



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ - *CAMPUS* DE CASCAVEL  
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS E FARMACÊUTICAS - CCMF  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS - PCF

**AÇÃO DE MICOCINAS PRODUZIDAS POR *Wickerhamomyces anomalus* SOBRE  
*Malassezia pachydermatis* ISOLADAS DO CONDUTO AUDITIVO DE CÃES**

**JESSICA CASSIA DA SILVA**

**CASCAVEL - PR**

**2021**

**JESSICA CASSIA DA SILVA**

**AÇÃO DE MICOCINAS PRODUZIDAS POR *Wickerhamomyces anomalus* SOBRE  
*Malassezia pachydermatis* ISOLADAS DO CONDUTO AUDITIVO DE CÃES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, *campus* de Cascavel, em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas na linha de pesquisa Prospecção de Microrganismos e Substâncias Bioativas com Aplicações Biotecnológicas e em Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Rinaldo Ferreira Gandra

**CASCADEL - PR**

**2021**

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Silva, Jessica Cassia da

Ação de micocinas produzidas por *Wickerhamomyces anomalus* sobre *Malassezia pachydermatis* isoladas do conduto auditivo de cães / Jessica Cassia da Silva; orientador Rinaldo Ferreira Gandra. -- Cascavel, 2021.

42 p.

Dissertação (Mestrado Acadêmico Campus de Cascavel) -- Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2021.

1. Micocinas. 2. Toxinas Killer. 3. Atividade antifúngica. 4. *Wickerhamomyces anomalus*. I. Gandra, Rinaldo Ferreira, orient. II. Título.

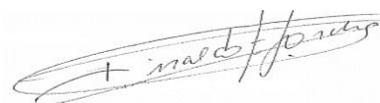
Dissertação revisada conforme as normas de redação do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas por Vanessa Raini de Santana, RG 9.925.311-8, revisora habilitada, graduada em Letras pela Universidade do Oeste do Paraná.

**JESSICA CASSIA DA SILVA**

**AÇÃO DE MICOCINAS PRODUZIDAS POR *Wickerhamomyces anomalus* SOBRE  
*Malassezia pachydermatis* ISOLADAS DO CONDUTO AUDITIVO DE CÃES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, *campus* de Cascavel, em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas na linha de pesquisa Prospecção de Microrganismos e Substâncias Bioativas com Aplicações Biotecnológicas e em Saúde.  
Orientador: Prof. Dr. Rinaldo Ferreira Gandra

**BANCA EXAMINADORA:**



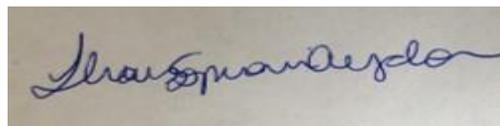
---

Prof. Dr. Rinaldo Ferreira Gandra  
Universidade Estadual do Oeste do Paraná  
UNIOESTE  
Orientador



---

Prof. Dr. Marcos Ereno Auler  
Universidade Estadual do Centro Oeste  
UNICENTRO



---

Prof. Drª. Thais Soprani Ayala  
Universidade Estadual do Oeste do Paraná  
UNIOESTE

## BIOGRAFIA RESUMIDA

Jessica Cassia da Silva, natural de Nova Aurora, Paraná, Brasil, nascida no dia 02 de março de 1991, graduada em Farmácia pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, *campus* de Cascavel em dezembro de 2014. Especialista pelo Programa de Pós-Graduação *lato sensu* em Residência Farmacêutica, com ênfase em Análises Clínicas. Trabalha como Farmacêutica Bioquímica no Hospital Universitário do Oeste do Paraná, de novembro de 2017 até o momento. Ingressou no Programa de Pós-graduação *stricto sensu* em nível de mestrado em Ciências Farmacêuticas no ano de 2019. Desenvolve projeto experimental de dissertação junto à linha Prospecção de Microrganismos e Substâncias Bioativas com Aplicações Biotecnológicas e em Saúde, orientada pelo Dr. Rinaldo Ferreira Gandra.

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar.  
Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”*  
(Madre Teresa de Calcutá)

A Deus,  
À minha família.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço à Deus, por estar sempre comigo, me dando saúde, me guiando e me consolando nos momentos de dificuldade.

Agradeço a minha família, principalmente os meus pais, Francisco e Neuza, minhas irmãs Cristiane e Grazieli, meus sobrinhos Davi e Isaac, meus avós Joaquim e Helena, e meu marido Silvio, pois desde o início me deram todo o apoio, incentivo, compreenderam minha ausência, meu estresse e as correrias ao longo dessa caminhada.

Gostaria de agradecer também a parceria das colegas do laboratório, Bruna, Eloiza, Maria e Eduarda, que me fizeram companhia durante a permanência no laboratório de micologia.

Sou muito grata ao meu orientador Prof. Dr. Rinaldo, pela oportunidade, pela paciência, pelo acolhimento e pelos ensinamentos no laboratório.

Por fim, gostaria de agradecer a Universidade Estadual do Oeste do Paraná, ao curso de Farmácia e principalmente ao Programa de Mestrado em Ciências, pois me deram as ferramentas necessárias para todo o conhecimento que tenho hoje, adquirido durante a graduação, residência e mestrado.

# **AÇÃO DE MICOCINAS PRODUZIDAS POR *Wickerhamomyces anomalus* SOBRE *Malassezia pachydermatis* ISOLADAS DO CONDUTO AUDITIVO DE CÃES**

## **RESUMO**

A *Malassezia pachydermatis* tem origem zoofílica, podendo ser encontrada em mamíferos, e frequentemente nos cães, nos quais colonizam principalmente a região do canal auditivo, levando a otites de difícil tratamento. As micocinas produzidas por *Wickerhamomyces anomalus* são capazes de inibir o crescimento de microrganismos eucariotos e procariotos. Este trabalho teve como objetivo verificar a inibição de *M. pachydermatis* isoladas do conduto auditivo de cães, por meio da ação de micocinas produzidas por *W. anomalus*. Os resultados mostraram, pelo teste de microdiluição em caldo, que 100% das cepas de *M. pachydermatis* testadas foram inibidas quando utilizado o sobrenadante de cultura contendo micocinas. O teste de viabilidade demonstrou que o tempo necessário para as micocinas inviabilizarem 100% das cepas de *M. pachydermatis* em caldo Sabouraud foi de 8 horas. No teste de produção de proteinases, 44% das cepas testadas foram fortemente produtoras de proteinases. E, posteriormente, todas essas cepas que tiveram a sua atividade enzimática fortemente positivas foram inibidas quando testadas em meio de cultura contendo uma concentração subinibitória de  $\beta$ -glucanases. Dessa forma, os resultados reforçam o potencial antimicrobiano das micocinas.

## **PALAVRAS-CHAVE:**

Atividade antifúngica; inibição de fungos; levedura *killer*; toxina *killer*.

## **ACTION OF MYCOCINS PRODUCED BY *Wickerhamomyces anomalus* ON *Malassezia pachydermatis* ISOLATED FROM THE EAR CANAL OF DOGS**

### **Abstract**

*Malassezia pachydermatis* has a zoophilic origin and can be found in mammals, and frequently in dogs, in which it mainly colonizes the ear canal region, leading to otitis that is difficult to treat. The mycocins produced by *Wickerhamomyces anomalus* are capable of inhibiting the growth of eukaryotic and prokaryotic microorganisms. This work aimed to verify the inhibition of *M. pachydermatis* isolated from the ear canal of dogs, through the action of mycocins produced by *W. anomalus*. The results showed, by the microdilution broth test, that 100% of *M. pachydermatis* strains tested were inhibited when culture supernatant containing mycocins was used. The viability test showed that the time required for mycocins to make 100% of *M. pachydermatis* strains in Sabouraud broth was 8 hours. In the proteinases production test, 44% of the tested strains were strong producers of proteinases. And subsequently, all of these strains that had their enzyme activity strongly positive were inhibited when tested in culture medium containing a subinhibitory concentration of  $\beta$ -glucanases. Thus, the results reinforce the antimicrobial potential of mycocins.

### **Keywords**

Antifungal activity; fungal of inhibition; yeast killer; toxin killer.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	10
1.1 Leveduras <i>killer</i> .....	10
1.2 <i>Malassezia pachydermatis</i> .....	12
2. OBJETIVOS .....	16
2.1 Objetivo geral .....	16
2.2 Objetivos específicos .....	16
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	16
3.1 Cepas de <i>Malassezia pachydermatis</i> .....	16
3.2 <i>Wickerhamomyces anomalus</i> .....	17
3.3 Produção de micocinas de <i>Wickerhamomyces anomalus</i> .....	17
3.4 Determinação da atividade de $\beta$ -glucanases .....	17
3.5 Atividade antimicrobiana em meio sólido .....	18
3.6 Atividade antimicrobiana pelo método de microdiluição .....	18
3.7 Teste de viabilidade .....	19
3.8 Pesquisa de proteinases e inibição de proteinases por micocinas.....	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
4.1 Determinação da atividade de $\beta$ -glucanases .....	21
4.2 Atividade antimicrobiana em meio sólido .....	21
4.3 Atividade antimicrobiana pelo método de microdiluição .....	22
4.4 Teste de viabilidade .....	24
4.5 Pesquisa de proteinases e inibição de proteinases por micocinas.....	25
5. CONCLUSÃO.....	27
6. REFERÊNCIAS .....	28

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Atividade antimicrobiana de micocinas em meio sólido .....	21
Figura 2. Leitura da placa do teste de microdiluição .....	22
Figura 3. Teste de susceptibilidade de <i>Malassezia pachydermatis</i> .....	23
Figura 4. Teste de viabilidade com brometo de etídeo e diacetato de fluoresceína .....	24
Figura 5. Teste de viabilidade de <i>M. pachydermatis</i> .....	25
Figura 6. Produção de proteinases em meio de cultura contendo albumina .....	26

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Leveduras *killer*

Algumas espécies de leveduras possuem a capacidade de produzir substâncias consideradas antimicrobianas, como é o caso da toxina *killer* ou micocinas, que podem causar a morte de outros microrganismos (MAGLIANI et al., 1997). O fenômeno *killer* foi descrito pela primeira vez por Bevan e Makower (1963), que observaram essa ação produzida por leveduras de *Saccharomyces cerevisiae*, isoladas de cerveja, e caracterizaram a sua atividade pela produção de glicoproteínas de baixo peso molecular, que são letais às células microbianas sensíveis, porém, essas leveduras são imunes a sua própria toxina (BOYNTON, 2019; MANNAZZU et al., 2019; SCHMITT; BREINIG, 2002).

Além da produção por *Saccharomyces*, outras leveduras possuem a mesma característica em produzir micocinas, como leveduras dos gêneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Ustilago*, *Wickerhamomyces*, *Williopsis* e *Zygosaccharomyces* (CHEN et al., 2000; SCHMITT; BREINIG, 2002; SCHNEIDER et al., 2012; TAY; LIM; TAN, 2014).

Estudos relatam sobre a relevância ecológica dessas leveduras produtoras de toxinas *killer*, sendo proposto que as cepas produtoras dessas toxinas apresentam uma vantagem competitiva no habitat natural da levedura, buscando uma disputa por recursos, inibindo, dessa forma, outras leveduras sensíveis (GANTER; STARMER, 1992; LIU et al., 2015). A inibição ocorre por meio da ação sobre receptores específicos da parede celular, presente nos microrganismos afetados (SCHMITT; BREINIG, 2002).

A parede celular de leveduras, fungos e bactérias, é composta por polissacarídeos  $\beta$ -glucanos, sendo um dos principais constituintes o  $\beta$ -1-3 glucano e o  $\beta$ -1-6 glucano (STEWART, 2017). Dessa forma, justifica-se um dos principais mecanismos de ação das micocinas, que é a inibição da síntese da parede por  $\beta$ -1,3-glucano sintetase e a hidrólise do  $\beta$ -1,3-glucano ou  $\beta$ -1,6-glucano, resultando na ruptura da parede celular, assim, o patógeno sofre lise osmótica, e conseqüentemente leva à sua morte (IZGÜ; ALTINBAY; TÜRELI, 2007; LIU et al., 2015; MAGNANI; CASTRO-GÓMEZ, 2008; PENG et al., 2009).

Devido à sua ação efetiva, as leveduras produtoras de toxinas estão atraindo a atenção para serem incorporadas em diversas aplicações. Elas podem ser usadas no biocontrole nas indústrias alimentícias, visando a neutralizar a ação de fungos patogênicos; outros estudos mostraram a sua utilização na indústria farmacêutica, como um agente antimicrobiano para o tratamento de infecções humanas e de animais, além de vários interesses no setor de biotecnologia (COMITINI et al., 2004; DE ULLIVARRI; MENDOZA; RAYA, 2014; MANNAZZU et al., 2019; MUCCILLI; RESTUCCIA, 2015; POLONELLI; MORACE, 1986; SCHMITT; BREINIG, 2002).

A espécie *Wickerhamomyces anomalus* possui algumas cepas que são consideradas leveduras *killer*, sendo atualmente o foco de vários estudos em diferentes áreas, como biocontrole, alimentos e fermentação (BERBEGAL et al., 2018; CALAZANS et al., 2021; CIANI; COMITINI, 2011; HUA et al., 2015; SCHNEIDER et al., 2012). Cepas dessa levedura já foram isoladas em diversos ambientes, como grãos de cereais, frutas, animais e vinhos (CAPPELLI et al., 2014; 2019; CECARINI et al., 2019; COMITINI et al., 2004; MARTINS; VAZ; MARTINS, 2015). O uso dessas toxinas como um agente antibacteriano e antifúngico *in vitro* já foi comprovado em outros estudos (CALAZANS et al., 2021; JUNGES et al., 2020; PARIS et al., 2016).

Cecarini et al. (2019) identificaram uma proteína de alto peso molecular, correspondente a  $\beta$ -glucanases, ao estudar as micocinas de *W. anomalus* produzidas pelo mosquito causador da malária, *Anopheles stephensi*. Segundo Muccilli et al. (2013), o mecanismo antimicrobiano das micocinas se deve à ação de  $\beta$ -glucanases que agem sobre as estruturas presentes na parede celular dos microrganismos, como os  $\beta$ -glucanos; assim, provocam a inibição ou hidrólise desses polímeros, causando a morte do agente patológico (LIU et al., 2015; MUCCILLI et al., 2013).

Epis et al. (2015) realizam um estudo para verificar a capacidade de *W. anomalus* em infectar o ser humano, uma vez que esse microrganismo pode ser isolado de mosquitos hematófagos, como o causador da malária. Com base nos resultados de fungemia, eles classificaram *W. anomalus* como irrelevante nesse tipo de infecção. Sundh e Melin (2011) relataram desconhecer um sistema de classificação (de acordo com a Autoridade Europeia de Segurança Alimentar) de biossegurança em que a classe de risco para *W. anomalus* seja diferente de 1, ou seja, considerado de baixa patogenicidade.

Junges et al. (2020) realizaram o teste de toxicidade com o sobrenadante contendo toxina *killer* de *W. anomalus* em *Artemia salina* Leach, e compararam o resultado com o antibiótico Polimixina B. Após o teste, as micocinas foram classificadas como de baixa toxicidade, já a Polimixina B foi considerada extremamente tóxica. Paris et al. (2016), ao realizarem o teste de hemólise com eritrócitos humanos, compararam a hemólise ocorrida entre as micocinas e o antifúngico Anfotericina B. As micocinas foram consideradas de baixa citotoxicidade, pois não causaram hemólise das células, já o antifúngico causou um elevado grau de hemólise quando testado. Nascimento et al. (2020) não encontraram relatos de resistências causadas com o uso de micocinas como agentes antimicrobianos, enaltecendo mais uma vez a eficácia do tratamento com essas micocinas. Esses estudos demonstram a baixa toxicidade das micocinas com relação aos antifúngicos, e, devido a isso, enaltece-se uma expectativa de aprofundar os estudos para o uso dessas substâncias como agente antimicrobiano eficaz.

## **1.2 *Malassezia pachydermatis***

*Malassezia* é um gênero de leveduras compostas atualmente por 18 espécies que habitam preferencialmente a pele e mucosa de humanos e animais (GEMMER et al., 2002; LORCH et al., 2018; THEELEN et al., 2018; VELEGRAKI et al., 2015). Nos humanos, podem ser isoladas de áreas com grandes quantidades de glândulas sebáceas, como peito, costas e couro cabeludo. Além disso, também estão associadas a doenças cutâneas superficiais, incluindo a dermatite atópica, dermatite seborreica, foliculites e pitiríase versicolor (CABAÑES, 2014; GUPTA, 2004; RIBEIRO DO PRADO et al., 2007).

A infecção por *Malassezia spp.* é dependente da vulnerabilidade de cada indivíduo, pois ela é considerada uma levedura oportunista (FAERGEMANN, 2002). Assim, alguns fatores podem favorecer essa infecção, como deficiências de vitaminas, desnutrição, doenças crônicas e infecciosas, uso prolongado de corticoides e imunodepressão (SCHMIDT, 1997).

São leveduras consideradas lipofílicas, por não sintetizarem ácidos graxos de cadeia longa (SHIFRINE; MARR, 1963), porém, a *M. pachydermatis* é a única espécie

denominada como não lipodependente (BOND, 2010; GUILLOT; BOND, 1999; LORCH et al., 2018).

A fisiopatologia das doenças de pele relacionadas à *Malassezia* spp ainda é pouco conhecida. Devido a isso, não há diretrizes aprovadas internacionalmente para o diagnóstico e tratamento padronizado dessa patologia (HALD et al., 2015). A *M. pachydermatis* é uma levedura lipofílica, não lipodependente, que faz parte do filo *Basidiomycota*, subfilo *Ustilaginomycotina*, classe *Malasseziomycetes*, ordem *Malasseziales*, família *Malasseziaceae* e gênero *Malassezia* (ZEINALI et al., 2014). Suas células têm formato oval e se reproduzem por brotamento (PUIG et al., 2017).

*M. pachydermatis* é uma levedura frequentemente encontrada em animais, podendo ser isolada como microbiota de conduto auditivo e pelos de cães e gatos. Apesar de ser considerada um fungo comensal, nos animais, essas leveduras podem levar à patogenicidade, pois são consideradas microrganismos oportunistas, associando-se a quadros clínicos de otites externas e dermatites. Dessa forma, estão relacionadas a processos de desequilíbrio local, como nas inflamações, atingindo geralmente cães e gatos, sendo assim considerada uma causa de doença veterinária (BOND, 2010; CHEN; HILL, 2005; MORRIS, 1999; PEANO et al., 2020; PETROV et al., 2019). Essas infecções também podem acometer outros animais, porém, os cães são afetados em maior frequência (MORRIS, 2004).

Na identificação de rotina, a levedura *M. pachydermatis* é identificada a partir de suas características macro e microscópicas. Possuem capacidade de crescer em meio Sabouraud dextrose sem suplementação de ácidos graxos, sendo considerado um fator decisivo para a identificação dessa espécie (GUILLOT; BOND, 1999).

Embora o grande interesse e estudo no que se refere a esse microrganismo em acometer os animais, já houve relatos de infecções causadas em humanos. Os casos mais comuns são em neonatos, que geralmente são crianças imunocomprometidas e que possivelmente foram infectados pelas mãos de profissionais de saúde que possuem animais colonizados com *M. pachydermatis* (GAITANIS et al., 2012; ILAHI et al., 2018; TRAGIANNIDIS et al., 2010). Há outro estudo que demonstrou um granuloma facial causado por *M. pachydermatis* em uma mulher, proprietária de cão colonizado por essa levedura (FAN et al., 2006). Morris et al. (2005) demonstraram que é comum a contaminação das mãos de donos de cães com *M. pachydermatis*. Dessa forma, é

necessário reforçar medidas de higiene das mãos por indivíduos que têm contato com cães e gatos, especialmente se tiverem contato próximo com indivíduos imunocomprometidos (BOND et al., 2020).

O tratamento das lesões é geralmente realizado com o uso tópico e oral de antifúngicos, podendo ser associado a antibióticos para impedir a infecção bacteriana (BOND, 2010). Os medicamentos mais utilizados são os compostos azoicos, como cetoconazol, miconazol, clotrimazol, fluconazol e itraconazol (CHEN; HILL, 2005; PEANO et al., 2020). O tratamento com esses antifúngicos geralmente é eficaz para o combate das infecções, porém, em alguns casos, pode ocorrer a falha no tratamento, e a infecção pode se agravar (MORRIS, 2004; ROSSER, 2004). Há relatos de resistência ao tratamento, principalmente após um período prolongado com terapia antifúngica (ANGILERI et al., 2019; KANO et al., 2019).

As leveduras de *M. pachydermatis* causam recorrentes infecções no canal auditivo de cães, podendo tornar o tratamento mais difícil, agravando, assim, os sinais de otite (BRILHANTE et al., 2018). Alguns estudos vêm surgindo na busca de novos alvos terapêuticos no combate a essas infecções causadas por *M. pachydermatis* (CAFARCHIA et al., 2015; SASTOQUE et al., 2020; SIEMIENIUK et al., 2016). Estudos sobre o tratamento da dermatite canina por *Malassezia* relataram uma grande efetividade para o uso tópico de um xampu contendo miconazol e clorexidina (BOND et al., 1995; MAYNARD; RÈME; VIAUD, 2011). Em alguns casos, essa terapia tópica foi ineficaz, sendo necessário o uso de cetoconazol e itraconazol por via oral (BOND et al., 2020).

A disponibilidade dos antifúngicos são reduzidos, e o tratamento de uma micose pode necessitar de uma terapia longa ou de doses elevadas de antifúngicos, além da possibilidade do desenvolvimento da resistência antifúngica. Devido a esses fatores, são necessários o acompanhamento e a busca de novas táticas de tratamento (SIEMIENIUK et al., 2016). A literatura demonstra que o tratamento das infecções correlacionadas a *M. pachydermatis* é mais comumente realizado com derivados azoicos, e essa terapia se mostrou eficiente para melhorar o quadro clínico do animal, porém, essa classe de antifúngicos demonstrou também uma preocupação, devido ao fato de alguns casos de resistência serem documentados (ÁLVAREZ-PÉREZ et al., 2014; CAFARCHIA et al., 2015).

Em cães, a dermatite por *M. pachydermatis* persistente ou recorrente pode estar associada à falha em identificar e corrigir os fatores predisponentes. No entanto, a comprovação de que a baixa suscetibilidade de *M. pachydermatis* aos antifúngicos comumente usados destaca a necessidade de vigilância rigorosa para evitar o surgimento de resistência antifúngica. Dessa forma, métodos de referência utilizados para avaliar a suscetibilidade de *M. pachydermatis* a antifúngicos são necessários para auxiliar o tratamento e o manejo de casos crônicos (GUILLOT; BOND, 2020).

Diferentes cepas de *M. pachydermatis* produzem enzimas hidrolíticas, como as proteinases, hialuronidases, fosfolipases e condroitina sulfatase. Acredita-se que a produção dessas enzimas seja considerada um fator de virulência, e, assim, relacionadas à patogenicidade do microrganismo (COUTINHO, 2005; COUTINHO; PAULA, 2000).

A atividade das proteinases se deve à ação dessas enzimas sobre as proteínas que constituem a membrana celular. As proteinases causam danos na membrana celular, favorecendo a invasão do microrganismo e, conseqüentemente, aumentam a sua patogenicidade (COUTINHO; PAULA, 2000; MUHSIN; AUBAID; AL-DUBOON, 1997). Munro e Hube (2002) afirmaram que o estudo de substâncias inibidoras de proteinases podem ser consideradas como uma maneira de impedir e prevenir infecções causadas por leveduras produtoras dessa enzima.

Considerando a incidência da *M. pachydermatis* em cães, é fundamental realizar o diagnóstico correto, visando ao tratamento de maneira correta e eficiente desses animais acometidos. Porém, os antifúngicos utilizados para o tratamento necessita de uma avaliação criteriosa quanto às dosagens, para que se busque a sua eficácia e se reduza a sua toxicidade, de modo a evitar o surgimento de resistência antifúngica e combater os efeitos colaterais que podem acometer esses animais. O uso de micocinas para tratar infecções por leveduras patogênicas em animais é pouco relatado, por essa razão, este trabalho busca estudar a ação dessas micocinas como um agente antimicrobiano na redução da patogenicidade de *M. pachydermatis*.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar a susceptibilidade das cepas de *Malassezia pachydermatis* isolada do conduto auditivo de cães, com relação às micocinas produzidas por *Wickerhamomyces anomalus*.

### 2.2 Objetivos específicos

- Obter sobrenadante contendo micocinas de *Wickerhamomyces anomalus* (WA40);
- Avaliar a atividade das micocinas presentes no sobrenadante da cultura de *Wickerhamomyces anomalus* (WA40) e a inibição de *Malassezia pachydermatis* em meio sólido;
- Avaliar, pela metodologia de microdiluição em caldo, se as cepas de *Malassezia pachydermatis* são susceptíveis à ação do sobrenadante contendo micocinas *Wickerhamomyces anomalus* (WA40);
- Verificar a viabilidade de cepas de *Malassezia pachydermatis* na presença de corantes vitais;
- Avaliar a produção de proteinases por *Malassezia pachydermatis* e, posteriormente, a inibição de sua atividade por micocinas de *Wickerhamomyces anomalus* (WA40).

## 3. MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Cepas de *Malassezia pachydermatis*

Foram utilizadas 50 cepas de *M. pachydermatis* isoladas de conduto auditivo de cães de diferentes raças, que apresentavam sinais de otite. Essas amostras foram coletadas e armazenadas no Laboratório de Leveduras Patogênicas e Ambientais do Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), com

autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFRRJ sob o protocolo CEUA nº 8030040717. As amostras foram cedidas, transportadas e armazenadas no Laboratório de Micologia do Laboratório de Análises Clínicas, Ensino, Pesquisa e Extensão (LACEPE).

### **3.2 *Wickerhamomyces anomalus***

A levedura de *W. anomalus* (WA40) produtora de micocinas molecularmente identificada (depositada no GenBank número de acesso: KT580794 - Disponível em: [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)) foi coletada do solo, às margens do Lago de Itaipu, na cidade de Foz do Iguaçu, localizado no estado do Paraná, Brasil. Atualmente, essa levedura faz parte da micoteca do laboratório de micologia do Laboratório de Análises Clínicas, Ensino, Pesquisa e Extensão (LACEPE).

### **3.3 Produção de micocinas de *Wickerhamomyces anomalus***

Para a produção das micocinas, a cepa WA40 foi semeada em Ágar Sabouraud Modificado (2% ágar, 1% de peptona, 2% de glicose, 1,92% de ácido cítrico, 3,48% de fosfato de potássio dibásico), pH 4,7 ± 2, incubado a 32 °C por 48 horas. Após 48 horas, essa cepa foi inoculada em garrafas de Roux contendo 200 mL de caldo Sabouraud Modificado (1% de peptona, 2% de glicose, 1,92% de ácido cítrico, 3,48% de fosfato de potássio dibásico), pH 4,7 ± 2, incubado a 25 °C por 5 dias. Em seguida, o caldo foi centrifugado a 6000 rpm/10 minutos, obtendo o sobrenadante, que então foi esterilizado por membrana filtrante 0,22 µm e armazenado a 4 °C.

### **3.4 Determinação da atividade de β-glucanases**

A determinação da atividade de β-glucanases presente no sobrenadante contendo as micocinas de *W. anomalus* WA40 foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Miller (1959), com algumas adaptações, utilizando a laminarina 1% (*Laminaria digitata*), tampão acetato 50 mM, em pH 5,0. Foi preparada uma solução contendo 62,5 µL do sobrenadante com as micocinas de *W. anomalus* WA40 e 125 µL

de laminarina 1%; em seguida, a solução foi incubada a 37 °C durante 10 minutos. Após a incubação, foram retirados 100 µL da solução e adicionados 100 µL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Em seguida, as soluções foram incubadas em água fervente por 5 minutos, e, após esse período, foram adicionados 500 µL de água destilada estéril, e realizada a leitura do produto da reação (açúcar reduzido) em 550 nm. A leitura do branco foi realizada utilizando a mesma solução do teste, porém, sem a adição de laminarina. Ao final, foi definido que uma unidade de enzima (U) foi determinada como a quantidade de proteína necessária para produzir 1 µmol de açúcar redutor por minuto (U/min/mL). Esse teste foi realizado em duplicata. Foi realizada a quantificação de proteínas presentes no sobrenadante de WA40 contendo as micocinas. Para isso, foi utilizada a metodologia de Bradford (1976), empregando a Albumina Bovina como curva padrão, e a equação da reta foi utilizada para o cálculo da concentração total de proteínas em mg/mL. A atividade específica de β-glucanases foi calculada por meio da razão da concentração de atividade enzimática pela concentração de proteínas.

### **3.5 Atividade antimicrobiana em meio sólido**

Foram preparados dois meios de culturas em ágar Sabouraud modificado (peptona bacteriana 1%, glicose 1%, extrato de malte 1%, extrato de levedura 1%, ágar 1,2%) pH 4,7 ± 2, um teste e outro controle. O meio de cultura teste foi constituído de ágar Sabouraud modificado diluído com o sobrenadante contendo micocinas de *W. anomalus* WA40, e o controle é constituído de ágar Sabouraud modificado, sem a adição de micocinas. Ambos os meios, controle e teste, foram vertidos em placa de Petri dividida ao meio, homogeneizados e, após a solidificação, foi semeada uma cepa de *M. pachydermatis* no lado teste e no lado controle; posteriormente, incubou-se a 35 °C por 48 horas. Esse teste foi realizado em duplicata, com 10 cepas diferentes de *M. pachydermatis*.

### **3.6 Atividade antimicrobiana pelo método de microdiluição**

Para os testes de microdiluição, utilizou-se o método M27-A3 - *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008), com algumas modificações, conforme

relatado nos trabalhos de Einchenberg et al. (2018) e Nascente et al. (2003). Utilizaram-se microplacas contendo 96 poços, dispostos em colunas (enumeradas de 1 a 12) e linhas (com letras alfabéticas, de A a H). As suspensões de células de *M. pachydermatis* foram ajustadas a  $10^6$  UFC/mL em espectrofotômetro no comprimento de onda de 530 nm com leitura de absorbância que variava de 0,420 a 0,430 (PIETSCHMANN et al., 2009). Essas suspensões foram preparadas em 5 mL de caldo Sabouraud 1% e distribuídas (100  $\mu$ L) nas colunas. Cada coluna correspondeu a uma cepa teste de *M. pachydermatis*. O sobrenadante contendo micocinas foi diluído em água destilada, obtendo as seguintes concentrações de  $\beta$ -glucanases: 0,8; 0,4; 0,2; 0,1; 0,05 e 0,02 U/mg. Em seguida, 100  $\mu$ L de cada diluição foi adicionada nos respectivos poços adicionados na linha A a F. Nas linhas G e H, foram realizados os controles, positivo (contendo caldo Sabouraud 1% e *M. pachydermatis*) e negativo (contendo somente caldo Sabouraud 1% estéril e sobrenadante de micocinas), respectivamente. Após o término do procedimento, a placa foi lacrada e incubada a 35 °C por 48 horas. A leitura foi realizada visualmente na placa, observando a menor concentração de  $\beta$ -glucanases que foi capaz de inibir o crescimento de *M. pachydermatis*, sendo esta tomada como a concentração inibitória mínima. Para a confirmação da inibição, foram retirados 10  $\mu$ L da última diluição em que não houve o crescimento de *M. pachydermatis* e semeados em ágar Sabouraud. O teste foi realizado com 50 cepas de *M. pachydermatis* e em duplicata.

### 3.7 Teste de viabilidade

O teste foi realizado segundo a metodologia de Calich et al. (1979). Foram utilizados 1000  $\mu$ L do sobrenadante contendo micocinas de *W. anomalus*, e adicionados 1000  $\mu$ L de uma suspensão de *M. pachydermatis*, em caldo Sabouraud, contendo  $10^6$  UFC/mL. A mistura dessa suspensão foi encubada a 37 °C, e a leitura foi realizada nos seguintes tempos: 0, 30, 60, 120, 240, 360 e 480 minutos. O controle foi realizado utilizando água destilada no lugar de micocinas. Após cada período de incubação, alíquotas de 30  $\mu$ L foram retiradas da suspensão e adicionados 30  $\mu$ L de uma solução de diacetato de fluoresceína (0,005%) e de brometo de etídio (0,005%). Essa mistura foi incubada por 15 minutos a 25 °C, e, em seguida, foi adicionada uma gota sobre lâmina e coberta com lamínula, e a leitura foi realizada utilizando um microscópio de

imunofluorescência. Em seguida, 100 células foram contadas, diferenciando a porcentagem de células vivas (verde) e células mortas (vermelhas). O teste foi realizado em duplicata.

### 3.8 Pesquisa de proteinases e inibição de proteinases por micocinas

Na pesquisa da produção das enzimas proteinases, foram utilizadas 50 cepas de *M. pachyermatis*, por meio da técnica descrita por Price et al. (1982). O meio de cultura utilizado para a pesquisa de proteinases foi constituído por um meio base contendo ágar 1,8%, previamente esterilizado por autoclavagem, e outro meio de cultura contendo albumina (albumina bovina fração V 2% e Yeast Carbon Base 1,17%). Esse meio foi previamente esterilizado por filtração em membrana 0,22 µm; em seguida, os meios de cultura foram misturados e distribuídos em placa de Petri. Após a solidificação, cepas de *M. pachydermatis* foram semeadas em pontos equidistantes no meio de cultura e incubadas por 6 dias, com leitura diária da atividade enzimática (Pz). A presença da enzima foi observada pela formação do halo translúcido de degradação da albumina presente no meio de cultura, ao redor da colônia da levedura. A leitura do Pz foi realizada utilizando a razão entre o diâmetro da colônia (dc) e o diâmetro da colônia, somado à zona de degradação (ddc), sendo, assim,  $Pz = dc/ddc$ . Os resultados obtidos foram classificados em três índices: índice 1 ( $Pz=1$ ) amostras sem atividade enzimática; índice 2 ( $0,64 \leq Pz < 1$ ) amostras positivas para atividade enzimática; índice 3 ( $Pz < 0,64$ ) amostras fortemente positivas para atividade enzimática. As cepas com produção fortemente positivas para proteinases (índice 3) foram testadas quanto à inibição de sua atividade. Sendo assim, uma concentração subinibitória (0,1 U/mg) de β-glucanases presente no sobrenadante de WA40 foi adicionada ao meio base ágar, juntamente com o meio de cultura contendo albumina. Em seguida, as placas foram homogeneizadas e, após sua solidificação, as leveduras de *M. pachydermatis* foram semeadas em pontos equidistantes. As placas foram incubadas a 32 °C, por um período de 6 dias, com leitura diária do Pz. Foi considerado teste positivo, ou seja, inibição da atividade enzimática, quando não houve a formação do halo de degradação da albumina.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Determinação da atividade de $\beta$ -glucanases

A parede celular dos microrganismos é constituída por polissacarídeos, como os  $\beta$ -glucanos. As  $\beta$ -glucanases podem ativar um sistema de lise celular, degradando a parede do microrganismo, causando a sua morte (BIELECKI; GALAS, 1991). Um estudo de Tay et al. (2014) confirmou a presença de  $\beta$ -glucanases em micocinas produzidas por *W. anomalus*, por isso, a determinação da sua atividade confere na sua capacidade em destruir as células de microrganismos patogênicos.

Neste estudo, foi encontrada, no sobrenadante de cultura de *W. anomalus*, a atividade específica de 0,8 U/mg de  $\beta$ -glucanases. Lima et al. (2013) obtiveram, com o mesmo estudo, a quantidade de 0,071 U/mg. Calazans et al. (2021) relataram 0,40 U/mg de atividade específica em micocinas produzidas por *W. anomalus*. A diferença na produção de  $\beta$ -glucanases pode estar relacionada a algumas variações do meio de cultura, temperatura e pH.

### 4.2 Atividade antimicrobiana em meio sólido

O teste do meio sólido foi realizado para avaliar a atividade antifúngica das micocinas produzidas por *W. anomalus*. No lado controle, foram semeadas cepas da levedura *M. pachydermatis* no meio de cultura sem a adição de micocinas, havendo, dessa forma, o crescimento da levedura (lado A); no lado teste (lado B), houve a adição do sobrenadante contendo micocinas de WA40 (concentração de 0,6 U/mg de  $\beta$ -glucanases) no meio de cultura, verificando, dessa forma, a inibição total de *M. pachydermatis* (Figura 1).



Figura 1 Atividade antimicrobiana de micocinas em meio sólido. Lado controle (a), crescimento de *Malassezia pachydermatis* em meio de cultura ágar Sabouraud modificado. Lado teste (b), sem crescimento de *Malassezia pachydermatis* em meio de cultura com adição de micocinas.

A realização do teste de atividade antimicrobiana em meio sólido é um método bastante efetivo, pois oferece uma leitura visual da ação das micocinas sobre o microrganismo testado, como demonstrado no trabalho de Junges et al. (2020), que verificaram a inibição total de cepas multirresistentes de *Acinetobacter baumannii* isoladas de amostras biológicas humanas, e na pesquisa de Calazans et al. (2021), em que demonstraram a inibição de cepas de *Staphylococcus aureus* isolados de carnes. Ambos os resultados foram devidos à presença de micocinas de *W. anomalus* no meio de cultura. Neste estudo, todas as cepas testadas apresentaram inibição no crescimento, quando inoculadas no meio de cultura contendo 0,6 U/mg de  $\beta$ -glucanases.

#### 4.3 Atividade antimicrobiana pelo método de microdiluição

O teste de microdiluição foi realizado para determinar a concentração inibitória mínima de  $\beta$ -glucanases presente no sobrenadante de *W. anomalus* WA40, que é capaz de impedir o crescimento de *M. pachydermatis*. A Figura 2 demonstra a inibição quando usada a concentração de 0,8 U/mg de  $\beta$ -glucanases. Dessa forma, foi considerada a concentração inibitória mínima para essa cepa testada, a diluição referente a 0,8 U/mg de  $\beta$ -glucanases.



Figura 2 Leitura da placa do teste de microdiluição mostrando a precipitação fúngica em que ocorreu o crescimento da *Malassezia pachydermatis* e no CT+ (Controle Positivo), e a inibição do crescimento no poço com adição de concentração de 0,8 U/mg de β-glucanases e no CT- (Controle Negativo).

Os resultados mostraram que as micocinas presentes no sobrenadante de WA40 na concentração 0,8 U/mg de β-glucanases foram capazes de inibir em 100% (50/50) as cepas de *M. pachydermatis*. Ao utilizar a concentração 0,4 U/mg, 54% (27/50) das cepas apresentaram sensibilidade; já na concentração 0,2 U/mg, apenas 16% (8/50) das cepas foram suscetíveis ao sobrenadante de *W. anomalus* WA40. Nas demais concentrações, não houve inibição das cepas (Figura 3).

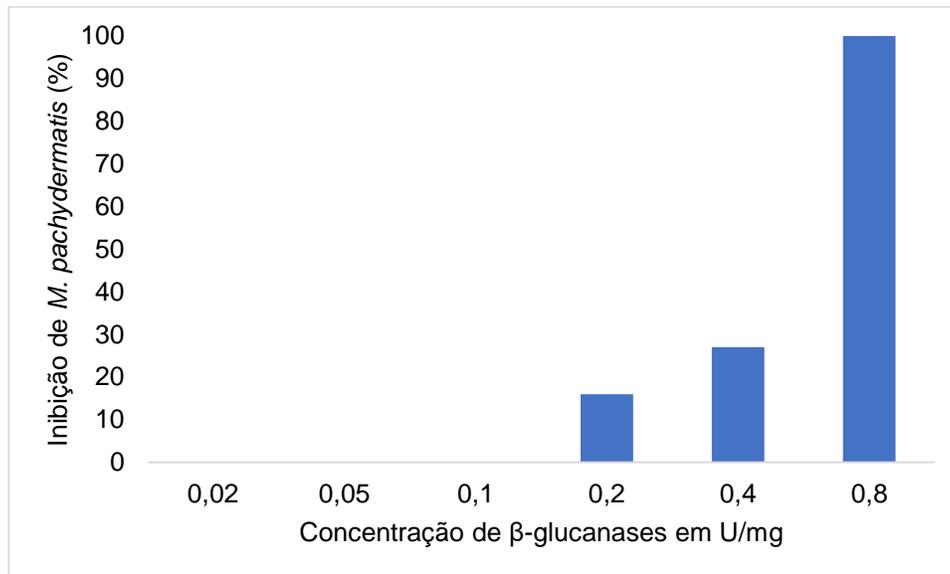


Figura 3 Teste de susceptibilidade de *Malassezia pachydermatis* frente às micocinas de *Wickerhamomyces anomalus* presentes no sobrenadante de WA40, em diferentes concentrações de β-glucanases.

Einchenberg et al. (2018) consideraram o teste de microdiluição como de baixo custo e fácil execução, ao testar a susceptibilidade de antifúngicos azoicos em cepas de *M. pachydermatis*. Silva et al. (2019) relataram que, em 90% dos trabalhos revisados

sobre testes de susceptibilidade de *Malassezia spp.* aos antifúngicos, os testes de microdiluição demonstraram grande eficácia, sendo, portanto, uma metodologia aplicável a *M. pachydermatis*. Paris et al. (2016) relataram que as micocinas apresentaram atividade antifúngica, por meio do teste em microdiluição em caldo, quando testadas sobre leveduras de *Candida albicans*. Neste estudo, por meio do teste de microdiluição em caldo, foi verificado que todas as cepas de *M. pachydermatis* foram inibidas pelas  $\beta$ -glucanases presentes no sobrenadante do cultivo de *W. anomalous*.

#### 4.4 Teste de viabilidade

O teste de viabilidade é classificado por diversos autores como simples, sensível e rápido, além de possuir uma alta reprodutividade (CALICH; PURCHIO; PAULA, 1979; CORREA et al., 1986; GANDRA et al., 2002). O brometo de etídeo é um reagente que penetra rapidamente nas células dos microrganismos mortos, conferindo, assim, a coloração vermelha (EDIDIN, 1970). Já o diacetato de fluoresceína tem a afinidade por células vivas, devido à capacidade dessas células de absorver a fluoresceína intracelular (ROTMAN; PAPERMASTER, 1966). A Figura 4 demonstra as cepas inviáveis de *M. pachydermatis* que foram coradas em vermelho. Já as cepas viáveis foram coradas em verde.

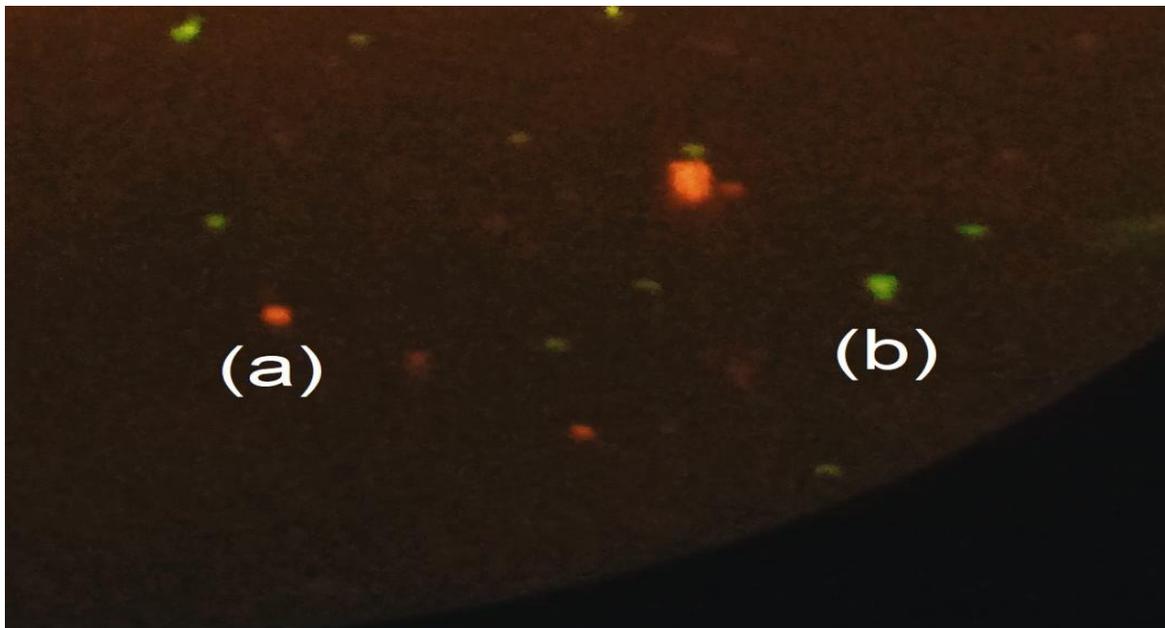


Figura 4 Teste de viabilidade com brometo de etídeo e diacetato de fluoresceína. Células de *M. pachydermatis* inviáveis em vermelho (a) e células viáveis em verde (b).

Os resultados mostraram que as micocinas levaram 8 horas para inviabilizar todas as células de *M. pachydermatis* (Figura 5). Paris et al. (2016) demonstraram que, para as micocinas inviabilizarem todas as células de *C. albicans*, foram necessárias 12 horas de contato.

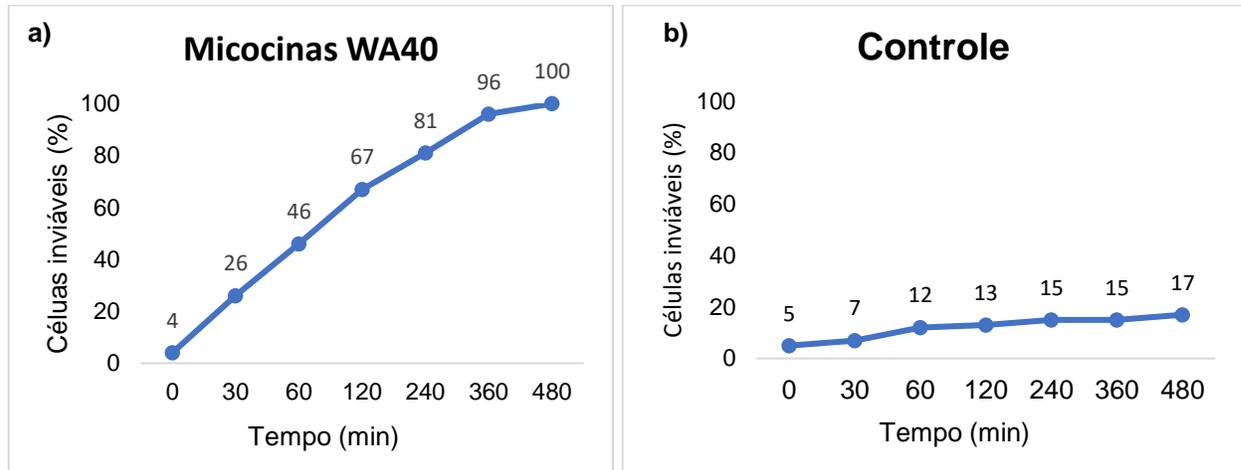


Figura 5 Teste de viabilidade de *M. pachydermatis*. a) Sobre a ação do sobrenadante de micocinas WA40. b) Viabilidade de cepas de *M. pachydermatis* realizada como controle, com a adição de água destilada ao invés de micocinas.

#### 4.5 Pesquisa de proteinases e inibição de proteinases por micocinas

Foram selecionadas 50 cepas de *M. pachydermatis* para a realização desse teste. Os resultados demonstram a formação de um halo translúcido representando positividade para a produção de proteinases, e a ausência do halo descreve as cepas sem atividade. Em relação à produção de proteinases, foi verificado que 44% (22/50) das cepas apresentaram atividade fortemente positiva para a produção da enzima, apresentando o índice 3. O índice 2 correspondeu a 20% (10/50) das cepas, ou seja, que possuem atividade moderadamente positiva, enquanto 18% (36/50) foram classificadas como índice 1, assim dizendo, sem atividade enzimática.

Todas as 22 cepas de *M. pachydermatis* que apresentaram atividade fortemente positiva para proteinases, ou seja, apresentaram o índice 3, tiveram sua atividade enzimática reduzida ao índice 1 (sem atividade), quando foram semeadas em meio de

cultura para pesquisa de proteinases, com a adição de uma concentração subinibitória (0,1 U/mg de  $\beta$ -glucanases) do sobrenadante de cultura de *W. anomalus*.

A Figura 6 representa o padrão de produção de proteinases sem a adição de micocinas (a), e com a adição de micocinas (b) no meio de cultura.

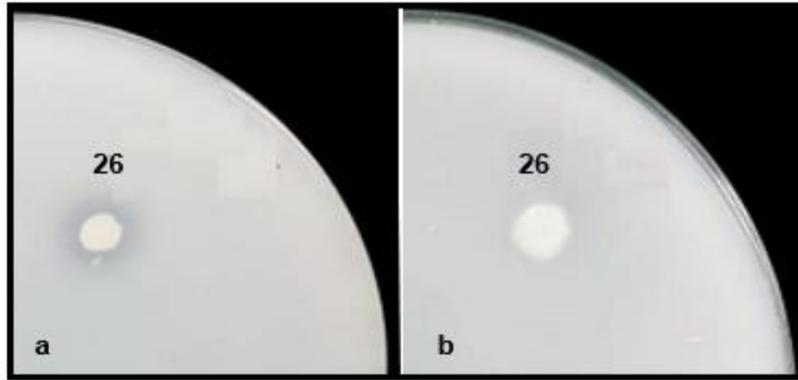


Figura 6 Produção das enzimas proteinases em meio de cultura contendo albumina bovina. a) Produção de proteinases ao redor da colônia de *Malassezia pachydermatis*. b) Inibição das proteinases após a adição de 0,1 U/mg de  $\beta$ -glucanase, sem a formação de halo ao redor da colônia.

Nos estudos de Coutinho e Paula (2000) e Coutinho (2005), todas as cepas de *M. pachydermatis* analisadas foram fortemente produtoras de proteinases. Ao estudar a atividade de proteinases com relação ao pH, Ortiz et al. (2013) demonstraram maior produção de proteinases por *M. pachydermatis* em pH elevado, sendo uma alternativa na redução dessas enzimas o uso de substâncias com o pH baixo. Poucos estudos são realizados, de forma direta, procurando associar a patogenicidade de *M. pachydermatis* com a produção de proteinases. Por outro lado, a virulência de cepas de *Candida albicans* já foi relacionada à atividade dessas enzimas (CASSONE et al., 1987; MACDONALD; ODDS, 1983). Para a inibição das proteinases produzidas por *C. albicans*, alguns estudos relacionaram o uso de antirretrovirais, como saquinavir, ritonavir e indinavir, uma vez que esses medicamentos são inibidores de proteinases, e, dessa forma, ao reduzir a atividade de proteinases, eles diminuem a patogenicidade causada por essa levedura (ASENCIO et al., 2005; LI et al., 2000). A importância de reduzir as infecções causadas por *C. albicans* se deve ao fato de essa levedura ser considerada oportunista e causar inúmeras infecções em pacientes imunocomprometidos, como os portadores do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) (CASOLARI et al., 2004).

Neste estudo, foi observado que 44% das cepas testadas foram fortemente produtoras de proteinases, e, posteriormente, todas essas cepas apresentaram inibição dessa enzima, ao testá-la no meio de cultura com adição da concentração subinibitória de 0,1 U/mg de  $\beta$ -glucanases. Dessa forma, o uso de substâncias que promovam a inibição das proteinases pode reduzir o seu potencial de virulência e ser uma alternativa terapêutica para microrganismos produtores dessa enzima (ASENCIO et al., 2005; MUNRO; HUBE, 2002). Sendo assim, reforçamos o papel das micocinas como uma alternativa na redução da patogenicidade causada por *M. pachydermatis*.

## 5. CONCLUSÃO

Concluimos que as cepas de *M. pachydermatis* foram susceptíveis à ação das micocinas produzidas por *W. anomalous* (WA40), e isso pode ser atrelado por meio de diferentes concentrações de  $\beta$ -glucanases. Assim, podemos afirmar que essas micocinas possuem um potencial farmacológico, podendo futuramente ser utilizadas em formulações para o tratamento de infecções.

## 6. REFERÊNCIAS

ÁLVAREZ-PÉREZ, Sergio; BLANCO, José L.; PELÁEZ, Teresa; CUTULI, Maite; GARCÍA, Marta E. In Vitro Amphotericin B Susceptibility of *Malassezia pachydermatis* Determined by the CLSI Broth Microdilution Method and Etest Using Lipid-Enriched Media. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. l.], v. 58, n. 7, p. 4203–4206, 2014. DOI: 10.1128/AAC.00091-14. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.00091-14>.

ANGILERI, Martina; PASQUETTI, Mario; DE LUCIA, Michela; PEANO, Andrea. Azole resistance of *Malassezia pachydermatis* causing treatment failure in a dog. **Medical Mycology Case Reports**, [S. l.], v. 23, p. 58–61, 2019. DOI: 10.1016/j.mmcr.2018.12.004. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211753918301441>.

ASENCIO, M. A.; GARDUÑO, E.; PÉREZ-GIRALDO, C.; BLANCO, M. T.; HURTADO, C.; GÓMEZ-GARCÍA, A. C. Exposure to Therapeutic Concentrations of Ritonavir, but Not Saquinavir, Reduces Secreted Aspartyl Proteinase of *Candida parapsilosis*. **Chemotherapy**, [S. l.], v. 51, n. 5, p. 252–255, 2005. DOI: 10.1159/000087252. Disponível em: <https://www.karger.com/Article/FullText/87252>.

BERBEGAL, Carmen; SPANO, Giuseppe; FRAGASSO, Mariagiovanna; GRIECO, Francesco; RUSSO, Pasquale; CAPOZZI, Vittorio. Starter cultures as biocontrol strategy to prevent *Brettanomyces bruxellensis* proliferation in wine. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 102, n. 2, p. 569–576, 2018. DOI: 10.1007/s00253-017-8666-x. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-017-8666-x>.

BEVAN, E. A.; MAKOWER, M. The physiological basis of the killer character in yeast. **Proceedings of the 11th International Congress on Genetics**, [S. l.], v. 1, p. 202–203, 1963.

BIELECKI, Stanislaw; GALAS, Edward. Microbial  $\beta$ -Glucanases Different from Cellulases. **Critical Reviews in Biotechnology**, [S. l.], v. 10, n. 4, p. 275–304, 1991. DOI: 10.3109/07388559109038212. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/07388559109038212>.

BOND, R.; ROSE, J. F.; ELLIS, J. W.; LLOYD, D. H. Comparison of two shampoos for treatment of *Malassezia pachydermatis*-associated seborrhoeic dermatitis in basset hounds. **Journal of Small Animal Practice**, [S. l.], v. 36, n. 3, p. 99–104, 1995. DOI: 10.1111/j.1748-5827.1995.tb02840.x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1748-5827.1995.tb02840.x>.

BOND, Ross. Superficial veterinary mycoses. **Clinics in Dermatology**, [S. l.], v. 28, n. 2, p. 226–236, 2010. DOI: 10.1016/j.clindermatol.2009.12.012. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0738081X09002545>.

BOND, Ross; MORRIS, Daniel O.; GUILLOT, Jacques; BENSIGNOR, Emmanuel J.;

ROBSON, David; MASON, Kenneth V.; KANO, Rui; HILL, Peter B. Biology, diagnosis and treatment of *Malassezia dermatitis* in dogs and cats. **Veterinary Dermatology**, [S. l.], v. 31, n. 1, p. 73–77, 2020. DOI: 10.1111/vde.12834. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/vde.12834>.

BOYNTON, Primrose J. The ecology of killer yeasts: Interference competition in natural habitats. **Yeast**, [S. l.], v. 36, n. 8, p. 473–485, 2019. DOI: 10.1002/yea.3398. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/yea.3398>.

BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, [S. l.], v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0003269776905273>.

BRILHANTE, R. S. N.; ROCHA, M. G.; GUEDES, G. M. M.; OLIVEIRA, J. S.; ARAUJO, G. S.; ESPANA, J. D. A.; SALES, J. A.; AGUIAR, L.; PAIVA, M. A. N.; CORDEIRO, R. A. C.; PEREIRA-NETO, W. A.; PINHEIRO, A. Q.; SIDRIM, J. C.; CATELO-BRANCO, D. S. C. M.; ROCHA, M. F. G. *Malassezia pachydermatis* from animals: Planktonic and biofilm antifungal susceptibility and its virulence arsenal. **Veterinary Microbiology**, [S. l.], v. 220, p. 47–52, 2018. DOI: 10.1016/j.vetmic.2018.05.003. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378113517312920>.

CABAÑES, F. Javier. *Malassezia* Yeasts: How Many Species Infect Humans and Animals? **PLoS Pathogens**, [S. l.], v. 10, n. 2, p. e1003892, 2014. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003892. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1003892>.

CAFARCHIA, Claudia; IATTA, Roberta; IMMEDIATO, Davide; PUTTILLI, Maria Rita; OTRANTO, Domenico. Azole susceptibility of *Malassezia pachydermatis* and *Malassezia furfur* and tentative epidemiological cut-off values. **Medical Mycology**, [S. l.], v. 53, n. 7, p. 743–748, 2015. DOI: 10.1093/mmy/myv049. Disponível em: <https://academic.oup.com/mmy/article-lookup/doi/10.1093/mmy/myv049>.

CALAZANS, G. F.; SILVA, J. C.; DELABENETA, M. F.; PARIS, A. P.; YASSUDA FILHO, P.; AULER, M. E.; MENOLLI, R. A.; PAULA, C. R.; SIMAO, R. C. G.; GANDRA, R. F. Antimicrobial activity of *Wickerhamomyces anomalus* mycocins against strains of *Staphylococcus aureus* isolated from meats. **Food Science and Technology**, [S. l.], v. 41, n. 2, p. 388–394, 2021. DOI: 10.1590/fst.39319. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0101-20612021000200388&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612021000200388&tlng=en).

CALICH, Vera Lucia G.; PURCHIO, Adhemar; PAULA, Claudete R. A new fluorescent viability test for fungi cells. **Mycopathologia**, [S. l.], v. 66, n. 3, p. 175–177, 1979. DOI: 10.1007/BF00683967. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/BF00683967>.

CAPPELLI, A.; ULISSI, U.; VALZANO, M.; DAMIANI, C.; EPIS, S.; GABRIELLI, M. G.; CONTI, S.; POLONELLI, L.; BANDI, C.; FAVIA, G.; RICCI, I. A *Wickerhamomyces*

*anomalus* killer strain in the malaria vector *Anopheles stephensi*. **PloS one**, [S. l.], v. 9, n. 5, p. e95988, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0095988. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24788884>.

CAPPELLI, Alessia; VALZANO, Matteo; CECARINI, Valentina; BOZIC, Jovana; ROSSI, Paolo; MENSAH, Priscilla; AMANTINI, Consuelo; FAVIA, Guido; RICCI, Irene. Killer yeasts exert anti-plasmodial activities against the malaria parasite *Plasmodium berghei* in the vector mosquito *Anopheles stephensi* and in mice. **Parasites & Vectors**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 329, 2019. DOI: 10.1186/s13071-019-3587-4. Disponível em: <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-019-3587-4>.

CASOLARI, C.; ROSSI, T.; BAGGIO, G.; COPPI, A.; ZANDOMENEHI, G.; RUBERTO, A. I.; FARINA, C.; FABIO, G.; ZANCA, A.; CASTELLI, M. Interaction between saquinavir and antimycotic drugs on *Candida albicans* and *Candida neoformans* strains. **Pharmacological Research**, [S. l.], v. 50, n. 6, p. 605–610, 2004. DOI: 10.1016/j.phrs.2004.06.008. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043661804001732>.

CASSONE, A.; BERNARDIS, F. D.; MONDELLO, F.; CEDDIA, T.; AGATENSI, L. Evidence for a Correlation Between Proteinase Secretion and Vulvovaginal Candidosis. **Journal of Infectious Diseases**, [S. l.], v. 156, n. 5, p. 777–783, 1987. DOI: 10.1093/infdis/156.5.777. Disponível em: <https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1093/infdis/156.5.777>.

CECARINI, V.; CUCCIOLONI, M.; BONFILI, L.; RICCIUTELLI, M.; VALZANO, M.; CAPPELLI, A.; AMANTINI, C.; FAVIA, G.; ELEUTERI, A. M.; ANGELETTI, M.; RICCI, I. Identification of a Killer Toxin from *Wickerhamomyces anomalus* with  $\beta$ -Glucanase Activity. **Toxins**, [S. l.], v. 11, n. 10, p. 568, 2019. DOI: 10.3390/toxins11100568. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6651/11/10/568>.

CHEN, TAI-AN; HILL, PETER B. The biology of *Malassezia* organisms and their ability to induce immune responses and skin disease. **Veterinary Dermatology**, [S. l.], v. 16, n. 1, p. 4–26, 2005. DOI: 10.1111/j.1365-3164.2005.00424.x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-3164.2005.00424.x>.

CHEN, Yinhuai; BAKER, Richard E.; KEITH, Kevin C.; HARRIS, Kendra; STOLER, Sam; FITZGERALD-HAYES, Molly. The N Terminus of the Centromere H3-Like Protein Cse4p Performs an Essential Function Distinct from That of the Histone Fold Domain. **Molecular and Cellular Biology**, [S. l.], v. 20, n. 18, p. 7037–7048, 2000. DOI: 10.1128/MCB.20.18.7037-7048.2000. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/MCB.20.18.7037-7048.2000>.

CIANI, Maurizio; COMITINI, Francesca. Non-*Saccharomyces* wine yeasts have a promising role in biotechnological approaches to winemaking. **Annals of Microbiology**, [S. l.], v. 61, n. 1, p. 25–32, 2011. DOI: 10.1007/s13213-010-0069-5. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s13213-010-0069-5>.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution

Antifungal Susceptibility Testing of Yeast; Approves Standard - Third Edition. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, [S. l.], v. 28, 2008.

COMITINI, Francesca; INGENIIS DE, Jessica; PEPE, Laura; MANNAZZU, Ilaria; CIANI, Maurizio. *Pichia anomala* and *Kluyveromyces wickerhamii* killer toxins as new tools against *Dekkera/Brettanomyces* spoilage yeasts. **FEMS Microbiology Letters**, [S. l.], v. 238, n. 1, p. 235–240, 2004. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2004.tb09761.x. Disponível em: <https://academic.oup.com/femsle/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6968.2004.tb09761.x>.

CORREA, B.; PURCHIO, A.; PAULA, C. R.; GAMBALE, W. Evaluation of a fluorescent method (fluorescein diacetate and ethidium bromide solution) in the study of the viability *Cryptococcus neoformans* strains. **Mycopathologia**, [S. l.], v. 96, n. 2, p. 91–96, 1986. DOI: 10.1007/BF00436666. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/BF00436666>.

COUTINHO, S. D. A. *Malassezia pachydermatis*: enzymes production in isolates from external ear canal of dogs with and without otitis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, [S. l.], v. 57, n. suppl 2, p. 149–153, 2005. DOI: 10.1590/S0102-09352005000800003. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-09352005000800003&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352005000800003&lng=en&tlng=en).

COUTINHO, S. D.; PAULA, C. R. Proteinase, phospholipase, hyaluronidase and chondroitin-sulphatase production by *Malassezia pachydermatis*. **Medical Mycology**, [S. l.], v. 38, n. 1, p. 73–76, 2000. DOI: 10.1080/mmy.38.1.73.76. Disponível em: <https://academic.oup.com/mmy/article-lookup/doi/10.1080/mmy.38.1.73.76>.

DE ULLIVARRI, Miguel Fernández; MENDOZA, Lucía M.; RAYA, Raúl R. Killer activity of *Saccharomyces cerevisiae* strains: partial characterization and strategies to improve the biocontrol efficacy in winemaking. **Antonie van Leeuwenhoek**, [S. l.], v. 106, n. 5, p. 865–878, 2014. DOI: 10.1007/s10482-014-0256-7. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s10482-014-0256-7>.

EDIDIN, M. A rapid, quantitative fluorescence assay for cell damage by cytotoxic antibodies. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, [S. l.], v. 104, n. 5, p. 1303–6, 1970. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5444341>.

EINCHENBERG, Maria Lúcia; APPEL, Carin Elisabete; BERG, Vanessa; MUSCHNER, Adriana Cunha; NOBRE, Márcia de Oliveira; MATTA, Daniel Da; ALVES, Sydney Hartz; FERREIRO, Laerte. Susceptibility of *Malassezia pachydermatis* to azole antifungal agents evaluated by a new broth microdilution method. **Acta Scientiae Veterinariae**, [S. l.], v. 31, n. 2, p. 75, 2018. DOI: 10.22456/1679-9216.17072. Disponível em: <https://seer.ufrgs.br/ActaScientiaeVeterinariae/article/view/17072>.

EPIS, S.; CAPONE, A.; MARTIN, E.; PAOLUCCI, M.; BAZZOCCHI, C.; VALZANO, M.; BOZIC, J.; NOVATI, S.; FAVIA, G; RICCI, I. A rapid qPCR method to investigate the circulation of the yeast *Wickerhamomyces anomalus* in humans. **The new**

**microbiologica**, [S. l.], v. 38, n. 4, p. 577–81, 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26485017>.

FAERGEMANN, Jan. Atopic Dermatitis and Fungi. **Clinical Microbiology Reviews**, [S. l.], v. 15, n. 4, p. 545–563, 2002. DOI: 10.1128/CMR.15.4.545-563.2002. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/CMR.15.4.545-563.2002>.

FAN, Yi-Ming; HUANG, Wen-Ming; LI, Shun-Fan; WU, Guo-Feng; LAI, Kuan; CHEN, Rong-Yi. Granulomatous Skin Infection Caused by *Malassezia pachydermatis* in a Dog Owner. **Archives of Dermatology**, [S. l.], v. 142, n. 9, 2006. DOI: 10.1001/archderm.142.9.1181. Disponível em: <http://archderm.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/archderm.142.9.1181>.

GAITANIS, Georgios; MAGIATIS, Prokopios; HANTSCHKE, Markus; BASSUKAS, Ioannis D.; VELEGRAKI, Aristeia. The *Malassezia* Genus in Skin and Systemic Diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, [S. l.], v. 25, n. 1, p. 106–141, 2012. DOI: 10.1128/CMR.00021-11. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/CMR.00021-11>.

GANDRA, R. F.; MELO, T. A.; MATSUMOTO, F. E.; PIRES, M. F. C.; CROCE, J.; GAMBALE, W.; PAULA, C. R. Allergenic evaluation of *Malassezia furfur* crude extracts. **Mycopathologia**, [S. l.], v. 155, n. 4, p. 183–9, 2002. DOI: 10.1023/a:1021181711225. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12650593>.

GANTER, Philip F.; STARMER, William T. Killer Factor as a Mechanism of Interference Competition in Yeasts Associated with Cacti. **Ecology**, [S. l.], v. 73, n. 1, p. 54–67, 1992. DOI: 10.2307/1938720. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.2307/1938720>.

GEMMER, Christina M.; DEANGELIS, Yvonne M.; THEELEN, Bart; BOEKHOUT, Teun; DAWSON, Thomas L. Fast, Noninvasive Method for Molecular Detection and Differentiation of *Malassezia* Yeast Species on Human Skin and Application of the Method to Dandruff Microbiology. **Journal of Clinical Microbiology**, [S. l.], v. 40, n. 9, p. 3350–3357, 2002. DOI: 10.1128/JCM.40.9.3350-3357.2002. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JCM.40.9.3350-3357.2002>.

GUILLOT, J.; BOND, R. *Malassezia pachydermatis*: a review. **Medical Mycology**, [S. l.], v. 37, n. 5, p. 295–306, 1999. DOI: 10.1046/j.1365-280X.1999.00237.x. Disponível em: <https://academic.oup.com/mmy/article-lookup/doi/10.1046/j.1365-280X.1999.00237.x>.

GUILLOT, Jacques; BOND, Ross. *Malassezia* Yeasts in Veterinary Dermatology: An Updated Overview. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [S. l.], v. 10, 2020. DOI: 10.3389/fcimb.2020.00079. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2020.00079/full>.

GUPTA, Aditya K. Molecular identification of *Malassezia* species by amplified fragment length polymorphism (AFLP) and sequence analyses of the internal transcribed spacer (ITS) and large subunit (LSU) regions of ribosomal DNA. **Journal of the American Academy of Dermatology**, [S. l.], v. 50, n. 3, p. P106, 2004. DOI:

10.1016/j.jaad.2003.10.351. Disponível em:  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S019096220303754X>.

HALD, M.; ARENDRUP, M.; SVEJGAARD, E.; LINDSKOV, R.; FOGED, E.; SAUNTE, D. Evidence-based Danish Guidelines for the Treatment of *Malassezia*-related Skin Diseases. **Acta Dermato Venereologica**, [S. l.], v. 95, n. 1, p. 12–19, 2015. DOI: 10.2340/00015555-1825. Disponível em:  
<http://www.medicaljournals.se/acta/content/?doi=10.2340/00015555-1825>.

HUA, Sui Sheng T.; HERNLEM, Bradley J.; YOKOYAMA, Wallace; SARREAL, Siov Bouy L. Intracellular trehalose and sorbitol synergistically promoting cell viability of a biocontrol yeast, *Pichia anomala*, for aflatoxin reduction. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 31, n. 5, p. 729–734, 2015. DOI: 10.1007/s11274-015-1824-3. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s11274-015-1824-3>.

ILAHI, Amin; HADRICH, Inès; GOUDJIL, Sabrina; KONGOLO, Guy; CHAZAL, Christèle; LÉKÉ, André; AYADI, Ali; CHOUAKI, Taieb; RANQUE, Stéphane. Molecular epidemiology of a *Malassezia pachydermatis* neonatal unit outbreak. **Medical mycology**, [S. l.], v. 56, n. 1, p. 69–77, 2018. DOI: 10.1093/mmy/myx022. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28371911>.

IZGÜ, Fatih; ALTINBAY, Demet; TÜRELI, Akif Emre. In vitro activity of panomycocin, a novel exo-beta-1,3-glucanase isolated from *Pichia anomala* NCYC 434, against dermatophytes. **Mycoses**, [S. l.], v. 50, n. 1, p. 31–4, 2007. DOI: 10.1111/j.1439-0507.2006.01303.x. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17302745>.

JUNGES, Daniele S. B.; DELABENETA, M. F.; ROSSETO, L. R. B.; NASCIMENTO, B. L.; PARIS, A. P.; PERSEL, C.; LOTH, E. A.; SIMAO, R. C. G.; MENOLLI, R. A.; PAULA, C. R.; GANDRA, R. F. Antibiotic Activity of *Wickerhamomyces anomalus* Mycocins on Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. **Microbial Ecology**, [S. l.], 2020. DOI: 10.1007/s00248-020-01495-9. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00248-020-01495-9>.

KANO, Rui; YOKOI, Shinichi; KARIYA, Naoki; OSHIMO, Karin; KAMATA, Hiroshi. Multi-azole-resistant strain of *Malassezia pachydermatis* isolated from a canine *Malassezia dermatitis*. **Medical Mycology**, [S. l.], v. 57, n. 3, p. 346–350, 2019. DOI: 10.1093/mmy/myy035. Disponível em:  
<https://academic.oup.com/mmy/article/57/3/346/5003023>.

LI, Mi; MORRIS, Garrett M.; LEE, Taekyu; LACO, Gary S.; WONG, Chi-Huey; OLSON, Arthur J.; ELDER, John H.; WLODAWER, Alexander; GUSTCHINA, Alla. Structural studies of FIV and HIV-1 proteases complexed with an efficient inhibitor of FIV protease. **Proteins: Structure, Function, and Genetics**, [S. l.], v. 38, n. 1, p. 29–40, 2000. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0134(20000101)38:1<29::AID-PROT4>3.0.CO;2-N. Disponível em: [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1097-0134\(20000101\)38:1%3C29::AID-PROT4%3E3.0.CO;2-N](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1097-0134(20000101)38:1%3C29::AID-PROT4%3E3.0.CO;2-N).

LIMA, J. R.; GONDIM, D. M. F.; OLIVEIRA, J. T. A.; OLIVEIRA, F. S. A.; GONÇALVES,

L. R. B.; VIANA, F. M. P. Use of killer yeast in the management of postharvest papaya anthracnose. **Postharvest Biology and Technology**, [S. l.], v. 83, p. 58–64, 2013. DOI: 10.1016/j.postharvbio.2013.03.014. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925521413000884>.

LIU, Guang-Lei; CHI, Zhe; WANG, Guang-Yuan; WANG, Zhi-Peng; LI, Yang; CHI, Zhen-Ming. Yeast killer toxins, molecular mechanisms of their action and their applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, [S. l.], v. 35, n. 2, p. 222–234, 2015. DOI: 10.3109/07388551.2013.833582. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/07388551.2013.833582>.

LORCH, J. M.; PALMER, J. M.; VANDERWOLF, K. J.; SCHMIDT, K. Z.; VERANT, M. L.; WELLER, T. J.; BLEHER, D. S. *Malassezia vespertilionis* sp. nov.: a new cold-tolerant species of yeast isolated from bats. **Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, [S. l.], v. 41, n. 1, p. 56–70, 2018. DOI: 10.3767/persoonia.2018.41.04. Disponível em: <https://www.ingentaconnect.com/content/10.3767/persoonia.2018.41.04>.

MACDONALD, F.; ODDS, F. C. Virulence For Mice Of A Proteinase-Secreting Strain Of *Candida albicans* And A Proteinase-Deficient Mutant. **Microbiology**, [S. l.], v. 129, n. 2, p. 431–438, 1983. DOI: 10.1099/00221287-129-2-431. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/00221287-129-2-431>.

MAGLIANI, W.; CONTI, S.; GERLONI, M.; BERTOLOTI, D.; POLONELLI, L. Yeast killer systems. **Clinical microbiology reviews**, [S. l.], v. 10, n. 3, p. 369–400, 1997. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9227858>.

MAGNANI, Marciane; CASTRO-GÓMEZ, Raul Jorge Hernan.  $\beta$ -glucana de *Saccharomyces cerevisiae*: constituição, bioatividade e obtenção. **Semina: Ciências Agrárias**, [S. l.], v. 29, p. 631–650, 2008.

MANNAZZU, Ilaria; DOMIZIO, Paola; CARBONI, Gavino; ZARA, Severino; ZARA, Giacomo; COMITINI, Francesca; BUDRONI, Marilena; CIANI, Maurizio. Yeast killer toxins: from ecological significance to application. **Critical Reviews in Biotechnology**, [S. l.], v. 39, n. 5, p. 603–617, 2019. DOI: 10.1080/07388551.2019.1601679. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/07388551.2019.1601679>.

MARTINS, Suzana Cláudia Silveira; VAZ, Fernanda Leitão; MARTINS, Claudia Miranda. Isolamento, caracterização e identificação de leveduras killer de caldo de cana de açúcar. **Semina: Ciências Agrárias**, [S. l.], v. 36, n. 5, p. 3123, 2015. DOI: 10.5433/1679-0359.2015v36n5p3123. Disponível em: <http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/18768>.

MAYNARD, L.; RÈME, C. A.; VIAUD, S. Comparison of two shampoos for the treatment of canine *Malassezia* dermatitis: a randomised controlled trial. **Journal of Small Animal Practice**, [S. l.], v. 52, n. 11, p. 566–572, 2011. DOI: 10.1111/j.1748-5827.2011.01124.x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1748-5827.2011.01124.x>.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959. DOI: 10.1021/ac60147a030. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac60147a030>.

MORRIS, Daniel O. *Malassezia* Dermatitis and Otitis. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, [S. l.], v. 29, n. 6, p. 1303–1310, 1999. DOI: 10.1016/S0195-5616(99)50128-9. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0195561699501289>.

MORRIS, Daniel O. Medical therapy of otitis externa and otitis media. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, [S. l.], v. 34, n. 2, p. 541–555, 2004. DOI: 10.1016/j.cvsm.2003.10.009. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0195561603001608>.

MORRIS, Daniel O.; O'SHEA, Kathleen; SHOFER, Frances S.; RANKIN, Shelley. *Malassezia pachydermatis* Carriage in Dog Owners. **Emerging Infectious Diseases**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. 83–88, 2005. DOI: 10.3201/eid1101.040882. Disponível em: [http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/11/1/04-0882\\_article.htm](http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/11/1/04-0882_article.htm).

MUCCILLI, Serena; RESTUCCIA, Cristina. Bioprotective Role of Yeasts. **Microorganisms**, [S. l.], v. 3, n. 4, p. 588–611, 2015. DOI: 10.3390/microorganisms3040588. Disponível em: <http://www.mdpi.com/2076-2607/3/4/588>.

MUCCILLI, Serena; WEMHOFF, Sabrina; RESTUCCIA, Cristina; MEINHARDT, Friedhelm. Exoglucanase-encoding genes from three *Wickerhamomyces anomalus* killer strains isolated from olive brine. **Yeast (Chichester, England)**, [S. l.], v. 30, n. 1, p. 33–43, 2013. DOI: 10.1002/yea.2935. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23148020>.

MUHSIN, T. M.; AUBAID, A. H.; AL-DUBOON, A. H. Extracellular enzyme activities of dermatophytes and yeast isolates on solid media. **Mycoses**, [S. l.], v. 40, n. 11–12, p. 465–469, 1997. DOI: 10.1111/j.1439-0507.1997.tb00186.x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1439-0507.1997.tb00186.x>.

MUNRO, Carol A.; HUBE, Bernhard. Anti-fungal therapy at the HAART of viral therapy. **Trends in Microbiology**, [S. l.], v. 10, n. 4, p. 173–177, 2002. DOI: 10.1016/S0966-842X(02)02330-2. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0966842X02023302>.

NASCENTE, Patrícia da Silva; NOBRE, Márcia de Oliveira; SCHUCH, Luiz Filipe; LUCIA-JÚNIOR, Thomaz; FERREIRO, Laerte; MEIRELES, Mário Carlos Araújo. Evaluation of *Malassezia pachydermatis* antifungal susceptibility using two different methods. **Brazilian Journal of Microbiology**, [S. l.], v. 34, n. 4, p. 359–362, 2003. DOI: 10.1590/S1517-83822003000400015. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1517-83822003000400015&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822003000400015&lng=en&nrm=iso&tlng=en).

NASCIMENTO, Bruna L.; DELABENETA, Mateus F.; ROSSETO, Lana Rubia B.; JUNGES, Daniele S. B.; PARIS, Ana Paula; PERSEL, Cristiane; GANDRA, Rinaldo F. Yeast Mycocins: a great potential for application in health. **FEMS Yeast Research**, [S. l.], v. 20, n. 3, 2020. DOI: 10.1093/femsyr/foaa016. Disponível em: <https://academic.oup.com/femsyr/article/doi/10.1093/femsyr/foaa016/5818766>.

ORTIZ, Gustavo; MARTÍN, M. Carmen; CARRILLO-MUÑOZ, Alfonso J.; PAYÁ, M. Jesús. Producción de fosfolipasa y proteinasa en cepas de *Malassezia pachydermatis* aisladas de perros con otitis y sin otitis. **Revista Iberoamericana de Micología**, [S. l.], v. 30, n. 4, p. 235–238, 2013. DOI: 10.1016/j.riam.2013.01.006. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S113014061300020X>.

PARIS, Ana Paula; PERSEL, Cristiane; SERAFIN, Cleber Fernando; DE CÁSSIA GARCIA SIMÃO, Rita; GANDRA, Rinaldo Ferreira. Susceptibility of *Candida albicans* Isolated from Blood to *Wickerhamomyces anomalous* Mycocins. **Current microbiology**, [S. l.], v. 73, n. 6, p. 878–884, 2016. DOI: 10.1007/s00284-016-1135-4. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27638312>.

PEANO, Andrea; JOHNSON, Elizabeth; CHIAVASSA, Elisa; TIZZANI, Paolo; GUILLOT, Jacques; PASQUETTI, Mario. Antifungal Resistance Regarding *Malassezia pachydermatis*: Where Are We Now? **Journal of Fungi**, [S. l.], v. 6, n. 2, p. 93, 2020. DOI: 10.3390/jof6020093. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2309-608X/6/2/93>.

PENG, Ying; CHI, Zhen-Ming; WANG, Xiang-Hong; LI, Jing. Purification and molecular characterization of exo- $\beta$ -1,3-glucanases from the marine yeast *Williopsis saturnus* WC91-2. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 85, n. 1, p. 85–94, 2009. DOI: 10.1007/s00253-009-2061-1. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-009-2061-1>.

PETROV, V.; ZHELEV, G.; MARUTSOV, P.; KOEV, K.; GEORGIEVA, S.; TONEVA, I.; URUMOVA, V. Microbiological and antibacterial resistance profile in canine otitis externa – a comparative analysis. **BULGARIAN JOURNAL OF VETERINARY MEDICINE**, [S. l.], v. 22, n. 4, p. 447–456, 2019. DOI: 10.15547/bjvm.2151. Disponível em: <http://tru.uni-sz.bg/bjvm/BJVM December 2019 p.447-456.pdf>.

PIETSCHMANN, Silvia; HOFFMANN, Katrin; VOGET, Michael; PISON, Ulrich. Synergistic effects of Miconazole and Polymyxin B on microbial pathogens. **Veterinary Research Communications**, [S. l.], v. 33, n. 6, p. 489–505, 2009. DOI: 10.1007/s11259-008-9194-z. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s11259-008-9194-z>.

POLONELLI, L.; MORACE, G. Reevaluation of the yeast killer phenomenon. **Journal of clinical microbiology**, [S. l.], v. 24, n. 5, p. 866–9, 1986. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3771773>.

PRICE, Margaret F.; WILKINSON, Ian D.; GENTRY, Layne O. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. **Medical Mycology**, [S. l.], v. 20, n. 1, p. 7–14, 1982. DOI: 10.1080/00362178285380031. Disponível em: <https://academic.oup.com/mmy/article-lookup/doi/10.1080/00362178285380031>.

PUIG, Laura; BRAGULAT, M. Rosa; CASTELLÀ, Gemma; CABAÑES, F. Javier. Characterization of the species *Malassezia pachydermatis* and re-evaluation of its lipid dependence using a synthetic agar medium. **PLOS ONE**, [S. l.], v. 12, n. 6, p. e0179148, 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0179148. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0179148>.

RIBEIRO DO PRADO, Marilena; BRILHANTE, Raimunda Sâmia Nogueira; SIDRIM, José Júlio Costa; ROCHA, Marcos Fábio Gadelha. *Malassezia* spp. em humanos e pequenos animais: uma abordagem teórica. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, [S. l.], v. 102, p. 207–214, 2007.

ROSSER, Edmund J. Causes of otitis externa. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, [S. l.], v. 34, n. 2, p. 459–468, 2004. DOI: 10.1016/j.cvsm.2003.10.006. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0195561603001578>.

ROTMAN, B.; PAPERMASTER, B. W. Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S. l.], v. 55, n. 1, p. 134–141, 1966. DOI: 10.1073/pnas.55.1.134. Disponível em: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.55.1.134>.

SASTOQUE, A.; TRIANA, S.; EHEMANN, K.; SUAREZ, L.; RESTREPO, S.; WOSTEN, H.; COCK, H.; FERNANDES-NINO, M.; BARRIOS, A. F. G.; RAMIREZ, A. M. C. New Therapeutic Candidates for the Treatment of *Malassezia pachydermatis* -Associated Infections. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 4860, 2020. DOI: 10.1038/s41598-020-61729-1. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41598-020-61729-1>.

SCHMIDT, A. *Malassezia furfur*: a fungus belonging to the physiological skin flora and its relevance in skin disorders. **Cutis**, [S. l.], v. 59, n. 1, p. 21–4, 1997. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9013067>.

SCHMITT, Manfred J.; BREINIG, Frank. The viral killer system in yeast: from molecular biology to application. **FEMS microbiology reviews**, [S. l.], v. 26, n. 3, p. 257–76, 2002. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2002.tb00614.x. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12165427>.

SCHNEIDER, Jessica; RUPP, Oliver; TROST, Eva; JAENICKE, Sebastian; PASSOTH, Volkmar; GOESMANN, Alexander; TAUCH, Andreas; BRINKROLF, Karina. Genome sequence of *Wickerhamomyces anomalus* DSM 6766 reveals genetic basis of biotechnologically important antimicrobial activities. **FEMS Yeast Research**, [S. l.], v. 12, n. 3, p. 382–386, 2012. DOI: 10.1111/j.1567-1364.2012.00791.x. Disponível em: <https://academic.oup.com/femsyr/article-lookup/doi/10.1111/j.1567-1364.2012.00791.x>.

SHIFRINE, M.; MARR, A. G. The Requirement of Fatty Acids by *Pityrosporum ovale*. **Journal of General Microbiology**, [S. l.], v. 32, n. 2, p. 263–270, 1963. DOI: 10.1099/00221287-32-2-263. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/00221287-32-2->

263.

SIEMIENIUK, Magdalena; CZYZEWSKA, Urszula; STRUMILO, Slawomir; TYLICKI, Adam. Thiamine antivitamin - an opportunity of therapy of fungal infections caused by *Malassezia pachydermatis* and *Candida albicans*. **Mycoses**, [S. l.], v. 59, n. 2, p. 108–116, 2016. DOI: 10.1111/myc.12441. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/myc.12441>.

SILVA, D. P.; LESSA, I. L. P.; SILVA, D. N. O.; DÂMASO, R. C. B. A.; MOREIRA, R. T. F. Suscetibilidade antifúngica de leveduras do gênero *Malassezia*. **Rev Norte Mineira de enferm**, [S. l.], p. 01–09, 2019. Disponível em: <https://www.periodicos.unimontes.br/index.php/renome/article/view/2251/2321>.

STEWART, Graham G. Killer (Zymocidal) Yeasts. *In: Brewing and Distilling Yeasts*. Cham: Springer International Publishing, 2017. p. 189–198. DOI: 10.1007/978-3-319-69126-8\_10. Disponível em: [http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-69126-8\\_10](http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-69126-8_10).

SUNDH, Ingvar; MELIN, Petter. Safety and regulation of yeasts used for biocontrol or biopreservation in the food or feed chain. **Antonie van Leeuwenhoek**, [S. l.], v. 99, n. 1, p. 113–9, 2011. DOI: 10.1007/s10482-010-9528-z. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21086043>.

TAY, Sun-Tee; LIM, Su-Lin; TAN, Hui-Wee. Growth inhibition of *Candida* species by *Wickerhamomyces anomalus* mycocin and a lactone compound of *Aureobasidium pullulans*. **BMC complementary and alternative medicine**, [S. l.], v. 14, p. 439, 2014. DOI: 10.1186/1472-6882-14-439. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25380692>.

THEELEN, Bart; CAFARCHIA, Claudia; GAITANIS, Georgios; BASSUKAS, Ioannis Dimitrios; BOEKHOUT, Teun; DAWSON, Thomas L. *Malassezia* ecology, pathophysiology, and treatment. **Medical Mycology**, [S. l.], v. 56, n. suppl\_1, p. S10–S25, 2018. DOI: 10.1093/mmy/myx134. Disponível em: [https://academic.oup.com/mmy/article/56/suppl\\_1/S10/4925974](https://academic.oup.com/mmy/article/56/suppl_1/S10/4925974).

TRAGIANNIDIS, Athanasios; BISPING, Guido; KOEHLER, Gabriele; GROLL, Andreas H. Minireview: *Malassezia* infections in immunocompromised patients. **Mycoses**, [S. l.], v. 53, n. 3, p. 187–195, 2010. DOI: 10.1111/j.1439-0507.2009.01814.x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1439-0507.2009.01814.x>.

VELEGRAKI, Aristeia; CAFARCHIA, Claudia; GAITANIS, Georgios; IATTA, Roberta; BOEKHOUT, Teun. *Malassezia* Infections in Humans and Animals: Pathophysiology, Detection, and Treatment. **PLoS Pathogens**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. e1004523, 2015. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004523. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1004523>.

ZEINALI, Elham; SADEGHI, Golnar; YAZDINIA, Fahimeh; SHAMS-GHAHFAROKHI, Masoomeh; RAZZAGHI-ABYANEH, Mehdi. Clinical and epidemiological features of the genus *Malassezia* in Iran. **Iranian journal of microbiology**, [S. l.], v. 6, n. 5, p. 354–60,

2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25848528>.