

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

Caracterização de isolados do fungo *Malassezia pachydermatis* através do perfil enzimático

CLAUDIA LAUTERT

PORTO ALEGRE

2010

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

Caracterização de isolados do fungo *Malassezia pachydermatis* através do perfil enzimático

Autor: CLAUDIA LAUTERT

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

Subárea: Microbiologia.

Orientador: PROF. DR. LAERTE FERREIRO

**Co-orientador: PROF. DR. JANIO MORAIS
SANTURIO**

PORTO ALEGRE

2010

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, agradeço aos meus pais, Claudio Roberto da Silva Lautert e Ivone Leda Lautert, e a minha avó Leda Krause Eismann, pelo incentivo, apoio e imenso amor.

Ao professor Laerte Ferreiro, pelos ensinamentos e dedicação à profissão. Ao professor Janio Morais Santurio, pela oportunidade de fazer parte da equipe LAPEMI e principalmente pelo voto de confiança, um verdadeiro obrigado. Ao prof^o Sydney Hartz Alves pela atenção, amizade e dedicação profissional.

Ao meu amor, amigo e companheiro Marcelo de Souza Paganotto, pelo incentivo, paciência e apoio em todos os momentos.

A toda equipe do LAPEMI: amigos, colegas e companheiros de aprendizado.

Por fim, às instituições de ensino UFRGS e UFSM.

“Não arrancarás uma letra ao teu destino. Ele se cumprirá
inteiro”.

-Machado de Assis-

RESUMO

Malassezia spp. são fungos lipofílicos, reconhecidos há mais de cem anos como membros da microbiota cutânea normal humana, bem como agentes de doenças dermatológicas. Desde 1980, são relatados como causadores de infecções sistêmicas oportunistas. Estas leveduras são frequentemente encontradas em uma grande variedade de animais homeotérmicos, e sua ampla distribuição no meio ambiente agora está sendo explorada através de técnicas moleculares e bioquímicas. O enfoque deste estudo foi a espécie não lipido-dependente *Malassezia pachydermatis*, e a sua caracterização através do perfil enzimático pelo sistema Api-Zym[®]. Deste modo, utilizaram-se 30 amostras de *M. pachydermatis* isoladas de cães, com e sem sinais clínicos, identificadas pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). As amostras foram cultivadas em meio de Dixon modificado, incubadas a 37°C durante 48 horas, para posterior quantificação através de espectrofotometria. Um inóculo de 65 µl foi colocado em cada orifício do kit comercial de verificação enzimática e, após, incubado a 37°C por 4 horas. Os resultados foram obtidos através da leitura visual e interpretação das titulações por escalas pré-determinadas, também foram avaliadas as reações através de “escaneamento” eletrônico. Todos os testes foram realizados em triplicata. Os resultados demonstraram a atividade de enzimas específicas pertencentes ao grupo das peptídeo hidrolases (100%), fosfohidrolases (98,3%) e éster hidrolases (91,6%), enquanto que as enzimas α -galactosidase, β -galactosidase, β -glicuronidase, α -manosidase e α -fucosidase caracterizaram 10% de todos os isolados. Além disso, não se comprovou a viabilidade do sistema utilizado no estudo para a caracterização enzimática da levedura.

Palavras-chave: *Malassezia pachydermatis*, atividade enzimática, Api-Zym, cães.

ABSTRACT

Malassezia spp. are lipophilic fungi, which have been recognised for over a century as members of the normal human cutaneous flora, and also as agents of certain skin diseases. In addition, since the 1980s, they have been reported as causing opportunistic systemic infections. These yeasts have frequently been found on a diverse range of other warm-blooded animals, and their wider distribution in nature is now being explored using molecular techniques. The focus of the present study was the species no lipid-dependent *Malassezia pachydermatis*, and its characterization through the enzymatic profile by the Api-Zym[®] system. Then 30 isolated samples of dogs had been used, with and without clinical signals, identified by the technique of Polymerase Chain Reaction (PCR). The samples were cultivated into Dixon's modified medium, incubated at 37°C during 48 hours, for posterior quantification through spectrophotometry. An inocula of 65 µl was placed in each microwell of the commercial kit of enzymatic verification and, after, it was incubated at 37°C for 4h. The results were obtained through the visual reading and interpretation of the titulations by predetermined scales, it were also evaluated the reactions through electronic scanning. All the tests were performed in triplicate. The results demonstrated the activity of specific enzymes pertaining to the group of the peptide hydrolases (100%), phosphohydrolases (98,3%) and ester hydrolases (91,6%), while the enzymes α -galactosidase, β -galactosidase, β -glucuronidase, α -mannosidase and α -fucosidase characterized 10% off all the isolates. Moreover, it was not proven the viability of the system used in the study for the enzymatic characterization of the yeast.

Key words: *Malassezia pachydermatis*, enzymatic activity, Api-Zym, dogs.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Visualização em triplicata do isolado 97BM no sistema Api-Zym[®]19

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Enzimas avaliadas pelo sistema Api-Zym [®] , com os respectivos substratos e formas de apresentação da reação positiva, presentes em cada orifício da galeria que compõe o “kit”	20
---	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1	<i>Malassezia pachydermatis</i>	14
2.2	Sistema Api-Zym[®]	18
3	ARTIGO CIENTÍFICO	21
4	DISCUSSÃO.....	34
5	CONCLUSÕES.....	40
6	REFERÊNCIAS	41
7	ANEXOS	50

1. INTRODUÇÃO

A levedura lipofílica *Malassezia*, anteriormente designada *Pityrosporum*, é parte da microbiota cutânea normal da maioria dos vertebrados. Entretanto, sob certas condições, como alta umidade relativa, pele oleosa, tratamento com corticosteróide e imunodeficiência, podem influenciar estas leveduras a tornarem-se patogênicas e causarem doenças de pele como pitiríase versicolor, foliculite, dermatite seborréica e dermatite atópica (ASHBEE & EVANS, 2002; FAERGEMANN, 2002).

Membros do gênero *Malassezia*, como muitas outras leveduras anamórficas, são difíceis de nomear em maiores níveis taxonômicos baseados em estruturas morfológicas. Moore (1980) estabeleceu a nomenclatura Malasseziales para as leveduras classificadas como basidiomicetos, que não apresentavam a produção da explosiva descarga de esporos denominados balistosporos, ao contrário dos Esporobolomicetales, que continham este mecanismo. Dentro da ordem Malasseziales, Moore incluiu oito gêneros, denominados *Cryptococcus*, *Malassezia*, *Phaffia*, *Rhodotorula*, *Sterigmatomyces*, *Trichosporon*, *Trichosporonoides* e *Vanrija*. A falta de uma característica unificadora e a definição negativa de Malasseziales já mostram as dificuldades no agrupamento destas leveduras de modo monofilético (GUÉHO-KELLERMANN et al., 2010).

Nos últimos vinte anos, as espécies de *Malassezia* têm sido reconhecidas como leveduras oportunistas de crescente importância (SHIBATA et al., 2006). Atualmente, doze espécies (*M. dermatis*, *M. furfur*, *M. globosa*, *M. japonica*, *M. nana*, *M. obtusa*, *M. restricta*, *M. slooffiae*, *M. sympodialis*, *M. yamatoensis*, *M. caprae* e *M. equina*) são reconhecidas como lipídeo-dependentes, enquanto que *M. pachydermatis* não exige suplementação lipídica para crescimento *in vitro* (CAFARCHIA et al., 2008a).

Todas as espécies do gênero, com a exceção de *Malassezia pachydermatis*, são lipídeo-dependentes devido à incapacidade de síntese dos ácidos graxos C₁₄ ou C₁₆. Por causa disso, os organismos necessitam de uma fonte lipídica externa e, por muitos anos, esta incapacidade confundiu pesquisadores na tentativa de cultivá-los *in vitro*. Sua natureza lipídeo-dependente foi primeiramente relatada por Benham (1939), a qual notou a necessidade de um suplemento lipídico para o seu crescimento (ASHBEE, 2007).

Outra fonte de confusão foi o dimorfismo das espécies. Muitos pesquisadores acreditavam que a fase de levedura (designada *Pityrosporum*) e a fase micelial (designada *Malassezia*) compreendiam organismos diferentes. A partir do ano de 1977, confirmou-se que as fases poderiam ser interconvertidas, e o dimorfismo do organismo foi reconhecido. Vários fatores induzem a conversão, incluindo glicina, colesterol e esqualeno, embora nem todas as espécies e cepas sejam capazes de sofrer esta transição. O reconhecimento do dimorfismo foi seguido, em 1986, pela unificação da nomenclatura do gênero com todas as espécies e fases do crescimento, designada *Malassezia* (ASHBEE, 2007).

Microorganismos fúngicos, assim como as bactérias, absorvem tudo o que for essencial para sua sobrevivência diretamente do ambiente. Portanto, estes microorganismos precisam de um meio para degradar polímeros de carboidratos, proteínas, além de outras moléculas. Sem considerar seu relacionamento com o substrato (patogênico ou sapróbio), estas classes de microorganismos produzem enzimas extracelulares, as quais interagem com o ambiente exterior à célula ou hifa (TRIGIANO & AMENT, 2003).

Vários microorganismos produzem enzimas hidrolíticas e estruturas que auxiliam sua patogenicidade. Por exemplo, enzimas liberadas no tecido infectado, particularmente proteinase e fosfolipase, são consideradas como fatores potencialmente importantes na virulência de *Candida albicans* (MACDONALD & ODDS, 1983).

Malassezia sp. pode produzir um variado espectro de enzimas, incluindo lipases, fosfolipases e hidrolases. As lipases são essenciais em prover os lipídeos necessários para o seu crescimento. Recentemente, um gene que codificava a lipase extracelular de *M. furfur* foi expressado e a lipase caracterizada, o gene foi denominado MfLIP1 (ASHBEE, 2007).

Fosfolipases constituem um grupo heterogêneo de enzimas que hidrolisam uma ou mais ligações ésteres em glicerofosfolipídeos (GHANNOUM, 2000). *In vitro*, a atividade de fosfolipase A₂ por *Malassezia* é capaz de liberar ácido araquidônico das células epiteliais, as quais foram indicadas como iniciadoras da resposta inflamatória na pele, e identificadas em doenças associadas a esta levedura (ASHBEE, 2007).

As espécies de *Malassezia* possuem uma parede celular muito fina, a qual é envolta por uma camada lamelar ou capsular que contém lipídeos, podendo ser removida com solventes. *Malassezia* spp. produz uma série de metabólitos, incluindo gama-lactonas,

que dão aos organismos seu odor característico. Quando essas leveduras são semeadas em meios de culturas contendo ácido oléico, há produção de ácido azelaico além de outros ácidos dicarboxílicos. Ácido azelaico é inibidor de neutrófilos e também atua como inibidor competitivo de tirosinase, uma enzima fundamental na melanogênese, levando à especulação que o ácido azelaico pode ser importante nas mudanças de pigmentação da pele, visualizadas na pitiríase versicolor (ASHBEE, 2007). As lesões de hipopigmentação e hiperpigmentação da pele, causadas pela doença, também podem ser parcialmente compreendidas pela geração de pigmentos derivados de triptofano (TRP) e outros indóis através da ação de transaminase 1 (TAM 1). Cicloserina é um inibidor de TAM e é capaz de inibir completamente, *in vitro*, a produção de pigmento em *M. furfur* (MAYSER & RIECHE, 2009).

Considerando que leveduras são microorganismos comensais, elas podem tornar-se patogênicas sob certas circunstâncias, causando doenças em mamíferos domésticos (GUILLOT et al., 1994), particularmente dermatite e otite em cães (KOWALSKI, 1988; MASON & EVANS, 1991). A frequência e quantidade da população de *M. pachydermatis* variam marcadamente entre diferentes sítios anatômicos nos cães (BENSIGNOR et al., 2002; BOND et al., 1994; BOND et al., 1995; BOND & LLOYD, 1997; GUILLOT & BOND, 1999; KENNIS et al., 1995). Estes parâmetros são provavelmente afetados pela presença de dermatites seborréicas, atópicas e alérgicas, em cães com desordens na pele e ou otite (BOND et al., 1994; BOND et al., 1996; BOND & LLOYD, 1997). A frequência e quantidade de colônias de *M. pachydermatis* também dependem da raça dos cães (BOND et al., 1996; MASON, 1993; PLANT et al., 1992).

O papel patogênico das espécies de *Malassezia* parece estar relacionado a distúrbios dos mecanismos físicos, químicos ou imunológicos normais, restringindo-se à colonização microbiana da pele, e à produção de fosfolipases (CAFARCHIA & OTRANTO, 2004; GUILLOT & BOND, 1999). CAFARCHIA & OTRANTO (2004), em seu estudo a respeito da associação entre produção de fosfolipase por *M. pachydermatis* e lesões da pele, observaram que todos os cães com lesões apresentaram isolados com atividade de fosfolipase, o que permitiu a conclusão de que a atividade de fosfolipase pode desempenhar uma função patogênica na ocorrência de lesões de pele causadas pela levedura, contribuindo dessa forma para sua virulência.

De forma geral, toda alteração cutânea com um forte componente inflamatório pode favorecer a proliferação de *Malassezia* spp. Em certas raças, a simples presença de dobras cutâneas cria um ambiente favorável (umidade) ao desenvolvimento das leveduras lipofílicas, assim como, no meato acústico externo, a secreção de grande quantidade de cerúmen forma um substrato para a proliferação das leveduras. Da mesma forma, as alterações da epidermopoiese, que se traduzem por disqueratinizações e acúmulo de lipídios sobre a pele, também podem ser fatores predisponentes e perpetuantes (MACHADO et al., 2003).

Embora fatores predisponentes em hospedeiros e desequilíbrio entre populações de microorganismos sejam vistos como requisitos básicos para a multiplicação de *M. pachydermatis* (BOND et al., 1996), a patogênese das doenças causadas por esta levedura é parcialmente desconhecida, assim como, os principais fatores que afetam a virulência do agente etiológico (COUTINHO & PAULA, 2000).

As enzimas são proteínas essenciais para o metabolismo de todos os seres vivos e têm um importante papel na degradação de matéria orgânica, na infecção de hospedeiros e na deterioração de alimentos. Enzimas agem no controle dos processos bioquímicos das células vivas. Elas podem ser isoladas de animais, plantas e microorganismos. Esses últimos são considerados ótimas fontes para produção de enzimas pela indústria, principalmente devido à ampla variedade de enzimas produzidas (LIMA et al., 1986).

O sistema Api-Zym[®] é um método semi-quantitativo de verificação de atividades enzimáticas aplicável a meios como tecidos, células, líquidos biológicos, microorganismos, solos, que permite estudar rápida e simultaneamente dezenove atividades enzimáticas a partir de pequenas quantidades de uma amostra. Resultados de Mancianti et al. (2000) sugerem que esse sistema pode ser utilizado para a caracterização enzimática de microorganismos fúngicos. Assim sendo, o presente estudo teve como objetivo os seguintes tópicos:

- Verificar a intensidade da atividade de 19 enzimas de 30 isolados de *Malassezia pachydermatis* através do método semi-quantitativo Api-Zym[®].
- Verificar as possíveis diferenças na produção de enzimas entre os isolados analisados.

- Comparar o perfil enzimático entre as amostras provenientes de cães com sinais clínicos e sem sinais clínicos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Malassezia pachydermatis*

A taxonomia do gênero *Malassezia* tem passado por extensivas revisões nos últimos dez anos e ainda está em estado de fluxo, com novas espécies descritas e outras demonstrando significativa diversidade (AIZAWA et al., 2001; CABAÑES et al., 2005).

Eichstedt foi o primeiro a descrever um fungo associado com lesões de pitíriase versicolor em 1846 (MOORE, 1940), contudo, somente em 1853 o organismo foi nomeado *Microsporon furfur*. A fase de levedura foi nomeada *Pityrosporum*, com três espécies reconhecidas, *P. orbiculare*, *P. ovale* e *P. pachydermatis*, enquanto a fase micelial foi nomeada *Malassezia furfur*. Em 1986, a sinonímia destes organismos foi reconhecida e o nome *M. furfur* formalmente aceito para organismos lipídeo-dependentes (CANNON, 1986). Simmons & Guého (1990) descreveram uma nova espécie, *M. sympodialis*, isolado a partir de um paciente com AIDS que apresentava *tinea capitis*.

No ano seguinte, descreveram e nomearam sete espécies de *Malassezia*: *M. furfur*, *M. sympodialis*, *M. obtusa*, *M. globosa*, *M. restricta*, *M. slooffiae* e *M. pachydermatis* (GUÉHO et al., 1996). No início do estudo, cinco novas espécies foram diferenciadas, entretanto, somente quatro foram nomeadas, sugerindo a possibilidade da existência de outras espécies. Subsequentemente, outras espécies de *Malassezia* foram descritas, incluindo *M. dermatis* (SUGITA et al., 2002), *M. japonica* (SUGITA et al., 2003), *M. nana* (HIRAI et al., 2004), *M. yamotoensis* (SUGITA et al., 2004), *M. equina* e *M. caprae* (CAFARCHIA et al., 2008).

Variações na morfologia das colônias e características dos isolados de *M. furfur* levaram à descrição de três sorovares (CUNNINGHAM et al., 1990) e ao reconhecimento contínuo de diferentes formas de organismos por vários grupos de pesquisa (FAERGEMANN, 1993; MIDGLEY, 1989). Na tentativa de resolver essa confusão, Guillot & Guého (1995) coletaram isolados de várias espécies animais e

sequenciaram a subunidade rRNA, além de compararem o DNA e sua recombinação. Seus resultados demonstraram que havia significantes diferenças, e suficientes para a separação em espécies distintas.

Considerando a necessidade de aprofundar os conhecimentos sobre a epidemiologia e a patogenia das infecções associadas à *M. pachydermatis*, recentemente foram estudadas características moleculares de 110 amostras isoladas de casos clínicos de cães e gatos, através da técnica de amplificação randômica de DNA polimórfico (RAPD) e análise da sequência nucleotídica do gene quitina sintase 2 (CHS2). Essa investigação revelou a existência de 4 tipos geneticamente distintos: A (84,6%), B (11,8%), C (0,9%) e D (2,7 %). A *M. pachydermatis* tipo A (predominante) foi isolada de lesões de várias doenças (otite externa, pioderma, dermatites atópica, alérgica à picada de pulgas e seborréica), enquanto aquelas dos tipos B, C e D foram isoladas majoritariamente de otites externas (AIZAWA et al., 2001).

A levedura lipofílica *M. pachydermatis* é parte da microbiota cutânea normal de muitos vertebrados, como carnívoros domésticos e silvestres (incluindo cão, raposa, gato e urso) (CAFARCHIA et al., 2008b). Ela é comumente encontrada, em cães saudáveis, nos canais auditivos, lábios, axilas, espaços interdigitais, sacos anais, reto e, com menos frequência, focinho e aparelho genital (SCOTT et al., 2001; BOND, 2002). Por outro lado, é capaz de sobreviver no meio ambiente somente por curtos períodos (COUTINHO & PAULA, 2000).

M. pachydermatis é a única espécie do gênero que não exige uma fonte exógena de lipídeo para crescimento (ASHBEE, 2006; BLANCO et al., 2000). Na Medicina Veterinária, é a espécie mais importante do gênero, embora outras espécies estejam relacionadas a desordens na pele.

Essa levedura pode se tornar patogênica sempre que ocorrer alterações microclimáticas na superfície da pele ou na defesa do hospedeiro. E atualmente, é amplamente aceito o fato de que dermatite por *Malassezia* é uma doença comum de cães. Desde a primeira descrição por Dufait em 1983, a mudança de opinião, em relação à importância desta doença na dermatologia veterinária, é ilustrada pelo número de artigos na literatura (NEGRE et al., 2008).

Dermatite por *Malassezia* pode ocorrer em cães de qualquer sexo, idade e raça, com a predisposição de algumas raças, como por exemplo, West Highland White Terriers,

Basset Hounds, Poodles, Australian Silky Terriers e American Cocker Spaniels (DUFAlT, 1983; MAUDLIN et al., 1997; PLANT et al., 1992; SCOTT et al., 2001).

Em cães, ela pode ser localizada ou generalizada. Sinais clínicos são variáveis: eritema, prurido leve a severo, alopecia, exsudação gordurosa e descamação são geralmente observados. Lesões secundárias incluem escoriações, liquenificação, hiperpigmentação e exsudação. Em casos generalizados, um odor ofensivo e rançoso é comumente relatado. Uma mancha marrom-avermelhada nas patas é visível em caso de paroníquia. E por fim, otite externa também é associada com a presença dessas leveduras (BOND & LLOYD, 1997; MUSE, 2000; SCOTT et al., 2001).

O primeiro caso de dermatite em cães causada por *M. pachydermatis* no Brasil foi descrito em 1979 por Larsson et al. Posteriormente, Larsson et al. (1988), ao avaliar 23 casos de cães com malasseziose, observaram que a seborréia primária provavelmente não é fator predisponente, embora possa ocorrer como uma manifestação secundária a essa levedurose.

O papel de *M. pachydermatis* como patógeno tem sido debatido há muito tempo. Dufait (1983) e depois Mason & Evans (1991) determinaram a levedura como um agente causador de doença. Suspeita-se que a sua proliferação seja promovida pela excessiva produção sebácea ou rompimento da barreira epidermal, tal como ocorre em doenças relacionadas com hipersensibilidade (atopia, reações cutâneas alimentares adversas, hipersensibilidade à picada de insetos e alergia por contato), infecção por ectoparasitas, pioderma bacteriano e doenças endócrinas (hiperadrenocorticismo, hipotireoidismo, diabetes mellitus) (BOND et al., 1996). Glicocorticóides, em longo prazo, podem também aumentar as populações de *Malassezia* (SCOTT et al., 2001; WHITE et al., 1998), enquanto que não se considera a administração de antibacterianos como fator predisponente (MATOUSEK & CAMPBELL, 2002; PLANT et al., 1992).

O diagnóstico é obtido pela observação direta das leveduras através de técnicas citológicas, de cultura e histopatológicas (NEGRE et al., 2008). A coloração é indispensável (MGG, Gram ou kits de colorações rápidas) e, com a objetiva de imersão, as leveduras lipofílicas são facilmente identificadas. A presença de numerosas leveduras (em média mais de 3-5 por campo microscópico) é altamente significativa, enquanto que a interpretação do achado de poucas leveduras deve ser sempre feita conjuntamente com os dados da anamnese e do aspecto clínico (MACHADO et al., 2003). O diagnóstico baseado na avaliação do número de leveduras, não leva em conta que

algumas delas poderiam apresentar potentes fatores de virulência; ou os hospedeiros poderiam ser atipicamente sensíveis a estes organismos (ex: hipersensibilidade à *Malassezia*). Em ambos os casos, sinais de dermatite por *Malassezia* provavelmente se desenvolveriam na presença de pequeno número de organismos (NEGRE et al., 2008).

Otite externa associada com *M. pachydermatis* é frequentemente caracterizada por um exsudato úmido, marrom ou amarelo, com variável eritema e prurido (GRIFFIN, 1993; GUILLOT & BOND, 1999).

Os fatores que favorecem a proliferação e transição de um organismo comensal para um aparente patógeno, na pele canina, são pouco compreendidos; mas provavelmente reflete distúrbios de mecanismos físicos normais, químicos ou imunológicos que restringe a colonização da pele. Doenças concomitantes são reconhecidas em muitos, mas não em todos, casos de dermatite por *Malassezia* em caninos, e a correção da doença concorrente pode prevenir ou reduzir a frequência da recidiva em alguns cães (GARCIA & BLANCO, 2000). Alguns cães atópicos apresentam alto número de leveduras, tanto na pele lesada como em áreas não afetadas (ASHBEE, 2007; ROSSYCHUCK, 1994). Teste de reatividade intradermal foi observado em cães atópicos, seguido de injeção de extratos de *M. pachydermatis*, em concentrações que não causam nenhuma reação em cães saudáveis; sugerindo que a hipersensibilidade aos alérgenos da levedura pode estar envolvida na patogênese em alguns casos da doença atópica (MORRIS & ROSSER, 1995).

Em gatos, dermatite associada com *Malassezia* spp. é frequentemente relatada naqueles com doenças metabólicas ou endócrinas, neoplasia e infecção com vírus da leucemia felina (FeLV) e vírus da imunodeficiência felina (FIV). Alguns relatos sugerem que o crescimento excessivo de *Malassezia* spp. pode ser encontrado em felinos com doenças alérgicas de pele (AHMAN et al., 2007; ORDEIX et al., 2007).

M. pachydermatis tem a habilidade de estimular o sistema imune via rota clássica e alternativa do complemento, atuando como um adjuvante e estimulando tanto resposta humoral como celular em indivíduos saudáveis ou com condições associadas ao agente (ASHBEE et al., 1994 a,b; SOHNLE & COLLINS-LECH, 1983; SUZUKI et al., 1998; TAKAHASHI et al., 1986). A ativação do complemento é responsável pela inflamação, associada com dermatite seborréica. Em contraste, é capaz de resistir à destruição fagocítica por neutrófilos e citocinas quando em co-cultura com células mononucleares sanguíneas periféricas (KESAVAN et al., 1998; RICHARDSON &

SHANKLAND, 1991). Este comportamento aparentemente contraditório pode estar associado à camada capsular, rica em lipídeos, que envolve as células das leveduras, e é responsável pela ausência de inflamação associada com *Malassezia* em seu estado comensal (ASHBEE, 2007; ASHBEE & EVANS, 2002; MITTAG, 1995).

Compreender a aparentemente contraditória habilidade de suprimir ou não a resposta imune contra si próprio, pode ser a chave para o entendimento de como a *Malassezia* spp. ocorre tanto como comensal e patógeno (ASHBEE, 2006).

Opções terapêuticas atuais incluem terapia sistêmica com cetoconazole ou itraconazole e/ou terapia tópica com derivados azólicos, ou outros agentes tais como sulfato de selênio e clorexidina (MASON & EVANS, 1991; MASON & STEWART, 1993).

2.2. Sistema Api-Zym®

Inicialmente, o kit Api-Zym® foi utilizado na identificação de enzimas bacterianas, sendo os padrões enzimáticos obtidos utilizados para taxonomia e tipificação dos microorganismos (HUMBLE et al., 1977). Esses autores relatam que o método é de fácil uso, não requer reagentes além dos que são fornecidos pelo kit e o resultado da maioria dos organismos é de fácil interpretabilidade e repetibilidade. Embora não tenha sido desenvolvido para alcançar a precisão de procedimentos espectrofotométricos ou eletroforéticos, o kit Api-Zym® pode ser usado em métodos de “*screening*”, proporcionando assim um amplo espectro de determinações enzimáticas (ZANETTE, 2010).

Essas vantagens levaram diversos autores a utilizar o respectivo kit não só em bacteriologia, mas também em micologia. A viabilidade do seu uso foi comprovada na pesquisa enzimática de fungos filamentosos (PAPINI & MANCIANTI, 1996; SÁENZ-DE-SANTAMARÍA et al., 2006) e leveduriformes (MANCIANTI et al., 2000), leveduras de interesse médico (CASAL & LINARES, 1983) e industrial (PENNACCHIA et al., 2008), larvas de *Oestrus ovis* (ANGULO-VALADEZ et al., 2007), entre outros.

Os substratos presentes nos poços das galerias do kit Api-Zym® (Figura 1) permitem verificar a atividade de diferentes grupos de enzimas, sendo elas: proteases, éster hidrolases, fosfohidrolases e glicosidases. Todos esses grupos exercem função

tanto na invasão tecidual quanto na nutrição do organismo invasor. Um patógeno que invade tecidos de mamíferos deve ser capaz de crescer na temperatura corporal de seu hospedeiro, e, presumidamente, secretar enzimas para digerir proteínas ou lipídios, que servem como fonte primária de calorías (DAVIS et al., 2006). No entanto, é importante presumir com cuidado o papel de uma enzima em particular quando o experimento restringe-se a um único aspecto do ciclo de vida do patógeno como um todo. Assim, seria impossível saber se o crescimento de um mutante deficiente, em determinada enzima, cessou porque este encontrou uma barreira física ou porque se esgotou sua fonte de nutrientes (RAVISHANKAR et al., 2001). Por esta razão, a significância de enzimas degradadoras de tecidos no processo infeccioso permanece uma questão não esclarecida completamente (ZANETTE, 2010).

Os testes enzimáticos são inoculados com uma suspensão densa, que reidrata os substratos. As reações produzidas durante o período de incubação traduzem-se por viragens de cor, reveladas pela adição de reagentes (Tabela 1).

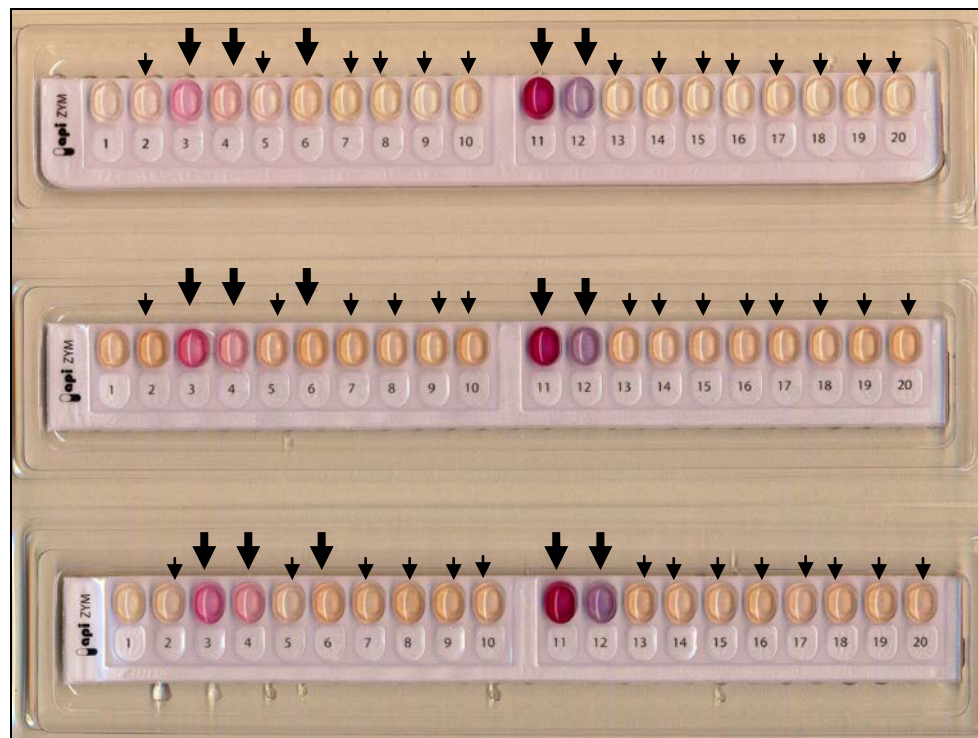


Figura 1. Sistema Api-Zym[®] inoculado com *M. pachydermatis* (isolado 97BM). Incubação a 37°C/4 h. Note as reações positivas (seta maior) e negativas (seta menor).

TABELA 1 – Enzimas avaliadas pelo sistema Api-Zym[®], com os respectivos substratos e formas de apresentação da reação positiva, presentes em cada orifício da galeria que compõe o “kit”.

<i>Nº. do orifício</i>	<i>Enzimas avaliadas</i>	<i>Substratos</i>	<i>Reação positiva (cor)</i>
01	Controle	Sem substrato	Transparente
02	Fosfatase alcalina	2-naftil fosfato	Violeta
03	Esterase (C ₄)	2-naftil butirato	Violeta
04	Esterase lipase (C ₈)	2-naftil caprilato	Violeta
05	Lipase (C ₁₄)	2-naftil miristato	Violeta
06	Leucina arilamidase	L-leucil-2-naftilamida	Laranja
07	Valina arilamidase	L-valil-2-naftilamida	Laranja
08	Cistina arilamidase	L-cistil-2-naftilamida	Laranja
09	Tripsina	N-benzoil-DL-arginil-2-naftilamida	Laranja
		N-glutaril-fenilalanina-2-naftilamida	
10	Quimotripsina		Laranja
11	Fosfatase ácida	2-naftil fosfato	Violeta
12	Naftol-AS-BI-fosfohidrolase	naftol-AS-BI-fosfato	Azul
		6-Br-2-naftil- α D-galactopiranosida	
13	A-galactosidase		Violeta
14	B-galactosidase	2-naftil- β D- galactopiranosida	Violeta
15	B-glicuronidase	naftil-AS-BI- β D-glicuronida	Azul
16	α -glicosidase	2-naftil- α D-glicopiranosida	Violeta
17	β -glicosidase	6-Br-2-naftil-Bd-glicopiranosida	Violeta
18	N-acetil- β -glicosaminidase	1-naftil-N-acetil- β D-glicosaminida	Castanho
19	α -manosidase	6-Br-2-naftil- α D-manopiranosida	Violeta
20	α -fucosidase	2-naftil- α L-fucopiranosida	Violeta

3. ARTIGO CIENTÍFICO

CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL ENZIMÁTICO DO FUNGO *Malassezia pachydermatis* ISOLADO DE CÃES

Artigo Submetido à revista *Veterinary Dermatology*

Manuscript ID: VDE-2010-107

Title: Enzymatic characterization of *Malassezia pachydermatis* isolates from dogs

Authors: Lautert, Claudia
Ferreiro, Laerte
Jesus, Francielli
Zanette, Régis
Alves, Sydney
Santurio, Janio

Date Submitted: 12-Aug-2010

RESUMO

A levedura *Malassezia pachydermatis* é parte da microbiota cutânea normal da maioria dos vertebrados homeotérmicos. Entretanto, sob certas condições como, alta umidade relativa, pele oleosa, tratamento corticosteróide e imunodeficiência, pode se tornar patogênica e causar dermatopatias. O seu papel patogênico parece estar relacionado a distúrbios dos mecanismos físicos, químicos ou imunológicos normais e à produção de enzimas. *Malassezia* spp. produz uma ampla série de enzimas, incluindo lipases, fosfolipases e hidrolases. O sistema Api-Zym[®] é um método semi-quantitativo de verificação de atividades enzimáticas aplicável a meios como tecidos, células, líquidos biológicos, microorganismos, solos, que permite estudar rápida e simultaneamente dezenove atividades enzimáticas. Ao utilizar este método em 30 isolados de *Malassezia pachydermatis*, constatou-se que as fosfohidrolases: fosfatase ácida e naftol-AS-BI-fosfohidrolase destacaram-se tanto em presença quanto intensidade de sua produção entre os isolados analisados, independente do sinal clínico associado ao animal utilizado para coleta das amostras. Este trabalho teve como objetivo caracterizar isolados de *Malassezia pachydermatis* através do perfil enzimático. Palavras-chave: *Malassezia pachydermatis*, enzimas, Api-Zym[®], atividade enzimática, cães.

INTRODUÇÃO

O gênero *Malassezia* compreende leveduras lipofílicas que fazem parte da microbiota cutânea do homem e animais. O seu isolamento a partir do meio ambiente é excepcional, pois sua sobrevivência está condicionada à presença de uma fonte lipídica, excetuando-se a espécie *Malassezia pachydermatis*, que é menos exigente no requerimento de lipídeos para seu desenvolvimento (Guého et al, 1996; Guillot & Bond, 1999a; Sidrim & Moreira, 1999).

M. pachydermatis é a espécie mais adaptada aos animais, sendo frequentemente isolada como microbiota de conduto auditivo e derme de cães, gatos e outras espécies de animais domésticos e selvagens. Em cães tem sido comumente associada a quadros clínicos de otites externas e dermatites, estando sua proliferação intensa associada a processos de desequilíbrio local ou sistêmico (Guillot & Bond, 1999a; Leite et al., 2003; Machado et al., 2003).

Uma vez que ocorre a colonização, acredita-se que *M. pachydermatis* libera proteases, lipases, fosfatases e ureases, que alteram a qualidade do produto de secreção das glândulas sebáceas, que protege a pele, e rompem a superfície epidermal (Mathieson et al., 1998).

A maioria dos métodos usados em laboratórios de microbiologia clínica para a identificação de microorganismos exige o crescimento dos mesmos e a detecção dos resultados finais de atividades metabólicas complexas. Uma alternativa é o uso do sistema para detecção de esterases, lipases, peptidases e outras enzimas, descrito por Buisiere et al. (1967), que foi modificado e comercializado, disponível como sistema Api-Zym[®] (Humble et al., 1977). A partir desse sistema, objetivou-se a caracterização de isolados de *Malassezia pachydermatis* através do seu perfil enzimático.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 30 isolados de *M. pachydermatis*: 24 amostras genotipadas como subtipo A1, isoladas de cães, provenientes do Hospital de Clínicas Veterinárias-UFRGS, processadas no Setor de Micologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS); e 6 amostras, também isoladas de cães, provenientes da cidade de Cuiabá, MT, processadas no Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

A possibilidade de produção de 19 enzimas extracelulares pela levedura foi verificada através da utilização do método semi-quantitativo Api-Zym[®] (BioMérieux, São Paulo, Brasil). As seguintes atividades enzimáticas foram testadas: fosfatase alcalina, esterase (C₄), esterase lipase (C₈), lipase (C₁₄), leucina arilamidase, valina arilamidase, cistina arilamidase, tripsina, quimotripsina, fosfatase ácida, naftol-AS-BI-fosfohidrolase, α -galactosidase, β -galactosidase, β -glicuronidase, α -glicosidase, β -glicosidase, N-acetil- β -glicosaminidase, α -mannosidase e α -fucosidase.

O inóculo foi preparado a partir do subcultivo das amostras em meio de Dixon modificado, e após 48h de incubação em estufa CO₂ a 37°C, quantificou-se por espectrofotometria. Para isso as amostras foram quantificadas em tubos contendo 5 ml de solução salina estéril a 0,085%, e a leitura feita em um comprimento de onda de 530 nm e transmitância de 85% (M27-A2, NCCLS, 2002).

Cada poço do sistema Api-Zym[®] foi inoculado com 65 μ l da solução e a incubação realizada dentro de 4h a uma temperatura de 37°C. Após esse período, adicionou-se uma gota de reagente Zym A (2,5 g de Trysma base, 1,1 ml de ácido clorídrico 37%, 1,0 g lauril sulfato de sódio e 10 ml de água destilada esterilizada) e Zym B (0,04 g de “Fast blue BB” e 10 ml de metoxietanol) a cada poço. A partir da estabilização das colorações, a leitura foi efetuada, anotando-se os resultados (escala

arbitrária de 0 a 5) conforme a intensidade da cor de cada orifício, sendo “0” correspondente a uma reação negativa e “5” correspondente a uma reação de intensidade máxima.

Os resultados foram então convertidos em nanomoles (nmol) de substrato hidrolizado, conforme a seguir: 1=5 nmol, 2=10 nmol, 3=20 nmol, 4 =30 nmol, 5 \geq 40 nmol. Todas as amostras foram analisadas em triplicata.

RESULTADOS

Dentre as 30 amostras, 27 foram isoladas de cães com variadas patologias, entre elas, doenças auto-imunes: atopia (15) e pênfigo (1); dermatopatias: dermatite alérgica à picada de pulga (DAPP) (2), sarna demodécica (2) e dermatite seborréica (1); e otites (6). As três amostras restantes foram isoladas de cães que não apresentavam sinais clínicos.

As enzimas Leucina arilamidase e naftol-AS-BI-fosfohidrolase estiveram presentes em 100% das amostras. Fosfatase ácida em 96,7%, esterase 93,3%, esterase lipase 90%, β -glicosidase 46,67% e fosfatase alcalina 43,3% das amostras (Tabela 1).

As enzimas restantes foram menos presentes: valina arilamidase 40%; cistina arilamidase 30%; lipase, α -quimotripsina e α -glicosidase 26,7%; tripsina 23,3%; N-acetil- β -glicosaminidase 20%, e por fim, α -galactosidase, β -galactosidase, β -glicuronidase, α -manosidase e α -fucosidase detectadas em 10% de todas as amostras.

Tabela 1 – Isolados de *M. pachydermatis* classificados pela origem, doença do cão que deu origem ao isolado e atividade enzimática analisada através do sistema Api-Zym®.

Isolado	Origem	Doença	FAL	E	EL	L	LA	VA	CA	T	α Q	FA	N	α GA	β GA	β GL	α G	β G	NA	α M	α F
38AM	UFR/CE	Atopia	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
64AM	UFR/CE	Atopia	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
70AM	UFR/CE	Atopia	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
91AM	UFR/CE	Atopia	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
98AM	UFR/CE	Atopia	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
13BM	UFR/CE	Atopia	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
19BM	UFR/CE	Atopia	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
39BM	UFR/CE	Atopia	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
95BM	UFR/CE	Atopia	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
97BM	UFR/CE	Atopia	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
102BM	UFR/CE	Atopia	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
22CM	UFR/CE	Atopia	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
47CM	UFR/CE	Atopia	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
63CM	UFR/CE	Atopia	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
113CM	UFR/CE	Atopia	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
189M	Cuiabá	Otite	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
414M	Cuiabá	Otite	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
528M	Cuiabá	Otite	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
564M	Cuiabá	Otite	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
570M	Cuiabá	Otite	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
589M	Cuiabá	Otite	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
12AM	UFR/CE	DAPP*	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
115CM	UFR/CE	DAPP*	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
49AM	UFR/CE	SD*	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
86AM	UFR/CE	SD*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-
99AS	UFR/CE	Ausente	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
114AS	UFR/CE	Ausente	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
175CS	UFR/CE	Ausente	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
37BM	UFR/CE	DS*	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
84CM	UFR/CE	Pérfigo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

*DAPP=Dermatite Alérgica à Picada de Pulga -*SD=Sarna demodécia -*DS=Dermatite seborréica
 N(Naftol-AS-BI-Fosfohidrolase) – LA(Leucina Arilamidase) – FA(Fosfatase Ácida) – E(Esterase)
 EL(Esterase Lipase) – VA (Valina Arilamidase) – β G (β -Glicosidase) – FAL (Fosfatase Alcalina)
 CA(Cistina Arilamidase) – α G(α -Glicosidase) – α Q(α -Quimotripsina) – T(Tripsina) – L(Lipase)
 NA (N- Acetil- β -Glicosaminidase) – β GA (β -Galactosidase) – α GA (α -Galactosidase)
 β GL (β -Glicuronidase) – α M (α -Manosidase) – α F (α -Fucosidase).

Quanto à produção enzimática, os resultados obtidos foram: fosfatase ácida 4(30 nmol); naftol-AS-BI-fosfohidrolase 3,6(24 nmol); esterase 2,3(12 nmol); leucina arilamidase 2,2(11nmol); esterase lipase 1,5(8 nmol); β -glicosidase 0,3(2 nmol); valina arilamidase 0,3(1 nmol); fosfatase alcalina 0,2(1 nmol); cistina arilamidase e α -glicosidase 0,2(1 nmol); lipase e α -quimotripsina 0,1(0,8 nmol); tripsina 0,1(0,7 nmol); N-acetil- β -glicosaminidase 0,08(0,4 nmol); e por fim, α -galactosidase, β -galactosidase, β -glicuronidase, α -manosidase e α -fucosidase 0,04(0,2 nmol) (Gráfico 1).

As amostras 47CM, 84CM e 114AS, isoladas, respectivamente, de cães com atopia, pênfigo e sem sinais clínicos; foram as que apresentaram maior produção de enzimas diferentes, totalizando 19 enzimas.

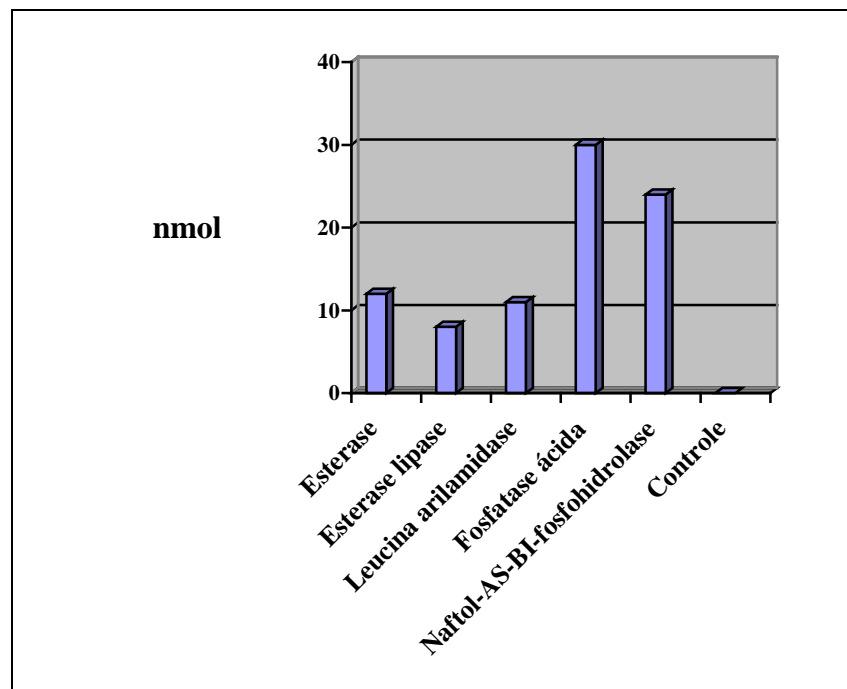


Gráfico 1 – Atividade enzimática prevalente dos isolados de *M. pachydermatis* avaliados.

DISCUSSÃO

Malassezia spp. produz muitas enzimas que contribuem para inflamação cutânea através de proteólise, lipólise (altera o filme cutâneo lipídico), alterações no pH da pele, liberação de eicosanóides e ativação do complemento (Mason, 1993).

Os mecanismos patogênicos de *M. pachydermatis* causam inflamação e prurido, os quais promovem a formação de microambientes favoráveis para a proliferação da levedura (Patterson & Frank, 2002).

Com notável exceção de *Malassezia pachydermatis*, todas as espécies conhecidas de *Malassezia* necessitam de lipídeos fornecidos externamente para seu crescimento (Brunke & Hube, 2006). Espécies lipídeo-dependentes de *Malassezia* produzem uma série de enzimas. Atividade de lipase foi demonstrada dentro da parede celular e em sítios de membrana da levedura *in vitro*, usando técnicas histoquímicas e microscopia eletrônica. Isso sugere que a enzima é sintetizada intracelularmente e exportada para a superfície celular (Catterall et al., 1978). Diversos estudos a respeito do perfil bioquímico de *M. pachydermatis* demonstraram a produção *in vitro* de várias enzimas, incluindo fosfatase ácida e alcalina, condroitina sulfatase, esterase, esterase lipase, galactosidase, glicosidase, hialuronidase, leucina arilamidase, lipase, lecitinase, peroxidase, fosfoamidase, fosfolipase, fosfohidrolase, protease e urease (Bond, 2002; Coutinho & Paula, 2000; Guillot & Bond, 1999a; Mathieson et al., 1998).

Como se acredita que proteases sejam mediadores de prurido em terminais neurais livres da pele, as mesmas liberadas pela levedura poderiam também contribuir para o prurido. *Malassezia* spp. também produzem lipases, que alteram a produção de sebo e levam à formação de ácidos graxos livres na superfície da pele. Lipídeos liberados podem ser usados para nutrição pelas leveduras, e ácidos graxos livres forneceriam proteção através da inibição de outros organismos (Chen & Hill, 2005).

Conseqüentemente, enzimas lipolíticas, tais como lipase, esterase, fosfolipase e lisofosfolipase são consideradas como estreitamente associadas à virulência de *Malassezia* spp. (Juntachai et al., 2009).

Os resultados encontrados neste estudo foram semelhantes aos apresentados por Mancianti et al. (2000), no qual analisaram 20 isolados de *M. pachydermatis* também pelo sistema Api-Zym[®], apresentando 15 atividades enzimáticas, dentre as quais esterase lipase, fosfatase ácida e naftol-AS-BI-fosfohidrolase destacaram-se entre a amostragem estudada. Esses dados confirmam a importância de esterase lipase, fosfatase ácida e naftol-AS-BI-fosfohidrolase no perfil bioquímico de *M. pachydermatis*, embora não haja estudos que comprovem a relação dessas enzimas com a patogenicidade da levedura.

Nowicki (1995) também observou alta atividade das enzimas fosfatase ácida, fosfatase alcalina e naftol-AS-BI-fosfohidrolase, durante seu estudo sobre as propriedades hidrolíticas de dermatófitos. No estudo de Kurnatowska (1998), a respeito da atividade de enzimas hidrolíticas de *Candida albicans*, as diferenças observadas foram estatisticamente significantes na atividade de esterase, leucina arilamidase, valina arilamidase, fosfatase ácida, naftol-AS-BI-fosfohidrolase, β -glicosidase e N-acetil- β -glicosaminidase.

As amostras 47CM, 84CM e 114AS foram as que apresentaram maior produção de enzimas diferentes, totalizando 19 atividades enzimáticas. Estas amostras são provenientes, respectivamente, de caninos com atopia, pênfigo e sem a presença de sinais clínicos, o que poderia exemplificar a não correlação entre maior ou menor atividade enzimática da levedura com dermatopatias específicas, embora seja necessária uma maior quantidade de isolados para sustentar tal conclusão. Coutinho & Paula (2002), ao analisar quatro enzimas, sendo elas, condroitina sulfatase, hialuronidase,

fosfolipase e protease, produzidas pela secreção do conduto auditivo de cães com otite e isoladas da pele de cães com dermatite, encontraram resultados semelhantes. Todas as 30 amostras estudadas demonstraram atividade de proteinase e condroitina sulfatase, enquanto que 29 amostras demonstraram atividade de fosfolipase e hialuronidase. Embora o estudo de Coutinho & Paula (2002) não tenha determinado o grau de influência destas enzimas na virulência em infecções por *M. pachydermatis*, sugere-se que tais enzimas contribuam para o potencial patogênico da levedura. Em contrapartida, segundo Bond (2002), maior atividade de esterase (C₄) foi detectada em suspensões celulares de cepas de *M. pachydermatis* obtidas a partir de cães saudáveis quando comparada aqueles com dermatite.

É importante ressaltar que a idade, sexo e período de amostragem não são comumente considerados fatores predisponentes para infestações por *Malassezia* em cães (Carlotti & Taillieu-Le Roy, 1997; Crespo et al., 2002), motivo pelo qual essas informações não foram incluídas neste estudo.

As maiores frequências e tamanhos de população de leveduras de *Malassezia* spp. relatados em animais com otite, comparados a animais saudáveis, indicaram que as leveduras crescem em locais de infecção e desempenham uma função na patogênese da otite externa. Os fatores relacionados com a transição das leveduras de *Malassezia* de organismos comensais para patogênicos são pouco compreendidos, mas provavelmente refletem distúrbios nos mecanismos normais físicos, químicos ou imunológicos que restringem a colonização de microorganismos na pele (Guillot & Bond, 1999b; Morris, 1999; Scott & Miller, 1995). Além disso, o crescimento em excesso da levedura em locais de infecção demonstra ser um importante fator indutor da doença, bem como a produção de fosfolipases (Cafarchia & Otranto, 2004).

CONCLUSÃO

As fosfolipases fosfatase ácida e naftol-AS-BI-fosfolipase destacaram-se tanto em presença quanto em intensidade de produção entre os isolados analisados, independente do sinal clínico associado ao animal utilizado para coleta das amostras. Esses dados também foram encontrados em estudos semelhantes, o que evidencia a relevância dessas enzimas no processo bioquímico de *M. pachydermatis*, embora sejam necessários maiores estudos para designar o papel específico de tais enzimas e determinar sua correlação com o processo patogênico da levedura.

REFERÊNCIAS

Bond, R., 2002. Pathogenesis of *Malassezia* dermatitis. In: Thoday, K.L., Foil, C.S., Bond, R. (Eds), Adv. Vet. Dermatol. Oxford, Blackwell Science Ltd. 69-75.

Brunke, S., Hube, B., 2006. MfLIP1, a gene encoding an extracellular lipase of the lipid-dependent fungus *Malassezia furfur*. Microbiology. 152, 547-554.

Buissiere, J., Fourcard, A., Colobert, L., 1967. Usage de substrats synthétiques pour l'étude de l'équipement enzymatique de microorganismes. Comptes rendus Hebdomadaires des séances de l'Académie des Sciences. 264, 415-417.

Cafarchia, C., Otranto, D., 2004. Association between phospholipase production by *Malassezia pachydermatis* and skin lesions. J. Clin. Microbiol. 42(10), 4868-4869.

Carlotti, D.N., Taillieu-Le Roy, S., 1997. L'otite externe chez le chien: etiologie et clinique, revue bibliographique et étude retrospective portant sur 752 cas. Prat. Med. Chir. Anim. Comp. 32, 243-257.

Catterall, M.D., Ward, M.E., Jacobs, P., 1978. A reappraisal of the role of *Pityrosporum orbiculare* in pityriasis versicolor and the significance of extracellular lipase. J. Invest. Dermatol. 71, 398-401.

Chen, T., Hill, P.B., 2005. The biology of *Malassezia* organisms and their ability to induce immune responses and skin disease. *Vet. Dermatol.* 16, 4-26.

Coutinho, S.D., Paula, C.R., 2000. Proteinase, phospholipase, hyaluronidase and chondroitin-sulphatase production by *Malassezia pachydermatis*. *Med. Mycol.* 38, 73-76.

Crespo, M.J., Abarca, M.L., Cabanes, F.J., 2002. Occurrence of *Malassezia* spp. in the external ear canals of dogs and cats with and without otitis externa. *Med. Mycol.* 40, 115-121.

Guého, E., Midgley, G., Guillot, J., 1996. The genus *Malassezia* with description of four new species. *Anton. Leeuwenhoek Int. J. Gen. M.* 69, 337-355.

Guillot, J., Bond, R., 1999a. *Malassezia pachydermatis*: a review. *Med. Mycol.* 37, 295-306.

Guillot, J., Bond, R., 1999b. *Malassezia pachydermatis*: a review. *Med. Mycol.* 4, 72-73.

Humble, M.W., King, M.W., Phillips, I., 1977. Api Zym: a simple rapid system for the detection of bacterial enzymes. *J. clin. Pathol.*, 30, 275-277.

Juntachai, W., Oura, T., Murayama, S.Y., Kajiwara, S., 2009. The lipolytic enzymes activities of *Malassezia* species. *Med. Mycol.* 47, 477-484.

Kurnatowska, A.J., 1998. Activity of hydrolytic enzymes of *Candida albicans* strains isolated from patients with periodontal and membrane mucosae of oral cavity diseases. *Med. Mycol.* 141, 105-109.

Leite, C.A.L., Abreu, V.L.V., Costa, G.M., 2003. Frequência de *Malassezia pachydermatis* em otite externa de cães. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.* 55, 102-104.

Machado, M.L.S., Appelt, C.E., Ferreiro, L., Guillot, J., 2003. Otites e dermatites por *Malassezia* spp em cães e gatos. *Clínica Veterinária*. 44, 27-34.

Mancianti, F., Rum, A., Nardoni, S., Corazza, M., 2000. Extracellular enzymatic activity of *Malassezia* spp. isolates. *Mycopathologia*. 149, 131-135.

Mason, K.V., 1993. Cutaneous *Malassezia*. In: Griffin, C.E., Kwochka, K.W., MacDonald, R.W. (Eds), *Current Veterinary Dermatology*. Mosby Year Book, Saint-Louis, 44-48.

Mathieson, I., Fixter, L.M., Little, C.J.L, 1998. Enzymatic activity of *Malassezia pachydermatis*. In: Kwochka, K.W., Willemsse, T., von Tscherner, C.V. (Eds), *Adv. Vet. Dermatol.* Oxford, Butterworth Heinemann. 3, 532-533.

Morris, D.O., 1999. *Malassezia* dermatitis and otitis. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 29, 1303-1310.

NCCLS. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras; Norma Aprovada - Segunda Edição. NCCLS document M27-A2 [ISBN 1-56238-469-4]. NCCLS, Estados Unidos, 2002.

Nowicki, R., 1995. Differences in the hydrolytic activity of dermatophytes. *Mikol. Lek.* 2, 209-213.

Patterson, A.P., Frank, L.A., 2002. How to diagnose and treat *Malassezia* dermatitis in dogs. *Vet. Med. US.* 612-623.

Scott, D.W., Miller, W.H., 1995. (5th ed.) WB Saunders, Philadelphia.

Sidrim, J.J.C., Moreira, J.L.B., 1999. *Fundamentos Clínicos e Laboratoriais da Micologia Médica*. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro

4. DISCUSSÃO

Fungos desempenham importantes funções como simbioses, patógenos e sapróbicos. Para isto, eles precisam secretar enzimas capazes de decompor várias substâncias orgânicas. Isto permite às enzimas secretadas escapar ao exterior onde elas podem degradar macromoléculas orgânicas tais como amido ou celulose (COCHRANE, 1958). As enzimas são proteínas essenciais para o sistema metabólico de todos os organismos vivos e têm um importante papel na degradação de matéria orgânica, em infecção de hospedeiros e deterioração de alimentos (LEHNINGER, 1988).

A patogênese de microorganismos fúngicos está relacionada a vários fatores. Entre eles, aderência, dimorfismo, toxina e produção de enzimas, bem como, a composição da superfície celular são as mais importantes (ODDS, 1988). Enzimas hidrolíticas extracelulares podem contribuir para a invasividade e proliferação fúngica por causar danos às células hospedeiras e fornecer materiais degradados como nutrientes para os organismos principalmente em micoses superficiais (OGAWA & TSUOBI, 1997).

Disfunção imunológica (imunidade celular, secreção de IgA) poderia também promover crescimento de *Malassezia* spp. na pele. Por exemplo, a displasia epidermal do West Highland White Terrier poderia ser associada com a predisposição genética à pobre resposta de células T contra a levedura (SCOTT et al., 2001).

Ran et al. (1993) demonstraram a atividade de lipase em fração insolúvel de *M. furfur*, relatando que os perfis de lipase eram similares aos de lipase de *Candida rugosa*. Plotkin et al. (1996) detectaram atividade de lipase no sobrenadante da cultura de *M. furfur*, bem como em sua fração insolúvel ligada à parede celular, e também demonstraram que a lipase poderia ser separada em três picos principais pela cromatografia, o que evidenciou a existência de três lipases diferentes. Baseado nisso, a metodologia do sistema Api-Zym[®] torna-se questionável, pois não avalia a multiplicidade de uma mesma enzima, nem a multiplicidade de suas atividades, conforme o substrato utilizado na reação. Além disso, a interpretação dos dados obtidos pelo kit comercial é através da visualização da intensidade da coloração das reações, isto é, uma interpretação um tanto quanto subjetiva.

Sabe-se que a dependência lipídica de *Malassezia* spp. é devido a um defeito na síntese de ácido mirístico, o qual serve como precursor da cadeia de ácidos graxos (PORRO et al., 1976; SHIFRINE & MARR, 1963). Contudo, a membrana celular

consiste principalmente de lipídeos (MITTAG, 1995), e acredita-se que ela esteja envolvida no processo de patogênese do microorganismo. Semelhante à cápsula de polissacarídeos de *Cryptococcus neoformans* (ELLERBROEK et al., 2004), essa camada lipídica parece proteger *M. furfur* da fagocitose (ASHBEE & EVANS, 2002) e regular a resposta imune inflamatória (KESAVAN et al., 2000). Além disso, a adesão às células hospedeiras pode ser mediada pela hidrofobicidade da parede celular rica em lipídeos (MITTAG, 1995) como foi demonstrado por algumas bactérias aeróbicas corineformes (BOJAR et al., 2004). Assim, a habilidade de metabolizar lipídeos e integrar ácidos graxos à membrana celular fúngica é essencial para o crescimento e sobrevivência no ambiente do hospedeiro e contribui notavelmente para a patogenicidade de *M. furfur*. Consequentemente, as enzimas necessárias para essas atividades podem ser consideradas como fatores de virulência (BRUNKE & HUBE, 2006).

A atividade de lipoxigenase da levedura pode estar envolvida nas alterações patológicas associadas com pitiríase versicolor. Níveis aumentados de lipoperóxidos foram detectados em lipídeos de lesões de pele de pacientes com pitiríase versicolor. Os subprodutos de lipoperoxidação induzida pela atividade de lipoxigenase da levedura foram considerados a causa de danos aos melanócitos, resultando na hipopigmentação vista na pitiríase versicolor. *In vitro*, *M. furfur* também produz fosfolipases, a atividade das mesmas foi considerada a causa da liberação de ácido araquidônico a partir de linhagens celulares epiteliais humanas, um mecanismo pelo qual *Malassezia* spp. podem promover inflamação na pele (CHEN & HILL, 2005).

Em estudo preliminar, Shibata et al. (2006) tentaram isolar as lipases de *M. furfur*, levedura lipídeo-dependente, de sobrenadante em cultura contendo lipídeo. Entretanto, a atividade lipolítica no meio e a produção da enzima foram pequenas. Ao contrário, o sobrenadante da cultura de *M. pachydermatis*, levedura não lipídeo-dependente, demonstrou alta atividade enzimática, e o isolamento da enzima a partir do meio, o qual não continha lipídeos, foi mais fácil se comparado com o realizado em meios contendo lipídeos para espécies lipídeo-dependentes de *Malassezia*. Existe a possibilidade de que a baixa atividade lipolítica do sobrenadante de culturas de espécies lipofílicas de *Malassezia* seja responsável pela associação de enzimas aos componentes da parede celular. Consequentemente, em seu estudo, Shibata et al. (2006) purificou, caracterizou e clonou uma enzima lipolítica extracelular de *M. pachydermatis*, passo fundamental

para o entendimento das bases moleculares e o seu papel na virulência destes patógenos lipofílicos do gênero *Malassezia*.

Os resultados encontrados neste estudo foram semelhantes aos apresentados por Mancianti et al. (2000), no qual analisaram 20 isolados de *M. pachydermatis* também pelo sistema Api-Zym[®], apresentando 15 atividades enzimáticas, dentre as quais esterase lipase, fosfatase ácida e naftol-AS-BI-fosfohidrolase destacaram-se entre a amostragem estudada. Esses dados confirmam a importância de esterase lipase, fosfatase ácida e naftol-AS-BI-fosfohidrolase no perfil bioquímico de *M. pachydermatis*, embora não haja estudos que comprovem a relação dessas enzimas com a patogenicidade da levedura.

Lipases catalisam a hidrólise de ligações ésteres de triacilglicerídeos, desse modo, liberando ácidos graxos livres. Além do seu importante papel na biotecnologia, essas reações são questionadas como potenciais fatores de virulência em bactérias e fungos patogênicos. Outros estudos demonstram a habilidade de *M. furfur* liberar ácidos graxos a partir de diferentes lipídeos (CATTERALL et al., 1978; HAMMER & RILEY, 2000; MANCIANTI et al., 2000). Entretanto, parece que a atividade lipolítica tem mais funções do que simplesmente fornecer ácidos graxos para o crescimento celular. Lipídeos associados à parede celular parecem estar envolvidos na supressão da resposta imune pró-inflamatória (KESAVAN et al., 2000) e no impedimento da internalização e inativação por células fagocíticas (ASHBEE & EVANS, 2002; GUÉHO et al., 1998). Além disso, esses lipídeos podem participar da adesão de *M. furfur* às células hospedeiras via interações hidrofóbicas (FAERGEMANN et al., 1983; MITTAG, 1995).

Dentre as 30 amostras analisadas neste estudo, 27 foram isoladas de cães com variadas patologias, entre elas, doenças auto-imunes: atopia (15) e pênfigo (1); dermatopatias: dermatite alérgica à picada de pulga (DAPP) (2), sarna demodécica (2) e dermatite seborréica (1); e otites (6). As três amostras restantes foram isoladas de cães que não apresentavam sinais clínicos. Os isolados 47CM, 84CM e 114AS foram os que apresentaram maior produção de enzimas diferentes, totalizando 19 atividades enzimáticas. Estas amostras são provenientes, respectivamente, de caninos com atopia, pênfigo e sem a presença de sinais clínicos, o que poderia exemplificar a não correlação entre maior ou menor atividade enzimática da levedura com dermatopatias específicas, embora seja necessária uma maior quantidade de isolados para sustentar tal conclusão.

Bond et al. (1994), ao comparar a presença de *M. pachydermatis* em cães normais e atópicos, observaram maior densidade populacional dessa levedura em cães atópicos. Salientaram que os fatores que predispõem a colonização por *Malassezia* na pele de cães atópicos não estão claros, mas provavelmente envolvam anormalidades físicas, químicas e imunológicas. Em contrapartida, Bond et al. (1996) avaliaram as ocorrências raciais e doenças concomitantes num grupo de 40 cães com dermatite pruriginosa associada a populações elevadas de *M. pachydermatis*, e compararam os resultados com um grupo de 239 cães com dermatopatias diversas sem populações elevadas dessa levedura. Concluíram que os mecanismos pelos quais outras doenças permitem a multiplicação de *M. pachydermatis* ainda não são conhecidos, mas é possível que, em algumas situações, doenças concomitantes possam cursar com elevadas populações cutâneas de *M. pachydermatis*. Bond et al. (1996) também detectaram que as prevalências de doenças endócrinas, disqueratinizações e atopias não foram diferentes estatisticamente nos dois grupos e que a pele de cães atópicos, aparentemente, não é mais favorável ao desenvolvimento de *M. pachydermatis* do que a pele de cães com outras dermatopatias.

As enzimas Leucina arilamidase e naftol-AS-BI-fosfohidrolase estiveram presentes em 100% das amostras. Enquanto que, fosfatase ácida, esterase, esterase lipase, β -glicosidase e fosfatase alcalina representaram, respectivamente, 96,7%; 93,3%; 90%; 46,67% e 43,3% do total de amostras.

Fosfatase alcalina, fosfatase ácida e naftol-AS-BI-fosfohidrolase são enzimas importantes na degradação de compostos fósforo-orgânicos, como aqueles que podem estar presentes na camada lipídica da membrana plasmática das células vegetais, enquanto que, β -glicosidase atua na conversão do dissacarídeo celubiose em glicose (PERES et al., 2000). Fosfatase ácida também está relacionada com a virulência de bactérias e parasitas (BACA et al., 1993; SAHA et al., 1985), nos quais se acredita aumentar a sobrevivência dos respectivos microorganismos pela supressão da explosão respiratória de neutrófilos e pela produção de ânion superóxido (REILLY et al., 1996).

Ambas fosfatase alcalina e fosfatase ácida são consideradas enzimas sem nenhuma localização celular específica. Estudos sobre fosfatase alcalina extracelular em *Bacillus* spp. revelaram a relação entre a biosíntese desta enzima e o metabolismo de carboidratos (SHAPIROVA et al., 2000). Além disso, uma correlação significativamente positiva foi também estabelecida entre a adesão de *Candida* a células epiteliais bucais

de mamíferos e fosfatases alcalina e ácida. Estas relações, descritas primeiramente por Fernanado et al. (1999), concluem que as fosfatases de espécies de *Candida* podem desempenhar um papel crucial na potencialização de sua virulência. Já a enzima β -glicosidase pode ser tanto extracelular como intracelular (WALTON, 1994).

Esterases e lipases são caracterizados por sua habilidade de catalizar a hidrólise de ligações ésteres de mono-, di- e triacilgliceróis, bem como de fosfolipídeos. Os ácidos graxos da pele, secretados por glândulas sebáceas, podem ser considerados como o principal mecanismo de defesa local, e determinadas cadeias ramificadas de ácidos graxos têm propriedades fungistáticas e bactericidas. A ampla atividade lipolítica de *C. albicans* é relatada como um importante fator para a persistência e virulência desta levedura em tecido humano (SCHALLER et al., 2005).

CHEN et al. (1997), através do sistema Api-Zym[®], detectaram atividade de fosfatase ácida em sobrenadantes de culturas de *Cryptococcus neoformans*, confirmando relatos anteriores desta atividade na respectiva levedura (KALINA et al., 1970; MAHVI et al., 1974; CASAL & LINARES, 1983; DE REUCK et al., 1986). Além de fosfatase ácida, também identificaram diversas atividades enzimáticas extracelulares e intracelulares de *C. neoformans*, incluindo atividades lipolíticas e esterolíticas que podem facilitar a infecção fúngica e a invasão nas células do hospedeiro.

Conforme estudo de Machado et al. (2010) a maior atividade de fosfolipase foi detectada em culturas de *M. pachydermatis* a partir de caninos com lesões de pele, e sustenta a hipótese de uma associação entre produção de fosfolipase e seu efeito patológico. Além da possibilidade da produção de fosfolipase por *M. pachydermatis* e a ocorrência de lesões da pele poderem estar relacionadas com β -endorfina e/ou composição química da pele, o que pode regular a expressão de mecanismos de receptores opióides sobre as células de *M. pachydermatis*. Entretanto, nenhuma diferença foi encontrada na relação entre graus de danificação da pele e produção de fosfolipase. Estes dados sugerem que embora a atividade de fosfolipase possa desempenhar um papel nas ocorrências de dermatopatias, não parece estar relacionada à severidade das lesões. Assim, Machado et al. (2010) demonstraram que a composição bioquímica da pele canina pode diferir, dependendo do sítio da pele e sua saúde e integridade, e isso pode influenciar no papel patogênico de *M. pachydermatis*.

Portanto, é provável que uma série de fatores micro ambientais sobre a pele (incluindo flora bacteriana, pH, sais, resposta imune, bioquímica e fisiologia)

desempenham um significativo papel na aderência, estabelecimento e crescimento desta levedura (CAFARCHIA et al., 2008a). Também, é especulado que *Malassezia* spp. tem a habilidade paradoxal de tanto estimular como suprimir a resposta imune diretamente contra si, a qual se manifesta como um equilíbrio entre comensalismo e patogenicidade (ASHBEE, 2007).

Por fim, HUMBLE (1977) demonstrou que o kit comercial Api-Zym[®] é uma ferramenta importante para detecção de atividades enzimáticas específicas, e que os padrões obtidos podem ser úteis na taxonomia e tipificação de bactérias. Diversos estudos (BRASCH & ZALDUA, 1994; FERNANADO et al., 1999; SÁENZ-DE-SANTAMARÍA et al., 2006; SCHALLER et al. 2005) confirmam sua utilidade em micologia. Resultados de Schwan-Estrada et al. (1997) permitem concluir que este sistema pode ser utilizado para seleção, identificação e caracterização preliminar de microorganismos até em nível de isolados. O presente estudo não concluiu a viabilidade do sistema Api-Zym[®] para a caracterização de *M. pachydermatis*, pois além de ser um método de avaliação subjetiva, não considera a multiplicidade de uma mesma enzima, que pode apresentar atividades diferentes conforme o substrato.

5. CONCLUSÕES

- 1- Os 30 isolados de *Malassezia pachydermatis* avaliados neste estudo apresentaram maior produção de enzimas pertencentes ao grupo das peptídeo hidrolases (100%), fosfohidrolases (98,3%) e éster hidrolases (91,6%).
- 2- As enzimas avaliadas leucina arilamidase e naftol-AS-BI-fosfohidrolase foram detectadas em 100% das amostras, fosfatase ácida em 96,7%, esterase em 93,3% e esterase lipase em 90%.
- 3- Em relação à intensidade da atividade enzimática entre as amostras analisadas, fosfatase ácida apresentou 30 nmol, naftol-AS-BI-fosfohidrolase 24 nmol, esterase 12 nmol, leucina arilamidase 11 nmol e esterase lipase 8 nmol.
- 4- Não houve diferença na produção enzimática entre as amostras provenientes de cães com sinais clínicos e sem sinais clínicos.

REFERÊNCIAS

- AHMAN, S.; PERRINS, N.; BOND, R. Carriage of *Malassezia spp.* yeasts in health and seborrhoeic Devon Rex cats. **Medical Mycology**, v. 45, p. 449-445, 2007.
- AIZAWA, T.; KANO, R.; NAKAMURA, Y.; WATANABE, S.; HASEGAWA, A. The genetic diversity of clinical isolates of *Malassezia pachydermatis* from dogs and cats. **Medical Mycology**, v. 39, p. 329-334, 2001.
- ANGULO-VALADEZ, C.E.; CEPEDA-PALACIOS, R.; ASCENCIO, F.; JACQUIET, P.; DORCHIES, P.; ROMERO, M.J.; KHELIFA, R.M. Proteolytic activity in salivary gland products of sheep bot fly (*Oestrus ovis*) larvae. **Veterinary Parasitology**, v. 149, p.117-25, 2007.
- ASHBEE, H.R.; FRUIN, A.; HOLLAND, K.T.; CUNLIFFE, W.J.; INGHAM, E. Humoral immunity to *Malassezia furfur* serovars A, B and C in patients with pityriasis versicolor, seborrhoeic dermatitis and controls. **Experimental Dermatology**, v. 3, p. 227-233, 1994a.
- ASHBEE, H.R.; INGHAM, E.; HOLLAND, K.T.; CUNLIFFE, W.J. Cell-mediated immune response to *Malassezia furfur* serovars A, B and C in patients with pityriasis versicolor, seborrhoeic dermatitis and controls. **Experimental Dermatology**, v. 3, p. 106-112, 1994b.
- ASHBEE, H.R.; EVANS, E.G.V. Immunology of diseases associated with *Malassezia* species. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, p. 21-57, 2002.
- ASHBEE, H.R. Recent development in the immunology and biology of *Malassezia* species. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 47, p. 14-23, 2006.
- ASHBEE, H.R. Update on the genus *Malassezia*. **Medical Mycology**, v. 45, p. 287-303, 2007.
- BACA, O.G.; ROMAN, M.J.; GLEW, R.F.; CHRISTNER, J.E.; BUHLER, A.S. Acid phosphatase activity in *Coxiella burnetii*: a possible virulence factor. **Infection and Immunity**, v. 61, p. 4232-4239, 1993.
- BENHAM, R.W. The cultural characteristics of *Pityrosporum ovale* – a lipophilic fungus. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 2, p. 187-203, 1939.
- BENSIGNOR, E.; JANKOWSKI, F.; SEEWALD, W. et al. Comparison of two sampling techniques to assess quantity and distribution of *Malassezia* yeasts on the skin of Basset Hounds. **Veterinary Dermatology**, v. 13, p. 237-241, 2002.
- BLANCO, J.L.; GUEDEJA-MARRON, J.; BLANCO, I.; GARCIA, M.E. Optimum incubation conditions for the isolation of yeasts from canine otitis externa. **Journal of Veterinary Medicine B**, v. 47, p. 599-605, 2000.

- BOJAR, R.A.; TUE, C.J.; HOLLAND, K.T. The effect of lipids on the adherence of axillary aerobic coryneform bacteria. **Letters in Applied Microbiology**, v. 38, p. 470-475, 2004.
- BOND, R.; COLLIN, N.S.; LLOYD, D.H. Use of contact plates for the quantitative culture of *Malassezia pachydermatis* from canine skin. **Journal of small animal practice**, v. 35, n. 2, p. 68-72, 1994.
- BOND, R.; SAIJONMAA-KOULUMIES, L.M.; LLOYD, D.H. Population sizes and frequency of *Malassezia pachydermatis* at skin mucosal sites on healthy dogs. **Journal of Small Animal Practice**, v. 36, p. 147-150, 1995.
- BOND, R.; FERGUSON, E.A.; CURTIS, C.F.; CRAIG, J.M.; LLOYD, D.H. Factors associated with elevated cutaneous *Malassezia pachydermatis* populations in dogs with pruritic skin disease. **Journal of Small Animal Practice**, v. 37, n. 3, p. 103-107, 1996.
- BOND, R.; LLOYD, D.H. Skin and mucosal populations of *Malassezia pachydermatis* in health and seborrhoeic Basset Hound. **Veterinary Dermatology**, v. 8, p. 101-106, 1997.
- BOND, R. Pathogenesis of *Malassezia pachydermatis*. In: Thoday, K.L.; Foil, C.S.; Bond, R. (Eds). **Advances in Veterinary Dermatology**, Oxford: Blackwell Science Ltd, p. 69-75, 2002.
- BRASCH, J.; ZALDUA, M. Enzyme patterns of dermatophytes. **Mycoses**, v. 37, p. 11-16, 1994.
- BRUNKE, S.; HUBE, B. MfLIP1, a gene encoding an extracellular lipase of the lipid dependent fungus *Malassezia furfur*. **Microbiology**, v. 152, p. 547-554, 2006.
- CABAÑES, F.J.; HERNANDEZ, J.J.; CASTELLA, G. Molecular analysis of *Malassezia sympodialis* – related strains from domestic animals. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 277-283, 2005.
- CAFARCHIA, C.; OTRANTO, D. Association between phospholipase production by *Malassezia pachydermatis* and skin lesions. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 4868-4869, 2004.
- CAFARCHIA, C.; GALLO, S.; DANESI, P.; CAPELLI, G.; PARADIES, P.; TRAVERSA, D.; GASSER, R.B.; OTRANTO, D. Assessing the relationship between *Malassezia* and Leishmaniasis in dogs with or without skin lesions. **Acta Tropica**, v. 107, p. 25-29, 2008a.
- CAFARCHIA, C.; GASSER, R.B.; LATROFA, M.S.; PARISI, A.; CAMPBELL, B.E.; OTRANTO, D. Genetic variants of *Malassezia pachydermatis* from canine skin: body distribution and phospholipase activity. **FEMS Yeast Research**, v. 8, p. 451-459, 2008b.

CANNON, P.F.; International Commission on the taxonomy of fungi (ICTF): name changes in fungi of microbiological, industrial and medical importance. **Microbiological Science**, v. 3, p. 285-287, 1986.

CASAL, M.; LINARES, M.J. Contribution to the study of the enzymatic profiles of yeast organisms with medical interest. **Mycopathologia**, v. 81, p. 155-159, 1983.

CATTERALL, M.D.; WARD, M.E.; JACOBS, P. A reappraisal of the role of *Pityrosporum orbiculare* in pityriasis versicolor and the significance of extracellular lipase. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 71, p. 398-401, 1978.

CHEN, T.; HILL, P.B. The biology of *Malassezia* organisms and their ability to induce immune responses and skin disease. **Veterinary Dermatology**, v. 16, p. 4-26, 2005.

COCHRANE, V.W. **Physiology of fungi**. New York: John Wiley & Sons Inc. 1958.

COUTINHO, S.D.; PAULA, C.R. Proteinase, phospholipase, hyaluronidase and chondroitin-sulphatase production by *Malassezia pachydermatis*. **Medical Mycology**, v. 38, p. 73-76, 2000.

CUNNINGHAM, A.C.; LEEMING, J.P.; INGHAM, E.; GOWLAND, G. Differentiation of three serovars of *Malassezia furfur*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 68, p. 439-446, 1990.

DAVIS, D.J.; LANTER, K.; MAKSELAN, S.; BONATI, C.; ASBROCK, P.; RAVISHANKAR, J.P.; MONEY, N.P. Relationship between temperature optima and secreted protease activities on three *Pythium* species and pathogenicity toward plant and animal hosts. **Mycological Research**, v. 110, p. 96-103, 2006.

DE REUCK, J.L.; DE COSTER, W.J.P., VAN DER EECKEN, H.M. Acid phosphatase activity of cerebrospinal fluid cells in bacterial and abacterial meningitis. **European Neurology**, v. 25, p. 362-368, 1986.

DUFAIT, R. *Pityrosporum canis* as the cause of canine chronic dermatitis. **Veterinary Medicine and Small Animal Clinician**, v. 78, p. 1055-1057, 1983.

ELLERBROEK, P.M.; WALINKAMP, A.M.; HOEPELMAN, A.I.; COENJAERT, F.E. Effects of the capsular polysaccharides of *Cryptococcus neoformans* on phagocyte migration and inflammatory mediators. **Current Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 253-266, 2004.

FAERGEMANN, J.; ALY, R.; MAIBACH, H.I. Adherence of *Pityrosporum orbiculare* to human stratum corneum cells. **Archives of Dermatological Research**, v. 275, p. 246-250, 1983.

FAERGEMANN, J. *Pityrosporum ovale* and skin diseases. **The Keio Journal of Medicine**, v. 42, p. 91-94, 1993.

FAERGEMANN, J. Atopic dermatitis and fungi. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, p. 545-563, 2002.

FERNANADO, P.H.; PANAGODA, G.J.; SAMARANAYAKE, L.P. The relationship between the acid and alkaline phosphatase activity and the adherence of clinical isolates *Candida parapsilosis* to human buccal epithelial cells. **APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v. 107, 1034-1042, 1999.

GARCIA, M.E.; BLANCO, J.L. Principales enfermedades fúngicas que afectan a los animales domésticos. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 17, S2-S7, 2000.

GHANNOUM, M.A. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, p. 122-143, 2000.

GRIFFIN, C.E. Otitis externa and otitis media. **Current Veterinary Dermatology**, Mosby Year Book, St. Louis, p. 244-262, 1993.

GUÉHO, L.; MIDGLEY, G.; GUILLOT, J. The genus *Malassezia* with description of four new species. **Antoine Van Leeuwenhoek**, v. 69, p. 337-335, 1996.

GUÉHO, E.; BOEKHOUT, T.; ASHBEE, H.R.; GUILLOT, J.; Van BELKUM, A.; FAERGEMANN, J. The role of *Malassezia* species in the ecology of human skin and as pathogens. **Medical Mycology**, v. 36, Suppl.1, p. 220-229, 1998.

GUÉHO-KELLERMANN, E.; BOEKHOUT, T.; BEGEROW, D. Biodiversity, Phylogeny and Ultrastructure. In: Boekhout, T.; Guého-Kellermann, E.; Mayser, P.; Velegraki, A. (eds.). **Malassezia and the Skin**. Science and Clinical Practice, Springer, p. 60, 2010.

GUILLOT, J.; CHERMETTE, R.; GUÉHO, E. Prévalence du genre *Malassezia* chez les mammifères. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 4, p. 1-15, 1994.

GUILLOT, J.; GUÉHO, E. The diversity of *Malassezia* yeasts confirmed by rRNA sequence and nuclear DNA comparisons. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 67, p. 297-314, 1995.

GUILLOT, J.; BOND, R. *Malassezia pachydermatis*: a review. **Medical Mycology**, v. 37, p. 295-306, 1999.

HAMMER, K.A.; RILEY, T.V. Precipitate production by some *Malassezia* species on Dixon's agar. **Medical Mycology**, v. 38, p. 105-107, 2000.

HIRAI, A.; KANO, R.; MAKIMURA, K. et al. *Malassezia nana* sp. nov., a novel lipid-dependent yeast species isolated from animals. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 623-627, 2004.

HUMBLE, M.W.; KING, A.; PHILLIPS, I. API ZYM: a simple rapid system for the detection of bacterial enzymes. **Journal of Clinical Pathology**, v. 30, p. 275-277, 1977.

KALINA, M.; BUBIS, J.J.; KLETTER, A.S.Y.; ARONSON, M. Ultrastructural localization of acid phosphatase in the yeast *Cryptococcus neoformans*. **Experientia**, v. 26, p. 287-288, 1970.

KENNIS, R.A.; ROSSER, E.J.; OLIVIER, N.B.; WALKER, R.W. Quantity and distribution of *Malassezia* organisms on the skin of clinically normal dogs. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 208, p. 1048-1051, 1995.

KESAVAN, S.A.; WALTERS, C.E.; HOLLAND, K.T.; INGHAM, E. The effects of *Malassezia* on pro-inflammatory cytokine production by human peripheral blood mononuclear cells *in vitro*. **Medical Mycology**, v. 36, p. 97-106, 1998.

KESAVAN, S.; HOLLAND, K.T.; INGHAM, E. The effects of lipid extraction on the immunomodulatory activity of *Malassezia* species *in vitro*. **Medical Mycology**, v. 38, p. 239-247, 2000.

KOWALSKI, J.J. The microbial environment of the ear canal in health and disease. **Veterinary Clinical North American: Small Animal Practice**, v. 18, p. 734-754, 1988.

LARSSON, C.E.; LARSSON, M.H.M.A.; PAULA, C.R.; FEIGL, M.H. Dermatite por *Pityrosporum pachydermatis* Weidman 1925 em um cão do estado de São Paulo. In: Congresso Estadual de Medicina Veterinária, Congresso Nacional de Clínicos de Pequenos Animais, Encontro Sul Brasileiro de Médicos Veterinários, 6, 1979. Gramado. **Anais**. Porto Alegre: SOVERGS, 1979, p. 49.

LARSSON, C.E.; LARSSON, M.H.M.A.; AMARAL, R.C.; GANDRA, G.R.P.; HAGIWARA, M.K.; FERNANDES, M.R. Dermatitis in dogs caused by *Malassezia (Pityrosporum) pachydermatis*. **Ars Veterinaria**, v. 4, n. 1, p. 63-68, 1988.

LEHNINGER, A.L. **Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Sarvier. 1988.

LIMA, V.A.; AQUARONE, E.; BARZANI, V. **Biotecnologia – tecnologia das fermentações**. São Paulo: Edgard Blücher. 1986. 285 pp.

MACDONALD, F.; ODDS, F.C. Virulence for mice of a proteinase-secreting strain of *Candida albicans* and a proteinase-deficient mutant. **Journal of Genetics Microbiology**, v. 129, p. 431-438, 1983.

MACHADO, M.L.S.; APPELT, C.E.; FERREIRO, L.; GUILLOT, J. Otites e dermatites por *Malassezia* spp. em cães e gatos. **Clínica Veterinária**, v. 44, p. 27-34, 2003.

MACHADO, M.L.S.; CAFARCHIA, C.; FERREIRO, L.; FERREIRA, R.R.; BIANCHI, S.P.; LATROFA, M.S.; PARISI, A.; OTRANTO, D. Genetic variability and phospholipase production of *Malassezia pachydermatis* isolated from dogs with diverse grades of skin lesions. **Medical Mycology**, 2010.

- MAHVI, T.A.; SPICER, S.S.; WRIGHT, N.J. Cytochemistry of acid mucosubstance and acid phosphatase in *Cryptococcus neoformans*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 20, p. 833-838, 1974.
- MANCIANTI, F.; RUM, A.; NARDONI, S.; CORAZZA, M. Extracellular enzymatic activity of *Malassezia* spp. isolates. **Mycopathologia**, v. 149, p. 131-135, 2000.
- MASON, K.V.; EVANS, A.G. Dermatitis associated with *Malassezia pachydermatis* in 11 dogs. **Journal of American Animal Hospital Association**, v. 27, p. 13-20, 1991.
- MASON, K.V. Cutaneous *Malassezia*. In: Griffin, C.E.; Kwochka, K.W.; Macdonald, J.M. (Eds). **Current Veterinary Dermatology**, Mosby Year book, St. Louis, MO, p. 44-48, 1993.
- MASON, K.V.; STEWART, L.J. *Malassezia* and canine dermatitis. In: Ihrke, P.J.; Mason, I.S.; White, S.D., eds. **Advances in Veterinary Dermatology**, Oxford: Pergamon Press, v. 2, p. 399-402, 1993.
- MATOUSEK, J.L.; CAMPBELL, K.L. *Malassezia* dermatitis. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 24, p. 224-232, 2002.
- MAUDLIN, E.A.; SCOTT, D.W.; MILLER, W.H.; SMITH, A. *Malassezia* dermatitis in the dog: a retrospective histopathological and immunological study of 86 cases (1990-95). **Veterinary Dermatology**, v. 8, p. 191-202, 1997.
- MAYSER, P; RICHIE, I. Rapid reversal of hyperpigmentation in pityriasis versicolor upon short-term topical cycloserine application. **Mycoses**, v. 52, n. 6, p. 541-543, 2009.
- MIDGLEY, G. The diversity of *Pytirosporium* (*Malassezia*) yeasts *in vivo* and *in vitro*. **Mycopathologia**, v. 106, p. 143-153, 1989.
- MITTAG, H. Fine structural investigation of *Malassezia furfur*. Part II. The envelope of the yeast cells. **Mycoses**, v. 38, p. 13-21, 1995.
- MOORE, M. *Malassezia furfur* the cause of tinea versicolor: cultivation of the organism and experimental production of the disease. **Archives of Dermatology**, v. 41, p. 253-261, 1940.
- MOORE, R.T. Taxonomic proposals for the classification of marine yeasts and other yeasts-like fungi including the smuts. **Botanica Marina**, v. 23, p. 361- 373, 1980.
- MORRIS, D.O.; ROSSER, E.J. Immunologic aspects of *Malassezia* dermatitis in patients with canine atopic dermatitis. In: **Proceedings of the 11th Annual Meeting American Academy of Veterinary Dermatology, American College of Veterinary Dermatology, Santa Fe, USA, 1995.**

MUSE, R. *Malassezia* dermatitis. In: BONAGURA, R. (Ed). Current Veterinary Therapy XIII. **Small Animal Practice**. Philadelphia, PA: WB Saunders, p. 574-577, 2000.

NEGRE, A.; BENSIGNOR, E.; GUILLOT, J. Evidence-based veterinary dermatology: a systematic review of interventions for *Malassezia* dermatitis in dogs. **Journal compilation**, v. 20, p. 1-12, 2008.

ODDS, F.C. *Candida* and candidosis. In: Odds, F.C. (Ed). 2nd Edition, Baillière Tindall: London, p. 67-99, 1988.

OGAWA, H.; TSUOBI, R. Fungal enzymes related to the pathogenesis of mycoses. In: Jackobs, P.H.; Nail, L. (Eds). **Fungal Disease: Biology, Immunology and Diagnosis**. Marcel Dekker: New York, p. 191-207, 1997.

ORDEIX, L.; GALEOTTI, F.; SCARAMPELLA, F.; DEDOLA, C.; BARDASÍ, M.; ROMANO, E.; FONDATI, A. *Malassezia* spp. overgrowth in allergic cats. **Veterinary Dermatology**, v. 18, p. 316-323, 2007.

PAPINI, R.; MANCIANTI, F. Extracellular enzymatic activity of *Microsporum canis* isolates. **Mycopathologia**, v. 132, p. 129-132, 1996.

PENNACCHIA, C. et al. Isolation of *Saccharomyces cerevisiae* strains from different food matrices and their preliminary selection for a potential use as probiotics. **Journal of Applied Microbiology**, v. 105, 1919-1928, 2008.

PERES, A.P.; MACHADO, J.C.; CHITARRA, A.B.; LIMA, L.C.O. Perfil enzimático de fungos associados à podridão peduncular do mamão. **Ciências Agrotécnicas**, v. 24, n. 1, p. 295-299, 2000.

PLANT, J.D.; ROSENCRANTZ, W.S.; GRIFFIN, C.E. Factor associated with and prevalence of high *M. pachydermatis* number on dog skin. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 201, p. 879-882, 1992.

PLOTKIN, L.I.; SQUIQUERA, L.; MATHOV, I.; GALIMBERTI, R.; LEONI, J. Characterization of the lipase activity of *Malassezia furfur*. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 34, p. 43-48, 1996.

PORRO, M. N.; PASSI, S.; CAPRILL, F.; NAZZARO, P.; MORPURGO, G. Growth requirements and lipid metabolism of *Pityrosporum orbiculare*. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 66, p. 178-182, 1976.

RAN, Y.; YOSHIKE, T.; OGAWA, H. Lipase of *Malassezia furfur*: some properties and their relationship to cell growth. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 31, p. 77-85, 1993.

RAVISHANKAR, J.P.; DAVIS, C.M.; DAVIS, D.J.; MACDONALD, E.; MAKSELAN, S.D.; MILLWARD, L.; MONEY, N.P. Mechanics of solid tissue invasion by the mammalian pathogen *Pythium insidiosum*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 34, p. 167-175, 2001.

REILLY, J.J.; BARON, G.S.; NANO, F.E.; KUHLENSCHMIDT, M.S. Characterization and sequence of a respiratory burst inhibiting acid phosphatase from *Francisella tularensis*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 10973-10983, 1996.

RICHARDSON, M.D.; SHANKLAND, G.S. Enhanced phagocytosis and intracellular killing of *Pityrosporum ovale* by human neutrophils after exposure to ketoconazole is correlated to changes of the yeast cell surface. **Mycoses**, v. 34, p. 29-33, 1991.

ROSSYCHUCK, R.A.W. Management of otitis externa. **Veterinary Clinical North American: Small Animal Practice**, v. 24, p. 921-995, 1994.

SÁENZ-DE-SANTAMARÍA, M.; GUI SANTES, J.A.; MARTÍNEZ, J. Enzymatic activities of *Alternaria alternata* allergenic extracts and its major allergen (Alt a 1). **Mycoses**, v. 49, p. 288-292, 2006.

SAHA, A.K.; DOWLING, J.N.; LAMARCO, K.L.; DAS, S.; REMALEY, A.T.; OLOMU, N.; POPE, M.T.; GLEW, R.H. Properties of an acid phosphatase from *Legionella micdadei* which blocks superoxide anion production by human neutrophils. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 243, p. 150-160, 1985.

SCHALLER, M.; BORELLI, C.; KORTING, H.C.; HUBE, B. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. **Mycoses**, v. 48, p. 365-377, 2005.

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; PASCHOLATI, S.F.; KRUGNER, T.L. Caracterização enzimática de fungos pelo sistema Api-Zym. **Fitopatologia Brasileira**, v. 22, n. 3, p. 392-395, 1997.

SCOTT, D.W.; MILLER, W.H.; GRIFFIN, C.E. *Malassezia dermatidis*. **Muller and Kirk's Small Animal Dermatology**, 6th edn. Philadelphia, PA: WB Saunders, p. 363-374, 2001.

SHAPIROVA, M.R.; BALABAN, N.P.; LESHCHINSKAIA, I.B. Localization of alkaline phosphatase in *Bacillus intermedius* cells. **Mikrobiologiia**, v. 69, p. 197-202, 2000.

SHIBATA, N.; OKANUMA, N.; HIRAI, K.; ARIKAWA, K.; KIMURA, M.; OKAWA, Y. Isolation, characterization and molecular cloning of a lipolytic enzyme secreted from *Malassezia pachydermatis*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 256, p. 137-144, 2006.

SHIFRINE, M.; MARR, A.G. The requirement of fatty acids by *Pityrosporum ovale*. **Journal of General Microbiology**, v. 32, p. 263-270, 1963.

SIMMONS, R.B.; GUÉHO, E.A. A new species of *Malassezia*. **Mycological Research**, v. 94, p. 1146-1149, 1990.

SOHNLE, P.G.; COLLINS-LECH, C. Activation of complement by *Pityrosporum orbiculare*. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 80, p. 93-97, 1983.

SUGITA, T.; TAKASHIMA, M.; SHINODA, T. et al. New yeast species, *Malassezia dermatis*, isolated from patients with atopic dermatitis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 1363-1367, 2002.

SUGITA, T.; TAKASHIMA, M.; KODAMA, M.; TSUBOI, R.; NISHIKAWA, A. Description of a new yeast species, *Malassezia japonica*, and its detection in patients with atopic dermatitis and healthy subjects. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 4695-4699, 2003.

SUGITA, T.; TAJIMA, M.; TAKASHIMA, M. et al. A new yeast, *Malassezia Yamotoensis*, isolated from a patient with seborrhoeic dermatitis, and its distribution in patients and healthy subjects. **Microbiology and Immunology**, v. 48, p. 579-583, 2004.

SUZUKI, T.; OHNO, N.; OSHIMA, Y.; YADOMAE, T. Activation of the complement system, alternative and classical pathways, by *Malassezia furfur*. **Pharmaceutical and Pharmacological Letters**, v. 8, p. 133-136, 1998.

TAKAHASHI, M.; USHIJIMA, T.; OZAKI, Y. Biological activity of *Pityrosporum*. II. Antitumor and immune stimulating effect of *Pityrosporum* in mice. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 77, p. 1093-1097, 1986.

TRIGIANO, R.N.; AMENT, M.H. Detecting and measuring extracellular enzymes of fungi and bacteria. **Plant pathology: Concepts & Laboratory Exercises**, cap. 27, p. 243- 255, 2003.

WALTON, J. Deconstructing the cell wall. **Plant Physiology**, v. 104, p. 1113-1118, 1994.

WHITE, S.D.; BORDEAU, P.; BLUMSTEIN, P. et al. Comparison via cytology and culture of carriage of *Malassezia pachydermatis* in atopic and healthy dogs. In: Kwochka, K.W.; Willemse, T.; Von Tscherner, C. (eds). **Advances in Veterinary Dermatology**, Oxford, UK: Butterworth Heinemann, v. 3, p. 291-298, 1998.

ZANETTE, R.A. **Variações no perfil enzimático de isolados do oomiceto *Pythium insidiosum***. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010, 55f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) Faculdade de Veterinária. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

ANEXOS

ANEXO A – Meio de cultura Dixon modificado

Meio de Dixon modificado

EXTRATO DE MALTE	3,6%
PEPTONA	0,6%
BILE DE BOI DISSECADA (OXBILE)	2,0%
TWEEN 40	1,0%
GLICEROL	0,2%
ÁCIDO OLEICO	0,2%
ÁGAR	2,0%
CLORANFENICOL	0,5%
CICLOHEXAMIDA	0,5%
ÁGUA DESTILADA	1 L
Ph 6.0 a 30°C	