UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

ATIVIDADE BIOCIDA DE DESINFETANTES E FITOQUÍMICOS FRENTE A FUNGOS ISOLADOS DE ANIMAIS SILVESTRES MANTIDOS EM CENTRO DE RECUPERAÇÃO

Josiara F. Mendes Redü

Porto Alegre, RS – Brasil
2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

ATIVIDADE BIOCIDA DE DESINFETANTES E FITOQUÍMICOS FRENTE A FUNGOS ISOLADOS DE ANIMAIS SILVESTRES MANTIDOS EM CENTRO DE RECUPERAÇÃO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, da Faculdade de Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do titulo de Mestre, pela Bióloga Josiara F. Mendes Redü.

Orientador: João Roberto Braga de Mello

Coorientadora: Patrícia da Silva Nascente

Porto Alegre, RS – Brasil

2014

CIP - Catalogação na Publicação

Redü, Josiara Furtado Mendes
Atividade biocida de desinfetantes e fitoquímicos frente a fungos isolados de animais silvestres mantidos em centro de recuperação / Josiara Furtado Mendes Redü. -- 2014.
94 f.

Orientador: João Roberto Braga de Mello.
Coorientadora: Patrícia da Silva Nascente.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. Animais silvestres. 2. Desinfecção ambiental. 3. Fungos. 4. CETAS. I. Mello, João Roberto Braga de, orient. II. Nascente, Patrícia da Silva, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

ATIVIDADE BIOCIDA DE DESINFETANTES E FITOQUÍMICOS FRENTE A FUNGOS ISOLADOS DE ANIMAIS SILVESTRES MANTIDOS EM CENTRO DE RECUPERAÇÃO

Aprovada em:

APROVADA POR:

_____

Dr. João Roberto Braga de Mello
Orientador e Presidente da Comissão

_____

Drª Marlete Brum Cleff
Membro da Comissão

_____

Drª Fernanda Bastos de Mello
Membro da Comissão

_____

Drª Daniela Isabel Brayer Pereira
Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. João Roberto Braga de Mello, pela confiança, oportunidade e liberdade fundamentais para realização deste trabalho;

A minha coorientadora Profª. Patrícia da Silva Nascente, pela amizade, confiança e liberdade, dadas para realização de todos os projetos que desenvolvemos ao longo desses anos. E pela dedicação mesmo após o nascimento da Marina e do Guilherme;

A todos os membros do Laboratório de Micologia, que proporcionaram valiosos momentos, especialmente aos nossos estagiários Isabel Esteves, Pedro Rassier dos Santos e Anna Pires Terra, que foram fundamentais na construção deste trabalho. E também a Gracialda Ferreira pelos bons momentos divididos;

As minhas queridas amigas Cristina Hallal, Patrícia Jacob, que me proporcionaram valiosos momentos, pelo carinho, pela amizade, pelos testes, estudos, conversas, risadas, enfim... E não poderia esquecer a dedicação incansável da Cris, na ajuda com os cálculos, pelas angustias e alegrias compartilhadas;

As minhas amigas Carolina Gonçalves, Ângela Cabana e Júlia Storch, pelas alegrias, tristezas, jantas, conversas, pelo chimarrão. Com vocês, as pausas entre um parágrafo e outro de produção melhora tudo o que tenho produzido na vida;

A toda equipe do NURFS, por toda a paciência com meus projetos durante todos esses anos, pela confiança e amizade, e por permitir que este estudo fosse realizado em parte lá também. Em especial a minha amiga Ana Paula Albano, pelo incentivo com as pesquisas, pela amizade e confiança em mim depositados;

A minha família, mãe, pai e Léo, por todo amor, apoio e bons exemplos, recebidos desde a infância. Por sua capacidade de acreditar e investir em mim;

Ao Nando, pessoa com quem amo partilhar a vida. Obrigado pelo carinho, paciência, por sua capacidade de me trazer paz na correria de cada dia. Por ter compreendido todos os momentos em que estive ausente;

Aos meus cachorros Fiona e Thor por todo seu companheirismo, carinho e amor incondicional em todos os momentos;

A minha querida Madrinha Lena, por todo carinho, incentivo, confiança e pelo abrigo quando foi necessário estar na Capital;

A Carolina Gonçalves, Anelise Fonseca, pela concessão dos óleos e extratos;

A Universidade Federal do Rio Grande do Sul e a Universidade Federal de Pelotas, por proporcionar a realização desta pesquisa;

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos;

Aos componentes da banca que atenderam o convite, pela atenção, Profª Marlete Brum Cleff, Profª. Fernanda Bastos de Mello e Daniela Isabel Brayer Pereira;

A todos os animais silvestres, que fizeram parte e são o motivo deste estudo;

Enfim, a todos aqueles que de alguma forma estiveram e estão próximos a mim, fazendo esta vida valer cada vez mais a pena;

Muito Obrigada!

RESUMO

Mendes, Josiara Furtado. Atividade biocida de desinfetantes e fitoquímicos frente a fungos isolados de animais silvestres mantidos em centro de recuperação. Orientador: João Roberto Braga de Mello

O estudo teve como objetivos verificar a suscetibilidade *in vitro* e *in uso* de diferentes espécies de leveduras oriundas de animais silvestres frente a diferentes desinfetantes existentes no mercado, bem como fitoquímicos. Foram realizados testes de Microdiluição em Caldo (MC) *in vitro*, com as seguintes leveduras: *Candida albicans*, *C. catenulata*, *C. guilliermondii*, *C. ciferri*, *C. famata*, *C. globosa*, *C. intermedia*, *C. sphaerica*, *Trichosporon assahii*, *Rhodotorula* sp., *Geotrichum klebahnii* e *Cryptococcus laurentii*, frente a Hipoclorito de Sódio, Pinho, Quaternário de Amônio, Digluconato de clorexidina, Água Sanitária, Óleo de Pinho, Óleo de *Mentha piperita*, Extrato Hidroálcoolico de Eucalipto, 1,8-Cineol e Óleo de Castanha-do-Brasil. Também foram realizados testes de Eficácia de Desinfetantes (ED) com os desinfetantes químicos, nos tempos de 0.5, 1, 5 e 15 minutos, com as mesmas leveduras. Os testes *in uso* foram realizados no Núcleo de Reabilitação da Fauna Silvestre da UFPel, com o Pinho, Água Sanitária e Digluconato de Clorexidina. Os resultados demonstraram boa ação dos compostos estudados, sendo que nos testes de MC todos os desinfetantes químicos, o óleo de Pinho e o óleo de Castanha-do-Brasil apresentaram ação fungicida, os demais compostos fitoquímicos apresentaram apenas ação fungistática. Nos testes de ED todas as leveduras estudas foram inativadas em até 15 minutos na presença de matéria orgânica e em cinco minutos quando o desinfetante foi diluído apenas em água. Já para os testes *in uso* ocorreu uma redução de em média 50% após o uso dos produtos na desinfecção do local. Todos os resultados dependentes do produto utilizado. Os desinfetantes químicos apresentaram resultados positivos frente aos microrganismos estudados, sendo mais eficazes que os fitoquímicos, que também obtiveram uma ação satisfatória neste estudo. Este estudo reforça a importância de manter a higiene das instalações dos Centros de Triagem de Animais Silvestres (CETAS), uma vez que todos os microrganismos estudados são provenientes da microbiota fúngica de animais silvestres. Os cuidados com a limpeza, higienização e a desinfecção são fundamentais na manutenção de qualquer cativeiro.

Palavras-chave: Animais Silvestres, Desinfecção Ambiental, CETAS

ABSTRACT

Mendes, Josiara F. Biocidal activity of disinfectants and phytochemicals against fungi isolated from wild animals kept in recovery center.
Adviser: João Roberto Braga de Mello

The study was designed to evaluate the in vitro susceptibility and in use of different yeast species originated from wild animals against different existing disinfectants on the market, as well as phytochemicals. Microdilution tests (MC) *in vitro*, were performed in broth, with the following yeasts : *Candida albicans* , *C. catenulata* , *C. guilliermondii*, *C. Ciferri* , *C. famata*, *C. globosa*, *C. intermedia*, *C. sphaerica*, *Trichosporon assahii*, *Rhodotorula* sp., *Geotrichum klebahnii* and *Cryptococcus laurentii*, compared to Sodium Hypochlorite, Pine, Quaternary ammonium, Chlorhexidine Digluconate, Bleach, Pine Oil, *Mentha piperita* oil, Hydroalcoholic Extract of *Eucalyptus*, 1.8 - Cineol and Chestnut- of - Brazil Oil. Efficacy testing of disinfectants (ED) were also carried out with chemical disinfectants, in the times of 0.5, 1, 5 and 15 minutes, with the same yeast. The tests were performed in use at the Núcleo de Reabilitação da Fauna Silvestre, UFPel, with Pine, Bleach and Chlorhexidine Digluconate . The results showed good deed of the compounds studied, and the MC tests all chemical disinfectants, oil Pine and Chestnut Brazil- oil showed fungicidal action, other phytochemical compounds showed only fungistatic . ED tests in all studied yeasts were inactivated within 15 minutes in the presence of organic matter and in five minutes when the disinfectant was diluted with water only. Already in use for the tests was a reduction of 50 % on average after using the products for the disinfection of the site. All results depending on the product used. Chemical disinfectants showed positive results against the microorganisms studied, being more effective that phytochemicals, which also had a satisfactory action in this study. This study reinforces the importance of maintaining the cleanliness of the premises of the Screening Centers of Wild Animals (CETAS) , since all the microorganisms studied are from fungal microbiota of wild animals . The care of the cleaning, sanitizing and disinfection are critical in maintaining any captivity.

Keywords: Wild Animals, Environmental Disinfection, CETAS

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Representação do aporte de animais silvestres pertencentes à fauna silvestre brasileira atendido pelo NURFS-CETAS/UFPEL no período entre os anos de 2000 a 2008..... 18

Figura 2: Coletas realizadas em diferentes superfícies (1- Mesa de Utensílios, 2 e 5- Mesa de procedimentos, 3 e 4- Armário de Medicamentos) do ambulatório do Núcleo da Fauna Silvestres da UFPEL..... 39

Figura 3: Controles positivos e negativos do HS, e de *C. catenulata*..... 46

Figura 4: Atividade antifúngica do Hipoclorito de sódio (HS) diluído em água e em leite frente à *Candida albicans, C. catenulata, C. sphaerica, C. guilliermondii, C. ciferri, C. globosa* expressa em Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) de acordo com o tempo de exposição ao desinfetante..... 47

Figura 5: Atividade antifúngica Água Sanitária (AS) diluído em água e em leite frente à *Candida albicans, C. sphaerica, C. guilliermondii, C. famata, C. intermedia, C. ciferri e Cryptococcus laurenti* expressa em Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) de acordo com o tempo de exposição ao desinfetante 49

Figura 6: Atividade antifúngica do Digluconato de Clorexidina (DC) diluído em água e em leite frente à *Candida albicans* expressa em Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) de acordo com o tempo de exposição ao desinfetante..... 51

Figura 7: Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) de *Candida sphaerica*, de acordo com o tempo de exposição ao Digluconato de Clorexidine (DC)..... 52

Figura 8: Atividade antifúngica do Pinho (P) diluído em água e em leite frente à *Candida albicans, C. catenulata, C. sphaerica, C. guilliermondii, C. famata, C. intermedia, C. globosa* e *Cryptococcus laurentii* expressa em Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) de acordo com o tempo de exposição ao desinfetante..... 53

Figura 9: Resultados da contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFCs), antes (AD) e após (PD) desinfecção ambiental com Água Sanitária (AS) nos tempos de 5, 15 e 60 minutos na mesa de procedimentos do ambulatório do Núcleo de Reabilitação da Fauna Silvestre, IB/UFPel..... 56

Figura 10: Resultados da contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFCs), antes (AD) e após (PD) desinfecção ambiental com Digluconato de Clorexidina (DC) coletado do armário de medicamentos do ambulatório do Núcleo de Reabilitação da Fauna Silvestre, IB/UFPel 57

Figura 11: Resultados da contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFCs), antes (AD) e após (PD) desinfecção ambiental com Pinho (P) coletado da mesa de procedimentos do ambulatório do Núcleo de Reabilitação da FaunaSilvestre,IB/UFPel..... 58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Origem das espécies fúngicas utilizadas neste estudo..... 35

Tabela 2: Concentração Inibitória Mínima (CIM) do Hipoclorito de sódio (HS) e Agua Sanitária (AS) frente às 12 espécies de leveduras estudadas provenientes de excretas e microbiota de animais silvestres..... 40

Tabela 3: Concentração Inibitória Mínima (CIM) do Digluconato de Clorexidina 20% (DC) frente às 12 leveduras estudadas provenientes de excretas e microbiota de animais silvestres..... 41

Tabela 4: Concentração Inibitória Mínima (CIM) do Quaternário de Amônia frente às 12 espécies de leveduras estudadas provenientes de excretas e microbiota de animais silvestres..... 42

Tabela 5: Concentração Inibitória Mínima (CIM) do Extrato Hidroálcoolico de *Eucalipto* e Cineol frente às 12 espécies de leveduras provenientes de microbiota e de excretas de animais silvestres..... 42

Tabela 6: Concentração Inibitória Mínima (CIM) do óleo de *Mentha piperita* frente às 12 leveduras provenientes de microbiota e de excretas de animais silvestres..... 43

Tabela 7: Concentração Inibitória Mínima do Óleo de Pinho frente a leveduras isoladas de excretas e microbiota de animais silvestres..... 44

Tabela 8: Concentração Inibitória Mínima do Óleo de Castanha-do-Brasil frente às 12 leveduras isoladas de excretas e microbiota de animais silvestres..... 44

Tabela 9: Concentrações dos desinfetantes utilizadas para os Testes de Eficácia de Desinfetantes..... 46

Tabela 10: Isolamento de UFCs dos locais coletados em relação ao desinfetante estudado de acordo com o tempo de exposição..... 60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AD - Antes Desinfecção

AS - Água Sanitária

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CFM – Concentração Fungicida Mínima

CETAS – Centro de Triagem de Animais Silvestres

CLSI – Clinic and Laboratory Standards Institute

DC- Digluconato de Clorexidina

EE - Extrato Hidroalcóolico de Eucalipto

HS – Hipoclorito de Sódio

IB- Instituto de Biologia

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

NCCLS – National Commite for Clinical Laboratory Standads

OC- Óleo de Castanha-do-Brasil

OM – Óleo de *Mentha piperita*

OP – Óleo de Pinho

P - Pinho

QA - Quaternário de Amônio

UFPel - Universidade Federal de Pelotas

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 14

2 OBJETIVOS 16

2.1 Objetivo Geral 16

2.2 Objetivos Específicos 16

3 REVISÃO DE LITERATURA 17

3.1 Fauna Silvestre 17

3.1.1 Centros de Triagem da Fauna Silvestre 18

3.2 Microbiota fúngica e Micoses de animais silvestres 20

3.2.1 Leveduras 21

3.3 Limpeza e desinfecção 25

3.3.1 Desinfetantes químicos 27

3.3.2 Fitoquímicos como desinfetantes 30

METODOLOGIA 35

4.1 Local de Estudo 35

4.2 Origem das amostras 35

Tabela1: Origem das espécies fúngicas utilizadas neste estudo 36

4.3 Antifungigrama 37

4.3.1 Desinfetantes Químicos 37

4.3.2 Fitoquímicos 37

4.3.3 Técnica de Microdiluição em Caldo 37

4.4 Testes de Eficácia de Desinfetantes (Cinética) 38

4.5 Testes *in uso* 39

5 RESULTADOS 41

5.1 Antifungigrama 41

5.1.1 Desinfetantes Químicos 41

5.1.2 Fitoquímicos 43

5.2 Testes de Eficácia dos Desinfetantes (Cinética) **46**

5.3 Testes *in uso* **55**

DISCUSSÃO **61**

7 CONCLUSÕES **70**

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS **72**

9 REFERÊNCIAS **73**

1 INTRODUÇÃO

A preocupação com a fauna e flora dos nossos ecossistemas vem aumentando consideravelmente, a interferência humana no habitat dos animais tem acarretado sérios prejuízos ambientais e ecológicos gerando mortes diretas e indiretas que chegam a culminar com ameaças de extinção em diversas espécies animais (CUBAS, SILVA e CATÃO-DIAS, 2007).

As causas de perda de biodiversidade são muitas e complexas, destacando-se predominantemente a perda de habitat. Além deste processo, outros que comprometem o patrimônio genético natural envolvem a caça, o tráfico ilegal de animais e plantas, a introdução de fauna e flora exóticas e a ocorrência de epizootias devastadoras, em especial aquelas nas quais patógenos adaptados aos animais domésticos ultrapassam esta barreira e atingem a fauna selvagem (CATÃO-DIAS, 2003).

Dentre os diversos agentes patogênicos capazes de produzir infecções estão os fungos, que podem causar sérios danos a animais silvestres e domésticos além do homem. Sparagno e Foggett (2009) realizaram um estudo detalhado destes agentes etiológicos apresentando os fungos clinicamente relevantes na Medicina Humana e Veterinária, entre eles *Trichophyton mentagrophytes, Candida albicans e Malassezia pachydermatis.* Os principais registros de patógenos em animais silvestres são aqueles obtidos de estudos de campo, registros de ocorrências isoladas em clínicas veterinárias e, sobretudo, de Centros de Triagem de Animais Silvestres. Estes locais são autorizados pelo IBAMA para as finalidades de recepção, triagem, manutenção, recuperação e destinação dos animais silvestres, recebendo designações específicas de acordo com suas atribuições (ALBANO, 2009).

Os fungos filamentosos e leveduriformes pertencentes aos gêneros *Aspergillus, Candida, Cryptococcus, Malassezia e Rhodotorula* são apontados como alguns importantes agentes causadores de micoses oportunísticas. Estes microrganismos apresentam maior probabilidade de causar infecções por serem ubíquos, podendo manter-se no ambiente e em superfícies por períodos prolongados (PFALLER e DIEKEMA, 2007; VONBERG e GASTMEIER, 2006). A concentração de fungos no ambiente depende de diversos fatores, incluindo, número de animais, circulação de pessoas, intensidade das trocas de ar e ainda da limpeza e desinfecção ambiental (FALVEY e STREIFEL, 2007).

A limpeza e desinfecção de ambientes têm como meta reduzir a quantidade de microrganismos patogênicos no ambiente de criação. Considera-se que nenhum desinfetante poderá exercer sua ação com eficiência se não houver uma limpeza prévia. Assim a limpeza e desinfecção são duas atividades sequenciais para se obter efeito desejável de criar um ambiente com o mínimo de agressão aos animais (MENDES et al., 2004).

A escolha de um agente químico desinfetante não é uma tarefa fácil frente a grande variedade de produtos existentes no mercado, devendo ser levado em consideração fatores como espectro de atividade desejada, toxicidade, poder residual, custo, estabilidade, e natureza do material a ser tratado. Os principais desinfetantes disponíveis são álcoois, formaldeído, glutaraldeído, compostos liberadores de cloro ativo (como hipoclorito de sódio), compostos quaternário de amônio (como cloreto de benzalcônio), iodóforos e biguaninas (como clorexidina). Dentre esta gama de opções, não existe um produto que apresente todas as características desejadas, cada um possui vantagens e desvantagens que devem ser avaliadas no momento da seleção para o uso (BRASIL, 1994; MCDONNEL e RUSSEL, 1999).

Os programas de higiene e desinfecção são essenciais no controle ambiental de microrganismos potencialmente patogênicos aos animais nestes locais (REDIG et al., 1993). A desinfecção ambiental deve ser realizada com rodízio periódico de agentes químicos capazes de inibir o crescimento ou eliminar esses microrganismos (KEARNS e LOUDIS, 2003).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Verificar a suscetibilidade *in vitro* e *in uso* de diferentes espécies de leveduras frente a desinfetantes comerciais e de fitoquímicos.

2.2 Objetivos Específicos

- Verificar a ação antifúngica *in vitro* de diferentes desinfetantes e fitoquímicos sobre leveduras isoladas de animais silvestres;

- Determinar qual a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos desinfetantes e fitoquimicos necessária para uma desinfecção eficaz;

- Verificar o tempo de exposição aos desinfetantes, necessário para reduzir os microrganismos estudados;

- Identificar quais serão os desinfetantes químicos e/ou fitoquímicos mais eficazes para utilização *in uso* do produto;

- Detectar em teste *in uso* qual o tempo de ação necessário para a ação eficaz de cada produto.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Fauna Silvestre

No Brasil, os animais silvestres são definidos como aqueles pertencentes às espécies nativas, migratórias e quaisquer outras, aquáticas ou terrestres, que tenham a sua vida ou parte ocorrendo naturalmente dentro dos limites do Território Brasileiro e suas águas jurisdicionais (BRASIL, 2011). A manutenção de animais silvestres em cativeiro domiciliar como animais de estimação, em sua maioria não legalizados, têm sido bastante comum no país, embora seja considerada crime contra a fauna brasileira (BRASIL, 2011). Os animais silvestres criados mais comumente como animais de estimação são as aves, devido ao fato das pessoas apreciarem o seu canto e sua beleza. Répteis silvestres também podem ser comumente encontrados como animais de estimação e, em menor número, os mamíferos (MENDES, 2011).

A maioria dos animais submetidos ao tráfico ilegal apresenta enfermidades devido às péssimas condições em que são mantidos (LIMA et al., 2002). Taylor e Woolhouse (2000) citam que cerca de 73% de todas as doenças infecciosas são zoonoses, sendo que muitas delas possuem como reservatórios naturais animais silvestres. Embora seja sabido que muitas das doenças infecciosas humanas previamente desconhecidas emergiram de reservatórios silvestres, ainda são inúmeras as lacunas quanto a sua epidemiologia, incluindo o papel do homem e de outros animais (ACHA e SZYFRES, 2003).

Embora a preocupação com a fauna e flora dos nossos ecossistemas tenha aumentado consideravelmente, a interferência humana no habitat dos animais continua acarretando sérios prejuízos ambientais e ecológicos gerando mortes diretas e indiretas que chegam a culminar com ameaças de extinção em diversas espécies animais (CUBAS, SILVA e CATÃO-DIAS, 2007).

É bem sabido que a saúde dos animais silvestres tem sido prejudicada pela fragmentação e degradação de habitats, pelo isolamento de populações, e pela maior proximidade com humanos e seus animais domésticos (DASZAK, et al, 2002). Animais mantidos em cativeiro ou transportados, mesmo que por um curto período, podem ser expostos a uma variedade de patógenos, e se tornarem carreadores potenciais de doenças infecciosas (BAKER e SOARES, 2002).

3.1.1 Centros de Triagem da Fauna Silvestre

Os Centros de Triagem de Animais Silvestres (CETAS) por definição, de acordo com a legislação vigente, são locais que tem por finalidade recepcionar, identificar, triar, tratar e destinar os animais silvestres resgatados ou apreendidos pelos órgãos fiscalizadores, assim como eventualmente receber animais silvestres de particulares que os estavam mantendo em cativeiro doméstico de forma irregular como animais de estimação, podendo possuir outras denominações, dependendo de sua localização (BRASIL, 2013).

Os animais ao ingressarem nos CETAS, necessitam de cuidados médico veterinário e de biólogos, além de condições ideais de soltura no que diz respeito ao seu habitat natural, respeitando as áreas de distribuição geográfica de cada espécie (BRASIL, 2013).

A União Internacional para Conservação da Natureza (IUCN, 2002) afirma que programas responsáveis pela reintrodução de animais à natureza são processos de empenho em longo prazo que requerem recursos humanos e financeiros substanciais, e consequentemente, podem desviar recursos escassos de outras atividades conservacionistas mais eficazes. Mesmo assim, a entidade faz ressalvas: em situações nas quais a população existente esteja severamente ameaçada, a reintrodução pode melhorar o potencial de conservação da espécie como um todo. A reintrodução traz questões político-educacionais e pode ajudar a promover valores conservacionistas, e as espécies reintroduzidas têm a possibilidade de cumprir seus papéis biológicos e ecológicos. Devido aos grandes riscos que uma soltura incorreta dos animas silvestres pode acarretar, é necessária uma análise criteriosa dos dados do animal (APRILE e BERTONATTI, 1996). A liberação de um animal deve estar sujeita a uma rigorosa avaliação prévia da informação reunida em torno do mesmo (determinação de sua espécie, estado sanitário, origem, nível de reabilitação, avaliações da área de soltura, etc.) e da possibilidade de monitoramento do animal liberado para avaliar o trabalho realizado (APRILE e BERTONATTI, 1996).

O destino dos animais apreendidos que não possuem condições de soltura, desde que não estejam na lista oficial das espécies ameaçadas de extinção é preferencialmente, zoológicos, criadouros registrados no IBAMA e centros de pesquisa. Solturas devem ser, sempre que possível vinculada a programas específicos de manejo para as diferentes espécies. Animais ameaçados de extinção são tratados de maneira especial, caso a caso,

seguindo recomendações de comitês nacionais e internacionais, quando existentes (BRASIL, 2013).

Em Pelotas, o Núcleo de Reabilitação da Fauna Silvestre e o Centro de Triagem de Animais Silvestres são órgãos da Universidade Federal de Pelotas, vinculados ao Instituto de Biologia e servem para atividades de Ensino, Pesquisa, Extensão. Suas infraestruturas estão localizadas no Campus Universitário do Capão do Leão, sendo administradas por um Colegiado Administrativo e comportam até aproximadamente mil animais, estando preparadas para a recepção de aves, mamíferos e répteis. Seu principal fluxo de entrada de animais silvestres corresponde ao atendimento dos Agentes de Policiamento Ambiental, Policia Civil e Federal, IBAMA, além de um aporte menor decorrente de entregas voluntárias (ALBANO, 2009).

Atendem uma demanda de aproximadamente cinco mil animais, sendo o principal grupo o das aves (84,78%), seguido dos mamíferos (11,99%) e depois pelos répteis (3,07%) (Figura 1) (ALBANO, 2009).

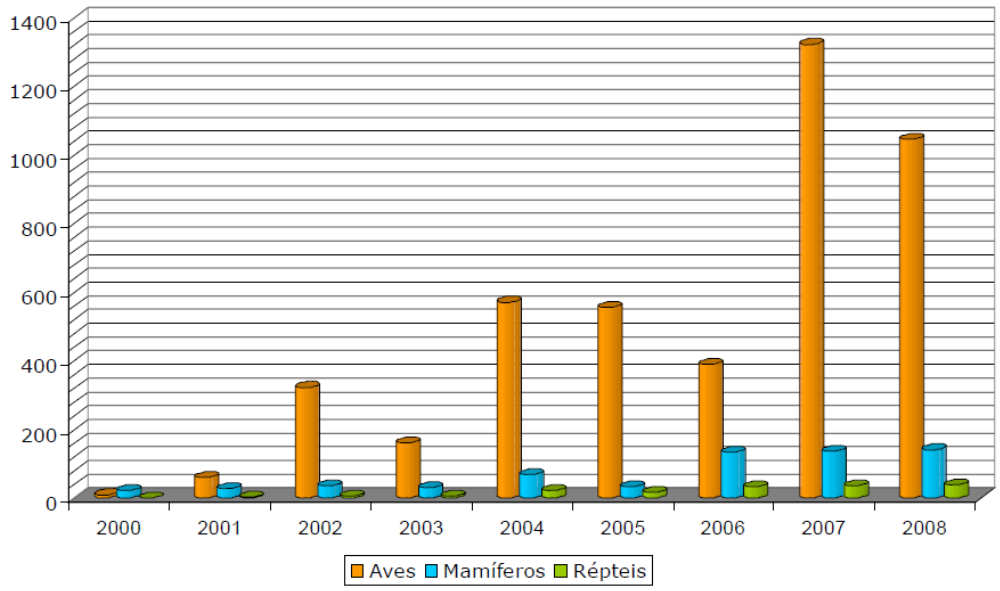

Figura 1. Representação do aporte de animais silvestres pertencentes à fauna silvestre brasileira atendido pelo NURFS-CETAS/UFPEL no período entre os anos de 2000 a 2008

Fonte: Banco de Dados – GOL-FAUNA NURFSCETAS/ UFPEL – Dez. 2008 e http://www.ufpel.edu.br/ib/nurfs

Entre os principais espécimes recebidos de cada grupo, encontramos *Paroaria coronata* (cardeal vermelho) nas aves; *Didelphis albiventris* (gambá-de-orelha-branca) nos mamíferos e *Trachemys dorbigni* (tigre-d'água) nos répteis. Dentre os animais

recebidos para atendimento é importante destacar o recebimento de espécies ameaçadas de extinção em diferentes níveis (Estado do Rio Grande do Sul, Brasil e no mundo), entre elas *Sporophila collaris* (coleiro-do-brejo) e *Leopardus geoffroyi* (gato-do-matogrande) (ALBANO, 2009).

3.2 Microbiota fúngica e Micoses de animais silvestres

A microbiota fúngica que compõe a superfície corpórea dos seres vivos é constitutivamente dinâmica, ou seja, sofre periodicamente, mudanças qualitativas e/ou quantitativas. Essas mudanças decorrem, em grande parte, de fatores ambientais, como, localização geográfica, sanidade e condições climáticas como temperatura e o tempo de exposição à luz ultravioleta (ARAÚJO et al., 2003).

As infecções fúngicas em animais silvestres, dependendo do agente causal, podem ser extremamente patogênicas e contagiosas não apenas entre os animais, mas também entre os homens. As informações na literatura sobre as prevalências dos agentes causais destas enfermidades ainda não permitem traçar perfis das principais espécies patógenas que acometem estes animais, principalmente no Brasil. Desta forma, a identificação fúngica em um processo de doença nestes animais deve ser sempre efetuada para fins de conhecimento (GOULART, 2004).

Os fungos são importantes agentes etiológicos de enfermidades em aves silvestres e outros animais, causando três tipos básicos de doenças: micoses (invasão direta dos tecidos), doenças alérgicas que envolvam o desenvolvimento de uma hipersensibilidade do hospedeiro aos antígenos fúngicos, e micotoxicoses (FRIEND et. al, 1999). A maioria dos agentes fúngicos é comumente encontrada no ambiente e a resistência do hospedeiro é o principal determinante da ocorrência da doença. Infecções oportunistas ocorrem principalmente em animais silvestres imunodeprimidos, tendo a inalação como a principal rota de infecção para a maioria dos fungos. Dentre as principais micoses que afetam as aves silvestres destacam-se a aspergilose e a candidíase (FRIEND et. al, 1999).

Estes patógenos costumam causar sérios danos a animais silvestres e domésticos além de poder acometer o homem. Marinho et al (2010), realizaram estudos com excretas de aves da família dos Passeriformes, isolando alguns fungos que classificaram como componentes da microbiota desses animais entre eles: *Penicillum* spp.,

Trichosporum spp., *Geotrichum* spp., *Candida* spp., *Aspergillus* spp., *Criptococcus gatti* e *C. neoformans.* Outro estudo sobre microbiota fúngica da pele, pelos e conduto auditivo de macacos clinicamente saudáveis, provenientes do reservatório de Manso no Mato Grosso do Sul, relata o crescente interesse em ecologia e conservação da fauna silvestre. Neste estudo foram encontrados *Curvularia* sp., *Drechslera* sp., *Penicillium* sp., *Cladosporium* sp, *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Rhodotorula* sp. e *Malassezia pachydermatis* (ÁVILA,2 2008). Foi realizado também um estudo sobre a identificação de fungos da microbiota do meato acústico externo de macacos (*Macaca mulatta*) onde foram isolados: *Aspergillus* sp., *Candida* sp., *Cladosporium* sp., *Rhodotorula* spp., *Penicillium* sp., *Trychophytum verrucosum*, *Epidermophyton flocosum*, e *Scopulariopsis* sp. (BROTTO et al., 2005).

A identificação das espécies fúngicas que fazem parte da microbiota em animais saudáveis é condição primordial para o reconhecimento dos microrganismos causadores de processos patológicos, um exemplo do assunto pode ser verificado no estudo sobre um gambá-de-orelha-branca (*Didelphis albiventris*), um mamífero marsupial comumente encontrado no Brasil inteiro que vive em diversos ecossistemas, além de se adaptar bem a áreas urbanas. O animal foi acometido por malasseziose causada pela levedura *Malassezia pachydermatis,* levedura comensal e patógeno oportunista de animais domésticos e silvestres (ALBANO et al. 2011). A aspergilose em pinguins, doença causada por fungos do gênero *Aspergillus* sp. durante a recuperação de animais marinhos, foi descrita por Xavier et al. (2008).

Assim como o isolamento de *Microsporum gypseum* em meato acústico externo de felinos em cativeiro (BENTUBO et al., 2006). Albano et al. (2011 a) descreve um estudo sobre a microbiota fúngica de felídeos silvestres hígidos encaminhados a centros de triagem no Rio Grande do Sul e Mato Grosso do Sul, onde foram encontradas as seguintes espécies fúngicas: *Aspergillus* spp. *Geotrichum* spp. *Penicillium* spp. *Trichophyton* sp., *M. pachydermatis*, *Candida* sp. e *Scopulariopsis* sp.

3.2.1 Leveduras

Dentre as leveduras que têm sido isoladas dos animais silvestres destacam-se:

3.3.1.1 Gênero *Geotrichum*

O gênero *Geotrichum* pertence à subdivisão Deuteromycotina, classe Hyphomycetes, ordem Saccharomycetales, família Endomycetaceae (LACAZ et al., 2002). Foi descrito por PERSOON, em 1822, apresentando colônias com crescimento muito rápido, com tempo de maturação de dois a quatro dias. Na macromorfologia, evidenciam-se colônias com textura glabra seca, com tonalidade branca ou branco-amarelada e com relevo cerebriforme na parte central. Algumas cepas podem produzir um revestimento algodonoso baixo, de tom branco. O reverso das colônias é branco ou bege, não produzindo pigmento difusível no meio (SIDRIM e ROCHA, 2004).

Geotrichum spp. são componentes da microbiota da pele e trato digestivo de humanos e de algumas espécies animais, sendo relacionados a quadros de infecções oportunistas, principalmente em pacientes imunodeprimidos, ocorrendo acometimento pulmonar, digestivo ou de mucosas. Em alguns pacientes, podem ser observados quadros septicêmicos, com comprometimento de vários órgãos. (SIDRIM e ROCHA, 2004).

A espécie *G. candidum* é o agente de infecções oportunísticas com lesões pulmonares mais frequentes, sendo causador da geotricose. Geralmente é isolado do leite, frutas e outros vegetais. Sendo descrito um caso de geotricose em cão em 1980, causando lesões pulmonares, brônquicas e ganglionares. (LACAZ et al., 2002).

Geotrichum spp. foi isolado em 2,8 % das 36 amostras isoladas das excretas de Passeriformes, a fim de avaliar a participação das aves mantidas em criadouros na epidemiologia de doenças infecciosas como a criptococose, e aspergilose, verificando consequentemente a manutenção e propagação de patógenos no meio ambiente (MARINHO et al., 2010)

Galindo, 2012 isolou entre outras leveduras, *Geotrichum* sp. da cavidade oral de lagartos da espécie *Tropidurus hispidus*, ao avaliar a diversidade e frequência da microbiota fúngica e analisar o potencial zoonótico nesses animais.

3.2.1.2 Gênero *Candida*

O gênero *Candida*, atualmente, está classificado na subdivisão Deuteromycotina, classe Blastomycetes, ordem Moniliales, família Cryptococcaceae, possui ampla distribuição no ambiente e, frequentemente coloniza pele e mucosas, como a cavidade oral, trato gastrointestinal e mucosa genital de mamíferos. É formado por leveduras com reprodução assexuada, através da formação de blastoconídeos, pseudohifas e, ocasionalmente, hifas verdadeiras. No entanto, algumas espécies do gênero como *C.*

guilliermondii e *C. krusei* já têm a forma sexuada ou teleomorfa conhecida e são classificadas na subdivisão *Ascomycotina*, classe *Hemiascomycetes*, ordem *Endomycetales*, família *Saccharomycetaceae*, gênero *Pichia*e gênero *Issatchenkia*, respectivamente (CLEFF et al., 2005; SIDRIM e ROCHA, 2004; LACAZ et al., 2002).

Apresenta colônias brilhantes ou opacas, textura cremosa com bordas regulares ou irregulares, de coloração branca a creme e odor de levedo. Na microscopia caracterizam-se por blastoconidios esféricos (8-12 µm) ou levemente ovais (6 – 10 µm x 3,6 – 6 µm), paredes finas e ausência de capsula, sendo que algumas espécies apresentam clamidoconídios terminais ou intercalares (LACAZ et al., 2002; SIDRIM E MOREIRA, 1999).

Leveduras do gênero *Candida* pertencem à microbiota de mucosas e pele de mamíferos, sendo descritas, em todo o mundo, como agente etiológico de micoses oportunistas em diversas espécies de animais domésticos e silvestres (CLEFF et. al.; 2005; MORETTI et al., 2004; LACAZ et al., 2002; SIERRA et al., 2000; RAPOSO et al., 1996).

C. albicans é considerada comensal de regiões mucocutâneas, trato digestório e genital de humanos, mamíferos e aves. Podendo estar envolvida em alguns casos de lesões cutâneas, unhas e trato respiratório, assim como desencadear infecção fúngica sistêmica (KWON-CHUNG e BENNETT, 1992). Estudos indicam que esta espécie, está associada a infecções humanas (ANTUNES et al., 2004), juntamente com a *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, que são causadoras de onicomicoses e candidemia, respectivamente (MEDRANO et al., 2006).

Estudos têm relatado a presença de leveduras nas mãos de agentes da saúde que trabalham em UTI (NASCENTE et al., 2007), além de cateteres umbilicais de recém-nascidos internados na UTI neonatal, alertando a possibilidade da ocorrência de infecções fúngicas sistêmicas em pacientes internados em ambientes hospitalares (FERNANDES et al., 2007).

Ao longo das últimas décadas as leveduras da microbiota de animais conferiram maior importância na micologia médica, em particular criptococose e candidíase, relatadas com maior frequência, especialmente em pacientes imunocomprometidos (VELASCO, 2000).

Em relação a animais silvestres estes agentes têm sido isolados de *Cebusapella* (macaco-prego) causando candidíase cutânea (CLEFF et al., 2008). Microbiota de aves e mamíferos silvestres em reabilitação (ALBANO, 2009). Em aves, o Gênero *Candida*

já foi isolado também da cavidade oral, no esôfago, no inglúvio, proventrículo, olhos e sistema reprodutivo (CAFARCHIA et al., 2008; CAFARCHIA et al., 2006; FULLERINGER et al., 2006). Em cães, este gênero também já foi isolado do tegumento e das mucosas (CLEFF et al., 2005; GUILLOT et. al, 1996).

3.2.1.3 Gênero *Rhodotorula*

O gênero *Rhodotorula* está classificado na subdivisão Deuteromycotina, classe Blastomycetes, família Cryptococcaceae e ordem Cryptococcales. Em Ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol a 28-37ºC, as colônias apresentam-se lisas, mucóides, brilhantes, arredondadas de coloração rósea ao avermelhado devido aos pigmentos carotenóides (BISWAS et al., 2001).

Rhodotorula spp. é sapróbio de ambientes domésticos e comensal de pele úmida. Pode ser isolada como contaminantes da pele ou de ambientes e são raramente isoladas de material clínico do trato urinário e úlceras (GREENE e HANDLER, 2006). *R. rubra* e outras espécies raramente têm sido isoladas de pacientes com doença grave no estágio terminal. Entretanto, dos casos registrados, a maioria foi causada pela espécie *R. rubra*, cuja presença foi observada em infecções fatais de pulmão, rins e SNC (LACAZ et al., 2002). *Rhodotorula* spp. já foi isolada das mãos de agentes da saúde que trabalham em Unidade de Terapia Intensiva (UTI) (NASCENTE et al., 2007).

3.2.1.4 Gênero *Trichosporon*

O gênero *Trichosporon* pertence à subdivisão Deuteromycotina, classe Basidiomycetes, e foi criado em 1890, recebendo esta denominação devido a serem fungos causadores de micoses superficiais em humanos (*Trichos*= pêlos e *sporon*= esporos). Este gênero, assim como a espécie *Trichosporon beigelli*, foi descrito originalmente a partir da observação clínica de pacientes com nódulos em cabelos e pelos (LACAZ et al., 2002; WATSON e KALLICHURUM, 1970).

O fungo está amplamente distribuído na natureza, sendo encontrados predominantemente em zonas tropicais e temperadas. Encontrado em materiais procedentes do meio ambiente, principalmente no solo, madeiras em decomposição e superfície corpórea de seres humanos e animais, como mamíferos e aves (SHAREEF et al., 2008).

Trichosporon asahii tem sido a espécie mais relacionada a infecções invasivas, seguida por *T. mucoides* e *T. inkin* (MADARIAGA et al., 2003). Além dessas, *T.*

*cutaneum*e e *T. ovoides* são também consideradas espécies que essencialmente ocupam nichos ecológicos não vertebrados, mas que possuem habilidade relativamente pronunciada de sobreviver em tecidos de organismos vertebrados (De HOOG; 1996).

3.2.1.5 Gênero *Cryptococcus*

O Gênero *Cryptococcus* está classificado no Reino Fungi, subdivisão Deutoromycota, classe Bastomycetes, família Cryptococcaceae, gênero Cryptococcus. É uma enfermidade micótica, subaguda ou crônica, que acomete a cavidade nasal, tecidos paranasais e pulmões, podendo disseminar-se para o sistema nervoso central (SNC), olhos, pele e outros órgãos, ocorrendo no homem, animais domésticos e silvestres (MEIRELES & NASCENTE et a., 2009).

Este gênero comporta mais de 38 espécies, duas das quais são consideradas potencialmente patogênicas, *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gatti* agentes etiológicos da criptococose, uma micose grave que tem tido uma crescente importância nas últimas décadas. A infecção causada por *C. neoformans* ocorre preferencialmente em indivíduos imunocomprometidos, enquanto *C. gattii* também acomete indivíduos imunocompetentes (FARIA, et al., 2010).

Dentre as micoses sistêmicas, a criptococose se destaca pela dificuldade no tratamento, gravidade e alta mortalidade em animais e humanos com envolvimento do SNC. Essa enfermidade vem assumindo papel relevante por ser considerada uma das micoses mais comuns em pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida (SIDA). Em medicina veterinária, é reconhecida como a micose sistêmica de maior ocorrência na clinica de felinos, tornando-se mais grave em animais que estão sendo submetidos à quimioterapia, tratamento prolongado com corticosteróis e enfermidades imunodepressivas, como a leucemia felina (FeLV) e a síndrome da imunodeficiência felina (FIV) (LACAZ 2002).

3.3 Limpeza e desinfecção

A desinfecção é o conjunto de medidas empregadas para impedir a entrada e crescimento de microrganismos em um ambiente ou estrutura, tornando-os livres de agentes infecciosos, com o uso de substâncias desinfetantes ou outras formas físicas de desinfecção (SPINOSA et al., 2006). Os desinfetantes são substâncias usadas para destruir todas as formas vegetativas de microrganismos em superfícies ou objetos

inanimados, mas esse processo não promove a esterilização do material (SPINOSA et al., 2006).

Cabe aqui ressaltar, que não se deve confundir limpeza com desinfecção, limpeza é a remoção mecânica de sujidade. É realizada pela aplicação de energia mecânica (fricção), química (soluções detergentes, desincrostantes ou enzimáticas) ou térmica. O emprego associado de todas estas formas de energia aumenta a eficiência da limpeza (CYRILLO, 2012). Sendo que a desinfecção é a eliminação ou remoção de todos os microrganismos na forma vegetativa, independente de serem patogênicos, presentes em artigos e superfícies inanimadas. Eventualmente ocorre remoção de esporulados, mas quanto a estes não é possível quantificar (NOGAROTO e PENNA, 2006).

A limpeza e desinfecção de ambientes têm como meta reduzir a quantidade de microrganismos patogênicos no ambiente de criação. Considera-se que nenhum desinfetante poderá exercer sua ação com eficiência se não houver uma limpeza prévia. Assim a limpeza e desinfecção são duas atividades sequenciais para se obter efeito desejável de criar um ambiente com o mínimo de agressão aos animais (MENDES et al., 2004). Sendo assim, os programas de higiene e desinfecção são essenciais no controle ambiental de microrganismos potencialmente patogênicos aos animais (LAGNEAU e HOUTAIN, 2001).

Antes de proceder à desinfecção é importante que se faça uma limpeza prévia do local ou material a ser desinfetado, pois além da maioria dos desinfetantes, diminuírem a sua ação em presença de matéria orgânica, este procedimento elimina mecanicamente grande quantidade de microrganismos presentes no local. A limpeza permite uma ação direta e mais eficiente do desinfetante sobre os microrganismos presentes na superfície a ser desinfetada (ANDRADE, 1988).

A desinfecção deve ser realizada com rodízio periódico de agentes químicos capazes de inibir o crescimento microbiano ou eliminar esses microrganismos, visando à redução principalmente na concentração de conídios fúngicos inalados pelos animais (KEARNS e LOUDIS, 2003).

Um bom programa de limpeza e desinfecção é a base para uma boa saúde animal, uma vez que, em condições de confinamento, a gravidade e a ocorrência das enfermidades estão diretamente relacionadas a contaminação do ambiente. Um programa efetivo de biosseguridade é uma excelente maneira de manter os sistemas de produção livres ou controlados, no que diz respeito à presença de microrganismos para

risco a saúde pública e de grande impacto econômico (SOBESTIANSKY, 2002; SESTI, 2004).

Microrganismos patogênicos podem ser introduzidos de reservatórios silvestres nas cidades. Por isto, os protocolos de limpeza e desinfecção são componentes essenciais de qualquer programa de biosseguridade, buscando conter ou reduzir ao máximo possível a disseminação de doenças (GREZZI, 2007).

A resistência é um fenômeno determinado geneticamente e deve ser diferenciado da adaptação fenotípica que não é hereditária. A adaptação pode ser evitada através de um rigoroso programa de limpeza e desinfecção, evitando o uso de desinfetantes em concentrações inferiores às concentrações recomendadas. O uso de desinfetantes para evitar o desenvolvimento de resistência tem sido amplamente discutido na comunidade científica mundial já que esse possui mecanismo inespecífico de ação. O essencial é usar produtos de forma certa na concentração certa e na dose necessária para obter os resultados esperados (GREZZI, 2007).

3.3.1 Desinfetantes químicos

A escolha de um agente químico desinfetante não é uma tarefa fácil frente a grande variedade de produtos existentes no mercado, devendo ser levado em consideração fatores como espectro de atividade desejada, toxicidade, poder residual, custo, estabilidade, e natureza do material a ser tratado. Os principais desinfetantes utilizados são álcoois, formaldeído, glutaraldeído, compostos liberadores de cloro ativo (como hipoclorito de sódio), compostos quaternário de amônio (como cloreto de benzalcônio), iodóforos e biguaninas (como clorexidina). Dentre esta gama de opções, não existe um produto que apresente todas as características desejadas, cada um possui vantagens e desvantagens que devem ser avaliadas no momento da seleção para o uso (BRASIL, 1994; MCDONNEL e RUSSEL, 1999).

3.3.1.1 Compostos do Amônio Quaternário (Quaternário de Amônio/ Pinho)

Os compostos de quaternário de amônio são agentes tensoativos catiônicos com boa atividade germicida, porém pobre capacidade de atuar como detergente (GERMANO e GERMANO, 2001). Tem atuação limitada em presença de matéria orgânica e em superfícies com restos de sabões e detergentes aniônicos (MENDES et al., 2004).

Inicialmente os compostos quaternários de amônio vão causar desnaturação e precipitação de proteínas da membrana celular e do citoplasma das bactérias liberando nitrogênio e potássio das células, eles ainda quebram os complexos lipoprotéicos da célula bacteriana liberando enzimas autolíticas (SPINOSA et al., 2006). Não foi encontrado na literatura consultada (PUBMED, PORTAL CAPES), o mesmo processo referente às leveduras, mas acredita-se que ocorra da mesma forma.

As vantagens dos surfactantes catiônicos é que não são, em geral, irritantes para a pele e tecidos, nem corrosivos para metais, têm baixa toxicidade e são inodoros. Podem ser usados em soluções com água e álcool, e em temperaturas altas, possuem boa atividade germicida em pH alcalino (SPINOSA et al., 2006).

Vários mecanismos de ação associados parecem estar relacionados com a atividade germicida dos compostos quaternário de amônio, tais como: inibição enzimática (ANDRADE e MACEDO, 1996), desnaturação de proteínas celulares essenciais e ruptura da membrana celular com vazamento dos constituintes celulares (DASHNER, 1997). Segundo Nagai et al. (2003), quando uma bactéria e exposta a ação de um composto quaternário de amônio, como cloreto de benzalcônio, ocorre a adsorção do agente biocida na superfície bacteriana, difusão através da parede celular, desorganização da membrana citoplasmática, liberação de constituintes citoplasmáticos e morte da célula bacteriana.

3.3.1.2 Hipoclorito de Sódio

Os hipocloritos são os compostos de cloro mais antigos e mais amplamente utilizados no campo da desinfecção química, pois são germicidas poderosos, de amplo espectro antimicrobiano, não são prejudiciais nas concentrações comercializadas, sem resíduos nocivos, nem alteração na cor e na solução, e por serem de fácil manuseio e baixo custo (BLOCK, 1991).

Os efeitos esporocidas são conseguidos somente com altas concentrações de cloro e sua atividade biocida é diminuída na presença de matéria orgânica (COTTONE e MOLINARI, 1987; RUTALA e WEBER, 1997).

O cloro foi utilizado inicialmente, como alvejante na indústria têxtil. Em 1908, foi introduzido o uso do cloro, na purificação da água consumida pela população dos Estados Unidos. Pode ser utilizado como desinfetante, sob as formas de gás, compostos inorgânicos, e os orgânicos. São amplamente usados na indústria de laticínios e nas propriedades produtoras de leite para desinfecção de equipamentos, utensílios de

ordenha e higienização do úbere dos animais antes da ordenha (ANDRADE, 1988). Quando estes produtos estão em solução aquosa, apresenta capacidade de penetrar na célula bacteriana e destruí-la. O hipoclorito é considerado como desinfetante universal para a água, e a parte que permanece nesta, após período de ação média de 20 minutos, constitui o cloro livre, de grande poder desinfetante. Os hipocloritos desinfetam superfícies limpas. Quando há considerável resíduo de matéria orgânica e/ou minerais, estas se combinam à solução de cloro, dando origem ao cloro combinado, que apresenta baixa ação desinfetante (HOFFMANN, 1995).

3.3.1.3 Digluconato de Clorexidina

Dentre os agentes desinfetantes, as biguanidas, como a clorexidina, se destacam principalmente pela baixa toxicidade, amplo espectro e suas propriedades inodoras, incolores e não corrosivas (MCDONNELL e RUSSELL, 1999).

A clorexidina é um composto químico biguanídico catiônico com molécula simétrica, consistindo de dois anéis 4–clorofenil e dois grupos biguanida conectados por uma cadeia de hexametileno central (1,1'–hexametilenobis {5–(4-*p*-clorofenil) biguanida)} (MARTINDALE, 2007). Foi sintetizada em laboratório em 1954 por Davies, Francis, Martin, Rose e Swain e aprovada para uso nos Estados Unidos em 1976 (SILVA et al., 2000).

A clorexidina é um desinfetante não específico de segunda geração e conservante. Embora seja bactericida de uso tópico com largo espectro de ação, sua eficácia difere em relação aos tipos de microrganismos. É efetiva contra bactérias Gram-positivas e menos eficaz para bactérias Gram-negativas, fungos e algumas espécies de *Proteus*. Quanto aos vírus, possui atividade apenas para alguns tipos de vírus envelopados, entre eles vírus da hepatite, herpes simples, HIV, citomegalovírus, influenza e vírus sincicial respiratório. Para as micobactérias, a clorexidina apresenta mínima atividade; contra endósporos e cistos de protozoários a atividade é nula (MARTINDALE, 2007; WEBER et al., 2007; TORTORA et al., 2006).

De acordo com a literatura, o uso da clorexidina é bastante amplo e tem sido empregada para limpeza de superfícies, equipamentos e roupas em hospitais, consultórios odontológicos e outras unidades de saúde (GAJADHAR et al., 2003); para antissepsia da pele e mucosas; para tratamento de feridas e queimaduras. Combinada a um detergente ou álcool, é usada para escovação cirúrgica das mãos e preparo pré-operatório da pele em pacientes (TORTORA et al., 2006).

Agentes químicos a base de digluconato de clorexidina são amplamente utilizados na prática odontológica e antissepsia, porém sua aplicação como desinfetante ambiental é limitada. No experimento realizado por Xavier et al. (2008), onde avaliou a eficácia da clorexidina-cetrimida na desinfecção ambiental contra *Aspergillus* spp., este agente químico foi escolhido principalmente devido a necessidade de aplicação em instalações com a presença de animais, tendo em vista que os produtos mais frequentemente utilizados para desinfecção de ambientes internos, como hipoclorito de sódio e amônia quaternária, são irritantes para mucosas e pele, e a amônia quaternária ainda é passível de contaminação, podendo carrear e disseminar microrganismos para o ambiente (MCDONNELL e RUSSELL, 1999).

3.3.2 Fitoquímicos como desinfetantes

Embora, desde a antiguidade os povos utilizem plantas na conservação de alimentos, o estudo sistemático das plantas como antibióticos é relativamente recente. Diversos condimentos como alho, orégano, tomilho e muitos outros, têm demonstrado atividade antimicrobiana, explicando a sua utilização histórica (CARVALHO et al., 2004).

Na natureza encontram-se muitos compostos complexos orgânicos, de origem vegetal, com características antimicrobianas. Os compostos produzidos pelo metabolismo secundário das plantas podem deter importantes ações na proteção contra patógenos, seja por sua ação bactericida, ativadora de rotas e mecanismos de defesa (BONALDO, 2004). Este mecanismo de defesa quando induzidos pelo tratamento com agentes de qualquer natureza (bióticos ou abióticos, orgânicos ou não, entre outros), são capazes de desencadear uma resposta na planta, atuando como indutores de resistência, ou seja, elicitores. (MAZARO, 2005). Alguns desses ligam-se aos receptores específicos na membrana das células vegetais desencadeando mudanças metabólicas, que resultam na produção de fitoalexinas (RAVEN, 2001).

Vários estudos têm comprovado o efeito do sinergismo de extratos de óleos essenciais de plantas que atuam como fungicidas naturais e, um número significativo destes constituintes têm se mostrado eficaz (CHAO e YOUNG, 2000).

Sartoratto et al. (2004) avaliaram óleos essenciais de oito plantas aromáticas utilizadas no Brasil e encontraram atividade antibacteriana e/ou anti-*Candida* em todas elas. *Aloysia triphila* e *Thymus vulgaris* foram às plantas que apresentaram CIM mais

baixa frente à maioria das bactérias utilizadas enquanto que *Mentha piperita* foi a mais ativa frente à C*andida albicans*. Nenhuma atuou sobre *Staphylococcus epidermidis* ou *Pseudomonas aeruginosa.*

Em geral, os princípios ativos das plantas medicinais com atividade antimicrobiana resultam do metabolismo secundário destas e acumulados em um ou vários dos seus tecidos. De uma forma geral, as plantas são capazes de produzir mais de 100.000 desses produtos naturais de baixo peso molecular. Os metabólitos secundários se diferenciam dos primários por não serem essenciais para a vida da planta. Dentre os grupos químicos mais comumente relacionados com atividade antimicrobiana, estão derivados fenólicos - óleos essenciais, flavonóides, quinonas, taninos, alcalóides e outros e alguns compostos enxofrados (DIXON, 2001; DOMINGO e LÓPEZ-BREA, 2003; SIMÕES et al., 2004).

3.3.2.1 Extrato de Eucalipto (*Eucalyptus* sp.)

O eucalipto é originário da Austrália e Tasmânia. Existem mais de 400 espécies de *Eucalyptus* spp. São utilizados na produção de bosques para comércio (celulose, madeira e lenha), e como sombra e corta vento no campo. Também, é mais utilizado como medicinal (DEL VITTO et al., 1998; LORENZI e MATOS, 2002).

São árvores de grande porte, alcançado até 60 metros de altura. Possuem folhas coriáceas opostas, com dois tipos morfológicos diferentes, as dos ramos jovens são azuladas, largas e peltadas, enquanto que as dos ramos maduros são estreitas, lanceoladas ou em forma de foice. Apresenta flores e botões florais solitários na axila das folhas. Os frutos são operculados, medindo até 1,5 cm de comprimento (LORENZI, 2000).

O chá das folhas e casca é considerado antisséptico pulmonar, intestinal, anti-asmático, hemostático, febrífugo e anti-catarral. Do óleo extrai-se o eucaliptol ou 1,8-cineol, principio ativo que possui atividade antimicrobiana (ALBUQUERQUE, 1989; DEL VITTO et al., 1998). Franco e Fontana (2004) registraram a indicação popular para fricção ou compressa em nevralgias de origem reumática, ciática, nas articulações ou nas costas. Além dessas, Balbachas (1963) ressalta que o eucalipto é um bom antisséptico. Aplica-se exteriormente para lavar feridas e úlceras. Utilizado no tratamento de malária na Venezuela (CARABALLO et al., 2004).

A atividade antimicrobiana tem sido demonstrada para várias espécies de Eucalipto. Kumar et al. (1988) avaliou a atividade antimicrobiana de óleos essenciais de

24 espécies de eucaliptos e encontraram diferenças na atividade entre essas espécies. Pattnaik et al. (1996) demonstraram a ação antimicrobiana do óleo essencial do eucalipto sobre 22 espécies bacterianas e onze de 12 fungos testados.

Takahashi et al. (2004) demonstraram a atividade antimicrobiana de extrato metanólico de várias espécies de Eucalipto, sendo os mais eficazes *E. globulus*, *E. maculata*e *E.botyroides*. Atuando contra Gram positivos, *Pseudomonas putida*e *Tricophyton mentagrophytes*, mas nenhum dos extratos atuou sobre *E. coli*.

Quanto a efeitos tóxicos ou citotóxicos, alguns relatos em humanos de intoxicação já foram publicados. Dentre esses casos, predominam as intoxicações por vaporização, reações alérgicas ao pólen e ingestão de grandes quantidades de óleo essencial por crianças. Estas informações em animais não são disponíveis (BORAL et al., 2004).

3.3.2.2 Óleo de Hortelã-pimenta (*Mentha piperita*)

O gênero *Mentha* é originário da América do Norte, da Ásia e da Europa. De suas origens relativamente frias, a menta se disseminou pelo globo, sofrendo hibridações naturais, mutações e variações, dando oportunidade ao surgimento de numerosas espécies, acabando assim por dificultar a correta identificação das inúmeras variedades e espécies, mesmo por especialistas (BRILHO, 1963).

As folhas de Hortelã-pimenta são oval-lanceoladas e serrilhadas, de cor verde a arroxeada, um tanto pilosas e têm um forte aroma refrescante. De seu óleo essencial se extrai o mentol, seu composto antimicrobiano. As flores são numerosas e roxas e se apresentam em inflorescências terminais do tipo espiga (MAIA, 1994). Planta utilizada desde a antiguidade, pelos egípcios, hebreus, gregos, medievais, romanos e americanos, com sua origem confundida com os mitos. Aparece em todas as listas de ervas da antiguidade (OKA e ROPERTO, 2007).

O óleo essencial de menta e o mentol podem ser usados numa infinidade de outros produtos, pois seu efeito sobre os microrganismos pode ser aproveitado de várias maneiras (MAIA, 1994). Singh et al. (1993) demonstraram o efeito fungicida e fungistático desse óleo sobre 23 espécies de leveduras.

3.3.2.3 Óleo essencial de Pinho

O *Pinus* sp. é nativo, na sua maioria do Hemisfério Norte. Na América do Norte, possui diversidade mais alta que no México e Califórnia. Na Eurásia, ocorrem desde

Portugal e leste da Escócia até o extremo oriental da Rússia, Japão, norte da África. No Himalaia relata-se uma espécie formando a floresta de coníferas subtropical, o (Pinheiro de Sumatra) que já cruzou o Equador em Sumatra. Os pinheiros são também plantados extensivamente em muitas partes do Hemisfério Sul (RICHARDSON, 1998).

O *Pinus* sp. também conhecido como, pinho-comum, pinos ou pinho-americano (LORENZZI, et al., 2003), pode atingir até 30 metros de altura (FREITAS, 2007) e um metro de diâmetro (ARALDI et al., 2008). Esta espécie conífera e típica da América do Norte, amplamente difundida em regiões de indústrias madeireiras em todo o planeta (ODUM, 1988), tendo também sua aplicação na produção de resina (CARVALHO, 2007), e confecção de tintas, adesivos entre outros (CARVALHO, 2007).

O óleo essencial de pinho, oriundo de algumas espécies de *Pinus* e composto em sua maioria por monoterpenos como α e β-pinenos, 2-carenos, α-felantrenos entre outros (WAGNER & WISENAUER, 2006). Além de desinfetar e desodorizar (ROBBERS, 1997), tem aplicabilidade como diurético, estimulante, descongestionante, tônico e na aromaterapia (OLIVEIRA, 2008). Como qualquer outro óleo essencial, pode desencadear reações alérgicas ou irritações locais, sendo que em altas concentrações pode causar inflamações renais (WAGBER e WISENAUER, 2006).

3.3.2.4 Óleo de Castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*)

A classificação botânica é descrita em: Divisão: *Angiospermae*→ Classe: *Dicotiledônea*→ Ordem: *Myrtiflorae*→ Familia: *Lecythidaceae* → Gênero: *Bertholletia*→ Espécie: *excelsa*. A família tem 325 tipos de árvores nos trópicos americanos, divide-se em 15 gêneros, em que o *Bertholletia* é dominante com 75 espécies (BRASIL, 2002).

O óleo da Castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*) é obtido pela prensagem das sementes, ou através do uso de solvente, e tem sido utilizado no enriquecimento de alimentos industrializados de forma a promover a sua qualidade. Novos métodos para purificação, acidificação e extração têm sido testados além da tradicional prensagem (PACHECO, 2007). De acordo com a composição nutricional da Castanha-do-Brasil, os componentes mais abundantes são os lipídios, seguidos pelas proteínas, carboidratos e fibras, de forma que o valor energético é bastante elevado (MOODLEY et al., 2007). É importante ressaltar que os níveis dos nutrientes diferem com o tamanho da castanha, sua variedade e origem.

Além da aplicação na fórmula de cosméticos, o óleo também pode ser utilizado em adição a meios específicos, como fonte de carbono para microrganismos, propiciando a produção de substâncias biosurfactantes, que devido à importância ecológica, são mais aceitos que os surfactantes sintéticos (COSTA et al., 2006).

METODOLOGIA

4.1 Local de Estudo

O projeto foi desenvolvido na Universidade Federal de Pelotas. Os testes de Microdiluição em Caldo e os testes de Eficácia de Desinfetantes foram realizados no Laboratório de Micologia do Instituto de Biologia (IB), UFPEL. Os testes *in uso* tiveram suas coletas realizadas no NURFS-IB-UFPEL e o restante do procedimento, incubação e contagem de UFC também realizados no Laboratório de Micologia.

4.2 Origem das amostras

Anteriormente a este trabalho, durante dois anos, foram realizados projetos no NURFS, IB-UFPEL onde se propôs identificar a microbiota fúngica das aves e mamíferos silvestres, bem como a frequência de fungos patogênicos em excretas de aves silvestres. Foram estudados 68 mamíferos e 50 aves, sendo isolados inúmeras espécies fungicas.

Para o estudo utilizou-se 12 amostras de leveduras, uma de cada espécie isoladas nos estudos acima citados, sendo nove provenientes de excretas de aves silvestres e três da microbiota de animais silvestres. As leveduras selecionadas e previamente identificadas para realização deste estudo foram: *Rhodotorula* sp. *Trichosporon assahii*, *Geotrichum klebahnii*, *Cryptococcus laurentii*, *Candida albicans*, *C. catenulata*, *C. sphaerica*, *C. globosa*, *C. guilliermondii*, *C. intermedia*, *C. ciferri* e *C. famata* (Tabela 1). As amostras estavam estocadas na micoteca do Laboratório de Micologia do IB (UFPel). Para os testes *in uso* as amostras foram coletas durante a realização do mesmo.

Tabela1: Origem das espécies fúngicas utilizadas neste estudo

Espécie de levedura	**Origem da amostra**	
	Excretas	**Microbiota**
	Espécie animal	
Rhodotorulla sp.	Anu Branco (*Guira guira*)	
Trichosporon assahii	*Sanhaçu-Frade* (*Stephanophorus diadematus*)	
Geotrichum klebahnii	*Sabiá-Laranjeira (Turdus rufiventris)*	
Cryptococcus laurentii	Sanhaçu-Frade (*Stephanophorus diadematus*)	
Candida albicans		*Gambá-de-Orelha-Branca (Didelphis albiventris)*
Candida catenulata	Cardeal-do-Banhado (*Amblyramphus holosericeus)*	
Candida sphaerica	Cardeal (*Paroaria coronate*)	
Candida globosa		Bugio-ruivo (*Alouata guariba clamitans*)
Candida guilliermondii	Cardeal (*Paroaria coronate*)	
Candida intermedia	Bico-Duro (*Saltator aurantiirostris*)	
Candida ciferri	Tie-Sangue (*Ramphocelus bresilius)*	
Candida famata		*Gato-do-Mato-Grande (Leopardus geoffroyi)*

4.3 Antifungigrama

A técnica utilizada para verificar a atividade dos desinfetantes frente às leveduras foi a Microdiluição em Caldo através da Concentração Inibitória Mínima e da Concentração Fungicida Mínima (CLSI – M27 – A3, 2008) adaptada aos desinfetantes.

4.3.1 Desinfetantes Químicos

As concentrações (diluição 1:2) dos desinfetantes químicos utilizados para realização dos testes foram: Hipoclorito de Sódio 10% (HS) de 25 à 0,0488mg/mL, Água Sanitária 2,5% (AS) (Cloro Hidróxido de Sódio) de 6,25 à 0,0122mg/mL, Digluconato de Clorexidina 20% (DC) de 50 à 0,0977mg/mL, Quaternário de Amônia 50% (QA) de 125 à 0,2441mg/mL e Pinho 50% (P) (0,45% de Cloreto de Cocobenzil alquil didometil amônio/Cloreto de didecil dimetil amônio e 0,35% de Cloreto de Cetil Trimetil Amônio) de 125 à 0,2441mg/mL.

4.3.2 Fitoquímicos

As concentrações (diluição 1:2) dos fitoquímicos utilizados para realização dos testes foram: Óleo essencial de Pinho 50% (OP) de 125 à 0,2441 mg/mL, Óleo essencial de *Mentha piperita* 100% (OM) de 250 à 0,0488mg/mL, Extrato Hidroalcoólico de Eucalipto 10% (EE) de 25 à 0,0488 mg/mL e o Óleo de Castanha-do-Brasil 100% (OC) de 250 à 0,48833mg/mL. Ainda foi testado o composto 1,8-Cineol 100% (C) que variou de 250 à 0,04883mg/mL.

4.3.3 Técnica de Microdiluição em Caldo

Foram utilizadas placas de microtitulação estéreis com 96 poços, onde foram feitas sucessivas diluições dos desinfetantes a partir das concentrações descritas anteriormente (1:2) e em cada diluição foram dispostos os inóculos fúngicos previamente ajustados em meio RPMI-1640 adicionado de MOPS, na escala do tubo 0,5 de McFarland. Foram utilizadas colônias jovens (24/48h) para preparação do inoculo.

As placas foram incubadas a 37º/48h e após este período foi realizada leitura da Concentração Inibitória Mínima (CIM). A partir dos poços onde as concentrações não apresentaram crescimento do inoculo, alíquotas de 10µL foram semeadas em meio de cultura sólido (Ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol) e incubadas a 37º/24h para verificação da Concentração Fungicida Mínima (CFM).

Foram realizados os controles negativos para todos os desinfetantes estudados, assim como os controles positivos foram realizados para cada amostra fúngica. Todas as amostras fúngicas foram testadas em duplicata frente aos desinfetantes e aos fitoquímicos com três repetições.

4.4 Testes de Eficácia de Desinfetantes (Cinética)

Os testes de eficácia dos desinfetentes foram realizados de acordo com o protocolo descrito por Schuch et al. (2008) adaptado aos desinfetantes utilizados neste estudo. Este teste foi realizado com as mesmas leveduras anteriormente descritas: *Candida famata, C. albicans, C. catenulata, C. sphaerica, C. guilliermondii, C. ciferri, C. intermedia, C. globosa, Cryptococcus laurentii, Rhodotorula sp., Trichosporon assahii e Geotrichum klebahnii.* Os desinfetantes usados nestes testes foram selecionados a partir dos melhores resultados obtidos na técnica de Microdiluição em Caldo. A concentração dos desinfetantes utilizada partiu da CIM obtida nos testes de Microdiluição em Caldo: HS 0,1953mg/mL, AS 0,01953mg/mL, P 3,9063mg/mL, QA 0,2441mg/mL e DC 0,0977mg/mL.

Para este teste, foram utilizados dois tubos-teste contendo 4mL de cada desinfentante, nas concentrações estudadas previamente. Em um tubo foi adicionado 1mL de água destilada estéril, e ao outro, 1mL de leite (representando matéria orgânica) autoclavados a 121ºC por cinco minutos. Todo este procedimento foi realizado em duplicata.

Os tubos foram agitados vigorosamente e a seguir, 100µL de cada inóculo fúngico foi adicionado separadamente. Nos intervalos de 0,5, 1, 5 e 15 minutos, alíquotas (50 µL) foram recolhidas e transferidas para tubos contendo produto químico neutralizante específico para cada desinfetante.

Os produtos neutralizantes utilizados foram: Tiossulfato de sódio (1%) foi utilizado para Hipoclorito de Sódio 10% e Clorofina 2,5%, e Lecetina de Soja (0,6%) para Quaternário de Amônia 50%, Digluconato de Clorexidina 20% e Pinho 50%.

Após, aliquotas de 100µL foram recolhidas para placas (em triplicata) contendo Ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol e incubadas a 36ºC/48h. Após o período de incubação foi procedida à contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC). Foi realizado o controle negativo de todos os desinfetantes, antes de cada teste, para assegurar sua esterilidade.

4.5 Testes *in uso*

Os testes *in uso* foram realizados no NURFS da UFPEL, após verificar nos testes *in vitro* acima descritos quais os desinfetantes mais eficientes. As concentrações utilizadas foram às mesmas do Teste de Eficiência dos Desinfetantes.

No primeiro momento da coleta foram dispostas placas de Petri abertas contendo Ágar Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol, durante 20 minutos em diferentes locais do ambulatório do NURFS para sedimentação fúngica do ambiente.

Sendo: duas placas na mesa de procedimentos (em inox), uma placa no armário de medicamentos e duas placas na bancada de utensílios. Logo após foram realizadas coletas através de *swab* estéril embebido em água peptonada friccionados nos mesmos locais anteriormente descritos, totalizando dez placas (Figura 2).

Num segundo momento, após a realização das coletas acima citadas, foi realizada a limpeza e desinfecção dos locais com o desinfetante selecionado naquele momento. Os testes foram realizados com intervalo semanal para cada produto desinfetante.

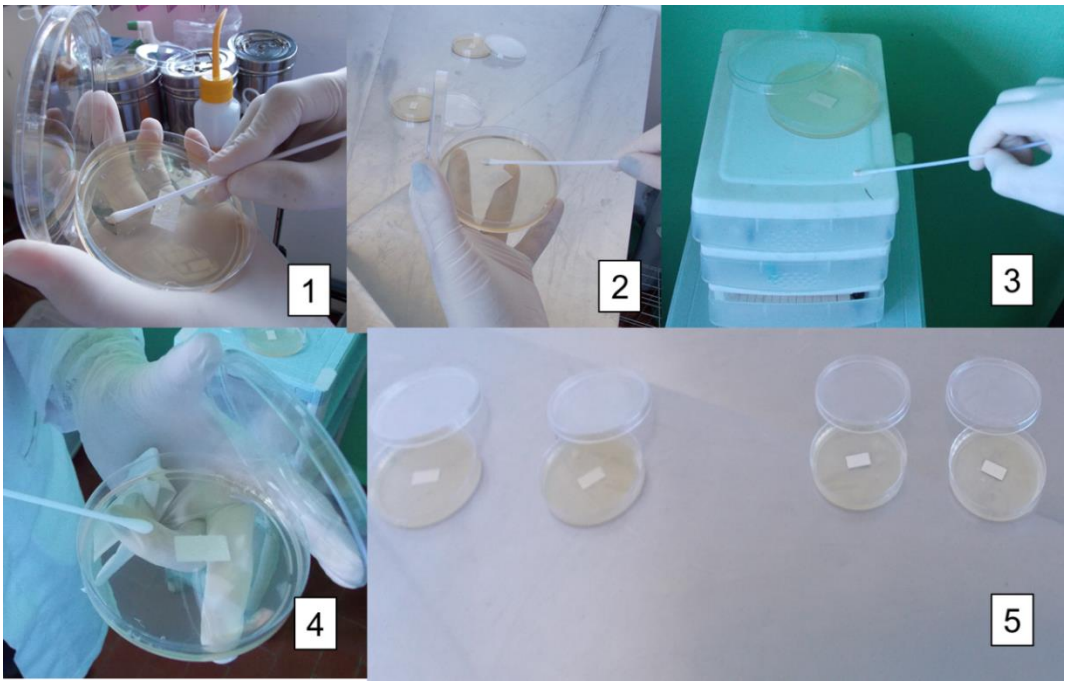

Figura 2: Coletas realizadas em diferentes superfícies (1- Mesa de Utensílios, 2 e 5- Mesa de procedimentos, 3 e 4- Armário de Medicamentos) do ambulatório do Núcleo da Fauna Silvestres da UFPEL

Fonte: Arquivo pessoal

O mesmo procedimento de coleta foi realizado depois da limpeza e desinfecção, sendo repetido após cinco, 15 e 60 minutos da realização do procedimento. O meio de cultivo utilizado nas placas nos dois momentos de coleta foi ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol.

As placas coletadas foram encaminhadas ao Laboratório de Micologia do IB e mantidas em estufa a temperatura de 36ºC por 48h. Após este período foi realizada a contagem das colônias fúngicas antes e após o uso dos produtos para comparação dos resultados de contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs).

5 RESULTADOS

5.1 Antifungigrama

Nos testes de microdiluição em caldo realizados com QA, P e DC nas concentrações descritas anteriormente não se verificou CIM, pois não houve crescimento da levedura em nenhuma das concentrações estudadas. Foram realizadas então, novas diluições até chegar às concentrações: Quaternário de amônia 50mg/mL, Pinho 100 mg/mL e Digluconato de Clorexidina 20 mg/mL. A partir daí as concentrações testadas foram: QA 12,5 a 0,0244 mg/mL, P 25 a 0,0488 mg/mL e DC 5 a 0,0098 mg/mL.

5.1.1 Desinfetantes Químicos

5.1.1.1 Hipoclorito de Sódio e Água Sanitária:

As leveduras estudadas se mostraram suscetíveis ao HS e a AS. No HS os microrganismos obtiveram a CIM entre 0,0651 e 0,0407 mg/mL. Já para AS às leveduras obtiveram CIM entre 1,0417 e 0,1139 mg/mL de acordo com a Tabela 2.

Tabela 2: Concentração Inibitória Mínima (CIM) do Hipoclorito de sódio (HS) e Agua Sanitária (AS) frente às 12 espécies de leveduras estudadas provenientes de excretas e microbiota de animais silvestres

Levedura Estudada	**HS (mg/mL)**	**AS (mg/mL)**
Rhodotorulla sp.	0,0651	1,0417
Candida albicans	0,0407	0,1139
Candida catenulata	0,0488	0,1302
Candida sphaerica	0,0407	0,1628
Candida guilliermondii	0,0407	0,1628
Candida famata	0,0651	0,1628
Candida intermedia	0,0570	0,2279
Geotrichum klebahnii	0,0570	0,8138
Candida ciferri	0,0651	0,2279
Tricosporon assahii	0,0651	0,6836
Cryptococcus laurentii	0,0651	1,0417

Cont. tabela 2

Candida globosa	0,0407	0,1139
Média Final	**0,05451**	**0,4069**

Em relação à Concentração Fungicida Mínima os dois desinfetantes apresentaram inibição do crescimento nas mesmas concentrações acima citadas.

5.1.1.2 Digluconato de Clorexidina

Os microrganismos estudados se mostraram sensíveis ao Digluconato de Clorexidina, nas concentrações testadas, sendo que a CIM e a CFM ficou em 0,0098 mg/mL em todas as leveduras (Tab. 3).

Tabela 3: Concentração Inibitória Mínima (CIM) do Digluconato de Clorexidina 20% (DC) frente às 12 leveduras estudadas provenientes de excretas e microbiota de animais silvestres

Levedura Estudada	**DC (mg/mL)**
Rhodotorulla sp.	< q 0,0098
Candida albicans	< q 0,0098
Candida catenulata	< q 0,0098
Candida sphaerica	< q 0,0098
Candida guilliermondii	< q 0,0098
Candida famata	< q 0,0098
Candida intermédia	< q 0,0098
Geotrichum klebahnii	< q 0,0098
Candida ciferri	< q 0,0098
Tricosporon assahii	< q 0,0098
Cryptococcus laurentii	< q 0,0098
Candida globosa	< q 0,0098
Média Final	**< q 0,0098**

5.1.1.3 Quaternário de Amônia e Pinho

A CIM e a CFM do quaternário de amônia frente às leveduras estudadas ficou em 0,0244mg/mL. Já a CIM do Pinho variou de 0,2604 à 1,17 mg/mL dependendo da espécie testada, conforme descrito na tabela 4.

Tabela 4: Concentração Inibitória Mínima (CIM) do Quaternário de Amônia frente às 12 espécies de leveduras estudadas provenientes de excretas e microbiota de animais silvestres

Levedura Estudada	**QA (mg/mL)**	**P (mg/mL)**
Rhodotorulla sp.	< q 0,0244	1,1719
Candida albicans	< q 0,0244	0,3906
Candida catenulata	< q 0,0244	0,3255
Candida sphaerica	< q 0,0244	0,2604
Candida guilliermondii	< q 0,0244	0,3255
Candida famata	< q 0,0244	0,3255
Candida intermedia	< q 0,0244	0,3255
Geotrichum klebahnii	< q 0,0244	0,7161
Candida ciferri	< q 0,0244	0,7161
Tricosporon assahii	< q 0,0244	1,1719
Cryptococcus laurentii	< q 0,0244	0,3255
Candida globosa	< q 0,0244	0,3255
Média Final	**< q 0,0244**	**0,5317**

5.1.2 Fitoquímicos

5.1.2.1 Extrato Hidroalcoólico de *Eucalipto* sp. e 1,8-Cineol

Todos os isolados fúngicos foram suscetíveis aos dois fitoquímicos estudados em algumas das concentrações testadas. No Extrato de Eucalipto as leveduras apresentaram CIM nas diluições entre 3,65 e 0,18 mg/mL, no 1,8-cineol as leveduras apresentaram CIM nas diluições entre 62,5 e 16,93 mg/mL (Tab. 5).

Tabela 5: Concentração Inibitória Mínima (CIM) do Extrato Hidroálcoolico de *Eucalipto* e Cineol frente às 12 espécies de leveduras provenientes de microbiota e de excretas de animais silvestres

Levedura Estudada	**EE (mg/mL)**	**C (mg/mL)**
Rhodotorulla sp.	3,13	62,50
Candida albicans	0,39	62,50
Candida catenulata	0,85	52,08
Candida sphaerica	0,72	52,08
Candida guilliermondii	0,42	72,92
Candida famata	0,39	46,88

Cont. tabela 5

Candida intermedia	0,65	46,88
Geotrichum klebahnii	0,91	62,50
Candida ciferri	3,65	52,08
Tricosporon assahii	0,18	52,08
Cryptococcus laurentii	0,46	16,93
Candida globosa	0,42	27,34
Média Final	**1,0147**	**50,5642**

Com relação à Concentração Fungicida Mínima o Extrato Hidroalcoólico de *Eucalipto* sp. e o 1,8-cineol não apresentaram ação fungicida, demonstrando apenas ação fungistática.

5.1.2.2 Óleo de *Mentha piperita*

Os isolados fungicos estudados se mostraram sensíveis ao óleo de *Mentha piperita.* O composto apresentou CIM entre 104,16 à 208mg/mL (Tab. 6). Com relação à CFM, o óleo de *Mentha piperita* demonstrou apenas ação fungistática.

Tabela 6: Concentração Inibitória Mínima (CIM) do óleo de *Mentha piperita* frente às 12 leveduras provenientes de microbiota e de excretas de animais silvestres

Levedura Estudada	**OM (mg/mL)**
Rhodotorulla sp.	166,6667
Candida albicans	208,3333
Candida catenulata	208,3333
Candida sphaerica	208,3333
Candida guilliermondii	166,6667
Candida famata	125
Candida intermédia	166,6667
Geotrichum klebahnii	104,1667
Candida ciferri	166,6667
Tricosporon assahii	166,6667
Cryptococcus laurentii	125
Candida globosa	166,6667
Média Final	**164,9306**

5.1.2.3 Óleo de Pinho

A CIM do Óleo de Pinho frente às leveduras estudadas variou entre 16,9271 e 1,1393mg/mL (Tab. 7). Em relação à CFM, o Óleo de Pinho demonstrou ação fungicida nas mesmas concentrações.

Tabela 7: Concentração Inibitória Mínima do Óleo de Pinho frente a leveduras isoladas de excretas e microbiota de animais silvestres

Levedura Estudada	**OP 50% (mg/mL)**
Rhodotorulla sp.	11,0677
Candida albicans	2,9297
Candida catenulata	16,9271
Candida sphaerica	11,0677
Candida guilliermondii	5,2084
Candida famata	1,1393
Candida intermédia	7,8125
Geotrichum klebahnii	7,9753
Candida ciferri	4,0690
Tricosporon assahii	6,0221
Cryptococcus laurentii	7,8125
Candida globosa	16,9271
Média Final	**8,2465**

5.1.2.4 Óleo de Castanha-do-Brasil

Os isolados fúngicos se mostraram suscetíveis dentro das concentrações testadas. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) das leveduras variou de 16,9 a 145,8 mg/mL (Tabela 8).

Tabela 8: Concentração Inibitória Mínima do Óleo de Castanha-do-Brasil frente às 12 leveduras isoladas de excretas e microbiota de animais silvestres

Levedura Estudada	**OC (mg/mL)**
Rhodotorulla sp.	104,2
Candida albicans	83,3
Candida catenulata	104,2

Cont. tabela 8

Candida sphaerica	104,2
Candida guilliermondii	104,2
Candida famata	22,5
Candida intermédia	145,8
Geotrichum klebahnii	72,9
Candida ciferri	52,1
Tricosporon assahii	16,9
Cryptococcus laurentii	72,9
Candida globosa	104,2
Média Final	**82,28**

Com relação à CFM, o óleo de Castanha-do-Brasil apresentou ação fungicida nas mesmas concentrações.

5.2 Testes de Eficácia dos Desinfetantes (Cinética)

Os testes de eficácia dos desinfetantes foram realizados com os desinfetantes que demonstraram uma ação mais eficaz nos testes de Microdiluição em Caldo, sendo eles: Pinho, Quaternário de Amônia, Digluconato de Clorexidina, Hipoclorito de Sódio e Água Sanitária (Tab. 9).

O tempo zero corresponde ao controle positivo, ou seja, quando o inoculo fúngico ainda não havia entrado em contato com o desinfetante.

Tabela 9: Concentrações dos desinfetantes utilizadas para os Testes de Eficácia de Desinfetantes

Desinfetante	Concentração Inicial	Diluição conforme metodologia	Concentração Final
Água Sanitária	0,7 mg/mL	Adição de 1mL de água ou 1mL de leite	0,56 mg/ml
Digluconato de Clorexidina	10 mg/mL	Adição de 1mL de água ou 1mL de leite	8 mg/mL
Hipoclorito de Sódio	0,28 mg/mL	Adição de 1mL de água ou 1mL de leite	0,22 mg/mL
Pinho	90,9 mg/mL	Adição de 1mL de água ou 1mL de leite	72,72 mg/mL
Quaternário de Amônio	9,8 mg/mL	Adição de 1mL de água ou 1mL de leite	7,84 mg/mL

O Controle negativo dos desinfetantes, confirmou a esterilidade dos compostos estudados. Assim como o controle positivo de cada levedura foi realizado para garantir sua viabilidade (Figura 3).

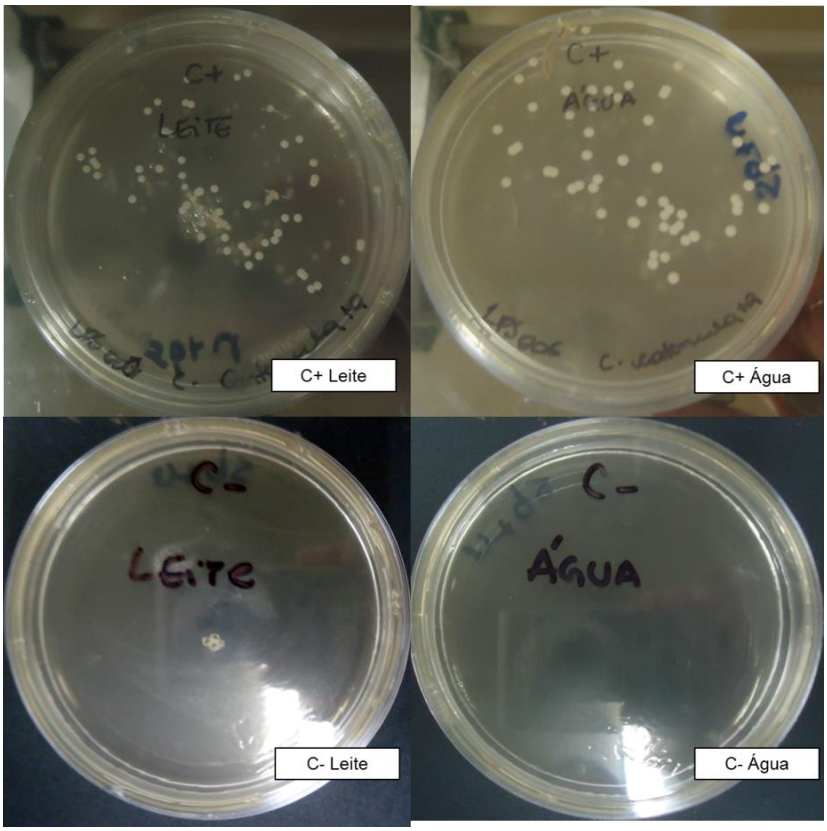

Figura 3: Controles positivos e negativos do HS, e de *C. catenulata*

Fonte: Arquivo Pessoal

5.2.1 Hipoclorito de Sódio

No HS *C. famata e C. lautentii*, tiveram inativação de 100% no crescimento fungico, nos intervalos de tempo estudados. Os demais microrganismos estão descritos na Figura 4. Os testes com as leveduras *Rhodotorula* sp., *Geotrichum klebahnii* e *Trichosporon assahii* não foram realizados. O HS foi testado na concentração de 0,28mg/mL.

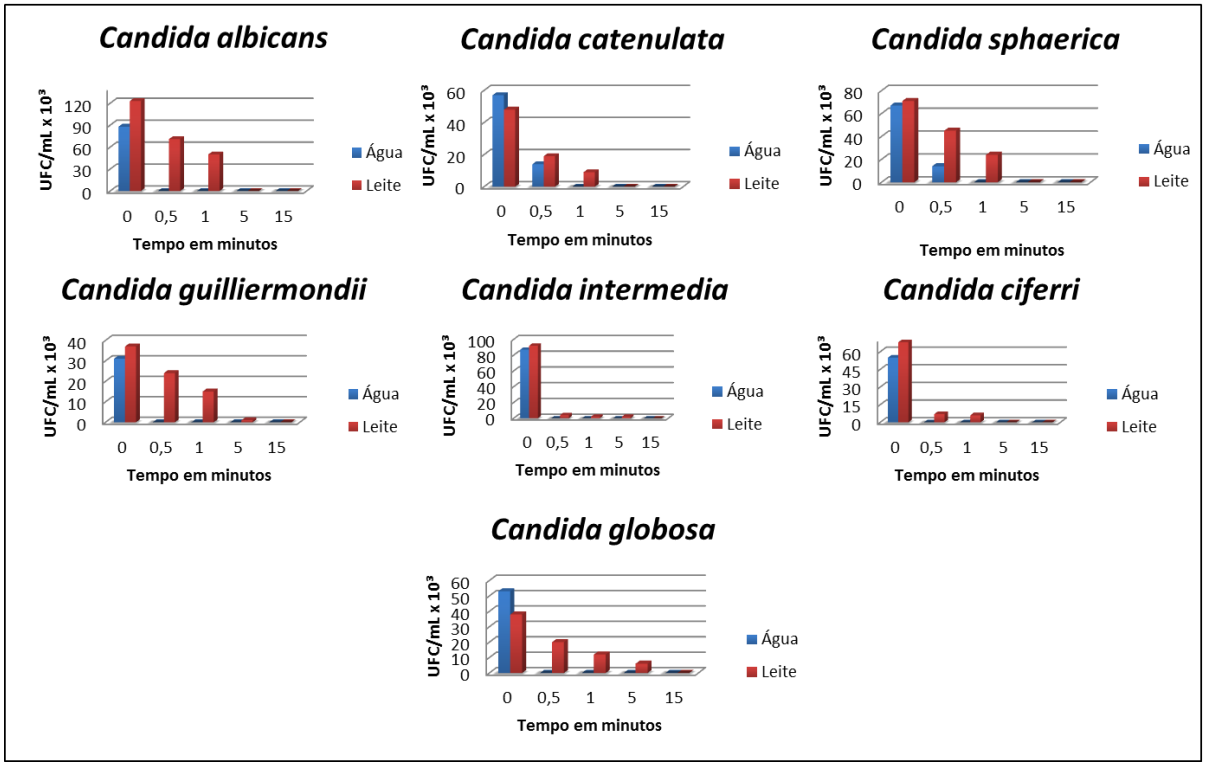

Figura 4: Atividade antifúngica do Hipoclorito de sódio (HS) diluído em água e em leite frente à *Candida albicans*, *C. catenulata*, *C. sphaerica*, *C. guilliermondii*, *C. ciferri*, *C. globosa* expressa em Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) de acordo com o tempo de exposição ao desinfetante

Fonte: O próprio autor

O isolado de *C. albicans* foi inativado 100% pelo HS quando exposto ao desinfetante por no mínimo cinco minutos. Quando esse foi diluído em água a redução foi de 100% a partir de meio minuto de exposição, já quando diluído em leite (matéria orgânica) foi inativado quando exposto ao desinfetante por no mínimo cinco minutos. No HS em leite exposto por meio minuto ocorreu uma redução de 42,2% das UFC, a exposição por um minuto reduziu 59,3%.

C. catenulata apresentou inibição do crescimento em 100% quando exposta ao HS por no mínimo cinco minutos. Houve redução de 75,4% no crescimento quando exposto ao desinfetante por meio minuto quando diluído em água e a partir de um minuto a redução foi de 100%. Quando realizada a diluição em leite esta espécie reduziu em 60,4% quando exposta a HS por meio minuto, 81,3% em um minuto de exposição e 100% a partir de cinco minutos.

Quando testado frente a *C. sphaerica*, o HS diluído em água reduziu o crescimento da levedura em 100% quando exposta por, pelo menos, um minuto ao

desinfetante. Quando diluído em leite a exposição ao HS a partir de cinco minutos reduziu 100% o crescimento desta espécie.

Em meio minuto o desinfetante diluído em água reduziu 79,1% o crescimento desta espécie. Para a diluição realizada em leite obteve uma redução de 36,6% quando a levedura foi exposta ao HS por meio minuto e 66,2% quando exposta por um minuto.

Frente a *C. guilliermondii*, o HS reduziu 100% da espécie quando esta foi exposta a partir de meio minuto a este desinfetante diluído em água. Na diluição realizada em leite, ocorreu uma redução de 35,1% quando exposta a meio minuto, 59,4% na exposição por um minuto e 100% a partir de cinco minutos de exposição.

O crescimento da *C. intermedia* foi inativado em 100% pelo HS diluído em água a partir de meio minuto de exposição a este desinfetante. Quando diluído em leite, o HS reduziu em 95,7%, 97,8% e 98,8% o crescimento desta levedura quando expostos ao desinfetante em 0,5; 1 e 5 minutos respectivamente. Com 15 minutos de exposição à redução foi 100%.

C. ciferri foi inativada quando exposta ao HS diluído em agua a partir da exposição por meio minuto. Para a diluição realizada com leite a inativação de 100% do crescimento da levedura ocorreu a partir da exposição por cinco minutos, e houve uma redução de 89,7% quando exposta ao HS por meio minuto, de 91,2% na exposição por um minuto.

Frente a *C. globosa*, o HS obteve uma redução de 100% a partir da exposição por meio minuto, quando diluído em água. Para a diluição realizada em leite, ocorreu uma redução de 47,4% quando exposto por meio minuto ao desinfetante, 68,4% na exposição por um minuto, 84,2% por cinco minutos e 100% quando exposto por 15 minutos.

5.2.2 Água Sanitária

Nos testes com AS, *C. catenulata* e *C. globosa*, obtiveram uma redução de 100% na contagem das UFC, durante 15 minutos. Os testes com *Rhodotorula* sp., *Geotrichum klebahnii* e *T. assahii* não foram realizados. Os resultados para os demais microrganismos estão descritos na Figura 5. A AS foi testada na concentração inicial de 0,7mg/mL.

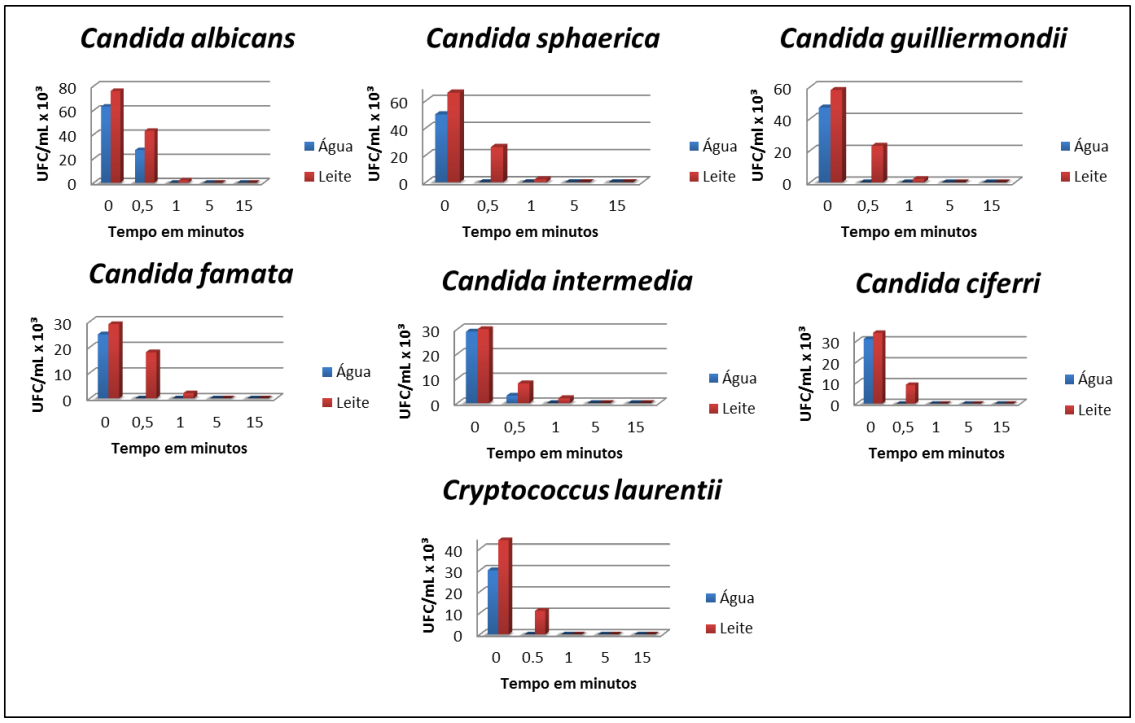

Figura 5: Atividade antifúngica Água Sanitária (AS) diluído em água e em leite frente à *Candida albicans, C. sphaerica, C. guilliermondii, C. famata, C. intermedia, C. ciferri e Cryptococcus laurenti* expressa em Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) de acordo com o tempo de exposição ao desinfetante

Fonte: O próprio autor

Frente a *C. albicans*, o AS obteve reduziu 57,1% das UFCs durante a exposição por meio minuto e 100% quando exposto por 1, 5 e 15 minutos, quando diluído em água. Para a diluição realizada em leite, ocorreu uma redução de 43,2% em meio minuto, 97,4% em um e 100% nos demais tempos de exposição.

Para *C. spaherica*, a contagem das UFCs reduziu 100% quando exposta partir de meio minuto, quando diluído em água. Para a diluição realizada em leite, ocorreu uma redução de 60,6% em meio minuto de exposição, 97% em um minuto e 100% a partir de cinco minutos de exposição.

Frente a *C. guilliermondii*, o AS obteve uma redução de 100% das UFCs a partir da exposição de meio minuto, quando diluído em água. Para a diluição realizada em leite, ocorreu uma redução de 60,3% em meio minuto, 96.6% em um minuto, e 100% a partir de cinco minutos de exposição.

C. famata frente ao AS obteve uma redução de 100% quando exposta a partir de meio minuto ao desinfetante diluído em água. Para a diluição realizada em leite, ocorreu

uma redução de 37,9% em meio minuto, 93,1% em um minuto, e 100% quando exposto a partir de cinco minutos.

C. intermedia teve suas UFC inativados a partir de cinco minutos exposta frente ao AS, quando diluído em água. Apresentou uma redução de 37,9% em meio minuto e 93,1% em um minuto de exposição. Quando diluído em leite, as UFCs foram inativadas 100% a partir de cinco minutos de exposição, Quando exposta por meio minuto ocorreu uma redução de 73,3% das UFCs e 93,3% durante um minuto.

Para *C. ciferri* as UFC foram inativadas a partir de um minuto de exposição frente a AS. Quando diluído em água teve uma redução de 100% das UFCs a partir de meio minuto e quando diluído em leite obteve uma redução de 73,5% na exposição por meio minuto. A AS reduziu 100% das UFCs durante 15 minutos quando diluído em água. Já para a diluição realizada em leite, ocorreu uma redução de 75% em meio minuto, de 100% nos demais tempos de exposição estudados.

5.2.3 Digluconato de Clorexidina

Nos testes de eficácia de desinfetantes com Digluconato de Clorexidina (DC), *Rhodotorula sp.*, *C. ciferri*, *T. assahii*, *C. laurentii*, *C. globosa* obtiveram uma redução de 100% na contagem das UFC, quando expostas ao produto a partir de 0,5 minuto com o desinfetante diluído em água e em leite. Teste com *Geotrichum klebahnii* não foi realizado. Os resultados para as demais leveduras estudadas estão descritos na Figura 6. O DC foi testado na concentração de 10mg/mL.

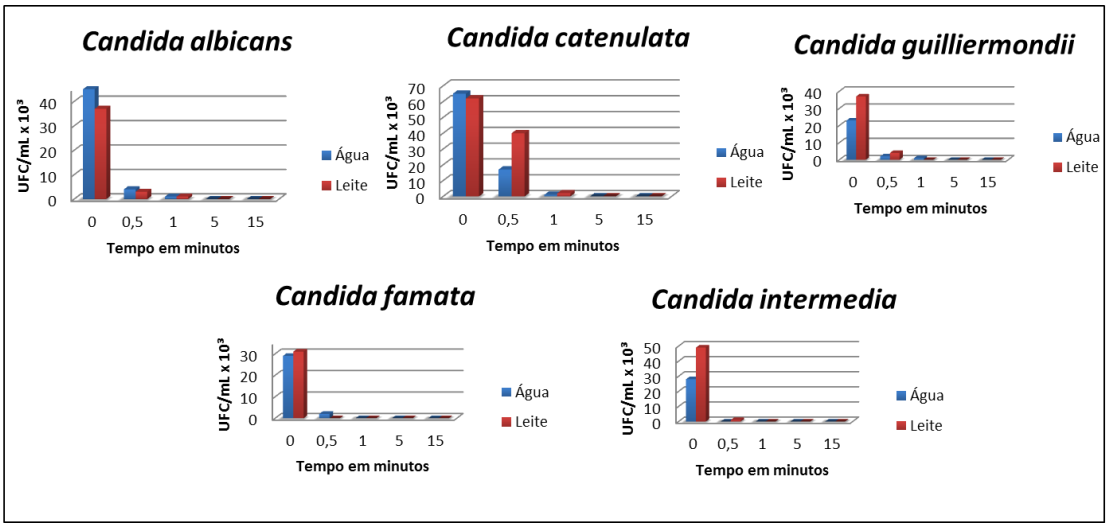

Figura 6: Atividade antifúngica do Digluconato de Clorexidina (DC) diluído em água e em leite frente à *Candida albicans* expressa em Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) de acordo com o tempo de exposição ao desinfetante

Fonte: O próprio autor

C. albicans foi inativada a partir de cinco minutos exposta frente ao DC diluído em leite ou em água. Quando diluído em água teve uma redução de 91,1% quando exposta a ele por meio minuto e 97,8% em exposição por um minuto. Quando diluído em leite ocorreu uma redução de 91,9% quando exposta a meio minuto e 97,3% em exposição por um minuto.

Para *C. catenulata*, o DC diluido em água, reduziu em 73,8% o seu crescimento quando exposta a ele por meio minuto, 98,5% em exposição por um minuto e de 100% a partir de cinco minutos de contato. Para a diluição do produto realizadas com leite, a exposição por meio minuto gerou uma redução de 35,5% do crescimento da levedura, em um minuto de exposição houve redução dede 96,8% desta espécie, sendo que a partir de cinco minutos a redução foi de 100%.

Frente a *C. sphaerica*, o DC reduziu 71% ao ser exposta ao desinfetante por meio minuto, reduziu 93,5% ao ser exposta por um minuto e 96,8% após exposição por cinco minutos e de 100% em 15 minutos (Figura 7), quando diluído em água. Para a diluição realizada em leite, ocorreu uma redução de 67,6% em exposição por meio minuto, 94,6% ao ser exposto por um minuto. A partir de cinco minutos e de exposição não houve crescimento da levedura.

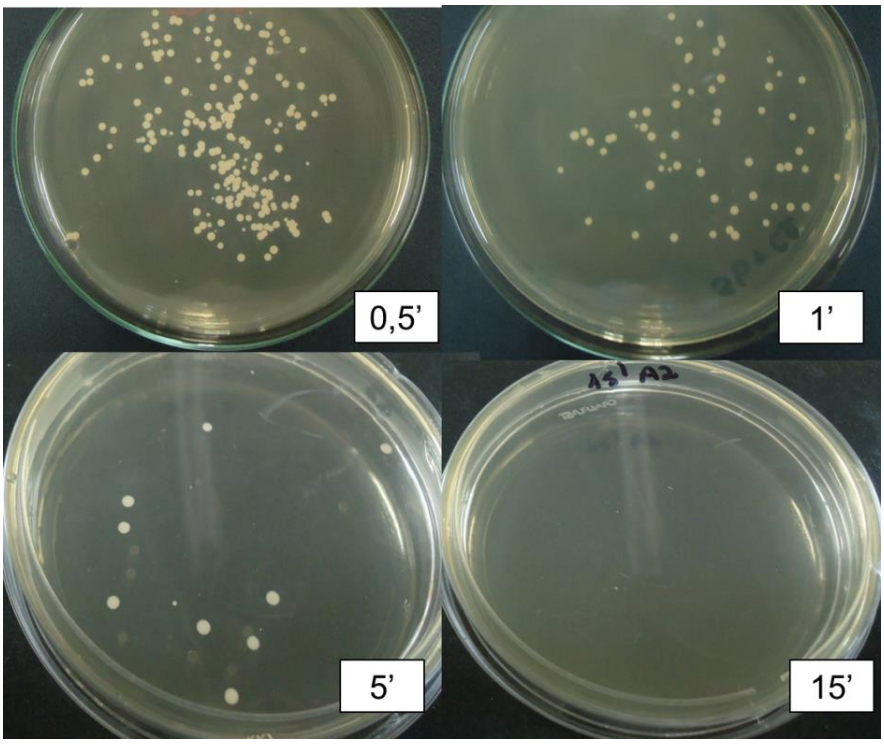

Figura 7: Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) de *Candida sphaerica*, de acordo com o tempo de exposição ao Digluconato de Clorexidine (DC)
Fonte: Arquivo pessoal

C. guilliermondii foi inativada a partir de cinco minutos de exposição ao DC diluído em água ou em leite. A levedura apresentou uma redução de 91,3% ao ser exposta a meio minuto, 96,7% por um minuto, quando diluído em água. Para a diluição realizada em leite, ocorreu uma redução de 89,2% na exposição a DC por meio minuto e de 100% a partir de um minuto.

C. famata foi inativada a partir da exposição ao DC por um minuto, quando diluído em leite. Com a diluição realizada em água, ocorreu uma redução de 93,1% na exposição a meio minuto e de 100% ao ser exposta a um minuto.

C. intermedia foi inativada quando exposta ao DC diluído em água a partir de meio minuto. Para a diluição realizada em leite, ocorreu uma redução de 94,7% na exposição por meio minuto ao DC e de 100% a partir da exposição por um minuto.

5.2.4 Pinho

C. ciferri teve inativação de 100% no seu crescimento a partir de meio minuto em contato com P diluído em água ou leite. Os demais microrganismos estão descritos na Figura 8. Os testes com as leveduras *Rhodotorula* sp., *Geotrichum klebahnii* e

Trichosporon assahii não foram realizados. O P foi testado na concentração inicial de 90,9 mg/mL.

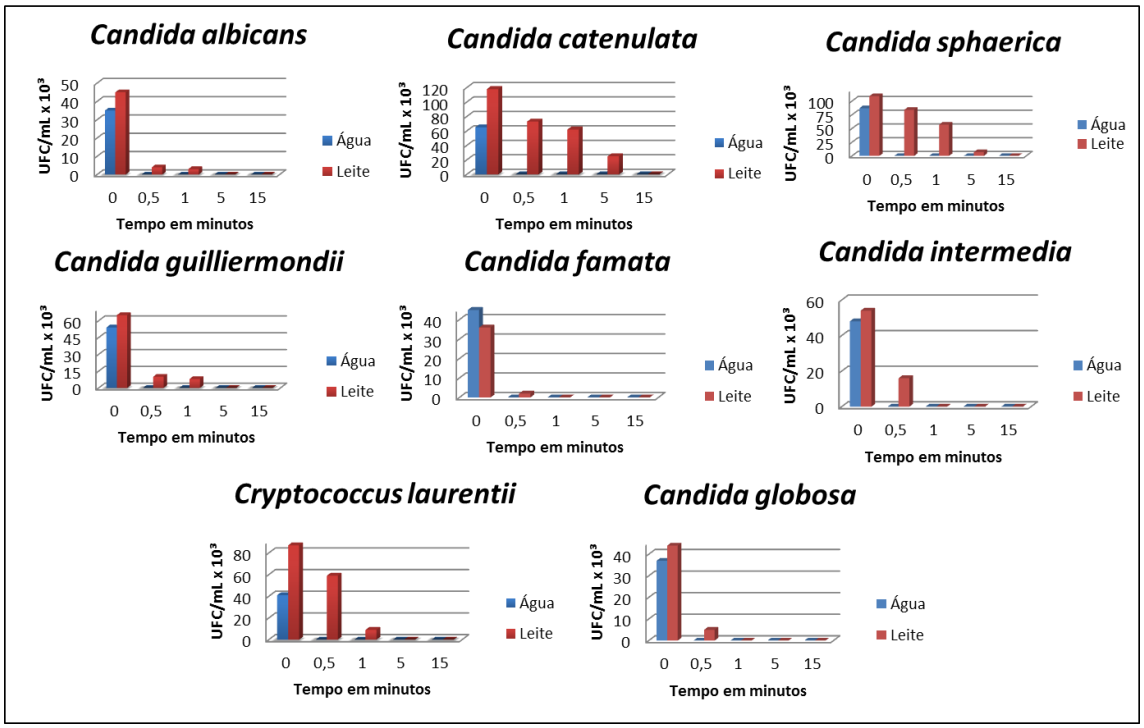

Figura 8: Atividade antifúngica do Pinho (P) diluído em água e em leite frente à *Candida albicans*, *C. catenulata*, *C. sphaerica*, *C. guilliermondii*, *C. famata*, *C. intermedia*, *C. globosa* e *Cryptococcus laurentii* expressa em Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) de acordo com o tempo de exposição ao desinfetante

Fonte: O próprio autor

C. albicans foi totalmente inativada a partir de cinco minutos em contato com P diluído em leite, ocorreu uma redução de 91,1% quando em contato por meio minuto, 93,3% no contato por um minuto. Quando diluído em água houve redução a partir de meio minuto de contato.

C. catenulata foi inativada a partir de 15 minutos em contato ao P quando diluído em leite, entretanto quando diluído em água houve redução total da levedura a partir do contato por meio minuto. Ainda quando diluído em leite ocorreu uma redução de 38,1% da levedura quando em contato por meio minuto, 47,5% no contato por um minuto e 78,8% no contato por cinco minutos.

C. sphaerica foi inativada em 100%, no contato com P diluído em agua, por pelo menos meio minuto. Quando diluído em leite ocorreu uma redução de 22,9% no crescimento da levedura no contato por meio minuto com o produto, 47,7% no contato

por um minuto e 93,8% no contato por cinco minutos e 100% após quinze minutos de contato.

C. guilliermondii foi inativada no a partir de meio minuto frente ao P diluído na água. Quando diluído em leite foi inativado em 100% a partir de cinco minutos em contato, após meio minuto ocorreu uma redução de 84,6% e após um minuto 87,7% de redução. *C. famata* foi inativada a partir de meio minuto de exposição frente ao P diluído em agua. Quando diluído em leite foi inativada em 100% a partir de um minuto em contato, e ocorreu uma redução de 97,2% do crescimento quando em contato por meio minuto.

C. intermedia foi inativada a partir de meio minuto em exposição ao P diluído em água. Para a diluição realizada em leite, ocorreu uma redução de 70,3% quando exposta por meio minuto e de 100% a partir de um minuto em contato.

C. laurentii foi inativado 100% a partir de cinco minutos de contato com o P diluído em leite. Ocorreu uma redução de 32,2% quando em meio minuto de contato e 89,7% quando exposto por um minuto ao produto. P diluído em água reduziu a levedura em 100% a partir de meio minuto de contato.

C. globosa foi inativada a partir de um minuto em contato com o P. O P reduziu de 100% a partir de meio minuto de exposição, quando diluído em água. Já para a diluição realizada em leite (matéria orgânica), ocorreu uma redução de 88,6% no contato por meio minuto com o produto e de 100% a partir de um minuto.

5.2.5 Quaternário de Amônia

No QA, foram feitas diversas diluições até chegar a 9,8mg/mL. Mas todas as leveduras estudadas tiveram inativação de 100% no crescimento a partir de meio minuto de exposição ao produto.

5.3 Testes *in uso*

No total foram coletadas e estudadas 120 amostras, através de placas de Petri, obtidas da superfície de ambientes de manipulação de animais silvestres em Centro de Reabilitação (NURFS), sendo que destas, 30 placas foram expostas antes da desinfecção (AD) e 90 após a desinfecção dos locais (Figura 9), dispostas nos tempos de 5, 15 e 60 minutos. Os testes foram realizados com intervalo semanal para cada produto, sendo uma para cada desinfetante (P, DC, AS), totalizando 40 placas por semana.

Das 30 amostras de superfície estudadas AD 100% foram positivas para fungos filamentosos e leveduriformes. Essas placas foram expostas na primeira hora da manhã no ambulatório do NURFS (mesa de procedimentos, bancada de utensílios e armário de medicamentos).

Das 90 amostras estudas após a desinfecção do local, em 37,8% (34/90) houve crescimento de UFCs e em 62,2% (56/90), não houve isolamento fungico, Sendo que a mesa de procedimentos e o armário de medicamentos apresentaram maior número de UFCs na coleta realizada com o *swab.* Já a mesa de utensílios obteve menos UFCs nas duas formas de coleta.

A avaliação da redução de microrganismos após a desinfecção foi realizada através da contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) e expressas em porcentagens. Para AS, apenas 16,7% (5/30), apresentaram isolamento de fungos após a desinfecção (Figura 9). Para DC 50% (15/30) das amostras de superfície foram positivas para fungos após a desinfecção (Figura 10). E para o P (Figura 11), ocorreu isolamento de fungos em 46,7% (14/30) das amostras após sua utilização como desinfetante.

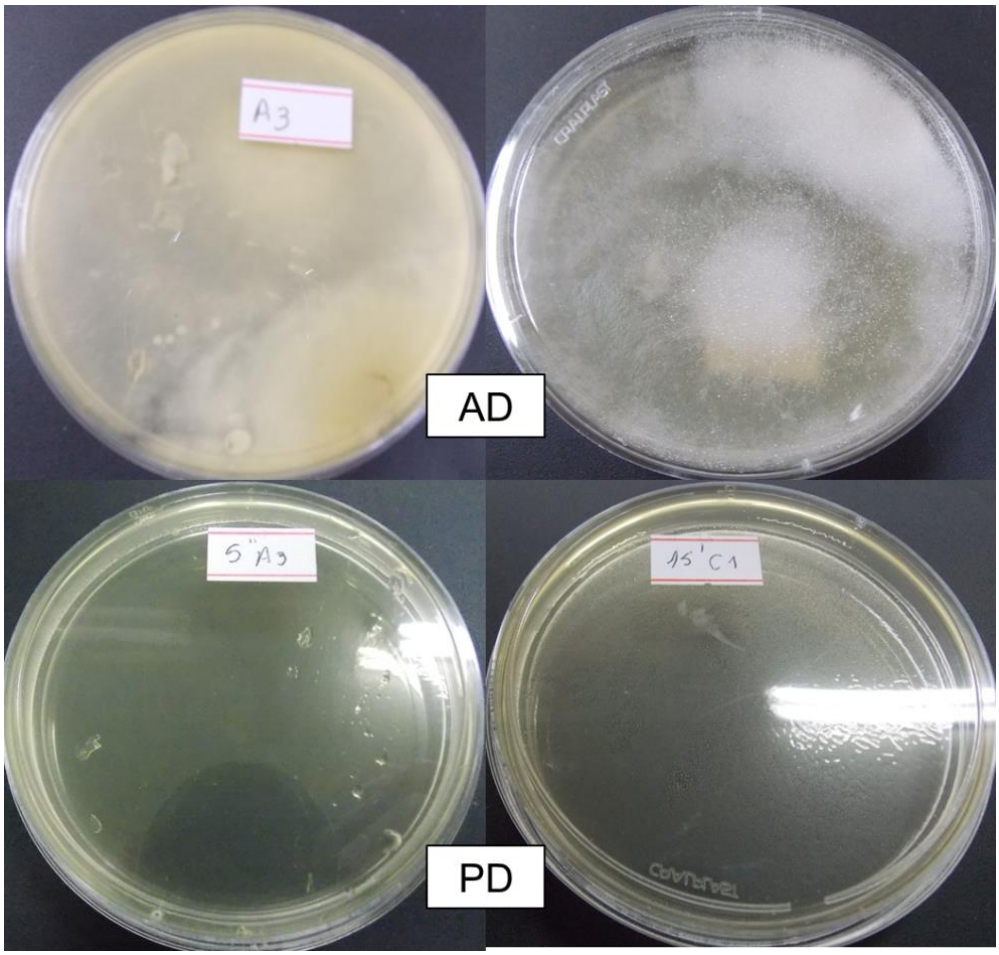

Figura 9: Resultados da contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFCs), antes (AD) e após (PD) desinfecção ambiental com Água Sanitária (AS) nos tempos de 5, 15 e 60 minutos na mesa de procedimentos do ambulatório do Núcleo de Reabilitação da Fauna Silvestre, IB/UFPel

Fonte: Arquivo pessoal

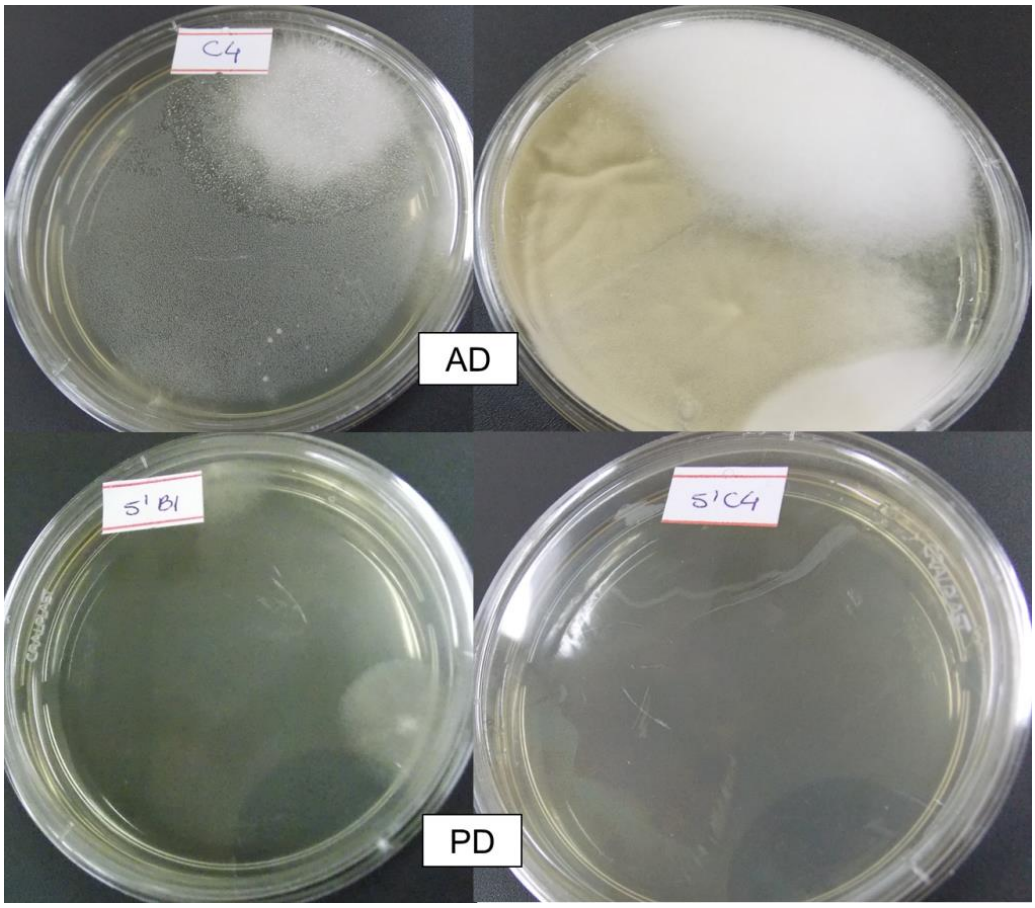

Figura 10: Resultados da contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFCs), antes (AD) e após (PD) desinfecção ambiental com Digluconato de Clorexidina (DC) coletado do armário de medicamentos do ambulatório do Núcleo de Reabilitação da Fauna Silvestre, IB/UFPel

Fonte: Arquivo pessoal

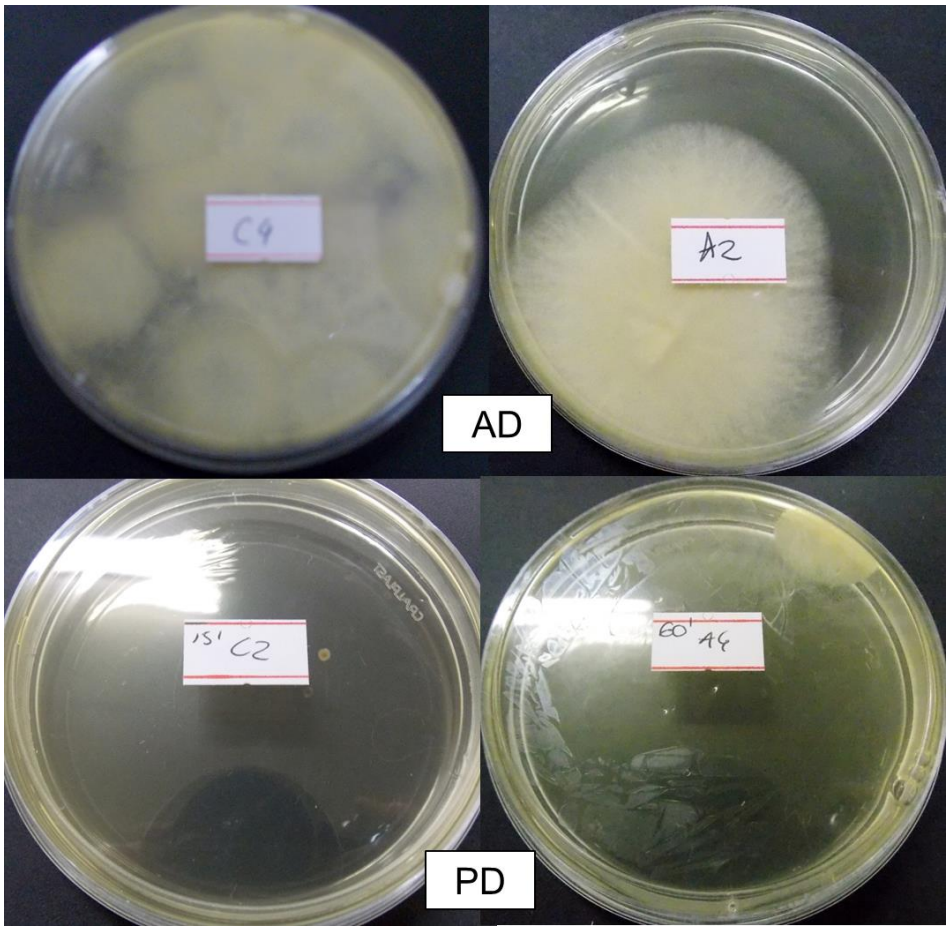

Figura 11: Resultados da contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFCs), antes (AD) e após (PD) desinfecção ambiental com Pinho (P) coletado da mesa de procedimentos do ambulatório do Núcleo de Reabilitação da Fauna Silvestre, IB/UFPel

Em relação aos tempos de exposição do produto, o crescimento fúngico após a desinfecção nos três intervalos testados ocorreu da seguinte forma: Após 5 minutos de desinfecção 40% (12/30) das amostras mostrou crescimento de UFCs. Depois de 15 minutos da desinfecção 30% (9/30) das amostras foram positivas para o isolamento de UFCs. E após 60 minutos ocorreram 43,3% das amostras positivas (Tabela 10).

Tabela 10: Isolamento de UFCs dos locais coletados em relação ao desinfetante estudado de acordo com o tempo de exposição

	Água sanitária				**Digluconato de clorexidina**				**Pinho**			
	AD	**5**	**15**	**60**	AD	5	15	60	**AD**	**5**	**15**	**60**
Local da coleta	**(Tempo em minutos)**											
	UFCs											
Mesa de procedimentos (placa aberta)	**4**	**1**	**0**	**1**	8	2	4	2	**3**	**0**	**1**	**2**
Mesa de procedimentos (*swab*)	**I**	**0**	**0**	**1**	19	4	5	1	**1**	**1**	**0**	**0**
Mesa de materiais (placa aberta)	**2**	**0**	**0**	**0**	5	2	0	0	**1**	**0**	**1**	**0**
Mesa de materiais (*swab*)	**4**	**0**	**0**	**0**	9	0	0	0	**1**	**0**	**0**	**0**
Armário (placa aberta)	**11**	**0**	**0**	**1**	60	2	2	2	**1**	**0**	**0**	**1**
Armário (*swab*)	**37**	**0**	**1**	**0**	28	0	3	4	**I**	**2**	**1**	**2**

AD = Antes da Desinfecção / I = UFCs incontáveis

6 DISCUSSÃO

Durante o período de estudo foi avaliada a atividade de diferentes desinfetantes frente a 12 espécies de leveduras provenientes de animais silvestres. A metodologia foi dividida em três testes: Microdiluição em Caldo, Teste de Eficácia de Desinfetante e Testes *in uso*.

O Extrato Hidroálcoolico de *Eucalipto* sp. (EE), Óleo de *Mentha piperita* (OM), e Cineol (C) demonstraram apenas ação fungistática, ao contrario dos desinfetantes químicos que demonstraram tanto ação fungistática quanto fungicida. O Óleo de Pinho (OP) e o Óleo de Castanha (OC) também apresentaram fungistática e fungicida.

Alguns desinfetantes químicos foram eficientes em concentrações bem menores que a recomendada pelo fabricante. Os compostos químicos são amplamente recomendados para uso na desinfecção de ambientes em locais de reabilitação de animais silvestres. Não foram encontrados na literatura consultada (PUBMED; PORTAL CAPES) artigos científicos com os desinfetantes utilizados neste estudo frente a microrganismos isolados de animais silvestres.

Nos testes de Microdiluição em caldo todos os desinfetantes obtiveram melhor ação contra os microrganismos estudados em concentrações menores que as recomendadas ao uso pelo fabricante. Quanto ao Hipoclorito de Sódio (HS) foi melhor na desinfecção confrontado com Água Sanitária (AS), uma vez que é mais concentrado. O HS teve melhores resultados obtendo CIM de 0,05451 mg/mL, já AS teve CIM de 0,4069 mg/mL. A concentração utilizada neste estudo foi menor do que a recomendada para uso e apresentou boa atuação. Cabe aqui ressaltar que de acordo com a recomendação dos fabricantes dos desinfetantes químicos comerciais utilizados neste estudo, para obter efeito desinfetante, devem ser utilizados puros. Já a recomendação para uso do fabricante para DC é 5% (500 mg/mL), HS 1% (10 mg/mL) e para QA <1% (0,6 mg/mL). Em relação aos fitoquímicos, não existe, um documento que estabeleça concentrações, para o uso dos mesmos como desinfetante. Uma vez, que foram estudados para saber se poderiam ser promissores no seu desenvolvimento como novos desinfetantes.

Foram observados estudos onde o HS foi testado na desinfecção de teteiras e dos tetos de vacas no processo de ordenha mecânica, no combate a mastite bovina (AMARAL, 2004) e também foi testado na desinfecção de moldes e modelos de gesso

em consultório dentário, obtendo resultados favoráveis de acordo com a recomendação de uso indicada pelo fabricante, concordando com o presente estudo (SANTOS, 2001).

Em relação ao DC, este também mostrou uma atividade melhor em relação a concentração do que a recomendada para uso pelo fabricante, sendo que a CIM do produto para inibir as leveduras foi de 0,0098 mg/mL. Um estudo realizado por Semprebom et al. (2007) avaliou a eficácia do DC na concentração de 0,0234 mg/mL frente a cepas de *C. albicans* coletadas da mucosa bucal e cultivadas em meios aeróbios e anaeróbios, onde foram determinadas as CIMs, que em aerobiose variou de 1,5 mg/mL a 12 mg/mL, já em anaerobiose variou de 0,0234 mg/mL a 0,375 mg/mL, o que demostra que os dois estudos obtiveram resultados satisfatórios em relação ao produto testado. Agentes químicos à base de DC são amplamente utilizados na prática odontológica (BAMBACE, 2003), porém sua aplicação como desinfetante ambiental é limitada.

O quaternário de amônia mostrou um resultado bastante satisfatório neste estudo obtendo CIM de 0,0244mg/mL frente as leveduras estudas. Para o Pinho a CIM média observada foi de 0,5317mg/mL, mostrando uma ação satisfatória assim como os demais desinfetantes testados. Estudos sobre a desinfecção de superfícies e avaliação da eficácia do hipoclorito de sódio 1%, Pinho e detergentes sobre o *Enterococcus faecalis* (ATCC 4083), foram realizados, demonstrando resultados efetivos na eliminação da contaminação experimental (SALIM, 2004), apesar de utilizar microrganismos diferentes, os estudos citados confirmam a eficácia dos desinfetantes, confirmando a boa ação do QA e P contra diferentes patógenos.

Na natureza encontram-se muitos compostos complexos orgânicos, de origem vegetal, com características bactericida e fungicida. Quintero (1994) aponta alguns fitofármacos recentemente estudados com características antimicrobianas, entre eles: Extrato aquoso de eucalipto (*Eucalyptus globulus*).

Óleos e extratos de plantas há muito tempo têm servido de base para diversas aplicações na medicina popular, entre elas, a produção de antissépticos tópicos. Tal realidade serviu de base para diversas investigações científicas, com vistas na confirmação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais (ALMEIDA et al.,2006; ARRUDA et al., 2006; NUNES et al 2006; BENKEBLIA, 2004; REHDER et al., 2004; CLAFFEY, 2003; SEYMOUR, 2003; ARWEILER et al., 2000; FINE et al., 2000; PAN et al., 2000).

Vários métodos vêm sendo realizados para avaliar a eficácia antimicrobiana de produtos naturais como óleos e extratos. Em um estudo foi avaliada a atividade antimicrobiana óleo essencial de *Eucalyptus cinerea* sobre bactérias e *C. albicans*, apresentando-se sensíveis, nas frações testadas. O controle de qualidade do método em detectar a inibição bacteriana e fúngica foi avaliado utilizando-se antibióticos com diâmetros de halo conhecidos. (FRANCO et al., 2005).

Outro estudo realizado avaliou a ação biocida de *Eucalyptus citriodora, Eucalyptus globulus* e *Eucalyptus staigeriana* no carrapato *Boophilus microplus*, buscando-se a produção de acaricidas menos agressivos ao meio ambiente. O óleo essencial de *E. citriodora* matou 100% dos carrapatos a uma concentração média de 17,5%, o de *E. globulus* a 15% e o de *E. staigeriana* a 12,5%. Os concentrados emulsionáveis de *E. globulus* mataram 100% dos carrapatos a uma concentração média de 9,9% e o de *E. staigeriana* a uma concentração de 3,9% (CHAGAS et al., 2002). No presente estudo o EE teve ação fungistática na concentração de 1,0147 mg/mL (Tabela 4).

A atividade antimicrobiana do óleo de *Mentha piperita* foi avaliada frente *C. albicans*, apresentando halos intermediários aos obtidos no controle positivo (GEROMINI et al., 2012). Segundo Işcan et al. (2002), o óleo de *M. piperita* inibiu *P. aeruginosa* e *S. aureus e* a bioatividade do mentol e do Óleo de *Mentha piperita* foi testada utilizando a combinação de técnicas *in vitro* tais como microdiluição em caldo de difusão em agar. Foi demonstrado que todos os óleos de hortelã-pimenta estudados inibiram fortemente microrganismos patogénicos para plantas, enquanto agentes patogénicos humanos eram apenas moderadamente inibidas. Contra as leveduras aqui estudadas o óleo de *Mentha piperita* apresentou CIM entre 62,5 à 250mg/mL, conforme observado na tabela 5, obtendo ação fungistática, concordando com o estudo acima, em relação à eficácia do óleo.

A caracterização físico-química de amostras de OP foi testada quanto sua atividade antimicrobiana, sendo que a composição do óleo de Pinho apresentou diversidade de componentes com atividade antimicrobiana inibitória. O óleo apresentou atividade bacteriostática sobre *Staphylococcus aureus* (OLIVEIRA, 2008). O OP obteve ação fungistática e fungicida na concentração de 100 mg/mL contra leveduras neste estudo, obtendo melhores resultados, que os encontrado, apesar de um estudo ter sido realizado com bactérias e o outro com leveduras a ação inibitória do OP contra microrganismos foi confirmada.

Trabalhos demostrando a ação antifúngica do OC são escassos. O OC no presente estudo apresentou CIM entre 0,98 a 125 mg/mL (Tabela 7), demonstrando ação fungicida. Outro estudo realizado por Pimentel et al. (2010), explana a ação fungitóxica do óleo essencial de *Tanaecium nocturnum* sobre o *Aspergillus flavus* isolado da castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*), o que evidencia que novos estudos devem ser realizados acerca da ação antifúngica do OC, para que se possa obter resultados mais concretos.

Nos testes de Eficácia dos desinfetantes, todos os testados se mostraram eficazes frente às leveduras estudadas. Variando o número de UFC de acordo com cada um e o tempo de exposição ao produto. Os desinfetantes demonstraram uma ação crescente, reduzindo à zero o número de colônias de acordo com o tempo de contato estabelecido no estudo. Todas as leveduras estudadas foram inativadas a partir de cinco minutos de exposição aos produtos, frente aos cinco desinfetantes, quando diluídos em água. Quando na presença de matéria orgânica (leite), essa inativação se mostrou reduzida, o tempo de exposição do desinfetante frente à matéria orgânica foi maior do que, quando diluído apenas em água, variando de acordo com cada levedura. O que mostra que para uma desinfecção adequada é necessário uma limpeza prévia do local, para remoção da matéria orgânica.

Antes de proceder à desinfecção é importante que se faça uma limpeza prévia do local ou material a ser desinfetado, pois além da maioria dos desinfetantes diminuírem a sua ação em presença de matéria orgânica, este procedimento elimina mecanicamente grande quantidade de microrganismos presentes no local. A limpeza permite uma ação direta e mais eficaz do desinfetante sobre os microrganismos presentes na superfície a ser desinfetada. A limpeza pode ser realizada por varredura, lavagem com água e sabão ou detergente, removendo-se fezes, restos de alimentos, gordura, entre outras sujidades. Os resíduos contaminados não devem ser deixados ao ar livre, pelo risco de contaminação imediata do local, ou pela dispersão dos contaminantes, pelo vento ou água pluvial (QUINTERO, 1994).

Schuch et al. (2008), buscou avaliar a cinética da atividade antimicrobiana de extratos de plantas medicinais frente a bactérias relacionadas com mastite bovina, onde foram produzida soluções desinfetantes a partir de folhas e talos de *Baccharis trimera* (Less) D.C., Compositae (Asteraceae), *Eucalyptus* ssp. Labill., Myrtaceae e *Tagetes minuta* (Linn.), Compositae (Asteraceae), através de extração hidroalcoólica (EHA) e

decocto. Concluindo que extratos de plantas medicinais apresentam potencial para serem utilizados em situações-problema em que as bactérias estejam envolvidas.

Outro estudo que testou a eficácia de desinfetantes ocorreu em um Hospital Veterinário da UPF, buscando avaliar produtos utilizados na sua rotina. Foram testados álcool 70% e 99%; clorexidina 2%, PVPI 1% aquoso, amônia quaternária 3,5%, sabão não degermante para mãos, álcool iodado, hipoclorito de sódio e um produto desodorizador com odor de pinho, frente a um *pool* de bactérias constituído por *Enterococcus* sp., *Enterobacter* sp.; *Salmonella enteritidis* e *Staphylococcus aureus*. Nos tempos de 5, 10, 15 e 20 minutos, todos os produtos foram eficazes, exceto o hipoclorito de sódio e o produto desodorizador a base de pinho, acrescentados de forma empírica na água usada para limpeza do piso (SANTOS, et al. 2007). Neste estudo, o DC e QA, também obtiveram resultados satisfatórios. Em contrapartida, o HS não obteve resultados satisfatórios, ao contrario deste estudo onde o HS reduziu 100% das leveduras estudadas durante o tempo de exposição de 5 minutos, quando diluído em água.

Com a finalidade de controlar a transmissão de patógenos entre tratadores e animais, um estudo foi realizado no Hospital Veterinário da UFRGS. Para isso, foi realizado teste de eficácia de desinfetantes, onde se utilizou: hipoclorito de sódio, quaternário de amônia, fenol sintético e clorexidina frente às bactérias *Streptococcus* sp. e *Pseudomonas* sp. e frente a levedura *C. guilliermondii*. O hipoclorito de sódio na concentração de 250 mg/L precisou de dez minutos para inativar *C. guilliermondii*. Os demais desinfetantes, na concentração de 25mg/L, precisaram de um minuto para inativar os microrganismos (GONZÁLES, 2011). Concordando com este estudo que também obteve resultados positivos na inativação dos microrganismos, contudo o HS foi testado na concentração de 0,22mg/mL, e inativou *C. guilliermodii* em cinco minutos quando diluído em água e 15 minutos na presença de matéria orgânica.

Para avaliar a ação antifúngica do hipoclorito de sódio 4% e do digluconato de clorexidina 6,6%, este estudo testou fungos isolados do ambiente como *Aspergillus* spp., *Candida* spp., *Microsporum* spp., *Malassezia pachydermatis, Cryptococcus neoformans* e *Sporothrix schenckii*. Para o hipoclorito de sódio, 58,3% dos isolados foram resistentes à concentração recomendada pelo fabricante (4%) apresentando CIM e CFM entre 2 e >8%. O digluconato de clorexidina demonstrou ação fungicida em baixas concentrações sendo eficaz na eliminação de fungos filamentosos e leveduriformes de importância médica e veterinária, enquanto o hipoclorito de sódio

somente obteve esta ação em altas concentrações (MADRID et al.,2013). No presente estudo, tanto o HS, como o DC também necessitaram de diluições menores que a recomendada pelo fabricante (DC= 8 mg/mL e HS= 0,22 mg/mL), para que fosse possível determinar a porcentagem de redução das leveduras estudas, demonstrando então, uma boa ação dos dois desinfetantes mencionados.

Coutinho et al., (2012), avaliou eficácia *in vitro* de desinfetantes utilizado na antissepsia dos tetos frente a leveduras isoladas do leite de vaca com mastite. As leveduras estudadas foram do gênero *Candida* spp. e do Gênero *Trichosporon* spp. Observou-se que 100% dos isolados mostraram-se sensíveis ao DC, em todos os tempos de exposição. Na Análise dos resultados para quaternário de amônio, observou-se que 66,67% foram sensíveis nos tempos 0,25’ e 0,5’, e 91,67% em 1’, 5’ e 10’. Em relação ao princípio ativo cloro apenas 16,67% foram sensíveis no tempo de 0,25’ e 0,5’, e 25% em 1’, 5’ e 10'. Os testes de eficácia para DC e QA, demonstraram excelentes resultados no presente estudo, sendo que o DC reduziu 100% das UFCs de *T. assahii* em 15 minutos, já *C. albicans* foi inativada a partir de 5 minutos de acordo com a figura 15. No QA foram feitas sucessivas diluições até chegar em 9,8 mg/mL, mas o composto inativou 100% das UFCs a partir de meio minuto de exposição a partir de meio minuto de exposição.

A Eficácia do iodo (0,57%), clorexidine (2,0%), cloro (2,5%) e composto de amônio quaternário (4,0%), foram avaliados no pré e pós-dipping, frente à *Staphylococcus* spp. Em propriedades leiteiras no norte país. Observou-se que foram sensíveis ao cloro, 87,5% à clorexidine e 37,5% ao composto de amônia no tempo de 60”. Quanto aos *Staphylococcus* coagulase positiva, 100% dos isolados foram resistentes ao clorexidine, 85,7% ao composto de amônio, 57,1% ao cloro. Em relação aos *Staphylococcus* coagulase negativa foi observado 91,9% de sensibilidade ao clorexidine, 70,3% sensíveis ao cloro, 66,2% ao iodo e 24,3% sensíveis ao composto de amônio no tempo de 60”, demostrando a eficácia dos desinfetantes utilizados em diferentes áreas e com diferentes microrganismos (RAMALHO, et al., 2012).

Outro estudo que confirma a eficácia dos desinfetantes foi realizado por Colla et al. (2011), teve por objetivo a avaliação *in vitro* de clorexidina 0,5%, amônia quaternária 0,5%, frente a amostras de *Salmonella heidelberg* isoladas de abatedouro avícola, nos tempos de contato de 5, 10, 15 e 20 minutos. Em relação à amônia quaternária, 33% dos isolados apresentaram resistência com 5 minutos de contato e 16,6% com 10 minutos de contato. Com relação à clorexidina, 25% dos isolados mostraram-se resistentes após 5

minutos de contato enquanto que 17% no tempo de 10 minutos de contato, demostrando a ação dos desinfetantes sobre diferentes microrganismos.

Resultados observados aqui concordaram com Santos et al. (2007) que avaliou a atividade fungicida de quatro desinfetantes comerciais, dentre eles Pinho (clorofenol) e amônia quaternária 3,5%, frente a *Candida albicans* e observou inibição total (>99%) do inóculo a partir das diluições 0,5%.

O objetivo de um programa de limpeza e desinfecção é manter uma concentração baixa de agentes patogênicos, diminuindo, consequentemente, a probabilidade de infecções. Resultando nos seguintes benefícios: o aumento da produtividade; a diminuição na incidência de doenças infecciosas e parasitárias; diminuição do número de animais refugos (debilitados); diminuição de gastos com medicamentos, por animal/ano; bem como a diminuição de gastos com mão-de-obra (HOFFMANN, 1995).

Para os testes *in uso*, foram eleitos cinco desinfetantes que obtiveram os melhores resultados: HS, AS, DC QA e P. Porém, optou-se por utilizar apenas três dos desinfetantes estudados, DC, AS e P, os dois últimos foram escolhidos, pois além de conter os mesmos princípios ativos de HS e QA respectivamente, são mais diluídos. Os resultados obtidos mostraram uma redução na porcentagem fúngica do local de estudo antes e após a desinfecção.

Uma pesquisa realizada sobre a desinfecção de leitos de um hospital, utilizando a mesma técnica de placas de contato empregada aqui, constatou a presença de fungos em 219 amostras antes e 180 amostras após a desinfecção destes (ANDRADE, ANGERAMI E PADOVANI, 2000). Números muito semelhantes foram obtidos no presente estudo, com redução de 62,2% da contaminação fúngica após a desinfecção.

Estudos anteriores têm avaliado a ação de desinfetantes e antissépticos, como clorexidina, álcool 70º, hipoclorito de sódio, peróxido de hidrogênio, radiação ultravioleta entre outros, frente a isolados clínicos e de ambiente de espécies fúngicas pertencentes aos gêneros *Candida*, *Cryptococcus* e *Rhodotorula*. Apenas a clorexidina numa concentração de 0,5% obteve resultado satisfatório frente a esses isolados (THÉRAUD et al., 2004). Enquanto que, neste trabalho o DC inibiu 50% dos fungos após da desinfecção.

Santos; Borsatto e Delgobo (2007) demonstraram atividade fungicida de derivado de cloro-fenol, amônia quaternária, hipoclorito de sódio e formaldeído frente a isolados de *C. albicans* nas concentrações de 0,1% a 10%. Embora, no presente estudo não tenha sido confirmado nenhum isolado de *C. albicans* antes de ocorrer à desinfecção, podemos constatar que o AS tanto nos isolados filamentosos quanto nos leveduriformes teve o

melhor desempenho entre os três desinfetantes estudados, sendo que este é o mais utilizado em limpezas em geral, além do baixo custo. O P e o DC também foram eficazes tanto frente aos isolados leveduriformes quanto aos filamentosos, mas com resultados menos satisfatórios que o AS.

Xavier et al. (2008), avaliou a ação *in uso* da clorexidina-cetrimida no controle de *Aspergillus* spp. em um centro de recuperação de animais marinhos, mostrando resultados positivos para ação do produto, concordando com o presente estudo também realizado em um CETAS, obtendo resultados positivos frente ao DC, diminuindo em 50% a contagem das UFCs, conforme comentado anteriormente.

Com relação à higiene e saúde os animais em cativeiro é imprescindível a remoção das fezes e urina diariamente, evitando a proliferação de bactérias e fungos no ambiente. Poleiros e ninhos devem estar livres de excrementos, deve se evitar que os bebedouros e comedouros fiquem embaixo dos poleiros, para que as aves não defequem sobre eles. Devem ser lavados e escovados todos os dias e desinfetados frequentemente (CUBAS et al., 2007). Neste sentido, pode-se constatar que a limpeza, higienização e a desinfecção são fundamentais na manutenção de qualquer cativeiro. No local de estudo, as gaiolas, bebedouros, comedouros, vasilhas, poleiros, os ninhos e até mesmo os utensílios e equipamentos são limpos diariamente, entretanto ainda assim se observou uma porcentagem alta (>99%) de isolamento de fungos potencialmente patogênicos ao homem e aos animais.

Não existe o desinfetante ideal, assim a escolha deverá recair sobre aquele que cumprir com maior número de requisitos à finalidade desejada, lembrando-se, entretanto que um bom desinfetante é aquele que na mesma concentração e no mesmo espaço de tempo elimina bactérias, vírus, fungos, protozoários e parasitos (QUINTERO,1994).

Em um programa de desinfecção devem ser ainda considerados alguns aspectos para se garantir o êxito da mesma. Não se deve misturar, ou combinar desinfetantes, pois este procedimento pode causar efeitos negativos, como a neutralização do poder desinfetante, reação química produzindo subprodutos tóxicos; e ainda por poder incrementar a resistência de determinados microrganismos. Deve-se ainda evitar o uso de desinfetantes tóxicos, irritantes e/ou com odores penetrantes, na presença de animais, reduzir o uso de desinfetantes corrosivos, e empregar os produtos desinfetantes com amplo espectro germicida, garantindo-se assim êxito no processo de desinfecção (HOFFMANN, 1995).

Manter a higiene nas instalações, usar luvas de borracha para que não haja contato direto com as excretas, lavar e higienizar bem as mãos após contato e manejo

dos animais é fundamental para se evitar possíveis transmissões de zoonoses (CUBAS, 2009).

7 CONCLUSÕES

Frente às condições deste estudo e suas respostas:

As concentrações dos desinfetantes (Hipoclorito de Sódio, Água Sanitária, Pinho, Digluconato de Clorexidina e Quaternário de Amônio) utilizados para verificar a atividade biocida estão abaixo das recomendadas pelos fabricantes, demonstrando a eficácia dos mesmos frente às leveduras isoladas de animais silvestres;

Todos os isolados fúngicos apresentam sensibilidade frente aos desinfetantes testados. Mas alguns produtos têm uma ação mais eficaz que os demais, como o Quaternário de Amônio e o Diguclonato de Clorexidina, que obtiveram bons resultados em todos os testes realizados. Para os testes *in uso* os três desinfetantes utilizados são recomendados para uso (Pinho, Digluconato de Clorexidina e Água Sanitária);

Os desinfetantes químicos estudados foram fungicidas e os fitoquímicos em sua maioria fungistáticos. Apresentaram ação fungicida apenas os fitoquímicos, Óleo de Castanha- do-Brasil e óleo de Pinho;

Os testes de eficácia dos desinfetantes demostrou que cada levedura atua de uma forma diferente frente ao desinfetante usado, demonstrando que deve haver cautela na hora da desinfecção para que todos os microrganismos presentes no ambiente sejam eliminados;

Todos os isolados fúngicos foram inativados em até cinco minutos nas diluições com água e em até 15 minutos na presença de matéria orgânica (leite);

Os desinfetantes químicos estudados mostraram ação satisfatória, sendo recomendados para o uso em ambientes de reabilitação de animais silvestres, obtendo melhores resultados, que os fitoquímicos. Sendo o quaternário de amônio o mais eficaz frente aos microrganismos estudados;

Os compostos fitoquímicos tiveram ação frente às leveduras analisadas, porém, nem todos alcançaram as expectativas, não sendo recomendada a sua substituição por

um composto químico na desinfecção. Apenas o óleo de Castanha-do-Brasil e o óleo de Pinho tiveram ação fungicida frente às leveduras pesquisadas. São necessários maiores estudos acerca do assunto;

Os três desinfetantes utilizados nos testes *in uso*, alcançaram a atuação esperada, eliminando a maioria dos microrganismos presentes no ambiente após o uso no NURFS;

O Pinho e o DC apresentaram melhores resultados nos testes *in vitro* do que a água sanitária, entretanto o contrario ocorreu na desinfecção de ambiente (testes *in uso*), realizada no NUFS.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo reforça a importância de manter a higiene das instalações dos CETAS, uma vez que todos os microrganismos estudados são provenientes da microbiota fúngica de animais silvestres. Sendo os cuidados com a limpeza, higienização e a desinfecção são fundamentais na manutenção de qualquer cativeiro.

A limpeza e desinfecção de ambientes têm como meta reduzir a quantidade de microrganismos patogênicos no ambiente de criação. Através dos testes de eficácia realizados na presença de matéria orgânica, pode-se observar que a mesma interfere em uma desinfecção. Considera-se então que nenhum desinfetante poderá exercer sua ação com eficiência se não houver uma limpeza prévia do local.

Considerando-se que estes fungos possuem caráter oportunista, ressalta-se a importância da limpeza, higienização e desinfecção das gaiolas. É imprescindível a remoção das fezes e urina diariamente, evitando a proliferação de bactérias e fungos no ambiente. Poleiros e ninhos devem estar livres de excrementos, deve se evitar que os bebedouros e comedouros fiquem embaixo dos poleiros, para que as aves não defequem sobre eles. Devem ser lavados e escovados todos os dias.

Apesar do resultado positivo obtido, este estudo foi somente uma forma de iniciar novas pesquisas no que diz relação aos programas de higiene e desinfecção de CETAS, pois ainda é um estudo muito pequeno, sugerimos portanto o seguimento da pesquisa a partir deste trabalho.

9 REFERÊNCIAS

ACHA, P.N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermidades transmisibles comunes al hombre y a los animales.** 3. ed. Washington: Publicación Científica OPS/OMS, 2003. p. 580.

ALBANO, A. P. N.; MENDES, J. F., COIMBRA, M. A. A.;LEITE, A. M. T.; SOARES, M. P.; MINELLO, L. F. et al. Ocorrência de *Malasseziapachydermatis*em gambá-de--orelha-branca (*Didelphisalbiventris*) – relato de caso. **Clínica Veterinária**, Ano XVI, n. 91, março/abril, 2011.

ALBANO, A. P., MENDES, J. F., FELICIO, A. P., COIMBRA, M. A. A., LEITE, A. T., MINELL, L. F., MEIRELES, M. C., NASCENTE, P. S. Microbiota Fungica de Felideos Higidos Encaminhados a Centros de Triagem no Rio Grande do Sul e Mato Grosso do Sul. **Revista Cientifica de Medicina Veterinária - Pequenos Animais e Animais de Estimação**. 9(31); 634-658; 2011 a.

ALBANO A. P. A. **Fungos e micoses em animais silvestres recebidos por Centros de Triagem** Pelotas, UFPel,2009. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2009.

ALBUQUERQUE. J.M. **Plantas medicinais de uso popular**. ABEAS/MEC, Brasília. 1989. 96 p.

ALMEIDA, J. R. G. A. et al. Antimicrobial Activity of the Essential Oil of Bowdichia virgilioides Kunt. **Revista Brasileira Farmacognosia,** v. 16, p. 638-641, 2006.

AMARAL, L. A.; ISA, H.; DIAS, L. T.; ROSSI, T. R.; FILHO, A. N. Avaliação da Eficacia da Desinfecção de Teteiras e dos Tetos no Processo da Ordenha mecânica de vacas. Pesquisa Veterinária Brasileira, Rio de Janeiro, v. 24, n. 4, p. 173-177, 2004.

ANDRADE, D.; ANGERAMI, E.; PADOVANI, C. Condição microbiológica dos leitos hospitalares antes e depois de sua limpeza. **Revista de Saúde Pública**. v.34, n. 2, p. 163-9, 2000.

ANDRADE, N. J.; MACÊDO, J. A. B.; **Higienização na Indústria de alimentos.** São Paulo: Varela, 1996. 192 p.

ANDRADE, N.J. O uso de compostos clorados na indústria de laticínios. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.13, n.155, p.48-52, 1988.

ANTUNES, A.G.V.; PASQUALOTTO, A.C.; DIAZ, M.C.; D'AZEVEDO, P.A.; SEVERO, L.C. Candidemia in a Brazilian tertiary care hospital: species distribution and antifungal susceptibility patterns. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo,** v. 46, p. 239-241, 2004.

APRILE, G. E BERTONATT C. 1996. Manual sobre rehabilitación de fauna. **Bolotim Técico FVSA**, Buenos Aires.

ARALDI D.B et.al., Estima da area foliar da producao de madeira para um povoamento de *Pinus elliotii* engelm., Santa Maria – RS, **Anais do Simpósio Latino-americano sobre Manejo Florestal:Produção de Bens Materiais e Imateriais**, 4.:2008, UFSM/CCR/PPGEF, Santa Maria –RS, 2008, pg 75-80.

ARAÚJO, A. J. G.; BASTOS, O. M. P.; SOUZA, M. A. J.; OLIVEIRA, J. C. Ocorrência de onicomicoses em pacientes atendidos em consultórios dermatológicos na cidade do Rio de Janeiro, Brasil. **National Brásiliam Dermtology**, v. 78, p. 445 - 455, 2003.

ARRUDA TA, ANTUNES RMP, CATÃO RMR, LIMA EO, SOUSA DP, NUNES XP, PEREIRA MSV, BARBOSA-FILHO JM, CUNHA EVL 2006. Preliminary study of the antimicrobial activity of *Mentha x villosa* Hudson essential oil, rotundifolone and its analogues. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 16: 307-311.

ARWEILER NB, DONOS N, NETUSCHIL L, REICH E, SCULEAN A 2000. Clinical and antibacterial effect of *tea tree* oil - a pilot study. **Clinical Oral Investigation** 4: 70-73.

AVILA, M. O.; BOUER, A.; SILVA, J.A. Estudo da microbiota fúngica da pele, pêlos e conduto auditivo de ouriço-cacheiro (*Coendou prehensilis*), clinicamente saudáveis. In: **XXXV CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA**, 2008, GRAMADO. 35 CONBRAVET, 2008. v. 1. p. 89-89.

BALBACHAS, A. **As plantas curam**. Ed. Missionária “A verdade presente”, São Paulo. 1963. 438 p.

BAKER LR, SOORAE PS. 2002. **Re-introduction NEWS: Special Primate Issue**, Newsletter of the IUCN/SSC Re-introduction Specialist Group, Abu Dhabi, UAE. No. 21:60 p. (ISSN: 1560-3709).

BAMBACE, A.M.J.; BARROS, E. J.A.; SANTOS, S.S.F.; JORGE; A.O.C. Eficácia de soluções aquosas de clorexidina para desinfetantes de superfícies. **Revista Biociênciencia Taubaté**, v. 9, n. 2, p. 73-81, 2003.

BENKEBLIA N 2004. Antimicrobial activity of essential oil extract of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). **Lebensm-Wiss Technol** *37*: 263-268.

BENTUBO H.D.L., FEDULLO J.D.L., CORRÊA S.H.R., TEIXEIRA, R.H.F.; COUTINHO S.D. Isolation of *Microsporum gypseum* from the haircoat of health wild felids kept in captivity in Brazil. **Braziliam Journal Microbiology**, v. 37, p.148-152, 2006.

BISWAS, A. K.; ENDO, M.; TAKEUCHI, T. Effet of different photoperiod cycles on metabolic rate and energy loss of both fed and unfed young tilapia *Oreochromis niloticus*: Part I **Fisheries Science**, v. 68, p. 543-553, 2001.

BLOCK, S. S**. Desinfection, sterelizations and preservation** 4 ed.Philadelphia: Lea & Febiguer; 1991, 1162.

BONALDO, S. M. et al . Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e protecao de pepino contra Colletotrichum lagenarium, pelo extrato aquoso de Eucalyptus citriodora. **Fitopatol. bras**., Brasilia, v. 29, n. 2, Apr. 2004 . Disponivel em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100 1582004000200002& lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 16 set 2013.

BORAL, D.; CHATTERJEE, S.; BHATTACHARYA, K. The occurrence and allergising potential of airborne pollen in west bengal, india. **Annal Agricol Environmental Medicine**, Lublin, v. 11, p. 45–52. 2004.

BRASIL- **IBAMA: Tráfico de animais silvestres**. Disponível em: http://www.ibama.gov.br/duvidas/animais.htm Acesso em: 13 out. 2013.

BRASIL - **Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis** – IBAMA. (disponível em: http://ibama.gov.br/patrimonio/. Acesso em : 25 de agosto de 2011).

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes.** Brasília, DF, 2002. 365p.

BRASIL. Ministério da Saúde, Coordenação de Controle de Infecção Hospitalar. **Processamento de Artigos e Superfícies em Estabelecimentos de Saúde.** 2.ed, Brasília, 1994, 50p.

BRASIL 2003. **Instrução Normativa nº 62 de 26 de agosto de 2003. Oficializar os métodos analíticos oficiais para analises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e aguas. Secretaria de Defesa Agropecuária, MAPA.** Diário Oficial da Republica Federativa do Brasil, Brasília, Seção 1, p.14, 18 de setembro de 2003.

BRILHO, R. C. **Hortelã pimenta.** Instituto Agronômico de Campinas, Campinas, SP, 1963c, 6p.

BROTTO, T. L.;ANDRADE, M.C.R; GONÇALVES, M.A.B.; GIMENIS, F.; PINA, A. Identification of fungi microflora in the ear conducts of rhesus macaques (Macaca mulatta) kept in captivity. **Braziliam Journal veterinary Research animal Sciece**, São Paulo, v. 42, n. 6, p. 459-464, 2005.

CATÃO-DIAS J.L. 2003. Doenças e seus impactos sobre a biodiversidade. **Ciência e Cultura** 55:32-34.

CARABALLO, A.; CARABALLO, B.; RODRÍGUEZ-ACOSTA, A. Preliminar assessment of medicinal plants used as antimalarials in the southeastern Venezuelan Amazon. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v.37, p. 186-188. 2004.

CAFARCHIA, C.; ROMITO, D.; COCCIOLI, C.; CAMARDA, A.; OTRANTO, D. Phospholipase activity of yeasts from wild birds and possible implications for human disease. **Medical Mycology**, v. 46, p. 1-6, 2008.

CAFARCHIA, C.; ROMITO, D.; IATTA, R.; CAMARDA, A.; MONTAGNA, M. T.; OTRANTO, D. Role of birds of prey as carriers and spreaders of *Cryptococcus neoformans* and other zoonotic yeasts. **Medical Mycology**, v. 44, p. 485-492, 2006.

CARVALHO M.S**, Ácido abiético e (+)-esclareolídeo como matérias-prima na preparação de um intermediário-chave e síntese de diterpenos labdânico com atividade biológica**, Tese (Doutorado - Universidade Estadual de Campinas),Instituto de Quimica, Campinas-SP, 2007, disponivel em: <http://biq.iqm.unicamp.br/arquivos/teses/vtls000418444.pdf>, acesso em: 25 Jun 2012.

CARVALHO, A.F.; COSTA, C.; NOVAES, D.M.; PINTO, M.P.A.;AROUCA, N.E. **Agricultura urbana: alternativa de segurança alimentar e geração de renda, Viçosa, MG.** Anais do 2º Congresso Brasileiro de Extensão Rural, Belo Horizonte. 2004.

CHAGAS, A. C. S. et al. Efeito acaricida de óleos essenciais e concentrados emulsionáveis de *Eucalyptus* spp em *Boophilus microplus***. Brazilam Journal Veterinary Research Animal Science** vol.39, n.5, pp. 247-253. ISSN 1413-9596, 2002.

CHAO, S. C.; YOUNG, D. G. Screening for inhibitory activity of essential oils ou selected bacteria, fungi and viruses. **Journal Essentials Oil Research**, [S.l.], v. 12, p. 630–649, 2000.

CLAFFEY N. Essential oil mouthwashes: a key component in oral health management. **Journal Clinical Periodontology** 30:22-24. 2003.

CLEFF, M. B. **Avaliação da Atividade Antifúngica do Óleo Essencial de *Origanum vulgare* L. Frente a Fungos de Importância em Veterinária com Ênfase em *Candida* spp.** UFRGS, 103 p. 2008.

CLEFF, M. B.; LIMA, A. P.; FARIA, R. O.; MEINERZ, A. R. M.; ANTUNES, T. A.; ARAUJO, F. B.; NASCENTE, P. S.; NOBRE, M. O.; MEIRELES, M. C. A. Isolation of *Candida* spp. from vaginal microbiota of healthy canine females during estrous cycle. **Brazilian Journal of Microbiology,** v. 36, p. 201-204, 2005.

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

COLLA F.L., RODRIGUES L.B., DICKEL E.L., NASCIMENTO V.P.; SANTOS L.R. 2012. [***In vitro* evaluation of chlorhexidine, quaternary ammonium and peracetic acid against *Salmonella* Heidelberg isolated from poultry slaughterhouse in 2005 and 2009.**] Avaliação *in vitro* de clorexidina, amônia quaternária e ácido peracético frente a amostras de *Salmonella* Heidelberg isoladas de abatedouro avícola em 2005 e 2009. *Pesquisa Veterinária Brasileira 32(4):289-292.*

COSTA, S. G. V. A. O. et al. Production of *Pseudomonas aeruginosa* LBI rhamnolipids following growth on Brazilian native oils. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 41, n. 2, p. 483-488, 2006.

COUTINHO, S. D., FEDULLO, J. D.; CORRÊA, S. H. Isolation of *Malassezia* spp. from cerumen of wild felids. **Medical Mycology** v. 44 , p. 383–387, 2006.

COTTONE JA, MOLINARI JA. Selection for dental practice of chemical disinfectants and sterilants for hepatitis and AIDS. **Australian Dental Journal** 1987; 32(5):368-74.

CUBAS Z. S.; SILVA J. C. R.; CATÃO-DIAS J. L. **Tratado de animais selvagens – medicina veterinária**. São Paulo: Editora Roca, 2007, p. 1354.

CUBAS Z. S. **Papagaio – saiba mais sobre eles**. Foz do Iguaçu; 2009 [cited 2013 nov 09]. Available from: < http://www.saudeanimal.com.br>.

CYRILO, M; A. **Manual sobre antissépticos**<http://www.prefeitura.sp.gov.br/cidade/secretarias/upload/saude/arquivos/assistenciafarmaceutica/anti_septicos.pdf> Acesso em julho de 2012.

DASCHNER, F. The hospital and pollution role of the hospital epidemiologisty in protecting the environment. In: WENZEL, R. **Prevention and control of nosocomial infections.** 3 ed. Baltimore: Williams e Wilkins, 1997, 27 p.

DASZAK P, CUNNINGHAM AA, HYATT AD. Emerging infectious disease of wildlife. Threats to biodiversity and human health. **Science**, 287;2002:443 – 9.

De HOOG, G.S. Risk assessment of fungi reported from humans and animals

Mycoses, v. 39, p. 407 – 417, 1996.

DEL VITTO, L.A.; PETENATTI, E.M.; PETENATTI, M.E. Recursos herbolários de San Luis (Argentina). Segunda parte: Plantas exóticas cultivadas, adventicias y/o naturalizadas. **Multequina**, Mendoza, v. 7, p. 29-48. 1998.

DIXON, R.A. Natural aspects and plants disease resistance. **Nature**, London, v. 411, p. 843-847. 2001.

DOMINGO, D & LÓPEZ-BREA, M.L. Plantas con acción antimicrobiana. **Revista Espanhola de Quimioterapia**, Barcelona, v. 16, p. 385-393. 2003.

FARIA, R. O.; NASCENTE, P. S.; MEINERZ, A. R. M.; CLEFF, M. B. et al. Ocorrência de *Cryptococcus neoformans* em excretas de pombos na cidade de Pelotas, Estado do Rio Grande do Sul. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Troical.* vol.43 no.2 Uberaba Mar./Apr. 2010.

FALVEY, D.; STREIFEL, A. Ten-year air sample analysis of *Aspergillus* prevalence in a university hospital. **Journal of Hospital Infection**. v. 67, p. 35-41, 2007.

FERNANDES, A. C. S.; SOUSA JUNIOR, F. C.; OLIVEIRA, S. M.; CALICH, L.; MILAN, E. P. Prevalence of *Candida* species in umbilical catheters implanted in newborns in Natal, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, p.104-107, 2007.

FINE DH, FURGANG D, BARNETT ML, DREW C, STEINBERG L, CHARLES CH, VINCENT JW. Effect of an essential oil-containing antiseptic mouthrinse on plaque and salivary *Streptococcus mutans* levels. **Journal Clinical Periodontology** 27: 157 161, 2000.

FIOCRUZ - PONZ, A. H. PINTO, L. M. O. **Citotoxicidade na Doença de Chagas**. Disponivel em<http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=166> Acesso em: nov, 2013.

FRANCO J, NAKASHIMA T, FRANCO L, BOLLER C. Composição química e atividade antimicrobiana in vitro do óleo. **Revista Brasileira Farmacognosia.** 17(1): Jan./Mar. 2005.

FRANCO, I.J. & FONTANA, V.L. **Ervas & plantas: a medicina dos simples**. 90 Ed., Livraria Vida LTDA, Erexim, RS. 2004. 208 pp.

FRIEND, M.; FRANSON, J. C.; CIGANOVICH, E. A. **Field manual of wildlife diseases: general field procedures and diseases of birds / Biological Resources**, Division (Information and technology report ; 1999–001). Washington, D.C, 1999. 438p.

FULLERINGER, S. L.; SEGUIN, D. ; WARIN, S. ; BEZILLE, A. ; DESTERQUE, C.; ARNE, P. ; CHERMETTE, R. ; BRETAGNE, S. ; GUILLOT, J. Evolution of the environmental contamination by thermophilic fungi in a turkey confinement house in France. **Poultry Science**, v. 85, p. 1875–1880, 2006.

GAJADHAR, T.; LARA, A; SEALY, P.; ADESIYUN, A.A. Microbial contamination of desinfectants and antiseptics in tour major hospitals in Trinidad. **Revista Panamenha Salud Publica**, v.14, n.3, p. 193-200, 2003.

GALINDO, M. K. F. **Microbiota Fúngica e Parasitas presentes em *Tropidurus hispidus* (Spix 1825), Pernambuco, Brasil.** Fungal microbiota and parasites found in *Tropidurus hispidus* (Spix 1825), Pernambuco, Brazil. 2012. 99f. Dissertação (Mestranda em Ecologia) - Universidade do Minho, Campus Gualtar, Braga – Portugal, 2012.

GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. São Paulo: Varela, 2001. 629 p.

GEROMINI, K. V. N.; RORATTO, F. B.; FERREIRA, F. G.; POLIDO, P. P.; SOUZA, S. G. H.; VALLE, J. S.; COLAUTO, N. B.; LINDE, G. A. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas medicinais. **Arquivo Ciência Veterinária e Zoologia.** UNIPAR, Umuarama, v. 15, n. 2, p. 127-131, jul./dez. 2012.

GOULART, Carlos E.S. **Herpetologia, Herpetocultura e Medicina de Répteis**. Rio de Janeiro: L.F. Livros de Veterinária, 2004. 330p.

GREENE, C. E.; CHANDLER, F. W. Candidiasis and Rhodotorulosis. In: GREENE, C. E. **Infectious Diseases of the dogs and cats**. 3.ed. St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier, 2006, cap.65, p.627-633.

GREZZI G.G. **Limpeza e desinfecção na avicultura**. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA, 2007, Campinas, SP. Anais. Campinas, SP, 2007. p.161-182.

GONZÁLEZ, N. H. **Capacidade de inativação de desinfetantes sobre microrganismos isolados de superfícies fixas em áreas críticas de um hospital veterinário de ensino**. [Dissertação de Mestrado – Faculdade de Veterinária da UFRGS]. UFRGS, 2011.

GUILLOT, J.; CHERMETTE, R.; MAILLARD, R. Les candidoses des carnivores domestiques actualisation à propos de 10 cas. **Point Vetérinaire**, v.28, n.175, p.51- 61, 1996.

HOFFMANN, F.L., GARCIA-CRUZ, C.H., VINTURIM, T.M. Determinação da atividade antibacteriana de desinfetantes. **Higiene Alimentar**, v.9, n.39, p.29-34, 1995.

IUCN/SSC **RE-INTRODUCTION SPECIALIST GROUP**. Guidelines for the Placement of Confiscated Animals. Gland, Suíça e ERWDA Abu Dhabi. 2002. 27p. Disponível em: http://wildlife1.wildlifeinformation.org/000ADOBES/B449IUCNGuidelinesConfiscAnimals.pdf. Acesso em 21 oct 2013.

İŞCAN, G. Antimicrobial screening of *Mentha piperita* essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** Washington, v. 50, n. 14, p. 3943-3946, 2002.

KEARNS, K. S.; LOUDIS B. Aspergillosis aviar, in Recent Advances in Avian Infectious Diseases, **International Veterinary Information Service**, Ithaca NY, 2003.

KUMAR, A.; SHARMA, V.D.; SING, A.K.; SING, K. Antibacterial properties of some Eucalyptus oils. **Fitoterapia**, Milano, v. 59, p. 141-144. 1988.

KWON-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E. **Medical Mycology**. Philadelphia, Lea & Febiger, 1992, 866p.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; HEINS – VACCARI E.M.; MELO, N.T. **Tratado de micologia médica**. 9 ed. São Paulo, Brasil: Sarvier 2002. 1104p.

LAGNEAU, P.E.; HOUTAIN, J.Y. Aspergillose invasive chez des psittacidés. **Animal Medicine Veterinary**, v.145, p.307-310, 2001.

LIMA P. C. et al. **O tráfico de animais silvestres na Bahia**. Biodiversity Reporting Award 2003. Salvador, ago. 2002 Disponível em: http://www.biodiversityreporting.org/article.sub?docId=680&c=Brazil&cRef=Brazil&year=2003&date=August%202002 Acesso em 25 de maio de 2011.

LORENZI H. et.al., Arvores exoticas no Brasil: madeireiras, ornamentais e aromaticas, **Instituto Plantarum**, Nova Odessa – SP, 2003.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil - terrestres, aquáticas, parasitas e toxicas**. 3 ed. Instituto Plantarum, Nova Odessa. São Paulo. 2000. 640 p.

MADARIAGA, M.G.; TENORIO, A.; PROIA, L. *Trichosporon inkin* peritonitis treated with caspofungin. **Journal Clinical Microbiology**. v. 41, n. 12, p.5827-9, 2003.

MADRID, I. M.; TELES, A. J.; SANTIN, R.; MATTEI, A. S.; GOMES, A. WALLER, S. B. Eficácia de soluções desinfetantes na eliminação de fungos de importância medica e veterinária. **Archives of veterinary Science**. V. 18, n. 1, p. 65-70, 2013.

MAIA, N. B. **Nutrição mineral, crescimento e qualidade do óleo essencial da menta (*Mentha arvensis* L.) cultivada em solução nutritiva.** Dissertação de mestrado apresentada na ESALQ, Piracicaba, SP em 1994, 69p.

MARINHO, M.; TÁPARO, C.V.; SILVA, B.G.; TENCATE, L.N.; PERRI, S.L.V. Microbiota fúngica de passeriformes de cativeiros da região noroeste do Estado de São Paulo**. Veterinária e Zootecnia** 2010 jun.; 17(2): 288-292.

MARTINDALE: the complete drug reference. 35th. ed. London: **Pharmaceutical Press**, 2007. p.1472-1475.

MAZARO S.M. et.al., Inducao de Resistencia em Plantas, **Sistema de Produção Agropecuária da UTFPR,** Mastergraf Grafica e Editora Ltda, Dois Vizinhos – PR, 2007 p: 183-195.

MCDONNELL, G.; RUSSEL, A.D. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. **Clinical Microbiology Review**., v.12, p.147-179, 1999.

MEIRELES, M.C. A., NASCENTE, P. S., et al. **Micologia Veterinária** – Pelotas, Ed. Gráfica Universitária, UFPEL, 543 p. 2009.

MEDRANO, D. J. A.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A. C.; ROCHA, M. F. G.; RABENHORST, S. H. B.; SIDRIM, J. J. C. Candidemia in a Brazilian hospital: theimportance of *Candida parapsilosis.* **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, p. 17-20, 2006.

MENDES, A.A. et al. **Produção de Frangos de Corte**. Campinas, FACTA, Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Agrícola, 2004. Cap. 8, p.117- 119. Cap. 11, p.171-173.

MENDES, Josiara Furtado. **PERCEPÇÃO DE ALUNOS DO ENSINO MÉDIO SOBRE A FAUNA SILVESTRE, O TRÁFICO E OS MAUS TRATOS A ANIMAIS EM PELOTAS, RS**. 2011 63 folhas. Trabalho de Conclusão de Curso – Ciências Biológicas – Licenciatura. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

MOODLEY, R.; KINDNESS, A.; JONNALAGADDA S. B. Elemental composition and chemical characteristics of five edible nuts (almond, Brazil, pecan, macadamia and walnut) consumed in Southern Africa. **Journal of Enviromental Science and Health, 42**, 585-591. 2007.

MORETTI, A.; POSTERARO, B.; BONCIO, L.; MECHELLI, L.; GASPERIS, E. AGNETTI, F.; RASPA, M. Diffuse cutaneous candidiasis in a dog. Diagnosis by PCRREA. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 21, p. 139-142, 2004.

NAGAI, K.; MURATA, T.; OHTA, S.; ZENDA, H.; OHNISHI, M.; HAYASHI, T.; Two diffetent mechanisms are the involved in the extremily high-level benzalconium chloride resistance of *Pseudomonas fluorences* strain. **Microbiology and Imunology.** Tokio, v. 47, p. 709-715, 2003.

NASCENTE, P. S.; SANTIN, R.; LUND, R. G.; BUENO, M. E.; FEIJO, A. M.; CLEFF, M. B.; MEIRELES, M. C. A. Leveduras isoladas em ambiente de UTI – estudo preliminar. In: 5º CONGRESSO BRASILEIRO DE MICOLOGIA, Recife. **Anais do 5º Congresso Brasileiro de Micologia**, 2007. 376p.

NCCLS. 2003. **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests**. Approved standard, 8th ed. NCCLS document, Wayne, Pa.

NOGARATO e PENNA. **Desinfecção e Esterilização.** 1ª ed. Rio de Janeiro: Atheneu Rio, 2006. 1 v.

NUNES XP, MAIA GLA, ALMEIDA JRGS, PEREIRA FO, LIMA EO 2006. Antimicrobial activity of the essential oil of *Sida cordifolia* L. **Revista Brasileira Farmacognosia** 16(Supl): 642-644.

ODUM P E., **Ecologia**, Ed. Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro – RJ, 1988.

OKA C. & ROPERTO A. **Hortelã.** Herbário Aquiléa. Disponível em: <http://www.cotianet.com.br/eco/HERB/hort.htm>. Acesso em: 12 janeiro 2007.

OLIVEIRA, F. F. **Caracterização físico-química de amostras de óleo de pinho e estudos da ação de sistemas tensoativos na atividade antimicrobiana de ativos fenólicos**. Tese (Doutorado). Instituto de Química. Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 191 p. 2008.

PACHECO, A. M. **Selênio e aflatoxinas em castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H. B. K.) e qualidade de produtos derivados.** 2007. 144 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

PAN P, BARNETT ML, COELHO J, BROGDON C, FINNEGAN MB. Determination of the in situ bactericidal activity of an essential oil mouthrinse using a vital stain method. **Journal Clinical Periodontology** 27: 256-261, 2000.

PATTNAIK, S.; SUBRAMANYAN, V.R.; KOLE, C, Antibacterial and antifungal activity of tem essential oils in vitro. **Microbios.**, Cambridge, v. 86, p. 237-246. 1996.

PERSOON, C. H. **Mycologia Europaea seu completa omnium fungorum in variis Europaeae regionibus detectorum enumeratio, methodo naturali disposita, descriptione succincta, synonymia selecta et observationibus criticis additis.** 3 vol. 1822.

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 20, n. 1, p. 133–163, 2007.

PIMENTEL, F. A., CARDOSO, M. G., BATISTA, L. R., GUIMARÃES, L. G. L., SILVA, D. M. Ação fungitóxica do óleo essencial de *Tanaecium nocturnum* (Barb. Rodr.) Bur. e K. Shum sobre o *Aspergillus flavus* isolado da castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*). **Acta Amazônica** vol. 40(1): 213 - 220, 2010.

POLLOCK, C.; ROHRBACH, B.; RAMSAY, E. Fungal dermatitis in captive Pinnipeds. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 31, n. 3, p. 374–378, 2000.

QUINTERO, W. **Desinfecção moderna** - Curso ministrado na VIII SEAB, UNESP, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, SP, 1994. 40p.

RAMALHO A.C., SOARES K.D.A., SILVA D.F., BARROS M.R.C., PINHEIRO JR. J.W., OLIVEIRA J.M.B., MOTA R.A. e MEDEIROS E.S. 2012. Eficácia *in vitro* de desinfetantes comerciais utilizados no pré e pós-dipping frente a *Staphylococcus* spp. isolados em rebanhos leiteiros. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 32(12):1285-1288.

RAPOSO J. B., PEREIRA D. I. B., FERNANDES G. C., RUAS J. L., RIET-CORREA G. 1997. Doenças Diagnosticadas pelo Laboratório Regional de Diagnóstico no ano de 1996. **Boletim do Laboratório Regional de Diagnóstico**, Pelotas, RS, n 17, p. 30-31.

RAVEN P.H., et.al., **Biologia Vegetal**, Editora Guanabara Koogan S.A, 6a Edição, Rio de Janeiro – RJ, 2001.

REDIG. General Infectious Diseases - Avian Aspergillosis. In: Fowler, M.E.: Zoo & Wild **Animal Medicine: current therapy 3**. W B Saunders Inc., Denver, Colorado, 1993, cap.23, p.178-181.

REHDER VLG, MACHADO ALM, DELARMELINA C, SARTORATTO A, FIGUEIRA GM, DUARTE MCT. Composição química e atividade antimicrobiana do óleo essential de *Origanum applii* e *Origanum vulgare*. **Rev Bras Pl Med** 6: 67-71, 2004.

RICHARDSON, D. M. **Ecology and Biogeography of Pinus**. Cambridge University Press, Cambridge. 1998. 530 p.

ROBBERS J.E. et.al., **Farmacognosia e Biotecnologia,** Editorial Premier, Sao Paulo – SP, 1997.

RUTALA WA, WEBER DJ. Uses of inorganic hypochlorite (bleach) in health-care

facilities. **Clinical Microbiology Review**. 1997; 10(4):597-610.

SALIM, C. A., **Desinfecção de superfícies: avaliação da eficácia do hipoclorito de sódio 1%, álcool 70%, Pinho Sol e detergente sobre o *Enterococcus faecalis* (ATCC 4083)**. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte; 2004. 74 p.

SANTOS, L.; SCALCO NETO, J.; RIZZO, N.; BASTIANI, P.; RODRIGUES, L.; FERREIRA, D.; SCHWANTS, N.; BARCELLOS, H.; BRUN, M. Avaliação dos procedimentos de limpeza, desinfecção e biossegurança no Hospital Veterinário da Universidade de Passo Fundo (HV-UPF). **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 35, p. 357-362, 2007.

SANTOS, J. I. Atividade fungicida de desinfetantes comerciais de uso doméstico frente a *Candida albicans*. **6ª SEMANA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO**. Santa Catarina. Anais da 6ª Semana de Ensino, Pesquisa e Extensão, 2007.

SANTOS, E. M.; JORGE, A. O. C. Desinfecção de moldes de hidrocolóide irreversível e modelos e gesso com hipoclorito de sódio: eficiência e estabilidade dimensional. **Revista de Odontologia**. UNESP, São Paulo, 30(1): 107-119, 2001

SARTORATTO, A. et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.35, p.275-280, 2004.

SCHUCH, L. F. D., WIEST, J. M. COIMBRA, H. S., PRESTES, L. S., TONI, L. LEMOS, J. S. CINÉTICA DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA *IN VITRO* DE EXTRATO NATURAIS FRENTE A MICRORGANISMOS RELACIONADOS À MASTITE BOVINA. **Ciência Animal Brasileira,** v. 9, n. 1, p. 161-169, jan./mar. 2008.

SEMPREBOM, A. M. **Aumento da suscetibilidade de *candida albicans* à clorexidina em condições de anaerobiose.** Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Catolica do Paraná, Curitiba,56 f. 2007.

SESTI, L.A.C. **Biosseguridade em avicultura**: controle integrado de doenças. In: Simpósio Goiano de avicultura, 06, 2004, Goiânia. Anais. Goiânia, GO, 2004.

SEYMOUR R 2003. Additional properties and uses of essential oils. **Journal Clin Periodontol** 30: 19-21.

SHAREEF, B. T.; HARUN, A.; ROZIAWATI, Y.; SHAIFUL BAHARI, I.; DERIS, Z. Z.; RAVICHANDRAN, M. Recurrent *Trichosporon asahii* Glossitis: A Case Report. **Journal Contemporary Dental Practice**, v.9, n.3, p.114-120, 2008.

SIDRIM J.J.C., ROCHA, M.F.G., **Micologia Médica à luz de autores conteporâneos**. Rio de Janeiro: Guanaba Koogan, 2004. 388p.

SIDRIM, J. J. C.; MOREIRA, J. L. B. Fundamentos clínico-laboratoriais da micologia médica. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, p. 171-190, 1999.

SIERRA, P.; GUILLOT, J.; JACOB, H.; BUSSIERAS, S.; CHERMETTE, R. Fungal flora on cutaneous and mucosal surfaces of cats infected with feline immunodeficiency virus or feline leukemia virus. **American Journal of Veterinary Research**, v. 61, n. 2, p. 158-161, 2000.

SILVA, E.J.S.; GONÇALVES, R.G.; PONTES, F.S.C.; CELESTINO JR., A.F. Avaliação microbiológica da eficácia imediata de 04 agentes anti-sépticos utilizados na degermação das mãos. **Revista Brasileira Cirurgia Implante**, v. 7, p. 20-27, 2000.

SPRINGFIELD EP, AMABEOKU G, WEITZ F, MABUSELA W, JOHNSON Q An assessment of two *Carpobrotus* species extracts as potential antimicrobial agents. **Phytomedicine** *10*: 434-439. 2003.

SIMÕES C.M.O et.al., **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 5a Edição, Editora UFRGS/Editora UFSC, Porto Alegre/Florianópolis, 2004.

SINGH, H. N. P.; PRASAD, M. M.; SINHA, K. K. Efficacy of leaf extracts of some medicinal plantas against disease deve lop ment in banana. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, n. 17, p. 269-271, 1993.

SOBESTIANSKY, J. **Sistema Intensivo de produção de suínos**: Programa de biossegurança. Goiânia: Pfizer, 2002.

SPARAGANO, O., FOGGETT, S. Diagnosis of clinically relevant Fungi. In: **Medicine and Veterinary Sciences - Advances in Apllied Microbiology**, v. 66, p. 29 – 52, 2009.

SPINOSA, H., GORNIAK, S., BERNARDI, M. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. Cap.35, p. 441-447.

TAKAHASHI, T.; KOKUBO, R.; SAKAINO, M. Antimicrobial activities of eucalyptus leaf extracts and flavonoids from *Eucalyptus maculate*. **Lett Application Microbiology**, Oxford, v. 39, p. 60-64. 2004.

TAYLOR, L.H., WOOLHOUSE, M.E.J**. Zoonoses and the risk of disease emergence**, Proc. Int. Conf. Emerg. Infect. Dis., Atlanta, USA, Board 122, 2000.

THÉRAUD, M.; BÉDOUIN, Y.; GUIGUEN, C.; GANGNEUX, J. Efficacy of antiseptics and disinfectants on clinical and environmental yeast isolates in planktonic and biofilm conditions. **Journal of Medical Microbiology**. v. 53, p. 1013–1018, 2004.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 8. ed. Porto Alegre:Artmed, 2006, p. 183-200; 459-460; 590-592.

VELASCO, M. C. Candidiasis and Cryptococcosis in birds. **Seminars in Avian andExotic Pet Medicine**, v. 9, n. 2, p. 75-81, 2000.

VONBERG, R.; GASTMEIER, P. Nosocomial aspergillosis in outbreak settings. **Journal of Hospital Infection**. v. 63, p. 246-254, 2006.

XAVIER, M.O. et al. **Eficácia da clorexidina-cetrimida na desinfecção ambiental contra *Aspergillus* spp.**. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* [online]. 2008, vol.60, n.4, pp. 873-877. ISSN 0102-0935.

WAGNER H., WISENAUER M., **Fitoterapia: Fitofármacos, Farmacologia e Aplicações Clínicas**; 2a Edicao, Pharmabooks Editora, Sao Paulo – SP, 2006.

WATSON, K.C.; KALLICHURUM, S. Brain abscess due to *Trichosporon cutaneum*. **Journal Medical Microbiology**, v. 3, n.1, p. 191 – 3, 1970.

WEBER, D.J.; RUTALA, W.A.; SICKBERT-BENNETT, E.E. Outbreks associated with contaminated antiseptics and disinfectants. **Antimicrobians Agents Chemother**., v. 51, n. 12, p. 4217-4224, 2007.