

# ATIVIDADE *IN VITRO* DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *Burkholderia* sp. (BURKHOLDER 1950) SOBRE A LEVEDURA *Malassezia pachydermatis*

OLNEY VIEIRA-DA-MOTTA,<sup>1</sup> MARIA JOSÉ RIBEIRO DA SILVA,<sup>2</sup> MARIANA FEITOSA DE DEUS,<sup>2</sup> RICHARD IAN SAMUELS,<sup>2</sup> LUCIANA MATHIAS,<sup>2</sup> JOÃO CARLOS DE AQUINO ALMEIDA,<sup>2</sup> ERICK VAZ GUIMARÃES<sup>3</sup> E ANTONIO HENRIQUE ALMEIDA MORAES-NETO<sup>3</sup>

1. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – Professor Associado II do Curso de Medicina Veterinária da UENF, do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Laboratório de Sanidade Animal. Contato principal para correspondência.

2. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

3. Fiocruz.

## RESUMO

*Malassezia pachydermatis* é um dos principais agentes fúngicos envolvidos nas lesões de pele e otopatias de cães e gatos e frequentemente associada a infecções bacterianas e a imunossupressão. Novas terapias para o tratamento de infecções fúngicas são necessárias por causa do aparecimento de cepas resistentes. O efeito inibitório de metabólitos presentes no filtrado de cultivo da bactéria *Burkholderia* sp. (FCB) foi testado sobre cepas nativas clínicas da levedura *M. pachydermatis* em meio líquido pelo padrão de curva de crescimento, pela técnica de difusão em ágar e contagem de unidades formadoras de colônias

em meio sólido. Avaliou-se a atividade de FCB sobre as células tratadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET). Utilizaram-se antifúngicos comerciais para efeitos de comparação. FCB apresentou atividade sobre a levedura pelas técnicas utilizadas. Nas análises de MET, os efeitos de FCB sobre as células também foram observados por alterações da parede com diminuição da eletrondensidade e desestruturação das organelas. Esses resultados sugerem a atividade interna e externa sobre a levedura e o uso potencial de FCB contra *M. pachydermatis*.

**PALAVRAS-CHAVES:** *Burkholderia* sp., inibição de crescimento, *Malassezia pachydermatis* metabólitos bacterianos.

## ABSTRACT

### *IN VITRO* ACTIVITY OF SECONDARY METABOLITES OF *Burkholderia* sp. (BURKHOLDER 1950) AGAINST THE YEAST *Malassezia pachydermatis*

*M. pachydermatis* is among the main agents involved in skin lesion and otopathological alterations of dogs and cats frequently associated to bacterial infections and host immune suppression. Because of resistance toward drugs, the market urge new therapies for treatment of fungal infections are needed. The effect of metabolites present in the filtrate culture of *Burkholderia* sp. (FCB) was tested against native clinical strains of the yeast *M. pachydermatis* in liquid medium measured by standard growth curve, by agar diffusion method, and colony forming units count in

agar. Activity of FCB on cells was evaluated by transmission electron microscopy (TEM). For comparison, sensitivity tests were performed on the yeast by diffusion agar test using commercial drugs. Crude FCB presented activity against the yeast by the methods utilized. The activity of FCB on cells was also observed by TEM, which revealed loss of electron density and organelles structure alteration. These results suggest internal and external activities on the yeast cells and the potential use of FCB against *M. pachydermatis*.

**KEY WORDS:** Bacterial metabolites, *Burkholderia* sp., growing inhibition, *Malassezia pachydermatis*.

## INTRODUÇÃO

*Malassezia pachydermatis* é uma levedura lipofílica, porém não dependente de fonte lipídica para seu crescimento em meio de cultura, classificada como um basidiomiceto, com tamanho aproximado de 2,5 x 5,0 micras (DAVID et al., 2003; 2007), podendo alcançar 4,8 x 7,0 micras (GUILLOT & BOND, 1999). A presença da levedura *M. pachydermatis* em lesões de pele e nas afecções do conduto auditivo de cães e gatos é vastamente documentada e sua presença em animais saudáveis indica o caráter oportunista desse microrganismo (CAFARCHIA et al., 2005), especialmente nos animais imunossuprimidos (AKERSTEDT & VOLLSET, 1996). Os animais sofrem com afecções do pavilhão auricular, muitas vezes associada a infecções múltiplas, com o envolvimento de bactérias (LLOYD & LAMPORT, 1999). A levedura pode ser carregada pelas mãos de humanos e representa riscos às pessoas quando a higiene pessoal não for observada (MORRIS, 2005).

A bactéria *Burkholderia cepacia*, pertencente à família *Pseudomonadaceae*, previamente denominada *Pseudomonas cepacia*, está associada a doenças em plantas (BURKHOLDER, 1950; HOLMES et al., 1998), no homem (BIDDICK et al., 2003) e animais domésticos (BERRIATUA et al., 2001). O efeito de metabólitos secundários produzidos por *Burkholderia* sp. demonstrou atividade contra fungos entomopatogênicos e saprofíticos, além de fungos especializados que crescem em jardins fúngicos de formigueiros, contudo, não apresentaram atividade sobre fungos mutualistas necessários para a manutenção do formigueiro (SANTOS et al., 2004). Substâncias com atividade antibiótica foram isoladas de *B. cepacia*, confirmando seu efeito sobre fungos do solo (LIM et al., 1994). PARKER et al. (1984), BISACCHI et al. (1987) e LEE et al. (1994) demonstraram o efeito de peptídeos sobre bactérias e fungos fitopatogênicos e de importância nas áreas animal e humana. O efeito de pirrolnitrina, substância isolada de *B. cepacia* NB-1 extraída por processos cromatográficos, ficou demonstrado contra *Neurospora crassa* cepa 74 A, mais espe-

cificamente na inibição do sistema de transporte de elétrons na mitocôndria fúngica (EL-BANNA & WINKELMANN, 1998).

Vários agentes químicos sintéticos são utilizados no tratamento de animais doentes portadores de *M. pachydermatis*, como cães e gatos (BOND & LLOYD, 1998) e caprinos (PIN, 2004), porém há citação de resistência do fungo aos tratamentos convencionais (UCHIDA et al., 1994), principalmente após cultivos sucessivos em laboratório (NAKANO et al., 2005). O mecanismo de resistência pode estar relacionado a mudanças na composição da membrana citoplasmática dos microrganismos. Em contraste com as células eucarióticas superiores, a camada externa das membranas microbianas é rica em lipídios negativamente carregados e tais informações podem facilitar o combate a patógenos por meio de desenvolvimento de novas drogas (THEVISSSEN et al., 1997). Tais fatos chamam a atenção para o desenvolvimento de novos tipos de tratamento para a doença causada por *M. pachydermatis* em medicina veterinária.

Este trabalho teve como objetivo testar *in vitro* a atividade de metabólitos secundários da bactéria *Burkholderia* sp. sobre a levedura *M. pachydermatis*, observar seu efeito na célula fúngica e sugere o seu uso potencial no tratamento de animais portadores de lesões causadas por esta levedura.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram isoladas 25 amostras clínicas de *M. pachydermatis*, no Laboratório de Sanidade Animal da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, obtidas de animais portadores de otite externa e com lesões cutâneas.

A identificação das leveduras foi baseada na morfologia característica, crescimento em ágar Sabouraud dextrose (Acumedia, EUA) com e sem adição de óleo de oliva estéril. As colônias de coloração branco-amarelada, no início do cultivo com superfície convexa e textura cremosa, lisa e seca, após uma semana de cultivo, apresentavam coloração bege e marrom. Após coloração com Panótico (Laborclin, Brasil), a microscopia reve-

lou células típicas, cujos brotamentos conferiram forma ovalada, variando a formas de garrafas ou pegadas.

De um total de 25 amostras foram separadas e testadas em triplicatas quatro cepas e cultivadas na presença de filtrado de cultivo da bactéria *Burkholderia* sp. (FCB), isolada de formigas cortadeiras (SANTOS et al., 2004).

#### Inibição de *Malassezia pachydermatis* em meio líquido

Para obtenção da curva de crescimento da levedura, cultivaram-se as cepas em ágar Sabouraud dextrose 2% (Acumedia, EUA) por 48 horas, a 37° C, sendo as colônias diluídas em solução salina fisiológica estéril a uma concentração equivalente a 10<sup>7</sup> unidades formadoras de colônias (UFC) ou correspondente à leitura 0,5 da escala McFarland, calculadas pelo fotômetro (Densimat®, bioMérieux, França) em D.O. 550nm, que passou a ser o inóculo para os ensaios de inibição. Em tubos com 1,8 e 1,85mL de caldo Sabouraud dextrose 2% (Acumedia, EUA) foram adicionados 100 e 50µL de FCB, respectivamente, de estoque com concentração de 3mg/mL, calculada pelo método de ácido bicinônico (Sigma®, EUA), e acrescentado um volume fixo de 100µL do inóculo, perfazendo um volume final de 2,0mL. Em intervalos de 120 minutos, o material foi analisado em fotômetro (Densimat®, bioMérieux, França) e obtida a curva de crescimento. Manteve-se o cultivo por 60 horas a 37° C e comparou-se o crescimento populacional com o material tratado apenas com meio adicionado de água destilada estéril, realizando-se todos os experimentos em triplicatas.

#### Confirmação de inibição em meio sólido por contagem de UFC

Após 60 horas de incubação em estufa a 37°C no meio líquido, o material foi homogeneizado e espalharam-se uniformemente alíquotas de 100µL sobre ágar Sabouraud dextrose (Acumedia, EUA) com auxílio de *swab* comercial (Venturi Transystem®, Copan Innovation, Italy).

Foi permitido o crescimento a 37°C por 72 horas e, das triplicatas, compararam-se os números de colônias crescidas.

#### Difusão em ágar

As colônias de *M. pachydermatis* cultivadas em ágar Sabouraud dextrose foram diluídas em caldo Sabouraud dextrose até atingir a densidade de 0,5 da escala McFarland (Densimat, bioMérieux, França). Volumes de 100µL desses inóculos foram espalhados sobre a superfície de placas contendo ágar Sabouraud com *swab* comercial (Venturi Transystem, Copan Innovation, Italy). Cinco poços de 0,5mm de diâmetro foram perfurados sobre o ágar e preenchidos com 30µL de FCB, 30µL de estoque contendo 0,5mg/mL de solução de nitrato de miconazol (Vodol®, União Química, São Paulo, Brasil), utilizado como controle positivo. Os halos de inibição de crescimento foram medidos com paquímetro e os valores das medidas das triplicatas calculados e analisados por regressão (dados não mostrados).

#### Microscopia eletrônica de transmissão

Os cultivos em caldo Sabouraud 2% dextrose (volume final de 2,0mL) de *M. pachydermatis* tratados com filtrado de cultivo de *Burkholderia* sp. (50µL) foram centrifugados por duas horas à temperatura ambiente em 2,5% (v/v) de glutaraldeído (Sigma®, EUA) grau II em 0,1M de tampão cacodilato de sódio (Sigma®, EUA), pH 7,4. Depois da fixação, a amostra foi pós-fixada por vinte minutos com tetróxido de ósmio (OsO<sub>4</sub> – Sigma®, EUA) 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,4 adicionado de 0,8% de ferrocianeto de potássio (Sigma®, EUA) e 5 mM de cloreto de cálcio. Em seguida, desidrataram-se as células por vinte minutos em séries crescentes de acetona: 15%, 30%, 50%, 70%, 90% e, finalmente por três vezes, a 100%. Em seguida, infiltraram-se as amostras por etapas de seis horas em Epon (PolyScience®, EUA), iniciando-se em concentrações crescentes de acetona: epon 3:1, 2:1, 1:1, e depois decrescentes 1:2, 1:3 e finalmente Epon puro. Posteriormente, as amostras

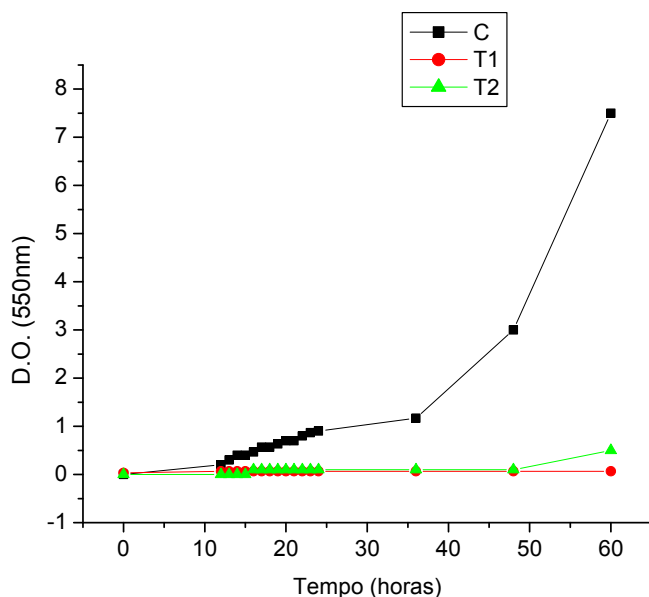
foram polimerizadas em estufa a 80°C e cortaram-se os blocos em ultramicrótomo Reichert Ultracut S (Leica®, Suíça). Acomodaram-se os cortes de 70nm (ultrafinos) obtidos em grades de 3mm de diâmetro e malha de 400 mesh (SPI grids, WestChester, PA, EUA), sendo observados no microscópio eletrônico de transmissão Zeiss TEM 900 em aumento 13.500x.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho quatro cepas de *M. pachydermatis* isoladas de animais portadores de otites e de lesões de pele foram submetidas a teste *in vitro*, aos subprodutos da bactéria *Burkholderia* sp. (SANTOS et al., 2004). A levedura *M. pachydermatis* é um dos patógenos de origem fúngica envolvido nos quadros patológicos de animais portadores de quadros de otite e dermatoses, mas pode ser isolado de animais considerados sadios (GUILLOT & BOND, 1999). O contato entre microrganismos na natureza é bastante freqüente e possivelmente os subprodutos secretados pelas diferentes espécies, tanto bactérias como fungos, interferem diretamente na sua sobrevivência em tais nichos ecológicos. A levedura secreta enzimas consideradas fatores de virulência que podem influenciar no quadro patológico dos hospedeiros (MANCIANTI et al., 2000). *B. cepacia* é um membro da família *Pseudomonadaceae*, ante-

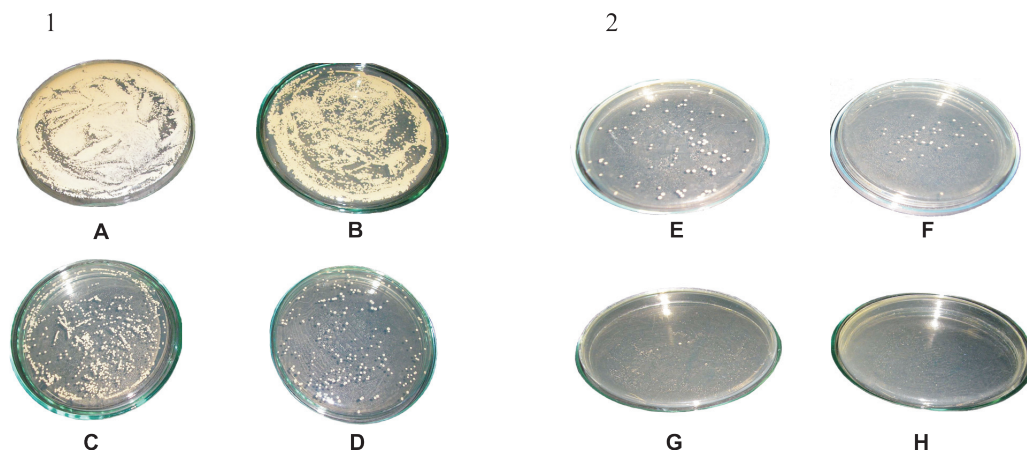
riormente denominada *Pseudomonas cepacia*, e sua virulência foi estudada em modelo vegetal (broto de alfafa) e animal (ratos) com variações de patogenicidade entre os seus genovares (BERNIER et al., 2003). Outros autores isolaram e descreveram a atividade de metabólitos de *B. cepacia* contra fungos, tal como pirrolnitrina secretada por *B. cepacia* NB-1, que apresentou efeito inibitório sobre o sistema de transporte de elétrons da mitocôndria de *N. crassa* 74 A (EL-BANNA & WINKELMANN, 1998). Vários subprodutos foram isolados dessa espécie bacteriana com diferentes aplicações na agricultura (KERR, 1994; HOLMES et al., 1998) e de *Burkholderia* sp. (SANTOS et al., 2004).

No presente estudo os metabólitos de *Burkholderia* sp. (SANTOS et al., 2004) apresentaram efeitos inibitórios sobre *M. pachydermatis* demonstrados por diferentes testes. Na avaliação pelo método de cultivo em caldo Sabouraud (Figura 1), as concentrações testadas apresentaram efeito fungicida (150µg) e fungistático (75µg), demonstrado em seguida pelo método de contagem de unidades formadoras de colônias (UFCs) em meio sólido. A contagem de UFCs após a incubação com FCB em meio líquido apresentou diferenças observadas pela comparação entre as diluições 10<sup>-1</sup> dos tratamentos e a diluição 10<sup>-4</sup> dos controles (Figura 2).



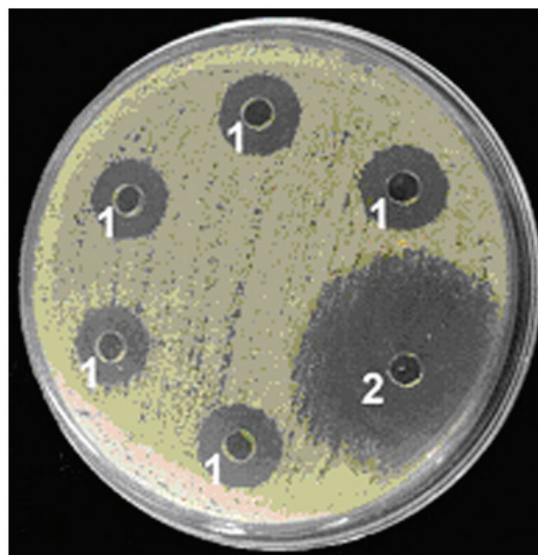
**FIGURA 1.** Curva de inibição de crescimento da levedura *Malassezia pachydermatis* cultivada em caldo Sabouraud dextrose 2%, em presença de filtrado de cultivo de *Burkholderia* spp.





**FIGURA 2.** Teste de contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) de *Malassezia pachydermatis* em agar Sabouraud 2% Dextrose, após diluições seriadas de cultivo em caldo Sabouraud dextrose 2%.

Os resultados observados pelo método de difusão em ágar (Figura 3) são compatíveis com os encontrados por outros autores, quando utilizaram testes semelhantes contra fungos entomopatogênicos (SANTOS et al., 2004) e *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. tropicalis* (GONÇALVES et al., 2005). Atualmente, os tratamentos contra a levedura *M. pachydermatis* incluem vários tipos de produtos, entre eles cetoconazol e terbinafina (GUILLOT et al., 2003), além de nistatina (NAKANO et al., 2005). No presente estudo, nos testes de difusão em ágar (Figura 3), o efeito de FCB sobre o crescimento de *M. pachydermatis* foi observado pela formação de halos com média de 19,8mm de diâmetro ( $p < 0,05\%$  nível de significância), e no controle positivo a formação de halo com média de 40,0mm ( $p < 0,05\%$  nível de significância), que se mantiveram constantes nas repetições. Levando-se em conta que o conteúdo de FCB ainda não foi totalmente caracterizado, o efeito inibitório do material tem potencial para ser explorado. EL-BANNA & WINKELMANN (1998), ao testarem os efeitos de pirrolnitrina pela técnica de difusão em ágar, observaram a presença de halos de inibição de diâmetros variados contra diversos microrganismos, porém mais pronunciado contra *Streptomyces antibioticus*, *S. violaceoruber*, *Paezilomyces variotii* e *Penicillium puberulum*. Esses mesmos autores detectaram atividade antibiótica de pirrolnitrina contra vários fungos, entre eles *Candida albicans*, pela técnica de microtitulação em placas.

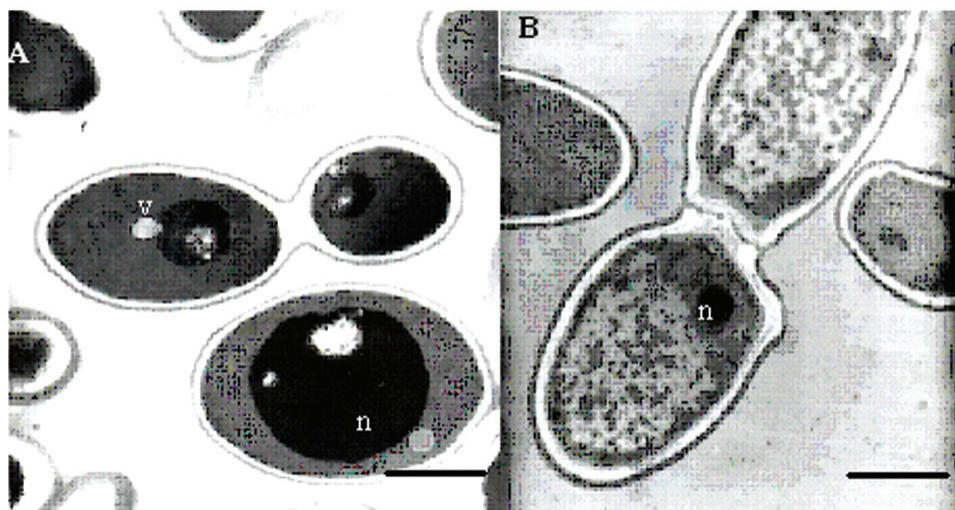


**FIGURA 3.** Avaliação da atividade antifúngica, em ágar Sabouraud Dextrose 2%, de metabólitos de *Burkholderia* spp. sobre *M. pachydermatis* pelo método de difusão em ágar.

Os resultados de microscopia eletrônica (Figura 4) obtidos neste trabalho podem elucidar a atividade de FCB sobre *M. pachydermatis*, embora a levedura detenha parede espessa (DAVID et al., 2003; 2007), conforme o observado pela perda de eletrondensidade e pela desorganização e desestruturação de organelas internas das células tratadas com 50 $\mu$ g de FCB em meio líquido. A formação de poros na membrana fúngica após a atuação de proteínas toxinas fúngicas foi sugerida (WEILER & SCHIMITT, 2003), pois não foi

possível precisar onde FCB atuou pela microscopia eletrônica. É possível que os efeitos observados por FCB sobre *M. pachydermatis* sejam decorrentes da formação de poros na membrana, como sugerido por outros trabalhos (WEILER & SCHIMITT, 2003), ou decorrente também da inibição do sistema transportador de elétrons de organelas internas, como mitocôndrias, tal como observado por EL-BANNA & WINKELMANN (1998), quando trabalharam com o fungo fitopatogênico *Neurospora crassa* cepa 74 A. Contudo, os resultados dos últimos autores foram obtidos com material extraído do cultivo de *B. cepacia* NB-1 e purificado por cromatografia e testados sobre o conteúdo das células de *N. crassa*.

Os princípios ativos presentes no FCB que possam atuar sobre *M. pachydermatis*, observados no presente trabalho, ainda não foram completamente caracterizados. No entanto, a presença de uma proteína com atividade antibiótica foi isolada desta cepa de *Burkholderia* sp., capaz de inibir o crescimento de fungos de importância veterinária e humana (SAMUELS et al., 2005). Pode-se inferir que a purificação de FCB derivará moléculas com poder inibitório mais acentuado sobre *M. pachydermatis*, e concentrações menores daquelas utilizadas no presente trabalho resultarão em um poder inibitório mais potente.



Aumento 13750 X, barra equivalente a 1,0  $\mu$ m.

**FIGURA 4.** Micrografias de secção ultrafina de microscopia eletrônica de transmissão da levedura *Malassezia pachydermatis*. Células do controle com núcleos (n) e vacúolos (v) bem visualizados (A); células tratadas com filtrado de cultivo de *Burkholderia* spp (B). Notar a perda de eletrondensidade e desestruturação de organelas internas com o núcleo picnótico (n) e ausência de vacúolos em (B).

## CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos neste trabalho, os componentes presentes no sobrenadante de *Burkholderia* sp. atuaram sobre as células de *Malassezia pachydermatis*, o que foi demonstrado pela sua atividade inibitória sobre o crescimento do fungo e nas alterações microscópicas após o cultivo na presença de FCB.

Os metabólitos produzidos por *Burkholderia* sp. poderão abrir novas perspectivas no tratamento de dermatopatias e otopatias causadas por *M. pachydermatis* em animais domésticos, porém ensaios

que demonstrem possíveis atividades citotóxicas em células de mamíferos deverão ser realizados.

## AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de mestrado ao primeiro autor, e à Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo a Pesquisas do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), pelo apoio financeiro concedido ao projeto Processo # E-26/ 171.045/ 2004, desenvolvido pelo segundo autor.

## REFERÊNCIAS

- AKERSTEDT, J.; VOLLSET, I. *Malassezia pachydermatis* with special reference to canine skin disease. **British Veterinary Journal**, v.152, n. 3, p. 269-281, 1996.
- BISACCHI, G.S.; HOCKSTEIN, D.R.; KOSTER, W.H.; PARKER, W.L.; RATHNUM, M.L.; UNGER, S.E. Xilocandin: A new complex of antifungal peptides II- Structural studies and chemical modifications. **The Journal of Antibiotics**, v. 40, n. 11, p. 1520-1529, 1987.
- BERNIER, S. P.; SILO-SUH, L.; WOODS, D. E.; OHMAN, D. E.; SOKOL, P. A. Comparative analysis of plant and animal models for characterization of *Burkholderia cepacia* virulence. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 9, p. 5306-5313, 2003.
- BERRIATUA, E.; ZILUAGA, I.; MIGUEL-VIRTO, C.; URIBARREN, P.; JUSTE, R.; LAEVENS, S.; VANDAMME, P.; GOVAN, J.R. Outbreak of subclinical mastitis in a flock of dairy sheep associated with *Burkholderia cepacia* complex infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 990-994, 2001.
- BIDDICK, R.; SPILKER, T.; MARTIN, A.; LIPUMA, J.J. Evidence of transmission of *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia multivorans* and *Burkholderia dolosa* among persons with cystic fibrosis. **FEMS Microbiology Letters**, v. 228, p. 57-62, 2003.
- BOND, R.; LLOYD, D. H. Effect of topical therapy of *Malassezia pachydermatis*-associated seborrhoeic dermatitis on oral carriage of *M. pachydermatis*. **Veterinary Record**, v. 142, n. 26, p. 725-726, 1998.
- BURKHOLDER, W. Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs. **Phytopathology**, v. 40, p. 115-118, 1950.
- CAFARCHIA, C.; GALLO, S. ; ROMITO, D. ; CAPELLI, G. ; CHERMETTE, R. ; GUILLOT, J. ; OTRANTO, D. Frequency, body distribution, and population size of *Malassezia* species in healthy dogs and in dogs with localized cutaneous lesions. **Journal of Veterinary Diagnosis and Investigation**, v. 17, n. 4, p. 316-322, 2005.
- DAVID, M.; GABRIEL, M.; KOPECKÁ, M. Unusual ultrastructural characteristics of the yeast *Malassezia pachydermatis*. **Scripta Medica (BRNO)**, v. 76, n. 3, p. 173-186, 2003.
- DAVID, M.; GABRIEL, M.; KOPECKÁ, M. Microtubular and actin cytoskeletons and ultrastructural characteristics of the potentially pathogenic basidiomycetous yeast *Malassezia pachydermatis*. **Cell Biology International**, v. 31, p. 16-23, 2007.
- EL-BANNA, N.; WINKELMANN, G. Pyrrolnitrin from *Burkholderia cepacia*: antibiotic activity against fungi and novel activities against Streptomycetes. **Journal of Applied Microbiology**, v. 85, p. 69-78, 1998.
- GONÇALVES, D.S.; SILVA, M.J.R.; DEUS, M.F.; SANTOS, A.V.; SAMUELS, R.I.; VIEIRA-DA-MOTTA, O. Aplicabilidade de metabólitos bacterianos sobre leveduras do gênero *Candida*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 22., 2005, Santos, SP. **Anais...** Santos, SP, 2005.
- GUILLOT, J.; BOND, R. *Malassezia pachydermatis*: a review. **Medical Mycology**, v. 37, p. 295-306, 1999.
- GUILLOT J.; BENSIGNOR, E.; JANKOWSKI, F.; SEEWALD, W.; CHERMETTE, R.; STEFFAN, J. Comparative efficacies of oral ketoconazole and terbinafine for reducing *Malassezia* population sizes on the skin of Basset Hounds. **Veterinary Dermatology**, v. 14, p. 153-157, 2003.
- HOLMES, A.; GOVAN, J.; GOLDSTEIN, R. Agricultural use of *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia*: a threat to human health? **Emerging Infectious Diseases**, v.12, p. 149-178, 1998.
- LEE, C.-H.; KIM, S.; HYUN, B.; SUCH, J.-W.; YAN, C.; KIM, C.; LIM, Y.; KIM, C. Cepacidine A, a novel antifungal antibiotic produced by *Pseudomonas cepacia* I- Taxonomy, Production, Isolation and Biological Activity. **The Journal of Antibiotics**, v. 47, n. 11, p. 1402-1414, 1994.
- LIM, Y.H.; SUH, J.W.; KIM, C.W.; HYUN, B.C.; KIM, C.S.; LEE, C.H. Cepacidine A, a novel antifungal antibiotic produced by *Pseudomonas cepacia*. II. Physicochemical properties and structure elucidation. **Journal of Antibiotics**, v. 47, p. 1406-1416, 1994.
- LLOYD, D. H.; LAMPORT, A. I. Activity of chlorhexidine shampoos in vitro against *Staphylococcus intermedius*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Malassezia pachydermatis*. **Veterinary Record**, v. 144, n.19, p. 536-537, 1999.
- MANCIANTI, F.; RUM, A.; NARDONI, S.; CORAZZA, M. Extracellular enzymatic activity of *Malassezia* spp. isolates. **Mycopathologia**, v. 149, p. 131-135, 2000.
- MORRIS, D. O. *Malassezia pachydermatis* carriage in dog owners. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 1, p. 83-88, 2005.
- NAKANO, Y.; WADA, M.; TANI, H.; SASAI, K.; BABA, E.



Effects of  $\beta$ -Thujaplicin on anti-*Malassezia pachydermatis* remedy for canine otitis externa. **Journal of Veterinary Medicine and Science**, v. 67, n. 12, p. 1243-1247, 2005.

PARKER, W.L.; RATHNUM, M.L.; SEINER, V.; TREJO, W.H.; PRÍNCIPE, P.A.; SYKES, R.B. Cepacin A e Cepacin B, two new antibiotics produced by *Pseudomonas cepacia*. **The Journal of Antibiotics**, v. 37, n. 5, p. 431-440, 1984.

PIN, D. Seborrheic dermatitis in a goat due to *Malassezia pachydermatis*. **Veterinary Dermatology**, v. 15, n. 1, p. 53-56, 2004.

SAMUELS, R. I.; SANTOS, A.V. O.; VIEIRA-DA-MOTTA, SILVA, L.G.; DEUS, M.F.; SILVA, M.J.R. Antimicrobial proteins secreted by *Burkholderia cepacia*. In: XXXIV Sbbq,34., 2005, Águas de Lindóia. **Anais... Águas de Lindóia**, 2005. v. 29, p. F8.

SANTOS, A. V.; DILLON, R. J.; DILLON, V. M.; REY-

NOLDS, S. E.; SAMUELS, R. I. Occurrence of the antibiotic producing bacterium *Burkholderia* sp. in colonies of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 239, n. 2, p. 319-323, 2004.

THEVISSSEN, K.; OSBORN, R.W.; ACLAND, D.P.; BROEKAERT, W.F. Specific, high affinity binding sites for an antifungal plant defensin on *Neurospora crassa* hyphae and microsomal membranes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 32176-32181, 1997.

UCHIDA, Y.; ONODERA, S.; NAKADE, T.; OTOMO, K. Sterol composition in polyene antibiotic-sensitive and resistant strains of *Malassezia pachydermatis*. **Veterinary Research Communications**, v. 18, n. 3, p. 183-187, 1994.

ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, v. 415, p. 389-395, 2002.

---

Protocolado em: 22 fev. 2007. Aceito em: 21 jan. 2008.