUSIANO, G. Prevalencia de especies de *Malassezia* asociadas a lesiones de dermatitisseborreica en pacientes de Argentina. **Rev. Iberoam. Micol.** v. 30, p. 239-242, 2013.

STAJICH, J.E; BERBEE, M.L; BLACKWELL, M; HIBBETT, D.S; JAMES, T.Y; SAPATAFORA, J.W; TAYLOR, J.W. The fungi. **Curr. Biol.** v. 19, p. 840-845, 2009

SUGITA, T.; TAJIMA, M.; TSUBUKU, H.; TSUBOI, R.; NISHIKAWAL, A. Quantitative analysis of cutaneous *Malassezia* in atopic dermatitis patients using real-time PCR. **Microbiol Immunol.** v. 50, p. 549-552, 2006.

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

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

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

STRIPPOLI, V.; PIANCENTINI, A.; D'AURIA, F.D.; SIMONETTI, N. Antifungal activity of ketoconazole and other azoles against *Malassezia furfur* in vitro and in vivo. **Infection.** v. 25, p. 303-306, 1997.

WAINWRIGHT, M.; BYRNE, M.N.; GATTREL, M.A. Phenothiazinium-based photo-bactericidal materials. **J. Photochem. Photobiol. B.Biol.** v. 84, p. 227-230, 2006.

WEILER, C.B.; de JESUS, F.P.; 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.** p.174-178, 2013.

WI, H.S.; NA, E.Y.; YUN, S.J.; LEE, J.B. The antifungal effect of light emitting diode on *Malassezia* yeasts. **J. Dermatol. Sci.** v. 67, p. 3-8, 2012.

YARROW, D.; AHEARN, D. G. Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. In: C.P, Kurtzman and J.W, Fell, **The yeasts, a taxonomic study.** 4^a Ed. Elsevier, Amsterdam, p. 77-100, 1998.

YOUNGCHIM, S.; NOSANCHUK, J.D.; PORNSUWAN, S.; KAJIWARA, S.; VANITTANAKOM, N. The Role of L-DOPA on Melanization and Mycelial Production in *Malassezia furfur*. **Plos one.** v. 8, p. 1-12, 2013.

THEELEN B.; SILVESTRII, M.; GUEHÓ E.; van BELKUM, A.; BOEKHOUT, T. Identification and typing of *Malassezia* yeasts using amplified fragment length polymorphism (AFLP), random amplified polymorphic DNA (RAPD) and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). **FEMS Yeast Res.** p. 79-86, 2001.

TRAGIANNIDIS, A.; BISPING, G.; KOEHLER, G.; GROLL, A.H. Minireview: *Malassezia* infections in immunocompromised patients. **Mycoses.** v. 53, p.187-195, 2009.

TREMBLAY, J.F.; DUSSAULT, S.; VIAU, G.; GAD, F.; BOUSHIRA, M.; BISSONNETTE, R. Photodynamic therapy with toluidine blue in Jurkat cells: cytotoxicity, subcellular localization and apoptosis induction. **Photochem. Photobiol. Sci.** v. 1, p. 852-856, 2002.

TSIPURSKY, M.S.; GOLCHET, P.R.; JAMPOL, L.M. Photodynamic therapy of choroidal hemangioma in sturge-weber syndrome, with a review of treatments for diffuse and circumscribed choroidal hemangiomas. **Surv. Ophthalmol.** v. 56, p. 68-85, 2011.

VELEGRAKI, A.; ALEXOPOULOS, E.C.; KRITIKOUS, 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.** v. 42, p. 3589-3593, 2004

XU, J.; SAUNDERS, C.W.; HU, P.; GRANT, R.A.,; BOEKHOUT, T.; KURAMAE, E.E.; KRONSTAD, J.W.; DEANGELIS, Y.M.; REENDER, N.L.; JOHNSTONE, K.R.; LELAND, M.; FIENO, A.M.; BEGLEY, W.M.; SUN, Y.; LACEY M.P.; CHAUDHARY, T.; KEOUGH, T.; CHU, L.; SEARS, R.; YUAN, B.; DAWSON, T.L Jr. Dandruff-associated *Malassezia* genomes reveal convergent and divergent virulence traits shared with plant and human fungal pathogens. **P.N.A.S.** p. 18730-18735, 2007.

ZHANG, H.; RAN, Y.; XIE, Z.; ZHANG R. Identification of *Malassezia* species in patients with seborrheic dermatitis in China. **Mycopathologia.** v. 175, p. 83-89, 2013.

ZEITOUNI, N.C.; SHIEH, S.; OSEROFF, A.R. Laser and photodynamic therapy in the management of cutaneous malignancies. **Clinics in Dermatology.** v. 19, p.328-339, 2001.

11. ANEXOS

Anexo 1: Comitê de ética em pesquisa



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Projeto: CAAE – 0648.0.203.000-11

Interessado(a): **Prof. Carlos Augusto Rosa**
Departamento de Microbiologia
Instituto de Ciências Biológicas - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 04 de maio de 2012, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado "**Isolamento e identificação de espécies do gênero Malassezia em pacientes atendidos pelo ISMD em Minas Gerais e São Paulo**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.



Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

Av. Pres. Antônio Carlos, 6627 – Unidade Administrativa II - 2º andar – Sala 2005 – Cep.31270-901 – BH-MG
Telefax: (031) 3409-4592 - e-mail: coep@prpq.ufmg.br

Anexo 2: Amostras analisadas no BLAST

Tabela 24: Amostras isoladas e suas respectivas espécies obtidas através do sequenciamento e posterior análise no BLAST.

N°	Amostra	Espécie	Acesso Gen bank
1	A16.1	<i>M. furfur</i>	AY072790.1
2	A16A	<i>M. furfur</i>	KC415103.1
3	A28.2	<i>M. sympodialis</i>	KC415100.1
4	A38A	<i>M. furfur</i>	KC415103.1
5	A38C1	<i>M. japonica</i>	JN874504. 1
6	A46	<i>M. slooffiae</i>	KC415104.1
7	A53A	<i>M. sympodialis</i>	KC415100.1
8	A69A2.1	<i>M. furfur</i>	KC415103.1
9	A57	<i>M. sympodialis</i>	KC415100.1
10	A87	<i>M. globosa</i>	KC415074.1
11	A88	<i>M. sympodialis</i>	KC415100.1
12	A78A	<i>M. furfur</i>	KC415103.1
13	A89B	<i>M. japonica</i>	JN874504. 1
14	BH1	<i>M. pachydermatis</i>	AY745724.1
15	BH2	<i>M. pachydermatis</i>	AY745754. 1
16	BH3	<i>M. pachydermatis</i>	JN874503.1
17	BH4	<i>M. pachydermatis</i>	AY745724.1
18	MID	<i>M. furfur</i>	AY072790.1
19	T1	<i>M. furfur</i>	KC415103. 1
20	T4	<i>M. furfur</i>	JQ271622.1
21	T5	<i>M. furfur</i>	KC415103. 1
22	A31A	<i>M. globosa</i>	JQ958301.1
23	SP5	<i>M. pachydermatis</i>	AY745724. 1
24	SP6	<i>M. pachydermatis</i>	AY745724.1
25	97	<i>M. japonica</i>	JN874504.1
26	98A	<i>M. slooffiae</i>	KC415104. 1
27	4813	<i>M. furfur</i>	AY743602.1
28	4850	<i>M. furfur</i>	AY743603.1
29	5389	<i>M. furfur</i>	AJ249955.1
30	5982	<i>M. furfur</i>	AY745725.1
31	MIE	<i>M. furfur</i>	AY743602.1
32	MZ2	<i>M. yamatoensis</i>	AB125264.1
33	5464A	<i>M. yamatoensis</i>	AB125264.1
34	MZ4	<i>M. globosa</i>	AY743604.1

Anexo 3: Determinação de CIM frente as espécies do gênero *Malassezia*

Tabela 25: Valores de CIM, após 72 horas de incubação, dos antimicrobianos cetoconazol, itraconazol, clotrimazol, miconazol, isoconazol e caspofungina frente a 20 amostras de *Malassezia furfur* cultivados em placa de 96 poços com o meio caldo ureia de Christensen a aproximadamente 30°C.

<i>Malassezia furfur</i> – CIM (µg/mL)						
AMOSTRA	CETOCONAZOL	ITRACONAZOL	CLOTRIMAZOL	MICONAZOL	ISOCONAZOL	CASPOFUNGINA
A16.1	0.5	0.5	1	1	0.25	>16
A16	0.125	0.125	2	0.5	4	>16
A16A	0.25	0.125	8	0.5	0.125	>16
A38A	0.062	0.125	2	0.5	4	>16
A39B	2	0.062	1	1	4	>16
A69A2.1	1	0.125	2	8	16	>16
A78A	1	0.125	2	8	16	>16
MID	1	0.125	2	8	16	>16
MIE	16	8	16	16	16	>16
SC1A	2	8	2	2	1	>16
T1	0.031	0.25	1	0.5	0.5	>16
T4	0.5	0.25	32	8	16	>16
T5	0.25	0.125	32	8	8	>16
T7	0.125	0.125	8	16	16	>16
T8B	0,062	0.031	1	0.5	0.25	>16
T19	2	0.062	2	0.5	0.5	>16
4813	1	0.25	64	>16	>16	>16
4850	0.062	0.125	2	4	8	>16
5389	0.125	0.125	4	2	16	>16
5982	0.062	0.25	4	4	16	>16

Tabela 26: Valores de CIM, após 72 horas de incubação, dos antimicrobianos cetoconazol, itraconazol, clotrimazol, miconazol, isoconazol e caspofungina frente a 10 amostras de *Malassezia pachydermatis* cultivados em placa de 96 poços com o meio caldo ureia de Christensen a aproximadamente 30°C.

<i>Malassezia pachydermatis</i> – CIM (µg/mL)						
AMOSTRA	CETOCONAZOL	ITRACONAZOL	CLOTRIMAZOL	MICONAZOL	ISOCONAZOL	CASPOFUNGINA
BH1	16	16	64	16	16	>16
BH2	16	16	64	16	16	>16
BH3	1	8	64	16	16	>16
BH4	1	1	32	4	2	>16
SP4	0.5	1	32	8	16	>16
SP5	4	2	64	16	0.5	>16
SP6	2	1	32	4	8	>16
SP7	0.125	0.125	64	0.5	0.5	>16
SP8	0.125	0.125	64	0.5	0.5	>16
SP9	1	4	32	4	1	>16

Tabela 27: Valores de CIM, após 72 horas de incubação, dos antimicrobianos cetoconazol, itraconazol, clotrimazol, miconazol, isoconazol e caspofungina frente a 10 amostras de *Malassezia sympodialis* cultivados em placa de 96 poços com o meio caldo ureia de Christensen a aproximadamente 30°C.

<i>Malassezia sympodialis</i> – CIM (µg/mL)						
AMOSTRA	CETOCONAZOL	ITRACONAZOL	CLOTRIMAZOL	MICONAZOL	ISOCONAZOL	CASPOFUNGINA
A8	0.031	0.062	>64	1	0.5	>16
A18A	8	0.25	0.5	1	1	>16
A28A	>16	16	4	16	>16	>16
A28.2	2	0.062	4	2	8	>16
A53A	0.125	4	8	4	8	>16
A57	4	0.062	32	0.125	16	>16
A88	0.125	1	16	1	8	>16
SC1	0.031	0.031	0.5	0.125	16	>16
SC3	0.062	0.062	4	4	4	>16
SC4	1	1	32	8	4	>16

Tabela 28: Valores de CIM, após 72 horas de incubação, dos antimicrobianos cetoconazol, itraconazol, clotrimazol, miconazol, isoconazol e caspofungina frente a 4 amostras de *Malassezia globosa* cultivados em placa de 96 poços com o meio caldo ureia de Christensen a aproximadamente 30°C.

<i>Malassezia globosa</i> – CIM (µg/mL)						
AMOSTRA	CETOCONAZOL	ITRACONAZOL	CLOTRIMAZOL	MICONAZOL	ISOCONAZOL	CASPOFUNGINA
A13	0.062	0.062	0.5	0.031	0.5	>16
A31A	>16	>16	>64	>16	>16	>16
A87	1	0.125	32	2	4	>16
MZ4	>16	0.062	4	>16	16	>16

Tabela 29: Valores de CIM, após 72 horas de incubação, dos antimicrobianos cetoconazol, itraconazol, clotrimazol, miconazol, isoconazol e caspofungina frente a 2 amostras de *Malassezia slooffiae* cultivados em placa de 96 poços com o meio caldo ureia de Christensen a aproximadamente 30°C.

<i>Malassezia slooffiae</i> – CIM (µg/mL)						
AMOSTRA	CETOCONAZOL	ITRACONAZOL	CLOTRIMAZOL	MICONAZOL	ISOCONAZOL	CASPOFUNGINA
98A	4	8	4	8	16	>16
A46	1	0.125	32	2	4	>16

Tabela 30: Valores de CIM, após 72 horas de incubação, dos antimicrobianos cetoconazol, itraconazol, clotrimazol, miconazol, isoconazol e caspofungina frente a 3 amostras de *Malassezia japonica* cultivados em placa de 96 poços com o meio caldo ureia de Christensen a aproximadamente 30°C.

<i>Malassezia japonica</i> – CIM (µg/mL)						
AMOSTRA	CETOCONAZOL	ITRACONAZOL	CLOTRIMAZOL	MICONAZOL	ISOCONAZOL	CASPOFUNGINA
A38C1	4	0.25	1	4	1	>16
A89B	16	0.125	16	8	16	>16
97	2	2	2	8	16	>16

Tabela 31: Valores de CIM, após 72 horas de incubação, dos antimicrobianos cetoconazol, itraconazol, clotrimazol, miconazol, isoconazol e caspofungina frente a 2 amostras de *Malassezia yamatoensis* cultivados em placa de 96 poços com o meio caldo ureia de Christensen a aproximadamente 30°C.

<i>Malassezia yamatoensis</i> – CIM (µg/mL)						
AMOSTRA	CETOCONAZOL	ITRACONAZOL	CLOTRIMAZOL	MICONAZOL	ISOCONAZOL	CASPOFUNGINA
5464A1	16	16	4	>16	16	>16
MZ2	0.5	0.125	16	4	8	>16

Anexo 4: Relação da participação em congressos em 2013



25 a 28 de
Novembro
de 2013



MICOLOGIA
Belém do Pará 2013

Realização



VII Congresso Brasileiro de Micologia

Certificamos que

DIOGO COELHO DE PÁDUA OLIVEIRA

apresentou o trabalho

INIBIÇÃO FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA IN VITRO PARA O GÊNERO MALASSEZIA
EMPREGANDO O AZUL DE ORTO - TOLUIDINA COMO FOTOABSORVEDOR

Autores: "DIOGO COELHO DE PÁDUA OLIVEIRA; SUSANA JOHANN; MARCOS PINOTTI
BARBOSA; BETÂNIA MARIA SOARES; PATRICIA SILVA CISALPINO"

na Sessão de Pôsteres durante o **VII Congresso Brasileiro de Micologia**
no período de 25 a 28 de novembro de 2013.

Belém - PA, 28 de novembro 2013.

Claudio Guedes Salgado
Presidente do Congresso Brasileiro de Micologia

José Luiz Bezerra
Presidente da Sociedade Brasileira de Micologia