



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE BIOCÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA  
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

MARIA ALICE RIBEIRO ALVES

**ANÁLISE TAXONÔMICA APLICADA A CULTURAS DE *Malassezia* E  
AVALIAÇÃO DO PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE FRENTE A NOVOS  
COMPOSTOS BIOATIVOS**

Recife

2023

MARIA ALICE RIBEIRO ALVES

**ANÁLISE TAXONÔMICA APLICADA A CULTURAS DE *Malassezia* E  
AVALIAÇÃO DO PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE FRENTE A NOVOS  
COMPOSTOS BIOATIVOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Ciências Biológicas - Bacharelado da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de Bacharela em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Rejane Pereira Neves

Coorientador: Dr. Cícero Pinheiro Inácio

Recife

2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Alves , Maria Alice Ribeiro.

Análise taxonômica aplicada a culturas de *Malassezia* e avaliação do perfil de susceptibilidade frente a novos compostos bioativos / Maria Alice Ribeiro  
Alves . - Recife, 2023.

47 : il., tab.

Orientador(a): Rejane Pereira Neves

Coorientador(a): Cícero Pinheiro Inácio

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Ciências Biológicas - Bacharelado, 2023.

1. Taxonomia . 2. *Malassezia* sp. . 3. Susceptibilidade antifúngica . 4. Derivados tiofênicos . I. Neves, Rejane Pereira. (Orientação). II. Inácio, Cícero Pinheiro . (Coorientação). IV. Título.

570 CDD (22.ed.)

MARIA ALICE RIBEIRO ALVES

**ANÁLISE TAXONÔMICA APLICADA A CULTURAS DE *Malassezia* E  
AVALIAÇÃO DO PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE FRENTE A NOVOS  
COMPOSTOS BIOATIVOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Ciências Biológicas - Bacharelado da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de Bacharela em Ciências Biológicas.

Aprovado em: 24/08/2023

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Rejane Pereira Neves (Orientadora)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Dra. Maria Daniela Silva Buonafina Paz (Examinador Interno)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Dr. Franz de Assis Graciano dos Santos (Examinador Interno)  
Universidade Federal de Pernambuco

A Deus, por toda força e coragem; À minha família, pilares da minha educação e felicidade.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus por me capacitar para realizar esse trabalho, pela sabedoria, pelo discernimento e por toda força a mim concedida.

À minha família materna e paterna, pelo apoio de sempre, pela credibilidade e confiança em mim.

Aos meus orientadores, Profa Dra. Rejane Pereira Neves e Dr. Cícero Pinheiro Inácio pelos ensinamentos e conhecimentos repassados, pela contribuição no meu desenvolvimento e no processo de amadurecimento científico.

À minha mãe, Ana Líbia, por todas as lutas ao meu lado, por nossa grande amizade, pela dedicação e união quando a vida colocou dificuldades no caminho e por ter acreditado em mim.

Aos meus queridos avós, Luci e João, pelo enorme aconchego que me proporcionaram, pelo acolhimento e pela disposição de sempre.

Às minhas tias, Ivanete e Lúcia (*in memoriam*), pela minha criação e por meus princípios.

À minha irmã, Maria Luiza, por me permitir sentir o que é cuidar e ser cuidada, pelas verdadeiras e boas risadas.

Ao meu pai, Orisvaldo, por toda contribuição, carinho e confiança.

Ao meu padrasto Fábio, por todo carinho e amizade.

Ao José Lauriano Filho, pela paciência, pelo respeito, pelo amor, pelos momentos compartilhados ao meu lado, pelo incentivo de sempre e por não ter soltado a minha mão em momento nenhum.

Aos meus sogros, pelo carinho e acolhimento de sempre.

Aos doutorandos e pós-doutorandos do Laboratório de Micologia Médica e de Micoses Sistêmicas, Dra. Maria Daniela Buonafina, Dr. Franz de Assis e Dra. Bruna de Sousa pela grande disponibilidade e atenção em me auxiliar nas pesquisas.

Aos discentes da iniciação científica, aos mestrandos e à técnica do Laboratório, Raquel Marinho, de Micologia Médica e do Laboratório de Micoses Sistêmicas, por todo auxílio nos experimentos, pela amizade que estabelecemos e pelas boas risadas. Terei sempre vocês em meu coração.

Às minhas parceiras de laboratório, pelos momentos de descontração, pela lealdade e pelo apoio durante a execução deste trabalho.

À Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), por tudo proporcionado durante minha jornada acadêmica.

À Coleção de Culturas Micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco, por prover os isolados fúngicos utilizados neste trabalho.

Agradeço profundamente a todos e todas que, de alguma maneira, estiveram presentes em minha vida compartilhando risadas, abraços, amor, me ajudando direta ou indiretamente. Terei sempre em meu coração a presença amiga de todos e todas vocês que ajudaram na minha formação. A vocês, minha eterna gratidão.

“O próprio Senhor irá à sua frente e estará com você; Ele nunca o deixará, nunca o abandonará. Não tenha medo! Não se desanime!” – Deuteronômio 31:8

## RESUMO

O gênero *Malassezia* corresponde a leveduras lipofílicas e/ou lipodependentes que estão presentes na microbiota autóctone de humanos e animais. Este gênero apresenta identificação taxonômica baseada em aspectos morfológicos, bioquímicos e fisiológicos. Esta levedura habita a microbiota autóctone de humanos e animais sem causar prejuízos a estes. No entanto, o rompimento do equilíbrio dos fungos na microbiota pode ocasionar o estabelecimento das infecções. *Malassezia* sp. pode estar associada a infecções fúngicas como a pitíriase versicolor e manifestações sistêmicas, tendo, portanto, grande relevância clínica o que requer um tratamento apropriado. O cetoconazol é um dos fármacos do mercado recomendados para o tratamento desta micose. Entretanto, diante do aumento da resistência das cepas aos antimicrobianos, alternativas como o uso de derivados tiofênicos, especialmente os 2-amino-tiofênicos (6CN e 7CN), como possível terapia antifúngica vêm se destacando devido ao reconhecimento por suas atividades biológicas. O presente trabalho contou com o fornecimento de isolados fúngicos da coleção de cultura Micoteca URM da universidade Federal de Pernambuco e do acervo do grupo de pesquisa Fungos de interesse médico e leveduras de interesse biotecnológico do Departamento de Micologia a fim de autenticá-los taxonomicamente através do sequenciamento parcial dos domínios D1/D2 do gene ribossômico 28S por meio dos iniciadores NL1 e NL4. A análise filogenética do gênero foi observada por meio de uma árvore filogenética (Neighbor Joining), onde o sequenciamento evidenciou os isolados URM5542, URM4502, URM2881, 84, URM4499, URM4849, URM4850, URM4813 e URM5389 com relações de parentesco filogenético com a espécie tipo de *Malassezia furfur* e com grupos diferentes ao gênero *Malassezia*, como os isolados URM4220, URM4226, URM4227, aparentados com o gênero *Candida* e a cepa URM5977, com parentesco filogenético com o gênero *Saccharomyces*. O estudo do perfil de susceptibilidade *in vitro* dos isolados seguiu os protocolos do documento M27-A3 (CLSI) através da microdiluição em caldo com típicas modificações, utilizando o cetoconazol, droga antifúngica convencional, e os derivados tiofênicos como novos compostos bioativos. Para os isolados com parentesco filogenético com o gênero *Malassezia* (URM5542, URM4502, URM2881, 84, URM4499, URM4849, URM4850, URM4813 e URM5389), foi observada sensibilidade aos compostos 6CN e 7CN (CIM 100-400 µg/mL). Todas

as cepas, com exceção do isolado URM5977, aparentado com a espécie *Saccharomyces cerevisiae*, apresentaram valores de CIM 0,125-4 µg/mL para o cetoconazol. Os isolados URM4220, URM4226, URM4227 e URM5977 apresentaram crescimento mesmo na maior concentração utilizada no ensaio para os compostos 6CN e 7CN. Diante disso, mais estudos com novos derivados tiofênicos que venham a ser sintetizados são de extrema importância a fim de avaliar o comportamento de susceptibilidade das cepas de *Malassezia* sp. aos novos arranjos destas moléculas.

**Palavras-chave:** *Malassezia* sp.; taxonomia; susceptibilidade antifúngica; derivados tiofênicos.

## ABSTRACT

The genus *Malassezia* corresponds to lipophilic and/or lipodependent yeasts that are present in the autochthonous microbiota of humans and animals. This genus presents taxonomic identification based on morphological, biochemical and physiological aspects. This yeast inhabits the autochthonous microbiota of humans and animals without causing harm to them. However, disruption of the balance of fungi in the microbiota can lead to the establishment of infections. *Malassezia* sp. It may be associated with fungal infections such as pityriasis versicolor and systemic manifestations, therefore having great clinical relevance and requiring appropriate treatment. Ketoconazole is one of the drugs on the market recommended for the treatment of this mycosis. However, given the increasing resistance of strains to antimicrobials, alternatives such as the use of thiophenic derivatives, especially 2-amino-thiophenic derivatives (6CN and 7CN), as a possible antifungal therapy have been highlighted due to the recognition for their biological activities. counted on the supply of fungal isolates from the Micoteca URM culture collection of the Federal University of Pernambuco and the collection of the research group Fungi of medical interest and yeasts of biotechnological interest of the Department of Mycology in order to taxonomically authenticate them through partial sequencing of D1/D2 domains of the 28S ribosomal gene through primers NL1 and NL4. The phylogenetic analysis of the genus was observed through a phylogenetic tree (Neighbor Joining), where sequencing showed the isolates URM5542, URM4502, URM2881, 84, URM4499, URM4849, URM4850, URM4813 and URM5389 with phylogenetic relationships with the type species. of *Malassezia furfur* and with groups different from the *Malassezia* genus, such as isolates URM4220, URM4226, URM4227, related to the genus *Candida* and strain URM5977, phylogenetically related to the genus *Saccharomyces*. The study of the in vitro susceptibility profile of the isolates followed the protocols of document M27-A3 (CLSI) through microdilution in broth with typical modifications, using ketoconazole, a conventional antifungal drug, and thiophenic derivatives as new bioactive compounds. For isolates phylogenetically related to the *Malassezia* genus (URM5542, URM4502, URM2881, 84, URM4499, URM4849, URM4850, URM4813 and URM5389), sensitivity to compounds 6CN and 7CN was observed (MIC 100-400 µg/mL). All strains, with the exception of isolate URM5977, related to the species

*Saccharomyces cerevisiae*, presented MIC values of 0.125-4 µg/mL for ketoconazole. Isolates URM4220, URM4226, URM4227 and URM5977 showed growth even at the highest concentration used in the assay for compounds 6CN and 7CN. In view of this, further studies with new thiophene derivatives that may be synthesized are extremely important in order to evaluate the susceptibility behavior of strains of *Malassezia* sp. to the new arrangements of these molecules.

**Keywords:** *Malassezia* sp.; taxonomy; antifungal susceptibility; thiophenic derivatives.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Microscopia de <i>Malassezia</i> sp.	18
Figura 2 -	Estrutura química do cetoconazol	19
Figura 3 -	Estrutura do tiofeno	20
Figura 4 -	Reação de Gewald	20
Figura 5 -	Estrutura química do derivado 6CN	21
Figura 6 -	Estrutura química do derivado 7CN	21
Figura 7 -	Árvore filogenética dos isolados sequenciados obtidos da Coleção de Cultura da Micoteca URM. Análise de Neighbor joining, Máxima verossimilhança usando ferramenta MEGA 11	31

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Relação dos reagentes utilizados para preparação do <i>mix</i> por reação	25
Tabela 2 - Isolados de <i>Malassezia</i> sp. obtidos da Coleção de Cultura Micoteca URM, UFPE e do acervo do grupo de pesquisa “Fungos de interesse médico e leveduras de interesse biotecnológico” do Departamento de Micologia	29
Tabela 3 - Identificação genômica dos isolados através do sequenciamento da região D1/D2 do gene ribossômico e da análise filogenética pelo método Neighbor joining, Máxima verossimilhança	32
Tabela 4 - Concentrações inibitórias mínimas dos isolados obtidos frente ao cetoconazol e aos derivados tiofênicos 6CN (T1) e 7CN (T2)	35

## LISTA DE ABREVIACOES

ATCC	American Type Culture Collection (Coleção de cultura da Universidade da Georgia, Atlanta (GA), Estados Unidos da América)
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute (Instituto de Padronizações Clínicas e Laboratoriais)</i>
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamnio
DdH2O	gua deionizada
DMSO	Dimetilsulfóxido
URM	University Recife Mycologia (Coleção de cultura da Universidade Federal de Pernambuco, Recife (PE), República Federativa do Brasil)

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>15</b>
2.1	Gênero <i>Malassezia</i>	15
2.2	A microbiota da pele	16
2.3	Infecções associadas ao gênero <i>Malassezia</i>	16
2.4	Tratamento com antifúngicos convencionais e busca por novas substâncias bioativas	18
2.4.1	<i>Cetoconazol</i>	19
2.4.2	<i>Derivados tiofênicos</i>	19
2.5	Importância do teste de susceptibilidade	21
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>22</b>
3.1	Objetivo Geral	22
3.2	Objetivos específicos	22
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b>	<b>23</b>
4.1	Obtenção dos isolados	23
4.2	Isolamento fúngico	23
4.3	Extração de DNA	23
4.4	Eletroforese	24
4.5	Reação em cadeia da polimerase (PCR)	25
4.6	Purificação dos produtos da PCR e Sequenciamento	26
4.7	Obtenção dos derivados tiofênicos	26
4.8	Teste de susceptibilidade antifúngica <i>in vitro</i>	27
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b>	<b>29</b>
5.1	Obtenção dos isolados de <i>Malassezia</i> sp.	29
5.2	Análise filogenética do gênero <i>Malassezia</i>	30
5.3	Perfil de susceptibilidade dos isolados ao cetoconazol	33

5.4	Perfil de susceptibilidade dos isolados aos derivados tiofênicos	34
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>37</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>38</b>

## 1 INTRODUÇÃO

*Malassezia* (Baillon, 1889) é um gênero de fungo pertencente ao filo Basidiomycota. São consideradas leveduras lipofílicas e/ou lipodependentes com características morfológicas e fisiológicas bastante semelhantes. Essas leveduras são reconhecidas por habitarem a microbiota normal da pele humana e de animais sem causar prejuízos no hospedeiro (IANIRI; HEITMAN; SCHEYNIUS, 2018).

Através das análises bioquímicas e moleculares, foram reconhecidas 18 espécies relacionadas ao gênero *Malassezia furfur*, *M. pachydermatis*, *M. sympodialis*, *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. restricta*, *M. slooffiae*, *M. dermatis*, *M. japonica*, *M. nana*, *M. yamatoensis*, *M. caprae*, *M. equina*, *M. cuniculi*, *M. brasiliensis*, *M. psittaci*, *M. arunalokei* e *M. vespertilionis* (HONNAVAR et al., 2016; BÖHMOVÁ et al., 2018; LORCH et al., 2018). A diferenciação e caracterização dessas espécies consiste em aspectos bioquímicos, fisiológicos e/ou morfológicos, como o crescimento em meio Ágar Sabouraud Dextrose sem uma fonte de lipídio, produção da enzima catalase, crescimento com absorção de *tween*, capacidade de hidrolisar a esculina e aspectos morfológicos das colônias (HOOG et al., 2000).

Este gênero possui grande relevância clínica por ser agente etiológico da Pitiríase versicolor, micose superficial que se apresenta com alterações na pigmentação da pele. Está associado também à infecções sistêmicas, à dermatite seborréica e outras infecções (PRADO et al., 2019). Devido à exigência nutricional dessas leveduras por lipídios, nutrem-se do sebo presente na pele do ser humano e também estão associadas a outros fatores predisponentes como sudorese, desnutrição, umidade e outras (LEUNG et al., 2022)

Com relação aos microrganismos e suas possíveis contaminações, tem-se observado atualmente certa diminuição da eficácia dos tratamentos convencionais por meio de fármacos existentes associada a um quadro de resistência das cepas microbianas (GRILLO et al., 2013; KANAFANI; PERFECT, 2008). A terapia antifúngica recomendada para tratar infecções causadas por *Malassezia* sp. é a base dos azóis, cujo mecanismo de ação é o bloqueio à biossíntese do ergosterol resultando na inibição do fungo.

O quadro de resistência de algumas cepas ao tratamento por azólicos somada ao aumento dos quadros clínicos das infecções associadas ao gênero *Malassezia*

evidencia a importância dos ensaios de susceptibilidade para avaliar novas terapias (VELEGRAKI et al., 2015). Com isso, observa-se a importância de novos estudos que tenham como base a inclusão de novas moléculas que apresentem potencial de se tornarem novos fármacos, com o desígnio de controlar a manifestação da infecção fúngica.

Os derivados tiofênicos são exemplos de compostos bioativos que vêm se destacando por suas atividades biológicas anticoagulantes, antifúngicas, antibacterianas, antitumorais (AGUIAR et al., 2016) em especial, derivados do 2-aminotiofeno, pelo fato desta porção estar presente na composição de moléculas que são biologicamente ativas (HUANG; DÖMLING, 2010) como os derivados 2-Amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofeno-3-carbonitrila, titulado como 6CN e 2-amino-5,6,7,8-tetrahidro-4H-ciclo-hepta [b] -tiofeno-3-carbonitrila (7CN) utilizados no presente trabalho. Em estudos prévios realizados demonstraram estas atividades biológicas e farmacológicas por meio dos derivados tiofênicos. Diante disso, o presente trabalho avaliou a susceptibilidade das cepas do gênero *Malassezia* aos derivados tiofênicos juntamente ao tratamento mais convencional com o fármaco *Cetoconazol* a fim de observar se estes novos compostos apresentam atividade antifúngica contra os isolados de *Malassezia* sp. possibilitando abertura para novas terapias.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Gênero *Malassezia*

O gênero *Malassezia*, descrito por Baillon (1889), abrange fungos que possuem afinidade e/ou dependência por lipídios. São leveduras que habitam a microbiota autóctone da pele de humanos e animais, sem causar malefícios nestes hospedeiros. No entanto, diante de alguma vulnerabilidade, como déficit imunológico do hospedeiro, pode vir a ser estabelecido um quadro patogênico (IANIRI; HEITMAN; SCHEYNIUS, 2018). Além disso, distúrbios no próprio microambiente também podem colaborar neste quadro

Novas espécies de *Malassezia* vêm sendo descobertas por meio de testes bioquímicos, moleculares e fisiológicos somados às análises morfológicas, devido à semelhança que as entidades apresentam como a forma das colônias. Atualmente, estão descritas e conhecidas 18 espécies de pertencentes a este gênero: *Malassezia furfur*, *M. pachydermatis*, *M. sympodialis*, *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. restricta*, *M. slooffiae*, *M. dermatis*, *M. japonica*, *M. nana*, *M. yamatoensis*, *M. caprae*, *M. equina*, *M. cuniculi*, *M. brasiliensis*, *M. psittaci*, *M. arunalokei* e *M. vespertilionis* (HONNAVAR et al., 2016; BÖHMOVÁ et al., 2018; LORCH et al., 2018). Dentre estas espécies, é atribuída à *Malassezia furfur* a maior porcentagem dos quadros de infecção fúngica (BENJAMIN et al., 2016).

As propriedades fisiológicas estudadas a fins de caracterização das espécies no que concerne aos aspectos bioquímicos e fisiológicos são por exemplo, a presença da catalase, a tolerância a 37°C e a capacidade de utilizar certas concentrações de *Tween* 20, 40, 60 e 80 como fonte de lipídio em meio simples (GUÉHO; MIDGLEY; GUILLOT, 1996). Com relação às características morfológicas das colônias de *Malassezia*, no geral apresentam textura cremosa e macia, com aspecto seco e variações na cor de creme ao marrom claro (SIDRIM; ROCHA, 2004).

Dentre as espécies de *Malassezia* descritas e conhecidas a afinidade por lipídios e/ou a lipodependência é estabelecida quando a levedura além da afinidade, só cresce na presença de uma fonte de lipídio (PEANO et al., 2020). Com base nisso, as demais espécies são lipodependentes com exceção da *Malassezia pachydermatis*, podendo então ser cultivada em meio de ágar Sabouraud dextrose sem lipídio. Com

relação ao teste da catalase, apenas a *Malassezia restricta* responde negativamente ao teste (SIMMONS; GUÉHO, 1994).

## 2.2 A microbiota da pele

A pele é o órgão responsável por envolver um organismo, protegendo-o e o defendendo de fatores e agentes externos (DOMANSKY; BORGES et al., 2012). A microbiota normal presente na pele humana é influenciada por fatores particulares e individuais como faixa etária, temperatura, disponibilidade de lipídio na pele, etc. A frequência e condição de microrganismos que fazem parte da microbiota normal da pele em determinadas regiões são influenciadas pela disponibilidade de água, fatores físicos como pH e a possibilidade de existências de substâncias com características inibitórias. Por exemplo, áreas como epiderme - camada mais externa da pele e sem vascularização - apresentam menos umidade quando comparadas às áreas como interdígitos (SIDRIM; ROCHA, 2004). Dentre a composição da pele estão os melanócitos, células responsáveis pela produção da melanina, pigmento que determina a cor da pele, dos cabelos e dos olhos de um indivíduo junto à fotoproteção e termorregulação (LIN; FISHER, 2007).

## 2.3 Infecções associadas ao gênero *Malassezia*

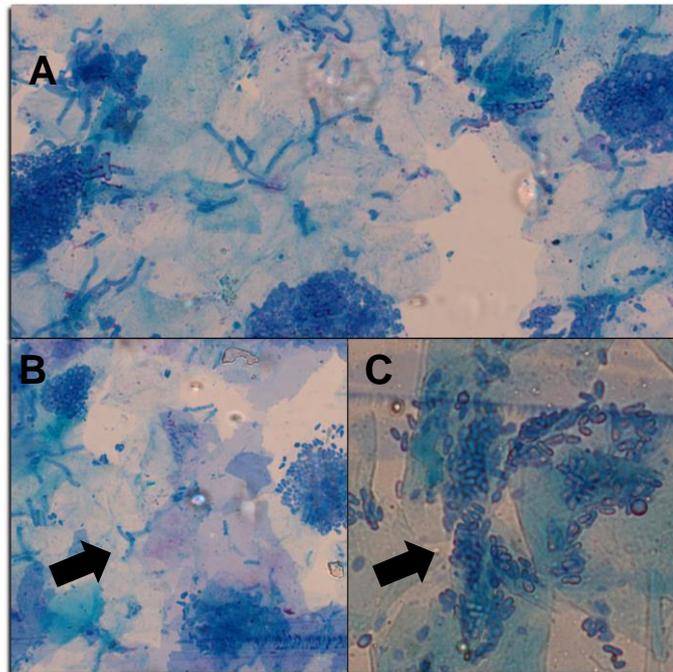
As patologias causadas por esse gênero estão associadas à onicomicose, infecções sistêmicas, caspa, dermatite seborreica, pitiríase versicolor (ROSA et al., 2019). Em um organismo de pele saudável, as leveduras do gênero *Malassezia* fazem parte da microbiota se nutrindo de lipídios produzidos pelas glândulas sebáceas (sebo) sem causar o rompimento do equilíbrio, o que provocaria a doença (LEUNG et al., 2022). Alterações nesse quadro pode levar ao estabelecimento da infecção pelo fato da fonte de lipídio utilizada pelos fungos estarem associados à estruturação da camada externa da levedura como também à formação de moléculas utilizadas na produção de melanina, o que resulta em lesões hipo ou hiperpigmentadas (VELEGRAKI et al., 2015). A infecção por espécies do gênero *Malassezia* representa uma porcentagem significativa em Unidades de terapia intensiva - UTI, fator que implica também em uma maior assistência para o tratamento. Dentre estas espécies,

é atribuída à *Malassezia furfur* a maior porcentagem dos quadros de infecção fúngica. Por isso a necessidade do controle patogênico (BENJAMIN et al., 2016).

A pitiríase versicolor é uma micose que acomete as superfícies da pele, também chamada por *tinea versicolor* e popularmente conhecida como pano branco. O termo *versicolor* está associado às manifestações da lesão referentes a sua coloração, podendo ser hipo ou hiperpigmentadas (HAMIDIZADEH et al., 2017). Esta infecção é geralmente assintomática e acarreta no aparecimento de placas escamosas com bordas delimitadas geralmente com descamação fina, sendo mais frequente nas regiões cervicais, tórax e ombros. Com relação a sua epidemiologia, apresenta distribuição mundial com maior frequência em áreas que predominam os climas tropical e subtropical, sem distinção de sexo e idade. A sudorese excessiva, desnutrição, alta temperatura corporal e uso de lubrificantes na pele são exemplos de fatores que podem colaborar para o estabelecimento da infecção (LEUNG et al., 2022).

O diagnóstico desta micose é dado através de exame direto, também conhecido por pesquisa direta, que consiste na observação das estruturas fúngicas através do microscópio, sendo então considerado padrão ouro para pitiríase versicolor. Nesta pesquisa são observadas células de leveduras globosas e ovais agrupadas em cachos e filamentos micelianos curtos e irregulares característicos de *Malassezia* sp. (Figura 1) em campos microscópicos (SIDRIM; ROCHA, 2004).

Figura 1 – Microscopia de *Malassezia* sp. a objetiva de aumento 40x pelo método de Porto ao Exame micológico direto. (A) células de leveduras ovais agrupadas em cachos e filamentos de micélio curtos e tortuosos; (B) filamentos micelianos curtos e tortuosos na seta; (C) células de leveduras ovais de *Malassezia* sp. na seta



Fonte: A autora (2023).

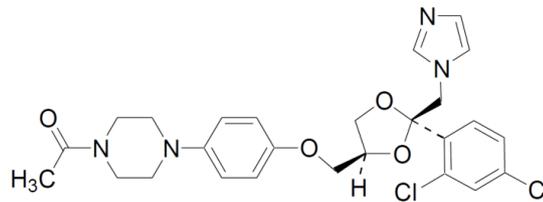
#### 2.4 Tratamento com antifúngicos convencionais e busca por novas substâncias bioativas

Atualmente os fármacos mais utilizados para o tratamento de infecções e contaminações associadas a *Malassezia* sp. são os azólicos de uso tópico ou oral, a depender da extensão do caso, como por exemplo: Cetoconazol, Itraconazol, Fluconazol e Anfotericina B (LEUNG et al., 2022). Entretanto, ultimamente tem-se observado um aumento da resistência das cepas aos tratamentos antimicrobianos como o uso desses antifúngicos, por exemplo. Tal resistência pode ser ocasionada pelo uso indevido e indiscriminado dos medicamentos (MORAES; BADIN, 2022). Isso torna a terapia ineficaz, sem melhorias clínicas aos indivíduos e persistência da lesão. Diante disso, a introdução de novas moléculas como potencial alternativa terapêutica são de extrema importância (GRILLO et al., 2013).

### 2.4.1 Cetoconazol

O Cetoconazol (Figura 2) trata-se de um fármaco derivado do imidazol reconhecido pela sua eficácia para o tratamento de infecções causadas por fungos, principalmente quando a contaminação acomete regiões superficiais como as dermatofitoses, pitíriase versicolor e candidíase (HAY, 1983; JANSSEN-CILAG FARMACÊUTICA, 2006). Este medicamento pode ser administrado via oral através dos comprimidos ou com uso tópico, nas formas de creme, xampu (CHOI; JUHASZ; ATANASKOVA MESINKOVSKA, 2019). O mecanismo de ação fungistático ou fungicida desta substância se dá por meio da inibição de um esteróide presente na membrana dos fungos causadores da infecção, o ergosterol (IGNACIO, 2022). Este esterol tem sido considerado na estimativa de biomassa fúngica que pode estar relacionada ao crescimento fúngico (GALVÃO et al., 2003).

Figura 2 - Estrutura química do cetoconazol



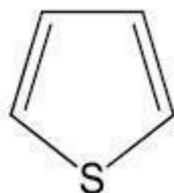
Fonte: BRITISH PHARMACOPEIA (2009).

### 2.4.2 Derivados tiofênicos

Novos métodos antifúngicos vêm sendo estudados como possibilidade de terapia antimicrobiana, a exemplo dos tiofenos (Figura 3). Compostos químicos heterocíclicos aromáticos formados por átomos de Carbono, Enxofre e Hidrogênio. Esta composição torna o tiofeno viável e destaca sua fama na química medicinal. A porção 2-aminotiofeno (Figura 4) apresenta grande relevância e responsabilidade na execução dessas atividades biológicas (BOZOROV et al., 2017; HUANG; DÖMLING, 2010). Isso porque a estrutura molecular dos tiofenos pode sofrer mudanças em sua conformação implicando diretamente no seu mecanismo de ação (WANG et al., 2017). A produção destes compostos vem se destacando ultimamente pela sua importância

e funcionalidade biológica, principalmente no âmbito farmacêutico como terapia antifúngica, antitumoral, anticoagulante (MABKHOT et al., 2016).

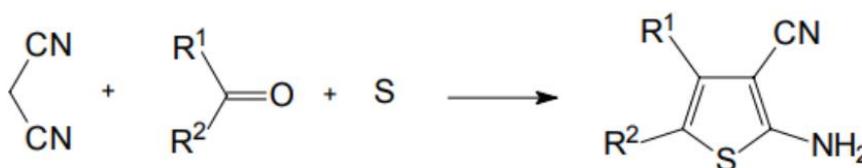
Figura 3 - Estrutura do tiofeno



Fonte: OLIVEIRA (2010).

Os derivados tiofênicos 2-Amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofeno-3-carbonitrilo (6CN), figura 5, e 2-amino-5,6,7,8-tetrahidro-4H-ciclo-hepta [b] -tiofeno-3-carbonitrilo (7CN), observado na figura 6, são exemplos da grande variedade de compostos bioativos sintetizados a partir do 2-aminotiofeno (Figura 4) através da reação de Gewald (GEWALD; SCHINKE; BÖTTCHER, 1966). Os derivados 6CN e 7CN utilizados no presente estudo apresentam-se em aspecto pulverulento.

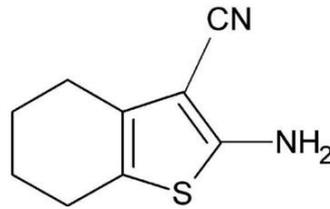
Figura 4 - Reação de Gewald



Fonte: OLIVEIRA (2010).

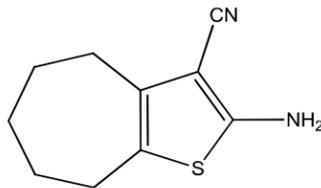
Apesar da aplicabilidade no âmbito farmacológico de acordo com o perfil inibitório estudado destas moléculas, 6CN (Figura 5) apresenta, quimicamente, uma baixa solubilidade aquosa que, conseqüentemente, ocasiona uma redução na biodisponibilidade tendo sua administração por via oral comprometida (LIMA et al., 2008).

Figura 5 - Estrutura química do derivado 6CN



Fonte: Grupo de pesquisa de Farmacologia, Fisiologia e Química Medicinal da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB).

Figura 6 - Estrutura química do derivado 7CN



Fonte: Grupo de pesquisa de Farmacologia, Fisiologia e Química Medicinal da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB).

Em estudos realizados por Wang et al., 2017, observou-se indução à apoptose celular por influenciar a fase G2 do ciclo celular através de derivados tiossemicarbazona em atividade antiproliferativa sobre células tumorais. Em estudos de Mendonça Júnior e colaboradores (2011), foi evidenciada atividade antifúngica promissora de derivados tiofênicos que apresentavam grupo Nitro em sua estrutura, como o 6CN10, contra cepas de *Candida* spp. e *Cryptococcus* spp.

## 2.5 Importância do teste de susceptibilidade

No que concerne às infecções fúngicas associadas às espécies do gênero *Malassezia* e a falta de eficácia dos tratamentos convencionais voltados às enfermidades pelo uso indiscriminado dos compostos ativos dos medicamentos, os testes de susceptibilidade tornaram-se uma estratégia na busca de novas substâncias com potenciais de se tornarem novas terapias para o controle dos microrganismos patogênicos (DIAS et al., 2010; LEANDRO et al., 2012).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Autenticar taxonomicamente amostras de *Malassezia* sp. e avaliar o perfil de susceptibilidade antifúngica destes isolados diante da atividade de compostos bioativos.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Identificar genotipicamente cepas obtidas da Micoteca URM e do acervo do grupo de pesquisa “Fungos de interesse médico e leveduras de interesse biotecnológico” do Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco;
- Autenticar os isolados recebidos da Micoteca URM através do sequenciamento genético;
- Analisar o perfil de susceptibilidade *in vitro* dos isolados frente ao cetoconazol e aos derivados tiofênicos 6CN e 7CN através das concentrações inibitórias mínimas (CIMs).

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Obtenção dos isolados

Para avaliar a susceptibilidade antifúngica de espécies de *Malassezia*, foram solicitados os isolados fúngicos do gênero à Coleção de Cultura Micoteca URM, que consiste em uma coleção de culturas fúngicas. Os pedidos foram enviados através de um formulário preenchido com o código da amostra, nome do solicitante, laboratório de interesse e o departamento no qual está inserido. Além disso, a avaliação também foi aplicada às cepas do acervo do laboratório de Micologia Médica Sylvio Campos do grupo de pesquisa Fungos de interesse médico e leveduras de interesse biotecnológico do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco.

### 4.2 Isolamento fúngico

Para isolar o agente e, posteriormente identificar a espécie, as cepas obtidas do acervo do Laboratório de Micologia Médica e as recebidas da coleção de culturas da Micoteca URM foram cultivadas em meio ágar Sabouraud (DIFCO) com Azeite de oliva acrescido de cloranfenicol em tubos de ensaio esterilizados devido à afinidade por lipídios e/ou lipodependência que as espécies do gênero possuem. Os isolados foram mantidos à temperatura ambiente e à temperatura de 37 °C. Para dar continuidade aos experimentos e manter os isolados na coleção do grupo de Pesquisa “Fungos de interesse médico e leveduras de interesse biotecnológico”, foram realizados novos repiques dos isolados obtidos para novos tubos de ensaio com meio SDA acrescido de azeite de oliva. Tal técnica utilizada é conhecida como repique e a transposição de um meio para outro foi realizada por meio de uma estria, com o auxílio de uma alça descartável (CAPRETTE, 2017).

### 4.3 Extração de DNA

Para a identificação genômica, após o crescimento das colônias de leveduras, uma parte da massa celular foi retirada e transferida para um tubo *Eppendorf* seco seguindo os protocolos de Brandão et al. (2011) com modificações, pelo método

CTAB. As células armazenadas no tubo foram congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Tal processo é realizado para análise molecular e para que o DNA seja extraído. Ao *Eppendorf* seco contendo a amostra, adicionou-se então  $650\mu\text{l}$  do tampão de extração (CTAB 2%, NaCl 1.5 M, 100mM de Tris-HCl, 20mM de EDTA e polivinilpirrolidona 1%) auxiliando na lise da parede celular. As amostras foram homogeneizadas em um vórtex (Basic 2.800 Rpm Kasvi) e incubadas no Termobloco a  $65^{\circ}\text{C}$  por 15 min. Posteriormente, foram centrifugadas a 13.000 Rpm por 10 minutos.

Em seguida, para o processo de purificação do DNA foi transferido a um novo tubo  $650\mu\text{l}$  do sobrenadante juntamente a  $650\mu\text{l}$  de Clorofórmio álcool-isoamílico (24:1). Após mais uma homogeneização no vórtex, as amostras foram novamente centrifugadas a 13.000 Rpm por 10 minutos para lavagem do DNA. O sobrenadante foi transferido novamente a um tubo seco e limpo e neste foi acrescentado  $40\mu\text{l}$  de acetato de sódio (3M) e a mesma proporção do sobrenadante do isopropanol. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (13000 Rpm por 10min) e ao final, o sobrenadante foi descartado. Observou-se então se houve formação do *pellet* de DNA e adicionou-se etanol a 70% a fim de suspender novamente este *pellet* e auxiliar na remoção de detritos presentes na amostra. Os materiais foram então centrifugados a 13000 rpm por 2 minutos e logo depois o sobrenadante foi descartado. O *pellet* é então desidratado a temperatura ambiente por cerca de 10min e o DNA é ressuspendido em água ultrapura (ddH<sub>2</sub>O/Milli-Q) até o período de realizar as análises.

#### 4.4 Eletroforese

Sob condições de corrente elétrica constante, a força de deslocamento de uma partícula é resultado da carga efetiva, da molaridade do tampão e da resistência do meio usado como suporte (ágar, acetato, gel capilar) (ECKERSALL, 2008). Para a eletroforese utilizando gel de agarose, foi utilizado 0,3g de agarose em 30mL de tampão (TAE 1x). Para corar dsDNA, ssDNA ou RNA em géis de agarose, adicionou-se um mix de GelRed® e GLB a cada amostra para dar início à corrida e separação dos componentes.

#### 4.5 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Utiliza-se reagentes e meios fundamentais para amplificação de um determinado segmento de DNA de cadeia dupla em uma reação em cadeia catalisada por uma polimerase de DNA termoestável, que passará por um processo de replicação originando outras cópias (GREEN, M. R.; SAMBROOK, J., 2018). Para este processo, preparou-se um mix de água ultrapura (ddH<sub>2</sub>O), tampão de amplificação (amplification buffer), dNTP (pH 8,0), os Primers: *Forward primer* e *Primer reverso*. Para identificação dos isolados de *Malassezia* e amplificação da região D1/D2 e retirada de um segmento viável, utilizou-se os *primers* NL1 (5'–GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG - 3') e NL4 (5' – GGTCCGTGTTTCAAGACGG - 3') (KURTZMAN E ROBNETT, 1998; LACHANCE et al., 1999). Adicionou-se também ao mix o DMSO e a *high fidelity dna polymerase* 5U (FERMENTAS™, CAN). Na reação final, adicionou-se 19µl do mix de reagentes preparado somado a 1µl do DNA molde em microtubos de 200 µl próprios para PCR. As reações foram processadas através do termociclador PCR (EPPENDORF™, USA).

Tabela 1 - Relação dos reagentes utilizados para preparação do *mix* por reação

Reagentes	1X
H <sub>2</sub> O	11,8 µl
<i>Amplification buffer</i>	4 µl
<i>Forward primer</i>	1 µl
<i>Primer reverso</i>	1 µl
DNA	1 µl
DMSO	0,6 µl
<i>Taq</i>	0,2 µl

Fonte: Protocolo da enzima *high fidelity dna polymerase* com adaptações.

Ao final da reação, preparou-se gel de agarose a 1% para uma nova eletroforese e quantificação dos produtos da PCR. Em parafilme, pipetou-se 5 µl do produto da PCR, 3 µl do GLB e 3 µl do GelRed. Após isso, as amostras foram sujeitas à corrida eletroforética a uma voltagem 100V em torno de 20min. Posteriormente à análise do gel e das bandas, os exemplares foram submetidos a um quantificador de DNA, RNA e proteínas (I-Quant Touch) a fim de comparar e avaliar as concentrações.

#### 4.6 Purificação dos produtos da PCR e Sequenciamento

Consiste na remoção dos resíduos dos reagentes utilizados na PCR que não foram integrados à reação. Neste processo, utilizou-se o kit de purificação por PCR GeneJet (Thermo Scientific™) com 1 µl da enzima Illustra, 1 µl do tampão da enzima e 3 µl do produto da PCR. Após o método próprio de purificação no termociclador (15min a 37°C 15min a 80°C), as amostras foram preparadas e submetidas ao sequenciamento com a colaboração do Plataforma de Sequenciamento – LABCEN/CB, UFPE com protocolos padronizados. Com o resultado do sequenciamento, as sequências foram analisadas com o auxílio de programas como o Sequencher 4.7. Através do BLAST, software disponível na plataforma NCBI (*National Center of Biotechnology Information*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). As sequências foram alinhadas de acordo com modelos disponíveis no banco de dados do GenBank a fim de observar as semelhanças. Para a construção da árvore filogenética a fim de realizar a verificação dos táxons, utilizou-se o programa *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA 11) com aplicação do método de *Neighbor Joining*, Máxima verossimilhança. Este procedimento contou com 32 sequências de nucleotídeos e as distâncias evolutivas foram estimadas com base no método *Maximum Composite Likelihood* com aplicação do teste de *bootstrap* previsto para 1000 repetições (TAMURA; NEI; KUMAR, 2004).

#### 4.7 Obtenção dos derivados tiofênicos

Para a avaliação do perfil de susceptibilidade das amostras sequenciadas, foram selecionados para os ensaios compostos bioativos, como os tiofenos. O presente trabalho utiliza dois derivados tiofênicos fornecidos por meio da colaboração com o grupo de pesquisa de Farmacologia, Fisiologia e Química Medicinal da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB). Os derivados tiofênicos foram introduzidos aos ensaios pelo teste de susceptibilidade com base na técnica de microdiluição (CLSI, 2008) a fim de analisar o quanto essas substâncias inibem o crescimento das cepas utilizadas através da Concentração Inibitória Mínima (CIM).

#### 4.8 Teste de susceptibilidade antifúngica *in vitro*

Com relação ao perfil de susceptibilidade *in vitro*, todos os isolados obtidos tanto da Coleção de cultura Micoteca URM, quanto do acervo do grupo de pesquisa Fungos de Interesse Médico e leveduras de interesse biotecnológico, foram utilizados nos ensaios a fim de analisar a atividade antifúngica do cetoconazol, fármaco convencional, e dos derivados tiofênicos 6CN e 7CN com base nos protocolos definidos no documento M27-A3 (CLSI, 2008), com adaptações para o gênero *Malassezia*, devido às suas exigências nutricionais conforme Chebil et al., 2022. Em criotubo, a fim de obter uma maior estabilidade, os derivados tiofênicos foram pesados ambos a 0,008g (0,8 µg) de acordo com os cálculos previsto para o ensaio. Estas moléculas foram solubilizadas com 50 µL de solvente DMSO (Sigma-Aldrich) e 50 µL de etanol absoluto. Em substituição do RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, EUA), usou-se caldo Sabouraud dextrose (Biolife, Milano, Itália) acrescido de 1% de *Tween* 80 (Sigma Co., Milano, Itália) (CHEBIL et al., 2022) como fonte de lipídio para o fungo para distribuição na placa de microtitulação de 96 poços (CAFARCHIA et al., 2012; IATTA et al., 2014). Para 500 mL de meio, usou-se 10g de glicose, 5g de peptona e 5 mL de *Tween* 80. Para padronização dos isolados em espectrofotômetro, a suspensão dos inóculos foram realizadas em água destilada esterilizada para obtenção de valores de transmitância a 90% a um comprimento de onda de 530 nm após o período de 2 dias de crescimento na incubadora B.O.D. (*Biochemical Oxygen Demand*) conforme protocolos do documento. Esta análise gera uma suspensão de armazenamento de leveduras de  $1 \times 10^6$  a  $5 \times 10^6$  unidades formadoras de colônias (UFC) /mL. A inoculação em meio caldo Sabouraud contendo 1% de *Tween* 80 foi feita na sequência de duas diluições: a primeira, de 1:100 (10 µL) e a segunda de 1:20 (50 µL) a fim de se obter uma suspensão celular de  $5,0 \times 10^2$  a  $2,5 \times 10^3$  de células por mL. Pipetou-se então um volume final de 100 µL nos 96 poços (Kasvi®) da placa juntamente aos 100 µL da diluição dos tiofenos utilizados e do cetoconazol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) em intervalos de concentração de 0,03 a 16 µg/mL para avaliar uma inibição de 50%. Para os tiofenos, as concentrações foram preparadas e utilizadas no intervalo de 0,195 a 400 µg/mL para avaliar 100% de sua inibição. A utilização do fármaco cetoconazol serviu à título de comparação mediante as novas moléculas devido a sua reconhecida atividade biológica. Estabeleceu as CIMs como

a mínima concentração de medicamento e dos tiofenos que conseguiram inibir o crescimento fúngico levando em consideração os controles sem fármacos e sem 6CN e 7CN. Além disso, foi utilizada a cepa padrão ATCC 22019 (*Candida parapsilosis*) como controle de qualidade a fim de averiguar a eficácia e qualidade dos resultados. As placas foram incubadas a 32 °C e sua leitura foi realizada após o período de 48 e 72 h a fim de verificar se houve ou não crescimento fúngico (CHEBIL et al., 2022). Com relação às concentrações inibitórias mínimas (CIMs), a menor concentração onde o composto conseguiu inibir o crescimento, estabeleceu-se inibição de 100% para os novos compostos bioativos utilizados e 50% para o cetoconazol.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 Obtenção dos isolados de *Malassezia* sp.

Dos 16 isolados obtidos da Coleção de Cultura Micoteca URM, foram identificados 11 isolados (68,75%) como *Malassezia furfur*, três (18,75%) isolados de *Malassezia sympodialis*, um isolado (6,25%) de *Malassezia slooffiae* e um isolado (6,25%) como *Malassezia globosa* (Tabela 2). Entretanto, os três isolados (53, 60 e 84) obtidos do acervo do grupo de pesquisa Fungos de Interesse Médico e Leveduras de Interesse Biotecnológico estavam definidos a nível de gênero. De acordo com o gênero e com a identificação numérica da linhagem, foram encontrados, para alguns isolados, registros de seu ano de depósito e dos substratos/hospedeiros.

Tabela 2 – Isolados de *Malassezia* sp. obtidos da Coleção de Cultura Micoteca URM, UFPE e do acervo do grupo de pesquisa “Fungos de interesse médico e leveduras de interesse biotecnológico” do Departamento de Micologia

Espécies	Isolados (Códigos)	Ano de depósito	Substrato/hospedeiro
<i>Malassezia sympodialis</i>	URM5542	2007	Escamas epidérmicas
<i>M. furfur</i>	URM2881	1986	---
<i>M. furfur</i>	URM4502	2002	Escamas epidérmicas
<i>M. furfur</i>	URM4227	---	Escamas epidérmicas
<i>M. furfur</i>	URM4226	---	Escamas epidérmicas
<i>M. sympodialis</i>	URM4499	2002	Escamas epidérmicas
<i>M. furfur</i>	URM4220	---	Escamas epidérmicas
<i>M. slooffiae</i>	URM4813	---	Escamas epidérmicas
<i>M. furfur</i>	URM6190	2010	Escamas epidérmicas
<i>M. sympodialis</i>	URM6193	2010	Escamas epidérmicas
<i>M. furfur</i>	URM4849	2004	Escamas epidérmicas
<i>M. furfur</i>	URM5982	2009	---
<i>M. furfur</i>	URM3876	1997	Pele humana
<i>M. globosa</i>	URM4850	2004	Escamas epidérmicas
<i>M. furfur</i>	URM5977	2009	Escamas epidérmicas
<i>M. furfur</i>	URM5389	2006	Escamas epidérmicas
<i>Malassezia</i> sp.	53	---	---
<i>Malassezia</i> sp.	60	---	---
<i>Malassezia</i> sp.	84	---	---

\*(-- --) não apresentam registros de ano de depósito e de substrato/hospedeiro

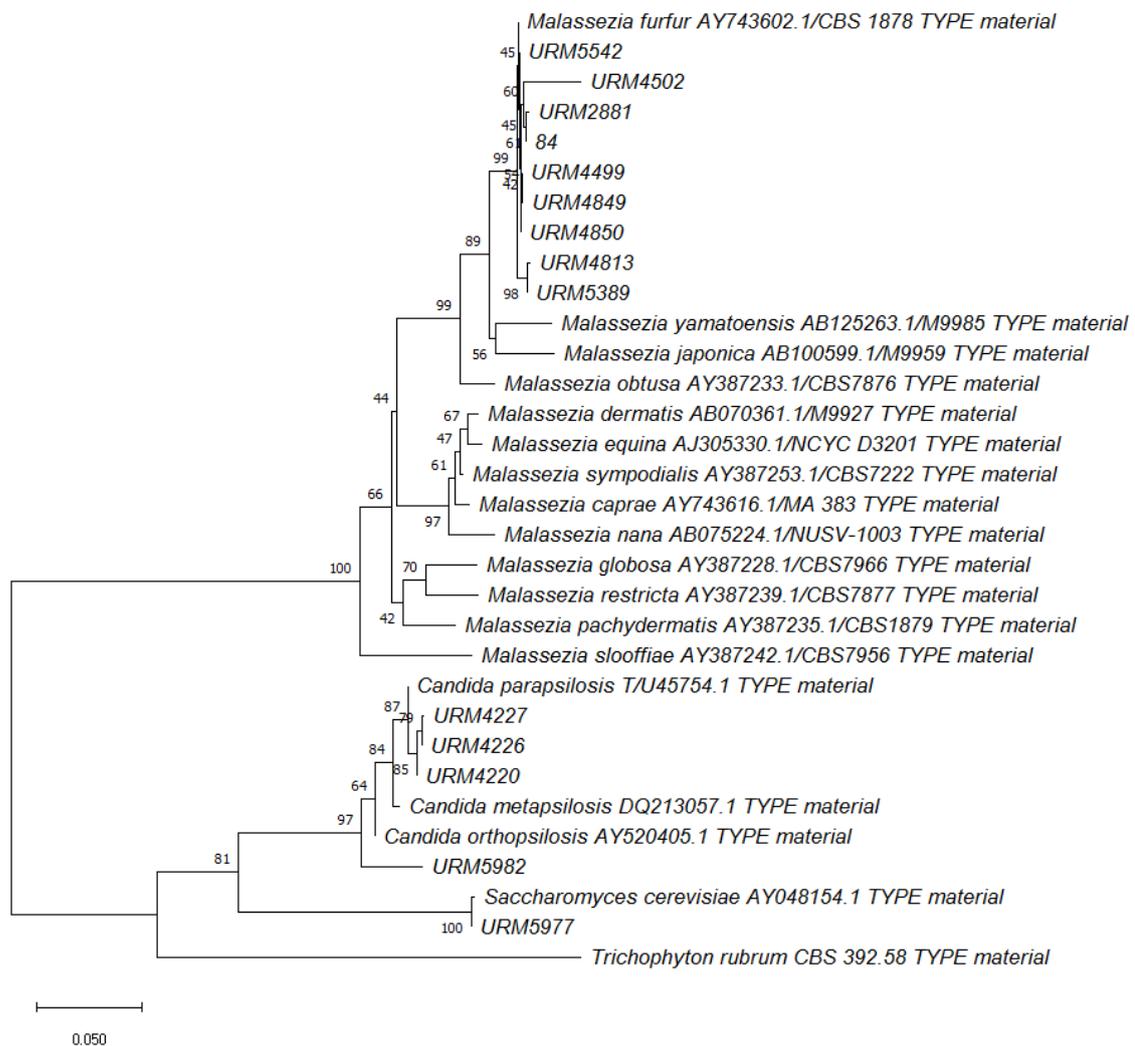
Fonte: A autora (2023).

Estes isolados foram cultivados em meio ágar Sabouraud dextrose (SDA) adicionado de azeite de oliva. Com relação ao período de estocagem desses isolados URM e sua utilização no presente trabalho, foi possível analisar que as amostras se mostraram viáveis para o estudo mesmo estando estocadas por muitos anos. Isso pode ser atribuído às manutenções e às metodologias de preservação realizadas pela Coleção de Cultura da Micoteca de forma a manter as características típicas do gênero.

## 5.2 Análise filogenética do gênero *Malassezia*

Para as análises filogenéticas, as sequências processadas foram comparadas com sequências já depositadas em bancos de dados, utilizou-se o *GenBank* por meio da ferramenta BLAST, onde também foi possível alinhar as sequências que apresentavam semelhanças. Para isso, adotou-se como critério um fator maior ou igual a 99% para definição a nível de espécie. A árvore filogenética (Figura 7) elaborada pela ferramenta MEGA 11 por meio do método *Neighbor Joining* após a obtenção das sequências, abrange apenas os isolados que tiveram a região D1/D2 do rRNA sequenciada. Diante disso, os isolados URM6190, URM6193, URM3876, 53 e 60 não foram abordados nessa relação filogenética. Os demais isolados utilizados nos estudos (URM5542, URM4502, URM2881, 84, URM4499, URM4849, URM4850, URM4813, URM5389, URM4227, URM4226, URM4220, URM5982 e URM5977) expressaram altos graus de similaridades com espécies tipos de acordo com o *GenBank*.

Figura 7 – Árvore filogenética dos isolados sequenciados obtidos da Coleção de Cultura da Micoteca URM. Análise de Neighbor joining, Máxima verossimilhança usando ferramenta MEGA 11



Dentre os 14 isolados sequenciados, foram identificadas 9 isolados com grau de parentesco com *Malassezia furfur*, 3 isolados com o gênero *Candida* sp., 1 isolado com seu grupo irmão *Candida orthopsilosis* e 1 isolado com *Saccharomyces cerevisiae*. Com isso, observou-se que muitos isolados anteriormente descritos como pertencentes a um determinado gênero, após a identificação através do sequenciamento da região D1/D2 apresentaram parentescos filogenéticos com o gênero *Candida* e *Saccharomyces* além do gênero *Malassezia*. Tal relação consta na Tabela 3. É provável que o levantamento e caracterização das espécies tenha sido influenciado também pela morfologia e aspectos das colônias, visto que as colônias

de *Malassezia* podem ter modificações macromorfológicas bastante semelhantes aos outros dois gêneros identificados.

Tabela 3 - Identificação genômica dos isolados através do sequenciamento da região D1/D2 do gene ribossômico e da análise filogenética pelo método Neighbor joining, Máxima verossimilhança

Isolados	Códigos	Identificação por meio do sequenciamento da região D1/D2 e proximidade filogenética
<i>Malassezia sympodialis</i>	5542	<i>Malassezia furfur</i>
<i>M. furfur</i>	2881	<i>Malassezia</i> sp.
<i>M. furfur</i>	4502	<i>Malassezia</i> sp.
<i>M. furfur</i>	4227	<i>Candida</i> sp.
<i>M. furfur</i>	4226	<i>Candida</i> sp.
<i>M. sympodialis</i>	4499	<i>Malassezia</i> sp.
<i>M. furfur</i>	4220	<i>Candida</i> sp.
<i>M. slooffiae</i>	4813	<i>Malassezia</i> sp.
<i>M. furfur</i>	6190*	- - -
<i>M. sympodialis</i>	6193*	- - -
<i>M. furfur</i>	4849	<i>Malassezia</i> sp.
<i>M. furfur</i>	5982	<i>Candida orthopsilosis</i>
<i>M. furfur</i>	3876*	- - -
<i>M. globosa</i>	4850	<i>Malassezia</i> sp.
<i>M. furfur</i>	5977	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>M. furfur</i>	5389	<i>Malassezia</i> sp.
<i>Malassezia</i> sp.	53*	- - -
<i>Malassezia</i> sp.	60*	- - -
<i>Malassezia</i> sp.	84	<i>Malassezia</i> sp.

(\*) Isolados não sequenciados

Fonte: A autora (2023).

Dessa maneira, o sequenciamento da região D1/D2 por meio dos iniciadores NL1 e NL4 por PCR somado às análises filogenéticas realizadas pelas ferramentas BLAST e MEGA 11, permitiram a autenticação taxonômica dos isolados abordados no presente estudo. Com base no material tipo de *Malassezia furfur*, é possível inferir que o grupo faz parte de uma única descendência existindo um forte monofiletismo que separa o grupo *M. furfur* e o grupo URM 5542 do grupo que separa *M. yamatoensis* e *M. japônica*. Diante disso, os isolados depositados como *Malassezia sympodialis* (URM5542 e URM4499), como *Malassezia slooffiae* (URM4813) e como

*Malassezia globosa* (URM4850) constituem representantes próximos filogeneticamente da espécie *Malassezia furfur*. Neste clado, o isolado URM5542 é o grupo mais próximo e com maior parentesco com o grupo *Malassezia furfur* que os demais isolados. Os isolados URM4502 e URM2881 depositados como espécies de *Malassezia furfur* também apresentaram um forte parentesco com este grupo. Entretanto, o isolado 84 reconhecido apenas como *Malassezia* sp. pelo acervo do grupo de pesquisa e o isolado URM2881 são mais aparentados entre si do que com o grupo URM4502. Com relação aos isolados URM4499, URM4849 e URM4850, observou-se que estes apesar de terem a mesma origem filogenética, não possuem uma separação sólida e são mais aparentados entre si do que com as demais, tratando-se de um grupo parafilético. O monofiletismo presente entre os grupos URM4813 e URM5389 prediz que são grupos irmãos a nível de espécie, sendo mais aparentados entre si apesar da relação de parentesco com o grupo *Malassezia furfur*.

Os isolados depositados como *Malassezia furfur* (URM4220, URM4226 e URM4227) foram identificados com parentesco filogenético ao gênero *Candida*. O isolado URM4227 é mais próximo e aparentado do isolado URM4226 do que URM4220, que é grupo irmão de *Candida parapsilosis*. Percebeu-se também um forte parentesco entre o isolado URM5982, depositado também como *Malassezia furfur*, com o grupo *Candida orthopsilosis*. *Trichophyton rubrum* trata-se de um grupo externo utilizado na construção da árvore filogenética.

### 5.3 Perfil de susceptibilidade dos isolados ao cetoconazol

A análise do perfil de susceptibilidade de *Malassezia* aos compostos foi baseada em protocolos que constam no documento M27-A3 (CLSI 2008). Com relação às modificações aplicadas ao gênero e às leituras, seguiu-se as normas referidas por Mulu *et al.*, visto que no documento M27-A3 (CLSI 2008) não constam registros para *Malassezia* sp. Observou-se que, após 48h de leitura para a cepa ATCC 22019 (*Candida parapsilosis*) e após 72h para os demais isolados, as cepas apresentaram concentração inibitória mínima (CIM) em um intervalo de 0,125 a 4µg/mL em uma faixa de variação testada de 0,03 à 16 µg/mL ao cetoconazol (Tabela 3), levando em consideração o poço controle. Em outros estudos com *Malassezia* sp., observou-se valores de MIC<sub>50</sub> para o cetoconazol menor do que os obtidos no

presente estudo. Como nos testes de Jesus *et al* (2011), onde foi avaliada a susceptibilidade de *Malassezia* sp. a este fármaco e observou um MIC de 0,03 µg/mL em um intervalo de 0,007 a 16 µg/mL. Além disso, em um trabalho desenvolvido por Weiler *et al.* (2013), foi analisado um MIC<sub>50</sub> 0,06 µg/mL no intermédio de 0,007 a 16 µg/mL também demonstra essa diminuição comparada aos observados neste trabalho.

Com relação à cepa ATCC 22019 (*Candida parapsilosis*), utilizada como controle de qualidade, estudos sugerem um MIC de 0,03 µg/mL ao cetoconazol para o gênero *Candida* (GOULART et al., 2018). No estudo realizado, o isolado controle ATCC 22019 apresentou CIM de 0,5 µg/mL ao fármaco. Este dado foi maior em comparação aos observados em outras literaturas. O isolado URM5977, com grau de parentesco muito significativo com a espécie *Saccharomyces cerevisiae*, não apresentou susceptibilidade no intervalo de concentração utilizado da droga. As concentrações observadas a 50% de inibição do cetoconazol nos intervalos de 0,125 a 4 µg/mL (tabela 3) ressaltaram a susceptibilidade dos isolados a este fármaco. Nesse caso, às leveduras aparentadas com o gênero *Malassezia* e com o gênero *Candida*, conforme observado nas relações filogenéticas. Os isolados URM2881 (*Malassezia* sp.) e URM6190 não apresentaram CIMs ao cetoconazol (Tabela 3).

#### 5.4 Perfil de susceptibilidade dos isolados aos derivados tiofênicos

Sobre a utilização dos derivados tiofênicos 6CN, nomeado como T1, e 7CN, como T2, observou-se, após 48h de leitura para a cepa ATCC 22019 (*Candida parapsilosis*) e após 72h para os demais isolados, que o composto 6CN apresentou 100% de inibição nos intervalos de 100 à <400 µg/mL. Isso evidencia atividade antifúngica contra os isolados utilizados e seus graus de parentesco com sequências pré-definidas pelo banco de dados. Os dois compostos tiofênicos apresentaram respostas satisfatórias na inibição dos isolados. Entretanto, a atividade antifúngica do composto 6CN pode ser considerada melhor devido às menores concentrações inibitórias mínimas observadas em comparação ao composto 7CN (tabela 3) podem ser consideradas respostas satisfatórias na inibição dos isolados

Tabela 4 - Concentrações inibitórias mínimas dos isolados obtidos frente ao cetoconazol e aos derivados tiofênicos 6CN (T1) e 7CN (T2)

Numeração	Espécies	Tiofenos		Cetoconazol
		T1 (6CN)	T2 (7CN)	
1	URM3876	200 µg/mL	200 µg/mL	0,125 µg/mL
2	<i>Malassezia</i> sp.	200 µg/mL	200 µg/mL	1 µg/mL
3	<i>Malassezia</i> sp.	200 µg/mL	400 µg/mL	0,25 µg/mL
4	<i>Malassezia</i> sp.	200 µg/mL	400 µg/mL	0,25 µg/mL
5	<i>Candida</i> sp.	>400 µg/mL	>400 µg/mL	0,5 µg/mL
6	<i>Candida</i> sp.	-	-	-
7	53	200 µg/mL	400 µg/mL	1 µg/mL
8	<i>Malassezia furfur</i>	200 µg/mL	400 µg/mL	0,25 µg/mL
9	<i>Malassezia</i> sp.	200 µg/mL	400 µg/mL	0,25 µg/mL
10	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	>400 µg/mL	>400 µg/mL	>16 µg/mL
11	<i>Malassezia</i> sp.	100 µg/mL	200 µg/mL	0,25 µg/mL
12	60	400 µg/mL	400 µg/mL	4 µg/mL
13	<i>Candida orthopsilosis</i>	200 µg/mL	>400 µg/mL	1 µg/mL
14	URM6193	100 µg/mL	400 µg/mL	0,125 µg/mL
15	<i>Malassezia</i> sp.	100 µg/mL	200 µg/mL	0,25 µg/mL
16	URM6190	-	-	-
17	<i>Malassezia</i> sp.	200 µg/mL	200 µg/mL	0,125 µg/mL
18	<i>Candida</i> sp.	>400 µg/mL	>400 µg/mL	1 µg/mL
19	<i>Candida</i> sp.	>400 µg/mL	>400 µg/mL	0,5 µg/mL
20	ATCC 22019	>400 µg/mL	>400 µg/mL	0,5 µg/mL

Fonte: A autora (2023).

No estudo foi visto que os isolados URM5389 e URM4499, que apresentam parentesco com o gênero *Malassezia* sp. e o isolado URM6193 apresentaram CIMs de 100 µg/mL frente ao composto tiofênico 6CN (t1). Com relação ao derivado tiofênico 7CN (t2), os isolados apresentaram CIMs de 200 à >400 µg/mL, podendo inferir que sua atividade inibitória foi menor que a do composto 6CN. A cepa ATCC 22019 (*Candida parapsilosis*) utilizada como controle de qualidade, não apresentou concentração inibitória mínima aos derivados tiofênicos 6CN e 7CN. Isso também pôde ser observado com os isolados URM4220, URM4226, URM4227, aparentados filogeneticamente com o gênero *Candida* sp. (Figura 7), e com o isolado URM5977, grupo irmão de *Saccharomyces cerevisiae*. Tal fato pode sugerir uma menor atividade inibitória desses derivados tiofênicos ao gênero *Candida* sp., como também, ao gênero *Saccharomyces* visto que, pelo menos na faixa intervalar de concentração utilizada, não apresentaram inibição.

Ressalta-se que os isolados URM6190, URM6193, URM3876, 53 e 60 apresentaram problemas no sequenciamento tornando inviável sua análise filogenética e parentesco evolutivo. No entanto, esses isolados também foram utilizados no ensaio de sensibilidade *in vitro* ao cetoconazol e aos derivados tiofênicos 6CN e 7CN. Desses, os isolados URM6193, URM3876 e 53 apresentaram concentrações inibitórias mínimas ao composto 6CN e ao cetoconazol.

Salienta-se que os compostos tiofênicos continuam sendo sintetizados com ampla variedade e modificações em sua estrutura, podendo produzir novas séries de derivados tiofênicos com atividades e aplicações diferentes. Isso pode implicar diretamente no seu mecanismo de ação antifúngico.

## 6. CONCLUSÕES

Diante dos resultados observados no estudo, pode-se concluir que:

- A identificação molecular através do sequenciamento genético utilizando os iniciadores NL1/NL4 foi eficaz, apresentando relações de parentesco com seqüências de outros grupos de *Malassezia* sp. presentes em bancos de dados;
- A análise permitiu a realocação de cepas previamente descritas como *Malassezia* sp. para gêneros com relação de parentesco com *Candida* sp. e *Saccharomyces* sp.;
- O cetoconazol apresentou respostas satisfatórias na inibição de isolados com grau de parentesco aos gêneros *Candida* e *Malassezia*;
- Os derivados tiofênicos 6CN e 7CN apresentaram atividade inibitória do crescimento fúngico dos isolados dos gêneros *Candida* e *Malassezia* embora 6CN tenha inibido em menores CIMs;
- São necessárias análises filogenéticas ainda mais robustas a fim de reafirmar com mais exatidão as relações de parentesco dos isolados a nível de espécie;
- É fundamental que novos ensaios para avaliar o perfil de susceptibilidade de *Malassezia* sp. aos derivados tiofênicos sejam realizados, devido às mudanças estruturais na conformação destes compostos e da influência em sua ação biológica.

## REFERÊNCIAS

- AGUIAR, A. C. V.; et al. Evaluation of the antiproliferative activity of 2-amino thiophene derivatives against human cancer cells lines. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v. 84, p. 403–414, 1 dez. 2016.
- BATRA, R.; et. al. *Malassezia* Baillon, emerging clinical yeasts. **FEMS. Yeast Res.** V.5, p. 1101-1113, 2005.1.
- BENJAMIN, M. D. et al. Colonisation à levures chez les prématurés de moins de 1500g hospitalisés en réanimation néonatale. **Archives de Pédiatrie**, v. 23, n. 9, p. 887–894, 1 set. 2016.
- BOZOROV, K. et al. 2-Aminothiophene scaffolds: Diverse biological and pharmacological attributes in medicinal chemistry. **European journal of medicinal chemistry**, v. 140, p. 465–493, 21 set. 2017.
- BRANDÃO, L. R.; et al. Yeasts from an oligotrophic lake in Patagonia (Argentina): Diversity, distribution and synthesis of photoprotective compounds and extracellular enzymes. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 76, n. 1, p. 1–13, 2011.
- CAFARCHIA, C. et al. Assessment of the antifungal susceptibility of *Malassezia pachydermatis* in various media using a CLSI protocol. **Veterinary Microbiology**, v. 159, n. 3-4, p. 536–540, out. 2012.
- CAPRETTE, D. R. Preparing and using agar slant tubes. **Laboratory Studies in Microbiology. Rice University**. 2017.
- CHEBIL, W. et al. In Vitro Assessment of Azole and Amphotericin B Susceptibilities of *Malassezia* spp. Isolated from Healthy and Lesioned Skin. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 9, p. 959, 1 set. 2022.
- CHEIKHROUHOU, F. et al. Molecular Identification of *Malassezia* Species in Patients with *Malassezia folliculitis* in Sfax, Tunisia. **Mycopathologia**, v. 182, n. 5-6, p. 583–589, 20 jan. 2017.
- CHIANG, C. M.; CHOW, L. T.; BROKER, T. R. Identification of Alternatively Spliced mRNAs and Localization of 5' Ends by Polymerase Chain Reaction Amplification. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 15, p. 189–198, 1993.
- CRESPO-ERCHIGA, V.; GÓMEZ-MOYANO, E.; CRESPO, M. Pityriasis Versicolor and the Yeasts of Genus *Malassezia*. **Actas Dermo-Sifiliográficas (English Edition)**, v. 99, n. 10, p. 764–771, 2008.
- DANESHMEND, T. K.; WARNOCK, D. W. Clinical pharmacokinetics of ketoconazole. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 14, n. 1, p. 13–34, 1 jan. 1988.

DIAS, M. et al. Antibióticos e resistência bacteriana, velhas questões, novos desafios. **Cadernos Otorrinolaringologia**. Clínica, investigação e inovação, 16 de dez de 2010.

ECKERSALL, P. D. Proteins, proteomics and the dysproteinemias. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 6th ed. Burlington: Academic Press, 2008. p. 117-155.

ELLER, M. S.; OSTROM, K.; GILCHREST, B. A. DNA damage enhances melanogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 3, p. 1087–1092, 6 fev. 1996.

ERCHIGA, V. C.; FLORENCIO, V. D. *Malassezia* species in skin diseases. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 15, n. 2, p. 133–142, abr. 2002.

FORERO. J. S. B.; CARVALHO, E.M.; JUNIOR, J.J.; SILVA, F.M. A New Protocol or The Synthesis of 2-Aminothiophenes Through The Gewald Reaction in Solvent-Free Conditions. **Heterocyclic Letters**, v. 1, n. 1, p. 61-67, 2011.

FRAMIL, V. M. DE S. et al. Pitiríase versicolor: isolamento e identificação das principais espécies de *Malassezia*. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, n. 1, p. 111–114, fev. 2010.

GALVIS-MARÍN, J. C. et al. [In vitro antifungal activity of azoles and amphotericin B against *Malassezia furfur* by the CLSI M27-A3 microdilution and Etest® methods]. **Revista Iberoamericana De Micologia**, v. 34, n. 2, p. 89–93, 2017.

GALVÃO, J. G. et al. Uso do fungo *Fusarium oxysporum* como indicador de ametrina, através da medida de biomassa, pela quantificação do ergosterol. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, p. 840–845, 1 ago. 2003.

GEWALD, K.; SCHINKE, E.; BOTTCHE, H. 2-amiono-thiophene aus methylenaktiven nitrilen, carbonylverbindungen und schwefel. **Chemische Berichte**, v. 99, p. 94-100, 1966.

GOULART, L. S. et al. Oral colonization by *Candida* species in HIV-positive patients: association and antifungal susceptibility study. **Einstein (São Paulo)**, v. 16, n. 3, 6 ago. 2018.

GREEN, M. R.; SAMBROOK, J. The Basic Polymerase Chain Reaction (PCR). **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2018, n. 5, p. pdb.prot095117, maio 2018.

GRILLO, V. T..R. S. et. al. Incidência bacteriana e perfil de resistência a antimicrobianos em pacientes pediátricos de um hospital público de Rondônia, Brasil. **Revista Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada**, n. 34, vol. 1, p. 117-123, 2013.

GUÉHO, E.; MIDGLEY, G. & GUILLOT, J. The genus *Malassezia* with description of four new species. **Antonie van Leeuwenhoek**, 69(4): 337-55, 1996.

H. YEŞİM KARASULU et al. Efficacy of a new ketoconazole bioadhesive vaginal tablet on *Candida albicans*. **Farmaco**, v. 59, n. 2, p. 163–167, 1 fev. 2004.

HAMIDIZADEH, Nasrin et al. Composition of minerals and trace elements at Mamasani thermal source: A possible preventive treatment for some skin diseases. **Journal of education and health promotion**, v. 6, 2017.

HAY, R. J. Ketoconazole in the treatment of fungal infection. **The American Journal of Medicine**, v. 74, n. 1, p. 16–19, jan. 1983.

HOOG, GS. et al. Atlas de fungos clínicos , 2ª ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Amsterdam, 1126 pp. 2000.

HUANG, Y.; DÖMLING, A. The Gewald multicomponent reaction. **Molecular Diversity**, v. 15, n. 1, p. 3–33, 27 fev. 2010.

IANIRI, G.; HEITMAN, J.; SCHEYNIUS, A. The Skin Commensal Yeast *Malassezia globosa* Thwarts Bacterial Biofilms to Benefit the Host. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 138, n. 5, p. 1026–1029, maio 2018.

IATTA, R. et al. In vitro antifungal susceptibility of *Malassezia furfur* from bloodstream infections. **Journal of Medical Microbiology**, v. 63, n. 11, p. 1467–1473, 1 nov. 2014.

IGNACIO, R. F. Resumo sobre Cetoconazol: indicações, farmacologia e mais! Disponível em: <https://med.estrategia.com/portal/conteudos-gratis/farmacos/resumo-cetoconazol/>>. Acesso em: 02 agosto 2023

ILAHI, A. et al. Real-Time PCR Identification of Six *Malassezia* Species. **Current Microbiology**, v. 74, n. 6, p. 671–677, 22 mar. 2017.

JANSSEN-CILAG FARMACÊUTICA. Informações importantes sobre a prescrição de Nizoral® comprimidos (cetoconazol), 2006. Disponível em: <https://www.saudedireta.com.br/catinc/drugs/bulas/cetonaxcomp.pdf>. Acesso em: 10 de agosto de 2023.

JESUS, F.P.K. et al. In vitro susceptibility of fluconazole-susceptible and -resistant isolates of *Malassezia pachydermatis* against azole. **Vet. Microbiol.** v. 152, p. 161-164, 2011.

KANAFANI, Z. A.; PERFECT, J. R. Resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. **Clinical Infectious Diseases**, n. 46, vol. 1, p.120-128, 2008.

LAUTERT, C. Caracterização de isolados do fungo *Malassezia pachydermatis* através do perfil enzimático. **lume.ufrgs.br**, 2010.

LEANDRO, B. P. D.; et al. A resistência bacteriana e a importância do antibiograma

nessa problemática. Universidade Federal do Ceará Campus Cariri IV Encontro Universitário da UFC no Cariri Juazeiro do Norte-CE, 17 a 19 de Dezembro de 2012.

LEAW, S. N. et al. Identification of Medically Important Yeast Species by Sequence Analysis of the Internal Transcribed Spacer Regions. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 693–699, mar. 2006.

LEUNG, A. K. et al. Tinea versicolor: an updated review. **Drugs in Context**, v. 11, p. 1–20, 14 nov. 2022.

LIMA, A. A .N. et al. Technologies alternatives to improve solubility of poorly water soluble drugs. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 27, p. 789-797, 2008 I

LIN, J. Y.; FISHER, D. E. Melanocyte biology and skin pigmentation. **Nature**, v. 445, n. 7130, p. 843–850, fev. 2007.

MABKHOT, Y. et al. Synthesis and Structure-Activity Relationship of Some New Thiophene-Based Heterocycles as Potential Antimicrobial Agents. **Molecules**, v. 21, n. 8, p. 1036, 9 ago. 2016.

MARCON, M. J.; POWELL, D. A. Human infections due to *Malassezia* spp. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 5, n. 2, p. 101–119, 1 abr. 1992.

MORRIEN, J. J. [The morphology of *Malassezia furfur* (Robin) (Baillon, 1889)]. **Nederlands Tijdschrift Voor Geneeskunde**, v. 106, p. 1049–1050, 19 maio 1962.

MULU, A. et al. Frequent detection of “azole” resistant *Candida* species among late presenting AIDS patients in northwest Ethiopia. **BMC Infectious Diseases**, v. 13, n. 1, 12 fev. 2013.

OLIVEIRA, J. R. DE; MAZOCCO, V. T.; STEINER, D. Pitiríase Versicolor. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 77, n. 5, p. 611–618, out. 2002.

PINTO, E. et al. Antifungal activity of synthetic di(hetero)arylamines based on the benzo[b]thiophene moiety. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 17, p. 8172–8177, 1 set. 2008.

PUBCHEM. **The PubChem Project**. Disponível em:

<<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 01 agosto 2023

PUTEROVA, Z.; KRUTOSIKIA, A.; VÉGH, D. Gewald Reaction: Synthesis, Properties and Applications of Substituted 2-Aminothiophenes. **Arkivoc**, [S.I.], v. 1, p. 209-46, 2010.

ROSA, L. D. et al. Presença de *Malassezia* sp. em cães da Unidade de Controle de Zoonoses de Guaraí (TO) e sua relação com humanos. **Health of Humans**, v. 1, n. 1, p. 1–8, 26 jun. 2019.

SCHLOTTFELDT, F. DOS S. et al. Reclassificação taxonômica de espécies do gênero *Malassezia*: revisão da literatura sobre as implicações clinicola boratoriais.

**Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 38, n. 3, jul. 2002.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G.; CORDEIRO, R. A. *Micologia Médica À Luz de Autores Contemporâneos*. Editora Guanabara Koogan– 1.ed. – Rio de Janeiro: 2004.

SIMMONS, R. B.; GUEHO, E. A new species of *Malassezia*. **Mycological Research**, v. 94, n. 8, p. 1146–1149, dez. 1990.

STAUB, I. et al. Determinação da segurança biológica do xampu de cetoconazol: teste de irritação ocular e avaliação do potencial de citotoxicidade in vitro. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 2, jun. 2007.

SUGITA, T. et. al. Quantitative analysis of cutaneous *Malassezia* in atopic dermatitis patients using real-time PCR. **Microbiol Immunol**. v. 50, p. 549-552, 2006.

SUGITA, T. et. al. A new yeast, *Malassezia yamatoensis*, isolated from a patient with seborrheic dermatitis, and its distribution in patients and healthy subjects. **Microbiol. Immunol**. p. 579-583, 2004.

SUGITA, T. et. al. Description of a new yeast species, *Malassezia japonica*, and its detection in patients with atopic dermatitis and healthy subjects. **J. Clin. Microbiol**. p. 4695-4699, 2003.

SUGITA, T. et. al.. New yeast species, *Malassezia dermatis*, isolated from patients with atopic dermatitis. **J. Clin. Microbiol**. p. 1363-1367, 2002.

TAMURA, K.; NEI, M.; KUMAR, S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 30, p. 11030–11035, 16 jul. 2004.

TAMURA, K.; STECHER, G.; KUMAR, S. OUP accepted manuscript. **Molecular Biology And Evolution**, v. 38, n. 7, 2021.

THEELEN, B. et al. *Malassezia* ecology, pathophysiology, and treatment. **Medical Mycology**, v. 56, n. suppl\_1, p. S10–S25, 10 mar. 2018.

VELEGRAKI, A. et al. *Malassezia* Infections in Humans and Animals: Pathophysiology, Detection, and Treatment. **PLoS Pathogens**, v. 11, n. 1, p. e1004523, 8 jan. 2015.

VIDEIRA, I. F. DOS S.; MOURA, D. F. L.; MAGINA, S. Mechanisms regulating melanogenesis. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 88, n. 1, p. 76–83, fev. 2013.

WANG, Y. et al. Design, synthesis and anticancer activity of novel nopinone-based thiosemicarbazone derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 27, n. 11, p. 2360–2363, 1 jun. 2017.

WEILER, C. B. et al. Susceptibility variation of *Malassezia pachydermatis* to antifungal agents according to isolate source. **Brazilian Journal of Microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]**, v. 44, n. 1, p. 174–178, 2013.

WISSAL CHEBIL et al. Epidemiology of Pityriasis versicolor in Tunisia: **Clinical features and characterization of Malassezia species**. v. 32, n. 2, p. 101246–101246, 1 maio 2022