

Universidade estadual paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP)
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (FCFAR)
Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia

CINTIA MARCELO DE OLIVEIRA

**Avaliação de isolados bacterianos a partir de hamsters sírios
(*Mesocricetus auratus*) antes e após a infecção por *Leishmania*
(*Leishmania*) *amazonensis***

Araraquara, SP
2022

**Avaliação de isolados bacterianos a partir de hamsters sírios
(*Mesocricetus auratus*) antes e após a infecção por *Leishmania*
(*Leishmania*) *amazonensis***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestra em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia, área de concentração: Parasitologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Mara Cristina Pinto

Coorientador: Prof. Dr. Jayme Augusto de
Souza Neto

Araraquara, SP

2022

0491a Oliveira, Cintia Marcelo de.
Avaliação de isolados bacterianos a partir de hamsters sírios
(*Mesocricetus auratus*) antes e após a infecção por *Leishmania*
(*Leishmania*) *amazonensis* / Cintia Marcelo de Oliveira. – Araraquara:
[S.n.], 2022.
83 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área Parasitologia.

Orientadora: Mara Cristina Pinto.
Coorientador: Jayme Augusto de Souza Neto.

1. Ecologia química. 2. Compostos orgânicos voláteis. 3. Leishmanioses.
4 Microbiota cutânea. 5. Bactérias cultiváveis. I. Pinto, Mara Cristina, orient.
II. Souza Neto, Jayme Augusto de, coorient. III. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Avaliação de isolados bacterianos a partir de hamsters sírios (*Mesocricetus auratus*) antes e após a infecção por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

AUTORA: CINTIA MARCELO DE OLIVEIRA

ORIENTADORA: MARA CRISTINA PINTO

COORIENTADOR: JAYME AUGUSTO DE SOUZA NETO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA APLICADAS À FARMÁCIA, área: Análises Clínicas pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. MARA CRISTINA PINTO (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP

Prof. Dr. CHRISTIANN DAVIS TOSTA (Participação Virtual)
Departamento de Alimentos / Instituto Federal de São Paulo Câmpus Matão

Dr. FREDY GALVIS OVALLOS (Participação Virtual)
Departamento de Epidemiologia / Faculdade de Saúde Pública da USP

Araraquara, 29 de julho de 2022

AGRADECIMENTOS

A minha família, Cleusa, José, Ricardo, meu maior alicerce agradeço e dedico este trabalho porque sem o apoio deles não conseguiria seguir adiante.

A David, meu grande amigo que sem o apoio eu também não teria ido longe nas empreitadas da vida, que me apoiou nos momentos mais delicados, dedico e agradeço profundamente por tudo.

A minha orientadora Mara, por me apoiar e me fornecer a estrutura necessária para o desenvolvimento desse trabalho.

A minhas amigas de longa data, Bruna, Joyce e Maristela. Agradeço por todos os momentos preciosos, todo o apoio e por estarem sempre comigo física ou virtualmente.

A Maria Raquel, uma amiga que entrou na minha vida muito recentemente e foi de um apoio fundamental, agradeço pelas conversas e conselhos fornecidos além de toda a ajuda.

A Mariana que desde o começo me auxiliou em todo o processo, sempre foi acessível além de uma pessoa maravilhosa.

A Thamiris, uma grande amiga que conheci no começo dessa empreitada e me proporcionou uma oportunidade que foi fundamental para que eu renovasse minha paixão pelo curso que escolhi, Biologia.

Aos amigos Fábio, Leilane, Lázaro, Débora, Andreza, Bruno, Carina, Marina e Ricieri, presenças recentes na minha vida que com tão pouco tempo já fizeram uma grande revolução na minha forma de ver a vida.

Aos meus tios falecidos acometidos pelo Covid Vital, João e meu falecido companheirinho animal Luke, que sempre esteve presente do meu lado e me apoiou silenciosamente pelos momentos mais críticos que passei.

Por último, mas não menos importante ao meu esposo Emerson, meu porto seguro que tem me apoiado e trazido muita leveza para a minha vida.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao programa de Biociências e Biotecnologia aplicados a farmácia (PPG BBAF) pelo incentivo financeiro para a realização deste trabalho.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para este trabalho.

RESUMO

Os flebotomíneos são insetos dípteros hematófagos, pertencentes à subfamília *Phlebotominae*, responsáveis por transmitirem o protozoário do gênero *Leishmania* (Trypanosomatidae), agente etiológico das leishmanioses. Estima-se que anualmente surjam entre 700.000 a 1 milhão de novos casos ao redor do mundo dessa parasitose. Durante o ano de 2020, a forma visceral da doença (LV) esteve presente em 10 países, totalizando 90% dos casos, dos quais 97% concentrados no Brasil. Em relação à leishmaniose tegumentar (LT), forma mais comum da doença, estima-se que 85% dos casos globais estejam concentrados em 10 países, dos quais, 15.484 são pertencentes ao Brasil. Uma das abordagens para o monitoramento e/ou controle dos insetos hematófagos é o estudo dos compostos orgânicos voláteis (COV) envolvidos na comunicação entre o hospedeiro e o inseto, denominados de cairomônios. Além disso, tem-se diferenças individuais na composição e concentração dos cairomônios o que, consequentemente, influencia na atratividade dos insetos. Estudos recentes têm apontado que hospedeiros infectados com parasitas, como *Plasmodium* spp e *Leishmania infantum*, podem ser mais atrativos para os insetos que os não infectados. Uma hipótese que explicaria tais alterações no padrão de voláteis emitidos é a microbiota da pele, que contém diversas espécies e cepas de bactérias capazes de produzir mais de 350 compostos voláteis diferentes. O presente projeto teve por objetivo avaliar as alterações causadas na microbiota das patas de hamsters sírios (*Mesocricetus auratus*) antes e após a infecção por *L. amazonensis*, assim como os voláteis produzidos por meio de isolamento e sequenciamento das bactérias cultiváveis, assim como os voláteis produzidos. Através da biblioteca Blastn (NCBI), foi possível identificar os gêneros das bactérias cultivadas (*Bacillus* e *Staphylococcus*), todas gram positivas. Além disso, foram realizados ensaios de microextração em fase sólida acoplado à cromatografia gasosa (CG-EM) para a identificação dos voláteis produzidos pelas bactérias cultivadas. Em relação aos compostos voláteis, foram identificados 46, com destaque para o ciclooctatetraeno, biomarcador para a bactéria *Staphylococcus aureus* e piridina-3-carboxilato de metila, volátil que indicou a presença de bactérias do gênero *Mycobacterium*, potencial agravadora das lesões leishmanióticas. Através do sequenciamento genético confirmou-se a presença dos gêneros *Staphylococcus* spp. e *Bacillus* spp. nos animais saudáveis e infectados, ambos pertencentes a classe Bacilli. O estudo demonstra, portanto, a associação existente entre a liberação de diferentes COV a partir de diferentes gêneros de bactérias. Além disso, destaca-se a presença frequente do gênero *Staphylococcus* na pele do hospedeiro, considerada uma bactéria oportunista, capaz de, ao adentrar o organismo do hospedeiro, criar biofilmes resistentes à ação de antibióticos. Deste modo, a identificação, o entendimento e a compreensão dos COV emitidos pela microbiota presente na pele de diferentes indivíduos se fazem necessárias, uma vez que podem servir como iscas atrativas passíveis de serem aplicadas no monitoramento ou controle destes insetos.

Palavras-chave: Ecologia química; compostos orgânicos voláteis; leishmanioses; microbiota cutânea; bactérias cultiváveis.

ABSTRACT

Sandflies are bloodsucking dipterous insects belonging to the subfamily Phlebotominae, responsible for transmitting the protozoan of the genus *Leishmania* (Trypanosomatidae), the etiological agent of leishmaniasis. It is estimated that annually between 700,000 and 1 million new cases arise around the world. During 2020, the visceral form of the disease (VL) was present in 10 countries, totaling 90% of cases, of which 97% are concentrated in Brazil. Regarding cutaneous leishmaniasis (TL), the most common form of the disease, it is estimated that 85% of global cases are concentrated in 10 countries, with 15,484 in Brazil. One of the approaches for monitoring and/or controlling blood-sucking insects is the study of volatile organic compounds (VOCs) involved in the communication between the host and the insect, called kairomones. In addition, there are individual differences in the composition and concentration of kairomones, which consequently influence the attractiveness of insects. Recent studies have shown that hosts infected with parasites, such as *Plasmodium* spp and *Leishmania infantum*, may be more attractive to insects than uninfected ones. One hypothesis that would explain such changes in the pattern of volatiles emitted is the skin microbiota, which contains several species and strains of bacteria capable of producing more than 350 different volatile compounds. The present project aimed to evaluate the changes caused in the species of bacteria in *Mesocricetus auratus* feet before and after infection by *Leishmania amazonensis* through the isolation and sequencing of cultivable bacteria. Using the Blastn library (NCBI), it was possible to identify the genera of the cultured bacteria (*Bacillus* and *Staphylococcus*), all gram-positive. Additionally, solid phase microextraction tests coupled with gas chromatography (GC-MS) were performed to identify the volatiles produced by the cultured bacteria. Regarding the compounds, 47 volatile compounds were identified, with emphasis on cyclooctatetraene, a biomarker for the bacterium *Staphylococcus aureus*, and methyl pyridine-3-carboxylate, a volatile that indicated the presence of bacteria of the *Mycobacterium* genus, a potential aggravator of leishmaniasis lesions. Through genetic sequencing, the presence of *Staphylococcus* spp. and *Bacillus* spp. was found in both healthy and infected animals, both belonging to the Bacilli class. The study therefore demonstrates the association between the release of different VOCs from different genera of bacteria. Additionally, the frequent presence of the genus *Staphylococcus* on the host's skin is highlighted, as it is considered an opportunistic bacterium capable of creating biofilms resistant to the action of antibiotics when entering the host's organism. Thus, the identification, understanding, and comprehension of VOCs emitted by the microbiota present in the skin of different individuals are necessary since they can serve as attractive baits that can be applied in the control of these insects.

Keywords: Chemical ecology; volatile organic compounds; leishmaniasis; skin microbiota; cultivable bacteria.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Dispositivo geral utilizado em spme	20
Figura 2: Fluxograma delineado para as etapas do estudo.	23
Figura 3: Fita colada na planta do pé da pata esquerda do hamster antes (a) e após a infecção por <i>L. amazonensis</i> (b).	24
Figura 4: Teste de adsorção de voláteis liberados pelo meio contendo bactérias ...	28
Figura 5: Fibras de SPME utilizadas para adsorção dos voláteis expostas ao meio de cultivo de hamsters infectados.	29
Figura 6: Crescimento de bactérias obtidas por fita (a) e por haste flexível (b).....	31
Figura 7: Imagem de representação das bactérias obtidas.....	31
Figura 8: Representação de amostra isolada por método de esgotamento proveniente do sítio de infecção da pata esquerda do hamster 1 (PI).	32
Figura 9: Cromatogramas obtidos a partir do controle de 1 hora em verde claro e controle de 3 horas em verde escuro.	37
Figura 10: Cromatogramas obtidos a partir da amostra de 1 hora em azul e amostra de 3 horas em roxo.	38
Figura 11: Total de picos em função do tempo de extração.....	39
Figura 12: Cromatograma gerado a partir da condição de controle negativo do caldo bhi estéril (CBHI). Imagem (a): cromatograma geral; (b): zoom tr=0-22; (c): zoom tr=23-45.....	44
Figura 13: Cromatogramas gerado a partir dos isolados extraídos a partir do hamster 1.	45
Figura 14: Cromatogramas gerado a partir dos isolados extraídos a partir do hamster 2.	45
Figura 15: Cromatogramas gerado a partir dos isolados extraídos a partir do hamster 3.	46
Figura 16: Cromatogramas gerado a partir dos isolados extraídos a partir do hamster 4..	46
Figura 17: Cromatogramas gerado a partir dos isolados extraídos a partir do hamster 5..	46
Figura 18: Cromatogramas gerado a partir dos isolados extraídos a partir do hamster 6..	47

Figura 19: Análise de Componentes Principais (PCA) dos voláteis identificados a partir das bactérias amostradas dos hamsters de 1 a 6.....	48
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Reação de PCR para identificação genômica de bactérias	26
Tabela 2: Iniciadores escolhidos para a amplificação das bactérias	26
Tabela 3: Condições para o PCR de sequenciamento do genoma bacteriano	27
Tabela 4: Resultados obtidos com os produtos de PCR dos isolados bacterianos através do espectrofotômetro UV-VIS Nanodrop.	33
Tabela 5: Identificação dos gêneros bacterianos encontrados e a confiança da amostragem com base nos dados obtidos a partir do banco de dados de nucleotídeos do NLM/NCBI (Genbank).	33
Tabela 6: Tamanho da lesão dos animais infectados.	36
Tabela 7: Identificação dos compostos com base nos índices de retenção (IR) calculados e obtidos em ordem crescente de tempo de retenção.	39

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 Flebotomíneos e caimomônios em hospedeiros infectados.....	13
1.2 Microbiota e caimomônios	15
1.3 Microbiota cutânea	16
1.4 Identificação de voláteis	19
2. JUSTIFICATIVA	21
3. OBJETIVOS.....	22
3.1 Objetivo geral.....	22
3.2 Objetivos específicos	22
4. MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1 Parasita.....	23
4.2 Modelo animal e infecção	23
4.3 Amostragem das bactérias da epiderme, isolamento e estocagem	24
4.4 Caracterização morfológica dos isolados bacterianos	25
4.5 Amplificação e sequenciamento do gene 16s rRNA para identificação das bactérias isoladas	26
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1 Padronização da obtenção das bactérias e isolamento.....	30
5.2 Sequenciamento sanger das bactérias cultiváveis	32
6.2 Acompanhamento do desenvolvimento de lesão.....	35
6.3 Extração de compostos orgânicos voláteis (COV'S)	36
6. CONCLUSÕES.....	50
7. PERSPECTIVAS	51
8. REFERÊNCIAS	52

1. Introdução

As leishmanioses são zoonoses causadas por mais de 20 espécies de protozoários do gênero *Leishmania* (Trypanosomatidae), sendo apenas três subgêneros *Mundinia*, *Vianna* e *Leishmania* responsáveis pelas leishmanioses em humanos (WHO, 2020; ESPINOSA et al., 2016). A infecção por esse parasita apresenta registros em 98 países e estima-se que, anualmente, cerca de um milhão de novos casos de leishmanioses sejam documentados, sendo que os casos de mortes provenientes da infecção sejam aproximadamente entre 26.000 a 65.000 ao ano (AKHOUNDI, 2016; WHO, 2020).

Esses protozoários são obrigatoriamente intracelulares, estando presentes nos vertebrados com duas formas finais: amastigota (dentro das células do sistema mononuclear fagocítico do hospedeiro vertebrado) e promastigota, no trato digestivo do vetor invertebrado (LESSA, 2007), sendo que entre elas outras formas intermediárias podem ser observadas.

As diferentes espécies de *Leishmania* são responsáveis por duas formas clínicas de doenças, sendo elas, a leishmaniose visceral (LV) e a leishmaniose tegumentar (LT). As espécies *Leishmania donovani* e *Leishmania infantum* são as responsáveis por causar a LV, doença que se não tratada, pode levar à óbito em 95% dos casos, com 98% dos casos mundiais concentrados em nove países, entre eles o Brasil (WHO, 2019).

Durante a infecção, as formas promastigotas do protozoário invadem as células do sistema mononuclear fagocítico e se espalham pelo sistema sanguíneo. No interior das células do sistema mononuclear fagocítico ocorre a modificação da forma promastigota para uma forma arredondada denominada amastigota, responsável por manter o ciclo de infecção. De maneira geral, a leishmaniose visceral caracteriza-se por causar, principalmente, hepatoesplenomegalia, perda considerável de peso e anemia (STEVERDING, 2017).

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) divide-se em três formas: cutânea localizada (CL), cutânea difusa (CD) e mucocutânea (MC). A forma CL caracteriza-se pela presença de lesões e úlceras na pele, deixando cicatrizes permanentes, enquanto que a CD se diferencia pelo desenvolvimento de múltiplos nódulos, sem a presença de úlceras, que progridem lentamente por toda a extensão do corpo. Na

forma MC ocorrem metástases para as mucosas, que podem causar a destruição total ou parcial da boca, nariz e garganta (STEVERDING, 2017).

A LT é a forma mais comum e a estimativa é de que 70 a 75% dos casos globais estejam concentrados em 10 países (AKHOUNDI, 2016), sendo 15.484 casos pertencentes apenas ao Brasil (WHO, 2020). Esses protozoários são divididos pela região a que pertencem, sendo *L. tropica*, *L. major*, *L. aethiopica*, pertencentes a regiões dos continentes da Europa e Ásia, portanto, originárias do Velho Mundo. Nas Américas se concentram aquelas denominadas *Leishmania* do Novo Mundo, e as espécies responsáveis pelo desenvolvimento das infecções no Brasil são: *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. amazonensis*, *L. lainsoni*, *L. naiffi*, *L. lindenberg* e *L. shawi* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

1.1 Flebotomíneos e cairomônios em hospedeiros infectados

A transmissão das leishmanioses ocorre, de maneira geral, por meio da picada do inseto hematófago flebotomíneo (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). O inseto, menor que 5 mm, possui o corpo coberto por cerdas e enquanto descansa suas asas se mantêm erguidas. Por se tratar de um holometábolo, o inseto passa pelas fases de ovo, quatro estádios larvais, pupa e adulto. Durante o desenvolvimento larval, a alimentação do vetor ocorre por meio de matéria orgânica em decomposição e se desenvolvem em ambientes úmidos de difícil localização, podendo ser cavernas, dentro de troncos e raízes (KILLICK-KENDRICK et al, 1999). Tanto os machos quanto as fêmeas utilizam como fonte alimentar açúcares vegetais, contudo, as fêmeas necessitam de sangue tanto para sua alimentação quanto para realizar a maturação de seus ovos (BRAZIL et al., 2015).

Uma das abordagens de pesquisa no entendimento das relações parasita-hospedeiro em insetos hematófagos baseia-se no estudo da comunicação química existente entre os mesmos. Os sinais químicos voláteis são detectados por insetos hematófagos através de um sistema olfativo altamente desenvolvido. Esses voláteis são divididos em duas classes: intraespecífica, chamados de feromônios, e interespecíficas, chamados de aleloquímicos (LAW, 1971; MCCALL; CAMERON, 1995). Dentro da classe dos aleloquímicos destacam-se os cairomônios, que são voláteis liberados por uma espécie emissora e que favorecem uma outra espécie receptora do sinal (BROWN, 1970). Nesse caso, o hospedeiro produzirá os compostos

e, a partir desses sinais, o inseto hematófago os utilizarão para se localizarem, realizando assim a alimentação sanguínea (ZARBIN, 2009; TAVARES, 2016).

A identificação desses compostos orgânicos voláteis (COVs) é importante para o desenvolvimento de iscas atrativas com a finalidade de monitoramento e/ou controle desses insetos, especialmente em áreas endêmicas da doença onde os vetores encontram-se presentes em maior densidade (LOGAN; BIRKETT, 2007).

Estudos envolvendo cairomônios também têm sido desenvolvidos tendo em vista uma abordagem epidemiológica da transmissão de patógenos. Para alguns parasitas, já foi demonstrado que os compostos voláteis liberados por hospedeiros infectados são diferentes daqueles não infectados, levando a uma maior atração dos insetos hematófagos por tais hospedeiros. Diferentes espécies de culicídeos transmissores da malária apresentaram maior atratividade por hospedeiros infectados com *Plasmodium* spp. (BATISTA; COSTA; SILVA, 2014; CORNET et al., 2013; DE MORAES et al., 2014; LACROIX et al., 2005). Além da diferença dos voláteis presentes em camundongos infectados e não infectados, constatou-se que a presença do *Plasmodium* na fase de gametócito, no hospedeiro infectado, aumenta ainda mais a atratividade dos insetos por esses hospedeiros (BATISTA; COSTA; SILVA, 2014; DE MORAES et al., 2014; LACROIX et al., 2005).

Em estudos com seres humanos infectados com *Plasmodium*, também foi observada maior atratividade para os insetos e foram observadas diferenças tanto na natureza, quanto nas concentrações de compostos emitidos entre o grupo infectado e não infectado, sendo que os aldeídos: heptanal, octanal e nonanal foram encontrados em maior quantidade nos indivíduos infectados (ROBINSON et al 2018). Dentro dessa área de estudos para *Plasmodium* e atratividade em humanos, destaca-se a alteração de voláteis produzidos pela microbiota da pele, tais como 2-metilbutanal e 3-metilbutanal, cujas quantidades foram aumentadas após a infecção dos indivíduos (BOER et al., 2017).

Para flebotomíneos, há evidências de que espécies de *Leishmania* sejam capazes de influenciar na quantidade de sangue a ser ingerida e a frequência de alimentação sanguínea dos insetos gerando, portanto, um aumento na taxa de transmissão (ROGERS, 2012; ROGERS; BATES, 2007). Entretanto, os relatos da

literatura apontam diferenças nas respostas atrativas dos insetos com relação às *Leishmania* spp. envolvidas na leishmaniose visceral e tegumentar.

Entre esses relatos, destacam-se dois estudos que avaliaram a resposta atrativa de hamsters infectados ou não com *L. infantum*, agente etiológico da leishmaniose visceral, apontando que os flebotomíneos da espécie *Lutzomyia longipalpis* apresentaram preferência pelos animais infectados (NEVATTE et al., 2017; O'SHEA et al., 2002). Em ambos os estudos citados, os compostos voláteis emanados não foram identificados. Ao se avaliar as amostras de pelos de cães infectados (assintomáticos e sintomáticos) ou não por *L. infantum*, seis compostos voláteis foram identificados e considerados potenciais biomarcadores de infecção pelo parasita (MAGALHÃES-JUNIOR et al., 2014). Cães infectados com *L. infantum* também foram mais atrativos para a espécie de flebotomíneo *Phlebotomus perniciosus* presente em áreas do Mediterrâneo (CHELBI et al., 2021).

Com relação à *L. braziliensis*, agente etiológico da leishmaniose tegumentar, o mesmo padrão não foi encontrado quando se avaliou a infecção de camundongos e a atração de flebotomíneos da espécie *Nyssomyia neivai*. No referido estudo, os flebotomíneos não foram mais atraídos pelos camundongos infectados e não foram encontradas diferenças na produção de voláteis por tais animais (DA ROCHA SILVA et al., 2019).

A espécie *L. amazonensis* é um importante alvo de estudo por ser capaz de manifestar mais de uma forma clínica da LT no organismo hospedeiro, desde a cutânea localizada até a difusa (ABADIAS-GRANADO, 2021; ANVERSA, 2018). Em um experimento piloto, realizado com três hamsters infectados com *L. amazonensis*, houve maior taxa de alimentação de flebotomíneos da espécie *L. longipalpis* (população com feromônio 9-metilgermacreno) nestes animais após a infecção (Comunicação pessoal Dra. Mara Cristina Pinto). Entretanto, quando esse teste foi repetido com outros dez hamsters, mas com a população de *L. longipalpis*, que apresenta o feromônio cembreno 1, esse fenômeno não foi observado (DA ROCHA SILVA et al, 2022).

1.2 Microbiota e cairomônios

O padrão de contato entre insetos hematófagos e hospedeiros demonstra-se não homogêneo dentro da população de hospedeiros; sendo alguns indivíduos mais atrativos para os insetos que outros (KELLY, 2001).

Em estudos comportamentais com *An. gambiae* e seres humanos, demonstrou-se que embora as pistas visuais e físicas desempenhem um papel importante de busca do inseto por hospedeiros, as pistas químicas, ou COVs emanados são essenciais no encontro da fonte sanguínea (VERHULST, 2009). Uma comparação dos perfis de odores de humanos com diferentes níveis de atratividade para os mosquitos foi realizada, o que contribuiu para elucidar o comportamento de busca dos insetos, identificando os cairomônios como a principal fonte de procura para o hospedeiro (QIU, 2006).

A microbiota da pele desempenha papel importante na produção de odores corporais humanos e, sem bactérias o suor humano é inodoro. Algumas linhagens de bactérias presentes na microbiota são capazes de produzir até 60 compostos voláteis diferentes, sendo o perfil de odor humano constituído por mais de 350 compostos. Deste modo, as diferenças na produção de odores dos pés dos humanos, podem ser fortemente explicadas pelos diversos voláteis produzidos pela microbiota dessa região. Assim, se o hospedeiro é selecionado a partir da composição das espécies, metabolismo e densidade da microbiota de sua pele, então a mesma terá um impacto indireto na quantidade de picadas por indivíduo e no risco de infecção (VERHULST, 2009).

1.3 Microbiota cutânea

A pele humana é o maior órgão do corpo humano e é responsável principalmente por atuar como barreira física contra agentes infecciosos e substâncias tóxicas, além de exercer proteção contra os raios solares ultravioleta, dentre outras funções (FIROOZ, 2011) como regulação térmica e síntese de vitamina D quando exposta ao sol. Deste modo, a microbiota cutânea humana possui como função clínica a ocupação de vários habitats; o que dificulta a colonização por microrganismos oportunistas ou patogênicos.

Grande variedade de microrganismos como vírus, fungos e bactérias habitam tanto a parte interna quanto externa do corpo humano. Tais organismos se organizam em complexas comunidades e utilizam secreções e nutrientes do corpo humano. O

microbioma é definido pelo conjunto desses microrganismos e sua composição do metabolismo depende de organismo para organismo. Compondo o microambiente estão glândulas sebáceas, sudoríparas, folículos capilares e as camadas dermais, o que contribui para a diferenciação de população bacteriana em cada parte do corpo (CUNDELL, 2018).

Em sua totalidade, a superfície epitelial, incluindo folículos pilosos e glândulas sudoríparas, apresenta uma extensão de até 30m². Sabe-se que o tamanho de tal população é dez vezes maior que as células presentes no corpo humano, aproximadamente 10¹⁴ bactérias (VIEIRA, L. Q, 1988; PARLET, 2019), pertencentes a 19 filos diferentes, dentre os quais destacam-se: Firmicutes, Proteobactérias e Bacteroidetes. Tais bactérias encontram-se distribuídas em diferentes proporções de acordo com as áreas e camadas do corpo, sendo as mais comuns as bactérias pertencentes aos gêneros *Propionibacterium*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus* e *Streptococcus* (DOMENICO *et al*, 2019).

A colonização da pele acaba por ser impactada pela quantidade de glândulas sudoríparas presentes, visto que as mesmas secretam vários peptídeos antimicrobianos (AMPs) para o controle da microbiota. As glândulas sebáceas se conectam aos folículos capilares para formar os folículos pilosos e quando ocorre a quebra do sebo há a liberação de ácidos graxos que atuam no controle da colonização microbiana juntamente com derivados de sebócitos chamadas catelicidina, b-defensinas e histonas antimicrobianas. Contudo, alguns anaeróbios facultativos como a espécie *Propionibacteria acnes* é capaz de se desenvolver na glândula sebácea devido à capacidade de liberação de proteases e lipases que favorecem a aderência na pele. As bactérias do gênero *Corynebacterium*, por exemplo, adaptaram-se para habitar locais úmidos, utilizando o estrato córneo e lipídios sebáceos para a geração de produtos que revestem sua superfície celular (LUNJANI, 2019). Maior abundância de β-proteobactérias, Flavobactérias e outras bactérias gram-negativas podem ser encontradas em lugares mais secos do corpo humano, como por exemplo, palma, antebraço e nádega (JOHNSON, *et al*. 2018).

As bactérias do gênero *Staphylococcus* são gram positivas e colonizam a membrana mucosa e, assim como propionibactérias, as glândulas de mamíferos, entre eles o humano. Dentro desse gênero, as estafilococos de coagulase negativa (CONS) representam a maioria dos colonizadores, conhecidas por competirem com

Staphylococcus aureus, que pertencem ao grupo coagulase positiva pelo mesmo nicho. Esta bactéria encontra-se presente em 30% da população humana sem apresentar manifestações clínicas e é responsável por 76% das infecções de pele consideradas leves (PARLET; BROWN; HORSWILL, 2019).

Quando determinada região da pele é lesionada, a invasão e a colonização desta e de regiões próximas à lesão por microrganismos externos é facilitada, dada a exposição das camadas mais internas da pele, proporcionada pela lesão. Tal fato possui direta ligação com o processo de cicatrização e em casos como os da leishmaniose cutânea, possibilita o retardamento dos processos de cicatrização. Além disso, existem fatores responsáveis pela variação de número geral e composição da microbiota da pele de cada organismo, o que acarreta diferentes respostas dos níveis de desenvolvimento da doença, tais como: região da pele, pH, composição de ácidos graxos, nível de umidade, gênero, localização geográfica, tratamento com antibióticos, idade do indivíduo e estado de saúde (VIEIRA, et al. 1988).

Em estudo realizado com camundongos livres de micro-organismos (VIEIRA, 1988), apenas um em cada doze animais injetados com *L. amazonensis* desenvolveu uma pequena lesão em comparação com os controles convencionais que desenvolveram úlceras agressivas. Contudo, quando analisado o tecido em busca de parasitas, foi observada grande quantidade de macrófagos infectados em animais livres de micro-organismos e convencionais; mas os tecidos dos animais convencionais geraram uma resposta inflamatória muito maior e necrose. Quando estudado a fundo o motivo, observou-se que os padrões de resposta inflamatória eram diferentes entre os animais livres de micro-organismos e animais convencionais (VIEIRA, et al. 1998).

O conceito de pan-microbioma sugere que membros da microbiota cutânea humana variam entre países. Essa diferenciação de padrões de microbiota, incluindo nos comensais, podem afetar o progresso na cicatrização de feridas e tratamentos subsequentes (LEUNG; WILKINS; LEE, 2015).

A infecção bacteriana pode ser identificada com base na análise da presença de sinais clássicos tais como cicatrização lenta da úlcera (haja vista que existem bactérias que produzem biofilmes ocasionando essa situação), odor fétido, surgimento de secreção purulenta seguida de dor, elevação de temperatura, tecido facilmente sangrante e aumento no tamanho da lesão (LANDIS, 2008) através da liberação de

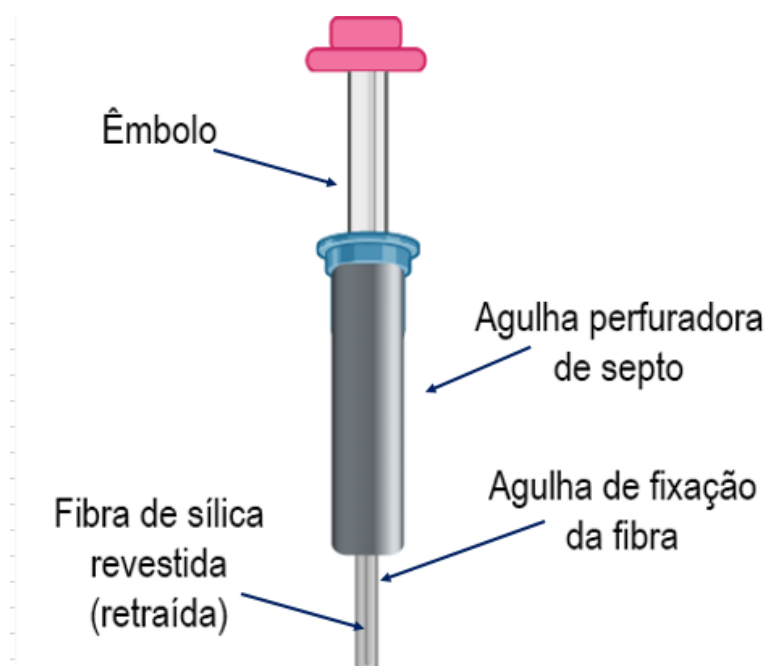
superantígenos que causam uma ativação mais robusta do sistema imune (JOHNSON et al, 2018).

Ainda com relação às infecções bacterianas associadas aos casos de leishmaniose cutânea, estudos apontam que a associação de métodos de cultura aos métodos moleculares fornece melhores resultados quando se deseja realizar a caracterização da diversidade microbiana presente nas infecções (FRANK et al, 2009).

Sabe-se também que a utilização de fitas estéreis para realizar a amostragem das bactérias presentes na epiderme é uma técnica simples que possibilita a obtenção de maior número de bactérias, quando comparada ao método swab, fatores estes que justificam a preferência por tal metodologia (KAZUHIRO et al, 2018). Entretanto, não há estudos que tenham identificado os voláteis emitidos em lesões causadas por *Leishmania* e infecções bacterianas associadas, utilizando fitas estéreis para a obtenção das amostras.

1.4 Identificação de voláteis

Uma das formas de identificação de voláteis é através da utilização da microextração em fase sólida (Solid Phase Microextraction – SPME), técnica utilizada para amostragem, associada a detectores de Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrômetro de Massas (CG-EM), onde o CG será responsável pela separação dos analitos enquanto a detecção e identificação ocorre pelo EM. Devido à praticidade de não envolver o uso de solventes para a extração das amostras voláteis, o SPME diminui o tempo de preparo das amostras, além de aumentar a sensibilidade das análises (VALENTE, 2000). A técnica, que foi inicialmente utilizada para a análise de poluentes atmosféricos (ARTHUR; PAWLISZYN, 1990), é efetuada através de uma fibra de sílica protegida por um tubo hipodérmico e presa a um êmbolo, sendo recoberta na extremidade por um polímero. Tal polímero é responsável por adsorver os compostos voláteis presentes na amostra, sendo exposto somente no momento da extração da amostra e da injeção no cromatógrafo para análise (Figura 1) (VALENTE, 2000). As fibras de SPME encontram-se disponíveis comercialmente, podendo apresentar diferentes polímeros como revestimento, cada um com características distintas (SHIREY, 2012; SUPELCO, 2018a).

Figura 1: Dispositivo geral utilizado em SPME

Fonte: SHIREY RE, 2012 (Adaptado).

Pode-se obter os compostos da amostra através de extração direta ou *headspace*. Por extração direta, coloca-se a fibra em contato direto com a amostra, ao passo que na extração por *headspace*, os voláteis são extraídos do espaço que existe entre o local onde a fibra é inserida e a amostra (PAWLISZYN, 2012). A técnica tem sido aplicada em diferentes estudos tais como: produtos naturais (STASHENKO; MARTÍNEZ, 2007), pelos de cães (DE OLIVEIRA et al., 2008; MAGALHÃES-JUNIOR et al., 2014), urina de camundongos (KWAK et al., 2009) e inclusive de seres humanos (DORMONT et al., 2013; DORMONT; BESSIÈRE; COHUET, 2013; GALLAGHER et al., 2008).

Em estudo utilizando a técnica de CG-EM foi possível identificar compostos voláteis extraídos de placas com meio ágar sangue cultivados com bactérias da espécie *S. epidermidis*, além de espécies aeróbicas de *Corynebactéria* e *Propionibactéria* (VERHULST, 2009).

2 JUSTIFICATIVA

Um dos aspectos da relação parasita-hospedeiro, que vem sendo mais recentemente abordados, investiga os compostos orgânicos voláteis (COVs) produzidos diferencialmente pelos hospedeiros infectados e o quanto esse fenômeno altera a atratividade para os vetores. Os estudos dessa área existentes para flebotomíneos são ainda incipientes e parecem indicar que diferentes espécies de *Leishmania* podem também afetar diferentemente a atratividade dos hospedeiros para os flebotomíneos.

Para *L. braziliensis*, espécie responsável pela leishmaniose tegumentar, um trabalho recém-publicado não mostrou aumento na atratividade dos camundongos infectados para os flebotomíneos da espécie *Ny. neivai* (DA ROCHA SILVA et al., 2019).

No modelo animal escolhido (*Mesocricetus auratus*) e em camundongos BALB/C, o aspecto clínico da lesão causada pela *L. amazonensis* difere fortemente da lesão causada pela *L. braziliensis*. Em ambos modelos animais ocorre o processo de formação de uma lesão ulcerada, sendo que para a primeira é mais agressiva, o que propicia o aparecimento de infecções bacterianas secundárias.

Devido a essas características da forma clínica da infecção por *L. amazonensis*, levantou-se a hipótese de uma possível alteração na microbiota presente na região ulcerada, que alteraria a produção de voláteis e, conseqüentemente, a atratividade para os flebotomíneos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar as alterações causadas na microbiota das patas de hamsters sírios (*Mesocricetus auratus*) antes e após a infecção por *L. amazonensis*, assim como os voláteis produzidos.

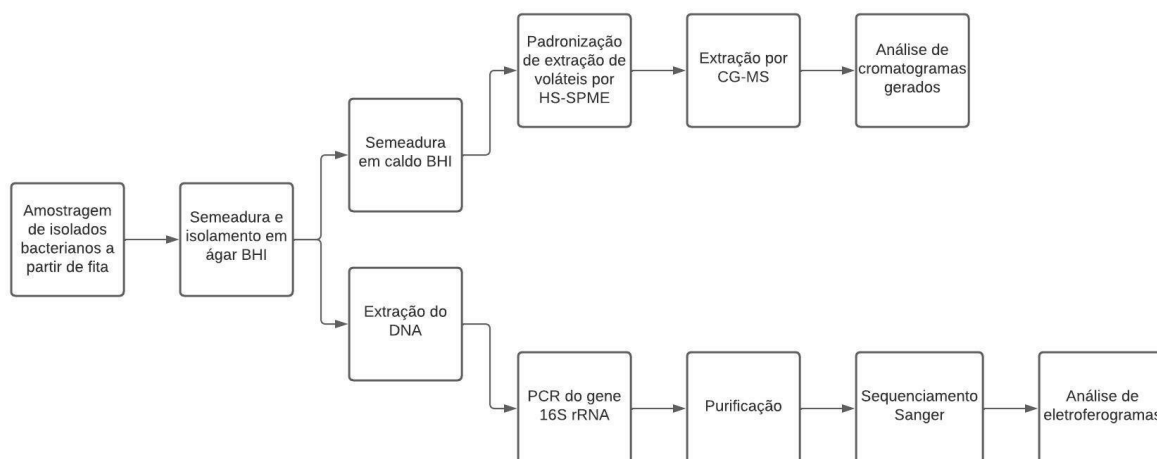
3.2 Objetivos específicos

- Isolar em meio de cultura as bactérias cutâneas presentes nas patas de hamsters sírios antes e após a infecção com *L. amazonensis*.
- Identificar as bactérias cultiváveis de hamsters antes e após a infecção com *L. amazonensis*.
- Extrair e identificar os compostos voláteis de bactérias cultiváveis em patas de hamsters antes e após a infecção com *L. amazonensis*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização do presente estudo, algumas etapas foram idealizadas para a obtenção das fitas contendo material necessário para sequenciamento de bactérias cultiváveis (Figura 2).

Figura 2: Fluxograma delineado para as etapas do estudo.



Fonte: Elaborado pela autora

4.1 Parasita

A cepa de *L. amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8) utilizada no presente estudo para a infecção dos hamsters foi inicialmente isolada de flebotomíneos da espécie *Lutzomyia flaviscutellata*, e é mantida no Laboratório de Estudos de Biologia da Infecção por Leishmania (LEBIL) do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) pelo Prof. Dr. Danilo Ciccone Miguel.

4.2 Modelo animal e infecção

Como modelo animal foram utilizados 6 hamsters sírios machos (*Mesocricetus auratus*), antes e após a infecção com *L. amazonensis*, obtidos da empresa ANILAB (ANIMAIS DE LABORATÓRIOS CRIAÇÃO E COMÉRCIO LTDA EPP – Paulínia/SP).

Os testes foram realizados com hamsters infectados por *L. amazonensis*, inoculados com 50 µL de uma solução de PBS contendo 2×10^6 promastigotas em fase estacionária, na região plantar da pata posterior esquerda com o auxílio de uma agulha de insulina de 50 µL. Uma vez infetados, os hamsters foram transferidos para o Biotério do Departamento de Ciências Biológicas da FCFAr/UNESP.

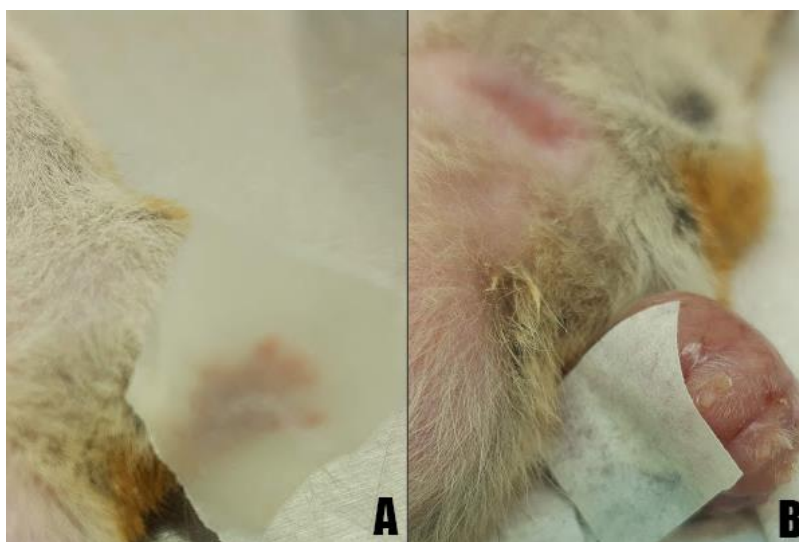
Para a realização dos testes, os animais foram anestesiados por via intraperitoneal, de acordo com a massa corporal de cada animal, com uma dose composta por ketamina 10% (120mg kg⁻¹) + xilazina 2% (5mg kg⁻¹) (ERHARDT et al., 1984).

O estudo realizado apresenta a aprovação realizada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FCFAr/UNESP através do Protocolo CEUA/FCF/CAr nº 16/2018.

4.3 Amostragem das bactérias da epiderme, isolamento e estocagem

Para se obter o material para sequenciamento e avaliação de voláteis liberados, utilizou-se a amostragem das bactérias pelo método da fita adesiva, descrito por Updegraff (1967) e Langen Asschenfeldt (2011), que se deu através da aplicação e remoção de uma fita estéril de 2 centímetros de largura por 2 centímetros de comprimento na planta da pata do hamster, durante um minuto. A fita foi retirada da pele com uma pinça estéril e aplicada sobre placas de Petri individuais contendo meio de cultura não seletivo Brain Heart Infusion (BHI) (Figura 3).

Figura 3: Fita colada na planta do pé da pata esquerda do hamster antes (A) e após a infecção por *L. amazonensis* (B).



Fonte: Elaborado pela autora

Assim, as patas posteriores direitas não foram infectadas pois foram utilizadas como controles individuais de cada camundongo de uma pata sem a presença do parasita, além disso, a pata direita do animal, precedendo a infecção, foi amostrada

como controle negativo. Pata esquerda foi a variável de infecção. As amostras obtidas das patas dos animais foram utilizadas para a realização do cultivo das bactérias coletadas e para os testes moleculares subsequentes. A seguir estão apresentadas as três situações nas quais o material foi coletado:

- 1) Amostra da pata direita antes da infecção (PC);
- 2) Amostra da pata esquerda infectada (PI) com a presença de úlcera (cerca de 40 dias após infecção);
- 3) Amostra da pata direita do animal já infectado, porém, sem a presença de edema ou úlcera (PNI).

Nos animais 4, 5 e 6, sob as condições PI e PNI, foi possível isolar e manter duas diferentes colônias de bactérias, levando, ao sequenciamento e a análise dos voláteis de PIa-PIb e PNIa-PNIb. As siglas minúsculas – a, b – se referem a duas colônias diferentes isoladas da mesma condição.

Frascos contendo o meio ágar BHI foram inoculados com as fitas utilizadas para amostragem das patas dos animais através do contato destas com o meio durante um minuto, e incubados a 37 °C por 48 horas. Após este período as colônias bacterianas foram separadas de acordo com suas morfologias e coloração, prosseguindo para a etapa de isolamento em novas placas de Petri com meio de cultura BHI. As colônias isoladas foram cultivadas em frascos de vidro contendo 10mL de caldo BHI, a fim de se proporcionar um maior crescimento destas. Parte deste material foi transferido para tubos de centrifugação estéreis contendo 5 mL de glicerol e armazenados em – 80 °C.

Após a infecção dos hamsters com *L. amazonensis*, realizou-se semanalmente o acompanhamento do peso dos animais, assim como a avaliação do sítio de infecção da pata inoculada, observando-se o aparecimento de edema advindo da fase assintomática e o surgimento de úlcera que surge durante a fase sintomática.

4.4 Caracterização morfológica dos isolados bacterianos

A fim de se garantir o isolamento das bactérias obtidas através da extração com fita adesiva, foram realizados 3 repiques. Assim, seguindo as recomendações oferecidas pelo Manual® of Systematic Bacteriology (GARRITY et al. 2004) a caracterização morfológica ocorreu por coloração, elevação da borda, brilho e formato.

4.5 Amplificação e sequenciamento do gene 16S rRNA para identificação das bactérias isoladas

Antecedendo-se à etapa de extração do DNA genômico, as bactérias foram cultivadas, por 24 horas, em placas de Petri contendo ágar BHI e, ao final, uma colônia foi transferida, com auxílio de uma alça bacteriana, para tubo eppendorf contendo 200 μL de água ultrapura autoclavada. A mistura foi homogeneizada e passou por um choque térmico por meio da elevação de sua temperatura incubando-as a 96°C, por 10 minutos, seguido de banho de gelo por mais 10 minutos. As soluções contendo o material extraído foram armazenadas a - 20°C. O volume final de reação para a realização da PCR foi de 25 μL , cujos componentes estão descritos (Tabela1).

Tabela 1: Reação de PCR para identificação genômica de bactérias

MIX	1X
Gotaq colorless	12,5 μL
Primer F 16S08	1,0 μL
Primer R 16S08	1,0 μL
Água ultrapura	8,5 μL
DNA	2 μL
Total	25 μL

Fonte: Arruda, 2017.

Os iniciadores apresentados na tabela 2 descrevem regiões conservadas do gene ribossomal 16S de bactérias. Os produtos gerados para a amplificação dos *loci* foram de aproximadamente 700 pares de bases.

Tabela 2: Iniciadores escolhidos para a amplificação das bactérias

Primer	Sequência 5' n 3'
16S08 F	GYCCADACWCCTACGG
16S08 R	CACGAGCTGACGAC

Fonte: Arruda, 2017.

O material foi amplificado utilizando-se termociclador. A etapa de extensão inicial ocorreu a 94°C, por 7 minutos, seguida de 30 ciclos a 94°C por 45 segundos. A etapa de anelamento ocorreu sob 50°C (30 segundos) e 72°C (60 segundos), seguida da etapa de extensão final (72°C, 10 minutos). Os fragmentos amplificados foram purificados com o kit de Purificação de DNA (Cellco) seguindo as etapas descritas pelo fabricante. As análises quantitativas das amostras foram realizadas por densidade óptica e espectrofotometria (NanoDrop MDn1000 UVnVis) a fim de realizar a padronização do cálculo das diluições das concentrações de DNA para sequenciamento do amplicon em sequenciador automático Sanger (Modelo: ABI 3500 – Applied Biosystems).

Para as etapas de sequenciamento foram utilizados os kits Terminator e X-Terminator da Thermofisher e as etapas seguiram a recomendação da fabricante (Tabela 3).

Tabela 3: Condições para o PCR de sequenciamento do genoma bacteriano

Nº de Ciclos	Temperatura (°C)	Tempo (minutos)
1x	96	1
	96	10
25x	Tm do primer (55)	5
	60	4
1x	60	5
1x	4	1

4.6 Identificação dos voláteis produzidos em placas e nos meios de cultura bacteriana por microextração em fase sólida e cromatografia gasosa

O sistema de microextração em fase sólida acoplado à cromatografia gasosa (CG-EM) foi utilizado para a extração e identificação dos voláteis liberados pelas bactérias presentes nas placas e no meio de cultura durante testes iniciais.

As placas cultivadas antes e após a infecção com *L. amazonensis* foram colocadas isoladamente em um recipiente de vidro fechado, com uma entrada onde a fibra de SPME composta por polidimetilsiloxano/divinilbenzeno de 65µm (PDMS/DVB – 24 Ga Pink) foi inserida (Figura 4).

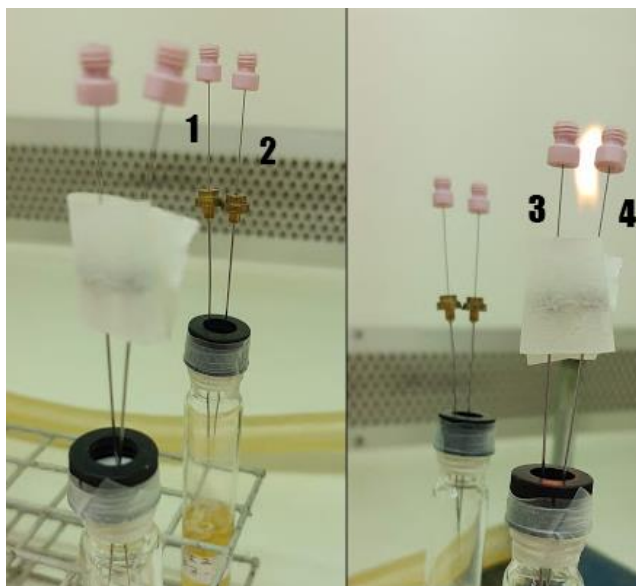
Figura 4: Teste de adsorção de voláteis liberados pelo meio contendo bactérias. (A) placas utilizadas para a condução dos ensaios (B) fibras de SPME expostas para adsorção os voláteis em recipientes que continham as placas controle e tratamento.



Fonte: Elaborado pela autora.

Os COV's foram extraídos dos tubos contendo meio de cultura BHI e as bactérias obtidas a partir das úlceras dos animais infectados. Foram utilizadas quatro fibras, sendo duas delas fibras controle e as demais, fibras testes. Foram testados diferentes tempos de exposição das fitas (1 hora e 3 horas), a fim de se descobrir qual o melhor tempo para adsorção dos voláteis liberados pelas bactérias cultivadas (Figura 5).

Figura 5: Fibras de SPME utilizadas para adsorção dos voláteis expostas ao meio de cultivo de hamsters infectados.



Fonte: Elaborado pela autora.

Para a identificação dos compostos a partir dos isolados bacterianos cultivados em caldo BHI, as fibras foram retraídas e inseridas no injetor do cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massas (Shimadzu CG-EM QP2010 Plus).

Apesar de os compostos voláteis serem dessorvidos após segundos, optou-se por manter a fibra por 5 minutos a 240 °C sob fluxo de gás de arraste em modo splitless (He 0,7 mL min⁻¹) e separados na coluna cromatográfica RTx5MS (30m x 0,25mm; 0,25µm - 0,25µm – fase de baixa polaridade; sílica fundida 5% difenil/95% dimetilpolissiloxano) (VALENTE, 2000). Ajustou-se em 250°C a temperatura da fonte de íons e da interface, com varredura de espectros de 40 a 400 m/z, 70 eV foi referente ao impacto de ionização.

As análises realizadas através do CG-EM ocorreram no Laboratório de Ensino e Pesquisa Analítica do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo, Câmpus Matão (IFSP Matão), sendo possível através da parceria o Prof. Dr. Christian Davis Tosta.

Para analisar os cromatogramas obtidos, identificando-se, portanto, os picos de COV, as bibliotecas NIST 08, NIST 98v101, Wiley MS 229 e FFNSC 1.3 foram consultadas e a porcentagem de similaridade considerada foi acima de 75%. Além disso, considerou-se os cálculos realizados com os índices de retenção (IR) de cada composto, gerado através dos tempos de retenção de uma mistura comercial de n-

alcanos (C8-C20) submetida a análise sob as mesmas condições cromatográficas das amostras.

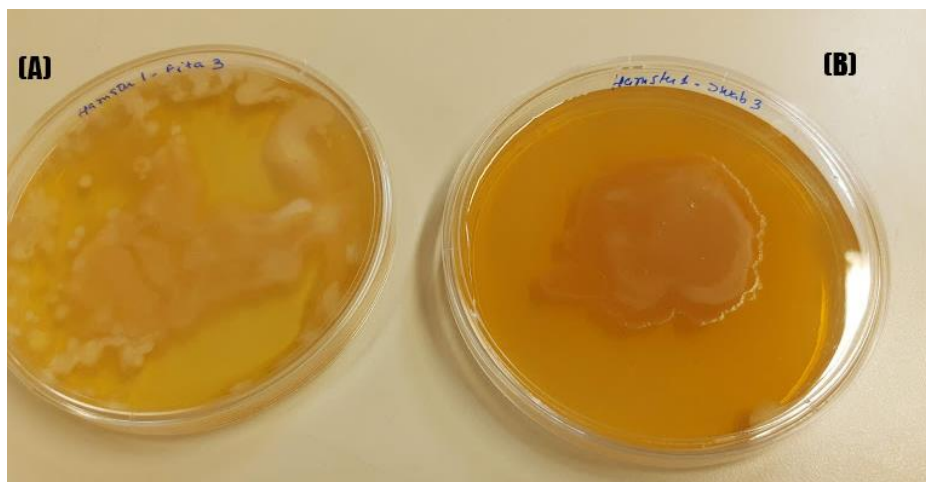
Deste modo, a comparação entre os IRs calculados com os dados presentes em bases de dados da literatura: <<https://webbook.nist.gov/chemistry/name-ser/>> e <http://www.odour.org.uk/Iriindex.html>> levaram a identificação dos índices de retenção de cada pico gerado nos cromatogramas das amostras. Através das áreas relativas dos picos dos voláteis identificados, foi realizada análise dos componentes principais (Principal Components Analysis - PCA) (Past 4.10 ®).

5. Resultados e Discussão

5.1 Padronização da obtenção das bactérias e isolamento

A fim de se estabelecer a melhor maneira de obtenção das bactérias cultiváveis a partir da microbiota cutânea dos hamsters, foram realizados testes para a padronização da amostragem. A amostragem das bactérias, quando realizada por fita adesiva comum (figura 6A) possibilita que as bactérias cresçam ocupando maior área da placa de Petri, enquanto a amostragem por haste flexível (figura 6B) resulta em cultivo mais aglomerado das células bacterianas, dificultando assim seu isolamento, uma vez que a separação por coloração e morfologia se torna prejudicada. Em razão disso, optou-se pela amostragem utilizando-se fita adesiva comum. Além disso, o estudo descrito por UPDEGRAFF (1967) relata que o uso da fita adesiva como método de obtenção de colônias de bactérias epidérmicas é mais efetivo, uma vez que permite a obtenção de colônias bacterianas presentes no estrato córneo, resultando em um maior número de colônias por área. Mais recentemente, Ogai (2018) relata em seu estudo que o número de colônias cultivadas coletadas pelo método de remoção de fita foi significativamente maior do que as coletadas pelo método em condições aeróbicas.

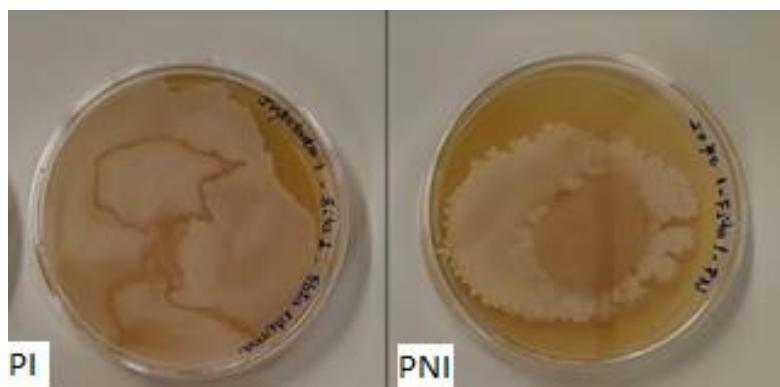
Figura 6: Crescimento de bactérias obtidas por fita (A) e por haste flexível (B).



Fonte: Elaborado pela autora.

Uma vez padronizada a técnica de amostragem das patas dos hamsters, partiu-se para o cultivo e isolamento propriamente dito das bactérias cultiváveis. A figura 7 representa as bactérias cultiváveis provenientes das patas esquerda e direita do hamster 1.

Figura 7: Imagem de representação das bactérias obtidas. Isolados bacterianos obtidos a partir do hamster 1 infectado com *L. amazonensis*. (PI) Placa com bactérias obtidas da pata posterior esquerda do animal com úlcera; (PNI) da pata posterior direita sem a presença de sítio de infecção.

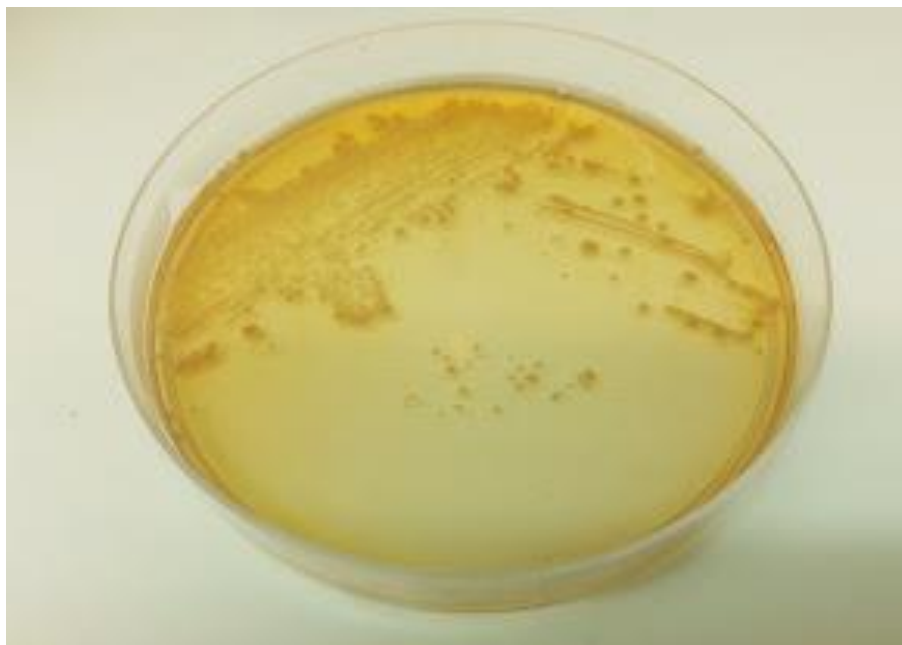


Fonte: Elaborado pela autora.

Uma vez obtidas as bactérias cultiváveis provenientes das patas dos 6 hamsters, passou-se então para a etapa de isolamento de cada uma destas, em meio Brain Heart Infusion (BHI). Para a realização dessa etapa, optou-se pela técnica de semeadura de esgotamento em estrias (Figura 8) para um maior espaçamento das unidades formadoras de colônia, a fim de se tornar possível a análise e comparação

das características morfológicas. O repique foi realizado por três vezes para obter sucesso no isolamento.

Figura 8: Representação de amostra isolada por método de esgotamento proveniente do sítio de infecção da pata esquerda do hamster 1 (PI).



Fonte: Elaborado pela autora.

Após o isolamento das bactérias, essas foram cultivadas em caldo de enriquecimento não seletivo Brain Heart Infusion (BHI) a fim de se aumentar a concentração das bactérias isoladas. No total foram isoladas 24 colônias bacterianas dos 6 animais nas três condições trabalhadas (item 4.3). Em seguida, os isolados bacterianos foram armazenados em -80°C com glicerol a 50% para as análises que ocorreram posteriormente de extração de voláteis e Sequenciamento Sanger.

As imagens presentes no item 10 (Apêndice B) ilustram o isolamento das amostras obtidas separadamente.

5.2 Sequenciamento Sanger das bactérias cultiváveis

Das 24 colônias bacterianas obtidas, foi possível realizar o sequenciamento de 20 delas (Tabela 4) e através do resultado bruto do sequenciamento, chegou-se a nível de gênero (Tabela 5). Os gêneros alcançados foram *Bacillus* sp. e *Staphylococcus* sp.

Tabela 4: Resultados obtidos com os produtos de PCR dos isolados bacterianos através do espectrofotômetro UV-Vis NanoDrop. As siglas H1, H2, H3, H4, H5 e H6 são referentes aos hamsters que deram origem aos isolados bacterianos nos quais as bactérias foram sequenciadas. Condição: Situação em que a pata do animal se encontrava quando foi realizada a amostragem da pele. PC: referente ao isolado bacteriano obtido através da pata direita do animal saudável; PNI: amostra obtida através da pata direita do animal infectado; PI: amostra obtida através do sítio de infecção localizado na pata esquerda.

N	Condição da pata	Concentração (ng/uL)	Relação A260nm/A280nm	Relação A260nm/A230nm
H1	PC	135	1,84	2,01
	PI	146,6	1,84	2,00
	PNI	124	1,83	1,87
H2	PC	109,7	1,82	1,95
	PI	105,5	1,83	1,97
	PNI	148	1,83	2,11
H3	PC	119,7	1,84	2,20
	PI	96,6	1,85	2,12
	PNI	48,2	1,80	1,98
H4	PC	163,1	1,84	2,13
	PIA	167	1,85	2,09
	PIB	146,4	1,85	2,13
	PNIA	161,7	1,84	2,21
	PNIB	97,3	1,84	2,09
H5	PC	131,8	1,83	1,92
	PIA	103,1	1,81	1,81
	PIB	91,8	1,83	2,06
	PNIA	129,4	1,84	1,92
	PNIB	94,2	1,83	1,88
H6	PIA	64,3	1,79	2,03

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 5: Identificação dos gêneros bacterianos encontrados e a confiança da amostragem com base nos dados obtidos a partir do banco de dados de nucleotídeos do NLM/NCBI (GenBank).

As siglas H1, H2, H3, H4, H5 e H6 são referentes aos hamsters que deram origem aos isolados bacterianos nos quais as bactérias foram sequenciadas. Condição: Situação em que a pata do animal se encontrava quando foi realizada a amostragem da pele. PC: referente ao isolado bacteriano obtido através da pata direita do animal saudável; PNI: amostra obtida através da pata direita do animal infectado; PI: amostra obtida através do sítio de infecção localizado na pata esquerda. Gênero: Gênero da bactéria isolada do animal a condição citada na segunda coluna. E.value: Valor esperado. Query cover: Cobertura, porcentagem de alinhamento da sequência com o banco de dados. Percentual de

identidade: O quanto da sequência foi idêntica ao que foi encontrado no banco de dados. Total score: High scoring segment pairs (HSP).

Condição da pata	N	Gênero	Spp aproximada	E.value	Query cover (cobertura)	% de Identidade	Total Score
PC	H1	Staphylococcus sp.	<i>Staphylococcus rostri</i>	0.0	99%	99.53%	1.166
	H2	Staphylococcus	<i>Staphylococcus capitis</i>	0.0	100%	99.67%	1098
	H3	Staphylococcus sp.	<i>Staphylococcus sciuri</i>	0.0	100%	100%	1182
	H4	Staphylococcus sp.	<i>Staphylococcus rostri</i>	0.0	100%	99.18%	1098
	H5	Staphylococcus sp.	<i>Staphylococcus rostri</i>	0.0	100%	99.53%	1168
PNI	H1	Bacillus sp.	<i>Bacillus cereus</i>	0.0	100%	99.50%	1086
	H2	Staphylococcus sp.	<i>Staphylococcus sciuri</i>	0.0	100%	99.86%	1284
	H3	Bacillus sp.	<i>Bacillus safensis</i>	0.0	100%	99.82%	1026
	H4-a	Bacillus sp.	<i>Bacillus pumilus</i>	0.0	100%	100%	1122
	H4-b	Bacillus sp.	<i>Bacillus safensis</i>	0.0	100%	100%	1199
	H5-a	Staphylococcus sp.	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0.0	100%	99.83%	1053
	H5-b	Staphylococcus sp.	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0.0	100%	100%	929
PI	H1	Staphylococcus sp.	<i>Staphylococcus sciuri</i>	0.0	100%	100%	1.186
	H2	Staphylococcus	<i>Staphylococcus capitis</i>	0.0	100%	99.81%	1410
	H3	Bacillus sp.	<i>Bacillus pumilus</i>	0.0	100%	100%	1134
	H4-a	Bacillus sp.	<i>Bacillus altitudinis</i>	0.0	100%	99.40%	1214
	H4-b	Staphylococcus sp.	<i>Staphylococcus rostri</i>	0.0	100%	99.55%	1201
	H5-a	Staphylococcus sp.	<i>Staphylococcus sciuri</i>	0.0	100%	99.84%	1160
	H5-b	Staphylococcus sp.	<i>Staphylococcus sciuri</i>	0.0	100%	100%	1024
	H6-a	Bacillus sp.	<i>Bacillus pumilus</i>	0.0	100%	99.82%	1048

Fonte: Elaborado pela autora.

Estudos avaliando a coinfeção de *Leishmania* spp e diferentes espécies de bactérias têm apontado um agravamento na lesão leishmaniótica em virtude do desequilíbrio do sistema imunológico (BORBÓN, 2019). No sentido contrário, o

desequilíbrio da homeostase da microbiota cutânea, causada pela úlcera leishmaniótica, pode favorecer a presença de bactérias comensais e que agravem a doença, conforme os estudos citados abaixo.

Uma coinfeção comumente encontrada é a associação estabelecida entre *Mycobacterium leprae*, uma Actinobacteria em forma de bacilo causadora da tuberculose leprosa, e a *Leishmania major*, causadora da leishmaniose cutânea. Nesses casos observa-se o agravamento da ferida leishmaniótica e uma resposta imunológica mais exacerbada (MARTÍNEZ, 2018).

As espécies do gênero *Staphylococcus* vêm sendo descritas na literatura como bactérias frequentemente presentes em úlceras leishmanióticas. A coinfeção por *Staphylococcus aureus* e *L. major* leva a um aumento da resposta imune contra ambos os patógenos. A presença dos dois patógenos é capaz de aumentar em duas vezes o tamanho da lesão por cerca de um mês, além de promover uma maior inflamação, por meio do recrutamento de mais neutrófilos para a região danificada. Além disso, tem-se um aumento da apoptose de neutrófilos, o que retarda a resolução da resposta imune (BORBÓN, 2019).

Em cachorros, observou-se que a presença de *Ehrlichia canis* pode tornar o animal 12 vezes mais susceptível a desenvolver leishmaniose canina do que animais saudáveis (ATTIPA, 2018).

Desta forma, estudos que visam a identificação das bactérias presentes em úlceras leishmanióticas se fazem cada vez mais necessários, haja vista que o desenvolvimento de bactérias oportunistas no local da lesão tende a contribuir com o aumento da gravidade da doença. Além de ser igualmente necessária a investigação da presença e da influência de bactérias oriundas a partir dos próprios vetores, no tamanho da lesão e gravidade da doença.

Logo, em casos de coinfeção bacteriana, uma vez realizada a identificação destas bactérias, tem-se a possibilidade de um tratamento mais direcionado através do uso de antibióticos adequados e, conseqüentemente, contribuindo para diminuição do tempo da doença e de cicatrização da ferida.

6.2 Acompanhamento do desenvolvimento de lesão

Os animais foram acompanhados conforme o curso da infecção por *L. amazonensis*, assim, medindo-se a pata infectada (pata esquerda) e a pata não

infectada (pata direita). Deste modo, observou-se a partir da segunda semana após a infecção o aumento do tamanho da pata infectada (Tabela 6).

Tabela 6: Tamanho da lesão dos animais com 40 dias de infecção (PI).

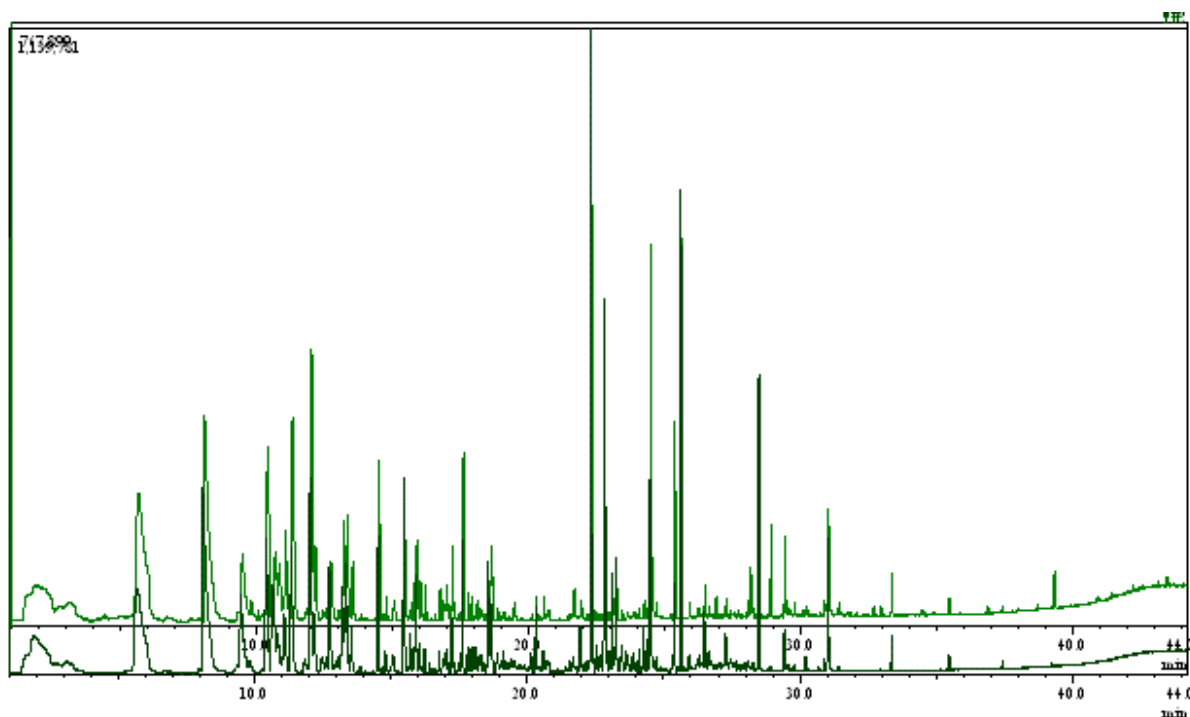
Animal amostrado	Tamanho da lesão (mm)
1	2
2	2
3	5
4	4
5	7
6	6

Fonte: Elaborado pela autora.

6.3 Extração de compostos orgânicos voláteis (COV's)

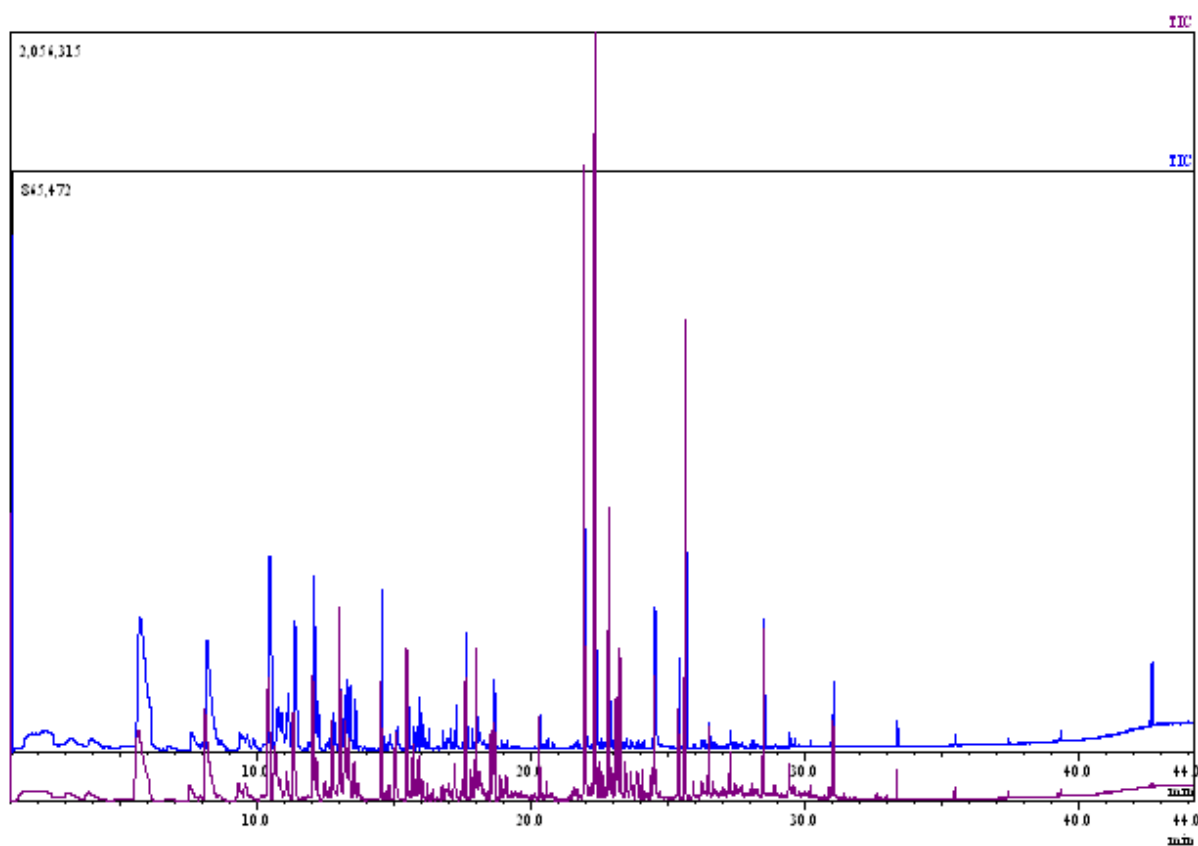
Durante o primeiro ensaio, as bactérias cultivadas em meio ágar BHI foram expostas por meia hora à fibra. Contudo, neste teste, não foi possível observar a presença de nenhum composto durante a análise do cromatograma obtido. Já durante o segundo ensaio, aumentou-se o tempo de exposição das bactérias cultivadas à fibra, sendo utilizados quatro tubos com caldo BHI contendo as bactérias que cresceram no mesmo. Em dois deles, a fibra foi exposta por uma hora (temperatura ambiente) e nos outros dois, por 3 horas para adsorver os compostos voláteis liberados pelos microrganismos presentes nas placas. Após a extração, as fibras foram retraídas e retiradas do recipiente e passaram mais uma vez pelo processo anterior em cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massas (Figura 10). Na contagem dos picos, foi observado que a fibra exposta por maior tempo gera uma maior adsorção dos voláteis produzidos pelas situações em análise (Figura 11). O protocolo de extração de voláteis foi o mesmo para os hamsters antes e após a infecção.

Figura 9: Cromatogramas obtidos a partir do controle de 1 hora em verde claro e controle de 3 horas em verde escuro.



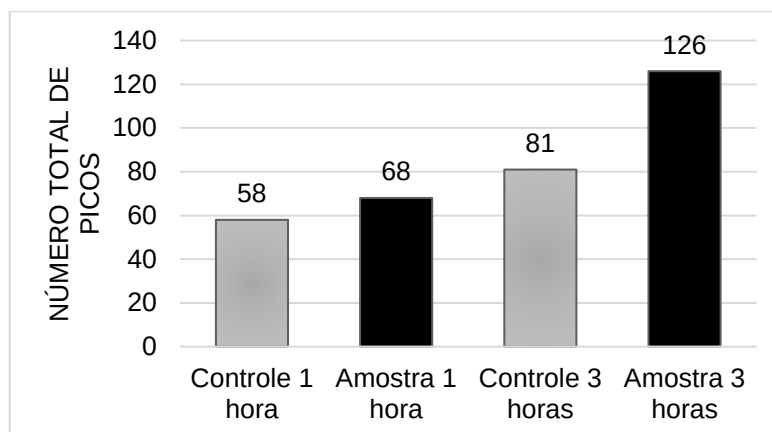
Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 10: Cromatogramas obtidos a partir da amostra de 1 hora em azul e amostra de 3 horas em roxo.



Fonte: Elaborado pela autora
Software LabSolutions.

Os picos obtidos com o controle de 1 hora e controle de 3 horas (Figura 10) são 58 e 81, enquanto os picos obtidos com as amostras são de 68 e 126 (figura 11), respectivamente (Figura 12).

Figura 11: Total de picos em função do tempo de extração

Fonte: Elaborado pela autora

Observa-se um maior número de picos na amostra que no controle. Entretanto, o controle captou grande quantidade de componentes provenientes do meio de cultura, indicando que a alta sensibilidade da fibra utilizada capta muitos voláteis liberados pelo meio que é rico em nutrientes.

Após a etapa de padronização do tempo de extração das amostras, realizou-se a extração dos voláteis provenientes dos seis hamsters nas seguintes condições:

- 1- Caldo BHI estéril (CBHI);
- 2- Caldo BHI contendo isolados bacterianos provenientes da pata do animal saudável (PC);
- 3- Caldo BHI e contendo isolados bacterianos provenientes da úlcera leishmaniótica da pata do animal infectado (PI);
- 4- Caldo BHI contendo isolados bacterianos provenientes da pata visualmente sadia da pata do animal infectado (PNI).

Através da análise dos cromatogramas gerados (Figura 13 a 19) das demais condições foi possível a identificação de 43 compostos provenientes dos 6 hamsters conforme a tabela abaixo (Tabela 6).

Tabela 7: Identificação dos compostos com base nos índices de retenção (IR) calculados e obtidos em ordem crescente de tempo de retenção. H1-H6: Referente ao animal na qual a amostra foi retirada. CBHI: Caldo BHI estéril. PC: volátil de bactéria retirada de pata que antecede infecção PNI: volátil de bactéria de pata saudável durante infecção; PI: volátil de bactéria retirada de pata infectada. As letras (a, b) que acompanham PNI e PI se referem a diferentes bactérias como fonte dos voláteis. Sinal (-) demonstra a ausência do volátil na amostra e os números são referentes a área relativa do composto presente na amostra. Em vermelho, encontram-se voláteis que também foram amostrados apenas no meio esterilizado.

21	1108	1133	3,7-dimetildecano	2.89	-	2.20	-	1.12	1.33	5.52	2.43	1.47	6.66	-	-	2.61	2.82	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.06	-
22	1109	1109	Nonanal	6.02	2.13	2.40	2.49	2.58	2.12	1.68	2.07	3.10	-	-	0.72	3.11	0.66	-	0.74	1.50	2.74	1.89	1.10	0.33	-	-	-	-
23	1122	1122	2-feniletanol	-	-	0.20	-	-	-	-	0.81	-	-	-	-	-	-	-	0.34	-	-	0.48	-	-	0.79	-	-	-
24	1156	1159	nonan-2-ol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7.24	-	-	-	-	10.29	-	11.04	-	-	5.35	-	
25	1162	1166	2,2,4,4,6,6,8,8,10,10-decametil- 1,3,5,7,9,2,4,6,8,10- pentaioxapentasilcano	-	0.07	-	-	-	-	0.34	2.67	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	1167	1166	2-(4-metil-fenil) propan-2-ol	-	-	-	-	-	-	-	0.73	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	1193	1181	2-fenoxietanol	-	0.30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.08	-	-	-	-	-	-	-	-
28	1200	1200	Dodecano	-	-	0.01	-	2.20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.87	-	-	-	-	-	-	-
29	1209	1205	Decanal	1.53	-	1.84	1.39	8.40	1.66	0.47	1.22	1.61	-	-	1.43	2.71	1.57	-	0.19	1.32	2.77	2.22	-	0.36	0.17	-	-	-
30	1215	1210	4,6-dimetilundecano	-	-	-	-	-	-	-	-	1.34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31	1215	1215	2,8-dimetilundecano	-	-	-	-	-	-	0.18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32	1266	1277	2-butiloctan-1-ol	-	0.43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33	1270	1267	dec-9-en-1-ol	-	-	-	-	-	-	-	0.53	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34	1290	1279	Pentil hexanoato	-	-	0.08	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35	1294	1295	undecan-2-ona	-	-	-	-	-	-	-	0.33	-	-	-	-	-	2.93	-	0.48	-	-	0.50	1.29	-	-	-	-	-
36	1326	1312	4,6-dimetildodecano	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3.48	21.75	-	-	-	-	-	-
37	1345	1342	Iodononano	-	0.08	0.19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.15	-	-	-	-	-	-	-
38	1490	1500	Pentadecano	1.39	1.18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
39	1535	1534	2,6-ditert-butil-4-metilfenol	-	0.37	-	-	-	-	-	-	-	3.12	-	-	6.63	-	-	-	1.35	-	-	-	-	-	-	-	-
40	1599	1600	Hexadecano	-	1.88	2.33	-	-	-	0.99	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.67	-	0.61	-	-	-	-	-	-
41	1605	1605	dietil benzeno-1,2-dicarboxilato	-	-	-	-	-	3.61	-	-	-	-	8.00	-	-	-	0.31	11.00	1.93	3.13	1.80	18.88	0.63	2.31	17.92	2.33	3.35
42	1882	1881	(2-metilpropil) benzeno-1,2- dicarboxilato	-	-	0.35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
43	1962	1957	Hexadecan-1-ol	-	0.34	0.30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.49	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.59

Fonte: Elaborado pela autora.

Conforme a tabela exhibe, observa-se que há diferença de compostos emitidos entre as amostras obtidas dos seis animais, o que corrobora com o que pode ser encontrado na literatura sobre o padrão de voláteis da pele variar de indivíduo para indivíduo devido a microbiota que cada um apresenta, conseqüentemente, os voláteis emitidos por cada um.

Dos 43 voláteis identificados, sete foram encontrados no caldo BHI esterilizado, deste modo, foram considerados contaminantes quando presentes nas demais amostras. Os compostos são: 3,7 dimetilundecano, decanal, nonanal, pentadecano, benzaldeído, 3-etil-2,5-dimetilpirazina e 2,5 dimetilpirazina.

Na situação controle (PC), na qual as bactérias foram amostradas das patas de animais saudáveis antes de serem infectados, dois compostos foram identificados exclusivamente, sendo eles: 2, 8 dimetilundecano (amostrado da bactéria retirada do animal 3) e 2-butiloctan-1-ol (amostrado da bactéria retirada do animal 1).

Cerca de sete foram encontrados apenas em isolados bacterianos extraídos da pata visualmente saudável de animais infectados (PNI), sendo eles: 2,4-dimetilheptano, 2,2,4,4,6,6-hexametil-1,3,5,2,4,6-trioxatrisilino, 2-etil-6-metilpirazina, 2,2,3,4-tetrametilpentano, 2,5-dimetil-3-(3-metilbutil) pirazina, 4,6 dimetildodecano e 3-etil-2,5-dimetilpirazina.

Dos isolados bacterianos amostrados das patas ulceradas de hamsters infectados (PI), foram identificados quatro compostos que apareceram apenas nessa situação, a saber: Dec-9-em-1-ol, 4-metildecano, (4S)-1-metil-4-prop-1-en-2-ilciclohexano e (2)metilpropilbenzeno-1,2-dicarboxilato.

Com o auxílio da database mVOC 2.0, onde há a possibilidade de realizar associações entre compostos e os organismos responsáveis por emití-los, sendo eles bactérias ou fungos, foi possível obter informações sobre as bactérias responsáveis pelos voláteis emitidos (LEMFAK, 2018). O composto ciclooctatetraeno extraído do caldo BHI com bactéria pertencente a pata dos hamsters amostrados, é conhecido por ser a assinatura da bactéria *Staphylococcus aureus*, o que pode indicar a presença da mesma no meio (YUSUF et al., 2015).

Como já apontado, as bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. são colonizadoras frequentes na pele humana. Tal organismo possui a capacidade de produzir biofilmes que tornem a região lesionada resistente a antibióticos além de causar a redução de reposição de fibroblastos (OTTO, 2018). Além disso, bactérias da espécie *S.aureus* produzem endotoxinas e podem gerar resposta inflamatória.

Para combatê-la, o sistema imune através das CD-4 secreta Interleucina-14(IL-14), uma substância pró-inflamatória que causará o recrutamento de neutrófilos para a região ferida, e consecutivamente, macrófagos chegam a região lesionada (HUITEMA *et al*, 2020). Deste modo, caso a bactéria tenha acesso a região picada pelo vetor, a mesma poderá acelerar o processo de estabelecimento da leishmaniose no sítio de infecção. Além disso, caso a úlcera seja colonizada por espécies comensais como *S. aureus*, haverá maior desequilíbrio na homeostase cutânea. Em um estudo realizado com pessoas infectadas com *L. braziliensis* notou-se que estas desenvolvem um desequilíbrio grande na microbiota da pele devido ao aumento na abundância de *Staphylococcus* ou *Streptococcus*, e essa situação é semelhante a encontrada em hamsters infectados com *L. major*. Essa situação ocorre justamente pela produção de biofilme realizada pelas bactérias presentes na úlcera. Contudo, essa situação pode se alastrar para partes mais distantes da pele, que se encontram saudáveis, e no caso de hamsters pode se alastrar até para outro animal saudável que compartilhe a mesma gaiola (GIMBLET, 2017).

Dos compostos amostrados da condição PI, o 4-metildecano foi encontrado em um estudo que observava a atividade antifúngica da bactéria *Staphylococcus sciuri* MarR44 (ALIJANI *et al.*, 2019). Enquanto o composto Dec-9-en-1-ol foi encontrado em um óleo essencial da planta *Maclura pomifera*, assim como outros compostos como octanol, decanol, hexanol e hexadecanol (JERKOVIC; MASTELIC; MARIJANOVIC, 2007).

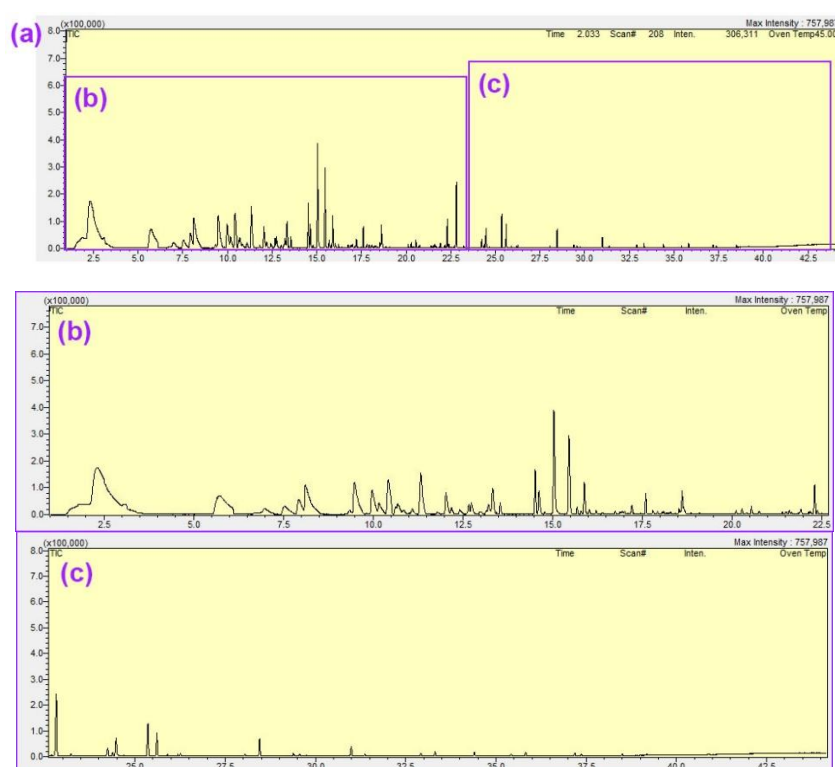
A piridina-3-carboxilato de metila, composto volátil que foi encontrado somente em animais infectados (PI e PNI) neste estudo, é metabolizado e liberado pelo gênero *Mycobacterium* (SYHRE *et al.*, 2008).

Um estudo sobre a produção de voláteis por bactérias e fungos e suas relações com processos desenvolvidos pelos mesmos como crescimentos de hifas ou desenvolvimento de biofilmes avaliou diferentes compostos: pentanal é emitido pelo *S. aureus*, enquanto o nonan-2-one é emitido por *Pseudomonas aeruginosa*, estando envolvido na função biológica de produção de biofilmes (ASHRAF *et al.*, 2018). Oct-1-en-3-ol é produzido por *Trametes gibbosa* e atrativo para besouros que se alimentam de fungos (DRILLING; DETTNER, 2009). *Pseudomonas putida* BP25 é uma bactéria gram negativa, endofítica, geralmente encontrada em plantas e no solo. Através da análise dos voláteis produzidos pela mesma por GC-MS, observou-se que um dos compostos identificados era o ácido hexadecanóico. No estudo, essa bactéria

associada a plantas libera voláteis carregados pelo ar com ações antimicrobianas (SHEORAN et al., 2015).

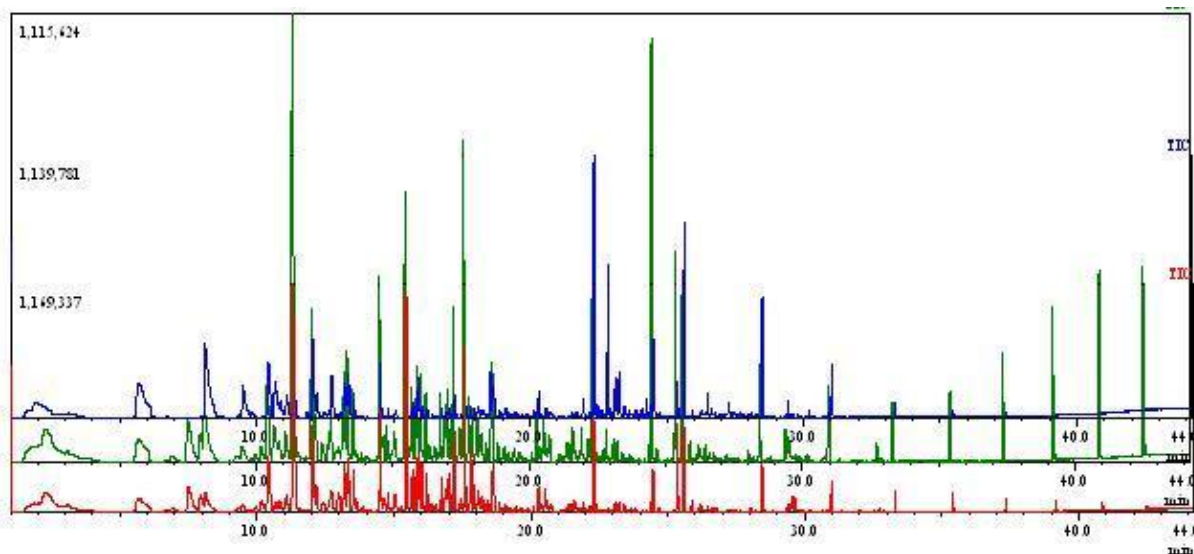
Em estudo realizado para se delinear o perfil de voláteis emitidos por bactérias cariogênicas, observou-se que o composto nonan-1-ol foi emitido apenas pela bactéria *Streptococcus mutans*. O nonan-1-ol, pode ser utilizado como assinatura para a bactéria *S. mutans*. Este composto foi encontrado nas condições PI e PNI (HERTEL, 2015).

Figura 12: Cromatograma gerado a partir da condição de controle negativo do Caldo BHI estéril (CBHI). Imagem (a): cromatograma geral; (b): zoom tr=0-22; (c): zoom tr=23-45.



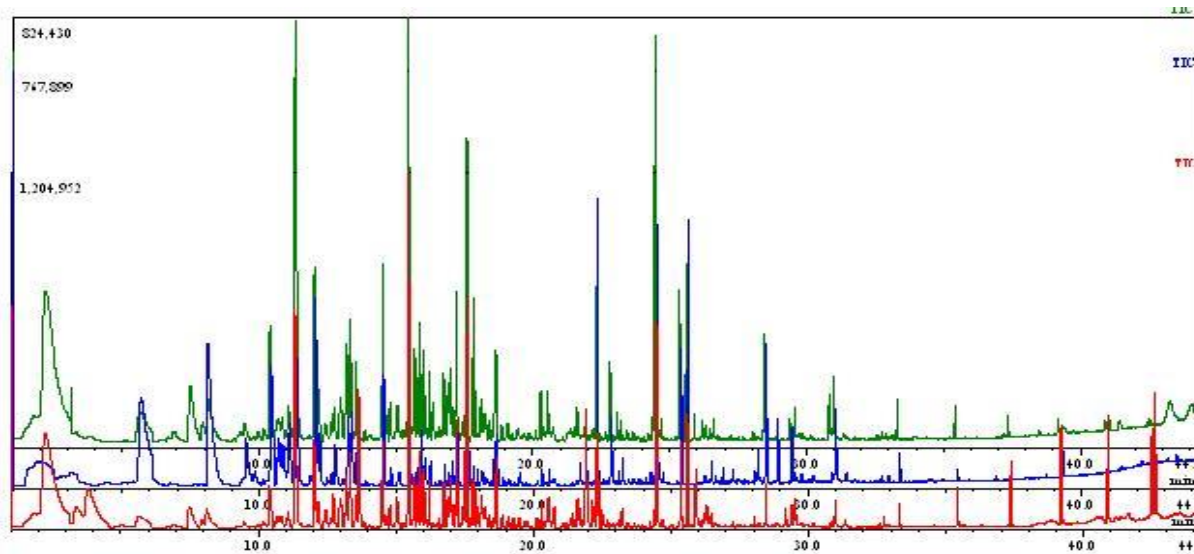
Fonte: Elaborado pela autora

Figura 13: Cromatogramas gerado a partir dos isolados extraídos a partir do hamster 1. A cor verde é referente ao cromatograma obtido através dos voláteis extraídos da pata esquerda na condição PC do animal. A cor azul é referente à condição PNI. A cor vermelha é referente a condição PI.



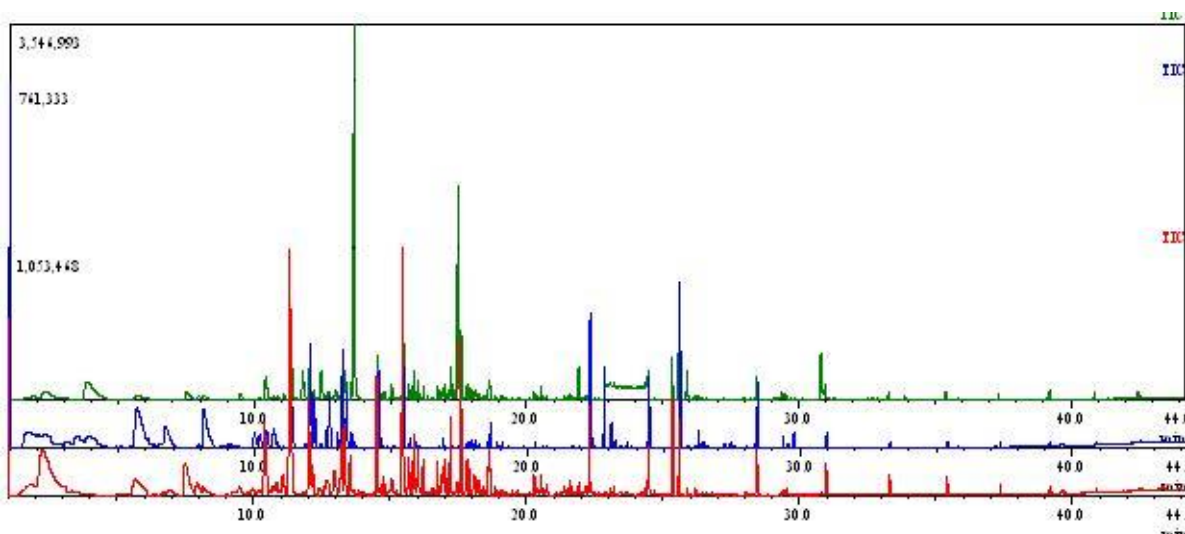
Fonte: Elaborado pela autora

Figura 14: Cromatogramas gerado a partir dos isolados extraídos a partir do hamster 2. A cor verde é referente ao cromatograma obtido através dos voláteis extraídos da pata esquerda na condição PC do animal. A cor azul é referente à condição PNI. A cor vermelha é referente a condição PI.



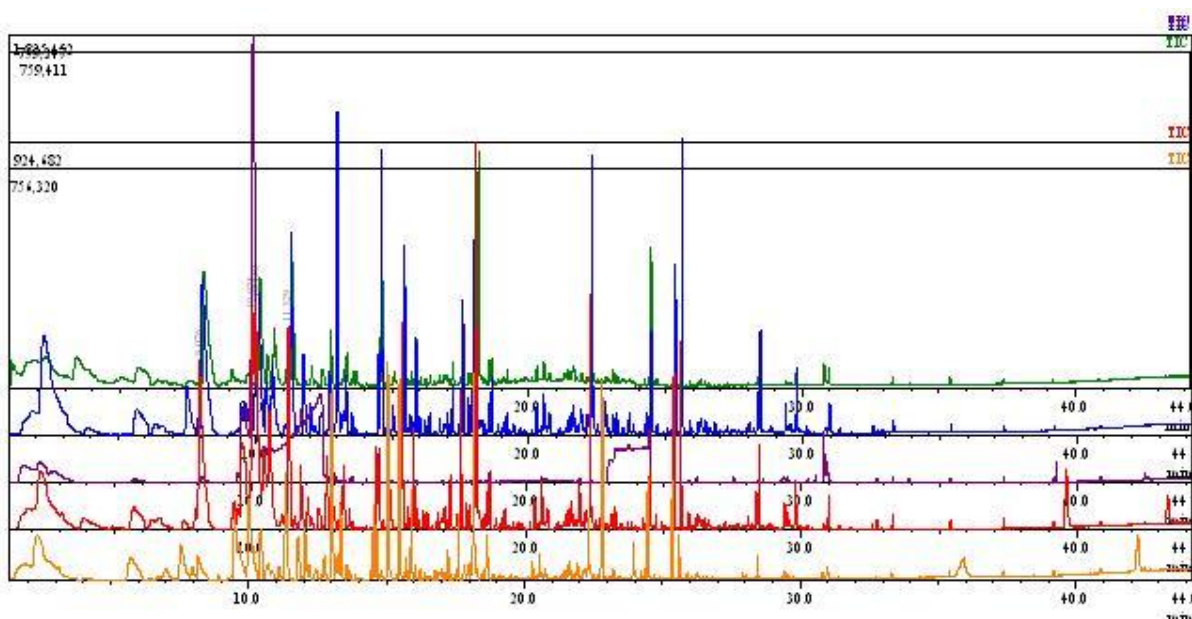
Fonte: Elaborado pela autora

Figura 15: Cromatogramas gerado a partir dos isolados extraídos a partir do hamster 3. A cor verde é referente ao cromatograma obtido através dos voláteis extraídos da pata esquerda na condição PC do animal. A cor azul é referente à condição PNI. A cor vermelha é referente a condição PI.



Fonte: Elaborado pela autora

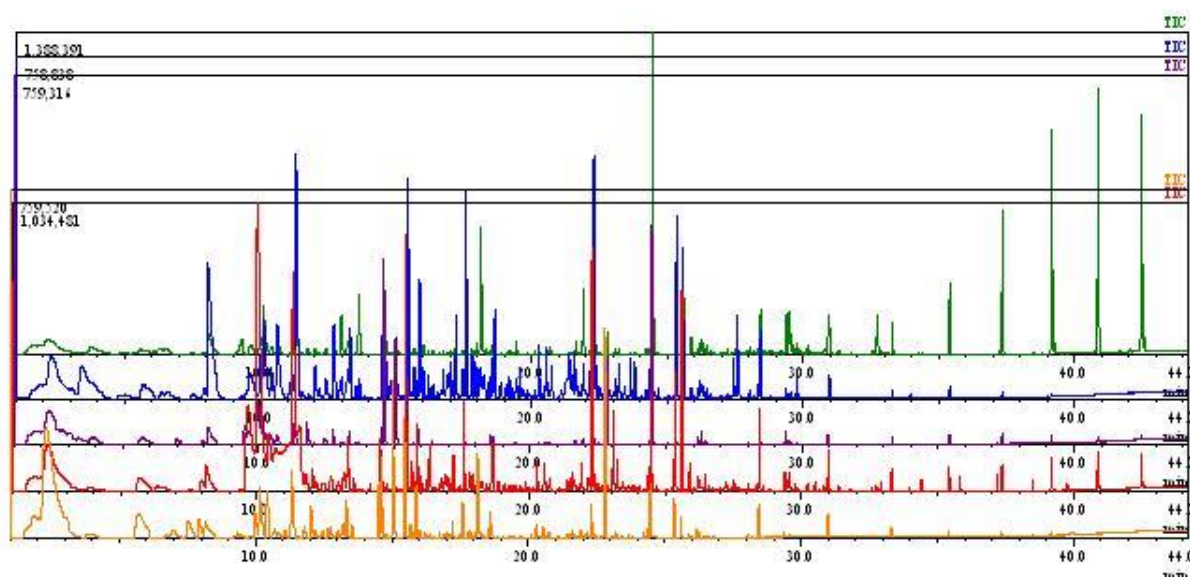
Figura 16: Cromatogramas gerado a partir dos isolados extraídos a partir do hamster 4. A cor verde é referente ao cromatograma obtido através dos voláteis extraídos da pata esquerda na condição PC do animal. Na condição PNI foram obtidos dois cromatogramas, PN1a na cor azul e PN1b na cor roxa. Na condição PI foram obtidos dois cromatogramas, PIa na cor vermelha e PIb na cor laranja.



Fonte: Elaborado pela autora

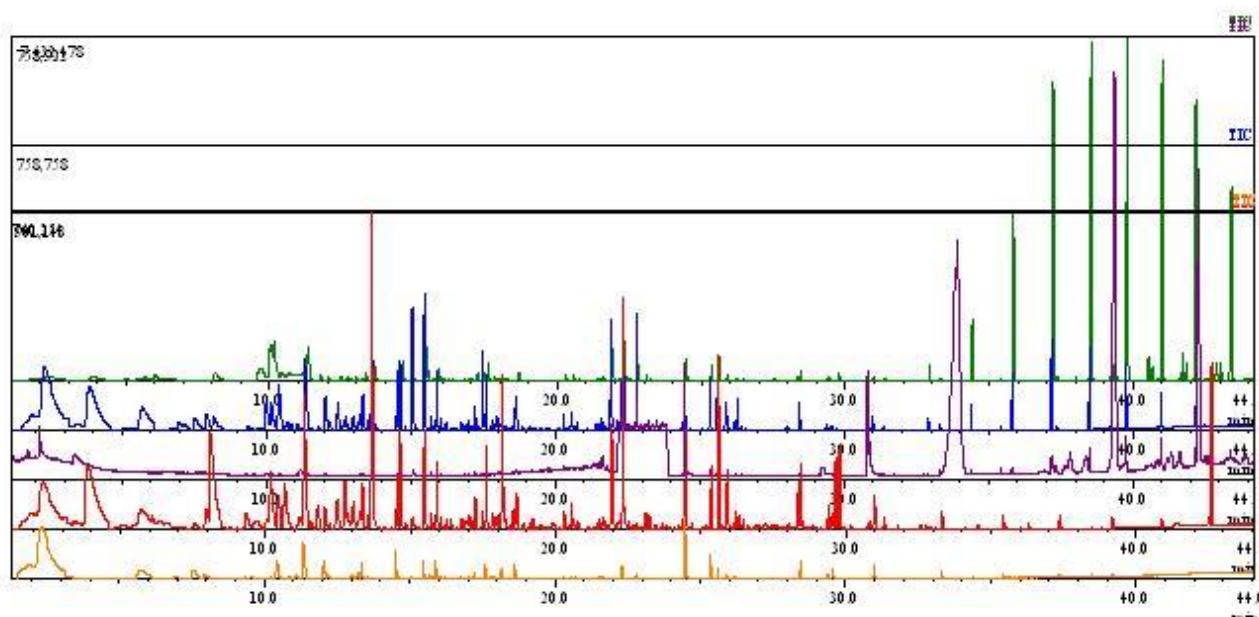
Figura 17: Cromatogramas gerado a partir dos isolados extraídos a partir do hamster 5. A cor verde é referente ao cromatograma obtido através dos voláteis extraídos da pata esquerda na condição PC

do animal. Na condição PNI foram obtidos dois cromatogramas, PNIa na cor azul e PNIb na cor roxa. Na condição PI foram obtidos dois cromatogramas, PIa na cor vermelha e PIb na cor laranja.



Fonte: Elaborado pela autora

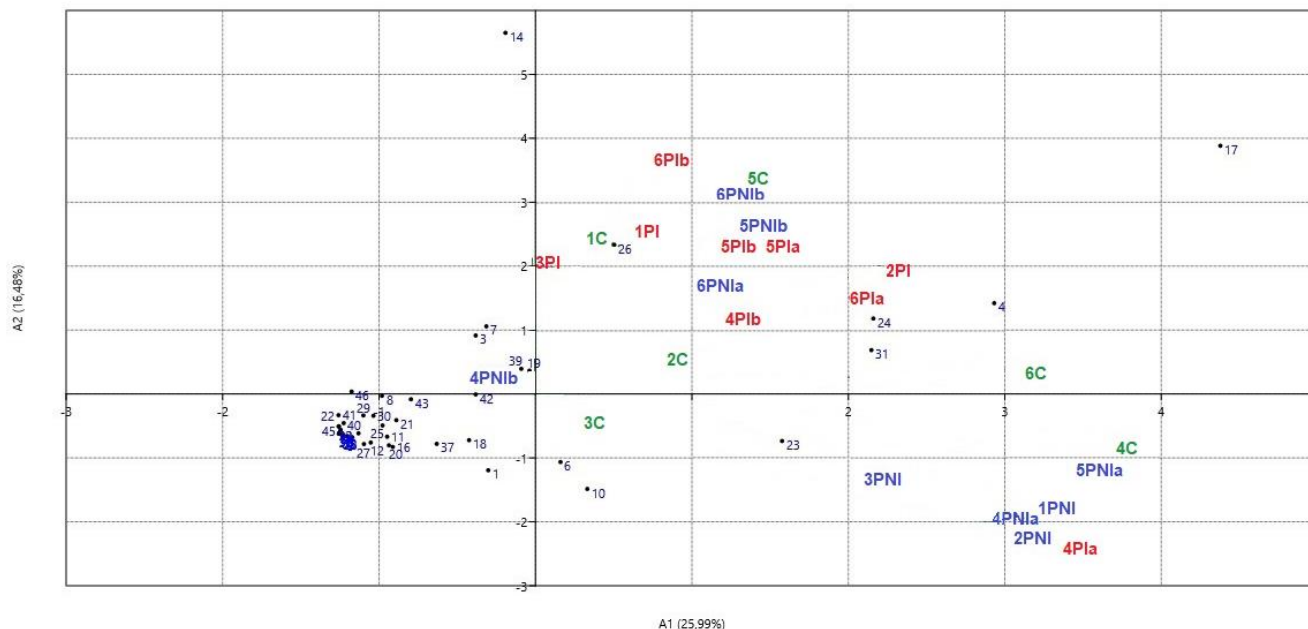
Figura 18: Cromatogramas gerado a partir dos isolados extraídos a partir do hamster 6. A cor verde é referente ao cromatograma obtido através dos voláteis extraídos da pata esquerda na condição PC do animal. Na condição PNI foram obtidos dois cromatogramas, PNIa na cor azul e PNIb na cor roxa. Na condição PI foram obtidos dois cromatogramas, PIa na cor vermelha e PIb na cor laranja.



Fonte: Elaborado pela autora

Para a realização de análise de componentes principais (Principal Components Analysis – PCA), utilizou-se as áreas relativas dos cromatogramas das amostras (Figura 20).

Figura 19: Análise de componentes principais (PCA) dos voláteis identificados a partir das bactérias amostradas dos hamsters de 1 a 6. Os compostos voláteis são representados por números seguindo a tabela 6 (43 compostos identificados). Condições: PC (Em verde): amostra retirada da pata esquerda antecedendo infecção, PNI (Em roxo): amostra retirada da pata não infectada; PI (Em vinho): Amostra retirada da pata infectada.



Fonte: Elaborado pela autora

Conforme observado através da análise de componentes principais (Figura 20), não foi possível estabelecer uma correlação entre as condições estudadas e os voláteis produzidos. Deste modo, tal evidência corrobora com as indicações da literatura apontando a variação interindividual da microbiota cutânea, sendo, portanto, determinante para a variação interindividual de voláteis, consequentemente tornando indivíduos mais atrativos do que outros. Além disso, a variação interindividual da microbiota cutânea contribui para a diferenciação de grau de ulceração entre os indivíduos infectados, uma vez que, alguns indivíduos podem apresentar, já em sua microbiota saudável, bactérias comensais capazes de tornarem-se patológicas caso haja a quebra da barreira da pele, o que, somado aos mecanismos de escape do protozoário da leishmaniose e de defesa do sistema imune e aos mecanismos de escape da leishmaniose, a diferenciação da úlcera leishmaniótica em si, pode ocorrer. Como apontado no estudo, o tamanho da lesão variou individualmente (Tabela 6) (BUSULA et al., 2017).

Ainda que não tenha sido observado diferenças entre os perfis de voláteis produzidos pelas bactérias amostradas das diferentes condições avaliadas, alguns dos compostos já foram encontrados em hospedeiros infectados em diferentes hospedeiros vertebrados e alguns apresentam resultados de atratividade para flebotomíneos.

Com relação ao composto nonan-1-ol, verificou-se a relação de ativação e atração do mesmo para machos e fêmeas de *Lu. longipalpis* (MAGALHÃES-JUNIOR et al., 2014b). Em outro estudo, avaliou-se também a atração e ativação de flebotomíneos da espécie *Ny. intermedia*, dentre os compostos estudados, os que apresentaram ambas as respostas foram 2-fenilacetaldeído e pentadecano (TAVARES et al., 2018).

Acerca dos compostos utilizados como biomarcadores para animais infectados, os que se apresentam nesse estudo e foram testados com relação a atratividade para machos e fêmeas de *Lu. longipalpis* foram: nonanal, octanal e decanal (MAGALHÃES-JUNIOR et al., 2019).

6. CONCLUSÕES

- O isolamento, separação e sequenciamento das bactérias cultiváveis, por meio do método de Sanger levou à identificação dos gêneros *Staphylococcus* e *Bacillus*.
- A extração de voláteis a partir de isolados de bactérias mostrou-se eficiente com obtenção de 43 compostos isolados.
- Apenas quatro compostos foram isolados exclusivamente dos animais infectados: (2) metilpropilbenzeno-1,2-dicarboxilato, 4-metildecano, dec-9-en-1-ol e (4S)-1-metil-4-prop-1-en-2-ilciclohexano.
- Os dados encontrados no presente trabalho, não apresentando diferenças marcantes entre bactérias ou voláteis, corroboram o estudo onde não foi encontrada diferença na atratividade de flebotomíneos da população 9-metilgermacreno para os animais após a infecção (DA ROCHA SILVA et al, 2022)”

7. PERSPECTIVAS

Já está em curso uma colaboração com a Prof^a Dr^a Saura Rodrigues da Silva do Laboratório de Bioinformática da Unesp de Jaboticabal, assim, serão realizados estudos mais aprofundados sobre o material sequenciado na tentativa de realizar a identificação das bactérias cultivadas a nível de espécie e se conseguir resultados estatísticos.

Estudos que busquem responder se estas bactérias e/ou outras em associação com o vetor são responsáveis pela liberação de algum composto que possa ser usado como isca biológica ainda são escassos e representam uma abordagem interessante do ponto de vista da prevenção e controle desta doença.

A identificação de todos os COV emitidos pelas bactérias isoladas no presente estudo será útil para a condução de ensaios comportamentais utilizando-se flebotomíneos, a fim de se observar a reação desencadeada por cada um dos compostos, no inseto, e a partir destes ensaios propor novas metodologias e abordagem no que se diz respeito a iscas atrativas para controle vetorial, especialmente se utilizado os compostos que foram emitidos apenas na situação em que o animal estava infectado, estando ele com úlcera ou não.

8. REFERÊNCIAS

- ABADÍAS-GRANADO, I., DIAGO, A., CERRO, P. A., PALMA-RUIZ, A. M.; GILABERTE, Y. Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. **Actas Dermosifiliográficas**, v. 112, n. 7, p. 601–618. 2021. DOI <https://doi.org/10.1016/j.ad.2021.02.008>
- ALIJANI, Zahra; AMINI, Jahanshir; ASHENGROPH, Morahem; BAHRAMNEJADC, Bahman. Antifungal activity of volatile compounds produced by *Staphylococcus sciuri* strain MarR44 and its potential for the biocontrol of *Colletotrichum nymphaeae*, causal agent strawberry anthracnose. **International Journal of Food Microbiology**, [S. l.], p. 1-9, 21 abr. 2019. DOI <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108276>. Disponível em: <https://www.journals.elsevier.com/international-journal-of-food-microbiology>. Acesso em: 4 ago. 2021.
- AKHOUNDI, M. et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. **PLoS nt Trop Dis**. v. 10, n 3, p. e0004349, 2016.
- ARRUDA, A. **Identificação de microrganismos cultiváveis associados ao intestino de Anopheles darlingi (Diptera: Culicidae) com potencial à paratransgênese para o controle da malária**. 2017. 170 f. Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal n BIONORTE) Universidade Federal do Amazonas - Universidade Federal de Rondônia, Manaus, 2017.
- ARTHUR, C. L. PAWLISZYN, J. Solid Phase Microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. **Anal Chem**. v. 62, n. 19, p. 2145–2148, 1990.
- ASHRAF, M.; NOVAK-FRAZER, L.; BATES, M.; BAGUNEID, M.; ALONSO-RASGADO, T.; XIA, G.; BAYAT, A., et al. Validation of biofilm formation on human skin wound models and demonstration of clinically translatable bacteria-specific volatile signatures. **Scientific reports**, v 8, n. 1, p. 1–16, 2018.
- ATTIPA, C.; SOLANO-GALLEGU, L.; PAPASOULIOTIS, K.; SOUTTER, F.; MORRIS, D.; HELPS, C.; CARVER, S.; TASKER, S. Association between canine leishmaniosis and *Ehrlichia canis* co-infection: a prospective casencontrol study. **Parasites & vectors**, v. 11, n. 1, p. 184. 2018. DOI <https://doi.org/10.1186/s13071n018n2717n8>
- BATISTA, E. P. A.; COSTA, E. F. M.; SILVA, A. A. *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) displays increased attractiveness to infected individuals with *Plasmodium vivax* gametocytes. **Parasites & Vectors**, v. 7, p. 251, 2014.
- BRASIL. **Casos de Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas**. 1990 a 2016. Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde. Setembro 2017. Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/setembro/14/LTnCasos.pdf>. Acesso em: 4 ago. 2021.
- BRASIL. Agência nacional de Vigilância Sanitária. Módulo 6. Detecção e identificação de bactérias de importância médica /Agência nacional de Vigilância Sanitária. **Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde**, 2013
- BRAZIL, R. P. et al. Sand fly vectors of *Leishmania* in the Americas – A mini review. **Entomol Ornithol Herpetol**. v. 4, n. 2, p. 144, 2015

- BROWN, W. L.; EISNER, T.; WHITTAKER, R. H. Allomones and Kairomones: Transspecific Chemical Messengers. **BioScience**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 21–22, 1970.
- BUSULA, A. O. et al. Mechanisms of Plasmodium-Enhanced Attraction of Mosquito Vectors. **Trends in Parasitology**, v. 33, n. 12, p. 961–973, 2017.
- CAMPOLINA, T. B. A ação da microbiota nativa de *Lutzomyia longipalpis* no desenvolvimento de *Leishmania* spp. 60. 2017. http://www.cpqrr.fiocruz.br/textoncompleto/D_193.pdf
- CAMPOLINA, T. B.; VILLEGAS, L. E. M.; MONTEIRO, C. C.; PIMENTA, P. F. P.; SECUNDINO, N. F. C. Tripartite interactions: *Leishmania*, microbiota and *Lutzomyia longipalpis*. **PLoS neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 10, p. 1–18. 2020. DOI <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008666>
- CHENG, Y. N.; WEN, P.; DONG, S. H.; TAN, K.; NIEH, J. C. Poison and alarm: The Asian hornet *Vespa velutina* uses sting venom volatiles as an alarm pheromone. **Journal of Experimental Biology**, [s. l.], v. 220, n. 4, p. 645–651, 2017.
- CHELBI, I.; MAGHRAOUI, K.; ZHIOUA, S.; CHERNI, S.; LABIDI, I.; SATOSKAR, A.; HAMILTON, J. G. C.; ZHIOUA, E. Enhanced attraction of sand fly vectors of *Leishmania infantum* to dogs infected with zoonotic visceral leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 15, n. 7, p. 1–17, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0009647>. Acesso em: 1 ago. 2021.
- COICO, R. **Gram Staining**. Faltou colocar o título do artigo. *Current Protocols in Microbiology*. 2005. DOI 10.1002/9780471729259.mca03c00
- CORNET, S. et al. Malaria infection increases bird attractiveness to uninfected mosquitoes. **Ecology Letters**, v. 16, n. 3, p. 323–329, 2013.
- CUNDELL, A. M. Microbial Ecology of the Human Skin. **Microbial Ecology**, v. 76, n. 1, p. 113–120. 2018. DOI <https://doi.org/10.1007/s00248n016n0789n6>
- DA ROCHA SILVA, F. B. et al. Influence of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* infection on the attractiveness of BALB/c mice to *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae). **PloS one**, v. 14, n. 4, p. e0214574, 2019.
- DE BOER, Jetske G. et al. Odours of *Plasmodium falciparum*-infected participants influence mosquito host interactions. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 9283, 2017.
- DE MORAES, C. M. et al. Malarian induced changes in host odors enhance mosquito attraction. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 30, p. 11079–11084, 2014.
- DE OLIVEIRA, L. S. et al. Headspace solid phase microextraction/gas chromatography-mass spectrometry combined to chemometric analysis for volatile organic compounds determination in canine hair: A new tool to detect dog contamination by visceral leishmaniasis. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 875, n. 2, p. 392–398, 2008.
- DOMENICO, E. G.; CAVALLO, I.; CAPITANIO, B.; ASCENZIONI, F.; PIMPINELLI, F.; MORRONE, A.; ENSOLI, F. *Staphylococcus aureus* and the Cutaneous Microbiota Biofilms in the Pathogenesis of Atopic Dermatitis. **Microorganisms**, v. 7, n. 9, p. 301, 2019. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7090301>.

- DORMONT, L. et al. New methods for field collection of human skin volatiles and perspectives for their application in the chemical ecology of human-pathogen-vector interactions. **Journal of Experimental Biology**, v. 216, n. 15, p.2783–2788, 2013.
- DORMONT, L.; BESSIÈRE, J. M.; COHUET, A. Human Skin Volatiles: A Review. **Journal of Chemical Ecology**, v. 39, n. 5, p. 569–578, 2013.
- DRILLING, K.; DETTNER, K. Electrophysiological responses of four fungivorous coleoptera to volatiles of trametes versicolor: Implications for host selection. **Chemoecology**, v. 19, n. 2, p. 109–115, 2009.
- ESPINOSA, O. A. et al. An appraisal of the taxonomy and nomenclature of trypanosomatids presently classified as Leishmania and Endotrypanum. **Parasitology**, v. 15, p. 1-13, 2016.
- ERHARDT, W. et al. A comparative study with various anesthetics in mice (pentobarbitone, ketamine, xylazine, carfentanyl, netomidate). **Res Exp Med**, v. 184, n. 3, p.159-169, 1984.
- EWING, W. H. **Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae**. 4th ed. New York: Elsevier Science Publishing, 1986.
- FARMER III, J. J. et al. Biochemical Identification of new species and biogroups of Enterobacteriaceae isolated from clinical specimens. **J. Clin. Microbiol.**, v. 21, p. 46 - 76, 1985.
- FIROOZ A. S. et al. Variation of Biophysical Parameters of the Skin with Age, Gender, and Body Region. **The Scientific World Journal**, p.1-5. 2012.
- FRANK, D. N.; WYSOCKI, A.; SPECHT-GLICK, D. D. et al. Microbial diversity in chronic 104 open wounds. **Wound Repair Regen**, St. Louis, v. 17, n. 2, p. 163-72, 2009.
- GALLAGHER, M. et al. Analyses of volatile organic compounds from human skin. **The British journal of dermatology**, v. 159, n. 4, p. 780–91, set. 2008.
- GARRITY, G. M.; BELL, J. A.; LILBURN, T. Thiotrichales ord. nov. **Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology**, p. 131–210. 2005. DOI 10.1007/0n387n28022n7_5
- GEIER, M.; BOECKH, J. A new Yntube olfactometer for mosquitoes to measure the attractiveness of host odours. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 92, n. 1, p. 9-19, 1999.
- GONÇALVES, E. G. R. et al. Infecção bacteriana na leishmaniose cutânea: padrão bacteriano e sensibilidade a antibióticos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v. 42, n. 2, p. 219-221, Abr 2009. <https://doi.org/10.1590/S0037-868220090002000272000>.
- GOULART, T. M. et al. Techniques to improve the maintenance of a laboratory colony of nyssomyia neivai (Diptera: Psychodidae). **Parasites and Vectors**, v. 8, n. 1, 2015.
- GOULART, T. M. et al. Breeding protocol for the sand fly nyssomyia neivai (Diptera: Psychodidae) in laboratory conditions. **Acta Trop.** v. 174, p. 102-105, 2017.
- HERTEL, M.; PREISSNER, R.; GILLISSEN, B.; SCHMIDT-WESTHAUSEN, A. M.; PARIS, S.; PREISSNER, S. Detection of signature volatiles for cariogenic microorganisms. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, [s. l.], v. 35, n. 2, p. 235–244, 2016.

HUITEMA, L.; PHILLIPS, T.; ALEXEEV, V.; TOMIC-CANIC, M.; PASTAR, I.; IGOUCHEVA, O. Intracellular escape strategies of *Staphylococcus aureus* in persistent cutaneous infections. **Experimental Dermatology**, v. 30, n. 10, p. 1428–1439, 2020. <https://doi.org/10.1111/exd.14235>.

JERKOVIC, I.; MASTELIC, J.; MARIJANOVIC, Z. Bound volatile compounds and essential oil from the fruit of *Maclura pomifera* (Raf.) Schneid. (osage orange). **Flavour and Fragrance Journal**, v. 22, p. 84–88, 2007. <https://doi.org/10.1002/ffj.1763>.

JOHNSON, T. R.; GÓMEZ, B. I.; MCINTYRE, M. K.; DUBICK, M. A.; CHRISTY, R. J.; NICHOLSON, S. E.; BURMEISTER, D. M. The cutaneous microbiome and wounds: new molecular targets to promote wound healing. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 9. 2018. DOI <https://doi.org/10.3390/ijms19092699>

KANCHISWAMY, Chidananda Nagamangala Kanchiswamy et al. Chemical diversity of microbial volatiles and their potential for plant growth and productivity. **Frontiers in plant science**, [S. l.], p. 1-23, 13 mar. 2015. DOI <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00151>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2015.00151/full>. Acesso em: 2 ago. 2021.

KELLY, D. W. Why are some people bitten more than others? **Trends in parasitology**, v. 17, n. 12, p. 578-581, 2001.

KWAK, J. et al. Major histocompatibility complex-regulated odortypes: Peptide-free urinary volatile signals. **Physiology & Behavior**, v. 96, n. 1, p. 184–188, 8 Jan. 2009.

KUBICA, G. P.; VITVITSKY, J. Comparison of Two Commercial Formulations of the MacConkey Agar Test for Mycobacteria. **Applied Microbiology**, v. 27, n. 5, p. 917–919. 1974. DOI <https://doi.org/10.1128/aem.27.5.917n919.1974>

LACROIX, R. et al. Malaria infection increases attractiveness of humans to mosquitoes. **PLoS Biology**, v. 3, n. 9, p.1590–1593, 2005.

LEUNG, Marcus H. Y.; WILKINS, David; LEE, Patrick K. H. Insights into the pan-microbiome: skin microbial communities of Chinese individuals differ from other racial groups. **Scientific reports**, [S. l.], p. 1-14, 16 ago. 2015. DOI 10.1038/srep11845. Disponível em: <https://www.nature.com/srep/>. Acesso em: 2 ago. 2021.

LAW, J. H.; REGNIER, F. E. Pheromones. **Annual review of biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 533-548, 1971.

LANDIS, S. J. Chronic wound infection and antimicrobial use. **Adv. Skin. Wound. Care.**, Springhouse, v. 21, n. 11, p. 531-40, 2008.

LANGE-ASSCHE-FELDT, B. et al. Distribution of bacteria in the epidermal layers and hair follicles of the human skin. **Skin pharmacology and physiology**, v. 24, n. 6, p. 305-311, 2011.

LEMFACK, M. C.; GOHLKE, B. O.; TOGUEM, S. M. T.; PREISSNER, S.; PIECHULLA, B.; PREISSNER, R. MVOC 2.0: A database of microbial volatiles. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. D1, p. D1261–D1265. 2018. DOI <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1016>.

- LESSA, M. M. et al. Mucosal leishmaniasis: epidemiological and clinical aspects. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 73, n. 6, p. 843-847, 2007.
- LOGAN, J. G.; BIRKETT, M. A. Semiochemicals for biting fly control: their identification and exploitation. **Pest Management Science**, v. 63, p. 647–657, 2007.
- LUNJANI, N.; HLELA, C.; O'MAHONY, L. Microbiome and skin biology. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, v. 19 n. 4, p. 328–333, 2019. DOI <https://doi.org/10.1097/ACI.0000000000000542>.
- MAGALHÃES-JUNIOR, J. T. et al. Identification of biomarkers in the hair of dogs: New diagnostic possibilities in the study and control of visceral leishmaniasis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 406, n. 26, p. 6691–6700, 2014a.
- MAGALHÃES-JUNIOR, J. T. et al. A laboratory evaluation of alcohols as attractants for the sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera:Psychodidae). **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 1, p. 60, 2014b.
- MAGALHÃES-JUNIOR, J. T. et al. Attraction of the sandfly *Lutzomyia longipalpis* to 61 possible biomarker compounds from dogs infected with *Leishmania infantum*. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 33, n. 2, p. 322–325, 2019.
- MANN, S.; FRASCA, K.; SCHERRER, S.; HENAO-MARTÍNEZ, A. F.; NEWMAN, S.; RAMANAN, P.; SUAREZ, J. A. A Review of Leishmaniasis: Current Knowledge and Future Directions. **Current Tropical Medicine Reports**, [s. l.], v. 8, n. 2, p. 121–132, 2021.
- MARTÍNEZ, D. Y.; VERDONCK, K.; KAYE, P. M.; ADAUI, V.; POLMAN, K.; LLANOS-CUENTAS, A.; DUJARDIN, J. C.; BOELAERT, M. Tegumentary leishmaniasis and coinfections other than HIV. **PLoS neglected Tropical Diseases**, v. 12 n. 3, p. 1–20. 2018. DOI <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006125>
- MCCALL, P. J.; CAMERON, M. M. Oviposition pheromones in insect vectors. **Parasitology Today**, v. 11, n. 9, p. 352-355, 1995.
- NEVATTE, T. M. et al. After infection with *Leishmania infantum*, Golden Hamsters (*Mesocricetus auratus*) become more attractive to female sand flies (*Lutzomyia longipalpis*). **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 6104, 2017.
- OGAI, K. et al. A comparison of techniques for collecting skin microbiome samples: swabbing versus tape stripping. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 2362, 2018.
- O'SHEA, B. et al. Enhanced sandfly attraction to Leishmanianinfected hosts. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 96, n. 2, p. 117–118, 2002.
- PARLET, C. P.; BROWN, M. M.; HORSWILL, A. R. Commensal Staphylococci Influence Staphylococcus aureus Skin Colonization and Disease. **Trends in Microbiology**, vol. 27, no. 6, p. 497–507, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.01.008>.
- PAWLISZYN, J. (Ed.). **Handbook of solid phase microextraction**. Waltham, MA: Elsevier Publ., 2012. ISBN: 978-0-12-416017-0. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416017-0.00016-4>.
- QIU, Y. T. et al. Interindividual variation in the attractiveness of human odours to the malaria mosquito *Anopheles gambiae* ss. **Medical and veterinary entomology**, v. 20, n. 3, p. 280-287, 2006.

ROBINSON, Ailie et al. Plasmodium-associated changes in human odor attract mosquitoes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 18, p. E4209–E4218, 2018. <https://doi.org/10.1073/pnas.1721610115>.

ROGERS, M. E. The role of Leishmania proteophosphoglycans in sand fly transmission and infection of the mammalian host. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 1–13, 2012.

ROGERS, M. E.; BATES, P. A. Leishmania manipulation of sand fly feeding behavior results in enhanced transmission. **PLoS Pathogens**, v. 3, n. 6, p. 818–825, 2007.

SHEORAN, N.; VALIYA NADAKKAKATH, A.; MUNJAL, V.; KUNDU, A.; SUBAHARAN, K.; VENUGOPAL, V.; RAJAMMA, S.; EAPEN, S. J.; KUMAR, A. Genetic analysis of plant endophytic *Pseudomonas putida* BP25 and chemo-profiling of its antimicrobial volatile organic compounds. **Microbiological Research**, [s. l.], v. 173, p. 66–78, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2015.02.001>. Acesso em: 19 jul. 2021.

SHIREY, R. E. SPME Commercial Devices and Fibre Coatings. In: PAWLISZYN, J. (Ed.). **Handbook of Solid Phase Microextraction**. Waltham, MA: Elsevier Publ., 2012. p. 99-1033. ISBN: 978-0-12-416017-0. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416017-0.00016-4>.

SMALLEGANGE, Renate C. et al. Synergism between ammonia, lactic acid and carboxylic acids as kairomones in the host-seeking behaviour of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* sensu stricto (Diptera: Culicidae). **Chemical senses**, v. 30, n. 2, p. 145–152, 2005.

STASHENKO, E. E.; MARTÍNEZ, J. R. Sampling volatile compounds from natural products with headspace/solid phase micro extraction. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 70, n. 2, p. 235–242, 10 mar. 2007.

STEVERDING, D. The history of leishmaniasis. **Parasit Vectors**. v. 10, n. 1, p. 82, 2017.

SUPELCO. **Solid Phase Microextraction Fiber Assemblies**. 2018.

SYHRE, M.; CHAMBERS, S. T. The scent of *Mycobacterium tuberculosis*. **Tuberculosis**, [s. l.], v. 88, n. 4, p. 317–323, 2008.

TAVARES, Diva da Silva. **Atração de vetores de leishmaniose tegumentar americana por compostos orgânicos voláteis presentes na pele humana**. 2016. 109 f. Tese (Doutorado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2016.

TAVARES, D. DA S. et al. Attraction of phlebotomine sandflies to volatiles from skin odors of individuals residing in an endemic area of tegumentary leishmaniasis. **PLoS ONE**, v. 13, n. 9, p. 1–14, 2018.

TOLEDO, M. R. F.; FONTES, C. F.; TRABULSI, L. R. EPM - Uma modificação do meio de Rugai e Araújo, para a realização simultânea dos testes de produção de gás a partir de glicose, H₂S, urease e triptofano desaminase. **Rev. Microbiol.**, v. 13, p. 309 - 315. 1982.

TOLEDO, M. R. F.; FONTES, C. F.; TRABULSI, L. R. MILi - Um meio para a realização dos testes de motilidade, indol e lisina descarboxilase. **Rev. Microbiol.**, v. 13, p. 230 - 235. 1982.

UPDEGRAFF, David M. Methods for determining the distribution of bacteria in the skin. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 44, n. 8, p. 481-483, 1967.

UCHIDA-FUJII, E.; NIWA, H.; KINOSHITA, Y.; KATAYAMA, Y.; NUKADA, T. Molecular phylogenetic and matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry identification of isolates from horses identified as enterobacter cloacae by biochemical identification. **Journal of Equine Science**, v. 31, n. 3, p. 49–55. 2020. DOI <https://doi.org/10.1294/jes.31.49>

VALENTE, A. L. P. et al. Microextração por fase sólida. **Química nova**, v. 23, n. 4, p. 523-530, 2000.

VERHULST, N. O. et al. Cultured skin microbiota attracts malaria mosquitoes. **Malaria journal**, v. 8, n. 1, p. 302, 2009.

VIEIRA, L. Q.; OLIVEIRA, M. R.; NEUMANN, E.; NICOLI, J. R.; VIEIRA, E. C. Parasitic infections in germfree animals. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, n. 1, p. 105–110 1998. DOI <https://doi.org/10.1590/S0100n879X1998000100013>

WASHINGTON, J. A. Laboratory approaches to the identification of enterobacteriaceae. **Human Pathology**, v. 7, n. 2, p. 151–159. 1976. DOI 10.1016/s0046n8177(76)80018n4

WILLIAMSON, Peter. A new method for the quantitative investigation of cutaneous propionibacteria. **J Invest Dermatol**, v. 45, p. 498n503, 1968.

WHO. **Leishmaniasis Fact sheets. 2019 (atualizado em março de 2020)**. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. Acesso em: 4 ago. 2021.

ZARBIN, P. H. G. et al. Feromônios de insetos: tecnologia e desafios para uma agricultura competitiva no Brasil. **Química nova**. v. 32, n. 3, p. 722n731, 2009.

YUSUF, Nurlisa et al. In-vitro diagnosis of single and poly microbial species targeted for diabetic foot infection using e-nose technology. **BMC Bioinformatics**, [S. l.], v. 16, n. 1, n. 158, p. 1-12, 14 abr. 2015. DOI 10.1186/s12859-015-0601-5. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4430918/>. Acesso em: 16 ago. 2021.

9. APÊNDICES

APÊNDICE A – Parecer de aprovação da CEUA/FCF/CAR.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara



CERTIFICADO

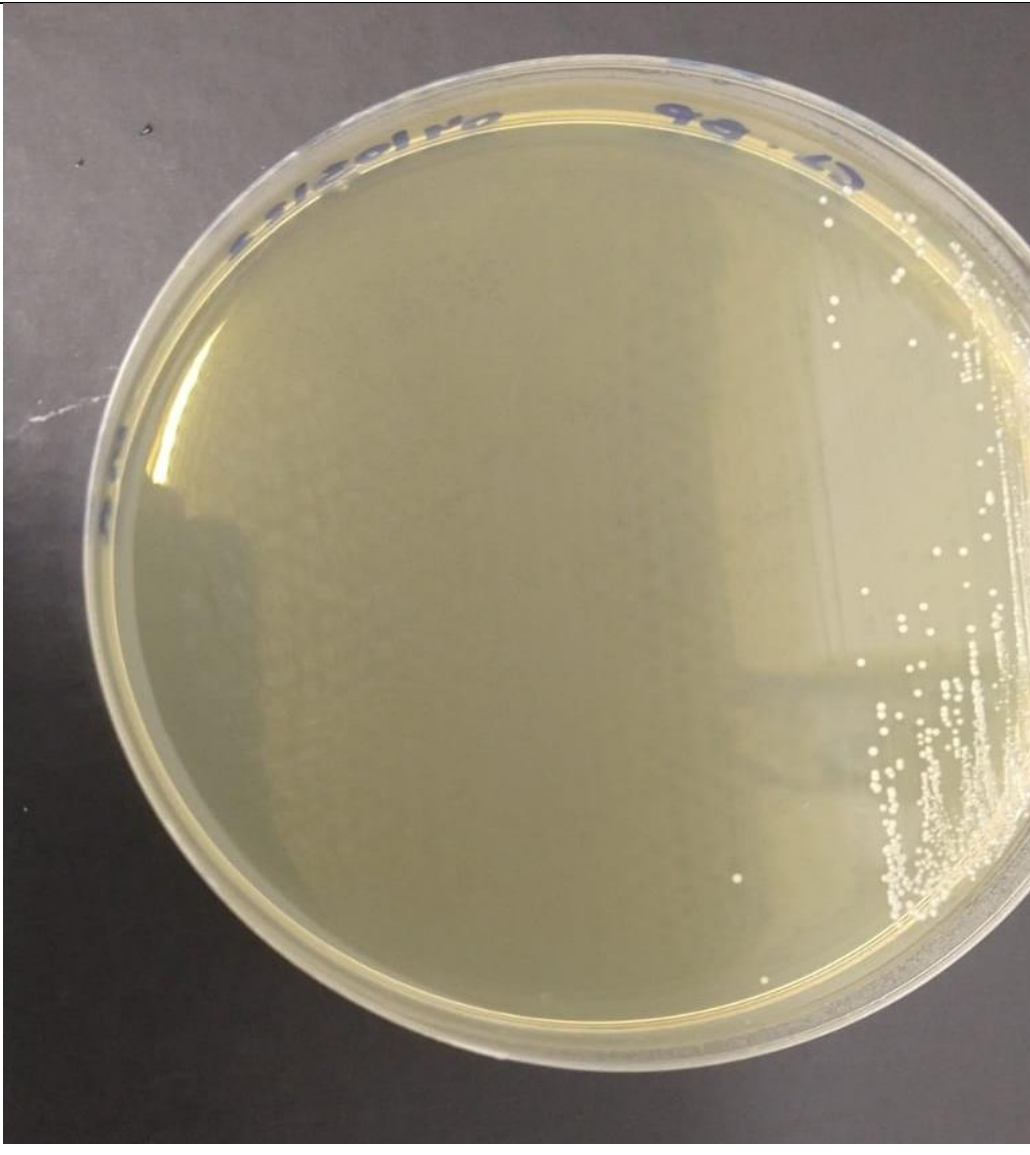
Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação da atratividade de hamster dourado (*Mesocricetus auratus*) infectado com *Leishmania* spp para flebotomíneos (*Diptera:Psychodidae*)", registrada com o Protocolo CEUA/FCF/CAR: 16/2018, sob a responsabilidade da Pesquisadora Flávia Benini da Rocha Silva, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP em reunião de 24 de outubro de 2018.

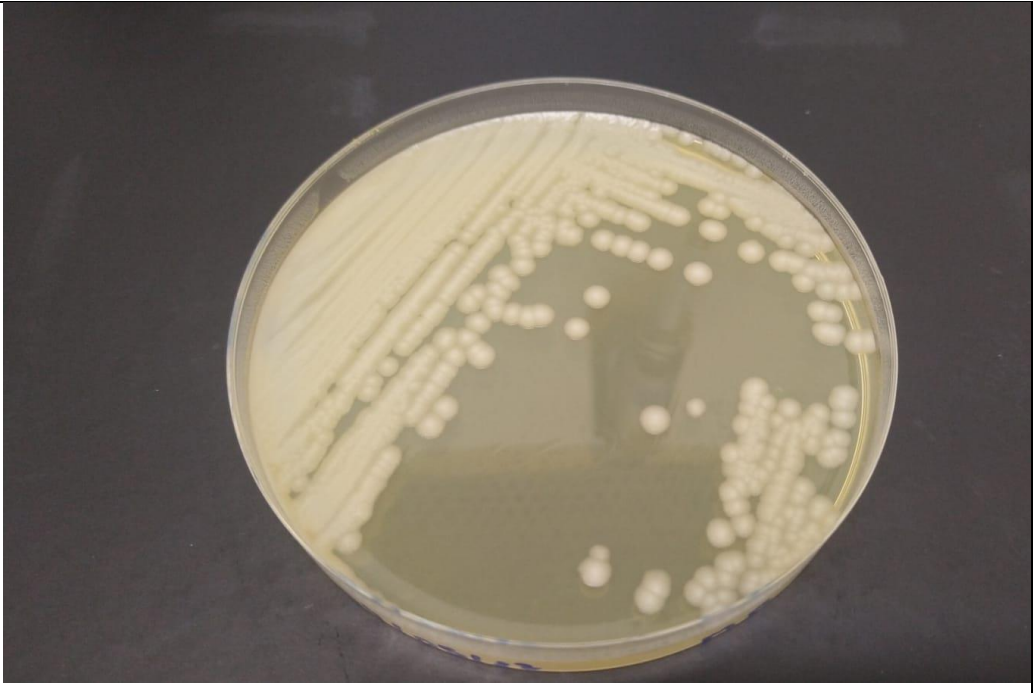
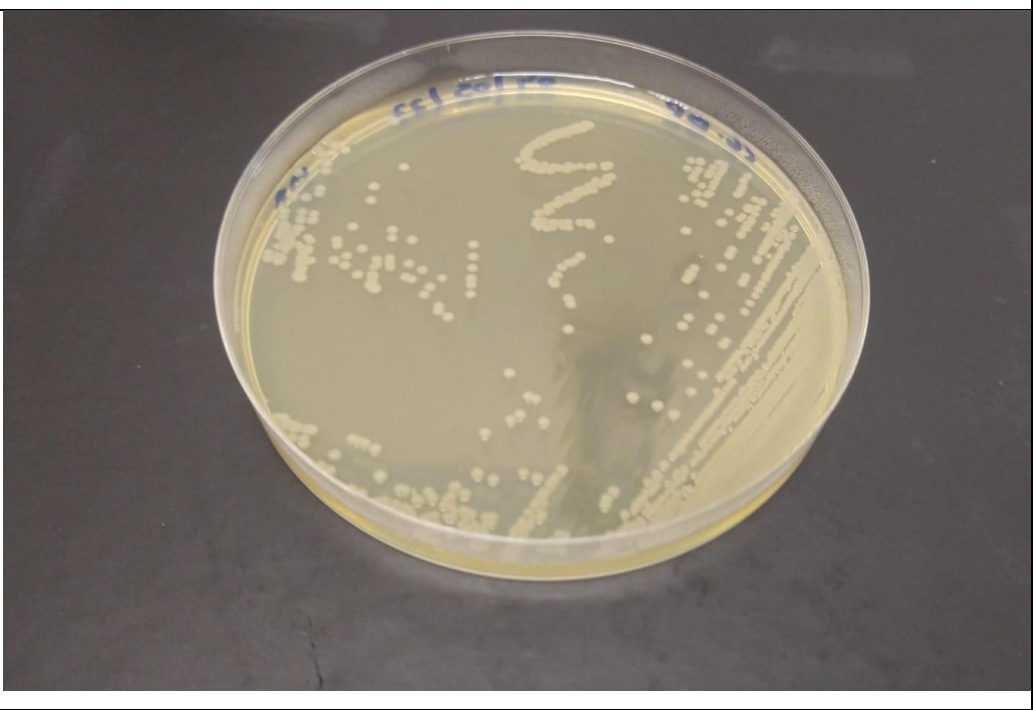
Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Agosto de 2020
Espécie/linhagem/raça	hamster dourado
Nº de animais	23
Idade/Peso	4 semanas 140 g
Sexo	feminino
Origem	ANILAB – Animais de Laboratório Criação e Comércio Ltda – EPP

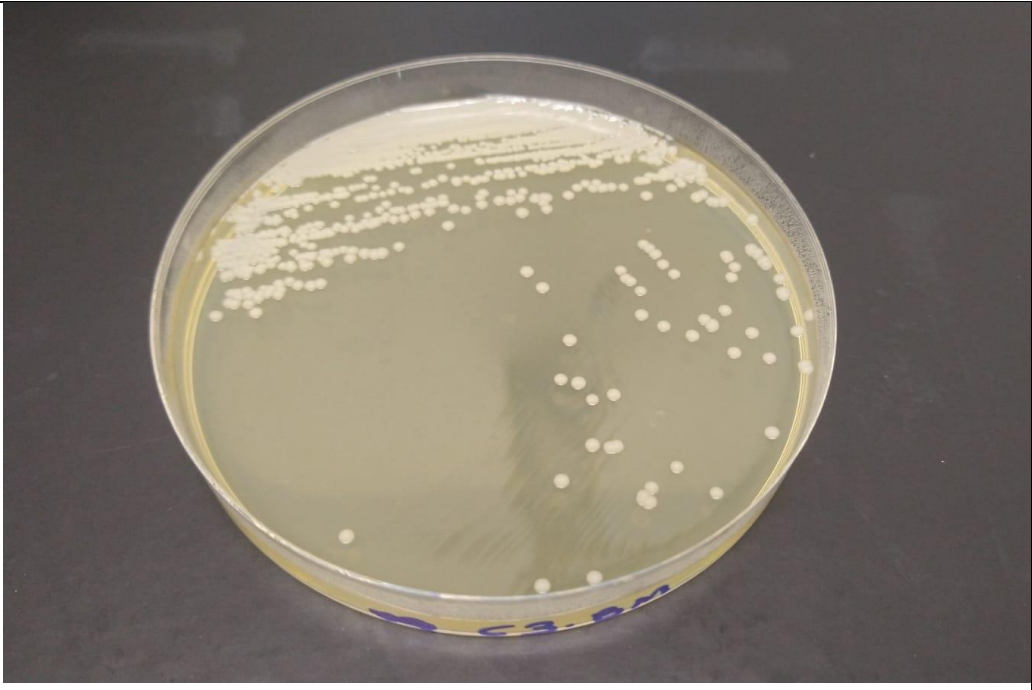
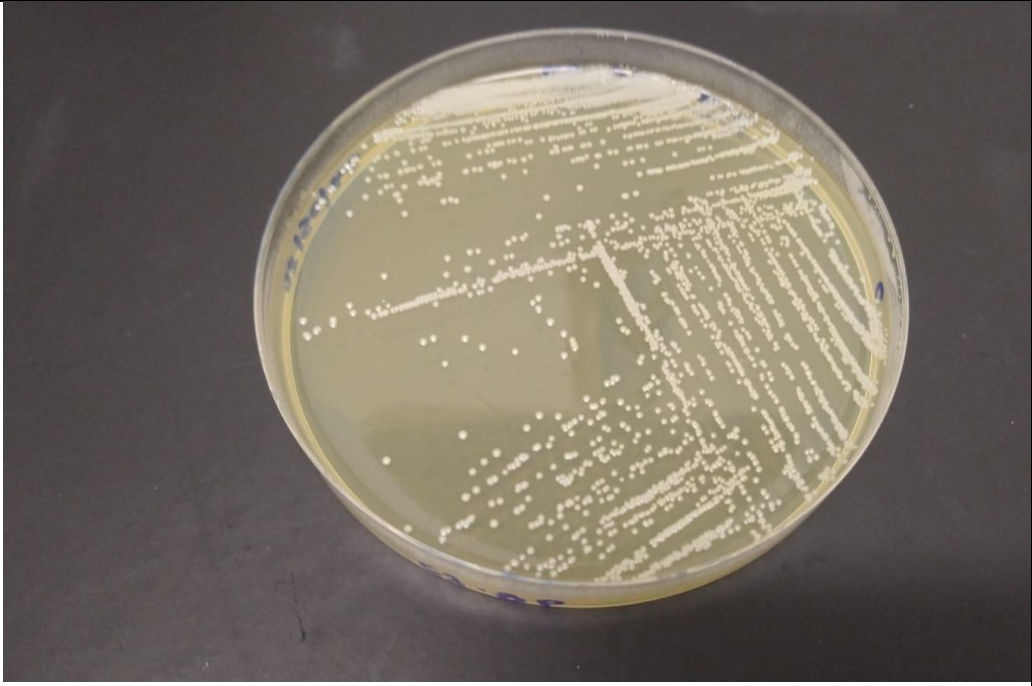
Araraquara, 24 de outubro de 2018.

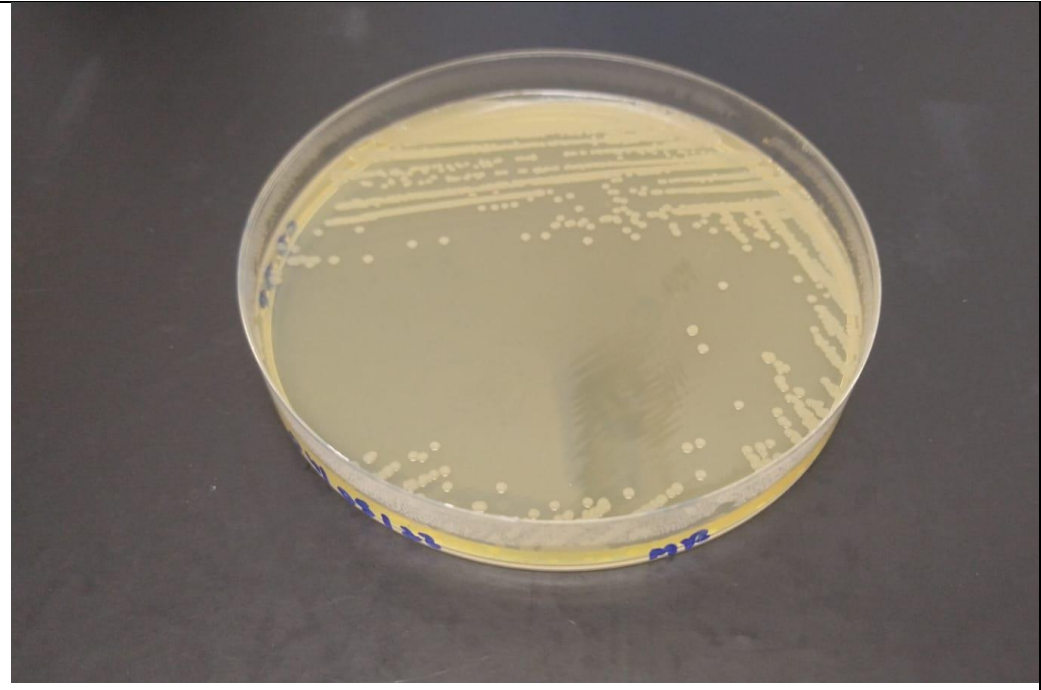
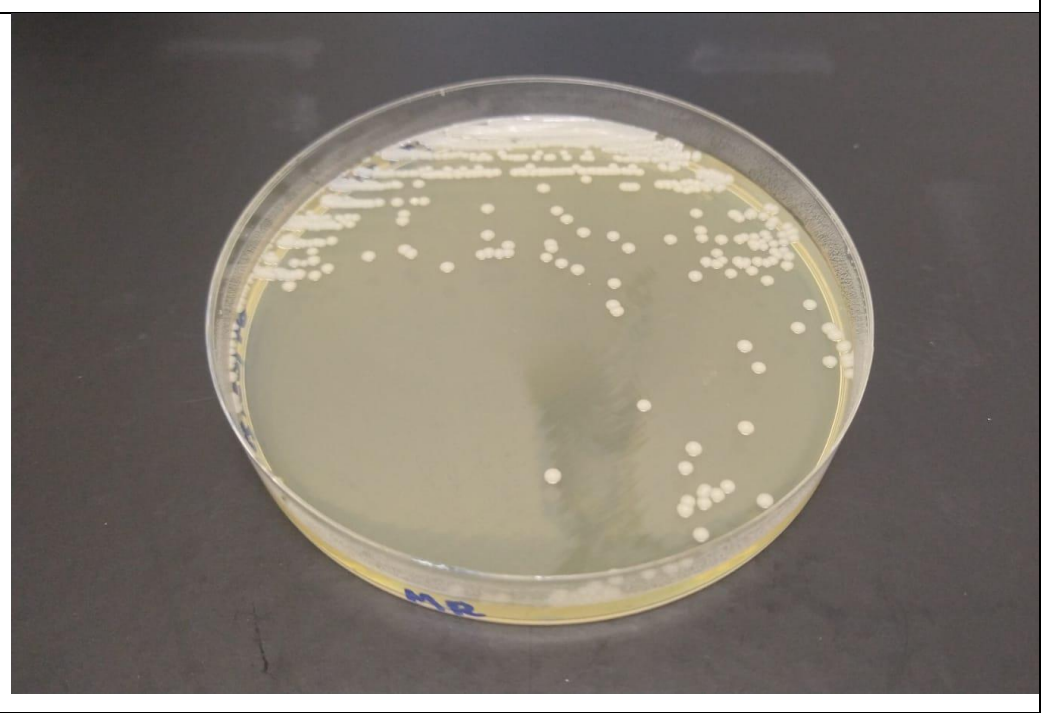
Profa. Dra. CARLA RAQUEL FONTANA
Coordenadora da CEUA

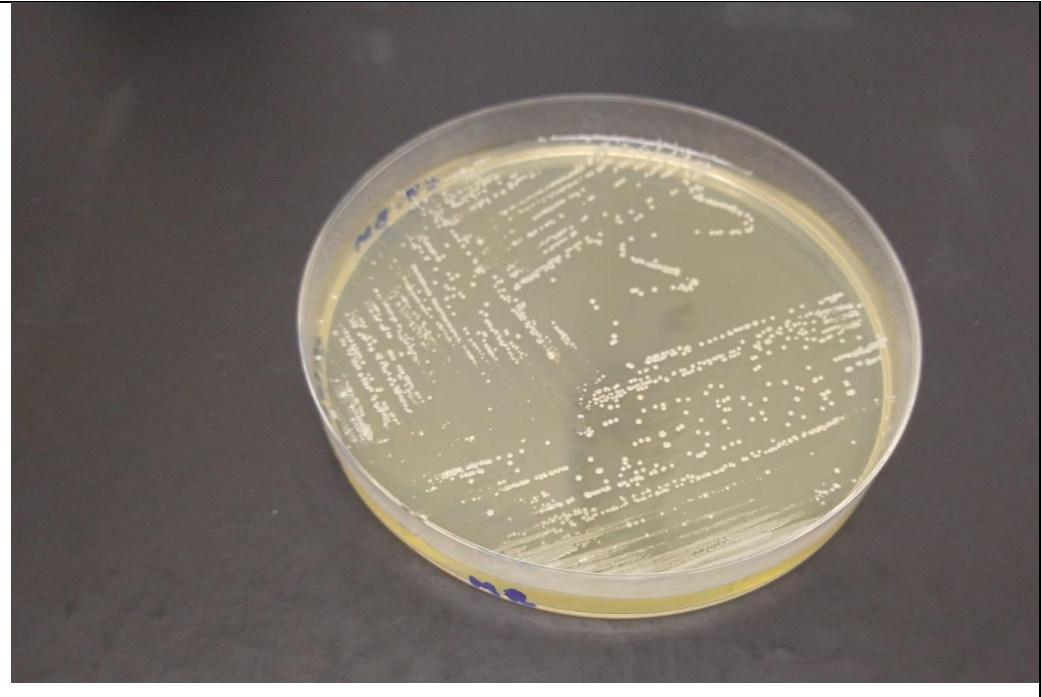
APÊNDICE B – Placas com isolados bacterianos recuperados para Sequenciamento Sanger. Legenda: Os números de 1 a 6 se referem a qual animal foi realizada a amostra; PC: o isolado bacteriano foi obtido da pata esquerda do animal antes da região ser infectada; PI: Isolado bacteriano retirado da pata esquerda do animal infectado apresentando úlcera; PNI: Isolado bacteriano retirado da pata direita do animal, pata na qual não há sítio de infecção estabelecido.

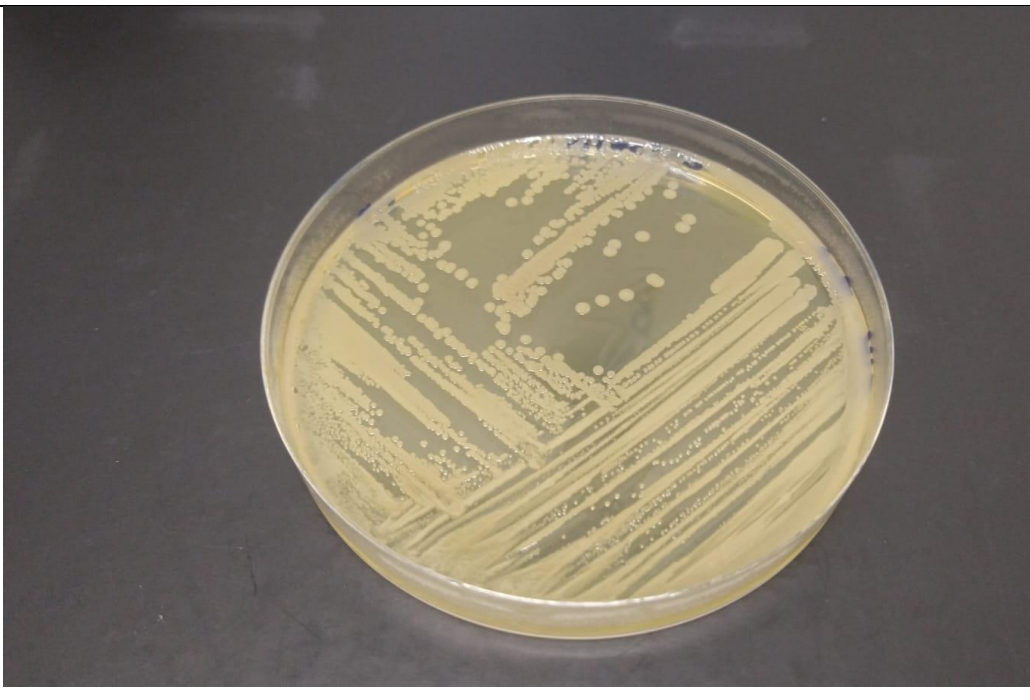
Amostra	Condição	Imagem do material amostrado
1	PC	

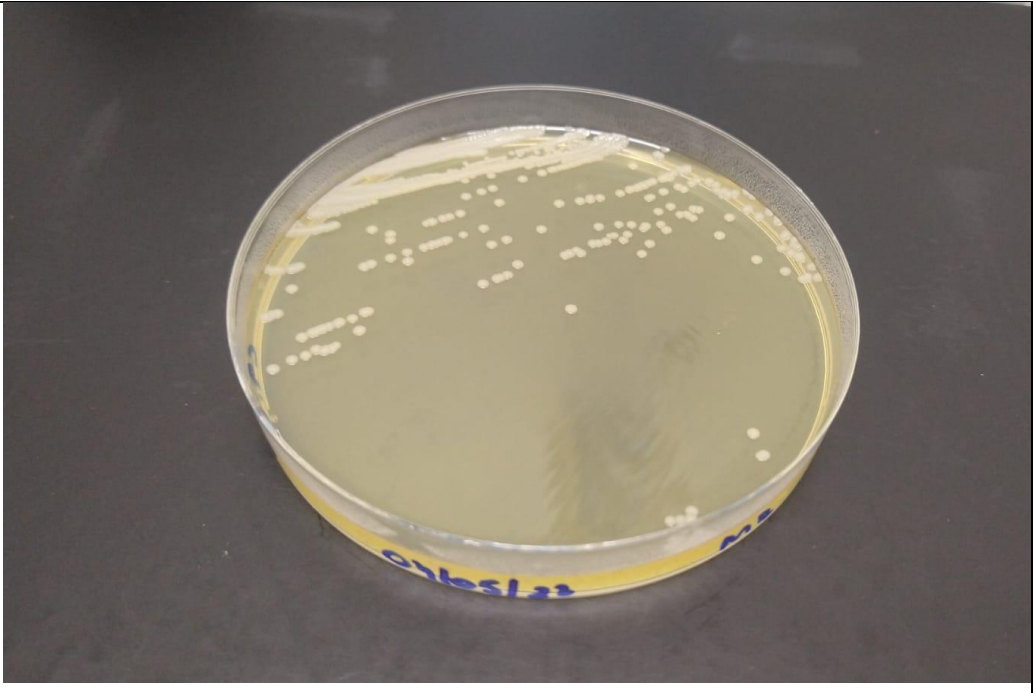
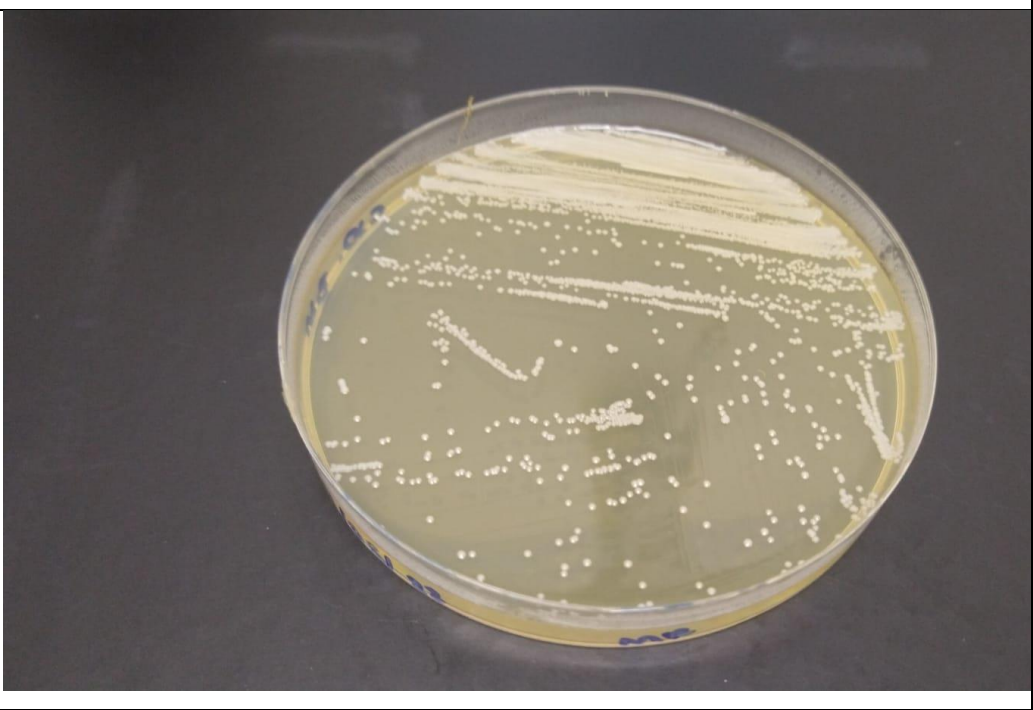
1	PC	
1	PI	

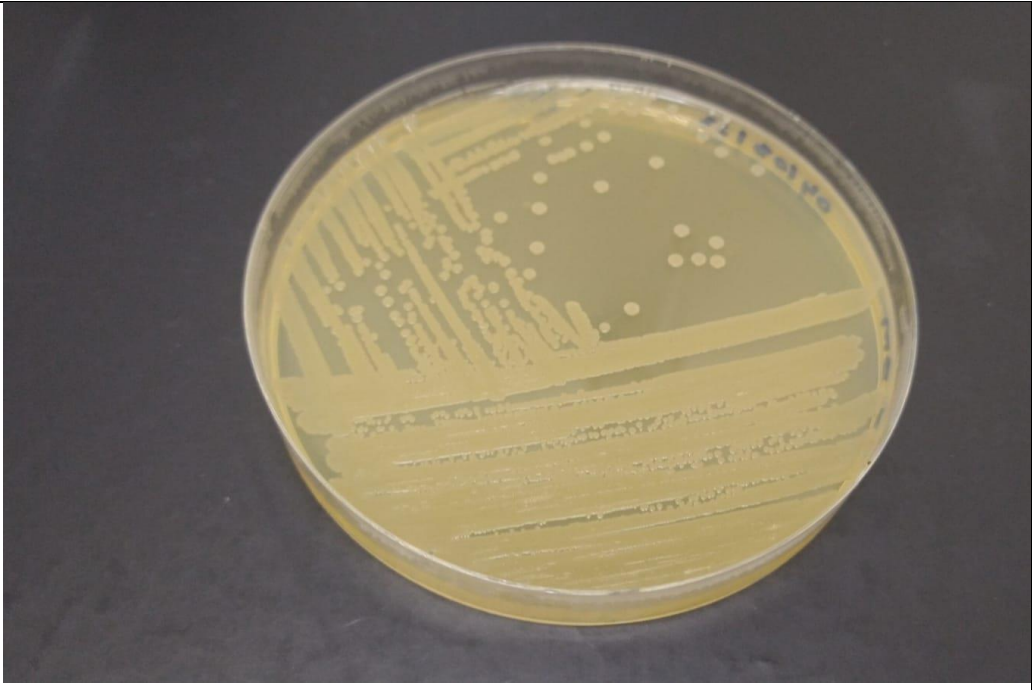
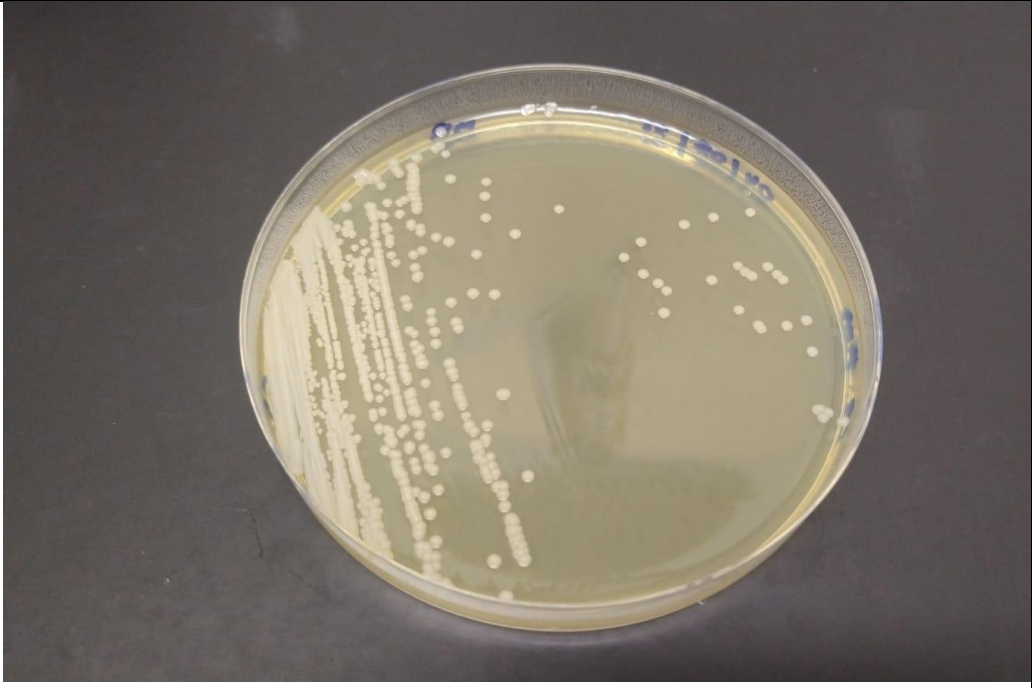
1	PNI	
2	PC	

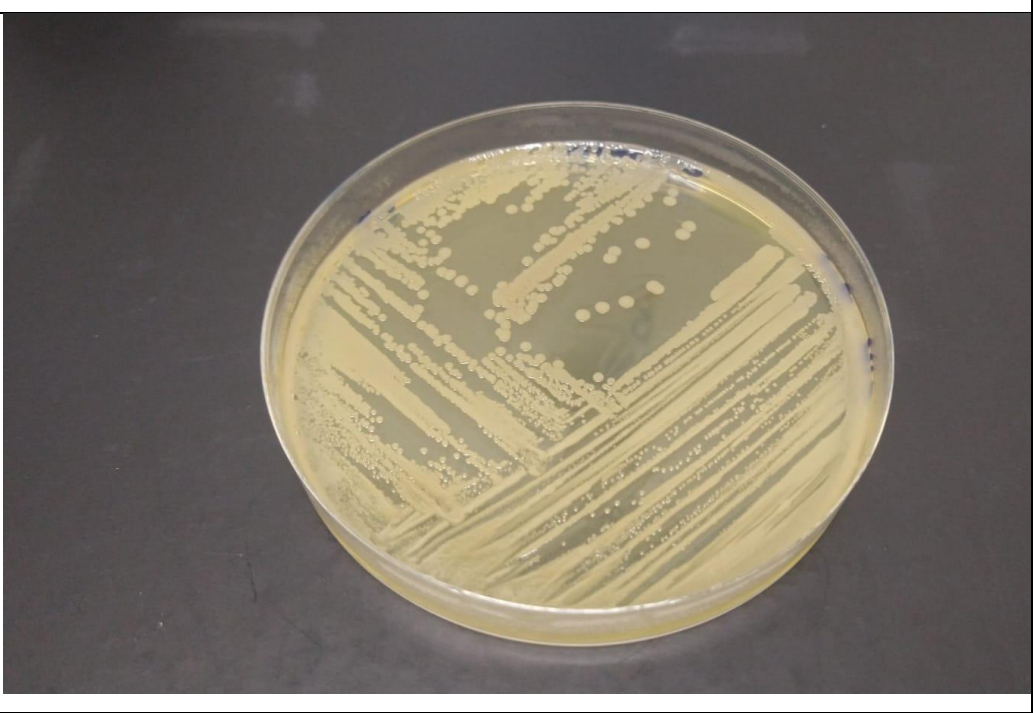
2	PI	
3	PNI	

3	PC	
3	PI	

3	PNI	 A petri dish containing a yellow agar medium. The surface is covered with numerous small, white, pinpoint-sized bacterial colonies. Some colonies are arranged in streaks, while others are more isolated. The petri dish has some blue markings on its rim.
4	PC	 A petri dish containing a yellow agar medium. The surface shows bacterial growth in the form of numerous small, white, pinpoint-sized colonies. There are also some larger, more confluent areas of growth, particularly towards the bottom of the dish. The petri dish has some blue markings on its rim.

4	PI	
4	PNI	

5	PC	
5	Pla	

5	Plb	
5	PNI a	

5	PNI b	 A petri dish containing a yellowish agar medium. Numerous small, white, circular bacterial colonies are visible, distributed across the surface in a somewhat streaked pattern. The colonies appear to be of uniform size and shape.
6	Pla	 A petri dish containing a yellowish agar medium. Numerous small, white, circular bacterial colonies are visible, distributed across the surface in a somewhat streaked pattern. The colonies appear to be of uniform size and shape.

APÊNDICE C – Porcentagens apresentando grau de similaridade dos compostos identificados acompanhadas das estruturas moleculares e comparação entre o cromatograma gerado a partir dos espectros de massas compondo os compostos das amostras das bactérias retiradas de hamsters (superior) com as bibliotecas utilizadas (inferior).

2,4-dimetilheptano – 81%

Hit#	Similar	Regis	Compound Name	Mol Wt	Formula	Library
1	81	☒	Heptane, 2,4-dimethyl- \$\$ 2,4-Dimethylheptane	128	C ₉ H ₂₀	NIST08.LIB
2	80	☐	Octane	114	C ₈ H ₁₈	NIST21.LIB
3	80	☐	OCTANE \$\$	114	C ₈ H ₁₈	WILEY229.LI
4	80	☐	Heptane, 2,4-dimethyl-	128	C ₉ H ₂₀	NIST21.LIB
5	80	☐	Heptane, 2,4-dimethyl- \$\$ 2,4-Dimethylheptane	128	C ₉ H ₂₀	NIST08s.LIB
6	79	☐	Octane (CAS) n-Octane \$\$ Octane (DOT) \$\$\$	114	C ₈ H ₁₈	WILEY229.LI

Target:

1 : 128 : Heptane, 2,4-dimethyl- \$\$ 2,4-Dimethylheptane \$\$

2,2,4,4,6,6-hexametil- 1,3,5,2,4,6-trioxatrisilinano – 76%

Hit#	Similar	Regis	Compound Name	Mol Wt	Formula	Library
1	76	☒	Trisiloxane, 1,1,1,5,5,5-hexamethyl-3,3-bis(trim	384	C ₁₂ H ₃₆ O ₄ Si ₃	NIST08.LIB
2	76	☐	Trisiloxane, 1,1,1,5,5,5-hexamethyl-3,3-bis(trim	384	C ₁₂ H ₃₆ O ₄ Si ₃	NIST107.LIB
3	75	☐	Trisiloxane, 1,1,1,5,5,5-hexamethyl-3,3-bis(trim	384	C ₁₂ H ₃₆ O ₄ Si ₃	WILEY229.LI
4	74	☐	SILICATE ANION TETRAMER \$\$	888	C ₂₄ H ₇₂ O ₁₂	WILEY229.LI
5	73	☐	1,1,1,3,5,5,7,7-Nonamethyl-3-(trimethylsiloxy)l	384	C ₁₂ H ₃₆ O ₄ Si ₃	NIST107.LIB
6	73	☐	1,1,1,3,5,5,7,7-Nonamethyl-3-(trimethylsiloxy)l	384	C ₁₂ H ₃₆ O ₄ Si ₃	NIST08.LIB

Target:

1 : 384 : Trisiloxane, 1,1,1,5,5,5-hexamethyl-3,3-bis(trimethylsiloxy)- \$\$ Tetrakis(trimethylsiloxy)silane \$\$ Trisiloxane, 1,1,1,5,5,5-hexamethyl-

Ciclooctatetraeno – 92%

Hit#	Similar	Regis	Compound Name	Mol Wt	Formula	Library
1	92	☒	1,3,5,7-Cyclooctatetraene (CAS) Cyclooctatetr	104	C8 H8	WILEY229.LI
2	92	☐	1,3,5,7-Cyclooctatetraene	104	C8H8	NIST21.LIB
3	92	☐	1,3,5,7-Cyclooctatetraene \$\$ [8]Annulene \$\$ C	104	C8H8	NIST08s.LIB
4	91	☐	Styrene \$\$ Benzene, ethenyl- (CAS) ETHENYL	104	C8 H8	WILEY229.LI
5	90	☐	Styrene	104	C8H8	NIST21.LIB
6	89	☐	Styrene \$\$ Benzene, ethenyl- \$\$ Bulstren K-52	104	C8H8	NIST08.LIB

Target:

1 : 104 : 1,3,5,7-Cyclooctatetraene (CAS) Cyclooctatetraene \$\$ [8]Annulene \$\$

Fenol – 93%

Hit#	Similar	Regis	Compound Name	Mol Wt	Formula	Library
1	93	☒	Phenol, 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methyl- (CA	220	C15 H24 O	WILEY229.LI
2	91	☐	Phenol, 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methyl- (CA	220	C15 H24 O	WILEY229.LI
3	91	☐	Butylated Hydroxytoluene \$\$ Phenol, 2,6-bis(1,	220	C15H24O	NIST107.LIB
4	91	☐	Butylated Hydroxytoluene \$\$ Phenol, 2,6-bis(1,	220	C15H24O	NIST08.LIB
5	89	☐	Phenol, 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methyl- (CA	220	C15 H24 O	WILEY229.LI
6	89	☐	Butylated Hydroxytoluene \$\$ Phenol, 2,6-bis(1,	220	C15H24O	NIST08s.LIB

Target:

1 : 220 : Phenol, 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methyl- (CAS) 4-Methyl-2,6-di-tert-butylphenol \$\$ BHT \$\$ P 21 \$\$ CAO 3 \$\$ AO 29 \$\$ CAO 1 \$\$ AO 4K \$\$ DBPC \$\$ F

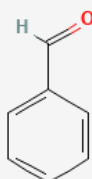
2,5-dimetilpirazina – 97%

Hit#	Similar	Regis	Compound Name	Mol Wt	Formula	Library
1	97	☒	Pyrazine, 2,5-dimethyl- \$\$ 2,5-Dimethylpyrazine	108	C6H8N2	NIST08.LIB
2	95	☐	Pyrazine, 2,5-dimethyl-	108	C6H8N2	NIST21.LIB
3	95	☐	Pyrazine, 2,5-dimethyl- \$\$ 2,5-Dimethylpyrazine	108	C6H8N2	NIST08s.LIB
4	95	☐	Pyrazine, 2,5-dimethyl- (CAS) 2,5-Dimethylpyraz	108	C6 H8 N2	WILEY229.LI
5	94	☐	Pyrazine, 2,5-dimethyl- (CAS) 2,5-Dimethylpyraz	108	C6 H8 N2	WILEY229.LI
6	93	☐	Pyrazine, 2,5-dimethyl- (CAS) 2,5-Dimethylbraz	108	C6 H8 N2	WILEY229.LI

Target:

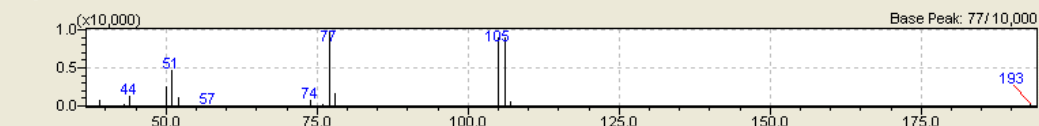
1 : 108 : Pyrazine, 2,5-dimethyl- \$\$ 2,5-Dimethylpyrazine \$\$ 2,5-Dimethyl pyrazine \$\$

Benzaldeido – 95%

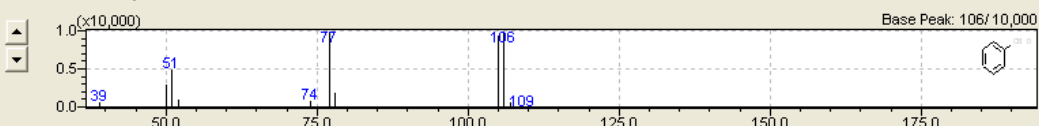


Hit#	Similar	Regis	Compound Name	Mol Wt	Formula	Library
1	95	☒	benzaldehyde \$\$	106	C7 H6 O	WILEY229.LI
2	94	☐	N-benzylidene-dimethylammonium chloride \$\$	169	C9 H12 CL N	WILEY229.LI
3	94	☐	Benzaldehyde \$\$	106	C7 H6 O	WILEY229.LI
4	94	☐	Benzaldehyde \$\$ Artificial Almond Oil \$\$ Benza	106	C7H6O	NIST08.LIB
5	94	☐	Benzaldehyde	106	C7H6O	NIST21.LIB
6	94	☐	Benzaldehyde (CAS) Phenylmethanal \$\$ Benz	106	C7 H6 O	WILEY229.LI

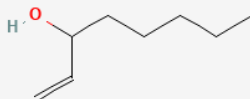
Target:



1 : 106 : benzaldehyde \$\$

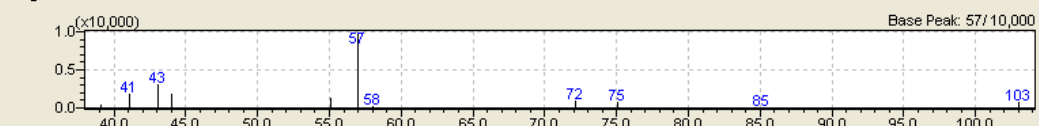


Oct-1-en-3-ol – 88%

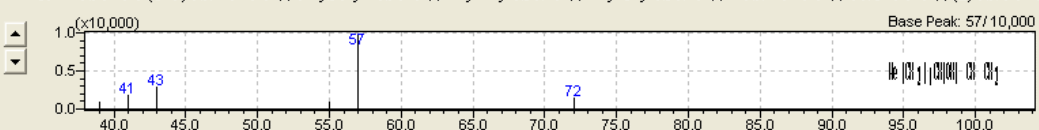
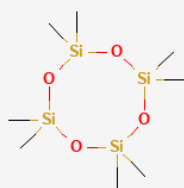


Hit#	Similar	Regis	Compound Name	Mol Wt	Formula	Library
1	88	☒	1-Octen-3-ol (CAS) Oct-1-en-3-ol \$\$ 3-Hydroxy-	128	C8 H16 O	WILEY229.LI
2	85	☐	Hexanal, 2,2-dimethyl- (CAS) 2,2-Dimethylhexa	128	C8 H16 O	WILEY229.LI
3	85	☐	Hexanal, 2,2-dimethyl- \$\$ 2,2-Dimethyl-n-hexan	128	C8H16O	NIST107.LIB
4	85	☐	Hexanal, 2,2-dimethyl- \$\$ 2,2-Dimethyl-n-hexan	128	C8H16O	NIST08.LIB
5	84	☐	di-tert-Butyl dicarbonate \$\$ di-t-Butyl dicarbonat	218	C10H18O5	NIST08s.LIB
6	84	☐	di-tert-Butyl dicarbonate \$\$ di-t-Butyl dicarbonat	218	C10H18O5	NIST107.LIB

Target:

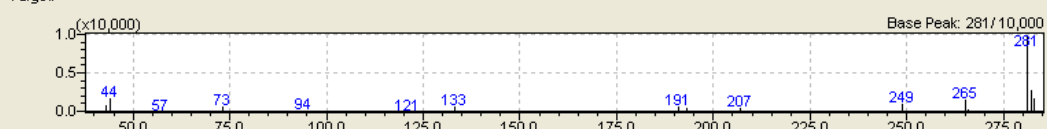


1 : 128 : 1-Octen-3-ol (CAS) Oct-1-en-3-ol \$\$ 3-Hydroxy-1-octene \$\$ Amyl vinyl carbinol \$\$ Vinyl amyl carbinol \$\$ n-Oct-1-en-3-ol \$\$ Octan-3-one \$\$ (Z)-Oct-5-en-3

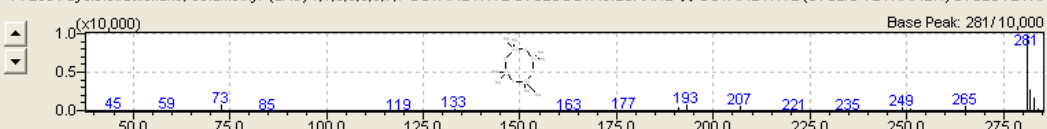
2,2,4,4,6,6,8,8-octametil-
1,3,5,7,2,4,6,8-
tetraoxatetrasilocano – 87%

Hit#	Similar	Regis	Compound Name	Mol Wt	Formula	Library
1	87	☒	Cyclotetrasiloxane, octamethyl- (CAS) 1,1,3,3,5	296	C8 H24 O4 Si	WILEY229.LI
2	86	☐	Cyclotetrasiloxane, octamethyl-	296	C8H24O4Si4	NIST21.LIB
3	85	☐	Cyclotetrasiloxane, octamethyl- \$\$ Oktamethylc	296	C8H24O4Si4	NIST08s.LIB
4	85	☐	Cyclotetrasiloxane, octamethyl- (CAS) 1,1,3,3,5	296	C8 H24 O4 Si	WILEY229.LI
5	84	☐	Cyclotetrasiloxane, octamethyl- (CAS) 1,1,3,3,5	296	C8 H24 O4 Si	WILEY229.LI
6	83	☐	Cyclotetrasiloxane, octamethyl-	296	C8H24O4Si4	NIST21.LIB

Target:

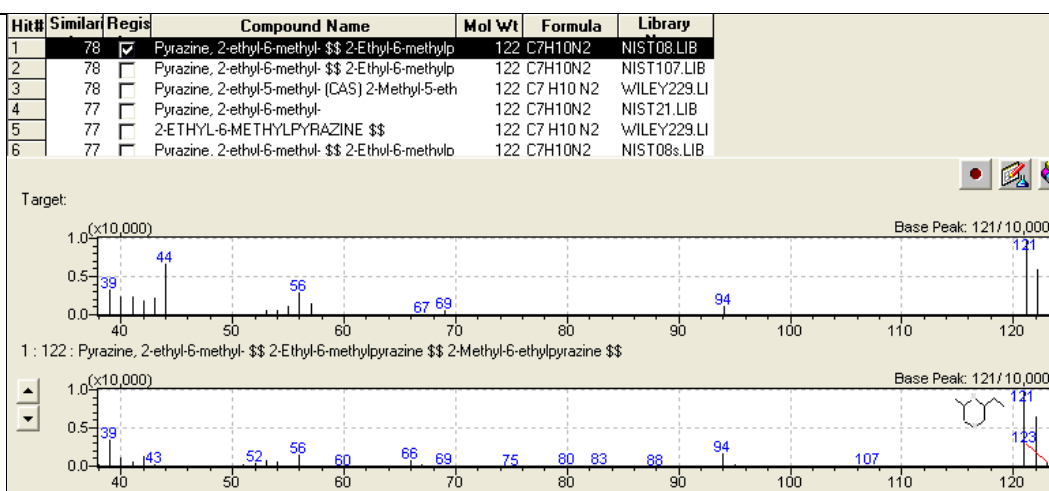
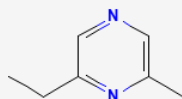


1 : 296 : Cyclotetrasiloxane, octamethyl- (CAS) 1,1,3,3,5,5,7,7-OCTAMETHYL-CYCLOOCTASILOXANE \$\$ OCTAMETHYL-(CYCLIC TETRAMER) CYCLOTETRA



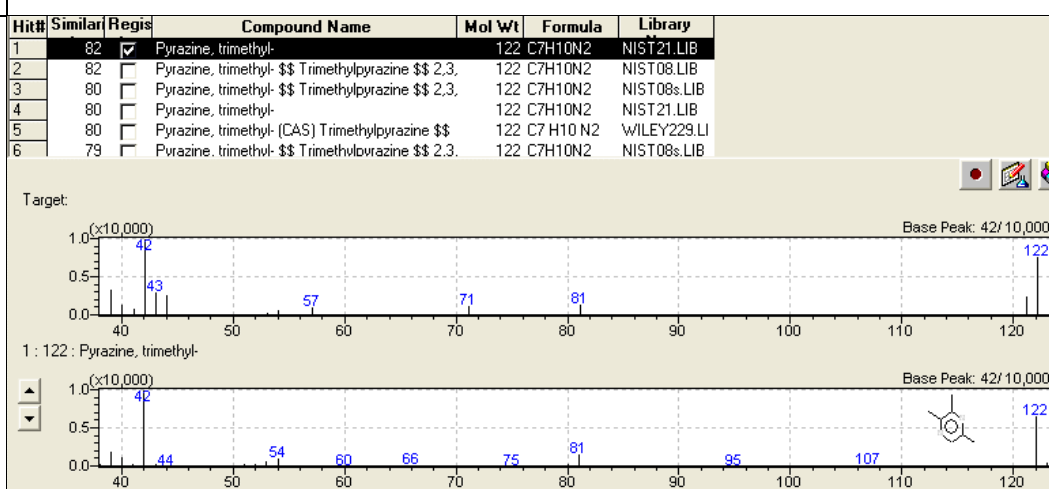
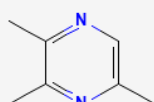
9

2-etil-6-metilpirazina – 78%



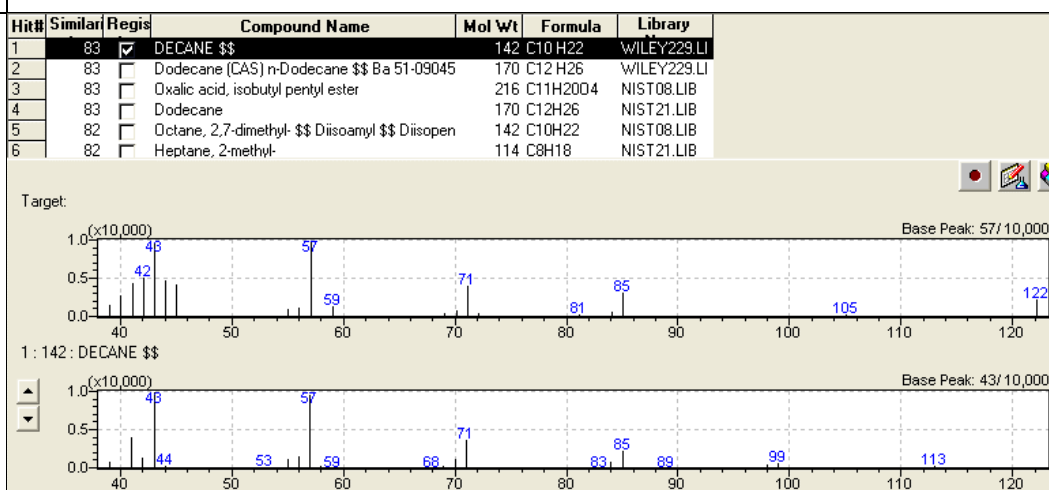
10

2,3,5-trimetilpirazina – 82%



11

Decano – 83%

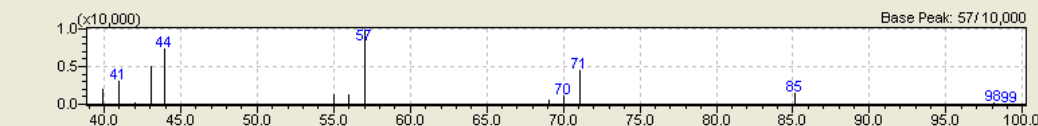


2,2,3,4-tetrametilpentano –
86%

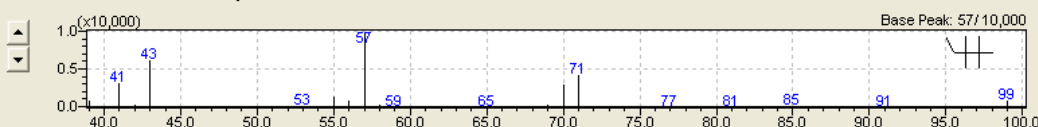


Hit#	Similar	Regis	Compound Name	Mol Wt	Formula	Library
1	86	☒	Pentane, 2,2,3,3-tetramethyl-	128	C ₉ H ₂₀	NIST21.LIB
2	86	☐	Pentane, 2,2,3,3-tetramethyl- \$\$ 2,2,3,3-Tetra	128	C ₉ H ₂₀	NIST08s.LIB
3	86	☐	Undecane	156	C ₁₁ H ₂₄	NIST21.LIB
4	86	☐	Undecane \$\$ n-Undecane \$\$ Hendecane \$\$	156	C ₁₁ H ₂₄	NIST08s.LIB
5	86	☐	Decane, 2,5,9-trimethyl- (CAS)	184	C ₁₃ H ₂₈	WILEY229.LI
6	86	☐	Decane, 2,5,9-trimethyl- \$\$	184	C ₁₃ H ₂₈	NIST107.LIB

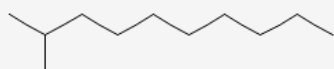
Target:



1 : 128 : Pentane, 2,2,3,3-tetramethyl-

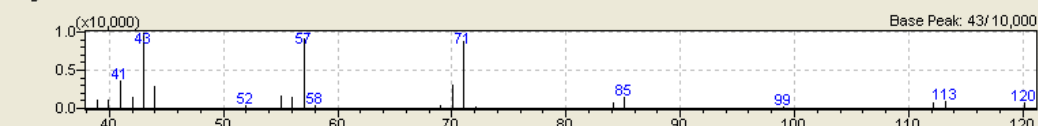


4-metildecano – 92%

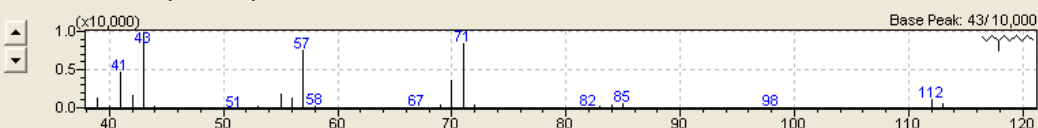


Hit#	Similar	Regis	Compound Name	Mol Wt	Formula	Library
1	92	☒	Decane, 4-methyl- \$\$ 4-Methyldecane \$\$	156	C ₁₁ H ₂₄	NIST08.LIB
2	92	☐	Decane, 4-methyl-	156	C ₁₁ H ₂₄	NIST21.LIB
3	92	☐	Heptane, 5-ethyl-2-methyl- \$\$ 5-Ethyl-2-methylh	142	C ₁₀ H ₂₂	NIST107.LIB
4	92	☐	Heptane, 5-ethyl-2-methyl- (CAS) 2-Methyl-5-et	142	C ₁₀ H ₂₂	WILEY229.LI
5	92	☐	Heptane, 5-ethyl-2-methyl- \$\$ 5-Ethyl-2-methylh	142	C ₁₀ H ₂₂	NIST08.LIB
6	91	☐	Nonane, 2,3-dimethyl- \$\$ 2,3-Dimethylnonane	156	C ₁₁ H ₂₄	NIST08.LIB

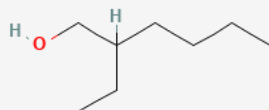
Target:



1 : 156 : Decane, 4-methyl- \$\$ 4-Methyldecane \$\$

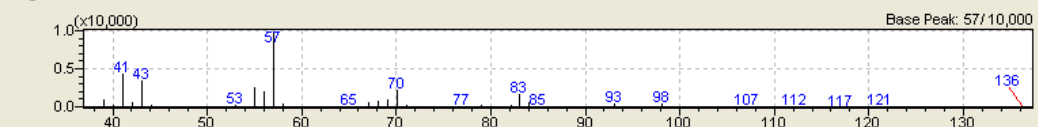


2-etilhexan-1-ol – 94%

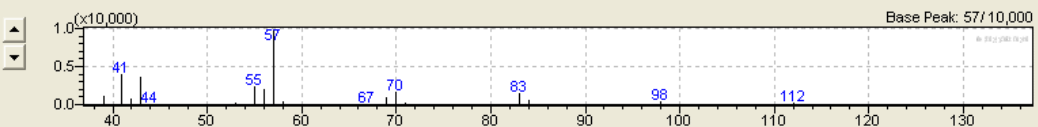


Hit#	Similar	Regis	Compound Name	Mol Wt	Formula	Library
1	94	☒	1-Hexanol, 2-ethyl- (CAS) 2-Ethylhexanol \$\$ 2-	130	C ₈ H ₁₈ O	WILEY229.LI
2	94	☐	1-Hexanol, 2-ethyl- \$\$ Ethylhexanol \$\$ 2-Ethyl-	130	C ₈ H ₁₈ O	NIST107.LIB
3	94	☐	1-Hexanol, 2-ethyl- \$\$ Ethylhexanol \$\$ 2-Ethyl-	130	C ₈ H ₁₈ O	NIST08.LIB
4	92	☐	2-ETHYL-1-HEXANOL \$\$	130	C ₈ H ₁₈ O	WILEY229.LI
5	92	☐	1-Hexanol, 2-ethyl- (CAS) 2-Ethylhexanol \$\$ 2-	130	C ₈ H ₁₈ O	WILEY229.LI
6	92	☐	2-Propyl-1-pentanol \$\$	130	C ₈ H ₁₈ O	NIST107.LIB

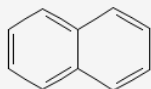
Target:



1 : 130 : 1-Hexanol, 2-ethyl- (CAS) 2-Ethylhexanol \$\$ 2-Ethyl-1-hexanol \$\$ Ethylhexanol \$\$ 2-Ethylhexan-1-ol \$\$ 2-Ethylhexyl alcohol \$\$ 2-Ethylhexanol-1 \$\$

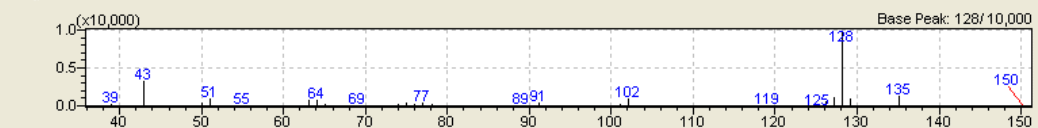


Naftaleno – 87%

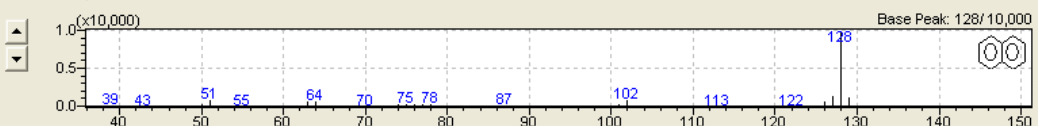


Hit#	Similar	Regis	Compound Name	Mol Wt	Formula	Library
1	87	☒	Naphthalene	128	C ₁₀ H ₈	NIST21.LIB
2	86	☐	Azulene	128	C ₁₀ H ₈	NIST21.LIB
3	86	☐	Azulene (CAS) Cyclopentacycloheptene \$\$ Bic	128	C ₁₀ H ₈	WILEY229.LI
4	85	☐	Naphthalene	128	C ₁₀ H ₈	NIST21.LIB
5	85	☐	Azulene (CAS) Cyclopentacycloheptene \$\$ Bic	128	C ₁₀ H ₈	WILEY229.LI
6	85	☐	Azulene	128	C ₁₀ H ₈	NIST21.LIB

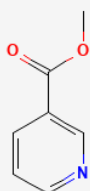
Target:



1 : 128 : Naphthalene

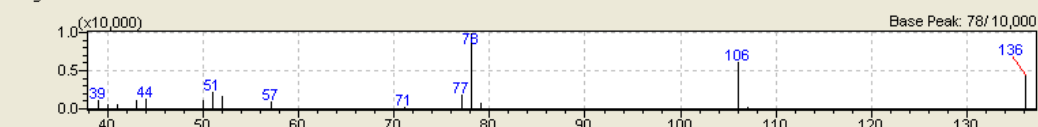


piridina-3-carboxilato de metila – 78%

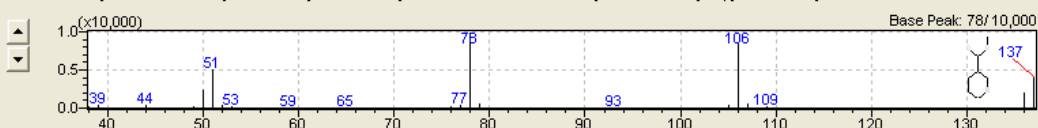


Hit#	Similar	Regis	Compound Name	Mol Wt	Formula	Library
1	78	☒	Methyl nicotinate \$\$ 3-Pyridinecarboxylic acid, methyl ester	137	C ₇ H ₇ N ₂ O ₂	NIST08s.LIB
2	78	☐	2,4,6-Cycloheptatrien-1-one \$\$ Cycloheptatrien	106	C ₇ H ₆ O	NIST107.LIB
3	78	☐	2,4,6-Cycloheptatrien-1-one \$\$ Tropone \$\$ Cy	106	C ₇ H ₆ O	NIST08.LIB
4	77	☐	3-Pyridinecarboxamide, N-methyl- \$\$ Nicotinam	136	C ₇ H ₈ N ₂ O	NIST08.LIB
5	76	☐	3-Pyridinecarboxamide, N-methyl- \$\$ Nicotinam	136	C ₇ H ₈ N ₂ O	NIST08s.LIB
6	76	☐	1-Propanone, 1-(3-pyridinyl)- \$\$ 1-Propanone, 1	135	C ₈ H ₉ N ₂ O	NIST08.LIB

Target:



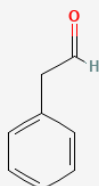
1 : 137 : Methyl nicotinate \$\$ 3-Pyridinecarboxylic acid, methyl ester \$\$ Nicotinic acid, methyl ester \$\$ Methyl 3-pyridinecarboxylate \$\$ Nicometh \$\$ 3-Carbometh



CAS#: 93 - 60 - 7 Mol Wt: 137 Serial#: 6507

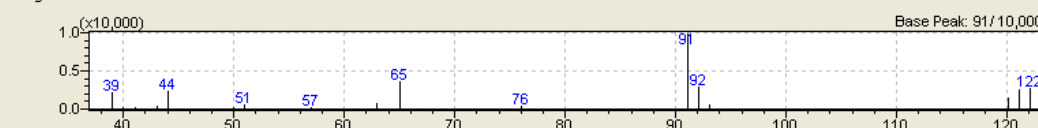
Cmpd Name: Methyl nicotinate \$\$ 3-Pyridinecarboxylic acid, methyl ester \$\$ Nicotinic acid, methyl ester \$\$ Methyl 3-pyridinecarboxylate \$\$ Nicometh \$\$ 3-Car

Fenilacetaldéido – 85%

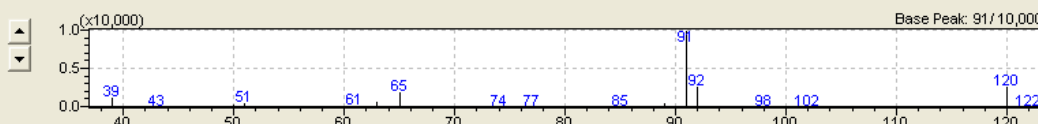


Hit#	Similar	Regis	Compound Name	Mol Wt	Formula	Library
1	85	☒	PHENYLACETALDEHYDE \$\$	120	C ₈ H ₈ O	WILEY229.LI
2	85	☐	Benzeneacetaldehyde	120	C ₈ H ₈ O	NIST21.LIB
3	84	☐	Benzeneacetaldehyde	120	C ₈ H ₈ O	NIST21.LIB
4	84	☐	PHENYL ACETALDEHYDE \$\$	120	C ₈ H ₈ O	WILEY229.LI
5	84	☐	Benzeneacetaldehyde (CAS) Hyacinthin \$\$ Ph	120	C ₈ H ₈ O	WILEY229.LI
6	84	☐	Benzeneacetaldehyde \$\$ Acetaldehyde, phen	120	C ₈ H ₈ O	NIST08.LIB

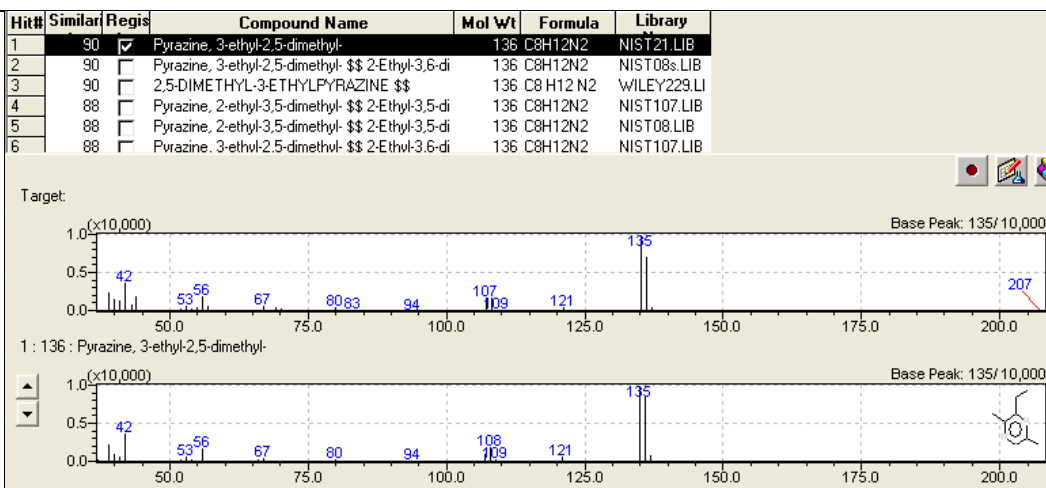
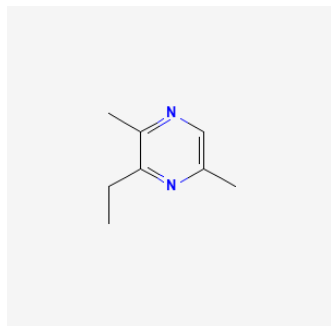
Target:



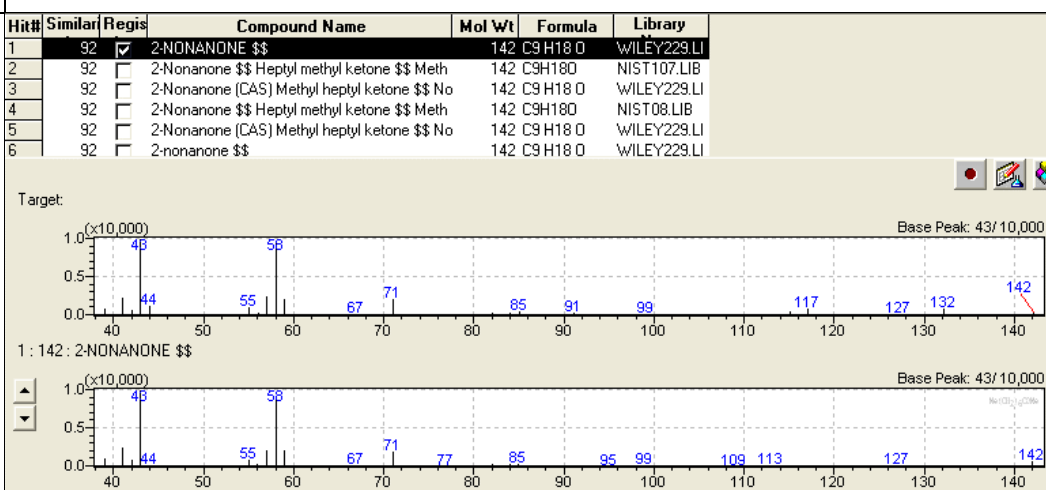
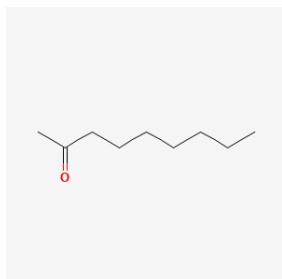
1 : 120 : PHENYLACETALDEHYDE \$\$



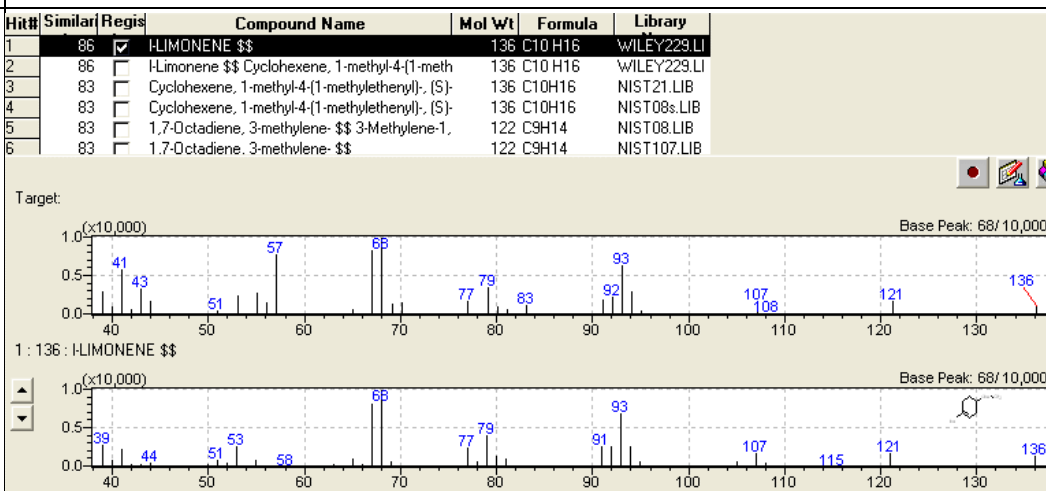
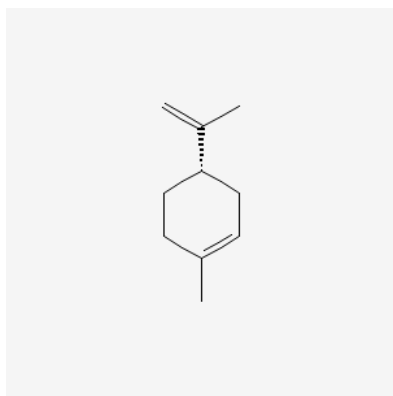
3-etil-2,5-dimetilpirazina –
90%



nonan-2-ona – 92%

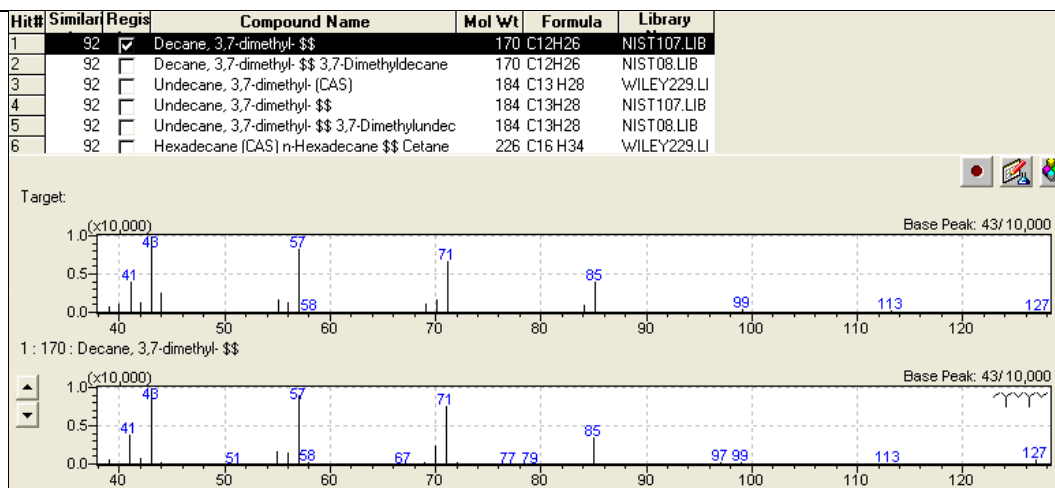
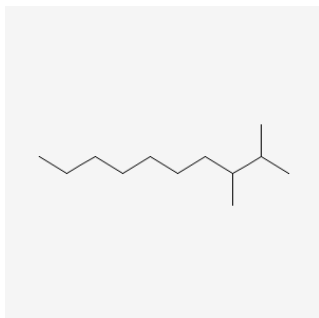


(4S)-1-metil-4-prop-1-en-2-ilciclohexano – 86%



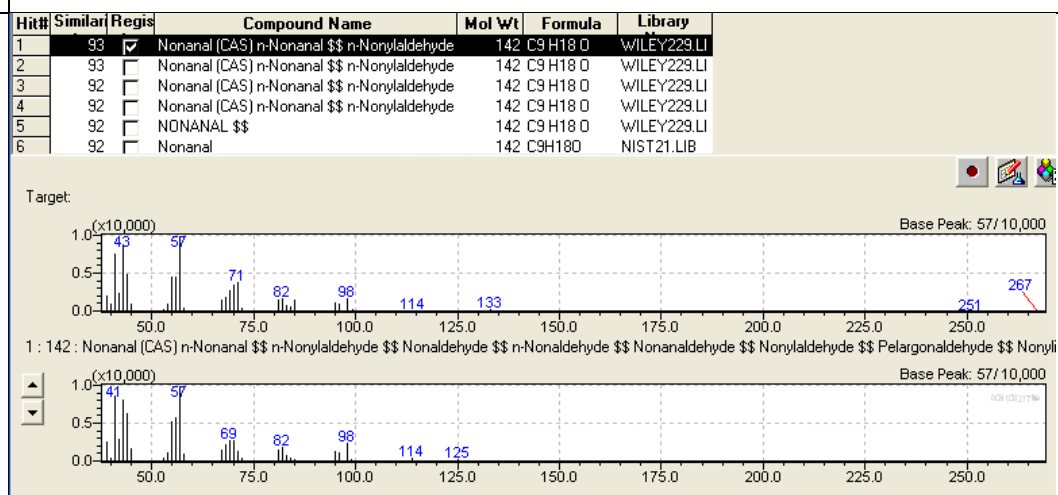
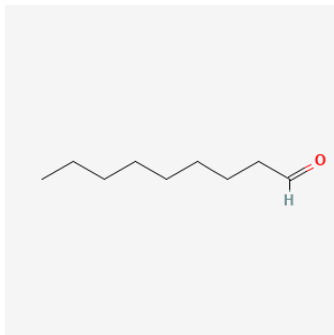
21

3,7-dimetildecano – 92%



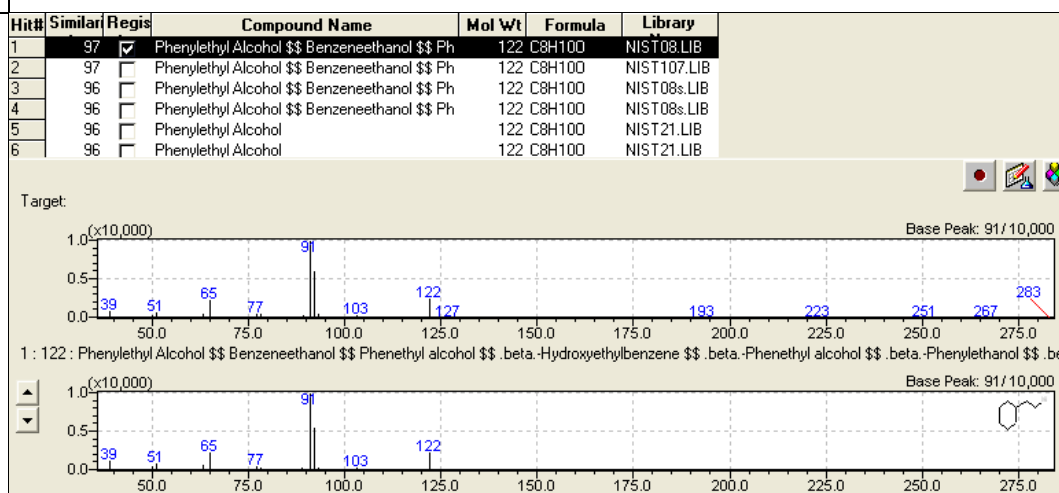
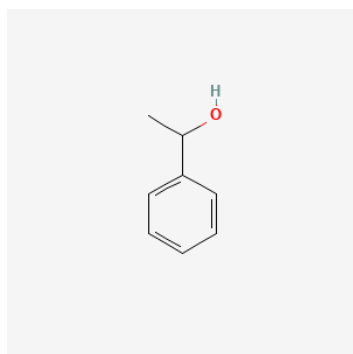
22

Nonanal – 93%



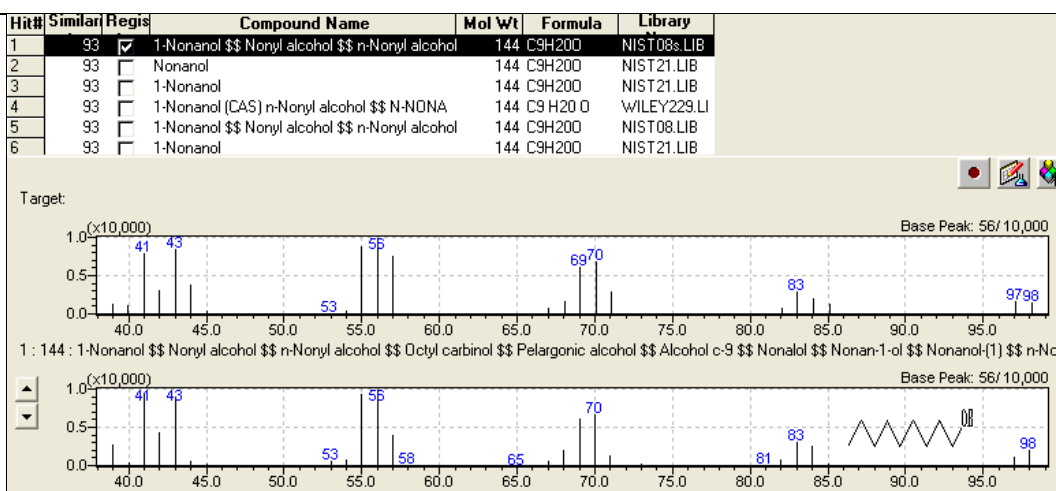
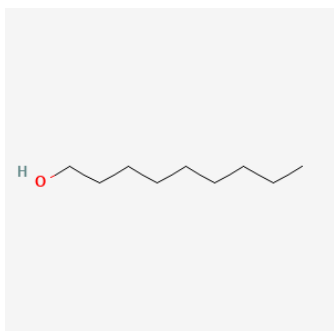
23

2-feniletan-1-ol – 97%



24

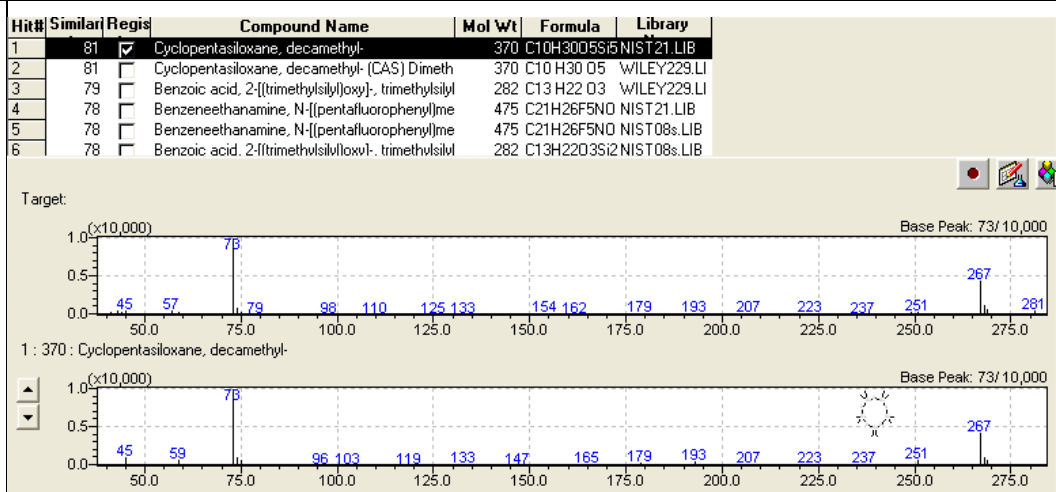
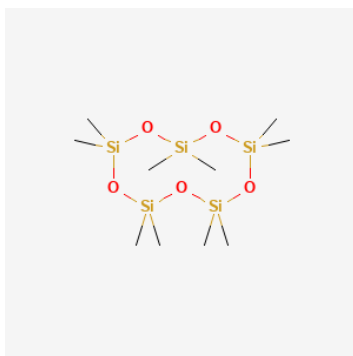
Nonan-2-ol – 93%



25

2,2,4,4,6,6,8,8,10,10-
decametil-

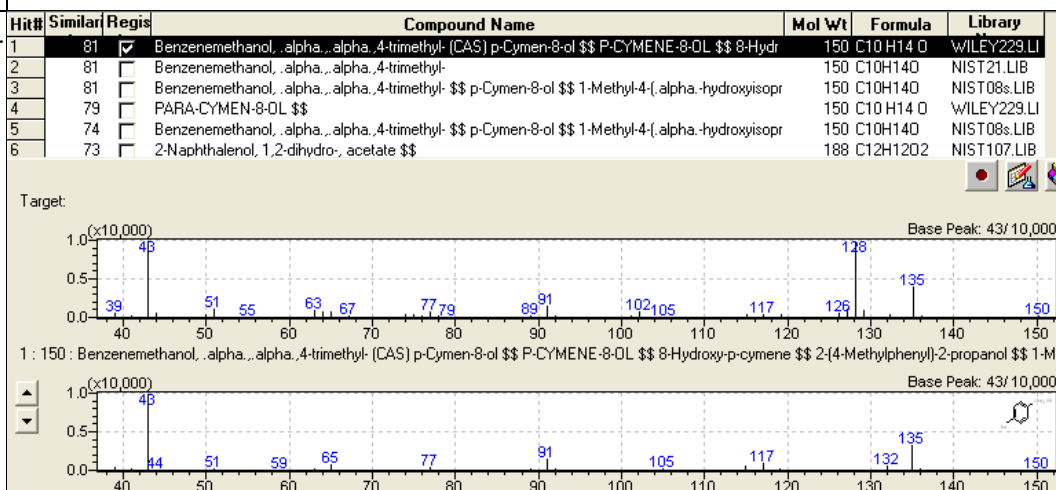
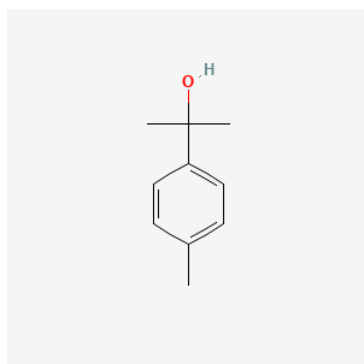
1,3,5,7,9,2,4,6,8,10- – 81%



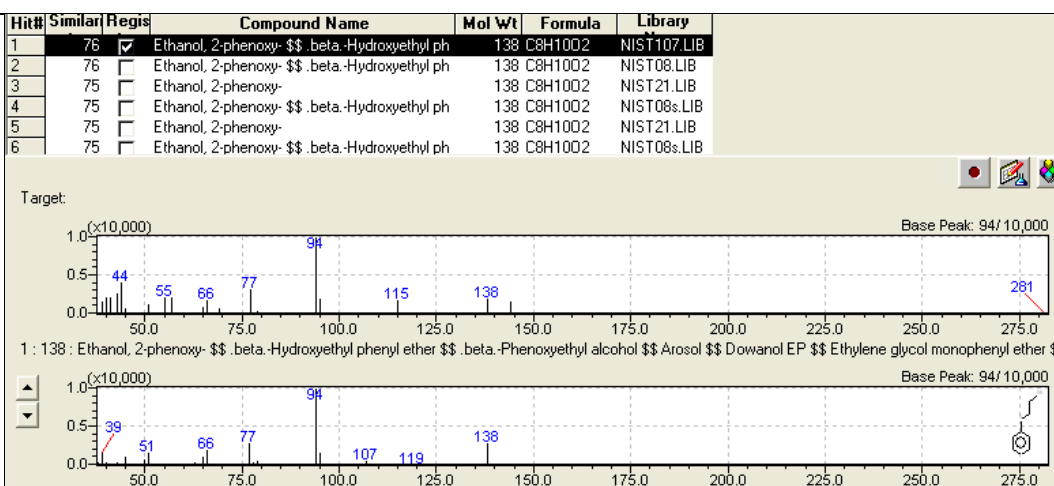
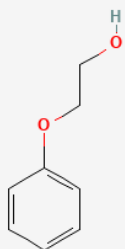
26

2-(4-metil-fenil) propan-2-ol –

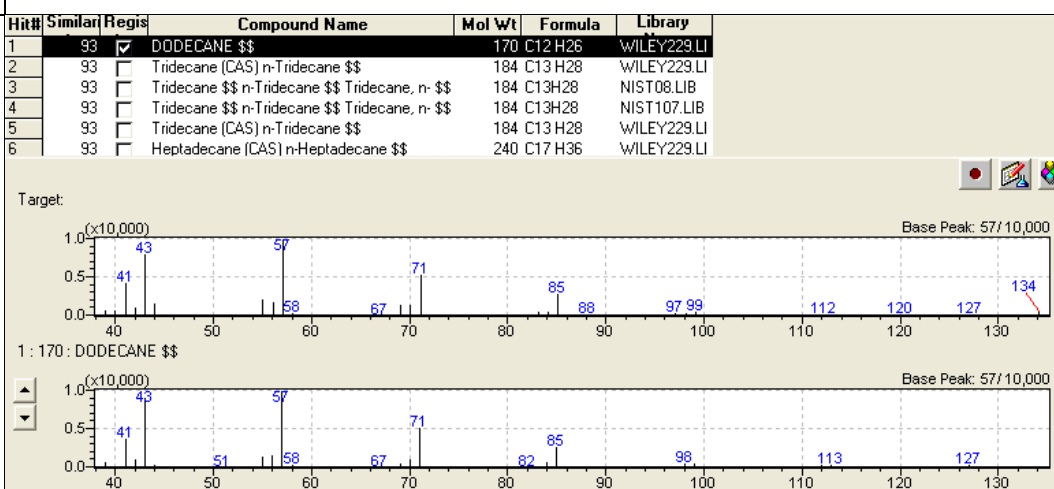
81%



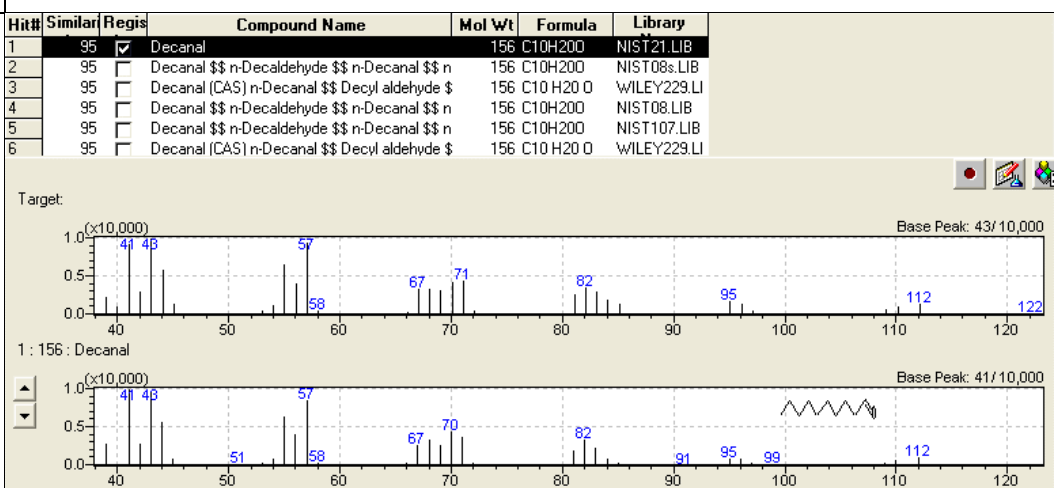
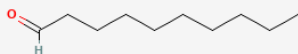
2-fenoxietanol – 76%



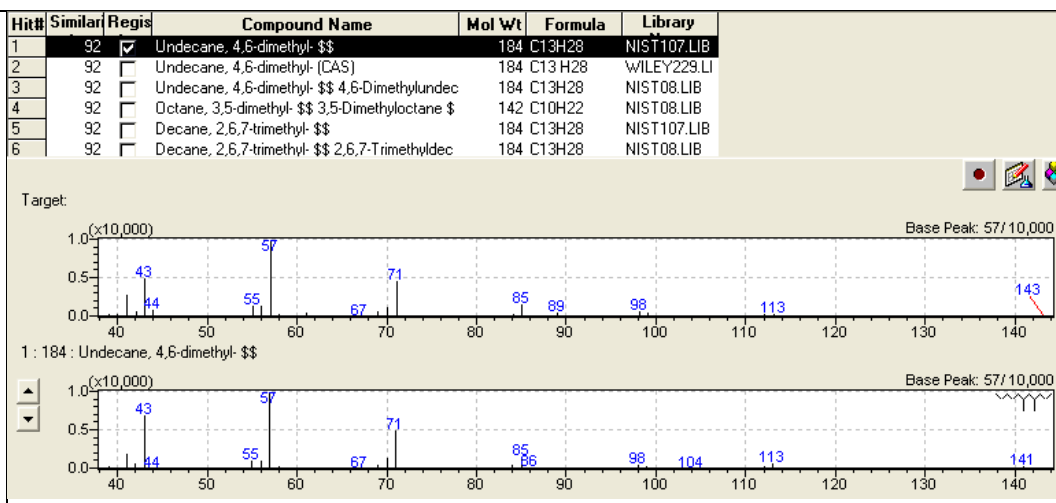
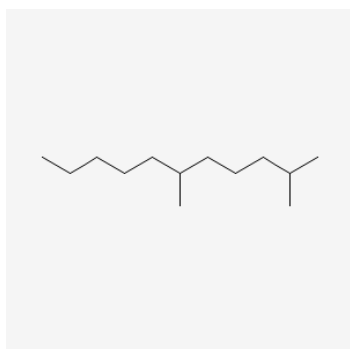
Dodecano – 93%



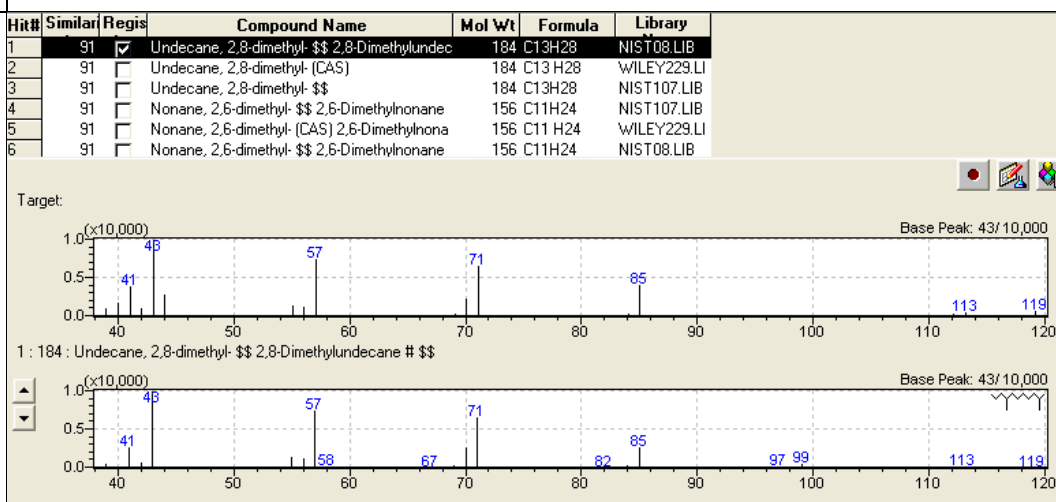
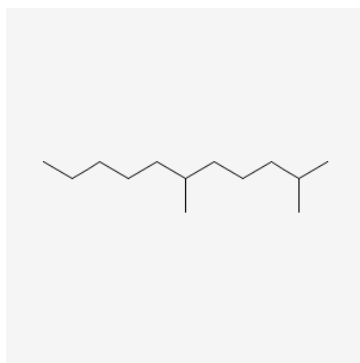
Decanal – 95%



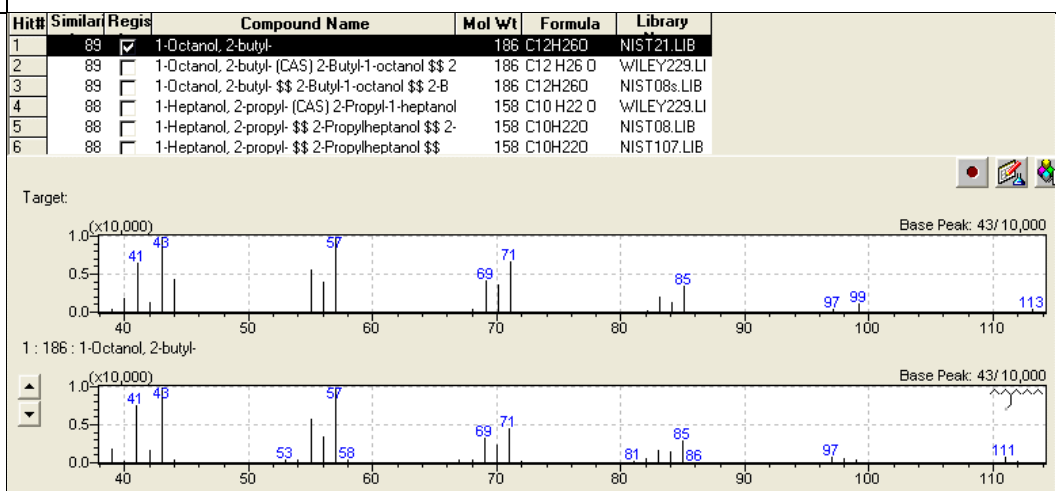
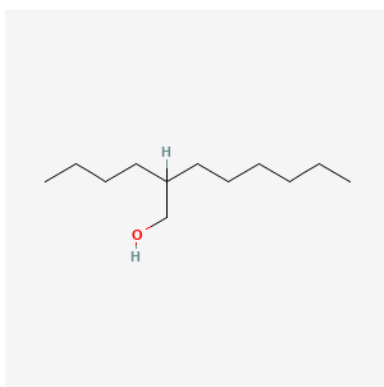
4,6-dimetilundecano – 92%



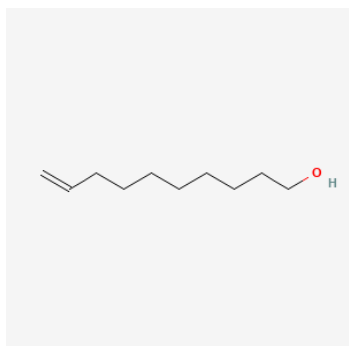
2,8-dimetilundecano – 91%



2-butiloctan-1-ol – 89%

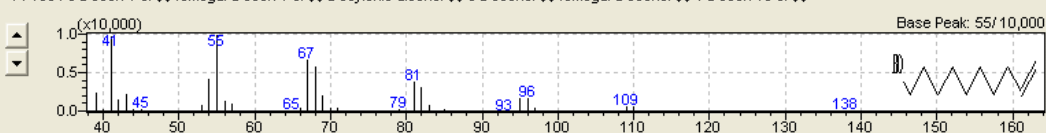
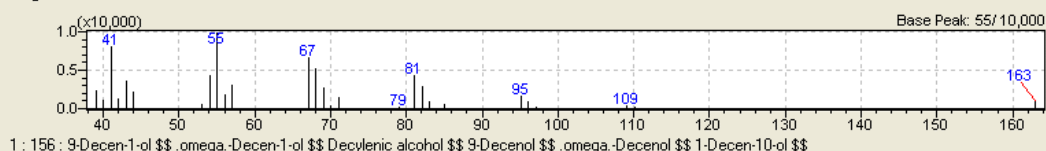


dec-9-en-1-ol – 92%

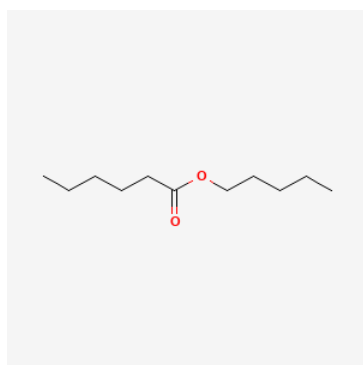


Hit#	Similarity	Regist	Compound Name	Mol	Formula	Library
1	92	☒	9-Decen-1-ol \$\$.omega.-Decen-1-ol \$\$ Decyl	156	C10H20O	NIST08s.LIB
2	92	☐	9-Decen-1-ol	156	C10H20O	NIST21.LIB
3	92	☐	9-Decen-1-ol	156	C10H20O	NIST21.LIB
4	92	☐	9-Decen-1-ol \$\$.omega.-Decen-1-ol \$\$ Decyl	156	C10H20O	NIST08s.LIB
5	91	☐	1,9-Nonanediol \$\$.alpha..Omega.-Nonanediol	160	C9H20O2	NIST107.LIB
6	91	☐	9-Decen-1-ol \$\$.omega.-Decen-1-ol \$\$ Decyl	156	C10H20O	NIST107.LIB

Target:

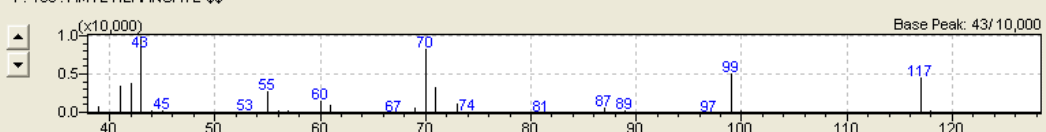
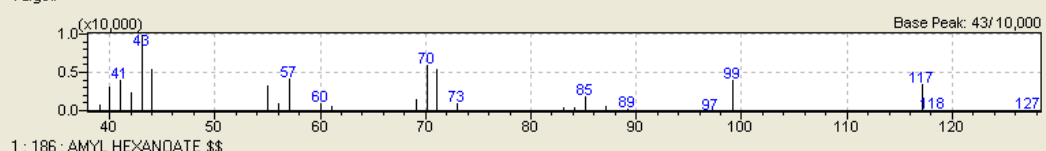


Pentil hexanoato – 87%

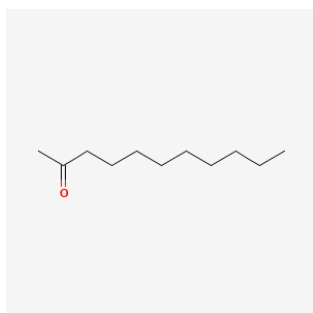


Hit#	Similarity	Regist	Compound Name	Mol Wt	Formula	Library
1	87	☒	AMYL HEXANOATE \$\$	186	C11H22O2	WILEY229.LI
2	86	☐	Hexanoic acid, 2-methylbutyl ester	186	C11H22O2	NIST21.LIB
3	86	☐	Hexanoic acid, 2-methylbutyl ester \$\$ 2-Methyl	186	C11H22O2	NIST08s.LIB
4	85	☐	Hexanoic acid, pentyl ester (CAS) Amyl hexoat	186	C11H22O2	WILEY229.LI
5	85	☐	Hexanoic acid, pentyl ester	186	C11H22O2	NIST21.LIB
6	85	☐	Hexanoic acid, pentyl ester \$\$ n-Amyl caproate	186	C11H22O2	NIST08s.LIB

Target:

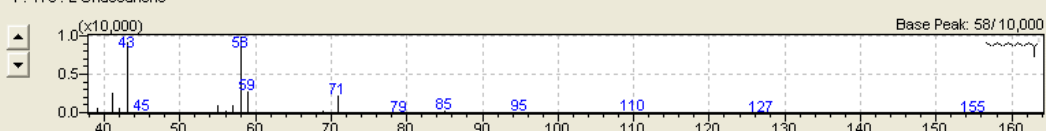
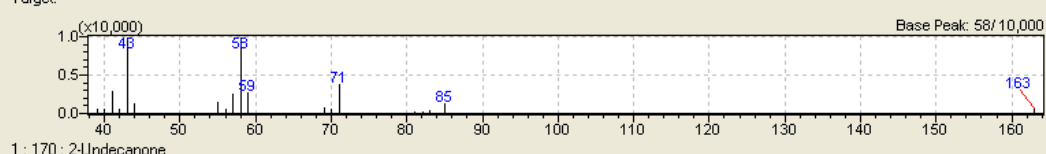


undecan-2-ona – 90%

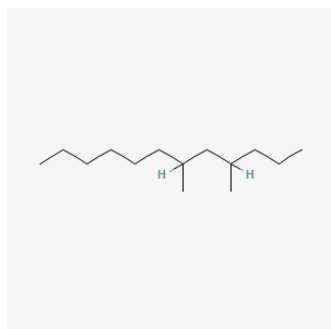


Hit#	Similarity	Regist	Compound Name	Mol	Formula	Library
1	90	☒	2-Undecanone	170	C11H22O	NIST21.LIB
2	90	☐	2-Undecanone (CAS) 2-Hendecanone \$\$ Met	170	C11H22O	WILEY229.LI
3	90	☐	2-Tridecanone (CAS) Methyl undecyl ketone \$	198	C13H26O	WILEY229.LI
4	90	☐	2-Tridecanone	198	C13H26O	NIST21.LIB
5	89	☐	2-Undecanone (CAS) 2-Hendecanone \$\$ Met	170	C11H22O	WILEY229.LI
6	89	☐	2-Undecanone	170	C11H22O	NIST21.LIB

Target:

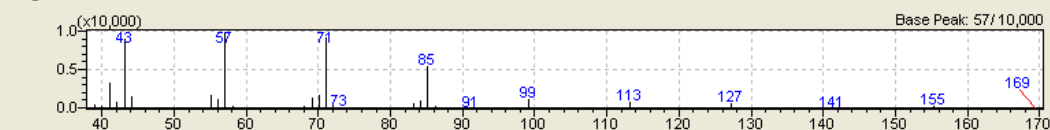


4,6-dimetildodecano – 94%

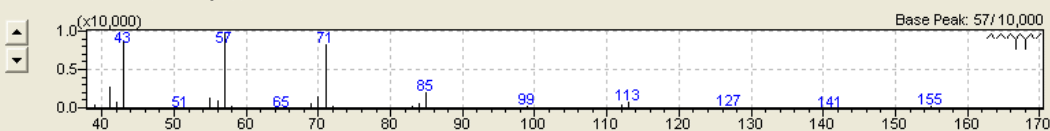


Hit#	Similar	Regis	Compound Name	Mol Wt	Formula	Library
1	94	☒	Dodecane, 4,6-dimethyl- \$\$	198	C ₁₄ H ₃₀	NIST107.LIB
2	94	☐	Dodecane, 4,6-dimethyl- (CAS)	198	C ₁₄ H ₃₀	WILEY229.LI
3	94	☐	Dodecane, 4,6-dimethyl- \$\$ 4,6-Dimethyldodec	198	C ₁₄ H ₃₀	NIST08.LIB
4	94	☐	Nonane, 5-(2-methylpropyl)- \$\$	184	C ₁₃ H ₂₈	NIST107.LIB
5	94	☐	Nonane, 5-(2-methylpropyl)- \$\$ 5-Isobutylnonan	184	C ₁₃ H ₂₈	NIST08.LIB
6	94	☐	Nonane, 5-(2-methylpropyl)- (CAS) OCTANE, 4-	184	C ₁₃ H ₂₈	WILEY229.LI

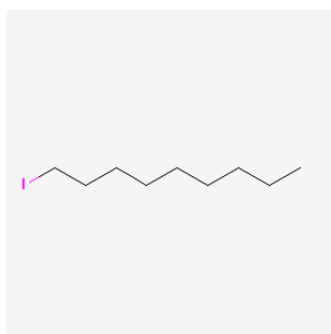
Target:



1 : 198 : Dodecane, 4,6-dimethyl- \$\$

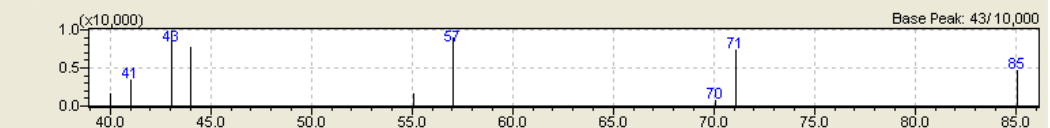


Iodononano – 86%

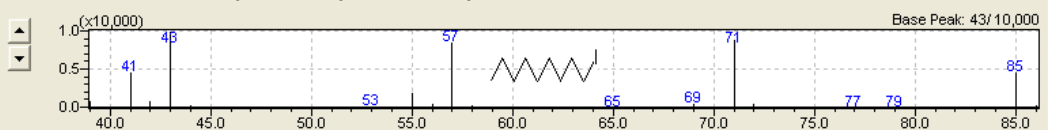


Hit#	Similar	Regis	Compound Name	Mol Wt	Formula	Library
1	86	☒	Nonane, 1-iodo- \$\$ n-Nonyl iodide \$\$ Nonyl io	254	C ₉ H ₁₉ I	NIST08.LIB
2	85	☐	Decane, 3,7-dimethyl- \$\$ 3,7-Dimethyldecane	170	C ₁₂ H ₂₆	NIST08.LIB
3	85	☐	Decane, 3,7-dimethyl- \$\$	170	C ₁₂ H ₂₆	NIST107.LIB
4	84	☐	4-Heptanone, 3-methyl- \$\$ 3-Methyl-4-heptano	128	C ₈ H ₁₆ O	NIST08.LIB
5	84	☐	Butane, 2,2-dimethyl- \$\$ Neohexane \$\$ 2,2-Di	96	C ₆ H ₁₄	NIST08.LIB
6	84	☐	4-Heptanone, 3-methyl- \$\$ 3-Methyl-4-heptano	128	C ₈ H ₁₆ O	NIST107.LIB

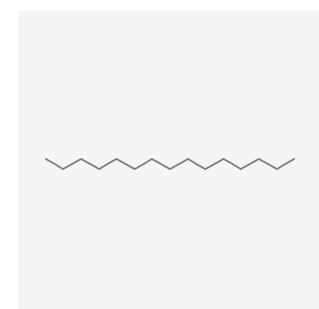
Target:



1 : 254 : Nonane, 1-iodo- \$\$ n-Nonyl iodide \$\$ Nonyl iodide \$\$ 1-n-Nonyl iodide \$\$ 1-Iodononane \$\$

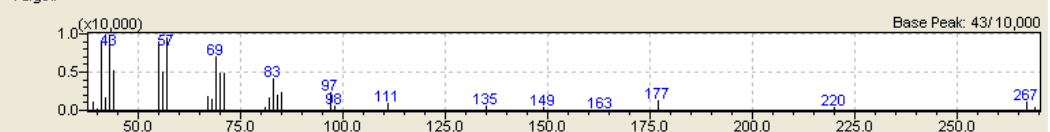


Pentadecano – 89%

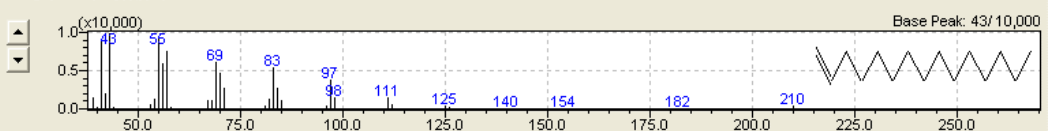


Hit#	Similar	Regis	Compound Name	Mol Wt	Formula	Library
1	89	☒	1-Pentadecene	210	C ₁₅ H ₃₀	NIST21.LIB
2	89	☐	1-Octadecanol (CAS) Stenol \$\$ Sipol S \$\$ Ste	270	C ₁₈ H ₃₈ O	WILEY229.LI
3	89	☐	Hexadecane, 1-chloro-	260	C ₁₆ H ₃₃ Cl	NIST21.LIB
4	89	☐	Hexadecane, 1-chloro- (CAS) 1-Chlorohexadec	260	C ₁₆ H ₃₃ Cl	WILEY229.LI
5	89	☐	1-Dodecanol	186	C ₁₂ H ₂₆ O	NIST21.LIB
6	89	☐	3-Tetradecene, (Z)- \$\$	196	C ₁₄ H ₂₈	NIST107.LIB

Target:

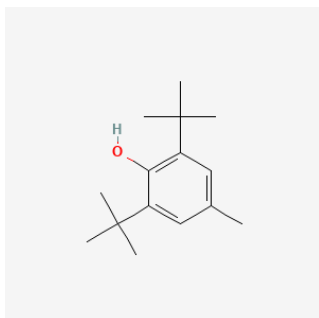


1 : 210 : 1-Pentadecene



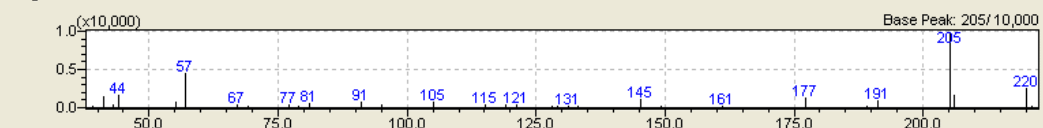
2,6-ditert-butil-4-metilfenol –

94%

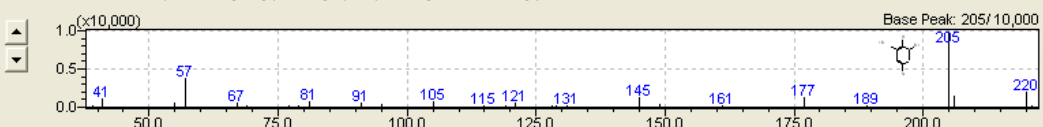


Hit#	Similar	Regis	Compound Name	Mol Wt	Formula	Library
1	94	☒	Phenol, 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methyl- (CA	220	C15H24O	WILEY229.LI
2	92	☐	Phenol, 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methyl- (CA	220	C15H24O	WILEY229.LI
3	92	☐	Butylated Hydroxytoluene	220	C15H24O	NIST21.LIB
4	92	☐	Phenol, 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methyl- (CA	220	C15H24O	WILEY229.LI
5	91	☐	Butylated Hydroxytoluene \$\$ Phenol, 2,6-bis(1,	220	C15H24O	NIST08.LIB
6	91	☐	Butylated Hydroxytoluene \$\$ Phenol, 2,6-bis(1,	220	C15H24O	NIST107.LIB

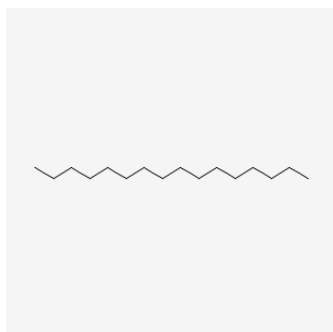
Target:



1 : 220 : Phenol, 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methyl- (CAS) 4-Methyl-2,6-di-tert-butylphenol \$\$ BHT \$\$ P 21 \$\$ CAD 3 \$\$ AO 29 \$\$ CAD 1 \$\$ AO 4K \$\$ DBPC \$\$

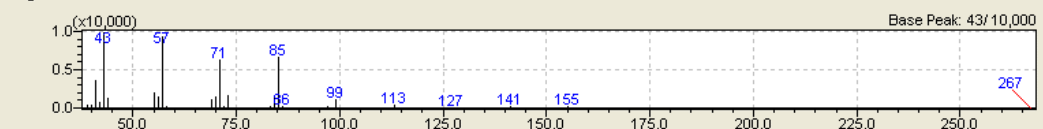


Hexadecano – 92%

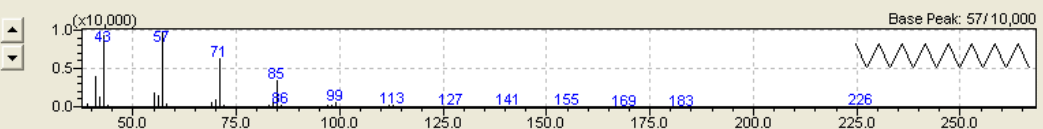
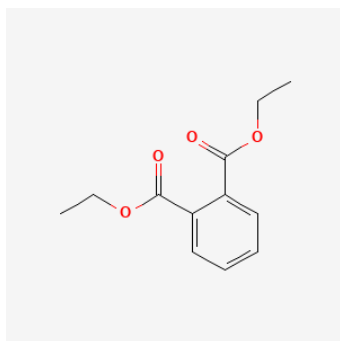


Hit#	Similar	Regis	Compound Name	Mol Wt	Formula	Library
1	92	☒	Hexadecane	226	C16H34	NIST21.LIB
2	92	☐	Hexadecane (CAS) n-Hexadecane \$\$ Cetane	226	C16H34	WILEY229.LI
3	92	☐	Hexadecane \$\$ n-Cetane \$\$ n-Hexadecane \$	226	C16H34	NIST08s.LIB
4	92	☐	Tetradecane (CAS) n-Tetradecane \$\$ Isotetra	198	C14H30	WILEY229.LI
5	92	☐	Undecane, 4-ethyl- (CAS)	184	C13H28	WILEY229.LI
6	92	☐	Undecane, 4-ethyl- \$\$	184	C13H28	NIST107.LIB

Target:

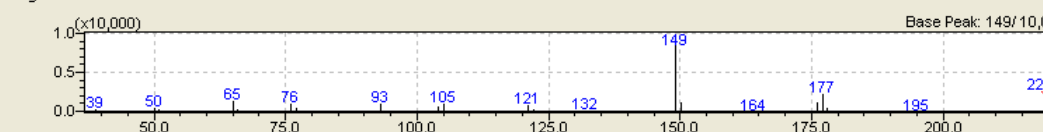


1 : 226 : Hexadecane

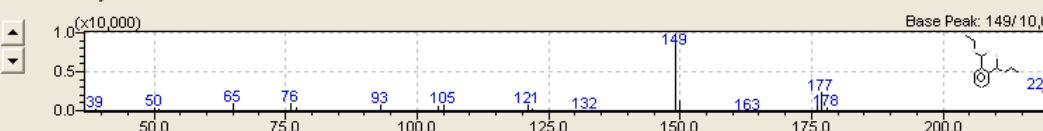
dietyl benzeno-1,2-
dicarboxilato – 97%

Hit#	Similar	Regis	Compound Name	Mol Wt	Formula	Library
1	97	☒	Diethyl Phthalate	222	C12H14O4	NIST21.LIB
2	97	☐	Diethyl Phthalate \$\$ 1,2-Benzenedicarboxylic a	222	C12H14O4	NIST08s.LIB
3	96	☐	DIETHYL PHTHALATE \$\$	222	C12H14O4	WILEY229.LI
4	96	☐	Diethyl Phthalate	222	C12H14O4	NIST21.LIB
5	95	☐	Diethyl Phthalate \$\$ 1,2-Benzenedicarboxylic a	222	C12H14O4	NIST08.LIB
6	94	☐	1,2-Benzenedicarboxylic acid, diethyl ester (CA	222	C12H14O4	WILEY229.LI

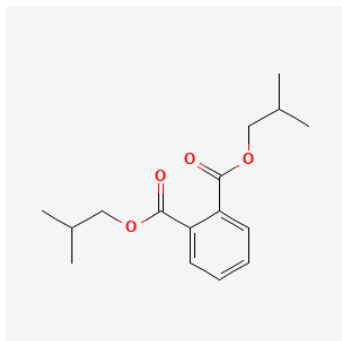
Target:



1 : 222 : Diethyl Phthalate

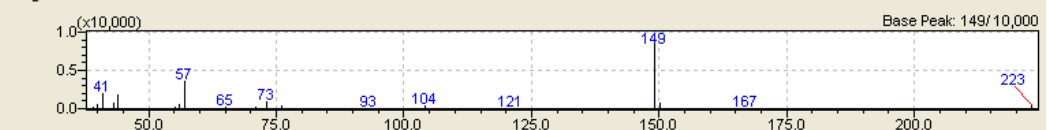


bis(2-metilpropil) benzeno-
1,2-dicarboxilato – 89%

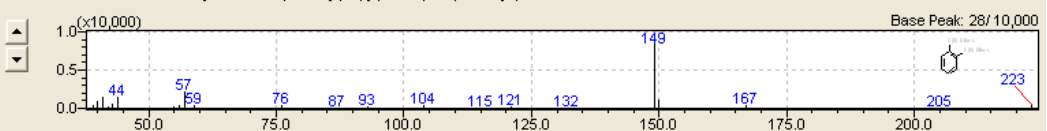


Hit#	Similar	Regis	Compound Name	Mol Wt	Formula	Library
1	89	☐	Diisobutyl phthalate \$\$	278	C16H22O4	WILEY229.LI
2	89	☒	1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-methylprop	278	C16H22O4	WILEY229.LI
3	84	☐	1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-methylprop	278	C16H22O4	NIST08s.LIB
4	84	☐	1,2-Benzenedicarboxylic acid, dibutyl ester (CA	278	C16H22O4	WILEY229.LI
5	84	☐	1,2-Benzenedicarboxylic acid, dibutyl ester (CA	278	C16H22O4	WILEY229.LI
6	83	☐	1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-methylprop	278	C16H22O4	WILEY229.LI

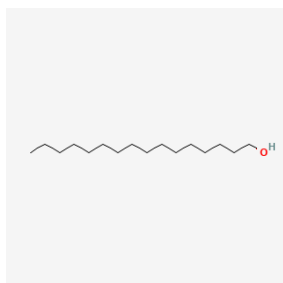
Target:



2 : 278 : 1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-methylpropyl) ester (CAS) Isobutyl phthalate \$\$ ISOBUTYL O-PHTHALATE \$\$ DI-ISOBUTYL PHTHALATE \$\$ Diisobutyl phthalate

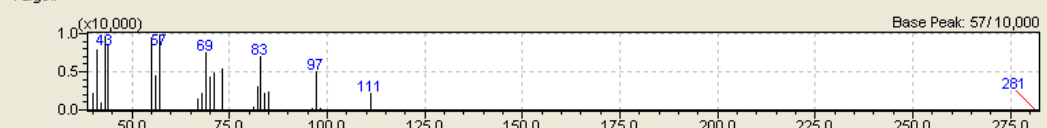


Hexadecan-1-ol – 89%



Hit#	Similar	Regis	Compound Name	Mol Wt	Formula	Library
1	89	☒	1-Hexadecanol \$\$ n-Cetyl alcohol \$\$ n-Hexad	242	C16H34O	NIST08s.LIB
2	89	☐	1-Hexadecanol	242	C16H34O	NIST21.LIB
3	89	☐	1-Hexadecanol (CAS) Cetol \$\$ Ethol \$\$ Ethol \$	242	C16H34O	WILEY229.LI
4	89	☐	n-Heptadecanol-1 \$\$ 1-Hydroxyheptadecane \$	256	C17H36O	NIST08s.LIB
5	89	☐	1-Heptadecanol (CAS) n-Heptadecanol \$\$ He	256	C17H36O	WILEY229.LI
6	89	☐	1-Heptadecanol	256	C17H36O	NIST21.LIB

Target:



1 : 242 : 1-Hexadecanol \$\$ n-Cetyl alcohol \$\$ n-Hexadecan-1-ol \$\$ n-Hexadecanol \$\$ n-1-Hexadecanol \$\$ Adol 52 \$\$ Adol 52 NF \$\$ Adol 54 \$\$ Aldol 54 \$\$ Aldol 54

