

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos.

MESTRADO PROFISSIONAL

DESENVOLVIMENTO DE UM GEL DERMATOLÓGICO PARA GATOS
FORMULADO COM MOLÉCULAS ANTIMICROBIANAS NATURAIS PARA
TRATAMENTO DE DOENÇAS FÚNGICAS.

ANÍSIO ANTÔNIO DA SILVA JÚNIOR

ORIENTADORA: PROFA. DRA. ANA MARISA FUSCO ALMEIDA
COORIENTADOR: PROF. DR. FERNANDO BITTENCOURT LUCIANO

Araraquara - SP
2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos.

DESENVOLVIMENTO DE UM GEL DERMATOLÓGICO PARA GATOS
FORMULADO COM MOLÉCULAS ANTIMICROBIANAS NATURAIS PARA
TRATAMENTO DE DOENÇAS FÚNGICAS.

ANÍSIO ANTÔNIO DA SILVA JÚNIOR

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos (Mestrado Profissional), Área de Biomateriais, Bioprocessos, Bioprodutos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos.

Orientador: Profa. Dra. Ana Marisa Fusco Almeida
Coorientador: Prof. Dr. Fernando Bittencourt Luciano

Araraquara - SP
2020

S586d

Silva Júnior, Anísio Antônio da.

Desenvolvimento de um gel dermatológico para gatos formulado com moléculas antimicrobianas naturais para tratamento de doenças fúngicas / Anísio Antônio da Silva Júnior. – Araraquara: [S.n.], 2020. 77 f. : il.

Dissertação (Mestrado Profissional) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos. Área de Biomateriais, Bioprocessos, Bioprodutos.

Orientadora: Ana Marisa Fusco Almeida.

Coorientador: Fernando Bittencourt Luciano.

1. Inovação. 2. Fungos. 3. AITC. 4. Cinamaldeído. 5. Gatos. 6. Gel transdérmico. I. Almeida, Ana Marisa Fusco, orient. II. Luciano, Fernando Bittencourt, coorient. III. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPEs: 33004030170P0

Esta ficha não pode ser modificada

TERMO DE SIGILO PARA MEMBRO DE BANCA EXAMINADORA

Ana Marisa Fusco Almeida, nacionalidade brasileira, inscrito no CPF/MF sob nº 138.729.278-17, portador da cédula de identidade RG nº 18.985.946-5, doravante denominado **EXAMINADOR**;

Considerando que a UNESP possui política institucional que visa a proteção legal dos resultados oriundos de suas atividades de pesquisa e desenvolvimento técnico e tecnológico;

Considerando que a novidade é um dos requisitos necessários à proteção dos resultados de pesquisas pelos institutos de propriedade industrial, e, por consequência, a sua manutenção em sigilo até a adoção dos procedimentos legais pertinentes é indispensável para a obtenção da proteção almejada; e

Considerando, ainda, o disciplinado pelo ordenamento jurídico brasileiro, em especial pela Lei nº 9.279/96 (Lei de Propriedade Industrial), Lei nº 9.609/98 (Lei de Programa de Computador), Lei nº 9.610/98 (Lei de Direitos Autorais), Lei nº 10.973/04 (Lei de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 5.563, de 11 de outubro de 2005) e Lei Complementar nº 1.049/08 (Lei Paulista de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 54.690, de 18 de agosto de 2009);

firma o EXAMINADOR o presente Termo de Sigilo, nas condições a seguir:

CLÁUSULA PRIMEIRA. O EXAMINADOR compromete-se a manter sigilo em relação a qualquer "Informação Confidencial" a que tiver acesso no exercício de suas atividades de membro de banca examinadora constituída para análise da tese intitulada "**DESENVOLVIMENTO DE UM GEL DERMATOLÓGICO PARA GATOS FORMULADO COM MOLÉCULAS ANTIMICROBIANAS NATURAIS PARA TRATAMENTO DE DOENÇAS FÚNGICAS**", desenvolvida pelo mestrando **ANÍSIO ANTÔNIO DA SILVA JÚNIOR** da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara-UNESP da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

CLÁUSULA SEGUNDA. A expressão "Informação Confidencial" abrange toda a informação relativa às pesquisas desenvolvidas no escopo da tese a que o EXAMINADOR tenha acesso, sob a forma escrita, verbal ou por quaisquer outros meios de comunicação, inclusive eletrônicos.

Parágrafo único. Não será considerada "Informação Confidencial" aquela que estiver sob domínio público antes de ser revelada ou disponibilizada ao EXAMINADOR.

CLÁUSULA TERCEIRA. O presente termo vigorará até que os direitos de propriedade intelectual das pesquisas desenvolvidas no escopo da tese estejam devidamente protegidos junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI e junto ao Órgão competente em âmbito internacional pela UNESP.

CLÁUSULA QUARTA. Fica eleito uma das varas da Fazenda Pública Estadual, circunscrição judiciária de São Paulo, Capital, para dirimir dúvidas ou litígios oriundos do presente instrumento.

E para todos os efeitos, firma o presente termo na presença das testemunhas abaixo-assinadas.

Araraquara, 06 de fevereiro de 2020.

Ana Marisa Fusco Almeida

nome e assinatura

Aniele Vilella

TESTEMUNHA

Nome: Aniele Vilella
CPF/MF: 368.997.328-74

TESTEMUNHA

Nome:
CPF/MF:

TERMO DE SIGILO PARA MEMBRO DE BANCA EXAMINADORA

Nilton Sérgio de Aquino, nacionalidade brasileira, inscrito no CPF/MF sob nº 043.577.386-01, portador da cédula de identidade RG nº M-8.574.511, doravante denominado **EXAMINADOR**;

Considerando que a UNESP possui política institucional que visa a proteção legal dos resultados oriundos de suas atividades de pesquisa e desenvolvimento técnico e tecnológico;

Considerando que a novidade é um dos requisitos necessários à proteção dos resultados de pesquisas pelos institutos de propriedade industrial, e, por consequência, a sua manutenção em sigilo até a adoção dos procedimentos legais pertinentes é indispensável para a obtenção da proteção almejada; e

Considerando, ainda, o disciplinado pelo ordenamento jurídico brasileiro, em especial pela Lei nº 9.279/96 (Lei de Propriedade Industrial), Lei nº 9.609/98 (Lei de Programa de Computador), Lei nº 9.610/98 (Lei de Direitos Autorais), Lei nº 10.973/04 (Lei de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 5.563, de 11 de outubro de 2005) e Lei Complementar nº 1.049/08 (Lei Paulista de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 54.690, de 18 de agosto de 2009);

firma o EXAMINADOR o presente Termo de Sigilo, nas condições a seguir:

CLÁUSULA PRIMEIRA. O EXAMINADOR compromete-se a manter sigilo em relação a qualquer "Informação Confidencial" a que tiver acesso no exercício de suas atividades de membro de banca examinadora constituída para análise da tese intitulada "**DESENVOLVIMENTO DE UM GEL DERMATOLÓGICO PARA GATOS FORMULADO COM MOLÉCULAS ANTIMICROBIANAS NATURAIS PARA TRATAMENTO DE DOENÇAS FÚNGICAS**", desenvolvida pelo mestrando **ANÍSIO ANTÔNIO DA SILVA JÚNIOR** da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara-UNESP da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

CLÁUSULA SEGUNDA. A expressão "Informação Confidencial" abrange toda a informação relativa às pesquisas desenvolvidas no escopo da tese a que o EXAMINADOR tenha acesso, sob a forma escrita, verbal ou por quaisquer outros meios de comunicação, inclusive eletrônicos.

Parágrafo único. Não será considerada "Informação Confidencial" aquela que estiver sob domínio público antes de ser revelada ou disponibilizada ao EXAMINADOR.

CLÁUSULA TERCEIRA. O presente termo vigorará até que os direitos de propriedade intelectual das pesquisas desenvolvidas no escopo da tese estejam devidamente protegidos junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI e junto ao Órgão competente em âmbito internacional pela UNESP.

CLÁUSULA QUARTA. Fica eleito uma das varas da Fazenda Pública Estadual, circunscrição judiciária de São Paulo, Capital, para dirimir dúvidas ou litígios oriundos do presente instrumento.

E para todos os efeitos, firma o presente termo na presença das testemunhas abaixo-assinadas.

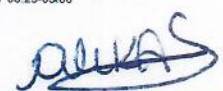
Araraquara, 06 de fevereiro de 2020.


Nilton S. Aquino
nome e assinatura

Digitally signed by Nilton S. Aquino
DN: cn=Nilton S. Aquino, o=UNESP Pharma Lab
ou=Responsável legal
e=ilton.aquino@unesp-pharma.com.br
Reason: Eu assinei este documento
Location:
2020-02-27 08:23:03-00



TESTEMUNHA
Nome: Aniele Vilella
CPF/MF: 368.997.328-74



TESTEMUNHA
Nome: Aleksandra Alves Silva
CPF/MF: 277.437.828-16

TERMO DE SIGILO PARA MEMBRO DE BANCA EXAMINADORA

Álvaro de Baptista Neto, nacionalidade brasileira, inscrito no CPF/MF sob nº 190.992.418-01, portador da cédula de identidade RG nº 20.364.308-2, doravante denominado **EXAMINADOR**;

Considerando que a UNESP possui política institucional que visa a proteção legal dos resultados oriundos de suas atividades de pesquisa e desenvolvimento técnico e tecnológico;

Considerando que a novidade é um dos requisitos necessários à proteção dos resultados de pesquisas pelos institutos de propriedade industrial, e, por consequência, a sua manutenção em sigilo até a adoção dos procedimentos legais pertinentes é indispensável para a obtenção da proteção almejada; e

Considerando, ainda, o disciplinado pelo ordenamento jurídico brasileiro, em especial pela Lei nº 9.279/96 (Lei de Propriedade Industrial), Lei nº 9.609/98 (Lei de Programa de Computador), Lei nº 9.610/98 (Lei de Direitos Autorais), Lei nº 10.973/04 (Lei de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 5.563, de 11 de outubro de 2005) e Lei Complementar nº 1.049/08 (Lei Paulista de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 54.690, de 18 de agosto de 2009);

firma o EXAMINADOR o presente Termo de Sigilo, nas condições a seguir:

CLÁUSULA PRIMEIRA. O EXAMINADOR compromete-se a manter sigilo em relação a qualquer "Informação Confidencial" a que tiver acesso no exercício de suas atividades de membro de banca examinadora constituída para análise da tese intitulada "**DESENVOLVIMENTO DE UM GEL DERMATOLÓGICO PARA GATOS FORMULADO COM MOLÉCULAS ANTIMICROBIANAS NATURAIS PARA TRATAMENTO DE DOENÇAS FÚNGICAS**", desenvolvida pelo mestrando **ANÍSIO ANTÔNIO DA SILVA JÚNIOR** da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara-UNESP da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

CLÁUSULA SEGUNDA. A expressão "Informação Confidencial" abrange toda a informação relativa às pesquisas desenvolvidas no escopo da tese a que o EXAMINADOR tenha acesso, sob a forma escrita, verbal ou por quaisquer outros meios de comunicação, inclusive eletrônicos.

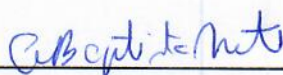
Parágrafo único. Não será considerada "Informação Confidencial" aquela que estiver sob domínio público antes de ser revelada ou disponibilizada ao EXAMINADOR.

CLÁUSULA TERCEIRA. O presente termo vigorará até que os direitos de propriedade intelectual das pesquisas desenvolvidas no escopo da tese estejam devidamente protegidos junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI e junto ao Órgão competente em âmbito internacional pela UNESP.

CLÁUSULA QUARTA. Fica eleito uma das varas da Fazenda Pública Estadual, circunscrição judiciária de São Paulo, Capital, para dirimir dúvidas ou litígios oriundos do presente instrumento.

E para todos os efeitos, firma o presente termo na presença das testemunhas abaixo-assinadas.

Araraquara, 06 de fevereiro de 2020.



nome e assinatura

Álvaro de Baptista Neto



TESTEMUNHA

Nome: Aniele Vilella
CPF/MF: 368.997.328-74

TESTEMUNHA

Nome:
CPF/MF:

ATESTADO DE APROVAÇÃO - DEFESA

Atestamos que **ANISIO ANTONIO DA SILVA JUNIOR**, RA nº: EBB180254, RG nº 10147309, expedido pela ssp/MG, defendeu, no dia 06/02/2020, a dissertação intitulada **DESENVOLVIMENTO DE UM GEL DERMATOLÓGICO PARA GATOS FORMULADO COM MOLÉCULAS ANTIMICROBIANAS NATURAIS PARA TRATAMENTO DE DOENÇAS FÚNGICAS**, junto ao Programa de Pós Graduação em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos, Curso de Mestrado Profissional, tendo sido 'APROVADO'.

Atestamos ainda que a obtenção do título dependerá de homologação pelo Órgão Colegiado competente.

Araraquara, 06 de fevereiro de 2020

Seção Técnica de Pós Graduação


CLÁUDIA LÚCIA MOLINA
Supervisor Técnico de Seção

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela saúde e sabedoria.

Ao meu amigo e irmão Rafael Carvalho de Oliveira pelos bons conselhos e irmandade, sem ele nada disso teria acontecido.

À minha família pela educação e bons valores a mim dedicados.

Aos doutores Fernando Bittencourt Luciano e Ana Marisa Fusco Almeida pelos ensinamentos e amizade.

Aos alunos de mestrado e doutorado, Carolina Orlando Vaso e Alberto Gonçalves Evangelista pelo acompanhamento das atividades e auxílio no experimento.

RESUMO

A inovação tecnológica de produtos farmacêuticos na área veterinária contendo ativos naturais é extremamente importante. Com o desenvolvimento tecnológico dos produtos farmacêuticos alcançado nos últimos anos, se faz necessária a busca por novos compostos que tenha segurança, facilidade de aquisição, estabilidade nas formulações e com atividades antimicrobianas diversas (amplo espectro) incluindo principalmente a atividade antifúngica, onde se dá a maior carência de produtos mais eficientes na área de dermatologia de pequenos animais. Além dessa abordagem do uso de moléculas naturais, é bastante oportuno o uso de uma tecnologia com liberação controlada dos ativos, prolongando a meia vida das moléculas, o que tornaria o produto mais eficiente e seguro. Dentre as infecções micóticas mais importantes estão as dermatofitoses que são infecções fúngicas superficiais dos tecidos queratinizados, causadas por fungos queratofílicos denominados dermatófitos, dos gêneros *Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidermophyton*. Estes fungos infectam o epitélio cutâneo e folicular, a haste pilosa e unhas de caninos, felinos, equinos, bovinos, suínos e mamíferos selvagens, além dos seres humanos. O felino, seguido pelos seres humanos, apresenta-se como a espécie mais frequentemente envolvida nos surtos de dermatofitose. Outras micoses mais graves podem afetar os felinos levando a lesões profundas e sistêmicas, entre estas estão a esporotricose, a cryptococose e a histoplasmose. Em geral as micoses são tratadas com formulações antimicrobianas sintéticas e tóxicas. A canela é uma planta medicinal, nativa do Sri Lanka, conhecida pelo nome científico *Cinnamomum zeylanicum* Blume e possui uma diversidade de compostos químicos, como o acetato de eugenol, ácido cinâmico, aldeído benzênico, aldeído cinâmico, aldeído cumínico, goma, linalol, mucilagem, oxalato de cálcio, resina, sacarose, tanino e vanilina. Dentre estes compostos, os derivados do ácido cinâmico, cinamaldeído e eugenol, merecem destaque por apresentarem atividade contra fungos filamentosos. Outra fonte natural é o isotiocianato de alila (AITC), um componente antimicrobiano potente encontrado na mostarda marrom. Diante do exposto, esse estudo teve por objetivo avaliar a atividade antifúngica in vitro do cinamaldeído, do isotiocianato de alila (AITC) e destes combinados frente a isolados dos gêneros dermatofíticos, *Sporothrix*, *Cryptococcus*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* e *Histoplasma capsulatum*, e desenvolver uma formulação inovadora a partir do composto isolado ou associação sinérgica destes ativos, para uso tópico no tratamento das referidas infecções. Os

resultados dos compostos ativos isolados (AITC e CIN) e combinados mostraram que as moléculas naturais foram eficazes em baixas CIMs (ppm) para o eliminar isolados de dermatófitos, *Sporothrix*, *Cryptococcus sp*, *Candida sp* e *Histoplasma capsulatum*. O produto formulado apresentou atividade antifúngica satisfatória contra *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* e *Sporothrix schenckii*. Desta forma o produto piloto mostrou-se promissor para o tratamento das dermatites fúngicas em gatos.

Palavras-chave: Inovação, Fungos, AITC, Cinamaldeído, Gel transdérmico. Gatos.

ABSTRACT

The technological innovation of veterinary pharmaceutical products containing natural actives is extremely important. With the technological development of pharmaceutical products achieved in recent years, it is necessary to search for new compounds that have safety, easy to acquire, stable formulas and broad spectrum including mainly antifungal activity, where there is a greater need of effective products in the small animal dermatology. In addition to this approach to the use of natural molecules, it is quite appropriate to use a technology with controlled release of the active, prolonging the half life of the molecules, which would make the product more efficient and safer. Among the most important mycotic infections is dermatophytosis, which is superficial fungal infections of keratinized tissues, caused by the dermatophytes of the *Microsporum*, *Trichophyton* and *Epidermophyton* genus. These fungi infect cutaneous and follicular epithelium, hair shaft and nails of canines, felines, horses, cattle, pigs and wild mammals, as well as humans. The feline, followed by humans, presents itself as the species most often involved in dermatophytosis outbreaks. Other more severe mycoses can affect felines leading to deep and systemic lesions including Sporotrichosis, Cryptococcosis and Histoplasmosis. In general mycoses are treated with synthetic and toxic antimicrobial formulations. Cinnamon is a medicinal plant, native to Sri Lanka, known by the scientific name *Cinnamomum zeylanicum* Blume and has a diversity of chemical compounds, including eugenol acetate, cinnamic acid, benzene aldehyde, cinnamic aldehyde, cuminic aldehyde, gum, linalol, mucilage, calcium oxalate, resin, sucrose, tannin and vanillin. Among these compounds, cinnamic acid, cinnamaldehyde and eugenol derivatives are noteworthy for their activity against filamentous fungi. Another natural source like brown mustard also contains a potent component against different microorganisms called allyl isothiocyanate (AITC). This study aimed to evaluate in vitro antifungal activity of cinnamaldehyde, allyl isothiocyanate (AITC) and these combined against isolates of the dermatophytes, *Sporothrix*, *Cryptococcus*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* and *Histoplasma capsulatum* genus, and to develop an innovative formulation from the compound or synergistic combination of these actives for topical use in the treatment of such infections. The results on isolated active compounds (AITC and CIN) and combined showed that both natural molecules were effective in low MICs (ppm) to eliminate isolates from dermatophytes, *Sporothrix*, *Cryptococcus*, *Candida sp* and *Histoplasma capsulatum*. The

formulated product showed satisfactory antifungal activity against *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* and *Sporothrix schenckii*. Thus, the pilot product has shown promise for the treatment of fungal dermatitis in cats.

Keywords: Innovation. Fungi. AITC. Cinnamaldehyde. Transdermal gel. Cats.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Gel transdérmico formulado.....	41
Figura 2. Gel transdérmico controle.....	41
Figura 3. Gel transdérmico formulado - aspecto.....	41
Figura 4. Gel transdérmico controle - aspecto.....	41
Figura 5. Técnica de micro diluição.....	45
Figura 6 – Método de semeadura para a técnica de disco difusão.....	46
Figura 7 – Técnica de disco difusão – A – discos estéreis; B – disco e composto aplicados na placa de Petri.....	47
Figura 8. Halos de inibição dos compostos mais o fármaco. A – Imagem representativa da <i>C. albicans</i> tratada com fluconazol; B – tratada com AITC; C – tratada com CIN; D – tratada com a combinação de AITC+CIN e D – controle negativo – Pentrapet.....	52
Figura 9 - Halos de inibição dos compostos mais o fármaco. A – Imagem representativa da <i>C. parapsilosis</i> tratada com fluconazol; B – tratada com AITC; C – tratada com CIN; D – tratada com a combinação de AITC+CIN e E – controle negativo – Pentrapet.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Atividade antifúngica e concentração inibitória mínima (CIM) dos compostos isolados.....	49
Tabela 2. Atividade antifúngica (<i>Sporothrix sp</i>) dos compostos associados.....	49
Tabela 3. Atividade antifúngica dos compostos isolados.....	50
Tabela 4. Valores referentes aos compostos da técnica de disco difusão.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABIN - Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de estimação

AITC - Isotiocianato de alila

CIN - Cinamaldeído

FIC - Concentração fracionária inibitória

FLC - Fluconazole

GRAS (Generally Recognized as Safe traduzido como geralmente reconhecido como seguro) é a designação da Food and Drug Administration (FDA), dos Estados Unidos, de que um produto químico ou substância adicionada ao alimento é considerado seguro por especialistas, e assim isento dos requisitos de tolerância de aditivos alimentares, medicamentos e cosméticos.

MFC - Minimum Fungistatic concentration traduzido como Concentração Fungicida Mínima

MIC - Minimum inhibitory concentration traduzido como Concentração Inibitória Mínima

ND - Não detectável

OE – Óleo Essencial

PPM - Partes por milhão

µg / mL - microgramas por mililitro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. OBJETIVOS	20
2.1. Geral.....	20
2.2. Específicos	21
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	21
3.1. Micro-organismos causadores de doenças	21
3.2. Antimicrobianos naturais	34
3.3. Formulação	36
3.4. Viabilidade econômica.....	37
4. MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1. Material.....	38
4.1.1. Antimicrobianos naturais	38
4.1.2. Microorganismos (fungos).....	39
4.1.2.1. <i>Histoplasma capsulatum</i>	39
4.1.2.2. <i>Sporothrix sp</i>	39
4.1.2.3. <i>Trichophyton rubrum</i>	39
4.1.2.4. <i>Malassezia sp</i>	40
4.1.2.5. <i>Candida albicans</i> e <i>Candida parapsilosis</i>	40
4.1.3. Gel Transdérmico.....	40
4.2. Métodos.....	41
4.2.1. Avaliação da sensibilidade de isolados de dermatófitos e <i>Sporothrix sp</i> aos compostos antifúngicos pela técnica de microdiluição.....	41
4.2.1.1 Diluição dos fármacos.....	41
4.2.1.2. Preparo do inóculo	42
4.2.1.3. Avaliação da sensibilidade de isolados de <i>Cryptococcus sp</i> e <i>Histoplasma capsulatum</i> aos antifúngicos comerciais e os compostos pela técnica de microdiluição.	43

4.2.1.4. Controle de qualidade	43
4.2.1.5. CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM)	43
4.2.1.6. Avaliação da sensibilidade de isolados de <i>Sporothrix sp</i> aos compostos antifúngicos combinados pela técnica de microdiluição.....	44
4.2.1.7. Teste de disco difusão	46
4.2.1.8. Desenvolvimento da formulação em gel.....	47
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	48
6. CONCLUSÃO E TRABALHOS FUTUROS.....	53
6.1. Conclusão.....	53
6.2. Trabalhos futuros	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55

1. INTRODUÇÃO

O mercado pet no Brasil é um dos maiores do mundo e tem se consolidado como um setor da economia com grande potencial de crescimento para os próximos anos. Por isso, investir no universo dos produtos e serviços para animais de estimação tem se mostrado, de fato, uma escolha de investimento promissora.

O Brasil possui o terceiro mercado pet do mundo em faturamento, ficando atrás apenas de Estados Unidos e Reino Unido, e é o 4º do mundo em população total de animais de estimação, de acordo com dados da Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação (Abinpet).

A literatura aponta que grande parte dos casos atendidos no dia a dia das clínicas de pequenos animais são de dermatopatias, sendo que as dermatofitoses são bastante comuns em gatos. Elas são causadas por fungos queratinofílicos, que podem ser leveduras ou dermatófitos, promovendo uma infecção na pele, pelo e unhas dos animais e seres humanos. Na medicina humana, a maioria dos relatos de micose está associada a fungos leveduriformes, enquanto na medicina veterinária está ligada a fungos dermatófitos (CABAÑES, 2000; CHAVES, 2007).

Os gêneros fúngicos mais identificados nos gatos com dermatofitose são o *Microsporum* e *Tricophyton*. Devido ao meio de transmissão, seu potencial zoonótico, e o fato do felino doméstico ser considerado um membro da família, a dermatofitose se tornou uma doença relevante na clínica de pequenos animais (MATTEI *et al.*, 2014).

Dentre os fungos mais importantes presentes em gatos e que podem afetar os seres humanos, encontra-se o *Sporothrix schenckii*. A esporotricose é uma micose cutânea ou subcutânea, de evolução subaguda ou crônica na maior parte dos casos, que costuma afetar a pele e os vasos linfáticos próximos ao local da lesão¹. Todas as formas de esporotricose em homens são causadas por uma única espécie, o fungo *Sporothrix schenckii* (DONADEL *et al.*, 2008).

O uso indiscriminado dos antimicrobianos disseminou cepas resistentes entre as populações microbianas, impedindo a ação de diversos fármacos (TAVARES, 2000). Medidas e programas de prevenção e educação a clínicos, farmacêuticos, veterinários, empresas do ramo de

antimicrobianos e o público em geral, devem incluir a conscientização do impacto da resistência aos fármacos e a consequência desse fenômeno na saúde pública (BERGERON; OUELLETTE, 1998). A resistência das diversas espécies de organismos é extremamente variável entre os países, regiões e pode estar relacionada à origem hospitalar ou comunitária das cepas.

O tratamento destas infecções é baseado em derivados azólicos e outros antifúngicos específicos, porém vários relatos e observações de campo indicam alta toxicidade hepática e renal para os animais (MORIELLO, *et al.*, 2017). O tratamento tópico ideal é o que abrange todo o corpo do animal, como a realização de banhos terapêuticos (FRYMUS *et al.*, 2013). São recomendados banhos com formulações tópicas (shampoos) a base de Miconazol 2% Clorexidina 2% ou a utilização de loções de enilconazol 0,2%. De forma geral estas opções são tóxicas e pouco eficazes e nada seguras ao meio ambiente.

Nesse sentido, está havendo um incremento no uso e estudos com moléculas naturais que são eficazes e não apresentam toxicidade para os animais, além de reduzir riscos de resistência microbiana aos princípios ativos.

2. OBJETIVOS

O presente projeto tem como objetivo desenvolver um gel formulado com princípios ativos naturais para tratamento de dermatopatias causadas por fungos em gatos.

Desenvolver um produto eficaz para o tratamento da Esporotricose.

2.1. Geral

Desenvolver uma formulação com ação sobre os principais fungos causadores de dermatopatias fúngicas em gatos e especialmente que seja eficaz contra a esporotricose causada pelo fungo *Sporothrix schenckii*.

2.2. Específicos

- i. Avaliação da estabilidade da formulação tópica
- ii. Avaliar a eficácia do produto frente ao *Sporothrix schenckii*.

3. REVISÃO DE LITERATURA

Para o desenvolvimento desse produto foi importante uma pesquisa minuciosa dos principais agentes que causam problemas dermatológicos em pequenos animais, mais especificamente em gatos, além de determinar qual seria a melhor molécula ou a combinação mais sinérgica de moléculas para eliminar os agentes causadores de doenças. Além desses aspectos, foram formulados diferentes veículos para carrear os ativos e assim obtermos uma formulação estável.

Para aquisição de alguns isolados de fungos e todas as moléculas antimicrobianas naturais, contamos com a colaboração de um dos maiores pesquisadores do mundo em moléculas naturais hoje diretor de inovação da PUC-PR, Dr. Fernando Bittencourt Luciano (Co-orientador no projeto). Com relação à elaboração do veículo e formulação do produto, fizemos parceria com o laboratório de manipulação Farmácia Santa Paula localizado na cidade de Araraquara-SP.

3.1. Micro-organismos causadores de doenças

Os dermatófitos, em particular o *Microsporum canis*, não são reconhecidos como parte da microbiota normal da pele, e sua presença indica contaminação ou infecção (MORIELLO; DeBOER, 1995; CABAÑES, 2000; MEINERZ *et al.*, 2002). Os gêneros *Microsporum* e *Trichophyton* frequentemente infectam os animais (SCOTT *et al.*, 2001; OLIVARES, 2003). Em caninos e felinos a maioria das infecções são causadas pelas espécies: *M. canis*, *M. gypseum* e *T. mentagrophytes* (ZAROR *et al.*, 1986; GAMBALE *et al.*, 1987; LARSSON *et al.*, 1997; BEALE, 1998; OLIVARES, 2003). Dermatófitos antropofílicos, como *M. audouini* (BEALE, 1998), *T. rubrum* (MORIELLO; DeBOER, 1991a; MORIELLO; DeBOER, 1991b) e *Epidermophyton floccosum* (GAMBALE *et al.*, 1987) podem ser adquiridos pelo contato com

seres humanos infectados, mas raramente são isolados nos animais de companhia (SCOTT *et al.*, 2001). Giuffrida *et al.* (2001) sugerem que a transmissão antroponótica do *T. mentagrophytes* também pode ocorrer, devido ao isolamento mais significativo desse dermatófito em felinos assintomáticos que mantinham contato com seres humanos portadores de lesões cutâneas. O felino, seguido pelos seres humanos, apresenta-se como a espécie mais frequentemente envolvida nos surtos de dermatofitose.

A literatura aponta que grande parte dos casos atendidos no dia a dia das clínicas de pequenos animais são de dermatopatias, sendo que as dermatofitoses são bastante comuns em gatos. Elas são causadas por fungos queratinofílicos, que podem ser leveduras ou dermatófitos, promovendo uma infecção na pele, pêlo e unhas dos animais e seres humanos. Na medicina humana, a maioria dos relatos de micose está associada a fungos leveduriformes, enquanto na medicina veterinária está ligada a fungos dermatófitos (CABAÑES, 2000; CHAVES, 2007).

Os gêneros fúngicos mais identificados nos gatos com dermatofitose são o *Microsporum* e *Trichophyton*. Devido ao meio de transmissão, seu potencial zoonótico, e o fato do felino doméstico ser considerado um membro da família, a dermatofitose se tornou uma doença relevante na clínica de pequenos animais (MATTEI *et al.*, 2014).

A dermatofitose geralmente ocorre em felinos jovens, que vivem em climas úmidos, possuem uma lesão de pele prévia, e/ou são imunocomprometidos (REES, 2010). Em animais sadios ela costuma ser auto limitante, mas o tratamento é indicado para acelerar a recuperação do paciente, prevenindo a disseminação para outros animais e seres humanos (MORIELLO *et al.*, 2017).

As doenças infecciosas causam um impacto significativo na saúde humana e animal, na agricultura, e na economia mundial. Entre os patógenos microbianos que causam doenças infecciosas no mundo, os fungos representam uma classe importante (COHEN, 2000; MORENS *et al.*, 2004). Entre eles, *Cryptococcus neoformans* é atualmente o principal patógeno fúngico invasivo líder, em nível mundial pelas taxas de incidência e mortalidade (TENOR *et al.*, 2015). A criptococose vem assumindo um papel relevante na história do SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida), e vem sendo considerada uma das micoses oportunistas mais comuns diagnosticadas entre os pacientes infectados pelo HIV (vírus da imunodeficiência humana) (FAVALESSA *et al.*, 2009). A criptococose é causada, principalmente, pelas leveduras capsuladas das espécies *C. neoformans* e *C. gattii* (MAK *et al.*, 2010). *C. gattii* é uma levedura

basidiomiceta e estima-se que divergiu de *C. neoformans* há 37,5 milhões de anos (BYRNES *et al.*, 2011).

C. neoformans é comumente encontrado na natureza e, essa espécie é frequentemente associada a fezes de pombos urbanos e outras aves, assim como vegetais e madeira (MITCHELL; PERFECT, 1995; SORRELL; ELLIS, 1997; REOLON, 2004; KOBAYASHI *et al.*, 2005). Em indivíduos imunocomprometidos, a espécie mais prevalente é *C. neoformans* (FERNANDES, 2000; RUIZ *et al.*, 1981; CHANDENIER *et al.*, 2004; KOBAYASHI *et al.*, 2005). Já o *C. gattii* acomete indivíduos imunocompetentes (RUIZ *et al.*, 1981; CHANDENIER *et al.*, 2004; LINDENBERG *et al.*, 2008). Ambos, *C. neoformans* e *C. gattii* são abundantes em materiais em decomposição dentro de cavidades de várias espécies de árvores (CHOWDHARY *et al.*, 2012; SPRINGER *et al.*, 2014). O primeiro isolamento no meio ambiente de *C. gattii* foi descrito em 1990 na árvore *Eucalyptus camadulensis* (ELLIS; PFEIFFER, 1990b;a; SORRELL; ELLIS, 1997).

Além disso, *C. neoformans* é distribuído globalmente, enquanto *C. gattii* classicamente tem sido visto como um fungo tropical ou subtropical (KWON-CHUNG; BENNETT, 1984). No entanto, agora com o aumento dos estudos epidemiológicos tem identificado reservatórios ambientais de *C. gattii* na Ásia, África, Austrália, América do Sul e alguns lugares da América do Norte (STEENBERGEN *et al.*, 2001; STEPHEN *et al.*, 2002; MEYER *et al.*, 2003; CHATURVEDI *et al.*, 2005; LITVINTSEVA *et al.*, 2005; MORGAN *et al.*, 2006; CHEN *et al.*, 2008; SANTOS *et al.*, 2008; BYRNES *et al.*, 2010). Também, ambos *C. neoformans* e *C. gattii* podem sobreviver e se replicar em amebas de vida livre, solo e nemátodos, e é possível que esses hospedeiros alternativos possam ter um papel importante na determinação da distribuição e virulência das diferentes linhagens criptocócicas ao redor do mundo (STEENBERGEN *et al.*, 2001).

De acordo com Littman e Zimmerman apud (CLARK; ROUBIN, 1970), *Cryptococcus neoformans* pode penetrar no corpo do animal via pulmões ou através de lesões na pele ou membranas mucosas.

Entre os pequenos animais, os gatos são mais frequentemente afetados com a infecção criptocócica (HOWLETT *et al.*, 1973), apesar que os dados precisos da ocorrência da enfermidade em animais domésticos são desconhecidos, devido provavelmente, aos casos que não são diagnosticados ou relatados (WEIR *et al.*, 1979). Apesar de *Cryptococcus*

neoformans ser encontrado comumente na natureza, a incidência da doença parece ser baixa, sugerindo que o organismo é oportunista (MEDLEAU, 1990). Doenças debilitantes, como ataques periódicos de anemia infecciosa felina, foram sugeridas como fatores predisponentes para a instalação de meningite criptocócica (JOHNSTON; LAVERS, 1963).

A amiloidose generalizada em gatos, que é apontada como tendo alta correlação com a hipervitaminose A, pode ocasionar desordem no Sistema Retículo Endotelial (CLARK; SEAWRIGHT, 1968) e esses distúrbios metabólicos também se relacionam como predisponentes para a infecção por *Cryptococcus neoformans* (CLARK; ROUBIN, 1970).

Uma grande percentagem de gatos afetados por criptococose apresentam reação positiva para o vírus da leucemia felina (SCOTT, 1980), esse vírus e o da imunodeficiência felina podem aumentar a suscetibilidade desses animais, porque possuem propriedades imunossupressoras (EMMS, 1987; MEDLEAU, 1990). Convém registrar ainda, que as infecções por *Cryptococcus neoformans* podem ocorrer com frequência após um estado de imunossupressão, que surge no seguimento de antibioticoterapias ou cortico-terapias prolongadas (GONÇALVES *et al.*, 1990, 1991).

A transmissão dessa doença entre animais da mesma espécie, ou de espécies diferentes, não tem sido relatada, porém, tal fato não exclui a possibilidade de um animal infectado, vir a constituir um perigo para Saúde Pública (BARRET; SCOTT, 1975; LEVI, 1978; GONÇALVES *et al.*, 1990, 1991). A transmissão natural humano-humano não tem sido observada. A infecção por *Cryptococcus spp* ocorre através da inalação das formas infectantes da levedura, os basidiósporos, os quais são encontrados no meio ambiente (MARTINEZ; CASADEVALL, 2006; CHATURVEDI, 2011; HARRIS *et al.*, 2012; NEGRONI, 2012; STIE; FOX, 2012; ZHU *et al.*, 2012). Em decorrência da infecção, as manifestações geralmente ocorrem na forma pulmonar onde as leveduras colonizam o tecido alveolar, caracterizando a infecção como aguda subaguda ou crônica (STIE; FOX, 2012; ZHAI *et al.*, 2013). Nos tecidos pulmonares, a levedura pode causar pneumonia em pacientes imunocomprometidos, mas em hospedeiros imunocompetentes, as células fúngicas são eliminadas pelo sistema imune ou se estabelecem como uma infecção latente assintomática. Com a depressão do sistema imunológico do hospedeiro, a levedura pode desenvolver pneumonia grave e insuficiência respiratória, podendo acometer o sistema nervoso central, causando sérios quadros de meningite e meningoencefalite,

os quais caracterizam a fase mais importante e grave da infecção (BRIZENDINE *et al.*, 2011). Além disso, causa lesões disseminadas na pele (DORA *et al.*, 2006).

O fármaco usado para o tratamento inicial da criptococose é a anfotericina B (AmB). A AmB é um derivado poliênico produzido pelo actinomiceto *Streptomyces nodosus*. Apesar da sua elevada toxicidade e do surgimento de outros fármacos antifúngicos de amplo espectro, a AmB e suas formulações lipídicas continuam sendo consideradas o “padrão ouro” dos fármacos antimicóticos disponíveis para uso clínico (LARRU; ZAOUTIS, 2013). O fluconazol é um composto azólico e tem ação inibitória sobre a lanosterol-14 α desmetilase, a qual é responsável pela conversão do lanosterol em ergosterol; desta forma, interrompe a biossíntese do ergosterol, componente fúngico essencial para a formação da membrana plasmática celular. É utilizado no tratamento de micoses superficiais e invasivas, no tratamento profilático e é bem tolerado pelo paciente, quando administrado em altas doses. Porém, o grande problema do uso deste fármaco, assim como, o uso dos demais azóis, é o desenvolvimento de resistência das leveduras a essa classe de fármacos. A terapia da criptococose é iniciada com uma dose intravenosa de 0,7-1 mg/Kg/dia durante 14 dias (ANDES, 2006) e posteriormente fluconazol numa dose de 400-800 mg por dia no mínimo durante 8 semanas na fase de manutenção, o que pode gerar problemas de resistência pelo longo tempo de uso (SCHAARS *et al.*, 2006). Devido à dificuldade na erradicação da criptococose e os problemas como a toxicidade, resistência e arsenal limitado dos antifúngicos usados hoje em dia na terapia, existe uma necessidade emergencial de se descobrir novas terapias uma vez que estas infecções são letais.

Recentemente, estudos que envolvem a prospecção de novas moléculas antifúngicas, têm-se focado nos biofilmes (GULLO *et al.*, 2013). As chalconas e seus derivados têm atraído cada vez mais a atenção devido a inúmeras aplicações farmacológicas. Propriedades anticancerígenas foram observadas em estudos como os de Echeverria e colaboradores (2009) com chalconas sintéticas. Um estudo executado por Lunardi e colaboradores (2003) relatou a atividade antiprotozoária *in vitro* contra o crescimento de *Leishmania braziliensis* e *Trypanosoma cruzi*. Yadav (2009) sintetizou uma série de derivados de chalconas com as quais observaram atividades anti-inflamatórias usando camundongos com um modelo de edema. Outros estudos demonstram propriedades antioxidantes, antimicrobiana e atividade larvicida contra mosquito (NURETTIN, 2006; HAMDI, 2010; BEGUM, 2011). Por último, as chalconas apresentam atividades antifúngicas contra espécies de *Candida*, *Saccharomyces cerevisiae*, *C.*

gattii e *Paracoccidoides brasiliensis* (DE CARVALHO TAVARES *et al.*, 2011). Recentemente também foi descrita atividade contra *C. neoformans* e *Mycobacterium tuberculosis* (ALWAN *et al.*, 2015). Assim, se faz necessário ensaios para verificação da atividade antifúngica e antibiofilmes frente à espécie *C. gattii*.

O *C. neoformans* var. *neoformans* é mais comum em cães e mais raro em gatos, de acordo com estudos realizados na Califórnia, já o *C. neoformans* var. *gattii* ocorre em regiões de clima tropical e subtropical, sendo que o solo contaminado é o principal risco de contaminação para os cães e gatos (SYKES; MALIK, 2012).

A principal porta de entrada é através da inalação de aerossóis de esporos de fungos ou basideomicetos, que podem se instalar nas vias aéreas superiores, ou atingir os pulmões e formarem granulomas e em casos de indivíduos imunossuprimidos ou crianças evoluir para um quadro de pneumonia difusa e meningite fúngica.

Nos gatos, geralmente ocorre associado com doenças que causem comprometimento imunológico do organismo como a Imunodeficiência Viral Felina (FIV) e Leucemia Felina (FeLV) (SYKES; MALIK, 2012).

A doença apresenta diversas formas, dentre elas a respiratória, tegumentar e nervosa. Os cães, furões, psitacídeos e os gatos especialmente os de vida livre são as espécies mais acometidas por esta levedura. As lesões mais frequentes desta doença nos gatos são lesões granulomatosas localizadas na cavidade nasal, conhecida popularmente como “nariz de palhaço” (PETRAGLIA, 2008).

Segundo Petraglia (2008), a criptococose ocorre com menor frequência nos cães em relação aos gatos. No Brasil, a criptococose é mais frequente em gatos machos e com idade superior a quatro anos. O fungo é inalado pelo felino e atinge o trato respiratório superior, porém pode ocorrer a inoculação cutânea direta. Após a entrada do fungo, ele se dissemina por via hematógena e acomete todo o organismo.

Os sinais clínicos podem ocorrer de diversas formas, dentre elas respiratória, tegumentar e nervosa (PETRAGLIA, 2008).

O diagnóstico pode ser feito através de uma minuciosa anamnese, achados de exame físico, exames complementares como sorologia, citopatológico, histopatológico e isolamento fúngico. Os resultados de hemograma completo são normais, exceto neutrofilia ou eosinofilia ocasional (JHONSON; SHERDING; BIRCHARD, 2008).

Perfil bioquímico só apresentará alterações quando houver envolvimento sistêmico dos órgãos. Por conta da expansão dos granulomas, o osso nasal pode estar destruído, causando distorção da cavidade nasal demonstrado no exame radiográfico (JHONSON; SHERDING; BIRCHARD, 2008).

O exame citológico possui vantagem de o procedimento ser rápido e da facilidade da execução e quando bem realizado permite obtenção de um diagnóstico definitivo (PETRAGLIA, 2008).

Podemos identificar facilmente os microrganismos em swabs de exsudato nasal ou imprints e aspirados de tumefações nasais. A resposta celular nas lesões nasais de cães e gatos é granulomatosa, demonstrando predomínio de macrófagos, linfócitos e células gigantes multinucleadas. O *Cryptococcus neoformans*, é encontrado nas amostras citológicas na forma de levedura oval a arredondada, intensamente basofílicas, e com a capsula apresentam de 8 a 40 um de diâmetro. O microrganismo tem uma cápsula mucóide espessa não-corada e uma estrutura granular interna que se cora de vermelho à púrpura.

O exame citológico pode revelar graus variáveis de inflamação piogranulomatosas, com macrófagos contendo microrganismos fagocitados (RASKIN; MEYER, 2003).

A cultura microbiológica limita o diagnóstico pois o crescimento pode levar de dias à semanas (JHONSON; SHERDING; BIRCHARD, 2008).

O tratamento em gatos tem sido feito com anfotericina B, o qual é um medicamento antifúngico de amplo espectro e início de ação rápido. Deve ser aplicado por via parenteral. É um medicamento nefrotóxico e é efetivo moderadamente contra criptococose, o qual nem sempre é indicado exceto em casos de doença disseminada com risco de vida (JHONSON; SHERDING; BIRCHARD, 2008).

A flucitosina é um medicamento antifúngico usado quando há envolvimento do sistema nervoso central, induz sinergismo com anfotericina B (JHONSON; SHERDING; BIRCHARD, 2008).

O itraconazol é usado como tratamento inicial de escolha para cães e gatos, quando não há risco de morte (JHONSON; SHERDING; BIRCHARD, 2008). O cetoconazol também pode ser usado porém menos efetivo quando comparado com itraconazol e também por possuir maiores efeitos colaterais como vômito, diarreia e perda de peso.

O fluconazol possui melhor penetração no sistema nervoso central do que o itraconazol e é uma alternativa útil quando há envolvimento do sistema nervoso, a única desvantagem é o alto preço (JHONSON; SHERDING; BICHARD, 2008).

Outro fungo de importância em gatos é o *Sporothrix sp.* A esporotricose pode acometer diversas espécies de animais e já foi descrita em equinos, cães, felinos, bovinos, suínos, camelos, primatas e no homem. A transmissão da doença é resultante da inoculação direta do fungo por meio de arranhadura e/ou mordedura de animais afetados ou por pequenos traumas durante atividades de lazer ou ocupacionais que tenham relação com floricultura, horticultura e jardinagem (NOBRE *et al.* 2002; SCHUBACH *et al.* 2012; CAUS, 2013).

O *Sporothrix spp.* é um fungo dimórfico, que na natureza ou em cultivos a 25° C vive na forma filamentosa e, após sua inoculação no hospedeiro ou em cultivos a temperaturas de 37° C faz transição para sua fase leveduriforme (GREENE, 2015; VETTORATO *et al.*, 2018).

Até a última década a esporotricose era atribuída a uma única espécie, *Sporothrix schenckii*. No entanto, estudos moleculares demonstraram tratar-se de um complexo com seis espécies crípticas: *S. schenckii strictu sensu*, *S. albicans*, *S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. luriei* e *S. mexicana*, em que o *S. schenckii* é provavelmente o ancestral filogenético. As espécies apresentam diferentes distribuições geográficas e potencial patogênico para os mamíferos. Sendo o *S. brasiliensis* o que possui o maior fator de virulência, devido à capacidade de invadir tecidos animais e levar à morte (MARIMON *et al.*, 2007; CRUZ, 2013; RODRIGUES *et al.*; 2013; ZHANG *et al.*, 2015; OROFINO-COSTA *et al.*, 2017).

A esporotricose está presente em diversos países do mundo (CARLOS *et al.*, 2009). Na China encontra-se, predominantemente, *S. globosa*; na África do Sul *S. schenckii* e no Brasil, *S. brasiliensis*. E ocorre com menor frequência no Japão, Austrália, Índia e continente europeu, embora o fungo seja considerado cosmopolita (ZHANG *et al.*, 2015).

No Brasil é considerada endêmica no Rio de Janeiro, onde possui cerca de 8 mil casos entre humanos e animais (PEREIRA *et al.*, 2014), e a região sul do estado do Rio Grande do Sul, com cerca de mil casos confirmados pelo laboratório de Micologia da Universidade Federal de Pelotas. Recentemente, o aumento do número de casos no estado de São Paulo motivou a publicação da Portaria no 064/2016 de 29/07/2016, na cidade de Guarulhos que determina a notificação compulsória dos casos humanos suspeitos e confirmados (Secretaria Municipal de Guarulhos, 2016).

Segundo ZHANG *et al.* (2015), a infecção costuma ser precedida de contato com debrís de plantas ou matéria orgânica em fermentação contaminada pelo *S. globosa* ou *S. schenckii*, sendo considerada sapronótica, ou por arranhões, mordidas ou contato com exsudato contaminado de lesões de gatos, quando o agente etiológico é o *S. brasiliensis* ou *S. schenckii*, condição em que é caracterizada como zoonótica. O gato é considerado a chave na ecoepidemiologia da esporotricose (MACÊDO-SALES *et al.*, 2018). Nesses animais, a infecção pode se dar tanto de forma direta por meio de arranhões ou mordidas durante brigas, brincadeiras ou cópula; como de forma indireta, oriunda do ambiente, visto que os felinos têm o hábito de arranhar árvores para trocar as cutículas e, também, que o fungo retorna ao solo após a morte do animal (RODRIGUES *et al.*, 2013; GREEN, 2015; MACÊDO-SALES *et al.*, 2018).

O *Sporothrix schenckii* afeta o homem e diversas outras espécies de animais, levando a diferentes apresentações clínicas da doença. Sendo as mais comuns a forma cutânea localizada, cutânea linfática e extra cutânea. Em cães e humanos a apresentação clínica se dá de forma limitada a pele e ao tecido subcutâneo, raramente desenvolvendo a forma disseminada (SCHUBACH *et al.*, 2015). Os gatos, porém, costumam desenvolver a forma disseminada grave da micose, demonstrando suscetibilidade da espécie ao agente (PIRES, 2017), e apresenta como principais sinais clínicos pápulas, nódulos e/ou úlceras com exsudato serosanguinolento ou hemorrágico (JONES; HUNT; KING, 2000). As lesões costumam se apresentar na região da cabeça, cauda e nos membros posteriores (SCHUBACH, 2015), por serem os locais mais afetados durante as brigas (ROSSER, 2006) e também pelo hábito de lambedura que a espécie apresenta (CRUZ, 2013). As lesões se caracterizam majoritariamente por áreas circulares, elevadas, com alopecia e crostas, em grande número com ulceração central, e no caso de doença disseminada, podem apresentar anormalidades oculares, neurológicas e linfáticas (NUNES; ESCOSTEGUY, 2005).

Os gatos têm um importante papel epidemiológico na transmissão e propagação da doença, principalmente os não castrados e de livre acesso à rua (SCHUBACH *et al.* 2004; MADRID *et al.* 2011), uma vez que as lesões cutâneas nestes animais contêm uma grande quantidade de células fúngicas infectantes que os distinguem de outras espécies e os caracterizam como notável fonte de infecção (NOBRE *et al.* 2001; SOUZA *et al.* 2006; BARROS *et al.* 2010; MADRID *et al.* 2011).

O diagnóstico clínico da esporotricose deve ser baseado no histórico e sinais clínicos do animal, aliado à epidemiologia da doença e confirmado por exame micológico (OROFINO-COSTA *et al.*, 2017). Para isso, faz-se necessária a coleta de uma amostra de material, secreção das lesões, nasal e saliva, e em alguns casos, também se pode fazer útil a coleta de sangue, urina, fluido sinovial ou líquido cefalorraquidiano. O exame microscópico direto do fungo pelo material coletado, se dá por esfregaços corados com gram, giemsa, panótico ou azul de metileno (CRUZ, 2013). Nesse exame o fungo apresenta a forma leveduriforme, ovalada ou arredondada, com aspecto de charuto, podendo estar livres ou fagocitados. Embora a microscopia direta possa sugerir a presença do fungo, o diagnóstico definitivo é realizado pelo isolamento fúngico.

A demora no diagnóstico e no tratamento, bem como o abandono dos animais doentes, contribui para a disseminação da infecção entre os animais e influencia diretamente no número de casos em seres humanos que vivem na mesma área geográfica, constituindo-se, assim, um problema de saúde pública. Os corpos de gatos mortos devem ser incinerados. O descarte inadequado mantém o agente etiológico no ambiente (CRUZ, 2013; RODRIGUES *et al.*, 2013).

Para o tratamento da esporotricose, utiliza-se principalmente azólicos, inicialmente, tratada com cetoconazol, passando-se, com o tempo, a utilizar o itraconazol. O tratamento muitas vezes, longo e oneroso, alguns trabalhos citam até 23 meses de tratamento (MACÊDO-SALES *et al.*, 2018). Desta forma, pode-se utilizar de forma conjunta ou isolada o iodeto de potássio ou de sódio, a fim de tratar, ou mesmo potencializar o efeito dos medicamentos e reduzir o tempo de tratamento tomando-se as devidas precauções para evitar iodismo (CRUZ, 2013).

O fluconazol e a anfotericina B também podem ser considerados como alternativas terapêuticas no tratamento da esporotricose (MEINERZ *et al.*, 2007; ROSA *et al.*, 2017). A anfotericina B via intralesional ou subcutânea geralmente é considerada em casos refratários ao itraconazol (PEREIRA *et al.*, 2009). Ainda segundo Pereira (2009) devido aos custos e a resistência crescente a esses medicamentos como ao itraconazol e a Anfotericina B (PEREIRA *et al.*, 2009), novos fármacos, como fitoterápicos a base de *Bauhinia forficata* (GIORDANI *et al.*, 2016), e formas de administração, como implante subcutâneo de itraconazol, estão sendo testados para a esporotricose, na tentativa de reduzir os efeitos colaterais dos antifúngicos (VETTORATO *et al.*, 2017). As diferentes apresentações clínicas da esporotricose podem influenciar no prognóstico e consequentemente no desfecho do quadro (SCHUBACH, 2004).

Casos de esporotricose em humanos e animais sem resposta clínica satisfatória têm aumentado, sinal de alarme para o surgimento de cepas resistentes aos antifúngicos convencionais. A urgente busca por alternativas terapêuticas tem incentivado as pesquisas em plantas medicinais com atividade anti-*Sporothrix spp.* Um levantamento bibliográfico foi realizado com base em artigos científicos sobre a atividade antifúngica in vitro e in vivo de óleos essenciais e extratos de plantas preparados em diferentes solventes contra o complexo *Sporothrix schenckii*. (WALLER *et al.*, 2016)

Além dos fungos citados anteriormente, outro possui importância tanto para os felinos quanto para os seres humanos. A histoplasmose é uma micose sistêmica cosmopolita causada pelo fungo dimórfico *Histoplasma capsulatum* que afeta seres humanos e animais (FERREIRA *et al.*, 2007). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a histoplasmose é a segunda micose sistêmica mais diagnosticada em gatos (REINHART *et al.*, 2012). Os gatos em geral apresentam anemia, emagrecimento, letargia, febre, lesões na pele, dispnéia e linfadenomegalia (GIONFRIDDO, 2000). O diagnóstico dessa enfermidade é baseado na associação dos sinais clínicos, anamnese e exames complementares como radiografias, broncoscopia, microbiológicos e testes moleculares (SILVA; BOSCO, 2016).

Histoplasmose é uma micose amplamente distribuída nas Américas, com uma particular endemia nos vales dos rios Ohio e Mississipi nos Estados Unidos, México, Brasil e algumas regiões das Guianas (Guiana Shield) (PASSOS *et al.*, 2014). Além disso, microfocos são comumente registrados no leste dos Estados Unidos, sul da Europa e sudeste da Ásia (CORREIA *et al.*, 2016), causada por *Histoplasma capsulatum variedade capsulatum* e espécies relacionadas como *H. suramericanum*, *H. ohiense* e *H. mississippiense* (GILMORE *et al.*, 2015; SEPÚLVEDA *et al.*, 2017). Este gênero é termodimórfico e apresenta forma miceliar quando exposto a temperatura ambiente (25 °C) e, forma leveduriforme, em temperatura de 37 °C (PITANGUI *et al.*, 2016). É considerado o agente mais prevalente nas infecções respiratórias causadas por fungos registradas nos últimos anos (DAMASCENO *et al.*, 2019).

Análises filogenéticas conduzidas por Sepúlveda e colaboradores (2017), mostram que o gênero *Histoplasma* pode ser composto por pelo menos quatro espécies diferentes tanto com relação à virulência quanto geneticamente, sendo elas *H. capsulatum*, *H. suramericanum*, *H. ohiense* e *H. mississippiense* (GILMORE *et al.*, 2015; SEPÚLVEDA *et al.*, 2017). No entanto, o *H. capsulatum var. duboisii* é considerado uma linhagem africana altamente divergente de todas

as quatro espécies americanas endêmicas, além disso, os indivíduos infectados por essa variedade apresentam diferenças nas manifestações clínicas, sendo associada a lesões granulomatosas predominantemente no tecido subcutâneo, cutâneo e ósseo e não associada a doença pulmonar como nas outras espécies (SEPÚLVEDA *et al.*, 2017).

Sendo assim a infecção é adquirida por via respiratória, a partir da inalação de microconídios ou fragmentos de hifas presentes na natureza e disseminados através da propagação pelo ar (WHEAT *et al.*, 2016). Uma vez inaladas, estas formas de disseminação atingem os alvéolos pulmonares e devido às mudanças de ambiente (temperatura, nutrientes, etc) levam o patógeno a um estado de estresse, onde se diferenciam de conídios em formas leveduriformes (SAHAZA *et al.*, 2014). Estas formas infectantes, por se tratarem de um corpo estranho, desencadeiam uma resposta inflamatória no hospedeiro recrutando células de defesa, principalmente macrófagos, neutrófilos e células dendríticas (DCs) por meio da ativação de receptores patógeno/hospedeiro (GUIMARÃES; NOSANCHUK, 2011). Os macrófagos por se tratarem de células fagocíticas são infectados por leveduras de *H. capsulatum* que por sua vez, produzem um ambiente de estresse para o microrganismo através da acidificação do meio intracelular, produção de radicais de oxigênio e de nitrogênio, peptídeos antimicrobianos, proteases e enzimas hidrolíticas, além da restrição de nutrientes essenciais para a sobrevivência e proliferação dos fungos (TAGLIARI *et al.*, 2012). Uma vez, que os fungos conseguem sobreviver aos mecanismos iniciais de defesa do organismo (macrófagos), os mesmos encontram-se protegidos dentro da célula, podendo assim se multiplicar contrariando a função usual de macrófagos que é de eliminar células nocivas. Esta replicação da forma leveduriforme dentro dos macrófagos desencadeia o rompimento dos mesmos, e tem sido bem documentada por vários autores, facilitando desse modo, a liberação e disseminação do patógeno (HOLBROOK; RAPPLEYE, 2008).

O *Histoplasma capsulatum* pode ser considerado um dos patógenos oportunistas mais importantes do homem. A histoplasmose humana, também denominada de doença de Darling, é considerada zoonose pela Organização Mundial de Saúde (CARNEIRO *et al.*, 2005). Pacientes com linfomas, transplantados renais, cardíacos e hepáticos, pacientes em uso de altas doses de corticosteróides e, particularmente, doentes com AIDS podem desenvolver quadros graves de histoplasmose disseminada, resultantes da recrudescência de infecções latentes e, menos

frequentemente, de reexposição ao microrganismo em áreas hiperendêmicas (FERREIRA; BORGES, 2009).

A infecção ocorre pela inalação de conídeos e pode ser subclínica, mas também causa doença pulmonar, que por via hematogena ou linfática se dissemina para diversos órgãos, com afinidade pelo sistema reticulo endotelial resultando em hepatomegalia e esplenomegalia (KLANG *et al.*, 2013). Os sinais clínicos em gatos, como fraqueza, letargia, febre, anorexia, emaciação, sinais oculares, envolvimento esquelético e sinais respiratórios são frequentemente crônicos e inespecíficos apesar da doença disseminada (BRÖMEL; SYKES, 2005; CARNEIRO *et al.*, 2005). Os gatos infectados podem apresentar-se clinicamente sadios ou desenvolver doença disseminada. A maioria dos casos ocorre em animais com menos de quatro anos de idade (NELSON; COUTO, 2001). O diagnóstico da histoplasmose baseia-se em exames histopatológicos, sorológicos e testes alérgicos, porém o diagnóstico definitivo é feito mediante cultura (CARNEIRO *et al.*, 2005).

Para o tratamento desta micose sistêmica, os fármacos eficazes e disponíveis comercialmente compõem diferentes opções terapêuticas. Entre elas, a anfotericina B desoxicolato é recomendada para o tratamento das formas graves, pulmonares ou disseminadas. Quando não for possível a sua administração é recomendado a anfotericina B lipossomal (KNEALE *et al.*, 2016). O itraconazol é recomendado para o tratamento de formas leves a moderadas, sendo útil também na manutenção pós-anfotericina B. Outros azólicos como fluconazol, podem ser administrados, sendo efetivo em até 70% dos casos (KAPLAN *et al.*, 2009). O voriconazol e o posaconazol são conhecidos por serem medicamentos eficazes, embora tiverem demonstrado atividade *in vitro* contra *H. capsulatum*, os resultados ainda são considerados insuficientes *in vivo* (WHEAT; FREIFELD *et al.*, 2007; AZAR; HAGE, 2017). O tratamento com itraconazol e anfotericina B é limitado por diretrizes que envolvem a absorção variável, o metabolismo e a toxicidade, respectivamente (WHEAT *et al.*, 2016). Muitos estudos revelam que o tratamento geralmente não é curativo (FAIOLLA *et al.*, 2013). No entanto, há relatos do aparecimento de cepas resistentes ao fluconazol, casos de falha terapêutica com itraconazol e é bem conhecido que a anfotericina B causa vários efeitos, nefrotoxicidade e hepatotoxicidade (WHEAT *et al.*, 1997). Além disso, as metodologias para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) frente aos fármacos usuais, como o teste de sensibilidade antifúngica *in vitro* permanecem não padronizadas e necessita de adaptações, não havendo dados

suficientes para o esclarecimento da resistência deste fungo (GOUGHENOUR; BALADALLASAT; RAPPLEYE, 2015).

Portanto, a incidência das infecções fúngicas causadas por linhagens resistentes vem aumentando e assim cresce também a urgência no desenvolvimento de terapias mais efetivas para o tratamento destas doenças (MARTINEZ *et al.*, 2006).

Uma característica fundamental da virulência da forma leveduriforme do *Histoplasma* é sua capacidade de evitar a detecção pelo sistema imunológico do hospedeiro. Sendo assim, para reduzir a detecção de células imunológicas e facilitar a adesão, invasão e proliferação intracelular, ocorrem mudanças não apenas na morfologia celular fúngica, mas também modificações na composição da parede celular, expressão de fatores de virulência e a presença de moléculas antigênicas (KLEIN; TEBBETS, 2007).

3.2. Antimicrobianos naturais

As plantas representam fonte importante de compostos com atividade biológica (FLAMBÓ, 2013), sendo que muitos são derivados do metabolismo secundário vegetal, como por exemplo, os compostos fenilpropanóides, os quais possuem propriedades antifúngicas descritas anteriormente (FREIESLEBEN; JÄGER, 2014). Dentre estes compostos, os derivados do ácido cinâmico, cinamaldeído e eugenol, merecem destaque por apresentarem ação contra fungos filamentosos (KHAN *et al.*, 2012; XING *et al.*, 2014) e leveduras (SHREAZ *et al.*, 2011; TAGUCHI *et al.*, 2013; DE PAULA *et al.*, 2014). O derivado sintético α -metilado do cinamaldeído, α -metil-trans-cinamaldeído, também pode representar um antifúngico promissor, uma vez que reúne a atividade do cinamaldeído ao aumento da lipofilicidade, com possível redução da toxicidade e o aumento da atividade farmacológica (SHREAZ *et al.*, 2011; KHAN *et al.*, 2012; XING *et al.*, 2014).

A canela (*Cinnamomum sp*) tem sido amplamente utilizada como especiaria, bem como na medicina tradicional à base de ervas em todo o mundo e tem uma longa história de uso como tempero e agentes aromatizantes. Ela é tradicionalmente colhida em países asiáticos e amplamente cultivada em Madagascar, no Sri Lanka, na Indonésia e no sul da China. Os constituintes químicos mais importantes da canela são os óleos voláteis (cinamaldeído, eugenol e

ácido cinâmico), mucilagem, diterpenos e proantocianidinas (JAYAPRAKASHA; RAOM; SAKARIAH, 2002).

Os constituintes do óleo essencial (OE) têm sido pesquisados como novas alternativas para o controle do biofilme. Um estudo demonstrou que o cinamaldeído foi eficaz como OE contra células planctônicas de cepas de *P. aeruginosa* ($p < 0,05$). Cinamaldeído mostrou atividade antibacteriana contra células sésseis de *P. aeruginosa* ($p < 0,05$). Para a estirpe ATCC 9027, foi obtida uma eliminação de células bacterianas viáveis em 100% (5,87 log-redução), após tratamento com a solução 6xMIC (0,06% Concentração Inibitória Mínima). As soluções sanitizantes de cinamaldeído podem ser novas alternativas para o controle dessas comunidades sésseis microbianas na indústria alimentícia. (PEREIRA *et al.*, 2019)

As plantas da família Brassicaceae possuem glucosinolatos (compostos sulfurosos formados por um grupo β -D-tioglicosídico com cadeias laterais variáveis) e uma enzima endógena denominada mirosinasa (β -tioglicosideo glicohidrolase, EC 3.2.3.147). Na mostarda marrom, quando o tecido vegetal é lesionado e há presença de água, a mirosinasa é ativada e hidrolisa o glucosinolato sinigrina, formando o isotiocianato de alila (AITC). O AITC foi demonstrado como um dos compostos mais potentes da família dos isotiocianatos contra bactérias, fungos e protozoários.

Dhingra *et al.* (2004) verificaram que o óleo das sementes de mostarda - *Brassica spp* adicionada ao solo inibiu in vitro o crescimento de *Rhizoctonia solani* e sugeriram que o mecanismo de inibição envolvido no controle do fitopatógeno está relacionado à presença de substâncias como isotiocianato de alila (AITC) produzidos pelos tecidos dessas sementes.

O alil isotiocianato (AITC), principal composto da semente de mostarda, tem sido extensivamente estudado por sua atividade antineoplásica. Vários autores têm estudado este seu potencial para o tratamento do câncer de bexiga. A principal razão para essas investigações é a alta biodisponibilidade do composto na urina, ou seja, quando uma dose oral dessa substância é administrada quase sua totalidade é eliminada por excreção renal passando pela bexiga. Enquanto o AITC permanece na bexiga, as células cancerígenas são expostas à substância, que é capaz de induzir bloqueio do ciclo celular e apoptose (MUNDAY *et al.*, 2008; GENG *et al.*, 2011).

Tunc, e colaboradores avaliaram alguns antimicrobianos naturais, dentre eles o CIN e o AITC frente ao *Penicillium notatum* onde Tunc, e colaboradores (2007), demonstram que os

antimicrobianos naturais CIN e AITC foram os que tiveram a melhor eficácia antifúngica. Os MICs para o CIN e AITC foram respectivamente, 0,5 mg/L e 0,375 mg/L.

3.3. Formulação

Foi definido o desenvolvimento de um gel transdérmico (ver figuras 1, 2, 3 e 4) com base em estudos de literatura e viabilidade técnica e econômica. Inicialmente pensamos em adotar um sistema de nanopartículas acopladas de ativos naturais, porém não houve viabilidade técnica e econômica para dar prosseguimento nos estudos.

O desenvolvimento de sistemas transdérmicos tem suscitado interesse crescente nas últimas décadas, uma vez que alguns fármacos foram desenvolvidos com sucesso, utilizando esta via, quer direcionado para uma ação local, quer para uma ação sistêmica (FLYNN, 1990).

A eficácia clínica de um fármaco aplicado por via tópica depende, não só das suas propriedades farmacológicas, mas também da sua disponibilidade no local de ação (LOFTSSON; OLAFSSON, 1998e).

Formas farmacêuticas nanométricas utilizadas na vetorização de fármacos permitem o direcionamento de substâncias, a modulação da distribuição e a consequente realização de seu papel biológico, sendo capazes de superar as barreiras oferecidas pelo organismo. Dentre essas nanoformulações lipossomas, micelas, ciclodextrinas, dendrímeros e as nanopartículas poliméricas (nanocápsulas e nanoesferas) possuem potencial para a utilização na administração do AITC (PUISIEUX; ROBLOT-TREPEL, 1988).

Além disso, esses sistemas melhoram a solubilização de fármacos lipofílicos em água e os protegem contra hidrólise enzimática, além de aumentar o potencial de absorção devido à presença de tensoativo (FORMARIZ et al., 2005). Uma das vantagens do micro emulsionadas frente a outros sistemas dispersos, tais como as suspensões, emulsões e lipossomas é sua estabilidade termodinâmica e consequentemente seu tempo de vida útil muito mais amplo (CRUZ; UCKUN, 2001).

A estratégia de incorporação de extratos vegetais em sistemas nanoestruturados tem sido bastante citada na literatura. Kesarwani e Gupta (2013) publicaram um artigo de revisão no qual mencionam uma série de trabalhos empregando sistemas nanoestruturados para otimizar as

propriedades de extratos vegetais. Recentemente, com o objetivo de avaliar um derivado do ácido protocatecuico (ácido 3,4-dihidroxibenzóico) de fonte vegetal que possui propriedades anti-oxidantes e antifúngicas, Medina-Alarcón *et al.*, (2017) desenvolveu sistemas lipídicos nanoestruturados para carrear e potencializar a ação antifúngica contra o fungo *Paracoccidioides sp* in vitro. Estes agentes são causadores da paracoccidioidomicose uma micose sistêmica humana endêmica no Brasil. Bhattacharya e Ghosh (2009) utilizaram sistemas baseados em lipídios para incorporação de extrato de chá verde e ginseng, com o objetivo de aumentar a absorção dos componentes do extrato.

3.4. Viabilidade econômica

Segundo o IBGE 2019, os brasileiros possuem 54,2 milhões de cães e 23,9 milhões de gatos. A expansão do mercado pet se deu por uma mudança no comportamento dos tutores. Se a maioria dos brasileiros considerava que o lugar do cachorro era no quintal e que os gatos sabiam se cuidar sozinhos, hoje em dia esses pets passaram a ser tratados como membros da família.

De acordo com a ABIN o faturamento em 2018 fechou em R\$ 20,3 bilhões, onde 17,7% refere-se à Pet Vet, 8,4% Pet Care e 73,9% Pet Food. O Brasil possui o segundo maior mercado pet do mundo, ficando atrás apenas dos EUA.

Ainda que os gastos com alimentação sejam responsáveis por mais de 70% do mercado segundo a Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação (Abinpet), especialistas do setor apontam uma tendência de crescimento cada vez maior de nichos que priorizem o bem-estar e qualidade de vida do animal, que é o caso de produtos farmacêuticos com apelo ecológico e que proporcione mais segurança para o Pet e para os donos.

Embora o mercado esteja aquecido, quem deseja empreender precisa investir em inovação, já que em alguns segmentos, como o de produtos farmacêuticos veterinários e demais segmentos, a concorrência é alta. Nesse caso, o produto desenvolvido torna-se uma excelente opção para entrar nesse mercado exigente e competitivo.

Além do fato do mercado de gatos estar em grande crescimento, a importância do produto dá-se por ser uma alternativa eficaz e segura para o controle da esporotricose, uma

enfermidade que afeta humanos e atualmente é uma epidemia em algumas regiões do Brasil e do mundo.

A Esporotricose Humana é uma micose subcutânea que surge quando o fungo do gênero *Sporothrix* entra no organismo, por meio de uma ferida na pele. A doença pode afetar tanto humanos quanto animais. A infecção ocorre, principalmente, pelo contato do fungo na pele ou mucosa por meio de trauma decorrente de acidentes com espinhos, palha ou lascas de madeira; contato com vegetais em decomposição; arranhadura ou mordedura de animais doentes, sendo o gato o mais comum.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Através da revisão de literatura e discussões com o time de P&D, foram selecionadas cepas específicas de fungos que provocam dermatopatias em gatos, também usamos moléculas naturais antifúngicas específicas e por fim definimos o melhor veículo com o propósito de assegurar eficácia dos ativos e estabilidade no produto final.

4.1. Material

4.1.1. Antimicrobianos naturais

Os óleos (AITC e Cinamaldeídos) foram obtidos do fabricante (Sigma-Aldrich). Os produtos possuem qualidade comprovada além de serem padronizados.

Ambos os compostos são considerados GRAS pelo FDA. Essa é uma designação feita pelo FDA que qualquer substância ou químicos adicionados à alimentos, medicamentos ou cosméticos, são seguros de acordo com os especialistas.

4.1.2. Micro-organismos (fungos)

4.1.2.1. *Histoplasma capsulatum*

Para a realização dos ensaios, foi utilizada a cepa de *H. capsulatum* EH-315, recuperada do intestino de um morcego infectado, da espécie *Mormoops*, capturado em uma caverna no estado de Guerrero no México e que foi depositada na Coleção de Culturas do Laboratório de Imunologia de Fungos do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Faculdade de Medicina da Universidade Nacional Autônoma do México (UNAM). Essa cepa foi registrada no banco de dados da Federação Mundial para Coleção de Culturas sob o número LIH-UNAM WDCM817, caracterizado como isolado de alta virulência e gentilmente cedida em colaboração com o grupo de pesquisa liderado pela Profa. Dra Maria Lúcia Taylor. Foi também utilizada como referência a cepa ATCC 26032 (G217B – isolado humano Norte Americano – Los Angeles) gentilmente cedida pelo Dr. Prof. Dr. Allan Jefferson Guimarães da Universidade Federal Fluminense do Rio de Janeiro. *Histoplasma capsulatum* é um fungo dimórfico encontrado sob a forma de bolor no ambiente e in vitro a 25-28 °C. A forma de leveduriforme é observada durante condições de parasitismo ou em culturas a 34-37 °C em meio enriquecido (DAMASCENO *et al*, 2019).

4.1.2.2. *Sporothrix sp*

As cepas foram coletadas no Hospital Veterinário da PUC-PR e são isolados provenientes de gatos com manifestação clínica de esporotricose.

4.1.2.3. *Trichophyton rubrum*

Foi utilizada uma cepa padrão: Cepa ATCC 28189.

4.1.2.4. *Malassezia sp*

Isolados de gatos com manifestação clínica de malasseziose. As cepas foram coletadas no Hospital Veterinário da PUC-PR.

4.1.2.5. *Candida albicans* e *Candida parapsilosis*

Para o experimento foram utilizadas duas cepas a *Candida albicans* ATCC 90028 e *Candida parapsilosis* ATCC 22019.

4.1.3. Gel Transdérmico

Foi usado o gel transdérmico Pentrapet que é uma emulsão óleo em água de penetração transdérmica, com uma matriz fosfolipídica que aumenta a permeação cutânea dos fármacos, tais como antiinflamatórios, antimicrobianos, corticoides, relaxantes musculares, analgésicos, hormônios, entre outras categorias.

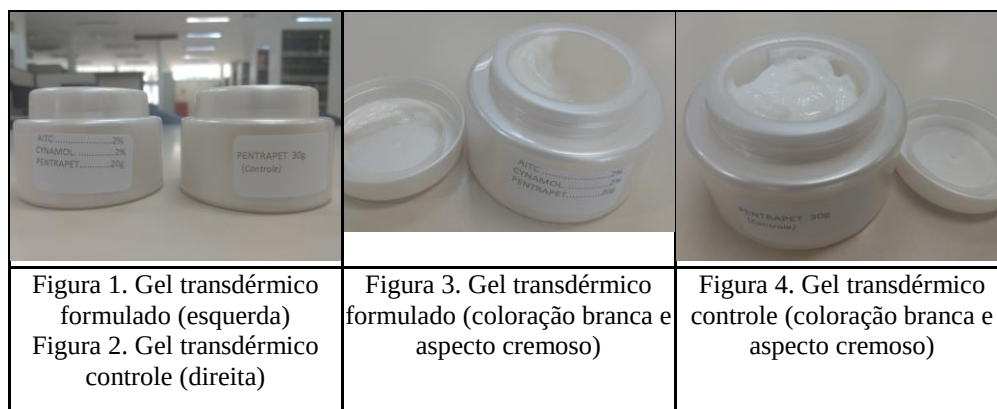
O gel promove uma leve desorganização da camada lipídica da pele sem dissolvê-la como faz o DMSO, permitindo a penetração do gel e ativo através do estrato córneo (ação surfactante anfotérica). O gel permite que o fármaco carregado penetre pelo estrato córneo até a circulação sistêmica via fluxo dérmico-epidérmico.

Dados técnicos:

Aparência Física: Creme evanescente branco opaco denso, de característica não oleosa, isenta de odores desagradáveis e sem residual pegajoso.

Composição: Emulsão lipossomal contendo fosfolipídeo vegetal, surfactantes, agentes emolientes e de consistência, modificadores de sensorial e preservantes.

Características Especiais: GRAS (FDA), produto vegano, produto livre de glúten, livre de lactose e ausência de parabenos.



4.2. Métodos

4.2.1. Avaliação da sensibilidade de isolados de dermatófitos e *Sporothrix sp* aos compostos antifúngicos pela técnica de microdiluição.

4.2.1.1 Diluição dos fármacos

Para todos os fármacos, foram preparadas soluções-estoque considerando sua pureza, através de cálculos preconizados no documento M38-A2, proposto pelo CLSI (2008a). Em seguida, as soluções-trabalho foram preparadas através da diluição das soluções-estoque em meio RPMI-1640 com glutamina, sem bicarbonato e com vermelho de fenol como indicador de pH (Gibco®) e tamponado com MOPS - [ácido 3-(N-morfolina) propanossulfônico] (Sigma-Aldrich), pH=7, nas proporções de 1:100 (fármacos diluídos em DMSO - griseofulvina, terbinafina, itraconazol, nistatina e miconazol) ou 1:10 (fármacos diluídos em solventes aquosos - fluconazol) foram padronizados e colocadas nas placas de 96 poços. Para a diluição dos compostos AITC e Cinamaldeídos foram padronizados os solventes seguindo as instruções do

documento M38-A2, proposto pelo CLSI. Para o teste de sensibilidade dos fungos dermatófitos, os fármacos controles foram testados nos seguintes intervalos de concentração: 64 a 0,125 mg/ L para griseofulvina e fluconazol; 16 a 0,0313 mg/L para nistatina e miconazol e 0,5 a 0,001 mg/ L para terbinafina e itraconazol. Para o composto Cinamaldeído, a partir da formulação comercial pura que se encontra em 132,16g/mol, inicialmente as diluições foram seriadas até a obtenção da CIM. Para o composto AITC a partir da formulação comercial pura que se encontra em 99,15g/mol inicialmente também foi diluída sequencialmente até a obtenção da CIM. Os compostos foram diluídos assepticamente e solubilizados com o auxílio do vórtex. Foram realizados cálculos para determinação da quantidade de cada substância testada para que a concentração inicial na placa de microdiluição seja a maior molaridade possível após a sua solubilização sem interferência do solvente. Como controle da interferência do solvente foi testado concomitantemente o solvente em suas diluições de uso. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas até que a concentração final na placa foi de 0,1ul/L.

4.2.1.2. Preparo do inóculo

Para o preparo do inóculo, os dermatófitos foram cultivados em ágar batata dextrose (Difco, BD biosciences) e incubados à temperatura de 28-30°C por sete dias ou até que houvesse esporulação. As culturas foram então cobertas com 5 mL de solução salina estéril a 0,85%, e uma suspensão de conídios preparada com a ajuda de uma zaragatoa estéril, gentilmente passada nas colônias. Os inóculos foram preparados em meio RPMI-1640 tamponado e ajustados com a contagem dos conídios no hematocitômetro, de modo a atingir uma concentração final na placa de 3×10^3 células/mL. Em seguida, 100 µL foram distribuídos nas placas de 96 poços, juntamente aos seus respectivos controles: o controle de esterilidade do meio, contendo 200 µL do meio RPMI-1640 e o controle de crescimento, contendo 100 µL do meio RPMI e 100 µL do inóculo. Por fim, as placas foram incubadas sem agitação a 35°C por 5 dias e realizadas leituras visual com e sem corante de viabilidade (Alamar blue) e espectrofotométrica na densidade óptica de 490 nm. Todos os testes foram realizados em triplicata (COSTA-ORLANDI, 2018).

4.2.1.3. Avaliação da sensibilidade de isolados de *Cryptococcus sp* e *Histoplasma capsulatum* aos antifúngicos comerciais e os compostos pela técnica de microdiluição.

O teste de sensibilidade para as formas leveduriformes dos fungos dimórficos e para a levedura *Cryptococcus sp* segue as normas do CLSI (M27-A3) e para *Histoplasma capsulatum* adaptações com modificações propostas por Ren-Kai Li *et al.* (2000) e Wheat *et al.* (2001). O inóculo inicial é estabelecido na concentração de 1×10^6 a 5×10^6 e foi realizada uma diluição de 1:10, tendo como concentração final 1×10^5 à $2,5 \times 10^5$ células/mL. As placas foram incubadas por 144 horas, a 37° C com agitação de 150 RPM (rotações por minuto).

4.2.1.4. Controle de qualidade

Para o controle de qualidade dos testes para leveduras o fármaco Itraconazol, foram utilizadas as cepas de *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *C. krusei* ATCC 6258, de acordo com o documento M27- A3, proposto pelo CLSI (2008b). Para os fungos filamentosos foram utilizados o fármaco antifúngico Terbinafina de acordo com o documento M38A2.

4.2.1.5. CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM)

A determinação da Concentração Fungicida Mínima foi realizada conforme descrito por Soares e colaboradores (2014). Placas de Petri contendo ágar Sabouraud Dextrose (Difco, BD biosciences) foram previamente demarcadas de acordo com as posições das diluições dos compostos e controles positivos na placa de 96 poços. Uma alíquota do conteúdo dos poços foi transferida para o respectivo local na placa de Petri com o auxílio de um palito de madeira estéril e as placas foram incubadas a 35°C por 96 horas. A concentração fungicida mínima é definida como a menor concentração do composto ou fármaco onde não ocorre o desenvolvimento de microrganismos (COSTA-ORLANDI, 2016).

4.2.1.6. Avaliação da sensibilidade de isolados de *Sporothrix sp* aos compostos antifúngicos combinados pela técnica de microdiluição.

Para a determinação da sensibilidade dos compostos combinados seguiu-se o protocolo adaptado do Clinical and Laboratory Standards Institute. (2017). M61 - Performance Standards for Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi, (1st ed.). Wayne, PA: CLSI.

Prepararam-se as placas com meio Ágar Sabouraud (AS) ou Batata Dextrose (ABD) e tubos contendo Caldo Sabouraud (CS) ou Triptona de Soja (CTS). Descongelou-se a cepa e transferiu-se 100 µL para os tubos contendo CS ou CTS, deixando a 25 °C, até apresentar crescimento. Após crescimento, utilizando uma alça em loop estéril, recolheu-se o pellet formado e inoculou-se no centro de uma placa com AS ou ABD; Levou-se as placas a uma estufa à 25 °C até apresentar crescimento; Para a retirada dos conídios, retirou-se o fungo da placa e colocou-se em tubo com 5 mL de água peptonada 1%. Após homogeneização em vórtex durante 3 minutos. Aguardou-se 15 minutos para sedimentação de estruturas pesadas e coletou-se o sobrenadante, ajustando para DO_{530nm} 0,09-0,13 e realizou-se a diluição 1:50; em uma placa de 96 poços de fundo chato colocou-se 100 µL de TSB nas fileiras de 2-11. Na fileira 12, 200 µL, pois foi considerado o controle negativo; preparou-se a solução do composto teste na concentração desejada e colocou-se 200 µL na fileira 1; retirou-se 100 µL da fileira 1 e passou-se para a fileira seguinte, homogeneizando. Retirou-se 100 µL e passou-se para a fileira seguinte e assim sucessivamente, fazendo uma diluição seriada 1:2 até a fileira 10. Descartaram-se os 100 µL da fileira 10; inoculou-se com 100 µL da suspensão fúngica da fileira 1-11. Lembrando-se que o poço 11 foi considerado o controle positivo, contendo apenas meio e a solução fúngica. Colocou-se a seladora de placa para fechá-la e envolveu-se com parafilme; incubou-se por 5 dias a 25 °C e realizou-se leitura visual para determinar a concentração inibitória mínima de 50% (CIM50), comparando o controle positivo com o poço que apresentou 50% de seu crescimento.

A figura 5 representa a placa de micro diluição a ser preparada.

200 µL do Composto

Descartar 100 µL

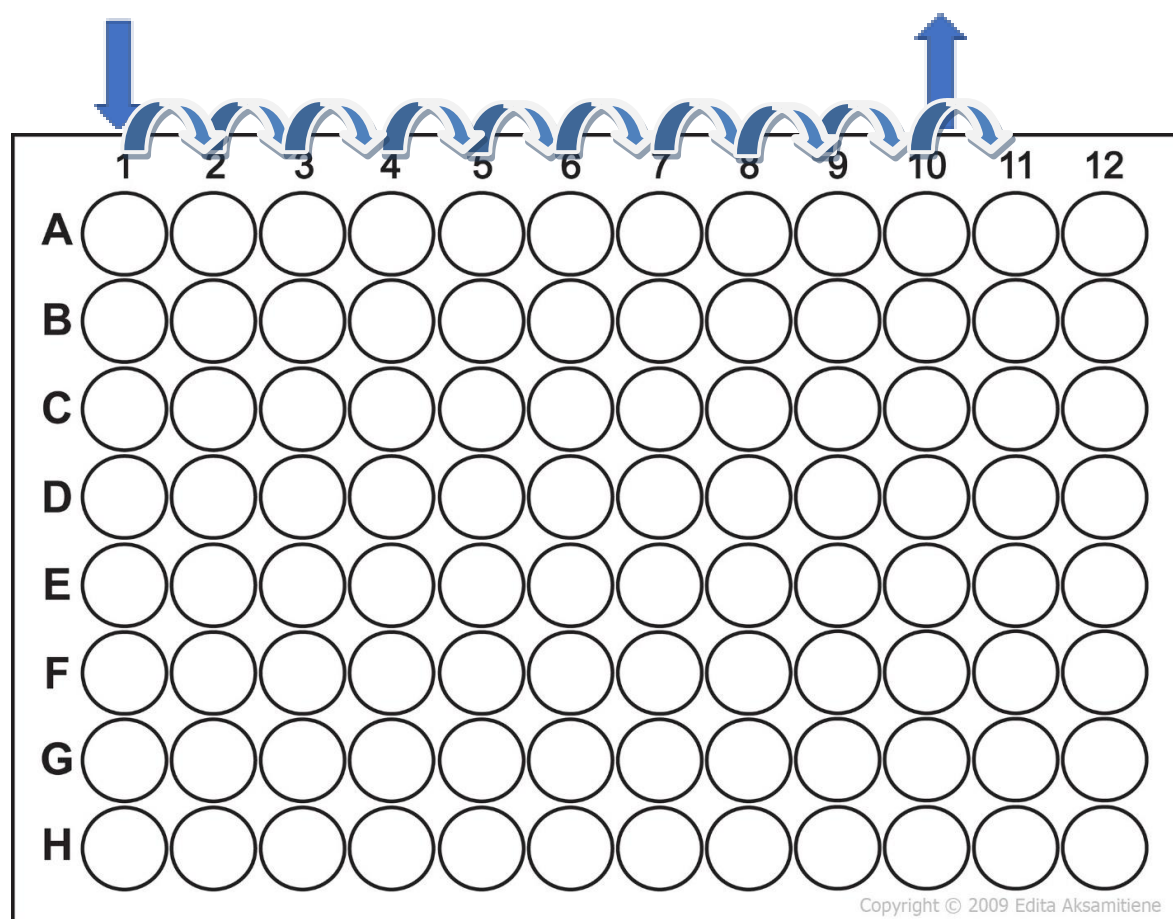


Figura 5. Técnica de microdiluição

C+ C-

Cada fileira, da 2 a 11, deve conter 100uL de TSB, com exceção da 12, que conterá 200uL do meio; após a diluição seriada, inocular 100uL da suspensão fúngica da fileira 1 a 11.

Cáculos para definição de sinergismo:

$$FIC_{index} = (FIC \text{ do AITC/CIM do AITC}) + (FIC \text{ do CIN/CIM do CIN})$$

Quando o FIC_{index} é $<$ ou $=$ a 0,5, determina-se que há efeito sinérgico entre os compostos.

Quando é $=$ ou $>$ que 4,0, determina-se que há antagonismo entre os compostos.

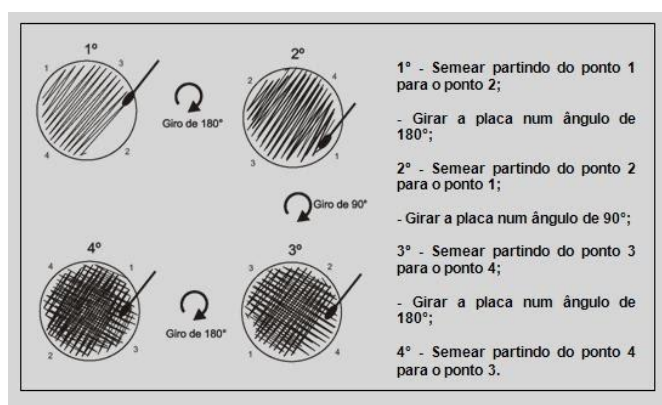
Valores de FIC_{index} entre 0,5 e 4,0 representam que não há interação entre os compostos.

4.2.1.7. Teste de disco difusão

Para o experimento foram utilizadas duas cepas a *Candida albicans* ATCC 90028 e *Candida parapsilosis* ATCC 22019, conforme o documento M44-A (CLSI, 2004), com pequenas modificações. O meio utilizado foi o ágar Sabouraud e o inóculo foi preparado do repique de *Candida* sp que foi incubado a 37°C por 24 horas. Em 5mL de solução salina 0,85%, foram colocadas 5 colônias, vortexando por 15 segundos e contadas em câmara de Neubauer. A suspensão foi ajustada 5×10^6 células/mL. O swab estéril foi mergulhado nesta suspensão e foi retirado o excesso e passado em toda a superfície do ágar (figura 6), esperou-se 3 a 5 minutos e aplicaram-se os discos com os compostos. Após aplicado os discos, incubou-se por 24 horas e foi medido o tamanho dos halos.

Para as cepas de *Histoplasma capsulatum*, os fungos foram incubados por 96 horas a 37°C no meio BHI e após isto foi subcultivado no meio líquido HAM-F12 por 72 horas. O inóculo foi ajustado na concentração de 5×10^6 em PBS com ajuda da câmara de Neubauer e foram retirados 100 µL da concentração e colocado nas placas de ágar BHI espalhou-se com a ajuda de um swab, deixou-se de 3 a 5 minutos e aplicou os discos.

Figura 6 – Método de semeadura para a técnica de disco difusão

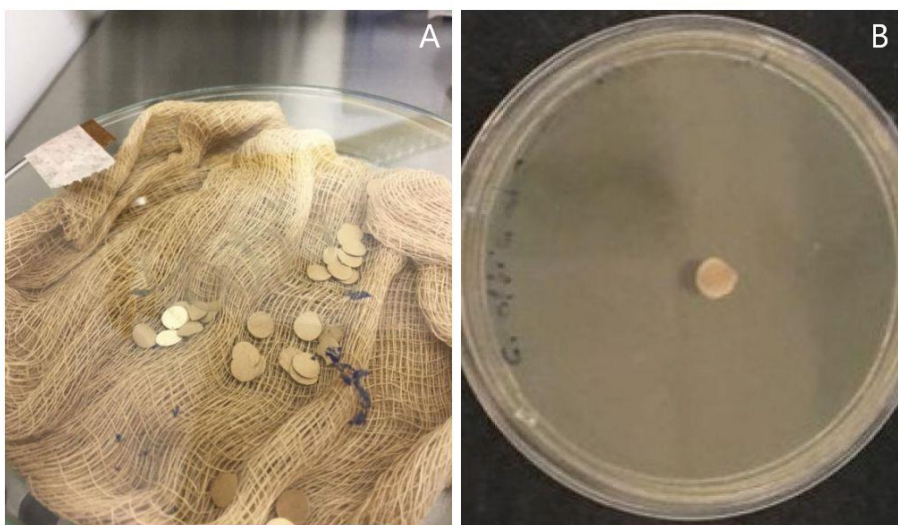


Fonte: https://sites.google.com/site/254512/Home/microbiologia-1/Microbiologia_Veterinaria/bacteriologia-veterinaria/procedimento-para-a-realizacao-de-antibiograma

Preparo dos compostos para a técnica de disco difusão

Para a técnica de disco difusão, foram cortados papeis cartão em formatos redondos e esterilizados em autoclave por 15 minutos a 121o C (figura 2 - A). Após este tempo, foram colocados na estufa de secagem. Todo o procedimento foi realizado dentro da cabine de segurança. Com o auxílio de uma pinça estéril, após a aplicação do inoculo nas placas, os discos foram colocados em contato com os compostos e transferidos para a área central da placa de Petri (figura 7-B), além disto, foi utilizado como controle disco contendo o fármaco comercial fluconazol. Os experimentos foram realizados em duplicata.

Figura 7 – Técnica de disco difusão – A – discos estéreis; B – disco e composto aplicados na placa de Petri.



Fonte: próprio autor.

4.2.1.8. Desenvolvimento da formulação em gel

As matrizes de gel (veículo) foram formuladas e adquiridas comercialmente para seleção da melhor incorporação dos compostos (cinamaldeído e AITC).

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

De acordo com a literatura e experiência com esses compostos naturais, os resultados foram satisfatórios, numa CIM muito baixa, demonstrando grande potencial para controle desses agentes causadores de dermatite em gatos.

O AITC é um composto volátil que está relacionado com diversos efeitos benéficos à saúde humana incluindo potencial antiangiogênico, anti-inflamatório, neuroprotetor e anticarcinogênico (BHATTACHARYA *et al.*, 2013). O AITC é o mais potente antimicrobiano entre os ITCs, devido a sua ação antimicrobiana em doses menores (OLAIMAT; HOLLEY, 2016).

Tem sido relatado que o cinamaldeído, que contem compostos terpenóides ou fenólicos, hidrofóbicos, têm poderosa atividade antimicrobiana contra uma variedade de patógenos, incluindo fungos, bactérias Gram-positivas e Gram- negativas

Sanla-Ead, e colaboradores (2012) obtiveram boa atividade antibacteriana, a partir de filmes a base de celulose adicionado ao CND, com concentrações inibitórias mínimas que variaram de 0,78 a 50 µl/ml contra as bactérias *Aeromonas hydrophila* e *Enterococcus faecalis*.

O resultado de determinação do CIM do presente estudo encontra-se na tabela 1 e pode ser destacado que os valores de CIM para o AITC e Cinamaldeído foram baixos por serem moléculas naturais. Os valores de CIM para moléculas naturais e antibióticos convencionais podem variar, apresentando valores maiores ou menores.

Em um estudo comparativo do cinamaldeído com antibióticos convencionais (quinolona e cefalosporina) demonstrou-se que o cinamaldeído apresentou uma eficácia maior, ou seja, o MIC foi menor se comparado aos dois antibióticos convencionais (DHARA, 2019).

Tabela 1. Atividade antifúngica e concentração inibitória mínima (CIM) dos compostos isolados.

Microorganismos	Cepas	Valores CIM ($\mu\text{g/mL}$)	Valores CIM ($\mu\text{g/mL}$)	Itraconazol ($\mu\text{g/mL}$)	Terbinafina ($\mu\text{g/mL}$)
		AITC	Cinamaldeído		
<i>H. capsulatum</i>	EH 315	31.25	15.9	0,125	ND
<i>H. capsulatum</i>	ATCC 26032	31.25	15.9	0,125	ND
<i>Sporothrix sp</i>	Isolado 4947	15.62	31.25	ND	ND
<i>Sporothrix sp</i>	Isolado 4948	7.81	62.5	ND	ND
<i>Sporothrix sp</i>	Isolado 4934	7.81	125	ND	ND
<i>T. rubrum</i>	ATCC 28189	3.9	62.25	ND	0,03

ND: Não detectável.

Na tabela 2 se pode notar quanto aos testes de combinação que em algumas cepas não houve interação dos compostos, observamos uma redução bem discreta na concentração necessária, quando comparamos os compostos isolados e combinados. Na cepa 4947 houve uma redução mais acentuada na concentração, quando comparamos a concentração dos compostos isolados e combinados, por isso apresentou o valor de 0,5 de sinergismo.

Vale a pena ressaltar que mesmo o teste demonstrando em alguns casos que não houve interação entre os compostos (sinergismo), efeito de potencialização, a combinação do cinamaldeído com o AITC torna o produto mais agradável para o animal no quesito de conforto e bem-estar, pois o AITC tem um odor mais pungente, e a junção com o CIN mesmo não potencializando o efeito antifúngico, consegue diminuir o efeito característico do AITC.

Tabela 2. Atividade antifúngica (*Sporothrix sp*) dos compostos associados.

Cepa	MIC ($\mu\text{g/mL}$)		MFC ($\mu\text{g/mL}$)		FIC ($\mu\text{g/mL}$)		FIC _{index}
	AITC	CIN	AITC	CIN	AITC	CIN	
4947	15,625	31,25	31,25	62,5	3,90625	7,8125	0,5*
416	7,8125	31,25			3,90625	31,25	1,5
4935	3,90625	7,8125			3,90625	7,8125	2
4948	7,8125	62,5	62,5	500	3,90625	31,25	1
4934	7,8125	125	62,5	500	3,90625	31,25	0,75

*Combinação sinérgica

Na tabela 3 confirmamos os resultados satisfatórios para o *Histoplasma capsulatum*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* e dermatófito (*T. rubrum*). Os compostos foram avaliados de forma isolada.

Tabela 3. Atividade antifúngica dos compostos isolados.

<i>Histoplasma capsulatum</i>	EH315	ATCC 26032	
AITC	31.25	31.25	(µg/mL)
CIN	15.9	15.9	
Itraconazol	0,125 µg/mL	0,125 µg/mL	
<i>Candida albicans</i>			
AITC	125	(µg/mL)	
CIN	62.5		
Fluconazol	4 µg/mL		
<i>Candida parapsilosis</i>			
AITC	62.5	(µg/mL)	
CIN	31.25		
Itraconazol	4 µg/mL		
<i>T. rubrum</i>			
AITC	7.8	(µg/mL)	
CIN	3.9		
Terbinafina	0,015 µg/mL		

Conforme a tabela 4, seguem os halos formados pela técnica de disco difusão. Observamos um halo maior quando combinamos os compostos CIN e AITC. Na figura 8 vemos com clareza a formação dos halos de inibição.

Tabela 4 – Valores referentes aos compostos da técnica de disco difusão

Cepa/Tratamento	Fluconazol (25 mcg)	AITC	CIN	AITC+CIN	Pentrapet
<i>C. albicans</i>	23 mm	15 ± 7 mm	22 ± 4 mm	≥ 40 mm	0 mm
<i>C. parapsilosis</i>	20 mm	12 ± 5 mm	27 ± 3 mm	≥ 40 mm	0 mm

AITC: Isotiocianato de alila; CIN: Cinamaldeído; Pentrapet: veículo transdérmico, controle negativo.

Os resultados presentes na tabela 4, demonstram o efeito sinérgico entre o CIN e o AITC avaliados frente à espécies de *Candida*, confirmando outros resultados já apresentados na tabela 1 frente ao *Sporothrix* sp. Esses dados também estão descritos na literatura.

A atividade sinérgica do AITC com o Fluconazole foi avaliada contra *Candida albicans*. Esse agente é uma ameaça para pacientes imunossuprimidos. A sinergia foi identificada entre o AITC e FLC e oferece uma estratégia em potencial para tratamento de candidíase. (RAUL *et al*, 2017)

Moléculas como o 4-terpineol, carvacrol e aldeído cinâmico são determinados como agentes antimicrobianos, frente a cepas como *C. albicans*, *C. glabrata* ou *E. coli* (CHAILLOT *et al.*, 2015; YANG; CHAO; LIU, 2014). O efeito antifúngico de fitoconstituintes como citrônolol, alfa-terpineol e limoneno é, especialmente frente à espécies do gênero *Penicillium* (TAO; JIA; ZHOU, 2014).

Embora a infecção fúngica represente uma interação entre espécies, notadamente a mais prevalente é a *C. albicans* (ZOMORODIAN *et al.*, 2011), sendo esta incluída em ensaios antifúngicos (ALMEIDA *et al.*, 2012; DE ALMEIDA *et al.*, 2016; FAOT *et al.*, 2014). Desta forma, pouco se relata sobre o efeito de fitoconstituintes frente a espécies não *albicans*. O presente estudo, contudo, confirma a capacidade inibitória tanto do AITC quanto do cinamaldeído, frente às cepas de *C. albicans* e *C. parapsilosis*.

Figura 8 – Halos de inibição dos compostos mais o fármaco. A – Imagem representativa da *C. albicans* tratada com fluconazol; B – tratada com AITC; C – tratada com CIN; D – tratada com a combinação de AITC+CIN e E – controle negativo – Pentrapet.

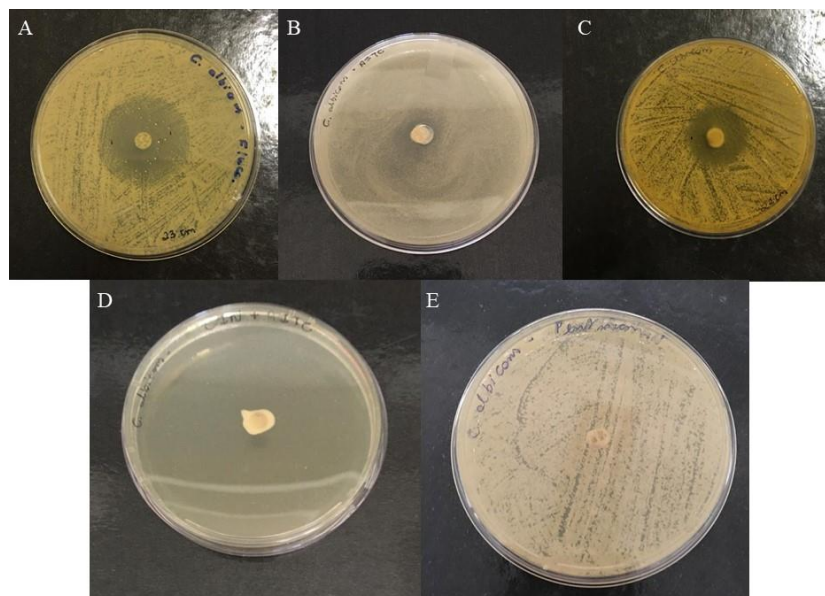
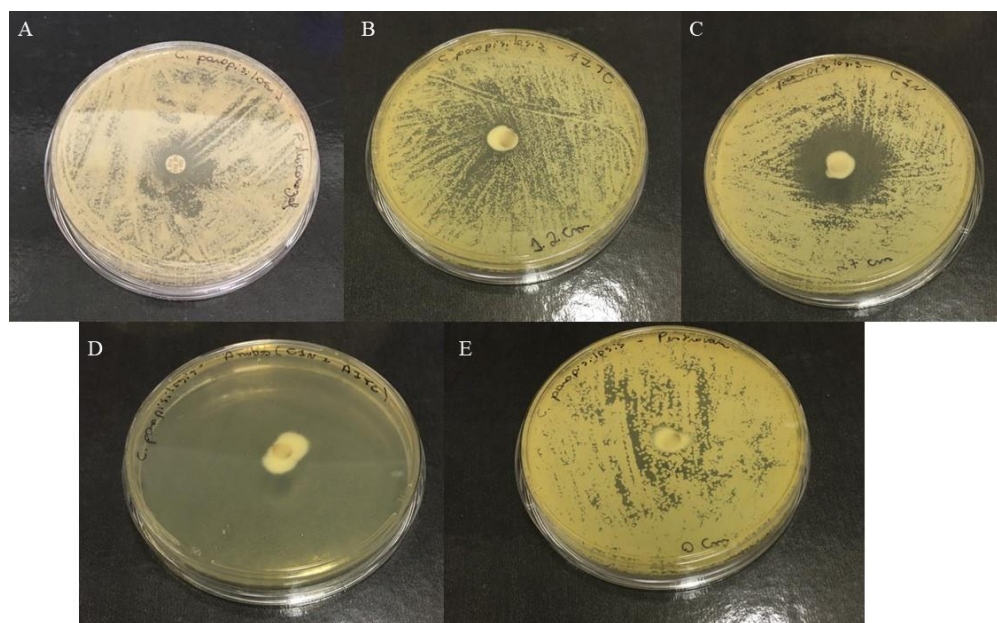


Figura 9 - Halos de inibição dos compostos mais o fármaco. A – Imagem representativa de *C. parapsilosis* tratada com fluconazol; B – tratada com AITC; C – tratada com CIN; D – tratada com a combinação de AITC+CIN e E – controle negativo – Pentrapet.



6. CONCLUSÃO E TRABALHOS FUTUROS

Mesmo com a crise econômica enfrentada pelo país e a contenção de gastos que as pessoas estão praticando, essa área de produtos farmacêuticos veterinários tem se destacado muito pelo fato dos animais de estimação terem passado para dentro das casas e ganhado o status de membros das famílias.

Atentos a esse mercado Pet, resolvemos investir em produtos voltados para esse segmento. A empresa tem investido em pesquisa para capitalizar novos mercados, e o setor Pet foi o principal apontado, tanto pelo tamanho quanto pelo crescimento contínuo.

Além do fato do mercado de gatos estar em grande crescimento, a importância do produto dá-se por ser uma alternativa eficaz e segura para o controle da esporotricose, uma enfermidade que afeta humanos e atualmente é uma epidemia em algumas regiões do Brasil e do mundo.

A ideia inicial do projeto é termos um gel transdérmico anti-micótico para gatos, utilizando moléculas naturais com liberação controlada de ativos. O apelo de termos um produto inovador onde associamos moléculas naturais (derivadas de plantas) com tecnologia de aplicação dérmica (gel transdérmico) vem ao encontro dessa nova “onda verde”, onde os consumidores buscam produtos que sejam seguros para seus animais de estimação e que também não afetem o meio ambiente. Esse projeto está plenamente alinhado à filosofia da empresa em praticamente não utilizar produtos químicos, e buscar, através de projetos subsidiados, alternativas em produtos naturais que sejam eficazes e seguros ao meio ambiente.

6.1. Conclusão

O produto Gel Transdérmico associado aos ativos cinamaldeído e AITC foi altamente eficaz frente à *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* e *Sporothrix schenckii*.

Além disso, os compostos ativos isolados e combinados foram eficazes frente aos principais agentes fúngicos causadores de doenças em gatos e em seres humanos, tais como, *Histoplasma*, *Sporothrix sp* e dermatófitos.

A escolha dos princípios ativos e do veículo para formulação final do produto foi muito assertiva, tanto por efeitos de eficácia quanto por propriedades sensoriais do produto, oferecendo assim maior conforto aos animais e um melhor aroma.

6.2. Trabalhos futuros

- a) Avaliação da estabilidade da formulação final;
- b) Teste de dispersão dérmica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU-DARWISH, M. S. *et al.* Chemical Composition and Biological Activities of *Artemisia judaica* Essential Oil from Southern Desert of Jordan. **Journal Ethnopharmacology**, v. 191, p. 161-168, Jun 2016. ISSN 1872-7573. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27318275> >.

AHMAD, F. *et al.* An in vivo evaluation of acute toxicity of cobalt ferrite (CoFe₂O₄) nanoparticles in larval-embryo Zebrafish (*Danio rerio*). **Aquatic Toxicology**, v. 166, p. 21-8, Sep 2015. ISSN 1879-1514. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26197244> >.

AJDACIC, V. Synthesis and evaluation of thiophene-based guanylhyazones (iminoguanidines) efficient against panel of voriconazole-resistant fungal isolates. In: LIDIJA SENEROVIC, M. V.; PEKMEZOVIC, M.; ARSIC-ARSNIJEVIC, V. *et al.* **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 24, p. 1277-1291, 2016.

ALBUQUERQUE, P.; CASADEVALL, A. Quorum sensing in fungi--a review. **Medical Mycology**, v. 50, n. 4, p. 337-45, May 2012.

ALWAN, W. S. *et al.* Novel imidazo[2,1-b]-1,3,4-thiadiazoles as promising antifungal agents against clinical isolate of *Cryptococcus neoformans*. **European Journal Medicinal Chemistry**, v. 95, p. 514-25, May 2015. ISSN 1768-3254. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25847769> >.

ANDES, D. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antifungals. **Infectious Diseases Clinics North America**, v. 20, n. 3, p. 679-97, Sep 2006. ISSN 0891-5520. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16984875> >.

ATIEE, G.; KVITKO-WHITE, H.; SPALDING, K.; JOHNSON, M. Ultrasonographic appearance of histoplasmosis identified in the spleen in 15 cats. **Veterinary Radiology Ultrasound**, v.55, p.310-314. (2014).

BANERJEE, P. *et al.* *Cryptococcus laurentii* fungemia. **Indian Journal Medical Microbiology**, v. 31, n. 1, p. 75-7, 2013 Jan-Mar 2013.

BARRET, R.E.; SCOTT, D.W. Treatment of feline Cryptococcosis: literature review and case report. **Journal American Animal Hospital Association**, v. 11, p. 511-518, 1975.

BARROS M.B.L.; SCHUBACH T.P.; COLL J.O.; GREMIÃO I.D.; WANKE B.; SCHUBACH A. Esporotricose: a evolução e os desafios de uma epidemia. **Revista Panamericana Salud Pública** v. 27, n. 6, p. 455-460. 2010.

BASTIDAS, R. J. *et al.* Rapamycin exerts antifungal activity in vitro and in vivo against *Mucor circinelloides* via FKBP12-dependent inhibition of Tor. **Eukaryotic Cell**, v. 11, n. 3, p. 270-81, Mar 2012. ISSN 1535-9786. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22210828> >.

BEALE, K. M. Dermatofitose. In: BICHARD, S. J.; SHERDING, R. G. **Manual Saunders: clínica de pequenos animais**. São Paulo: Roca, 1998. p.321-28.

BEGUM, N. A. Mosquito larvicidal studies of some chalcone analogues and their derived products: structure-activity relationship analysis. In: ROY, N. **Medicinal Chemistry Research**. v. 20, p. 184-191, 2011.

BEN YAAKOV, D. *et al.* Identification and characterization of haemofungin, a novel antifungal compound that inhibits the final step of haem biosynthesis. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 4, p. 946-52, Apr 2016. ISSN 1460-2091. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26747101> >.

BERGERON, M.G.; OUELLETTE, M. Preventing Antibiotic Resistance through Rapid Genotypic Identification of Bacteria and of Their Antibiotic Resistance Genes in the Clinical Microbiology Laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**. Washington, v. 36, n.8, p. 2169–2172, ago.1998.

BONIFAZ, A.; TIRADO-SANCHES, A. Cutaneous Disseminated And Extracutaneous Sporotrichosis: Current Status Of A Complex Disease. **Journal Fungi**, v. 3, 1, 6 p. 2017.

BRILHANTE, R.S.N.; LIMA, R.A.C.; FARIAS MARQUES, F.J.; SILVA, N.F.; CAETANO, E.P.; CASTELO-BRANCO, D.D.S.C.M.; BANDEIRA, T.J.P.G.; MOREIRA, J.L.B.; CORDEIRO, R.A.; MONTEIRO, A.J.; CAMARGO, Z.P.; SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. *Histoplasma capsulatum* in planktonic and biofilm forms: in vitro susceptibility to amphotericin B, itraconazole and farnesol. **Journal of Medical Microbiology**, v.64, n.4, p.394-399, 2015.

BRILHANTE, R. S. *et al.* Simvastatin inhibits planktonic cells and biofilms of *Candida* and *Cryptococcus* species. **Brazilian Journal Infectious Diseases**, v. 19, n. 5, p. 459-65, 2015 Sep-Oct 2015. ISSN 1678-4391. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26119850> >.

BRIZENDINE, K. D.; BADDLEY, J. W.; PAPPAS, P. G. Pulmonary cryptococcosis. **Seminars in Respiratory Critical Care Medicine**, v. 32, n. 6, p. 727-34, Dec 2011.

BROMEL, C.; SYKES, J. E. Histoplasmosis in dogs and cats. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v. 20, p. 227-232, 2005.

BRYAN, R. A. *et al.* Radioimmunotherapy is more effective than antifungal treatment in experimental cryptococcal infection. **Journal Infectious Diseases**, v. 202, n. 4, p. 633-7, Aug 2010.

BUSQUET, F. *et al.* OECD validation study to assess intra- and inter-laboratory reproducibility of the zebrafish embryo toxicity test for acute aquatic toxicity testing. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 69, n. 3, p. 496-511, Aug 2014. ISSN 1096-0295. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24874798> >.

BYRNES, E. J.; LI, W.; LEWIT, Y.; MA, H.; VOELZ, K.; REN, P.; CARTER, D. A.; CHATURVEDI, V.; BILDFELL, R. J.; MAY, R. C.; HEITMAN, J. Emergence and pathogenicity of highly virulent *Cryptococcus gattii* genotypes in the northwest United States. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 4, p. e1000850, 2010.

BYRNES, E. J. et al. *Cryptococcus gattii*: an emerging fungal pathogen infecting humans and animals. **Microbes Infection**, v. 13, n. 11, p. 895-907, Oct 2011. ISSN 1769-714X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21684347> >.

CAUS, A.L.O. **Esporotricose no estado do Espírito Santo: um estudo de três décadas**. 2013. 53 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde, Vitória, 2013.

CABAÑES, F.J. Dermatofitosis animales. Recientes avances. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.17, p.S8- S12, 2000.

CARDOSO, N. N. et al. Synergism Effect of the Essential Oil from *Ocimum basilicum* var. Maria Bonita and Its Major Components with Fluconazole and Its Influence on Ergosterol Biosynthesis. **Evidence Based Complementary Alternative Medicine**, v. 2016, p. 5647182, 2016. ISSN 1741-427X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27274752> >.

CARLOS, I.Z.; SASSA, M.F.; SGARBI, D.B.G.; PLACERES, M.C.; MAIA, D.C. Current research on the immune response to experimental sporotrichosis. **Mycopathologia**, v. 168, p. 1-10, 2009.

CARNEIRO, R. A.; LAVALLE, G. E.; ARAÚJO, R. B. Histoplasmose cutânea em gato: relato de caso. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, p. 158-161, 2005.

CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L. Host-pathogen interactions: the attributes of virulence. **Journal Infectious Diseases**, v. 184, n. 3, p. 337-44, Aug 2001.

CHAILLOT, J. et al. The monoterpene carvacrol generates endoplasmic reticulum stress in the pathogenic fungus *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 8, p. 4584–4592, 2015.

CHANDENIER, J. et al. In vitro activity of amphotericin B, fluconazole and voriconazole against 162 *Cryptococcus neoformans* isolates from Africa and Cambodia. **European Journal Clinical Microbiology Infectious Diseases**, v. 23, n. 6, p. 506-8, Jun 2004. ISSN 0934-9723. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15141336> >.

CHANDRA, J.; KUHN, D.M.; MUKHERJEE, P.K.; HOYER, L.L.; MCCORMICK, T.; GHANNOUM, M.A. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 18, p. 5385-5394, 2001.

CHANDRA, J.; PATEL, J.D.; LI, J.; ZHOU, G.; MUKHERJEE, P.K.; MCCORMICK, T.S.; ANDERSON, J.M.; GHANNOUM, M.A. Modification of surface properties of biomaterials influences the ability of *Candida albicans* to form biofilms. **Applied Environmental Microbiology**, v. 71, n. 12, p. 8795-8801, 2005.

CHATURVEDI, S. *et al.* *Cryptococcus gattii* in AIDS patients, southern California. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 11, p. 1686-92, Nov 2005. ISSN 1080-6040. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16318719> >.

CHATURVEDI, V.; CHATURVEDI, S. *Cryptococcus gattii*: a resurgent fungal pathogen. **Trends Microbiology**, v. 19, n. 11, p. 564-71, Nov 2011.

CHAVES, L. J. Q. **Dermatomicoses em cães e gatos: avaliação do diagnóstico clínico-laboratorial e dos aspectos epidemiológicos em uma população de portadores de lesões alopecias circulares**. 2007. 85 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2007.

CHEN, J. *et al.* *Cryptococcus neoformans* strains and infection in apparently immunocompetent patients, China. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 5, p. 755-62, May 2008. ISSN 1080-6059. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18439357> >.

CHEN, S. C.; SORRELL, T. C. Antifungal agents. **Medical Journal of Australian**, v. 187, n. 7, p. 404-9, Oct 2007. ISSN 0025-729X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17908006> >.

CHENG, P. Y.; SHAM, A.; KRONSTAD, J. W. *Cryptococcus gattii* isolates from the British Columbia cryptococcosis outbreak induce less protective inflammation in a murine model of infection than *Cryptococcus neoformans*. **Infection Immunity**, v. 77, n. 10, p. 4284-94, Oct 2009. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19635827> >.

CHOWDHARY, A. *et al.* Environmental prevalence of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in India: an update. **Critical Reviews Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 1-16, Feb 2012. ISSN 1549-7828. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22133016> >.

CID, V. J. *et al.* Molecular basis of cell integrity and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiological Review**, v. 59, n. 3, p. 345-86, Sep 1995. ISSN 0146-0749. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7565410> >.

CLARK, M.E.; HE, Z.; REDDING, A.M.; JOACHIMIAK, M.P.; KEASLING, J.D.; ZHOU, J.Z.; ARKIN AP, *et al.* Transcriptomic and proteomic analyses of *Desulfovibrio vulgaris* biofilms: carbon and energy flow contribute to the distinct biofilm growth state. **BMC Genomics**. v. 13, Article ID 138, 2012.

CLARK, L.; ROUBIN, G.S. Cryptococcosis in a cat. **Australian Veterinary Journal**, v. 46, n. 11, p. 544-548, 1970.

CLARK, L.; SEAWRIGHT, A.A. Amhloidosis associated with chronic hypervitaminosis A in cats. **Australian Veterinary Journal**. v. 44, n. 12, p. 584, 1968.

CLSI. M38-A. Método de referência para testes de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade a terapia antifúngica dos fungos filamentosos: norma aprovada, v. 22, n. 16, 2002. 50p.

CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; Approved Standard – 2nd. ed. CLSI document M38-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008a.

CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard – 3rd. ed. CLSI document M27-A3 . Wayne, PA, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute 2008b.

COHEN, M. L. Changing patterns of infectious disease. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 762-7, Aug 2000. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10963605> >.

CORREIA, F. G. S. *et al.* Spatial distribution of disseminated histoplasmosis and AIDS co-infection in an endemic area of Northeastern Brazil. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, p. 227–231, 2016.

COSTERTON, J. W. *et al.* Microbial biofilms. **Annual Review of Microbiology**, v. 49, p. 711-45, 1995.

CRUZ, L. C. H. Complexo *Sporothrix Schenckii*. **Veterinária e Zootecnia**. v. 20, p. 8-28, 2013.

CYTRYŃSKA, M.; ZDYBICKA-BARABAS, A.; JAKUBOWICZ, T. The involvement of protein kinase A in the immune response of *Galleria mellonella* larvae to bacteria. **Acta Biochimica Polonica**, v. 54, n. 1, p. 167-74, 2007. ISSN 0001-527X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17311109> >.

DAMASCENO, L. S. *et al.* Mixed infection by *Histoplasma capsulatum* isolates with different mating types in Brazilian AIDS-patients. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 61, Article ID e-8, fev. 2019.

DE CARVALHO TAVARES, L. *et al.* Quinolinyln and quinolinyln N-oxide chalcones: synthesis, antifungal and cytotoxic activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 9, p. 4448-4456, Sep 2011. ISSN 1768-3254. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21816519> >.

DE LACORTE SINGULANI, J. *et al.* Evaluation of the efficacy of antifungal drugs against *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii* in a *Galleria mellonella* model. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 48, n. 3, p. 292-297, Jul 2016. ISSN 1872-7913. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27444116> >.

DE PAULA, S. B.; BARTELLI, T. F.; DI RAIMO, V.; SANTOS, J. P.; MOREY, A. T.; BOSINI, M. A.; NAKAMURA, C. V.; YAMAYCHI, L. M.; YAMADA-OGATTA, S. F. Effect of eugenol on cell surface hydrophobicity, adhesion, and biofilm of *Candida tropicalis* and *Candida dubliniensis* isolated from oral cavity of HIV-infected patients. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, p. 1-8. 2014.

DHARA, L.; TRIPATHI, A. Cinnamaldehyde: a compound with antimicrobial and synergistic activity against ESBL-producing quinolone-resistant pathogenic Enterobacteriaceae. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**. v. 39, p. 65-73, 2019.

DHINGRA, O.D. *et al.* Essential oil of mustard to control *Rhizoctonia solani* causing seedling damping off and seedling blight in nursery. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, n.6, p.683-6, 2004.

DONADEL, K.W.; REINOSO, Y.D.; OLIVEIRA, J.C.; AZULAY, R.D. **Anais Brasileiros de Dermatologia** [site de Internet]. Esporotricose: revisão. [citado em 19 maio 2008] Disponível em: <http://www.anaisdedermatologia.org.br/artigo>.

DONG, Z. M.; MURPHY, J. W. Effects of the two varieties of *Cryptococcus neoformans* cells and culture filtrate antigens on neutrophil locomotion. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 7, p. 2632-44, Jul 1995. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7790079> >.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Review**, v. 15, n. 2, p. 167-93, Apr 2002.

DORA, J. M. *et al.* Cutaneous cryptococcosis due to *Cryptococcus gattii* in immunocompetent hosts: case report and review. **Mycopathologia**, v. 161, n. 4, p. 235-8, Apr 2006. ISSN 0301-486X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16552487> >.

DUCHARME, N. A. *et al.* Comparison of toxicity values across zebrafish early life stages and mammalian studies: Implications for chemical testing. **Reproductive Toxicology**, v. 55, p. 3-10, Aug 2015. ISSN 1873-1708. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25261610> >.

ECHEVERRIA, C. *et al.* Structural antitumoral activity relationships of synthetic chalcones. **International Journal of Molecular Science**, v. 10, n. 1, p. 221-31, Jan 2009. ISSN 1422-0067. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19333443> >.

EIMON, P. M.; RUBINSTEIN, A. L. The use of in vivo zebrafish assays in drug toxicity screening. **Expert Opinion Drug Metabolism & Toxicology**, v. 5, n. 4, p. 393-401, Apr 2009. ISSN 1744-7607. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19368493> >.

ELLIS, D.H.; PFEIFFER, T.J. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, p. 1642-1644, 1990a.

ELLIS, D.H.; PFEIFFER, T.J. Ecology, life cycle, and infectious propagule of *Cryptococcus neoformans*. **Lancet**, v. 336, p. 923-925, 1990b.

ELLS, T.C.; TRUELSTRUP HANSEN, L. Strain and growth temperature influence *Listeria* spp. attachment to intact and cut cabbage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 111, n. 1, p. 34-42, 2006.

EMMS, S.G. Ketoconazole in the treatment of Cryptococcosis in cats. **Australian Veterinary Journal**, v. 64, n. 9, p. 276-277, 1987.

ESCANDÓN, P. *et al.* Cryptococcosis in Colombia: Results of the national surveillance program for the years 2006-2010. **Biomedica**, v. 32, n. 3, p. 386-98, Sep 2012.

FAIOLLA, R.C.; COELHO, M.C.; SANTANA, R.C.; MARTINEZ, R. Histoplasmosis in immunocompetent individuals living in an endemic area in the Brazilian Southeast. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, p. 461-465, 2013.

FAVALESSA, O. C. *et al.* First description of phenotypic profile and in vitro drug susceptibility of *Cryptococcus* spp yeast isolated from HIV-positive and HIV-negative patients in State of Mato Grosso. **Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, v. 42, n. 6, p. 661-5, 2009 Nov-Dec 2009. ISSN 1678-9849. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20209351> >.

FAVRE-GODAL, Q. *et al.* Comprehensive approach for the detection of antifungal compounds using a susceptible strain of *Candida albicans* and confirmation of in vivo activity with the *Galleria mellonella* model. **Phytochemistry**, v. 105, p. 68-78, Sep 2014. ISSN 1873-3700. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24984572> >.

FELDMESSER, M. *et al.* *Cryptococcus neoformans* is a facultative intracellular pathogen in murine pulmonary infection. **Infection Immunity**, v. 68, n. 7, p. 4225-37, Jul 2000.

FERNANDES, O. D. F. L. *Cryptococcus neoformans* isolados de pacientes com AIDS. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 33, p. 75-78, 2000.

FERREIRA, M. S.; BORGES A. S. Histoplasmoses. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 2, p. 192-198, mar-abr 2009.

FIRACATIVE, C.; DUAN, S.; MEYER, W. *Galleria mellonella* model identifies highly virulent strains among all major molecular types of *Cryptococcus gattii*. **PLoS One**, v. 9, n. 8, p. e105076, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25133687> >.

FLAMBÓ, D. F. A. L. P. **Atividades biológicas dos flavonoides: atividade antimicrobiana**. 2013. 43 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Fernando Pessoa, Porto, Portugal, 2013.

FLYNN, G. L. Topical drug absorption and topical pharmaceutical systems. In: BANKER, G. S.; RHODES, C. T., eds. **Modern pharmaceuticals**. New York: Marcel Dekker, 1990. p. 263-325.

FREIESLEBEN, S. H.; JÄGER, A. K. Correlation between plant secondary metabolites and their antifungal mechanisms – a review. **Medicinal & Aromatic Plants**, v. 3, n. 2, p. 1-6, 2014.

FUCHS, B. B.; MYLONAKIS, E. Using non-mammalian hosts to study fungal virulence and host defense. **Current Opinion Microbiology**, v. 9, n. 4, p. 346-51, Aug 2006. ISSN 1369-5274. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16814595> >.

FUCHS, B. B. *et al.* Methods for using *Galleria mellonella* as a model host to study fungal pathogenesis. **Virulence**, v. 1, n. 6, p. 475-82, 2010 Nov-Dec 2010. ISSN 2150-5608. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21178491> >.

GAMBALE, W.; CORREA, B.; PAULA, C. R.; PURCHIO, A.; LARSSON, C. E. Ocorrência de fungos em lesões superficiais de caninos na cidade de São Paulo, Brasil. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v.24, p.187- 92, 1987.

GAMBALE, W. *et al.* Dermatophytes and other fungi of the hair coat of cats without dermatophytosis in the city of São Paulo, Brazil. **Feline Practice**, v.21, p.29-33, 1993.

GENG, F.; TANG, L.; LI, Y.; YANG, L.; CHOI, K. S.; KAZIM, A. L.; ZHANG, Y. Allyl isothiocyanate arrests cancer cells in mitosis, and mitotic arrest in turn leads to apoptosis via Bcl-2 protein phosphorylation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, p. 32259-32267, 2011.

GERHARDT, U. **Especies y Condimentos**. Zaragoza: Acribia. 1973.

GILES, S. S. *et al.* *Cryptococcus neoformans* mitochondrial superoxide dismutase: an essential link between antioxidant function and high-temperature growth. **Eukaryotic Cell**, v. 4, n. 1, p. 46-54, Jan 2005. ISSN 1535-9778. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15643059> >.

GILMORE, S.A.; VOORHIES, M.; GEBHART, D.; SIL, A. Genome-Wide Reprogramming of Transcript Architecture by Temperature Specifies the Developmental States of the Human Pathogen Histoplasma. **PLoS genetics** v. 11, n. 7, Article e1005395, 2015. [PMID:26177267](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26177267/) [GEO:GSE68707](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE68707)

GIONFRIDDO, J.R. Feline systemic fungal infections. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.30, p.1029–1050, 2000.

GIORDANI, C.; MATOS, C. B.; GUTERRES, K. A.; CIO, C. Potentially toxic and medicinal plants from community assisted in UFPel Veterinary Clinic. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 23, n. 3-4, p. 126-132, 2016.

GIUFFRIDA, R.; FARIAS, M. R.; RIBEIRO, E. A.; ERBELLA, J. R. C. Prevalência de gatos carreadores assintomáticos de fungos dermatófitos na região de Presidente Prudente: aspectos epidemiológicos e zoonóticos. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE MEDICINA

FELINA/CIMFEL, 2, 2001, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: Núcleo de Ciência Veterinária/NCV, 2001. p.26-27.

GONÇALVES, J.; PELETEIRO, M.C.; DURÃO, C. *et al.* Criptococose pulmonar em felino. *In:* Anais da Faculdade de Medicina Veterinária, 1990/1991. Lisboa, Portugal. **Anais...** Lisboa, Universidade Técnica de Lisboa, 1990/1991. v. XXVII/XXVIII. p. 213-222.

GHOSH, S.; BHATTACHARYYA, D. K. Mechanistic aspects of quantum dot based probing of Cu (II) inos: role of dendrimer in sensor efficiency. **Journal Fluorescence**, v. 19, n. 4, p. 723-731, 2009.

GOUGHENOUR, K.D.; BALADA-LLASAT, J.M.; RAPPLEYE, C.A. Quantitative Microplate-Based Growth Assay for Determination of Antifungal Susceptibility of *Histoplasma capsulatum* Yeasts. **Journal of Clinical Microbiology** v. 53, n. 10, p. 3286-3295, 2015. doi: 10.1128/JCM.00795-15. Epub 2015 Aug 5.

GOW, N. A. *et al.* *Candida albicans* morphogenesis and host defense: discriminating invasion from colonization. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 2, p. 112-22, Feb 2012. ISSN 1740-1534. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22158429> >.

GREENE, C. E. **Doenças Infecciosas em Cães e Gatos**. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015. p. 678-684.

GULLO, F. Cryptococcosis: epidemiology, fungal resistance, and new alternatives for treatment **European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases**, v. 32, n. 11, p. 1377-1391, 2013.

GUIMARÃES, A. J.; NOSANCHUK, J. D.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M. Diagnosis of histoplasmosis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 1-13, 2006.

HABASH M, REID G. Microbial biofilms: their development and significance for device-related infections. **Journal of Clinical Pharmacology**. v. 39, n. 9, p. 887-898, 1999.

HAGE, C.A.; WHEAT, L.J.; LOYD, J.; ALLEN, S.D.; BLUE, D.; KNOX, K.S. Pulmonary histoplasmosis. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine** v. 29, p. 151-165, 2008.

HAMDI, N. A rapid access to new coumarinyl chalcone and substituted chromeno[4,3-c]pyrazol-4(1H)-ones and their antibacterial and DPPH radical scavenging activities. *In:* FISCHMEISTER, C. **Medicinal Chemistry Research**. v. 20, p. 522-530, 2010.

HARRIS, J. R. *et al.* High prevalence of cryptococcal infection among HIV-infected patients hospitalized with pneumonia in Thailand. **Clinical Infectious Diseases**, v. 54, n. 5, p. e43-50, Mar 2012.

HERMSEN, S. A. *et al.* Relative embryotoxicity of two classes of chemicals in a modified zebrafish embryotoxicity test and comparison with their in vivo potencies. **Toxicology In Vitro**,

v. 25, n. 3, p. 745-53, Apr 2011. ISSN 1879-3177. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21238576> >.

HOHL, T. M.; RIVERA, A.; PAMER, E. G. Immunity to fungi. **Current Opinion Immunology**, v. 18, n. 4, p. 465-72, Aug 2006. ISSN 0952-7915. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16765580> >.

HOLBROOK, E. D.; RAPPEYE, C. A. *Histoplasma capsulatum* pathogenesis: making a lifestyle switch. **Current Opinion Microbiology**, v. 11, p. 318-324, 2008.

HOWE, K. *et al.* The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 498-503, Apr 2013. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23594743> >.

HOWLETT, C.R.; DUFF, B.C.; ALLAN, G.S. Systemic Cryptococcosis in a cat. **Australian Veterinary Journal**, v. 49, n. 11, p. 535-538, 1973.

HUBE, B. From commensal to pathogen: stage- and tissue-specific gene expression of *Candida albicans*. **Current Opinion Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 336-41, Aug 2004. ISSN 1369-5274. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15288621> >.

IÑIGO, M.; PEMÁN, J.; DEL POZO, J. L. Antifungal activity against *Candida* biofilms. **International Journal Artificial Organs**, v. 35, n. 10, p. 780-91, Oct 2012. ISSN 1724-6040. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23138707> >.

JABRA-RIZK, M. A.; FALKLER, W. A.; MEILLER, T. F. Fungal biofilms and drug resistance. **Emerging Infection Diseases**, v. 10, n. 1, p. 14-9, Jan 2004. ISSN 1080-6040. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15078591> >.

JAYAPRAKASHA, G. K.; RAOM, L. J.; SAKARIAH, K. K. Chemical composition of volatile oil from *Cinnamomum zeylanicum* buds. **Zeitschrift für Naturforschung. C, Journal of biosciences**. v. 57, n. 12, p. 990-993, 2002.

JENSEN PØ, GIVSKOV M, BJARNSHOLT T, MOSER C. The immune system vs. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **FEMS Immunology Medical Microbiology**. v. 59, n. 3, p. 292-305, 2010.

JHONSON, S. E; SHERDING, R.G.; BIRCHARD, S.J. **Manual saunders clínica de pequenos animais**. 3. ed. São Paulo: Roca, 2008. Cap.20, p. 209-222.

JONES, T. C; HUNT, R. D; KING, N. W. **Patologia veterinária**. 6. ed. São Paulo: Manole, 2000. 1415 p.

JOHNSTON, LA.; LAVERS, D.W. Cryptococcal meningite in a cat in north Queensland. **Australian Veterinary Journal**, v. 39, n. 8, p. 306-307, 1963.

KAMTHAN, M.; MUKHOPADHYAY, G.; CHAKRABORTY, N.; CHAKRABORTY, S.; DATTA, A. Quantitative proteomics and metabolomics approaches to demonstrate N-acetyl-D-glucosamine inducible amino acid deprivation response as morphological switch in *Candida albicans*. **Fungal Genetics Biology**, v. 49, n. 5, p. 369-378, 2012.

KANAFANI, Z. A.; PERFECT, J. R. Antimicrobial resistance: resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, n. 1, p. 120-8, Jan 2008. ISSN 1537-6591. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18171227> >.

KANT, R. *et al.* Synthesis of newer 1,2,3-triazole linked chalcone and flavone hybrid compounds and evaluation of their antimicrobial and cytotoxic activities. **European Journal Medicinal Chemistry**, v. 113, p. 34-49, May 2016. ISSN 1768-3254. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26922227> >.

KAPLAN, J. E.; BENSON, C.; HOLMES, K. K. *et al.* Guidelines for prevention and treatment of opportunistic infections in HIV-infected adults and adolescents: recommendations from CDC, the National Institutes of Health, and the HIV Medicine Association of the Infectious Diseases Society of America. **MMWR Recommendations and Reports**, v. 58, n. RR-4, p. 1-207; quiz CE1-4, 2009.

KELLY, J.; KAVANAGH, K. Caspofungin primes the immune response of the larvae of *Galleria mellonella* and induces a non-specific antimicrobial response. **Journal Medical Microbiology**, v. 60, n. Pt 2, p. 189-96, Feb 2011. ISSN 1473-5644. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20947665> >.

KESSLER, A. T.; AL KHARRAT, T.; KOURTIS, A. P. *Cryptococcus neoformans* as a cause of bronchiolitis obliterans organizing pneumonia. **Journal Infection and Chemotherapy**, v. 16, n. 3, p. 206-9, Jun 2010.

KESARWANI, K.; GUPTA, R. Bioavailability enhancers of herbal origin: An overview. **Asian Pacific Journal Tropical Biomedicine**, v. 3, n. 4, p. 253-266, 2013.

KHAN, N.; SHREAZ, S.; BHATIA, R.; AHMAD, S. I.; MURALIDHAR, S.; MANZOOR, N.; KHAN, L. A. Anticandidal activity of curcumin and methyl cinnamaldehyde. **Fitoterapia**, v. 83, p. 434-440, 2012.

KLANG, A.; LONCARIC, I.; SPERGSE, J.; EIGELSREITER, S.; WEISSENBOCK, H. Disseminated histoplasmosis in a domestic cat imported from the USA to Austria. **Medical Mycology Case Reports**, v. 2, p. 108-112, 2013.

KLEIN, B.S.; TEBBETS, B. Dimorphism and virulence in fungi. **Current Opinion Microbiology**, v. 10, n. 4, p. 314-319, 2007.

KNEALE, M. *et al.* Global access to antifungal therapy and its variable cost. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 12, p. 3599-3606, 2016. ISBN: 0305-7453, ISSN: 0305-7453, DOI: 10.1093/jac/dkw325.

KOBAYASHI, C. C. *et al.* Characterization of *Cryptococcus neoformans* isolated from urban environmental sources in Goiânia, Goiás State, Brazil. **Revista Instituto Medicina Tropical Sao Paulo**, v. 47, n. 4, p. 203-7, 2005 Jul-Aug 2005. ISSN 0036-4665. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16138201> >.

KOERDT, A.; ORELL, A.; PHAM, T.K.; MUKHERJEE, J.; WLODKOWSKI, A.; KARUNAKARAN, E.; BIGGS, C.A.; WRIGHT, P.C.; ALBERS, S.V. Macromolecular fingerprinting of *Sulfolobus* species in biofilm: a transcriptomic and proteomic approach combined with spectroscopic analysis. **Journal Proteome Research**. Sep 2; v. 10, n. 9, p. 4105-4119, 2011.

KRONSTAD, J. W. *et al.* Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. **Nature Review Microbiology**, v. 9, n. 3, p. 193-203, Mar 2011.

KUHN, D.M.; GEORGE, T.; CHANDRA, J.; MUKHERJEE, P.K.; GHANNOUM, M.A. Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms: unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. v. 46, n. 6, p. 1773-1780, 2002.

KWON-CHUNG, K.J.; BENNETT, J.E. Epidemiologic differences between the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. **American Journal of epidemiology**, v. 120, p. 123-130, 1984.

KWON-CHUNG, K. J.; EDMAN, J. C.; WICKES, B. L. Genetic association of mating types and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Infection Immunity**, v. 60, n. 2, p. 602-5, Feb 1992.

KWON-CHUNG, K. J.; POLACHECK, I.; BENNETT, J. E. Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotypes B and C). **Journal Clinical Microbiology**, v. 15, n. 3, p. 535-7, Mar 1982.

LANTZ-MCPEAK, S. *et al.* Developmental toxicity assay using high content screening of zebrafish embryos. **Journal Applied Toxicology**, v. 35, n. 3, p. 261-72, Mar 2015. ISSN 1099-1263. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24871937> >.

LARRU, B.; ZAOUTIS, T. E. Newer antifungal agents. **Current Opinion Pediatric**, v. 25, n. 1, p. 110-5, Feb 2013. ISSN 1531-698X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23263025> >.

LARSSON, C. E.; LUCAS, R.; GERMANO, P. M. L. Dermatofitoses de caninos e felinos em São Paulo: estudo da possível influência sazonal. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.72, p.139-42, 1997.

LEE, J.; FREEMAN, J. L. Zebrafish as a model for investigating developmental lead (Pb) neurotoxicity as a risk factor in adult neurodegenerative disease: a mini-review.

Neurotoxicology, v. 43, p. 57-64, Jul 2014. ISSN 1872-9711. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24698670> >.

LEVI, G.C. Criptococose. In: NETO, V.A.; BALDY, J.L.S. **Doenças transmissíveis**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1978. 689 p.

LI, M.; CHEN, M.; PAN, W. Approaches on genetic polymorphism of *Cryptococcus* Species Complex. **Frontiers in Bioscience**, v. 18, p. 1227-36, 2013.

LI, D. D. *et al.* Using *Galleria mellonella* - *Candida albicans* infection model to evaluate antifungal agents. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 36, n. 9, p. 1482-7, 2013. ISSN 1347-5215. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23995660> >.

LINDENBERG, A.S.C.; CHANG, M.R.; PANIAGO, A.M.M.; LAZÉRA, M.S.; MONCADA, P.M.F.; BONFIM, G.F.; NOGUEIRA, S.A.; WANKE, B. Clinical and epidemiological features of 123 cases of cryptococcosis in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 50, p. 75-78, 2008.

LIPP, H. P. Antifungal agents--clinical pharmacokinetics and drug interactions. **Mycoses**, v. 51 Suppl 1, p. 7-18, 2008. ISSN 1439-0507. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18471156> >.

LITVINTSEVA, A. P. *et al.* Prevalence of clinical isolates of *Cryptococcus gattii* serotype C among patients with AIDS in Sub-Saharan Africa. **Journal Infectious Diseases**, v. 192, n. 5, p. 888-92, Sep 2005. ISSN 0022-1899. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16088839> >.

LOFTSSON, T.; FRIDRIKSDÓTTIR, H.; INGVARSDÓTTIR, G.; JÓNSDÓTTIR, B.; SIGUROARDÓTTIR, A. M. The influence of 2- Hydroxypropyl- β -cyclodextrin on diffusion rates and transdermal delivery of hydrocortisone. **Drug Development Industrial Pharmacy**, New York, v.20, p. 1699-1708, 1994a.

LOFTSSON, T.; FRIDRIKSDÓTTIR, H.; SIGUROARDÓTTIR, A. M.; UEDA, H. The effect of water-soluble polymers on drug-cyclodextrin complexation. **International Journal Pharmaceutics**, Amsterdam, v.110, p. 169- 177, 1994b.

LOFTSSON, T.; FRIDRIKSDÓTTIR, H.; THÓRISDÓTTIR, S.; STEFÁNSSON, E. The effect of hydroxypropyl methylcellulose on the release of dexametasone from aqueous 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin formulations. **International Journal Pharmaceutics**, Amsterdam, v.104, p. 181-184, 1994c.

LOFTSSON, T.; MÁSSON, M.; SIGURDSSON, H. H.; MAGNÚSSON, P.; GOFFIC, F. Cyclodextrins as coenhancers in dermal and transdermal drug delivery. **Pharmazie**, Berlin, v.53, p. 137-139, 1998b.

LOFTSSON, T.; MÁSSON, M.; SIGURJÓNSDÓTTIR, J. F. Methods to enhance the complexation efficiency of cyclodextrins. **S.T.P.- Pharma Sciences**. Paris, v.9, n.3, p.237- 242, 1999.

LOFTSSON, T.; MÁSSON, M.; STEFÁNSSON, E. Cyclodextrins as permeation enhancers. In: PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY CONFERENCE, 17., Dublin, 1998. Proceedings. Liverpool: Solid Dosage Research Unit, 1998c. v.2, p. 313.

LOFTSSON, T.; ÓLAFSSON, J. H. Cyclodextrins: new drug delivery systems in dermatology. **International Journal Dermatology**, Philadelphia, v.37, p.241-246, 1998e.

LONNEMANN G. Chronic inflammation in hemodialysis: the role of contaminated dialysate. **Blood Purification**, v. 18, n. 3, p. 214-223, 2000.

LÓPEZ, S. N. *et al.* In vitro antifungal evaluation and structure-activity relationships of a new series of chalcone derivatives and synthetic analogues, with inhibitory properties against polymers of the fungal cell wall. **Bioorganic Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 8, p. 1999-2013, Aug 2001. ISSN 0968-0896. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11504637> >.

LUNA, B.; DREW, R. H.; PERFECT, J. R. Agents for treatment of invasive fungal infections. **Otolaryngology Clinics North America**, v. 33, n. 2, p. 277-99, Apr 2000. ISSN 0030-6665. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10736404> >.

LUNARDI, F. *et al.* Trypanocidal and leishmanicidal properties of substitution-containing chalcones. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 47, n. 4, p. 1449-51, Apr 2003. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12654691> >.

MACÊDO-SALES, P. A.; SOUTO, S. R. L. S.; DESTEFANI, A. A.; LUCENA, R. C.; MACHADO, R. L. D.; PINTO, M. R.; RODRIGUES, A. M. *et al.* Domestic Feline Contribution in The Transmission of *Sporothrix* in Rio de Janeiro State, Brazil: A Comparison Between Infected and Non-Infected Populations. **Bmc Veterinary Research**, v. 14p. 19, 2018.

MADRID, L.M.; FERNANDES, C.G.; NOBRE, M.O.; MEIRELES, M.C.A. Epidemiological findings and laboratory evaluation of sporotrichosis: a description of 103 cases in cats and dogs in southern Brazil. **Mycopathologia** v. 173, n. 4, p. 265-273. 2011.

MAES, J. *et al.* Evaluation of 14 organic solvents and carriers for screening applications in zebrafish embryos and larvae. **PLoS One**, v. 7, n. 10, p. e43850, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23082109> >.

MAK, S.; KLINKENBERG, B.; BARTLETT, K.; FYFE, M. Ecological niche modeling of *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada. **Environmental Health Perspective**, v. 118, n. 5, p. 653-8, 2010.

MAH, T.F.; O'TOOLE, G.A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 34-39, 2001.

MANOS, J.; ARTHUR, J.; ROSE, B.; TINGPEJ, P.; FUNG, C.; CURTIS, M.; WEBB, J.S.; HU, H. *et al.* Transcriptome analyses and biofilm-forming characteristics of a clonal *Pseudomonas aeruginosa* from the cystic fibrosis lung. **Journal Medical Microbiology**, v. 57, Pt 12, p. 1454-1465, 2008.

MARIMON, R.; CANO, J.; GENÉ, J.; SUTTON, D. A.; KAWASAKI, M.; GUARRO, J. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, Three New *Sporothrix* Species Of Clinical Interest. **Journal of Clinical Microbiology**. p. 3198-3206. 2007.

MARIONI, J.C.; MASON, C.E.; MANE, S.M.; STEPHENS, M.; GILAD, Y. RNA-seq: an assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays. **Genome Research**, v. 18, n. 9, p. 1509-1517, 2008.

MARTINEZ, L. R.; CASADEVALL. Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* biofilms to antifungal agents in vitro. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 50, n. 3, p. 1021-33, Mar 2006.

MATTEI, A.S. Presença de fungos com potencial patogênico em instrumentos de tosa. **Archives of Veterinary Science**, v.19, n.2, p.40-45, 2014.

MCCLELLAND, E. E.; BERNHARDT, P.; CASADEVALL, A. Coping with multiple virulence factors: which is most important? **PLoS Pathogens**, v. 1, n. 4, p. e40, Dec 2005.

MEDINA-ALARCÓN, K.P.; SINGULANI, J.L.; VOLTAN, A.R.; SARDI, J.C.O.; PETRONIO, M.S., SANTOS, M.B.; POLAQUINI, C.R.; REGASINI, L.O.; BOLZANI, V.S.; DA SILVA, D.H.S.; CHORILLI, M.; MENDES-GIANNINI, M.J.S.; FUSCO-ALMEIDA, A.M. Alkyl Protocatechuate- Loaded Nanostructured Lipid Systems as a Treatment Strategy for *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii* in vitro. **Frontiers Microbiology**, v. 12, n. 8, p. 1048. 2017. doi: 10.3389/fmicb.2017.01048. eCollection 2017.

MEDINA-ALARCÓN et al. Alkyl Protocatechuate-Loaded Nanostructured Lipid Systems as a Treatment Strategy for *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii* In Vitro. **Frontiers Microbiology**. v. 8, p. 1048, 2017.

MEDLEAU, L. Recently described feline dermatoses. **Veterinary Clinics North America Small Animal Practice**, v. 20, n. 6, p. 1615-1632.1990.

MEINERZ, A. R. M.; NOBRE, M. O.; NASCENTE, P. S.; ANTUNES, T. A.; CLEFF, M. B.; FARIA, R. O.; SOUZA, L. L. *et al.* Estudo do *Microsporium canis* e vírus da FeLV em felinos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CLÍNICOS VETERINÁRIOS E PEQUENOS ANIMAIS, 23, 2002, Brasília. **Anais...** Brasília: Associação Nacional de Clínicos de Pequenos Animais/ANCLIVEPA, 2002.

MESA-ARANGO, A. C. *et al.* The non-mammalian host *Galleria mellonella* can be used to study the virulence of the fungal pathogen *Candida tropicalis* and the efficacy of antifungal drugs during infection by this pathogenic yeast. **Medical Mycology**, v. 51, n. 5, p. 461-72, Jul 2013. ISSN 1460-2709. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23170962> >.

MEYER, W. *et al.* Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 2, p. 189-95, Feb 2003. ISSN 1080-6040. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12603989> >.

MIRCUS, G. *et al.* Identification and characterization of a novel family of selective antifungal compounds (CANBEFs) that interfere with fungal protein synthesis. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 59, n. 9, p. 5631-40, Sep 2015. ISSN 1098-6596. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26149982> >.

MITCHELL, T. G.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis in the era of AIDS--100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8, n. 4, p. 515-48, Oct 1995. ISSN 0893-8512. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8665468> >.

MIYATA, S. *et al.* Use of the *Galleria mellonella* caterpillar as a model host to study the role of the type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. **Infection Immunity**, v. 71, n. 5, p. 2404-13, May 2003. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12704110> >.

MORENS, D. M.; FOLKERS, G. K.; FAUCI, A. S. The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases. **Nature**, v. 430, n. 6996, p. 242-9, Jul 2004. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15241422> >.

MORGAN, J. *et al.* *Cryptococcus gattii* infection: characteristics and epidemiology of cases identified in a South African province with high HIV seroprevalence, 2002-2004. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, n. 8, p. 1077-80, Oct 2006. ISSN 1537-6591. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16983624> >.

MORIELLO, K.A.; DE BOER, D.J. Fungal flora of the haircoat of cats with and without dermatophytosis. **Journal Medical Veterinary Mycology**, v.29, n.5, p.285-292, 1991.

MORIELLO, K.A.; DE BOER, D.J. Feline dermatophytosis: Recent advances and recommendations for therapy. **Veterinary Clinics North America, Small Animal. Practice**. V. 25, n. 4, p. 901-921. 1995.

MORIELLO, K.A. Zoonotic skin diseases of dogs and cats. **Animal Health Research Review**, v. 4, n. 2, p. 157-168, 2003.

MORIELLO, K. A.; COYNER, K.; PATERSON, S.; MIGNON, B. Diagnosis and treatment of dermatophytosis in dogs and cats: Clinical Consensus Guidelines of the World Association for Veterinary Dermatology. **Veterinary Dermatology**, v. 28, p. 266-e68. 2017.

MORRIS, C.E.; MONIER, J.; JACQUES, M. Methods for observing microbial biofilms directly on leaf surfaces and recovering them for isolation of culturable microorganisms. **Applied Environmental Microbiology**, v. 63, n. 4, p. 1570-1576, 1997.

MORTAZAVI, A.; WILLIAMS, B.A.; MCCUE, K.; SCHAEFFER, L.; WOLD, B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. **Nature Methods**, v. 5, n. 7, p. 621-628, 2008.

MORTON, D. B.; BARNETT, R. I.; CHADWICK, J. S. Structural alterations to *Proteus mirabilis* as a result of exposure to haemolymph from the larvae of *Galleria mellonella*. **Microbios**, v. 39, n. 157-158, p. 177-85, 1984. ISSN 0026-2633. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6374385> >.

MOWAT, E. *et al.* Development of a simple model for studying the effects of antifungal agents on multicellular communities of *Aspergillus fumigatus*. **Journal Medical Microbiology**, v. 56, n. Pt 9, p. 1205-12, Sep 2007. ISSN 0022-2615. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17761484> >.

MYLONAKIS, E. *et al.* *Galleria mellonella* as a model system to study *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. **Infection Immunity**, v. 73, n. 7, p. 3842-50, Jul 2005. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15972469> >.

MUNDAY, R.; MHAWECH-FAUCEGLIA, P.; MUNDAY, C.M.; PAONESSA, J. D.; TANG, L.; MUNDAY, J. S.; LISTER, C. *et al.* Inhibition of urinary bladder carcinogenesis by broccoli sprouts. **Cancer Research**, v. 68, p. 1593–1600, 2008.

NARASIPURA, S. D. *et al.* Characterization of Cu,Zn superoxide dismutase (SOD1) gene knock-out mutant of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*: role in biology and virulence. **Molecular Microbiology**, v. 47, n. 6, p. 1681-94, Mar 2003. ISSN 0950-382X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12622821> >.

NARASIPURA, S. D.; CHATURVEDI, V.; CHATURVEDI, S. Characterization of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* SOD2 reveals distinct roles of the two superoxide dismutases in fungal biology and virulence. **Molecular Microbiology**, v. 55, n. 6, p. 1782-800, Mar 2005. ISSN 0950-382X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15752200> >.

NEGRONI, R. Cryptococcosis. **Clinical Dermatology**, v. 30, n. 6, p. 599-609, 2012 Nov-Dec 2012.

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

NOBRE, M.O.; MEIRELES, M.C.; CAETANO D.T.; FAÉ F.; CORDERO M.; MEIRELES, R.M. *et al.* Esporotricose zoonótica na região sul do Rio Grande do Sul: revisão da literatura brasileira. **Revista Brasileira Medicina Veterinária**, v. 9, n. 1, p. 36-44, 2002.

NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A. Budding of melanized *Cryptococcus neoformans* in the presence or absence of L-dopa. **Microbiology**, v. 149, n. Pt 7, p. 1945-51, Jul 2003.

NUNES, C. F.; ESCOSTEGUY, C. C. Esporotricose humana associada à transmissão por gato doméstico. Relato de caso e revisão de literatura. **Revista de Educação Continuada do Clínico Veterinário de Pequenos Animais**, v. 54, 66-68, 2005.

NURETTIN, Y. Synthesis and Biological Activities of N-Alkyl Derivatives of o-, m-, and p-Nitro (E)-4-Azachalcones and Stereoselective Photochemistry in Solution, with Theoretical Calculations. **Turkish Journal of Chemistry**, v. 30, p. 505, 2006.

OLAIMAT, A.N.; HOLLEY, R.A. Inhibition of *Listeria monocytogenes* on cooked cured chicken breasts by acidified coating containing allyl isothiocyanate or deodorized oriental mustard extract. **Food Microbiology**, v. 57, p. 90–95, 2016.

OLIVARES, R. A. C. Ringworm Infection in Dog and Cats: last updated in 24 jun. 2003. In: Carmichael L. **Recent Advances in Canine Infectious Diseases**. Ithaca, New York: International Veterinary Information Service, 2003. Disponível em: <http://www.ivis.org/advances/infect_dis_carmichael/cervantes/chapter_frm.asp?la=1>. Acesso em: 02 mar. 2004.

OROFINO-COSTA, R.; MACEDO, P.M.; RODRIGUES, A.M.; BERNARDES-ENGEMANN, A.R. Sporotrichosis: an update on epidemiology, etiopathogenesis, laboratory and clinical therapeutics. **Anais Brasileiros Dermatologia**. [online]. v. 92, n.5, p. 606-620. 2017. ISSN 0365-0596.

PAIXAO, G. C. Dermatófitos e fungos sapróbios isolados de cães e gatos na cidade de Fortaleza. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia**. [online]. v. 53, n.5, p. 568-573, 2001.

PASSOS, A.N.; KOHARA, V.S.; FREITAS, R.S.; VICENTINI, A.P. Immunological assays employed for the elucidation of an histoplasmosis outbreak in São Paulo, SP. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 45, p.1357- 1361, 2014.

PEREIRA, L. A. S.; OLIVEIRA, M. M. M.; MARTINS, H. H. A.; VALE, L. A.; ISIDORO, S. R.; BOTREL, D. A.; PICCOLI, R. H. Sanitizing cinnamaldehyde solutions against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms formed on stainless steel surfaces. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 22, Article e2018144, 2019. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.14418>

PEREIRA, S.A. *et al.* The epidemiological scenario of feline sporotrichosis in Rio de Janeiro, State of Rio de Janeiro, Brazil. **Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical** [online]. v. 47, n.3, p. 392-393, 2014. ISSN 0037-8682. <http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0092-2013>.

PETRAGLIA, F. **Relato de um caso de criptococose em gato**. Rio de Janeiro, 2008. 30p. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização “*Lato Sensu*” Clínica Médica e Cirurgia em Pequenos Animais) - Universidade Castelo Branco.

PHILIPPI, J.M.S.; MORETTO, E. Salmonella and Fecal Coliforms in Cinnamon (*Cinnamomum cassia* Blume and *Cinnamomum zeylanicum* Nees) Sold in the City of Florianópolis, Santa Catarina, Brazil. **Caderno Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 4, p. 624-628, Oct/Dec, 1995. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/csp/v11n4/v11n4a10>. Acesso em: 15/06/2014.

PIERCE, C.G.; UPPULURI, P.; TRISTAN, A.R.; WORMLEY, F.L. JR; MOWAT, E.; RAMAGE, G.; LOPEZ-RIBOT, J.L. A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. **Nature Protocols**, v. 3, n. 9, p. 1494-1500, 2008.

PUISIEUX, F.; ROBLOT-TREPEL, L. Vetorização e vetores de fármacos. **Caderno de Farmácia**, v. 4, p. 29-50, 1988.

RAMAGE, G.; VANDE WALLE, K.; WICKES, B.L.; LÓPEZ-RIBOT, J.L. Biofilm formation by *Candida dubliniensis*. **Journal Clinical Microbiology**, v. 39, n. 9, p. 3234-3240, 2001.

RASKIN, E. R.; MEYER, J. D. **Atlas de citologia de cães e gatos**. São Paulo: Roca, 2003, p. 41.

RASO, T. F. *et al.* Cryptococcosis outbreak in psittacine birds in Brazil. **Medical Mycology**, v. 42, n. 4, p. 355-62, Aug 2004. ISSN 1369-3786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15473361> >.

RAUL, J.S.; BANSODE, B.S.; JADHAV, A.K.; KARUPPAYIL, S.M. Activity of Allyl Isothiocyanate and Its Synergy with Fluconazole against *Candida albicans* Biofilms. **Journal Microbiology Biotechnology**. v. 27, n. 4, p. 685-693, 2017. doi: 10.4014/jmb.1607.07072.

REES, C. A. Dermatophytosis. In: NORSWORTHY, G. D.; GRACE, S. F.; CRYSTAL, M. A.; TILLEY, L. P. The feline patient. 4.ed. Iowa: Blackwell publishing ltd, 2010. cap. 48, p. 108-110. SCOTT, G. F. Formação de mofo em ambientes tropicais: discussão. In: MENDES, M. *et al.* (Org.). **Conservação: conceitos e práticas**. Rio de Janeiro: UFRJ, 2001. p.261-278.

REINHART, J.M.; KUKANICH K.S.; JACKSON, T.; HARKIN, K.R. Feline histoplasmosis: fluconazole therapy and identification of potential sources of *Histoplasma* species exposure. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.14, n.12, p.841–848, 2012.

REN-KAI LI, M. A.C. *et al.* In Vitro Activities of Voriconazole, Itraconazole, and Amphotericin B against *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, and *Histoplasma capsulatum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, p. 1734-1736, June 2000.

REOLON, A. Prevalência de *Cryptococcus neoformans* nos pombos urbanos da cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. PEREZ, L. R. R. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 40, p. 293-298, 2004.

RIZZO, L. Y. *et al.* In Vivo Nanotoxicity Testing using the Zebrafish Embryo Assay. **Journal Materials Chemistry B, Materials for Biology and Medicine**, v. 1, 13 p. Jun 2013. ISSN 2050-750X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24179674> >.

ROBERTSON, E. J.; CASADEVALL, A. Antibody-mediated immobilization of *Cryptococcus neoformans* promotes biofilm formation. **Applied Environmental Microbiology**, v. 75, n. 8, p. 2528-2533, Apr 2009.

RODRIGUES, G. B. *et al.* In vitro photodynamic inactivation of *Cryptococcus neoformans* melanized cells with chloroaluminum phthalocyanine nanoemulsion. **Photochemistry Photobiology**, v. 88, n. 2, p. 440-7, 2012 Mar-Apr 2012.

RODRIGUES, M. L.; NIMRICHTER, L. In good company: association between fungal glycans generates molecular complexes with unique functions. **Frontiers Microbiology**, v. 3, p. 249, 2012.

RODRIGUES, M. R.; TEIXEIRA, M. De M.; HOOG, G. S.; SCHUBACH, T. M. P.; PEREIRA, S. A.; FERNANDES, G. F.; BEZERA, L. M. L.; FELIPE, M. S.; CAMARGO, Z. P. Phylogenetic Analysis Reveals a High Prevalence of *Sporothrix brasiliensis* in Feline Sporothricosis Outbreaks. **Plos Neglected Tropical Diseases**. v. 7, 1-12, 2013.

ROESSNER, U.; WAGNER, C.; KOPKA, J.; TRETHEWEY, R.N.; WILLMITZER, L. Technical advance: simultaneous analysis of metabolites in potato tuber by gas chromatography-mass spectrometry. **Plant Journal**, v. 23, n. 1, p. 131-142, 2000.

ROSA, C. S.; MEINERZ, A. R. M.; OSÓRIO, L. G.; CLEFF, M. B.; MEIRELES, M. C. A. Terapêutica da esporotricose: Revisão. **Science and Animal Head**, v. 5, n. 3, p. 212-228, 2017.

ROSSER E.J.; DUNSTAN R.W. Sporotrichosis, p.608-612. In: GREENE C.E. (Ed.). **Infectious Diseases of the Dog and Cat**. 3rd ed. Philadelphia: Elsevier, 2006.

ROMANI, L. Immunity to fungal infections. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, n. 1, p. 1-23, Jan 2004. ISSN 1474-1733. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14661066> >.

ROMANI, L.; PUCCETTI, P. Protective tolerance to fungi: the role of IL-10 and tryptophan catabolism. **Trends Microbiology**, v. 14, n. 4, p. 183-9, Apr 2006. ISSN 0966-842X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16517165> >.

RUIZ, A.; FROMTLING, R. A.; BULMER, G. S. Distribution of *Cryptococcus neoformans* in a natural site. **Infection Immunity**, v. 31, n. 2, p. 560-3, Feb 1981. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7012011> >.

SAHAZA, J. H.; PEREZ-TORRES, A.; ZENTENO, E.; TAYLOR, M. L. Usefulness of the murine model to study the immune response against *Histoplasma capsulatum* infection. **Comparative Immunology, Microbiology Infectious Diseases**, v. 37, p. 143–152, 2014.

SANLA-EAD, N.; JANGCHUD, A.; CHONHENCHOB, P. S. V. Antimicrobial Activity of Cinnamaldehyde and Eugenol and Their Activity after Incorporation into Cellulose-based Packaging Films. **Packaging Technology and Science**, v. 25, n. 1, p. 7-17, 2012.

SANTOS, W. R. *et al.* Primary endemic *Cryptococcus gattii* by molecular type VGII in the state of Pará, Brazil. **Memorias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 8, p. 813-8, Dec 2008. ISSN 1678-8060. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19148422> >.

SCHAARS, C. F. *et al.* Outcome of AIDS-associated cryptococcal meningitis initially treated with 200 mg/day or 400 mg/day of fluconazole. **BMC Infectious Diseases**, v. 6, p. 118, 2006. ISSN 1471-2334. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16846523> >.

SCHUBACH, T.M.P.; MENEZES, R.C.; WANKE, B. Sporotrichosis, p.645- 650. In: GREENE C.E. (Ed.). **Infectious Diseases of the Dog and Cat**. 4th ed. St Louis: Elsevier, 2012.

SCORZONI, L. The use of standard methodology for determination of antifungal activity of natural products against medical yeasts *Candida* sp and *Cryptococcus* sp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 391-397, 2007.

SCORZONI, L. *et al.* Antifungal efficacy during *Candida krusei* infection in non-conventional models correlates with the yeast in vitro susceptibility profile. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. e60047, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23555877> >.

SCOTT, D.W. Feline dermatology. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 1, p. 349-365, 1980.

SCOTT, G. F. Formação de mofo em ambientes tropicais: discussão. In: MENDES, M. *et al.* (Org.). **Conservação: conceitos e práticas**. Rio de Janeiro: UFRJ, 2001. p. 261-278.

SCULLY, L. R.; BIDOCHKA, M. J. Serial passage of the opportunistic pathogen *Aspergillus flavus* through an insect host yields decreased saprobic capacity. **Canadian Journal Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 185-9, Feb 2005. ISSN 0008-4166. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16091778> >.

SEIDLER, M. J.; SALVENMOSER, S.; MÜLLER, F. M. *Aspergillus fumigatus* forms biofilms with reduced antifungal drug susceptibility on bronchial epithelial cells. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 52, n. 11, p. 4130-6, Nov 2008. ISSN 1098-6596. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18710910> >.

SEPÚLVEDA, V.E; MÁRQUEZ, R.; DAVID, A; TURISSINI, W. E.; GOLDMAN, D.; MATUTE, R. Genome Sequences Reveal Cryptic Speciation in the Human Pathogen *Histoplasma Capsulatum*. **MBio**, v. 8, n. 6, p.1-23, 2017.

SHREAZ, S.; SHEIKH, R. A.; BHATIA, R.; NEELOFAR, K.; IMRAN, S.; HASHMI, A. A.; MANZOOR, N.; BASIR, S. F.; KHAN, L. A. Antifungal activity of α -methyl trans cinnamaldehyde, its ligand and metal complexes: promising growth and ergosterol inhibitors. **Biomaterials**, v. 24, p. 923-933, 2011.

SILVA, A.V.; BOSCO, S.M G. Histoplasmose. In: MEGID, J.; RIBEIRO, M.G.; PAES, A.C. **Doenças Infecciosas em Animais de Produção e de Companhia**. Rio de Janeiro: Rocca, 2016. p.929-935.

SILVA, G. A. da *et al.* Tuberculose pseudotumoral, criptococose e silicose no mesmo lobo pulmonar. **Jornal Brasileiro Pneumologia**. [online]. v. 39, n.5 [cited 2014-06-05], pp. 620-626, 2013. Available from: <<http://www.scielo.br/scielo.php?>

SIPES, N. S.; PADILLA, S.; KNUDSEN, T. B. Zebrafish: as an integrative model for twenty-first century toxicity testing. **Birth Defects Research C Embryo Today**, v. 93, n. 3, p. 256-67, Sep 2011. ISSN 1542-9768. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21932434> >.

SOARES, L. A.; GULLO, F. P.; SARDI, J. C.; PITANGUI, N. S.; COSTA-ORLANDI, C. B.; SANGALLI-LEITE, F.; SCORZONI, L.; REGASINI, L. O.; PETRÔNIO, M. S.; SOUZA, P. F.; SILVA, D. H.; MENDES-GIANNINI, M. J.; FUSCO-ALMEIDA, A. M. Anti-Trichophyton Activity of Protocatechuates and Their Synergism with Fluconazole. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, 2014.

SORRELL, T. C.; ELLIS, D. H. Ecology of *Cryptococcus neoformans*. **Revista Iberoamericana Micologia**, v. 14, n. 2, p. 42-3, Jun 1997. ISSN 1130-1406. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16854168> >.

SOUZA, L.L.; NASCENTE, P.S.; NOBRE, M.O.; MEINERZ, A.R.M.; MEIRELESV M.C.A. Isolation of *Sporothrix schenckii* from the nails of healthy cats. *Brazilian Journal Microbiology*, v. 37, n. 3, p. 372-374, 2006.

SPRINGER, D. J. *et al.* *Cryptococcus gattii* VGIII isolates causing infections in HIV/AIDS patients in Southern California: identification of the local environmental source as arboreal. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 8, p. e1004285, Aug 2014. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25144534> >.

STEENBERGEN, J. N.; SHUMAN, H. A.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. **Proceedings National Academy of Science U S A**, v. 98, n. 26, p. 15245-50, Dec 2001. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11742090> >.

STEPHEN, C. *et al.* Multispecies outbreak of cryptococcosis on southern Vancouver Island, British Columbia. **Canadian Veterinary Journal**, v. 43, n. 10, p. 792-4, Oct 2002. ISSN 0008-5286. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12395765> >.

STIE, J.; FOX, D. Induction of brain microvascular endothelial cell urokinase expression by *Cryptococcus neoformans* facilitates blood-brain barrier invasion. **PLoS One**, v. 7, n. 11, p. e49402, 2012.

SYKES, J.E.; MALIK, R. Cryptococcosis. In. GREENE, C. E. **Infectious diseases of dog and cat**. 4th. ed. Saint Louis-Missouri: Elsevier Saunders, 2012. p. 621-34.

TAGLIARI, L.; TOLEDO, M. S.; LACERDA, T. G.; SUZUKI, E.; STRAUS A. H.; TAKAHASHI, H. K. Membrane microdomain components of *Histoplasma capsulatum* yeast forms, and their role in alveolar macrophage infectivity. **Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes**, v. 1818, p. 458–466, 2012. 10.1016/j.bbamem.2011.12.008.

TAGUSHI, Y.; HASUMI, Y.; ABE S.; NISHIYAMA, Y. The effect of cinnamaldehyde on the growth and the morphology of *Candida albicans*. **Medical Molecular Morphology**, v. 46, p. 8-13, 2013.

TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 33, n. 3, p. 281-301, mai-jun, 2000.

TAO, N.; JIA, L.; ZHOU, H. Anti-fungal activity of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum*. **Food chemistry**, v. 153, p. 265–71, 15 jun. 2014.

TENOR, J. L. *et al.* Live Imaging of Host-Parasite Interactions in a Zebrafish Infection Model Reveals Cryptococcal Determinants of Virulence and Central Nervous System Invasion. **MBio**, v. 6, n. 5, p. e01425-15, 2015. ISSN 2150-7511. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26419880> >.

THOMAS, R.; CHRISTOPHER, D.J.; BALAMUGESH, T.; JAMES, P.; THOMAS, M. Endobronchial pulmonary cryptococcosis and tuberculosis in an immunocompetent host. **Singapore Medical Journal**, v. 53, n. 2, Article ID e.32-e.34, 2012.

TRAPNELL, C.; PACHTER, L.; SALZBERG, S.L. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. **Bioinformatics**, v. 25, n. 9, p. 1105-1111, 2009.

TUNC, S.; CHOLLET, E.; CHALIER, P.; PREZIOSI-BELLO, L.; GONTARD, N. Combined effect of volatile antimicrobial agents on the growth of *Penicillium notatum*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 113, n. 3, p. 263–270. 2007. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.07.004.

VETTORATO, R.; HEIDRICH, D.; FRAGA, F.; RIBEIRO, A. C.; PAGANI, D. M.; TIMOTHEO, C.; AMARO, T. G.; VETTORATO, G.; SCROFERNEKER, M. L. Sporotrichosis by *Sporothrix schenckii* Senso Stricto with Itraconazole Resistance and Terbinafine Sensitivity Observed In Vitro and In Vivo: Case Report. **Medical Mycology Case Reports**. v.19, p.18-20, 2018.

WALLER, S. B. *et al.* Anti- *Sporothrix* spp. activity of medicinal plants. **Brazilian Journal Pharmaceutical Science** [online]. v. 52, n.2, p.221-237. 2016.

WANG, Y.E.; LI, B.; CARLSON, J.M.; STREECK, H.; GLADDEN, A.D.; GOODMAN, R.; SCHNEIDEWIND, A.; POWER, K.A.; TOTH, I.; FRAHM, N.; ALTER, G.; BRANDER, C. *et al.* Protective HLA class I alleles that restrict acute-phase CD8⁺ T-cell responses are associated with viral escape mutations located in highly conserved regions of human immunodeficiency virus type 1. **Journal of Virology**, v. 83, n. 4, p. 1845-1855, 2009.

WEIR, E.C.; SCHWARTZ, A.; BUERGELT, C.D. Short-term combination chemotherapy for treatment of feline cryptococcosis. **Journal American Veterinary Medical Association**, v. 174, n. 5, p. 507-510, 1979.

WHEAT, J.; HAFNER, R.; KORZUN, A.H.; LIMJOCO, M.T.; SPENCER, P; LARSEN, R.A.; HECHT, F.M.; POWDERLY, W. Itraconazole treatment of disseminated histoplasmosis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. AIDS Clinical Trial Group. **The American Journal of Medicine** v. 98, p. 336-342, 1995.

WHEAT, L. J. *et al.* Emergence of Resistance to Fluconazole as a Cause of Failure during Treatment of Histoplasmosis in Patients with Acquired Immunodeficiency Disease Syndrome. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, n. 1, December, 2001.

WHEAT, L.J.; FREIELD, A.G.; KLEIMAN, M.D.; BLADDLEY, J.N.; MC KINSEY, D.S.; LOYD, J.E.; KAUFFMAN, C.A. Clinical practice guidelines for the management of patients with histoplasmosis 2007. Update by the Infections Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases** v. 45, p. 807-825, 2007.

WHEAT, L.J. *et al.* Histoplasmosis. **Infectious Diseases of Clinics North America**. v. 30, n. 1, p. 207-227. 2016. doi: 10.1016/j.idc.2015.10.009.

WILSON, M. Bacterial biofilms and human disease. **Science Progress**, v. 84, Pt3, p. 235-254, 2001.

WRIGHT, L. *et al.* Metabolites released by *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* and var. *gattii* differentially affect human neutrophil function. **Microbes Infection**, v. 4, n. 14, p. 1427-38, Nov 2002. ISSN 1286-4579. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12475633>>.

XING, F.; HUA, H.; SELVARAJ, J. N.; ZHAO, Y.; ZHOU, L.; LIU, X.; LIU, Y. Growth inhibition and morphological alterations of *Fusarium verticillioides* by cinnamon oil and cinnamaldehyde. **Food Control**, v. 46, p. 343-350. 2014.

YADAV, H. L. Synthesis and biological evaluation of antiinflammatory activity of 1,3-diphenyl propenone derivatives. GUPTA, P. **Medicinal Chemistry Research**, v. 20, p. 461-465, 2009.

YANG, T.-S.; CHAO, L. K.-P.; LIU, T.-T. Antimicrobial activity of the essential oil of *Glossogyne tenuifolia* against selected pathogens. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 14, p. 2965–2971, nov. 2014.

YUE, C. et al. The STE12alpha homolog is required for haploid filamentation but largely dispensable for mating and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Genetics**, v. 153, n. 4, p. 1601-15, Dec 1999. ISSN 0016-6731. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10581270>>.

ZAROR, L.; FISCHMANN, O.; BORGES, M.; VILANOVA, A.; LEVITES, J. The role of cats and dogs in the epidemiological cycle of *Microsporium canis*. **Mykosen**, v.29, p.185-188, 1986.

ZHANG, Y.; HAGEN, F.; STIELOW, B.; RODRIGUES, A. M.; SAMERPITAK, K.; ZHOU, X.; FENG, P.; YANG, L; CHEN, M.; DENG, S; Li, S.; LIAO, W.; LI, R; LI, F.; MEIS, J. F.; GUARRO, J.; TEIXEIRA, M; Al- ZHRANI, H. S.; CAMARGO, Z. P. De; ZHANG, L.; HOOG, G. S. Phylogeography And Evolutionary Patterns In: *Sporothrix* spanning more than 14000 human and animal case reports. **Persoonia**, v. 35, p. 1-20, 2015.

ZHAI, B. et al. Congenic Strains of the Filamentous Form of *Cryptococcus neoformans* for Studies of Fungal Morphogenesis and Virulence. **Infection and Immunity**, v. 81, n. 7, p. 2626-37, Jul 2013. ISSN 1098-5522.

ZHU, F. et al. Drug discovery prospect from untapped species: indications from approved natural product drugs. **PLoS One**, v. 7, n. 7, p. e39782, 2012. ISSN 1932-6203.