



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA  
MÉDICA

JOÃO JAIME GIFFONI LEITE

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA, PERFIL DE  
SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA E ESTOCAGEM DE  
*MALASSEZIA* spp.**

FORTALEZA/CE

2008

JOÃO JAIME GIFFONI LEITE

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA, PERFIL DE  
SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA E ESTOCAGEM DE  
*MALASSEZIA* spp.**

Dissertação submetida ao Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, do Departamento de Patologia e Medicina Legal, da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha

FORTALEZA/CE

2008

JOÃO JAIME GIFFONI LEITE

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA, PERFIL DE SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA E  
ESTOCAGEM DE *MALASSEZIA* SPP.**

Dissertação submetida ao Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, do Departamento de Patologia e Medicina Legal, da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Data da Defesa: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dr. Francisco Marlon Carneiro Feijó  
Departamento de Medicina Veterinária – Universidade Federal Rural do Semi-Árido -  
UFERSA

---

Dr. José Júlio Costa Sidrim  
Departamento de Patologia e Medicina Legal – Universidade Federal do Ceará - UFC

---

Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante  
Departamento de Patologia e Medicina Legal – Universidade Federal do Ceará - UFC

---

Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha (Orientador)  
Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias – Universidade Estadual do Ceará

À Deus por sempre iluminar e guiar meus caminhos;  
A minha mãe e minhas irmãs, por toda dedicação, orgulho e carinho;  
E ao meu pai que continua a me guardar.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Júlio Costa Sidrim, coordenador do Mestrado em Microbiologia Médica, pela sua dedicação para o funcionamento desse mestrado.

Ao Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha pelo constante apoio, paciência e disponibilidade para realização deste trabalho.

As professoras Dr<sup>a</sup>. Raimunda Sâmia Brilhante e Dr<sup>a</sup>. Rossana Aguiar Cordeiro pela dedicado trabalho ao lado de todos os alunos do Centro Especializado em Micologia Médica.

A todos os professores do mestrado, com os quais tive a oportunidade e o prazer de aprender.

Aos membros da banca: Dr. Francisco Marlon Carneiro Feijó, Dr. José Júlio Costa Sidrim e Dr<sup>a</sup>. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante por terem aceitado gentilmente a participar da avaliação desse trabalho.

À Prof. Dr<sup>a</sup>. Selene Maia de Moraes pelo fornecimento dos extratos utilizados nesse estudo.

Aos meus colegas de curso, Aracélia Gurgem Rodrigues, Luana Nepomuceno Gondim Costa Lima, Lydia Dayanne Maia Pantoja, Renato Evando Moreira Filho e Silviane Praciano Bandeira, pelo apoio e companheirismo ao longo desses meses.

A todos os que fazem, ou fizeram parte do Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM), pela participação e valiosa contribuição nesse estudo. Especialmente, a Priscila Raquel Nogueira Vieira, Érica Helena Salles Brito e Charles Ielpo Mourão.

A Terezinha do Menino Jesus (Tetê) e Daniel Teixeira Lima, técnicos do CEMM, pelo auxílio concedido para a realização desse trabalho.

A Marta Maria de Vasconcelos, secretária do curso, por estar sempre disposta a ajudar na resolução de etapas burocráticas.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro.

Aos meus familiares, especialmente minha mãe Sylvia Giffoni Leite e minha tia Maria de Fátima Braga Giffoni, pela torcida, carinho e apoio em todos os momentos.

"Nunca andes pelo caminho traçado, pois ele conduz somente aonde outros já foram."

Alexander Graham Bell

## RESUMO

O gênero *Malassezia* abrange leveduras lipofílicas e lipodependentes que, após várias mudanças em sua classificação taxonômica, compreende na atualidade 13 espécies, incluindo *M. pachydermatis*, *M. furfur*, *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. sympodialis*, *M. slooffiae*, *M. restricta*, *M. dermatis*, *M. japonica*, *M. yamatoensis*, *M. nana*, *M. caprae* e *M. equiina*. Estas leveduras estão associadas a várias enfermidades que incluem infecções, como a pitiríase versicolor ou dermatoses, dermatite seborréica e dermatite atópica, entre outras. O objetivo geral deste trabalho foi contribuir para melhor entendimento sobre a identificação fenotípica, manutenção em micoteca e sensibilidade a antifúngicos *in vitro* de *Malassezia* spp.. A fenotipagem baseou-se nas características macro e micromorfológicas, bem como análises em bioquímicas e nutricionais. Doze cepas de diferentes espécies de *Malassezia* spp. sofreram estocagem a -80°C sob óleos vegetais. A técnica de microdiluição foi realizada em caldo RPMI 1640, suplementado com bile, glicerol e *Tween* 20, sendo complementada com subcultivo em ágar Dixon, para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração fungicida mínima (CFM). As drogas testadas foram Cetoconazol (CET), Itraconazol (ITR), Fluconazol (FLU), Voriconazol (VOR), Anfotericina B (ANB) e Caspofungina (CAS). Com a análise fenotípica convencional das cepas (n=38), pode-se sugerir a presença de *M. furfur*/ *M. dermatis* (n=17), *M. sympodialis* (n=8), *M. slooffiae* (n=5) e *M. pachydermatis* (n=8). O estoque realizado em óleos vegetais a -80°C demonstrou significativas taxas de recuperação, no entanto características fisiológicas foram alteradas como β-glicosidase e assimilação de Chremophor EL. A maioria das cepas estudadas (84,21%), *M. pachydermatis* e cepas lipodependentes, foram sensíveis ao CET e ITR, obtendo valores de CIM ≤ 0,03µg/mL. Para o FLU, os valores de CIM variaram de 4 a 64µg/mL e frente ao VOR as cepas de *M. pachydermatis* obtiveram CIMs que variaram de <0,03 a 2µg/mL, enquanto as cepas lipodependentes de *Malassezia* spp. obtiveram resultados mais dispersos que variaram de <0,03 a >16µg/mL. Perante ANB, o intervalo de CIM encontrado foi de 1 a >16µg/mL. Não foi possível determinar os valores de CIM e CFM frente à caspofungina. Os extratos oriundos das sementes do abacate foram ativos contra as cepas de *M. pachydermatis*.

Palavras-chave: *Malassezia* spp., fenotipagem, criopreservação, sementes, sensibilidade antifúngica

## ABSTRACT

The genus *Malassezia* enclose lipophylic and lipid-dependent yeast that after many changes in its taxonomic classification, comprises in the atuality 13 species, including *M. pachydermatis*, *M. furfur*, *M. sympodialis*, *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. restricta*, *M. slooffiae*, *M. dermatis*, *M. japonica*, *M. yamatoensis*, *M. nana*, *M. equine*, and *M. caprae*. These yeasts are associated to several diseases including, such as pityriasis versicolor, or dermatoses, seborrheic dermatitis and atopic dermatitis, among others. The general aim of this study was to contribute to better knowledge about the phenotypical identification, storage in fungal collection and *in vitro* antifungal susceptibility of *Malassezia* spp. The phenotyping was based on macro and micromorphologics characteristics, as well as biochemistry and nutritional analisys. Twenteen strains suffers storage at -80°C in vegetables oils. The microdilution technique was accomplished in RPMI 1640 broth, supplemented with ox bile, Tween 20 and glycerol, being complemented with subculture on Dixon agar, for determination of the minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal fungicidal concentration (CFM). The drugs tested were ketoconazole (KET), itraconazole (ITR), fluconazole (FLC), amphotericin B (AMB) and caspofungine (CAS). With the conventional phenotypical analysis of the strains (n=38), could suggest the presence of the *M. furfur* / *M. dermatis* (n=17), *M. sympodialis* (n=8), *M. slooffiae* (n=5) and *M. pachydermatis* (n=8). The stored accomplished in vegetable oils at -80°C showed meaningful rate of recorver, but physiologic characteristics was modified, such as  $\beta$ -glicosidase activity and Chremophor EL assimilation. Most of the strains (84,21%) was sensitive for KET and ITR, obtaining values of  $\text{MIC} \leq 0.03\mu\text{g/mL}$ . For FLC the MIC range was 4 to  $64\mu\text{g/mL}$ , against VOR the strains of *M. pachydermatis* obtained MIC range  $<0.03$  a  $2\mu\text{g/mL}$ , therefore the lipid-dependents strains of *Malassezia* spp. obtained dispersive results from  $<0.03$  to  $>16\mu\text{g/mL}$ . Against ANB, the MIC range was 1 to  $>16\mu\text{g/mL}$ . It was not possible determinate the MIC and MFC values for caspofungine. The extracts from avocado seeds were active against strains of *M. pachydermatis*.

Key-words: *Malassezia* spp., phenotyping, cryopreservation, seeds, antifungal suceptibility

# ÍNDICE

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	17
1.1 Histórico .....	17
1.2 Características estruturais, fisiológicas e bioquímicas do gênero <i>Malassezia</i>	20
1.3 Características fisiológicas utilizadas nas chaves de identificação para <i>Malassezia</i> spp .....	22
1.3.1 Capacidade de crescimento em ágar Sabouraud simples .....	24
1.3.2 Assimilação de <i>Tweens</i> .....	24
1.3.3 Atividade de catalase .....	24
1.3.4 Atividade de urease .....	24
1.3.5 Atividade de β-glicosidase (hidrólise da esculina) .....	27
1.3.6 Assimilação de Chemophor EL .....	27
1.3.7 Crescimento a 40°C .....	28
1.4 Classificação taxonômica de espécies do gênero <i>Malassezia</i> .....	28
1.5 Características morfológicas e fisiológicas das diferentes espécies de <i>Malassezia</i> .....	28
1.5.1 <i>M. pachydermatis</i> .....	29
1.5.2 <i>M. furfur</i> .....	29
1.5.3 <i>M. sympodialis</i> .....	30
1.5.4 <i>M. globosa</i> .....	30
1.5.5 <i>M. obtusa</i> .....	31
1.5.6 <i>M. restricta</i> .....	31
1.5.7 <i>M. sloofiae</i> .....	32
1.5.8 <i>M. dermatis</i> .....	32
1.5.9 <i>M. japonica</i> .....	33
1.5.10 <i>M. yamatoensis</i> .....	33
1.5.11 <i>M. nana</i> .....	33
1.5.12 <i>M. caprae</i> .....	34
1.5.13 <i>M. equina</i> .....	34

1.6 Identificação molecular de <i>Malassezia</i> spp. ....	36
1.7 Doenças associadas às espécies de <i>Malassezia</i> .....	37
1.7 Sensibilidade antimicrobiana in vitro de <i>Malassezia</i> spp. ....	44
1.8 Impôrtancia do armazenamento de fungos em micotecas: Um enfoque para a conservação de <i>Malassezia</i> spp. ....	46
1.9 Prospecção terapêutica e biotecnológico de produtos naturais derivados de sementes de frutas: Perspectivas de uso criotecnológico e antifúngicos naturais.	49
<b>2 PERGUNTAS DE PARTIDA.....</b>	52
<b>3 HIPÓTESES CIENTÍFICAS.....</b>	53
<b>4 OBJETIVOS .....</b>	54
4.1 Objetivo geral .....	54
4.2 Objetivos específicos .....	54
<b>5 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	55
5.1 Microrganismos .....	55
5.1.1 Coleção de exemplares fúngicos do CEMM .....	55
5.1.2 Recuperação das cepas estocadas na micoteca do CEMM .....	55
5.1.3 Cepas estudadas .....	55
5.2 Identificação .....	56
5.2.1 Identificação fenotípica convencional .....	56
5.3 Avaliação do efeito crioprotetor de óleos fixos de sementes de frutas .....	57
5.3.1 Obtenção das sementes e preparação dos extratos.....	57
5.3.2 Testes pré-estocagem de <i>Malassezia</i> spp. em óleos fixos das sementes ....	57
5.3.3 Estocagem de diferentes cepas de <i>Malassezia</i> spp. em meio sólido .....	58
5.3.4 Estocagem de diferentes cepas de <i>Malassezia</i> spp. em caldo .....	58
5.3.5 Avaliação fenotípica pós-estocagem de cepas de <i>Malassezia</i> spp. ....	59
5.4 Testes de sensibilidade antifúngica <i>in vitro</i> .....	59
5.4.1 Sensibilidade <i>in vitro</i> das cepas de <i>Malassezia</i> spp. ....	59
5.4.2 Avaliação da atividade antifúngica dos extratos hexânico e metanólico da semente do abacate frente a <i>M. pachydermatis</i> , <i>Candida</i> spp. e <i>C. neoformans</i> .	61
<b>6 RESULTADOS .....</b>	63
6.1 Recuperação das cepas .....	63

6.2 Análise fenotípica .....	64
6.3 Estocagem de cepa de <i>Malassezia</i> spp. em óleos fixos de sementes (OFS) ..	67
6.4 Sensibilidade antifúngica <i>in vitro</i> das cepas de <i>Malassezia</i> spp. .....	68
6.5 Avaliação da atividade antifúngica dos extratos hexânico e metanólico da semente do abacate frente a <i>M. pachydermatis</i> , <i>Candida</i> spp. e <i>C. neoformans</i> .	71
<b>7 DISCUSSÃO .....</b>	<b>73</b>
<b>8 CONCLUSÕES .....</b>	<b>83</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>84</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>86</b>
Meios de cultura, corantes e soluções .....	95
Técnicas e testes complementares .....	101
<b>PUBLICAÇÕES .....</b>	<b>103</b>

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Blastoconídios de <i>Malassezia</i> sp. corados pelo método de Gram.	21
FIGURA 2 – Micrografia eletrônica de seção ultrafina através de célula de <i>Malassezia pachydermatis</i> antes da mitose .....	21
FIGURA 3 – Fórmula estrutural do ácido azeláico, metabólito de <i>Malassezia</i> spp. inibidor da melanogênese .....	23
FIGURA 4 – Reação de dismutação do peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	24
FIGURA 5 – Reação de hidrólise da uréia.....	25
FIGURA 6 – Reação de hidrólise da esculina.....	27
FIGURA 7 – Paciente apresentando pitiríase versicolor causada por <i>Malassezia</i> sp. .....	38
FIGURA 8 – Sinais clínicos observados em lesões de pitiríase versicolor .....	39
FIGURA 9 – Procedimento de elaboração da lâmina confeccionada com fita adesiva transparente para microscopia direta.....	40
FIGURA 10 – Tubos Ependorffs® contendo ágar Dixon, inoculado com <i>Malassezia</i> spp.....	58
FIGURA 11 – Subcultivo em ágar Dixon das concentrações de antifúngicos contidas nos poços da placa de microdiluição. .....	39
FIGURA 12 – Taxa de recuperação das cepas de <i>Malassezia</i> spp. em ágar Dixon, após diferentes tempos de estoque a -20°C.....	63
FIGURA 13 – Colônias de <i>Malassezia</i> spp. em ágar Dixon (A) e micromorfologia dos seus blastoconídios corados por Gram, evidenciando o “colarete” (B).....	64

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Características fenotípicas de <i>Malassezia</i> spp.....	35
TABELA 2 – Resultados dos testes fenotípicos das cepas de <i>Malassezia</i> spp...	66
TABELA 3 – Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) dos derivados azólicos, anfotericina B e caspofungina perante as cepas de <i>Malassezia</i> spp.....	69
TABELA 4 – Concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos das sementes de abacate ( <i>Persea americana</i> ) frente a <i>M. pachydermatis</i> , <i>Candida</i> spp. e <i>C. neoformans</i> .....	71

## **LISTA DE QUADROS**

QUADRO 1- Fórmula estrutural dos *Tweens* 20, 40, 60 e 80..... 26

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AFLP- *Amplified Fragment Length Polymorphism*

ATCC- *American Type Culture Collection*

BHI- *Brain Heart Infusion*

°C- Graus Celcius

C- Citosina

CFM- Concentração Fungicida Mínima

CIM- Concentração Inibitória Mínima

CLSI- *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CO<sub>2</sub>- Dióxido de Carbono

DGGE- *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*

DMSO – Dimetil-sulfóxido

DNA- Ácido Desoxiribonucléico

EHSPA- Extrato Hexânico das Sementes de *Persea americana*

EMSPA- Extrato Metanólico das Sementes de *Persea americana*

EROs- Espécies Reativas do Oxigênio

G- Guanina

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- Peróxido de Hidrogênio

ITS- *Internal Transcribed Spacer*

KOH- Hidróxido de Potássio

µg- Micrograma

µm- Micrômetro

mL- Mililitro

mm- Milímetro

MOPS- Ácido 3-(N-morfolino)-propanossulfônico

NCCLS- *National Committee for Clinical Laboratory*

NCYC- *National Collection of Yeast Cultures*

NH<sub>3</sub>- Amônia

PCR- *Polymerase Chain Reaction*

pH- Potencial Hidrogeniônico

O<sub>2</sub><sup>•-</sup>- Ânion Superóxido

O<sub>2</sub>- Oxigênio molecular

OFS- Óleo Fixo de Semente

•OH- Radical Hidroxil

rDNA- DNA Ribossômico

RAPD-PCR- *Random Amplification of Polymorphic DNA*

RPMI- *Roswell Park Memorial Institute*

S/A- Ágar Sabouraud

TA-Temperatura Ambiente

UFC/mL- Unidades Formadoras de Colônia por Mililitro

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Histórico

A pitiríase versicolor foi descrita, pela primeira vez em 1801 e posteriormente, em 1846, o cirurgião alemão Eichstedt reconheceu a etiologia fúngica da pitiríase versicolor, sendo considerada uma micose superficial, benigna e crônica. No entanto, o agente etiológico da pitiríase versicolor não recebeu nenhuma designação até 1853, quando Robin denomina este novo agente etiológico de “*Microsporum furfur*”, fazendo uma correlação com o dermatófito *Microsporum audouinii*, em virtude da presença de filamentos associados à levedura, denominando a enfermidade de *tinea versicolor*. A partir desta data, o fungo recebeu numerosas denominações, devido, principalmente, ao seu polimorfismo e sua associação com distintas entidades clínicas. Rivolta, em 1863, ao estudar lesões de psoríase vulgar, descreveu a presença de leveduras redondas com membrana de duplo contorno e denominou o agente de *Cryptococcus psoriasis* (VARGAS et al., 2004; CHEN, HILL, 2005). Outros estudos também classificaram este fungo como pertencentes aos gêneros *Saccharomyces*, *Pityrosporum*, *Dermatophyton* e *Monilia* (ASHBEE, EVANS; 2002).

Malassez, em 1874, realizou estudo mais preciso do fungo isolado a partir de couro cabeludo, descrevendo diferentes tipos de conídios, sem micélio em amostras de indivíduos calvos e em pacientes com pitiríase simplex ou caspa. Observou, então, a presença de fungos constituídos por células ovóides, raramente esféricas, com brotamento de 4 a 5 µm de largura, que parasitava a camada córnea da epiderme e penetrava nos folículos, sugerindo sua participação na patogenia da caspa (VARGAS et al., 2004; CHEN, HILL, 2005).

Em 1899, Baillon por discordar da origem comum dos agentes da dematofitose e da pitiríase versicolor, como acreditava Robin, e o denominou de *Malassezia furfur*, em homenagem ao micologista Malassez, que o antecedeu com trabalhos na mesma linha de pesquisa (VARGAS et al., 2004; CHEN, HILL, 2005). Em 1904, Sabouraud ratificou que a caspa era uma micose causada por uma levedura, que denominou de *Pityrosporum malassezi*, não cultivável em meios artificiais, bem como sugeriu que as formas leveduriformes e miceliais estariam relacionadas.

Castelleni e Chambers, em 1913, chamaram o fungo de *Pityrosporum ovale* (VARGAS et al., 2004; CHEN, HILL, 2005).

Em 1925, foi isolado a partir de escamas de um rinoceronte indiano com dermatite esfoliativa, um fungo que apresentava semelhança com o *P. ovale*, mas de tamanho menor (2-3 µm em comparação aos 3-8 µm do *P. ovale*). Assim, Weidman propôs o nome *Pityrosporum pachydermatis* para o organismo. Em 1927, Panja os classificou em um mesmo gênero, surgindo assim a primeira classificação taxonômica oficial que alocava dentro do gênero *Pityrosporum* duas espécies: *P. ovale* e *P. pachydermatis* (VARGAS et al., 2004).

Mesmo com a taxonomia evoluindo, havia uma problemática no cultivo da espécie lipodependente em meios artificiais, no entanto, Benham, em 1939, desvendou a dificuldade de cultivo do organismo, quando foi observado que havia uma necessidade de suplementar os meios de crescimento com “substâncias gordurosas”. Uma vez que este requisito lipídico foi estabelecido, este pesquisador preparou o caminho para a formulação de vários meios de cultura que poderiam recuperar e manter a viabilidade do organismo, permitindo que os trabalhos sobre a taxonomia, fisiologia, bioquímica do gênero fossem desenvolvidos (ASHBEE, EVANS, 2002).

Em 1951, Gordon cultivou microrganismos de formato arredondado de pacientes com pitiríase versicolor e denominou de *Pityrosporum orbiculare* (VARGAS et al., 2004; CHEN, HILL, 2005). Gustafson, em 1955, isolou leveduras de cães com otite externa e as relacionou com o gênero *Pityrosporum*, denominado-as de *P. canis* por não apresentarem a mesma lipodependência que as demais espécies do gênero. Slooff determinou que todas as espécies do gênero que não fossem lipodependentes seriam denominadas *P. pachydermatis* (VARGAS et al., 2004; CHEN, HILL, 2005). Com isso, em 1970, as leveduras do gênero *Pityrosporum*, isoladas de humanos, eram classificadas em duas espécies morfologicamente diferentes: *P. ovale*, espécie que apresentava células do tipo ovóide e eram associadas às entidades clínicas conhecidas como pitiríase *capitis* e dermatite seborréica, e *P. orbiculare*, espécie que mostrava no material clínico, células de aspecto globoso, responsáveis pela pitiríase versicolor. Ambas as espécies eram encontradas em pele sadia de humanos, fazendo parte da microbiota normal (VARGAS et al., 2004). Por último, outro espécime a ingressar ao gênero *Pityrosporum* foi o *P. pachydermatis*, que eram leveduras associadas a manifestações clínicas em animais.

Embora se aceitasse que havia um relacionamento entre a morfologia leveduriforme e filamentosa, a conversão entre estas formas não tinha sido ainda demonstrada, assim, os dois

gêneros, *Microsporum* e *Pityrosporum*, foram mantidos distintos. Esse impasse foi finalmente resolvido, em 1977, quando três grupos independentes obtiveram sucesso ao induzir a conversão de leveduras a hifas *in vitro* (DORN, ROEHNERT (1977), NAZZARO-PORRO et al. (1977), SALKIN, GORDON (1997) *apud* ASHBEE, EVANS, 2002). Estes grupos produziram hifas a partir de leveduras, que eram indistinguíveis daquelas observadas nos espécimes clínicos em pacientes com pitiríase versicolor. Observou-se também que as formas, redondas e ovais, da levedura poderiam produzir hifas, assim foi sugerido que leveduras e hifas eram simplesmente estágios do ciclo de vida de um único organismo (ASHBEE, EVANS, 2002). Deste modo, o Comitê Internacional de Taxonomia dos Fungos, em 1986, unificou os dois gêneros, *Pityrosporum* e *Microsporum*, com a aceitação do nome *Malassezia furfur*, incluindo *P. ovale*, *P. orbiculare* e *M. furfur* (VARGAS et al., 2004; CHEN, HILL, 2005).

Simmons e Guého (1990), definiram uma nova espécie, a *M. sympodialis*, com base na diferença da percentagem de guanina e de citosina no DNA (54% quando comparada com a *M. furfur* que possui 60% de G+C) e na presença de brotamento simpodial (ASHBEE, EVANS, 2002). No corrente ano, Cunningham et al. diferenciaram três sorotipos de *M. furfur* (A, B e C), os quais apresentavam diferenças macroscópicas e microscópicas que correspondiam a diferenças sorológicas determinadas por antígenos da superfície celular (ASHBEE, EVANS, 2002). Contudo, até 1990, a taxonomia do gênero *Malassezia* permanecia caótica, com diferentes grupos projetando e favorecendo seu próprio esquema de identificação. Todavia, essa iniciativa resultava na incapacidade de comparar os resultando propostos pelos diferentes grupos.

Guého et al. (1996) revisaram a taxonomia do gênero, utilizando as características morfológicas, fisiológicas e o estudo da seqüência do gene rRNA e quatro novas espécies lipodependentes foram descritas: *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. restricta* e *M. slooffiae*.

Em 2002, Nell et al., estudando *Malassezia* sp. atípicas lipodependentes isoladas de cavalos e de ruminantes, sugeriram uma nova espécie, *M. equi*, isolada da pele normal de cavalo. Contudo, sua descrição não foi validada e a cepa depositada na coleção de leveduras NCYC, tornou-se inviável. Estes fatos impossibilitaram a participação oficial desta espécie no gênero.

Entre 2002 e 2004, quatro novas espécies de *Malassezia* isoladas de homens e de animais foram incluídas no gênero, *M. dermatis* (SUGITA et al., 2002), *M. japonica* (SUGITA et al., 2003), *M. yamatoensis* (SUGITA et al., 2004) e *M. nana* (HIRAI et al., 2004), através de

análise genética das seqüências dos domínios D1/D2 da sub-unidade 26S do rDNA e a seqüência do espaçador de transcrição interno (ITS), localizada entre as regiões 5,8S e 18S.

Em 2007, em estudo com cepas lipodependente isolados de animais domésticos, algumas cepas de *Malassezia* spp. atípicas filogeneticamente relacionadas à *M. sympodialis* foram apresentadas como duas novas espécies: *M. caprae* e *M. equina*, isoladas de cabras e cavalos, respectivamente (CABAÑES et al., 2007).

## 1.2 Características estruturais, fisiológicas e bioquímicas do gênero *Malassezia*

O gênero *Malassezia* é capaz de existir em ambas as formas, levedura e hifa, sendo considerado, então, um organismo pleomórfico. A forma leveduriforme é a forma que predomina em cultura, sendo mais comumente associada à pele normal, embora hifas possam ser vistas em algumas espécies. Muitos grupos, tiveram sucesso na indução da produção de micélio *in vitro*, usando uma variedade de meios (ASHBEE, EVANS, 2002), porém nem todos os isolados de *Malassezia* spp. são capazes de sofrer esta transformação (ASHBEE, EVANS, 2002).

Espécies de *Malassezia* apresentam reprodução assexuada por brotamento monopolar ou simpodial (*M. sympodialis*), onde a célula mãe e filha são divididas por um septo, e a célula filha, após ser separada por fissão, deixa uma cicatriz ou “colarete” através do qual emergem sucessivas células filhas (Figura 1) (ASHBEE, EVANS, 2002).

A parede celular de *Malassezia* spp. é mais espessa em comparação com outras leveduras (cerca de 0,12µm) e constitui cerca de 26 a 37% do volume total da célula. O componente majoritário da parede celular são açúcares (~70%), proteína (~10%), e lipídios (15 a 20%), contendo pequenas quantidades de enxofre e de nitrogênio (ASHBEE, EVANS, 2002).

Acima da parede celular há uma camada lamelar, cuja estrutura varia de acordo com as diferentes fontes de lipídios no meio e permanece corada com sulfato de azul do Nilo, sugerindo a presença de lipídeo na sua constituição. A camada lamelar pode ter importante papel na adesão do organismo na pele de humanos e no interior de cateteres (Figura 2).

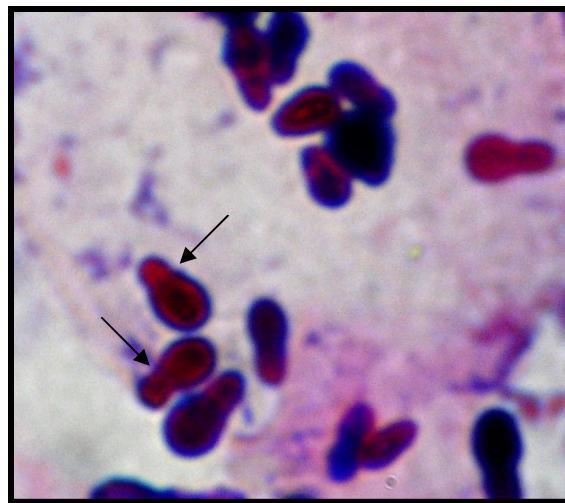


Figura 1- Bastoconídios de *Malassezia* sp. corados pelo método de Gram. As setas indicam o “colarete”, através do qual emergem sucessivos brotamentos .

Fonte: CEMM

A célula fúngica em formação contém três mitocôndrias, que aumentam de volume e de quantidade, durante o desenvolvimento celular. O núcleo possui uma membrana limitante bem definida ao redor de um nucleoplasma granular homogêneo. Os vacúolos presentes na célula contêm lipídios e variam de tamanho de acordo com a idade da célula (CHEN, HILL, 2005) (Figura 2).

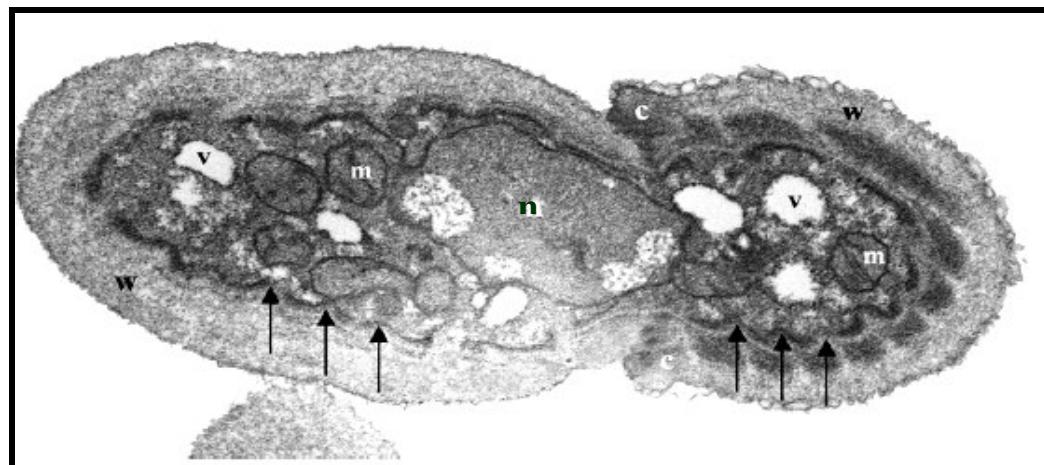


Figura 2- Micrografia eletrônica de secção ultrafina através de célula *Malassezia pachydermatis* antes da mitose. Núcleo (n) situado no brotamento, mitocôndria (m), vacúolo (v), camada lamelar da célula (w), colarete (c). As setas indicam aspecto serrilhado sobre a face interior da parede celular que corresponde as invaginações da membrana plasmática

Fonte: DAVID, GABRIEL, KOPECKA, 2007.

Em 1939, Benham notou que as espécies de *Malassezia* eram incapazes de fermentar açúcares, observando que o organismo se valia de lipídios como única fonte de carbono, bem como não possuíam requerimentos vitamínicos, microminerais ou eletrolíticos. Preferencialmente, usavam metionina como única fonte de enxofre, podendo usar também cistina ou cisteína, sendo capazes de usar muitos aminoácidos, bem como sais de amônio, como fonte de nitrogênio. Embora o organismo cresça normalmente, *in vitro*, em condições aeróbias, este também é capaz de crescer sob microaerofilia e condições anaeróbias (ASHBEE, EVANS, 2002).

O requerimento de lipídios para o crescimento de *Malassezia* spp. foi primeiramente notado, em 1939, mas não foi estudado com detalhes, até que Shifrine e Marr (1963) demonstraram a inabilidade deste organismo de formar ácidos graxos de cadeia longa, por um bloqueio na síntese do ácido mirístico, requerendo a adição de ácidos graxos ao meio artificial de cultivo. A fonte de lipídio usada durante o crescimento afetava a composição de ácidos graxos do organismo, sugerindo que os ácidos graxos não eram usados como fonte energética, mas eram incorporados diretamente aos lipídios da membrana celular. Wilde e Stewart (1968) observaram que lipídios presentes na pele humana são capazes de cumprir o requerimento lipídico do organismo (ASHBEE, EVANS, 2002).

Atividade de lipase tem sido demonstrada, *in vitro*, na parede celular e em sítios da membrana citoplasmática, usando técnica de histoquímica e de microscopia eletrônica (ASHBEE, EVANS, 2002). Isto sugere que a enzima é sintetizada no meio intracelular e exportada para a superfície da célula (ASHBEE, EVANS, 2002).

*In vitro*, as espécies de *Malassezia* também apresentam atividade de fosfolipase. Esta enzima é útil na produção de metabólitos do ácido araquidônico, em linhagem de células HEp-2, os quais estão envolvidos na inflamação cutânea, que tem sido sugerido como um mecanismo pelo qual espécies de *Malassezia* podem iniciar uma resposta inflamatória (ASHBEE, EVANS, 2002).

O gênero também é produtor de lipoxigenase, enzima capaz de produzir radicais livres do oxigênio e esterificar ácidos graxos insaturados, esqualeno e colesterol. O aumento dos níveis de lipoxigenases foi detectado em lipídios de pele lesionada, mas não em pele sadia, em pacientes com pitiríase versicolor. A resultante da produção de lipoxigenases são os danos à membrana plasmática e a interferência da atividade celular dos melanócitos, tendo como

conseqüência as alterações da pigmentação da pele, associada à pitiríase versicolor (ASHBEE, EVANS, 2002).

Culturas de *Malassezia* spp. produzem um característico odor “frutal”, descrito primeiramente por Van Abbe (1964) e análises de cromatografia de gás acoplada a espectrometria de massa dos gases emitidos em cultura de *Malassezia* spp. em meio acrescido de lipídios apresentou a presença de lactonas voláteis. Outro metabólito produzido é o ácido azeláico (Figura 3), um ácido dicarboxílico (C9), produzido quando as leveduras crescem em presença de ácido oléico. Este diácido é um inibidor competitivo de tirosinase, enzima envolvida na síntese de melanina. Além desta propriedade, o ácido azeláico possui atividade antibacteriana e antifúngica, inibe proliferação de várias linhagens de células tumorais e diminui a produção de espécies reativas de oxigênio em neutrófilos (ASHBEE, EVANS, 2002).

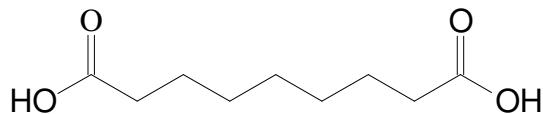


Figura 3- Fórmula estrutural do ácido azeláico, metabólito de *Malassezia* spp. inibidor da melanogênese.  
Fonte: Mayser et al., 1997.

### 1.3 Características fisiológicas utilizadas nas chaves de identificação para *Malassezia* spp.

As características macro e micromorfológicas não são suficientes para identificar as espécies de *Malassezia*, apenas sugerem o gênero, de forma que é necessária a união entre morfologia, critérios bioquímicos e moleculares para identificação (GUILLOT et al., 1996; MAKIMURA et al., 2000; MIRHEND et al., 2005).

Alguns testes são utilizados para identificação e caracterização fisiológica de *Malassezia* spp. como: capacidade de crescer em meio de cultura isento de suplementação lipídica e sob temperatura de 40°C; de assimilar Chremophor EL e Tweens 20, 40, 60, 80 e de produzir catalase, urease e  $\beta$ -glicosidase (GUÉHO, MIDGLEY, GUILLOT, 1996; GUILLOT et al., 1996; HOOG, GUARRO, FIGUEIRAS, 2000; CABANÉS et al., 2007).

### 1.3.1 Capacidade de crescer em meio de cultura sem adição de lipídios

As espécies do gênero *Malazessia* são lipodependentes, ou seja, necessitam da presença de lipídios para crescer. No entanto, a *M. pachydermatis* é uma exceção, pois é um fungo lipofílico, porém não lipodependente, sendo, assim, capaz de crescer em ágar Sabouraud sem a necessidade da adição de fonte de ácidos graxos de cadeia longa, o que a diferencia das outras espécies. Com efeito, se isolado de um espécime clínico suspeito de malasseziose crescer em ágar Sabouraud simples, já pode ser identificado como *M. pachydermatis* (GUILLOT et al., 1996).

### 1.3.2 Assimilação de *Tweens*

O *Tween* é um surfactante não-iônico, pouco tóxico para as membranas biológicas, constituído por ésteres de ácidos graxos de polioxietileno sorbitol (Quadro 1). As diferenças entre os *Tweens* está na cadeia carbônica do ácido graxo esterificado, logo os *Tweens* 20, 40, 60 e 80, possuem o ácido oléico, esteárico, palmítico e láurico, respectivamente, como os ácidos graxos correspondentes (<http://www.chemblink.com>). As espécies do gênero *Malassezia* são lipofílicas e lipodependentes, excetuando a *M. pachydermatis* e como necessitam de uma fonte exógena de lipídios, podem metabolizar os ácidos graxos destes compostos (GUÉHO, MIDGLEY, GUILLOT, 1996; GUILLOT et al., 1996).

### 1.3.3 Atividade de catalase

A catalase é uma enzima intracelular, encontrada na maioria dos microrganismos, que decompõe o tóxico peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) convertendo-o numa espécie química menos reativa ( $H_2O$ ) (ÖZYÜRET et al., 2008), segundo a reação química abaixo:



Figura 4– Reação de dismutação do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ).  
Fonte: ÖZYÜRET et al., 2008

Este teste consiste na adição de uma gota de peróxido de hidrogênio sobre a cultura fúngica. O resultado positivo, ou seja, a cepa produz catalase, é observado pela produção de bolhas de gás oxigênio. Excetuando-se a *M. restricta*, as outras espécies lipodependentes do gênero *Malassezia* spp. são produtoras de catalase, conferindo a estas espécies a decomposição do peróxido de hidrogênio. A espécie *M. pachydermatis*, pode apresentar resultados tanto negativo como positivo (CABAÑES et al., 2007).

### 2.3.1 Atividade de urease

Este teste verifica se o fungo é capaz ou não de produzir a enzima urease. Para sua realização, um fragmento da colônia fúngica é repicado para o meio uréia de Chistensen, que possui um indicador de pH, e incubado em estufa a 37°C, durante duas a quatro horas. Após este período, quando a prova é positiva, a enzima urease, produzida pelo fungo, entra em contato com o meio e hidrolisa a uréia com liberação de amônia (mostrado na reação abaixo), que aumenta pH e o indicador vira para uma coloração rósea intensa. Este teste é utilizado somente para identificação de *M. pachydermatis* (GIRÃO et al., 2004; PRADO et al., 2004).

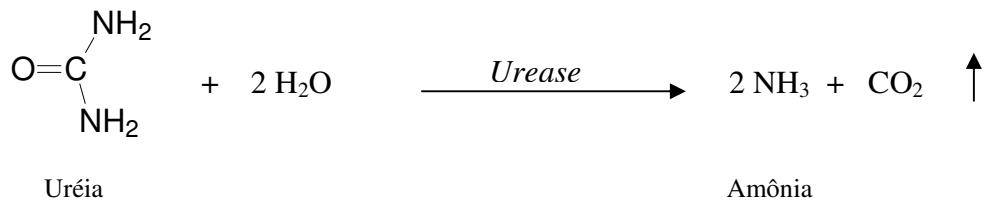
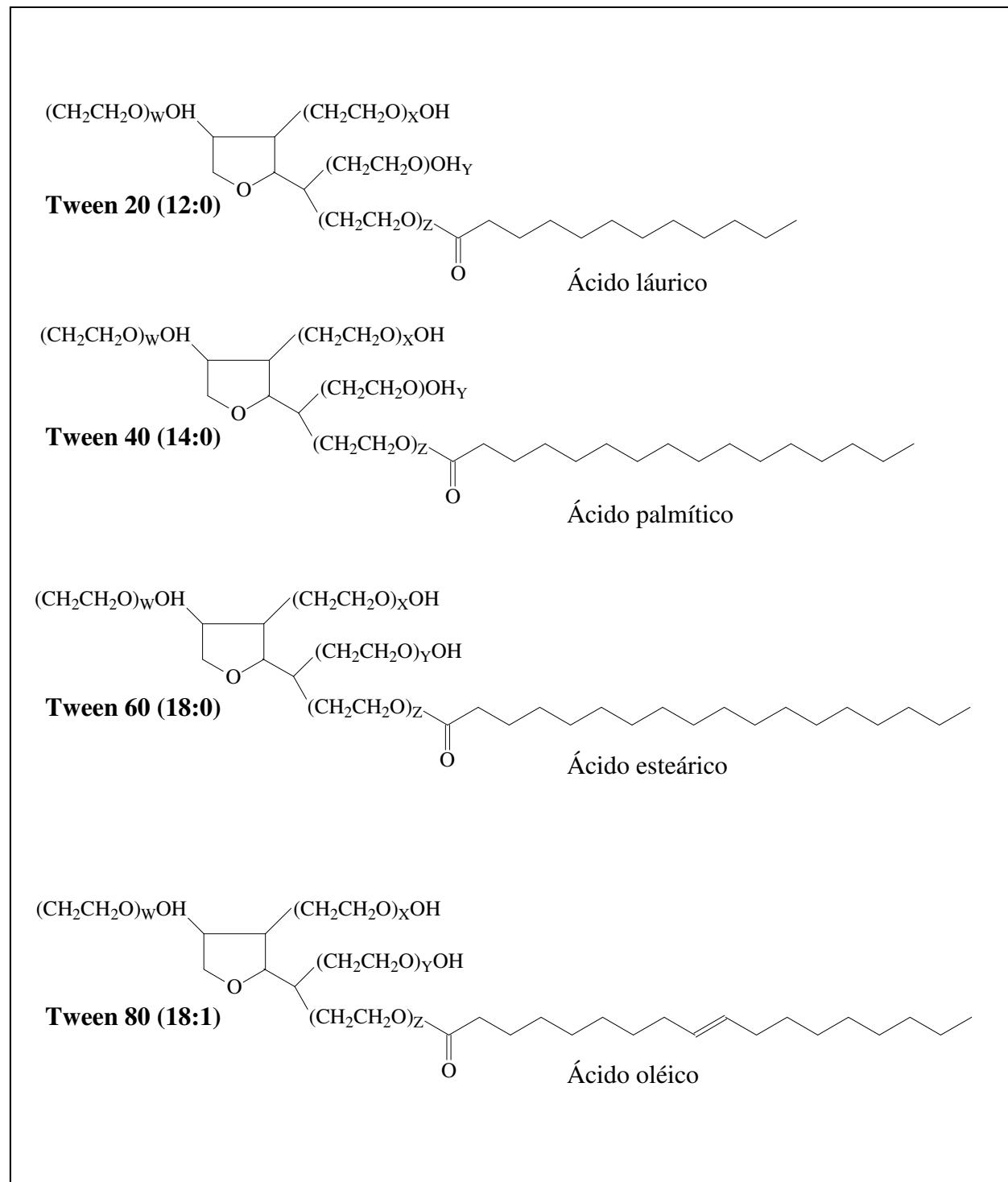


Figura 6— Reação de hidrólise da uréia.

Fonte: ROMEIRO s.d.

Quadro 1- Fórmula estrutural dos *Tweens* 20, 40, 60 e 80



Fonte: Disponível em: <http://www.chemblink.com>. Acesso em: 01 jul. 2008.

### 2.3.2 Atividade de $\beta$ -glicosidase (hidrólise da esculina)

A esculina é um açúcar complexo, fluorescente sob luz UV. Bactérias ou fungos, possuindo um sistema enzimático capaz de hidrolisá-la, provocam a formação de esculetina que, ao reagir com íons ferro, dá origem a um complexo de cor escura, não fluorescente (ROMEIRO s.d.). Algumas espécies do gênero *Malassezia* são produtoras de  $\beta$ -glicosidase (CABAÑES et al., 2007), no entanto a reação positiva para este grupo dever ser cuidadosa, pois há variação na intensidade da hidrólise da esculina, portanto deve-se ter disponível um controle negativo (tubo contendo apenas meio esculina).

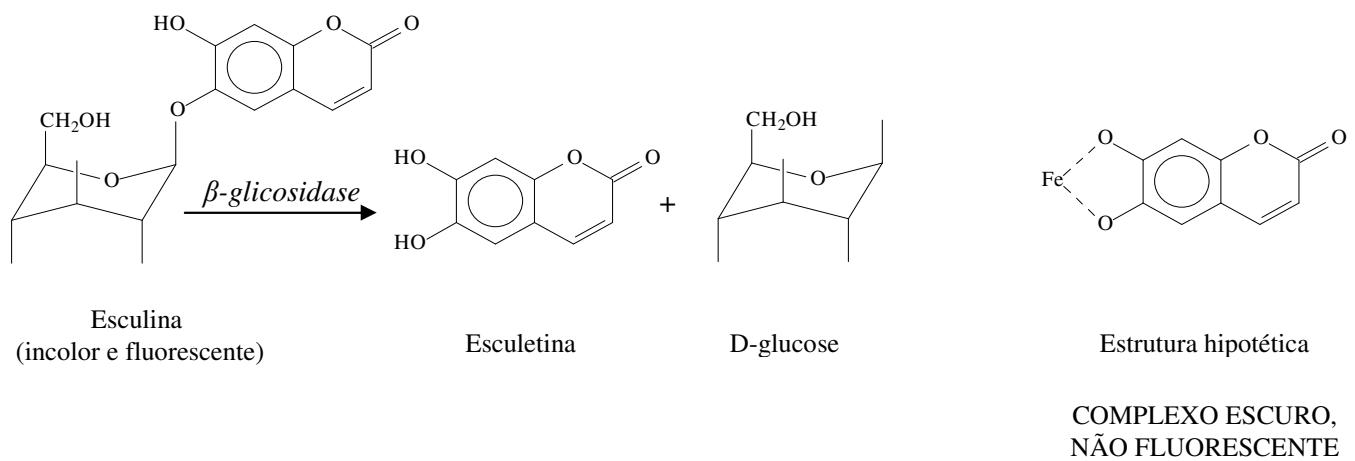


Figura 6 – Reação de hidrólise da esculina.

Fonte: ROMEIRO s.d.

### 2.3.3 Assimilação de Chremophor EL

Cremophor EL é um polietoxetileno, emulsificante não-iônico obtido por reação de óxido de etileno e do óleo de mamona, produzindo uma mistura de ácido ricinoléico, glicerol e seus éteres. O teste consiste em repicar a cepa ao ágar Sabouraud suplementado com 10% de Cremophor EL. Havendo crescimento, o teste é considerado positivo (MAYSER et al., 1997). Excetuando *M. pachydermatis*, as demais espécies de *Malassezia* são lipofílicas e lipodependentes e necessitam de uma fonte exógena de lipídios. Assim, *M. furfur*, *M. dermatitis* e *M. pachydermatis* assimilam como fonte lipídica o Chemophor EL (CABAÑES et al., 2007).

### 2.3.4 Crescimento a 40°C

Este teste é utilizado para identificação de *M. pachydermatis*, *M. furfur*, *M. sympodialis*, *M. slooffiae* e *M. dermatitis* que são as únicas adaptadas ao crescimento a 40°C, entre as espécies de *Malassezia* (CABAÑES et al., 2007).

## 1.4 Classificação taxonômica de espécies do gênero *Malassezia*

Segundo Hoog et al. (2000), o gênero *Malassezia* apresenta a seguinte classificação taxonômica:

- Reino: *Fungi*
- Divisão: *Basidiomycota*
- Classe: *Hymenomycetes*
- Ordem: *Tremellales*
- Família: *Filobasidiaceae*
- Gênero: *Malassezia*

## 1.5 Características morfológicas e fisiológicas das diferentes espécies de *Malassezia*

As espécies de *Malassezia* são semelhantes entre si, mas comumente diferenciadas por meio de critérios morfofisiológicos (GUÉHO, MIDGLEY, GUILLOT, 1996; GUILLOT et al., 1996; MIRHEND et al., 2005), nos quais são observadas as diferenças na micromorfologia e ultraestrutura de cada espécie, na atividade enzimática e suas necessidades nutricionais. No entanto, estes métodos fisiológicos consomem tempo e não são suficientemente discriminatórios, principalmente em relação às espécies recentemente identificadas. Assim os critérios moleculares, nos quais são avaliados a composição e características do seu DNA, estão se tornando ferramenta indispensável para identificação das espécies de *Malassezia* (GUPTA et al., 2000; MIRHEND et al., 2005; CANTEROS et al., 2007). Segue abaixo, as características

morfofisiológicas das 13 espécies de *Malassezia*, ainda utilizadas na identificação laboratorial (Tabela 1).

### **1.5.1 *M. pachydermatis***

Esta espécie é uma levedura zoóflica encontrada principalmente no conduto auditivo de várias espécies de animais, podendo, entretanto, ser isolada da pele de seres humanos. É um fungo lipofílico, porém não-lipodependente, sendo, assim, capaz de crescer em ágar Sabouraud sem a necessidade da adição de fonte de ácidos graxos de cadeia longa, o que o diferencia facilmente das outras espécies. Apresenta assimilação ao *Tween* 40 e fraca ou positiva ao *Tween* 80. Quanto ao *Tween* 20, pode ou não ser assimilado. Esta espécie apresenta atividade de catalase positiva ou negativa e para  $\beta$ -glicosidase (Esculina). A temperatura ideal para o seu desenvolvimento é de 37°C, e a máxima de 40°C ou 41°C (SCHLOTTFELDT et al., 2002; VARGAS et al., 2004; CABANÉS et al., 2007). Em meio Dixon (37°C) após 7 dias forma colônias foscas, com aspecto cremoso e textura macia ou friável. Na micromorfologia apresenta células ovais pequenas (2 $\mu$ m-2,5 $\mu$ m x 4 $\mu$ m-5 $\mu$ m). Os brotos, que são os maiores entre todas as espécies, surgem na base larga, onde pode ser observado um colarete ou cicatriz devido a sucessivos brotamentos (VARGAS et al., 2004; SCHLOTTFELDT et al., 2002).

### **1.5.2 *M. furfur***

É lipodependente, não cresce em ágar Sabouraud simples e necessita de suplemento de ácidos graxos de cadeia longa (C12 à C14) para seu crescimento, incluindo ácido ricinoléico e seus derivados. Cresce bem em Sabouraud enriquecido com *Tween* 20, 40, 60 e 80, na concentração de 0,1 a 10%, como único suplemento lipídico e apresenta reação de catalase positiva. A *M. furfur* é a única espécie que assimila o Cremophor EL adicionado ao meio Sabouraud. No Brasil esta espécie é a mais incidente nos casos de pitiríase versicolor (NEVES, 2005). Em relação a sua atividade  $\beta$ -glicosidase há divergência entre alguns autores, sendo considerada positiva (KANEKO et al., 2006), fracamente positiva (GUÉHO, MIDGLEY,

GUILLOT, 1996) e negativa (RENDIC, DÍAZ, FICH, 2003; VARGAS et al., 2004; CABANES et al., 2007). Esta espécie também é reconhecida por suportar crescimento a 40°C. No entanto, Canteros et al. (2007) encontraram cepas termosensíveis de *M. furfur* a esta temperatura. Em meio Dixon a 37° após 7 dias, as colônias desta espécie apresentam textura cremosa, são friáveis, convexas e de coloração branco-fosco. No exame microscópico observam-se células de variados tamanhos e formas: ovais (1,5µm-3µm), cilíndricas (2,5µm-8µm) ou esféricas (2,5µm-5µm de diâmetro). Os brotos são formados na base larga da célula, e os filamentos podem originar-se em qualquer ponto da levedura (VARGAS et al., 2004; SCHLOTTFELDT et al., 2002).

### **1.5.3 *M. sympodialis***

É uma espécie lipodependente e diferenciada de *M. furfur* devido ao seu brotamento simpodial. Não cresce em presença de *Tween* 20 e Chremophor EL como única fonte de ácidos graxos, porém cresce em meios suplementados com os *Tweens* 40, 60 ou 80 em concentrações que variam de 0,1% a 10%. A temperatura ótima de crescimento é de 37°C, podendo suportar temperaturas de até 41°C. Apresenta β-glicosidase (Esculina), characteristicamente positiva em 24 horas e reação de catalase positiva (VARGAS et al., 2004; CABANES et al., 2007). Esta espécie tem sido relacionada à microbiota humana e a quadros de pitiríase versicolor no Canadá (GUPTA et al., 2001). Em ágar Dixon após 7 dias a 37°C esta espécie apresenta colônias brilhantes, lisas, planas, com elevação central e textura macia. Na micromorfologia são observadas células ovais ou globosas, com um tamanho que varia de 1,5µm-2,5µm x 2,5µm-6µm (VARGAS et al., 2004; SCHLOTTFELDT et al., 2002).

### **1.5.4 *M. globosa***

É uma espécie lipodependente. Não cresce em ágar peptonado com glicose acrescido de 0,1% a 10% dos diversos tipos de *Tween* utilizados isoladamente como única fonte de ácidos graxos. Não cresce, ou cresce pouco, em temperatura de 37°C. Não apresenta β-glicosidase, ou seja, é Esculina-negativa, mas apresenta reação de catalase positiva. A espécie relaciona-se com a

microbiota humana e, muito freqüentemente, com quadros de pitiríase versicolor na Europa Ocidental (GAITANIS et al., 2006). Apresenta colônias elevadas, dobradas e rugosas, ásperas e quebradiças de 4 mm de diâmetro, em meio Dixon, à temperatura de 37°C após sete dias. Ao exame microscópico apresenta formato esférico que varia de 2,4 $\mu$ m a 8 $\mu$ m de diâmetro, com brotos formados na base estreita. O colarinho ou cicatriz nesta espécie não é tão proeminente como nas demais espécies de *Malassezia*. Algumas vezes pode ser observada produção de pequenos filamentos próximos ao local de formação do broto, podendo inclusive ocorrer no ponto onde a célula-mãe e a célula-filha se unem (VARGAS et al., 2004; SCHLOTTFELDT et al., 2002).

### **1.5.5 *M. obtusa***

Esta espécie apresenta um padrão fisiológico idêntico ao da *M. globosa*, diferindo apenas na capacidade de ser  $\beta$ -glicosidase, ou seja, é Esculina-positiva. Não cresce em presença dos *Tweens* 20, 40, 60 ou 80 que seja utilizado isoladamente como única fonte de ácidos graxos. Geralmente cresce a 37°C, porém não tolera temperaturas superiores a 38°C. Suas colônias são planas e lisas, e apresenta textura mucóide de 4mm, após 7 dias em ágar Dixon a 37°C. Na micromorfologia evidenciam-se células cilíndricas grandes com 1,5 $\mu$ m-2 $\mu$ m x 4 $\mu$ m-6 $\mu$ m, podendo alcançar mais de 10 $\mu$ m. Os brotos são formados na base larga da célula-mãe, enquanto que filamentos podem ser formados sobre qualquer ponto da superfície do micélio (VARGAS et al., 2004; SCHLOTTFELDT et al., 2002).

### **1.5.6 *M. restricta***

Esta espécie é bastante lipodependente bastante exigente não crescendo em presença de 0,1% a 10% dos *Tweens* 20, 40, 60 ou 80 nem Cremophor, não utilizando isoladamente como única fonte de ácidos graxos. É a única espécie a apresentar reação de catalase negativa. Não apresenta  $\beta$ -glicosidase (esculina (-)). Pode apresentar pequeno crescimento a 37°C, podendo resistir a temperaturas de até 39°C. Apresenta, em meio Dixon (37°C, após 7 dias de incubação),

colônias pouco lisas ou rugosas e textura dura e quebradiça de 3mm. Ao exame microscópico observam-se células esféricas ou ovais (1,5 $\mu$ m-2 $\mu$ m x 2,5 $\mu$ m-4 $\mu$ m) e brotos formados na base estreita (VARGAS et al., 2004; SCHLOTTFELDT et al., 2002)..

### **1.5.7 *M. slooffiae***

É uma espécie lipodependente. Cresce em presença de *Tween* 20, 40 e 60, mas não em presença de *Tween* 80 (GUÉHO, MIDGLEY, GUILLOT, 1996); porém em 2007, Ayhan et al. definem que esta espécie assimila fracamente este composto. Algumas amostras não crescem em *Tween* 20, mesmo em altas concentrações. Apresenta reação de catalase positiva, porém não apresenta  $\beta$ -glicosidase (esculina (-)) Cresce a 37°C, podendo resistir a temperaturas de até 40°C. Apresenta colônias rugosas geralmente com sulcos e textura áspera, de 3mm de diâmetro. Na micromorfologia apresenta células curtas cilíndricas (1 $\mu$ m-2 $\mu$ m x 1,5 $\mu$ m-4 $\mu$ m), enquanto que os brotos ocorrem na base larga da célula-mãe (VARGAS et al., 2004; SCHLOTTFELDT et al., 2002).

### **1.5.8 *M. dermatis***

Esta espécie apresenta características fisiológicas semelhantes à *M. furfur*. Assimila os *Tweens* 20, 40, 60 e 80 (SUGITA et al., 2002). Apresenta reação de catalase (+) e cresce bem a 37 e 40 °C. Porém, a percentagem molecular de G+C do DNA da *M. dermatis* é 60,4% enquanto que a da *M. furfur* é de 66,0 a 66,7%. Para *M. dermatis* há também controvérsias sobre sua atividade de  $\beta$ -glicosidase e assimilação de Chremophor EL, sendo considerado teste positivo e negativo, respectivamente (KANEKO et al., 2006), no entanto Sugita et al. (2002) que catalogaram esta espécie não descrevem estes testes, assim estes dados fisiológicos continuam escassos para esta espécie. Forma colônias brancas a amareladas, semibrilhantes a opacas, convexas e de textura cremosa. Na microscopia podem-se observar células esféricas, ovais ou elípticas (2-8  $\mu$ m x 2-10 $\mu$ m); ocasionalmente são formados filamentos na área de origem do brotamento (SUGITA et al., 2002).

### **1.5.9 *M. japonica***

Espécie lipodependente, assimila os *Tweens* 40 e 60 como única fonte de lipídio, mas não assimila os *Tweens* 20 ou 80. Apresenta reação de catalase (+) e cresce bem a 37 °C, porém não apresenta crescimento à 40 °C. Sugita et al. (2003) também catalogaram esta espécie e novamente não descreveram dados sobre assimilação de Chremophor EL e atividade de  $\beta$ -glicosidase. Porém, Kaneko et al. (2006) descrevem esta espécie como positiva para  $\beta$ -glicosidase e negativa para a assimilação de Chremophor EL como fonte lipídica. Suas colônias são amarelo-claras, semi-brilhantes a opacas, rugosas e de textura cremosa. Ao exame microscópico apresenta células esféricas, ovais ou elípticas (2-5  $\mu\text{m}$  x 2-7 $\mu\text{m}$ ) com brotamento simpodial (SUGITA et al., 2003).

### **1.5.10 *M. yamatoensis***

Espécie lipodependente que apresenta características similares a *M. furfur* e *M. dermatis*, assimilando os *Tweens* 20, 40 e 80 e apresentando reação de catalase (+). Porém, não cresce a 40 °C. Porém não possui dados sobre assimilação de Chremophor EL e atividade de  $\beta$ -glicosidase. Apresenta colônias brancas a amareladas, semi-brilhantes, rugosas a pregueadas, textura cremosa. Na micromorfologia evidenciam-se as células ovais a elípticas (2-4,5  $\mu\text{m}$  x 2-7,5 $\mu\text{m}$ ), com formação de brotos na base estreita. (SUGITA et al., 2004).

### **1.5.11 *M. nana***

Espécie lipodependente semelhante à *M. sympodialis*, não assimila *Tween* 20 e Chremophor EL, mas assimila os *Tweens* 40, 60 e 60. Apresenta reações de catalase (+) e esculina (-) e cresce bem a 37 e 40 °C. As leveduras desta espécie formam colônias de coloração creme a amarelas, brilhantes a opacas, de superfície lisa e convexa e diâmetro médio de 2 mm. O exame microscópico revela células pequenas, ovóides a globosas (1,5-2  $\mu\text{m}$  x 2,5-3 $\mu\text{m}$ ), com brotamento monopolar na base estreita (HIRAI et al., 2004).

### **1.5.12 *M. caprae***

Espécie lipodependente que assimila fracamente os *Tweens* 40, 60 e 80, no entanto não utiliza *Tween* 20 ou Chremophor EL, como única fonte lipídica. Apresenta reação de catalase positiva e  $\beta$ -glicosidase freqüentemente positiva. Apresenta fraco crescimento a 37°C, e não resiste a 40°C. Após sete dias de crescimento a 32°C, apresenta colônias de coloração branca a creme, superfície lisa, brilhantes ou opacas e moderadamente convexas, com diâmetro variando entre 0,5 a 1,8 mm. As células apresentam formato oval a esférico (2,7-4,5 x 1,7-4,5  $\mu\text{m}$ ), com formação de brotos na base estreita (CABAÑES et al., 2007).

### **1.5.13 *M. equina***

Espécie lipodependente que, assim como a *M. caprae* não assimila *Tween* 20 e Chremophor EL, mas assimila fracamente os *Tweens* 40, 60 e 80. Apresenta reação de catalase positiva e de  $\beta$ -glicosidase freqüentemente negativa. Não cresce a 40°C, mas pode apresentar fraco crescimento a 37°C. Após sete dias de crescimento a 32°C as colônias apresentam coloração branca a creme, superfície lisa, brilhantes a opacas, textura cremosa e moderadamente convexas. As colônias são pequenas com diâmetro variando de <0,5 a 2 mm. Na microscopia as células são ovóides (2,9-4,7 x 1,2-3,1  $\mu\text{m}$ ), com formação de brotos na base estreita. (CABAÑES et al., 2007).

**Tabela 1:** Características fenotípicas de *Malassezia* spp.

Espécie	Crescimento Sab <sup>a</sup> a 32°C	Assimilação de Tween				Assimilação de Chemophor EL	Hidrólise da esculina	Reação de catalase	Crescimento em Dixon a	
		T 20 (10%)	T 40 (0,5%)	T 60 (0,5%)	T 80 (0,1%)				37°C	40°C
<i>M. pachydermatis</i>	+	+	+	+	+	+	+ (-)	± ou +	+	+
<i>M. furfur</i>	-	+	+	+	+	+ (-)	- (±)	+ ou -	+	+
<i>M. sympodialis</i>	-	-	+	+	+	- (±)	+	+	+	+
<i>M. globosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	- (±)	-
<i>M. obtusa</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	- (±)	-
<i>M. restricta</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	v	-
<i>M. slooffiae</i>	-	+ (±)	+	+	-	-	-	+	+	+
<i>M. dermatitis</i>	-	+	+	+	+	± (+)	?	+	+	+
<i>M. japonica</i>	-	-	±	+	-	?	?	+	+	-
<i>M. yamatoensis</i>	-	+	+	+	+	?	?	+	+	-
<i>M. nana</i>	-	+ (-)	+	+	±	-	-	+	+	v
<i>M. caprae</i>	-	-	± (-)	±	±	+ (-)	+ (-)	+	- (±)	-
<i>M. eqüina</i>	-	±	±	±	±	- (+)	- (+)	+	±	-

<sup>a</sup> Ágar Sabouraud; +, positivo; -, negativo; ±, fracamente positivo; v, variável; ( ), indica raras divergências do padrão principal

Fonte: Cabañas et al.,2007.

## 1.6 Identificação molecular de *Malassezia* spp.

Os testes fenotípicos para a identificação das espécies de *Malassezia* demandam tempo e seus resultados são subjetivos ou inconclusivos (MIRHEND et al., 2005). Além disso, são incapazes de diferenciar as espécies *M. dermatitis*, *M. japonica*, *M. yamatoensis* e *M. nana*, isoladas a partir de 2002, bem como as espécies *M. caprae* e *M. equina* identificadas em 2007. Portanto, vários estudos têm sido desenvolvidos com o intuito de melhorar o processo de identificação destas leveduras. Dentre os novos métodos, está o uso de técnicas moleculares, porém, alguns destes como: PCR (*polymerase chain reaction*) *fingerprinting*, RAPD-PCR (*random amplification of polymorphic DNA*), AFLP (*amplified fragment length polymorphism*) e DGGE (*denaturing gradient gel electrophoresis*), produzem resultados pouco promissores para análises de rotina, devido ao fato de serem laboriosos e os equipamentos necessários serem de alto custo (CANTEROS et al., 2007).

Em 2005, Mirhendi et al. descreveram um simples método de PCR e enzimas de restrição para a identificação e diferenciação de 11 espécies de *Malassezia*. A amplificação do PCR foi realizada utilizando-se os *primers* 5'-TAACAAGGATTCCCCTAGTA-3' e 5'-ATTACGCCAGCATCCTAAG-3' e a digestão enzimática foi obtida com a utilização das enzimas *CfoI* e *BstF51*, seguida de eletroforese em gel de agarose 2%. Usando a enzima *CfoI*, pode-se distinguir nove diferentes espécies de *Malassezia*, incluindo *M. furfur*, *M. pachydermatis*, *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. restricta*, *M. slooffiae*, *M. nana*, *M. japonica* e *M. yamatoensis*, mas *M. sympodialis* e *M. dermatitis* produziram o mesmo padrão. Porém, estas duas espécies podem ser diferenciadas usando a enzima *BstF51*.

Kaneko et al. (2006), realizaram a identificação de leveduras do gênero *Malassezia* por fenotipagem utilizando CHROMagar Candida® complementado com 10% de *Tween* 40, assimilação de Chremophor EL e *Tween* 60, atividade de catalase e  $\beta$ -glicosidase, além de crescimento em ágar Sabouraud sem suplemento lipídico. Para aferir sua identificação fenotípica, os autores utilizaram PCR e seqüenciamento dos produtos de amplificação. Foram utilizadas cepas padrão e apenas 26 isolados. Verificou-se neste estudo, correlação entre as técnicas fenotípicas e moleculares. Ademais, foi possível verificar diferenças na produção de precipitado cromogênico, nas espécies *M. dermatitis* e *M. japonica* que possuem propriedades biológicas muito semelhantes com *M. slooffiae* e *M. sympodialis*, respectivamente.

Em um trabalho realizado por Canteros et al. (2007), foi descrita uma comparação da eficiência dos testes fenotípicos em relação à identificação genética para *Malassezia* spp.. Foram

utilizados os testes fenotípicos de assimilação de *Tween* (20, 40, 60 e 80), termotolerância, atividade de catalase e  $\beta$ -glicosidase, bem como a produção de pigmento em meio enriquecido com triptofano. A identificação por biologia molecular foi realizada de acordo com Guillot et al. (2000), utilizando os *primers*: *Malup* (5'-AGCGGAGGAAAAGAACT-3') e *Maldown* (5'-GCGCGAAGGTGTCCGAAG-3'). Após a reação de PCR os produtos de amplificação (*amplicons*) foram digeridos pelas enzimas *BamI*, *HaeII* e *MspI*. Contudo, esta técnica diferencia apenas as sete espécies descritas até o ano de 2000 (*M. furfur*, *M. pachydermatis*, *M. sympodialis*, *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. restricta* e *M. slooffiae*), assim as seis novas espécies identificadas até o momento não foram contempladas com esta metodologia. Entretanto, este estudo traz informações importantes sobre a ineficiência do teste de termotolerância e outras provas que geram dúvidas em algumas espécies de *Malassezia*.

Recentemente, Zomorodain et al. (2008) utilizaram a metodologia empregada por Mirhend et al. (2005) para averiguar a incidência de colonização de leveduras do gênero *Malassezia* em neonatos saudáveis e com doenças de pele. Os autores ressalvam que os *primers*, *Malf* e *Malr*, amplificaram com sucesso o marcador molecular 26S rDNA de todos os isolados de *Malassezia* spp., promovendo uma único *amplicon* (aproximadamente 580pb).

Outros estudos foram desenvolvidos com base nas propriedades moleculares do gênero *Malassezia*, como o PCR em tempo real, para detecção de carga genômica em amostras clínicas de dermatite atópica (SUGITA et al., 2006) e psoríase (TAKAHATA et al., 2007; PAULINO et al., 2008), deste modo não havendo necessidade de isolamento em cultura, pois é sabido que algumas espécies como *M. globosa*, *M. obtusa* e *M. restricta* possuem baixas taxas de recuperação em meios artificiais de cultivo (CANTEROS et al., 2007). Assim, devido a crescente evolução taxonômica do gênero *Malassezia*, verifica-se a importância das técnicas de biologia molecular, pois foi, a partir destas que novas espécies foram classificadas, fazendo-se necessário o desenvolvimento e implantação de técnicas genéticas mais acessíveis a laboratórios de diagnóstico.

## 1.7 Doenças associadas às espécies de *Malassezia*

Vários estudos têm mostrado que cerca de 50% a 100% dos indivíduos clinicamente saudios são portadores de leveduras lipofílicas, principalmente em regiões do corpo ricas em glândulas sebáceas (ZAITZ et al. 2000). Esta variação observada na freqüência de isolamento pode ser atribuída às diferentes metodologias empregadas pelos autores. Mesmo assim, o gênero

Malassezia é considerado parte da microbiota normal da pele (ZAITZ et al. 2000). Para o desenvolvimento e a evolução de quadros patológicos associados às espécies do gênero *Malassezia* é necessário que existam fatores predisponentes no hospedeiro (ZAITZ et al. 2000).

Entre as enfermidades que estão associadas a infecções por espécies do gênero *Malassezia* pode-se citar: pitiríase versicolor, foliculite pityrospórica e infecções sistêmicas. Já na dermatite seborréica, na dermatite atópica, na papilomatose confluente reticulada de Gougerot e Carteaud e em outros quadros patológicos, o papel patogênico da *Malassezia* spp. não está claramente definido, embora seus quadros clínicos possam ser agravados ou desencadeados por esta levedura (ZAITZ et al. 2000).

O gênero *Malassezia* é conhecido por ser o agente etiológico da pitiríase versicolor. Apesar das condições para a patologia ainda não terem sido totalmente elucidadas, é sabido que ocorre a conversão da forma leveduriforme para a forma filamentosa, a qual é capaz de invadir o estrato córneo, penetrando através dos corneócitos (GUPTA et al., 2004).

Pitiríase versicolor é uma infecção superficial, benigna, freqüentemente recidivante, caracterizada por lesões maculosa, com descamação fina e coloração variável do branco ao acastanhado, podendo, mais raramente, tornar-se eritematosa, justificando, assim, a denominação pitiríase versicolor, que afeta, em maior freqüência, a porção superior do tronco, face e nos membros superiores (Figura 7) (ZAITZ et al. 2000). Na maioria dos casos, as lesões são assintomáticas, exceção feita às eritematosas que, em geral, são pruriginosas.

A maior freqüência dos casos acontece a partir da puberdade, quando ocorrem alterações nos lipídios na superfície da pele, decorrentes de modificações hormonais (ZAITZ et al. 2000), embora também tenham sido reportados em crianças e em idosos (ASHBEE, EVANS, 2002).



Figura 7-Paciente apresentando pitiríase versicolor causada por *Malassezia* sp.. Região da face (A), membros (B) e tronco (C).

Fonte: LEITE, 2008.

Outro aspecto epidemiológico importante é que esta dermatose apresenta maior prevalência em regiões tropicais e subtropicais, onde o clima quente e úmido favorece a colonização da pele pelo fungo, condição esta advinda da hiper-hidratação da camada córnea produzida pela sudorese excessiva (TROPE, 1992), o que pode explicar o aumento da sua incidência nos meses de verão. A incidência em clima temperado é aproximadamente de 1% (SCHLOTTFELDT et al., 2002), mas incidências de 40 a 60% têm sido relatadas, em climas tropicais (ASHBEE, EVANS, 2002; SCHLOTTFELDT et al., 2002).

Outros fatores que predispõem a esta infecção são: deficiências vitamínicas, doenças crônicas infecciosas, como: tuberculose, diabete melitus, estado nutricional precário, corticoterapia sistêmica, gravidez, pacientes imunodeprimidos e taxas elevadas de cortisol plasmático (ASHBEE, EVANS, 2002).

As lesões da pitiríase versicolor são de coloração geralmente amarelada ou parda e, raspando-as com as unhas, nota-se leve descamação que constitui o chamado “sinal de Besnier” ou “sinal de unhada”. A descamação pode ser observada, também, pelo estiramento da pele ou sinal de Zireli (Figura 8) (LACAZ et al., 2002; VARGAS et al., 2004)

Vários estudos procuram explicações para a variação de tonalidade das lesões, às vezes no mesmo paciente. As lesões hiperpigmentadas parecem ser devidas tanto ao aumento do tamanho dos melanossomos e a mudanças em sua distribuição na epiderme, quanto ao aumento do *turnover* das células da camada córnea nas lesões. Lesões hipopigmentadas podem ser resultantes da inibição da reação dopa-tirosidase por frações lipídicas (ácidos dicarboxílicos) produzidas pelo fungo, quando em meio gorduroso, determinando a pouca melanização (ZAITZ et al. 2000).



Figura 8- Sinais clínicos observados em lesões de pitiríase versicolor. Sinal de Besnier (A) e sinal de Zileri (B)  
Fonte: LEITE, 2008.

O diagnóstico dessa dermatose não oferece grandes dificuldades. Raspados obtidos da lesão são clarificados com KOH 10% e examinados ao microscópio. O exame microscópico revela artículos micelianos septados curtos e tortuosos, ramificados em T, ao lado de blastoconídios arredondados, isolados ou dispostos em massas ou em grupos. O fungo limita-se a camada córnea da pele. Neste caso, a maneira mais correta de expressar o resultado seria indicar a presença de *Malassezia* sp., porque as várias espécies envolvidas neste quadro patológico apresentam a mesma morfologia neste tipo de exame (LACAZ et al., 2002).

Porto (1953) propôs um método para diagnóstico da pitiríase versicolor que consiste na adesão de um fragmento de fita adesiva transparente às lesões e na, posterior, retirada do mesmo. Em seguida, o fragmento de fita é preso a uma lâmina (Figura 9) e examinado ao microscópio (PORTO (1953) *apud* LACAZ et al., 2002).



Figura 9- Procedimento de elaboração da lâmina confeccionada com fita adesiva transparente para microscopia direta. Fixação da fita adesiva transparente nas lesões de pitiríase versicolor (A), retirada da fita adesiva contendo a amostra de pele (B) e preparo da lâmina de microscopia com a identificação do paciente (C).  
Fonte: LEITE, 2008.

Uma variante clínica com intensa despigmentação cutânea pode ocorrer em indivíduos de pele escura e é chamada de acromia parasitária. De forma excepcional, pode afetar recém nascidos, atingindo face e áreas de contato com a fralda. Existe também forma atrófica, rara, de pitiríase versicolor, em que as lesões são deprimidas e relacionadas ao uso prolongado de corticóides tópicos (ZAITZ et al. 2000).

Outras diversas formas clínicas dessa dermatomicose podem ser observadas, tais como a pitiríase folicular, a forma generalizada das regiões inguinais, da face e do couro cabeludo (LACAZ et al., 2002).

Como na pitiríase versicolor, a foliculite pitirospórica é associada com a colonização de leveduras do gênero *Malassezia* (GUPTA et al., 2004; CHEN, HILL, 2005), no entanto nesta

enfermidade, não há conversão da fase leveduriforme a forma filamentosa (GUPTA et al., 2004). Esta é uma doença infecciosa de distribuição universal, porém ocorre, com maior freqüência, em climas quentes e úmidos, atingindo, principalmente, mulheres na faixa de 25 a 35 anos, sendo comuns as recidivas (ASHBEE, EVANS, 2002). Esta infecção caracteriza-se pela formação de pápulas e pústulas foliculares nos membros superiores, no tronco e no pescoço (CHEN, HILL, 2005). A formação das pústulas deve-se à obstrução do folículo piloso por massas de leveduras, o que é agravada pela sua multiplicação. O processo inflamatório ocorre devido à quebra de ácidos graxos livres e triglicérides. Após a inflamação pode ocorrer depósito de mucina intrafolicular (ZAITZ et al. 2000).

Durante a evolução da infecção são observados altos títulos de anticorpos da classe IgG, em comparação com os pacientes que apresentam quadros de pitiríase versicolor ou com pessoas saudáveis (GUPTA et al., 2004). Entretanto não há, ainda, estudos que tenham determinado, em face da nova nomenclatura taxonômica, a espécie ou as espécies de *Malassezia* envolvidas nesta infecção.

Em determinadas situações clínicas, a colonização por *Malassezia* spp. pode evoluir para um quadro de fungemia. Pode ocorrer em crianças recém-nascidas, crianças e adultos imunocomprometidos que recebem alimentação parenteral com suplementação lipídica por meio de cateteres (ZOMORODAIN et al., 2008). Acredita-se que a suplementação lipídica facilite a colonização, pela levedura, do cateter utilizado para infundir os nutrientes, sendo que a remoção do cateter contaminado já é suficiente para limitar a infecção (CHRYSSANTHOU et al., 2001).

Richet et al. (1989) observaram três casos de crianças com broncopneumonia, sendo que, em duas delas, o exame após a morte revelou *M. furfur* nos tecidos pulmonares, de uma criança que sobreviveu, esta levedura foi cultivada do sangue, urina e fezes. A lavagem das mãos foi recomendada para diminuir este tipo de infecção em crianças de alto risco (Richet et al. (1989) *apud* LACAZ et al., 2002).

Cornacchioni et al (1996) registraram caso de fungemia por *M. furfur* associada a *Klebsiella pneumoniae* em paciente de dois anos de idade com leucemia linfoblástica aguda. Tratada com cetoconazol e anfotericina B, houve cura clínica e microbiológica (CORNACCHIONI et al., (1996) *apud* LACAZ et al., 2002). Redline e Dahms (1981) registraram caso de vasculite pulmonar (pneumonia) por *M. furfur* em crianças que faziam uso de terapia lipídica parenteral (REDLINE, DAHMS (1981) *apud* LACAZ et al., 2002).

Chang et al. (1998), em um serviço de Terapia Intensiva Infantil do Centro Médico Dartmouth-Hitchcock no Líbano, registraram uma verdadeira epidemia de processos infecciosos

provocadas pela *M. pachydermatis*, levedura essencialmente zoofílica, que fora carreada ao berçário pelas mãos de enfermeiras que cuidavam em casa de seus cães. De outubro de 1993 a 18 de janeiro de 1995, foram registrados 15 casos desse tipo de infecção, sendo oito casos de fungemia, dois casos de infecção urinária e um de meningite. Outros quatro pacientes apresentaram cultivo positivo no lavado traqueobrônquico (dois casos), 1 caso de lesões cutâneas e outro com a ponta do cateter contaminada.

Outra enfermidade de considerável incidência na população mundial, (1% a 3%) associada com leveduras de *Malassezia* spp, é a dermatite seborréica (GUPTA et al., 2004). Esta, é clinicamente caracterizada pela inflamação e a descamação da pele em áreas ricas em glândulas sebáceas, como face, couro cabeludo e porção superior do tronco. O grupo mais atingido é aquele representado por indivíduos do sexo masculino com idade superior a 40 anos (ZAITZ et al. 2000). Entretanto, recém-nascidos a partir de oito dias também podem ser acometidos por esta dermatose (SOUZA, 1996).

A dermatite seborréica caracteriza-se pela formação de lesões eritemato-descamativas em couro cabeludo, região retroauricular, mediofacial e mediotorácica, acompanhadas ou não de prurido, sendo associada freqüentemente à colonização por *Malassezia* spp. (SCHLOTTFELDT et al., 2002).

Na população normal, a incidência de dermatite seborréica é aproximadamente de 3%, mas, em pacientes HIV-positivos, a incidência é mais alta, perfazendo intervalos de 30 a 83%, sendo esta desencadeada de forma súbita e com quadro clínico mais intenso ou grave (ROSS et al., 1994). Dermatite seborréica também tem uma alta incidência em pacientes com pitiríase versicolor, doença de Parkinson e/ou depressão (ASHBEE, EVANS, 2002). Nesta dermatose, as espécies *M. globosa*, *M. furfur*, *M. sympodialis* e *M. pachydermatis* têm sido isoladas com maior freqüência (NAKABAYASHI et al., 2000).

Outra dermatose que o gênero *Malassezia* possivelmente está envolvido é a dermatite atópica, cujos sintomas iniciais ou subseqüente exacerbão podem ser relacionados a problemas emocionais, a infecção, a irritação mecânica ou química, a alterações térmicas ou a alergênicos. Os alergênicos implicados incluem-se alergênicos alimentares, aeroalergênicos, como pólen ou poeira doméstica, e alergênicos de comensais ou patógenos cutâneos. Devido ao prejuízo da função de barreira da pele, na dermatite seborréica, e ao prurido intenso, que resulta em escoriações, os antígenos dos organismos presentes na pele são levados à derme e em contato com o sistema imune, elucidam uma resposta inflamatória (ASHBEE, EVANS, 2002).

As lesões localizam-se na cabeça, no couro cabeludo e no pescoço, e os pacientes apresentam altos títulos de IgE sérica contra levedura de *Malassezia* spp. (BOGUNIEWICZ et al., 2006). Embora quase 60% dos pacientes com dermatite atópica possam ter espécies de *Malassezia* spp., como *M. globosa*, *M. furfur* e *M. sympodialis*, isoladas da pele, isto corresponde a uma freqüência semelhante à observada em pele de pessoas saudáveis (NAKABAYASHI et al., 2000).

Descrita por Gougerot e Carteaud em 1927, a papilomatose confluente reticulada ocorre principalmente na região superior do tronco, atingindo principalmente mulheres jovens (BOWMAN, DAVIS, 2003). Caracteriza-se por pápulas eritematosas ou acastanhadas que evoluem para placas hiperceratinizadas e reticuladas (RIAUX et al., 2007). A existência de casos familiares desta dermatose sugere que a mesma possa ser determinada geneticamente. Embora sua etiologia ainda seja desconhecida, acredita-se que a ceratinização que ocorre seja resultado da colonização da pele por fungos do gênero *Malassezia*, embora isto ainda não tenha sido comprovado, já que a utilização de antifúngicos para a erradicação da levedura presente nas lesões nem sempre leva a uma melhoria do quadro clínico (ASHBEE, EVANS, 2002).

O seu diagnóstico é firmado nos exames clínico e histopatológico, e quando se cultiva o material da pele em meios apropriados, obtém-se facilmente o isolamento de *Malassezia* spp. (ZAITZ et al. 2000).

*M. furfur* foi descrita pela primeira vez por Aractingi et al. (1991), como agente etiológico da pustulose cefálica neonatal. Este caso foi demonstrado em um recém-nascido com 20 dias de nascimento, no qual se observava clinicamente a formação de eritemas, pápulas e pústulas na face, no pescoço e no couro cabeludo de recém-nascido. Rapelanoro et al. (1996) descreveram os critérios de diagnóstico para esta doença, como idade, localização cefálica, exame de microscopia direta o qual é positivo para *Malassezia* spp. que elimina as outras causas de pustulose neonatal e resposta positiva a terapia tópica com cetoconazol.

Em recente estudo realizado na Turquia, Ayhan et al. (2007) isolaram *M. furfur/M. dermatis* e *M. japonica* de 6 pacientes entre 26 que apresentavam pustulose cefálica neonatal, no entanto os pesquisadores notaram que nem todos os pacientes com cultura positiva apresentavam a enfermidade e que nem todos os neonatos colonizados desenvolveram pustulose cefálica neonatal. Com isso os pesquisadores concluíram que *Malassezia* spp. não é o agente etiológico direto da pustulose cefálica neonatal, nem a sua colonização, seja persistente ou transitória, está correlacionada com o desenvolvimento do estágio clínico da doença.

As leveduras do gênero *Malassezia* podem colonizar as unhas de indivíduos imunocomprometidos e imunocompetentes (ZAWAR, CHUH, 2008). No entanto, fatores predisponentes, como diabetes, psoríase ungueal, dermatite seborréica, dermatite de contato, trauma ungueal ou que estejam fazendo uso de drogas imunossupressoras, aumentam a incidência desta dermatomicose (ZAITZ et al. 2000).

Silva et al. (1997), em estudo realizado em São Paulo, isolaram *M. furfur* em exames micológicos de pacientes com suspeita clínica de onicomicoses e observaram que estes pacientes apresentavam algum tipo de fator predisponente.

Clinicamente podem-se observar lâmina ungueal de coloração branco-amarelada e hiperceratose subungueal com onicólise. Não ocorre paroníquia. Acomete geralmente as unhas das mãos e o diagnóstico é feito pela presença das leveduras ao exame microscópico direto e pelo cultivo de leveduras do gênero *Malassezia* em ágar Dixon (ZAITZ et al. 2000; VARGAS et al., 2004).

O papel das leveduras do gênero *Malassezia* na psoríase é bastante controverso. A aplicação de leveduras em pele sã de coelhos, bem como a realização de testes de contato com esses fungos em pacientes com psoríase, pode produzir lesões psoriasiformes. A patogênese da psoríase estaria relacionada com a ativação da via alternativa do complemento por parte de leveduras do gênero *Malassezia* e possível existência, nesses pacientes, de fenômeno de Köebner, formação de lesões lineares em áreas de trauma cutâneo, como resposta à colonização por essas leveduras (ZAITZ et al. 2000; FRY, BEKER, 2007).

Por fim, as leveduras do gênero *Malassezia* podem estar ligadas a patologias oculares, causando alargamento e obstrução do canal lacrimal (ZAITZ et al. 2000), bem como agravando a fisiopatologia de úlcera de córnea em cães, cujo saco conjuntival esteja colonizado por *M. pachydermatis* (PRADO et al., 2004).

## **1.8 Sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de *Malassezia* spp.**

Durante muito tempo os estudos realizados na avaliação do perfil de sensibilidade a antimicrobianos foram desenvolvidos destinando-se apenas as drogas antibacterianas, sendo pouca atenção voltada para a sensibilidade a antifúngicos. Porém, nos últimos anos, estudos revelam aumento da incidência de infecções fúngicas devido ao crescimento do número de indivíduos imunodeprimidos, que necessitam do uso de antifúngicos por períodos prolongados

acarretando uma seleção de cepas resistentes. Deste modo, o interesse pela busca do perfil de sensibilidade *in vitro* de cepas fúngicas, vem sendo alavancado (COLOMBO, SALES, 2004).

Em 1997, o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI – antigo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* – NCCLS) liberou uma versão aprovada dos testes de micro e macrodiluição em caldo para testar a sensibilidade *in vitro* de fungos leveduriformes, com o documento M27-A. Em 2002, este documento foi revisto (M27-A2), todavia apesar das técnicas preconizadas serem consolidadas para os gêneros *Candida* spp. e *Cryptococcus* spp, este não é aplicável as espécies lipodependentes do gênero *Malassezia*, isto é, qualquer espécie com exceção de *M. pachydermatis* (GARAU et al., 2003).

Vários estudos estão sendo realizados, buscando uma padronização do teste de sensibilidade para espécies de *Malassezia*. Gupta et al., (2000) realizaram um teste de sensibilidade baseados no método de diluição em ágar Leeming-Notman ou Sabouraud, onde a droga era adicionada ao meio fundente para a confecção das concentrações desejadas. O tamanho do inóculo fixado em  $1 \times 10^4$  UFC/ml e as drogas testadas foram: cetoconazol, voriconazol, itraconazol e terbinafina. A maioria das cepas foi sensível a cetoconazol, voriconazol e itraconazol, sendo que as cepas de *M. furfur*, *M. globosa* e *M. obtusa* foram as mais resistentes à terbinafina.

Em 2003, Eichenberg et al. descrevem uma técnica de microdiluição em caldo para teste de sensibilidade de *M. pachydermatis*, testando as drogas fluconazol, itraconazol e cetoconazol. Esta metodologia utilizou como meio o caldo Sabouraud dextrose acrescido de Tween 80 (1%), relatando que estudos preliminares descartaram o uso do meio RPMI 1640 preconizado pelo CLSI. O tamanho do inóculo também diferiu, sendo de  $0,5 - 3,0 \times 10^6$  UFC/ml. Neste estudo a CIM foi determinada como sendo a menor concentração da droga capaz de inibir 50% do crescimento quando comparada ao controle positivo.

Em 2004, Velegraki et al. descreveram um método de microdiluição em caldo para oito espécies de *Malassezia* com a utilização do meio RPMI 1640, suplementado com Tween 20, glicerol, monoesterato de glicerol e bile bovina, onde foram testados as seguintes drogas antifúngicas: fluconazol, itraconazol, voriconazol, cetoconazol, posaconazol, terbinafina e anfotericina B. O tamanho do inóculo utilizado foi entre  $2,0$  e  $3,5 \times 10^3$  UFC/ml e o teste incubado a  $32^{\circ}\text{C}$  por 48 horas (*M. furfur* e *M. pachydermatis*) ou 72 horas (*M. sympodialis*, *M. slooffiae*, *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. restricta* e *M. dermatis*) e a leitura realizada visualmente.

Miranda et al (2007) avaliaram a sensibilidade *in vitro* de 95 isolados de *M. furfur*, *M. sympodialis*, *M. obtusa* e *M. globosa*, frente ao fluconazol, itraconazol, cetoconazol e voriconazol

pela técnica de microdiluição utilizando o caldo Leeming-Notman contendo 0,1% glicose, 0,1% peptona, 0,8% de sais biliares, 0,2% de extrato de levedura, 0,1% de glicerol, 0,5% de *Tween* 60, 3% de azeite de oliva e 50 µg/mL cloranfenicol. O inóculo foi preparado para obtenção final de  $2,5 \times 10^3$  cels/mL e o meio reacional incubado durante 5 dias a 32°C e a leitura foi realizada por comparação visual com o controle, onde os autores indicam um boa reproduzibilidade para este teste. As cepas avaliadas mostraram-se menor susceptibilidade ao fluconazol, pois 9,5% dos isolados testados exibiram MICs > 16 µg/mL.

Brito et al. (2007), utilizaram metodologia semelhante a Gupta et al. (2000) para avaliar a sensibilidade de 32 cepas de *M. pachydermatis* isoladas de cães, frente a derivados azólicos (cetoconazol, itraconazol e fluconazol) e anfotericina B, utilizando o ágar Sabouraud. Os resultados mostraram que as cepas testadas foram mais sensíveis ao cetoconazol e itraconazol. Porém, através desta metodologia só foi possível determinar a CFM (Concentração Fungicida Mínima) e não a CIM.

Prado et al. (2008) sugeriram que a técnica de microdiluição em caldo RPMI 1640 modificado, preconizado por Velegraki et al. (2004) poderia ser complementada com subcultivo em ágar batata dextrose, para determinar a CFM, bem como a CIM para cepas de *M. pachydermatis* isolados de cães sadios e enfermos. Assim, este grupo avaliou a sensibilidade a derivados azólicos (cetoconazol, itraconazol, fluconazol e voriconazol), anfotericina B e caspofungina. Com os dados obtidos neste estudo verificou-se que as cepas foram bastante sensíveis a cetoconazol e itraconazol. Adicionalmente, obteve-se o primeiro relato que as cepas de *M. pachydermatis* são resistentes a caspofungina (MIC e MFC >256 µg/mL).

## **1.8 Importância do armazenamento de fungos em micotecas: Um enfoque para conservação de *Malassezia* spp.**

O cenário das infecções fúngicas tem se alterado de maneira significativa nos últimos anos, percebendo-se um aumento da sobrevida de pacientes imunocomprometidos, bem como a expansão da lista de patógenos potenciais (ROCHA, SIDRIM, 2004). Com isso, a importância das espécies fúngicas tem aumentado, e consequentemente estes organismos tornaram-se alvos de estudos com diversas finalidades, sendo mantidos e manipulados em laboratórios científicos. Assim, a necessidade de desenvolvimento de técnicas conservativas para manutenção das

culturas fúngicas, visando sua disponibilidade em condições adequadas para vários fins científicos, por períodos prolongados (ODDS, 1991).

A manutenção de fungos em laboratórios de microbiologia é de fundamental importância para estudos retrospectivos e prospectivos, que enfoquem sua biologia, etiologia e aspectos epidemiológicos, devendo esta prática ser estimulada, pois somente com a formação de coleções de microrganismos, pode-se avaliar mudanças nos perfis fenotípicos e genotípicos, caracterizando a biodiversidade microbiana de uma desejada região (BRILHANTE, 2003).

A manutenção desses organismos não se restringe apenas a sua recuperação, mas a preservação das suas características fisiológicas e estabilidade genética são de importância fundamental (NAGAI et al., 2005). A habilidade do inóculo de crescer e se reproduzir pode ser constantemente avaliada pela quantificação de células viáveis e mortas do total da população, sendo o “status” reparado em métodos de reconstituição rotineira (MORICHI, 1973). Apesar da atenção especial dada aos processos reprodutivos, as propriedades bioquímicas devem ser mantidas, principalmente pelo fato de que muitos fungos se constituem como ferramentas importantes na indústria químico-farmacêutica e na biotecnologia, bem como na produção de hormônios e medicamentos (MEYER, 2008).

Quanto às instabilidades gênicas, estas seriam um dos grandes problemas de estocagem, visto que tais mutações podem ser pontuais e, muitas vezes, podem passar desapercebidas. Conseqüentemente, a seleção dos métodos deverá ser baseada em características inerentes a cada espécie, bem como a resposta dos microrganismos aos nutrientes de preservação (BRILHANTE, 2003).

A manutenção por repiques seriados em meios de cultura requer muitos cuidados, pois os consomem rapidamente e necessitam repiques freqüentes, gastando tempo e possibilitando contaminação e diminuição da virulência (COSTA, FERREIRA, 1991). Devido a essas dificuldades, foram desenvolvidos outros métodos para a conservação de fungos, como óleo mineral, solo, sílica-gel, tecidos secos do hospedeiro, e água destilada, a liofilização e a conservação em nitrogênio líquido (DIOGO, SARPIERI, PIRES, 2005).

Vários fatores influenciam a eficácia da criopreservação de microorganismos, por exemplo: espécie, cepa, fase de desenvolvimento, composição do meio de crescimento, teor de água intracelular e lipídios na composição celular, a composição do meio de congelamento, o meio de recuperação entre outros. Uma das condições importantes é a composição do meio utilizado para suspender os organismos que irão sofrer o congelamento (HUBÁLEK, 2003). Embora exista uma boa sobrevivência de bactérias e esporos microbianos ultra-congelados sem o

uso de aditivos de proteção, a presença de um adequado crioprotetor normalmente aumenta consideravelmente a taxa de sobrevivência. Assim, a descoberta de que o glicerol e o dimetilsulfóxido ( $\text{Me}_2\text{SO}$ ) possuam potencial crioprotetor de células eucarióticas contra os danos ocasionados pelo congelamento marcou o início da criotecnologia moderna (HUBÁLEK, 2003).

Para o aumento da sobrevivência das células fúngicas ao processo de congelamento, é necessário o uso dos agentes crioprotetores, que são classificados como agentes crioprotetores não penetrantes (extracelulares) e agentes crioprotetores penetrantes (intracelulares) (HUBÁLEK, 2003).

Os crioprotetores penetrantes são substâncias altamente hidrofílicas devido à presença de grupos químicos formadores de pontes de hidrogênio, como os grupamentos: hidroxila, amida, sulfóxido e, em menor escala, os grupos carboxilas dos aminoácidos. Estas forças intramoleculares mudam a orientação da molécula da água nos cristais de gelo, criando um ambiente menos nocivo para as células (HUBÁLEK, 2003). Estas ligações de hidrogênio também promovem a estabilização da estrutura quaternária das proteínas de membrana, preservando-as da desidratação, da proteólise térmica e da radiação. Os crioprotetores penetrantes, também, tornam a membrana citoplasmática mais rígida, evitando excessiva desidratação e reduzindo a toxicidade do  $\text{NaCl}$  intracelular (HUBÁLEK, 2003).

O mecanismo de ação dos agentes crioprotetores não penetrantes baseia-se na proteção dos fungos contra os efeitos osmóticos durante o processo de congelamento, promovendo um meio hipertônico que induz a saída de água das células levando a desidratação, ou seja, eles agem no meio extracelular, reduzindo assim a possibilidade da formação de cristais de gelo intracelular, bem como aumentando a viscosidade da solução de congelamento, mantendo assim a estrutura anamorfa do gelo. No entanto, eles não interagem diretamente com a membrana plasmática ou parede celular. Estes são representados pelos açúcares, proteínas do leite e gema do ovo (HUBÁLEK, 2003).

Desde a sua descoberta, o gênero *Malassezia* passou por várias mudanças taxonômicas, e ainda não foi alcançada uma solução definitiva para a classificação sistemática desta levedura. Além da evolução taxonômica do gênero, problemas como o isolamento e a identificação de *Malassezia* spp., principalmente as espécies lipodependentes, continuam caóticos, devido principalmente a sua baixa viabilidade, especialmente com algumas de suas espécies. Atualmente, com o advento de novas e menos onerosas técnicas moleculares de identificação para estas leveduras, torna-se necessário o desenvolvimento de metodologias

eficazes para a preservação, por longos períodos de tempo, exemplares do gênero *Malassezia* (CRESPO, ABARCA, CABANES, 2000).

Crespo, Abarca e Cabañas (2000) avaliaram diversas técnicas de preservação de cepas de *Malassezia* spp., incluindo *M. pachydermatis*, *M. furfur*, *M. sympodialis*, *M. slooffiae*, *M. globosa*, *M. obtusa* e *M. restricta*. Os resultados obtidos mostraram que o congelamento a -80°C foi o único método que obteve sucesso na recuperação das cepas testadas, incluindo *M. globosa*, *M. restricta* e *M. obtusa*, as quais são reportadas como espécies de difícil manutenção *in vitro*, no entanto estes resultados foram显著mente melhorados com a adição de glicerol e leite, o que enaltece a importância do uso de agentes crioprotetores em técnicas de preservação em baixas temperaturas.

Em 2004, Girão et al. avaliaram o comportamento de *M. pachydermatis* frente a diferentes métodos de conservação de culturas. Após identificação de amostras clínicas do material obtido de condutos auditivos de cães, as cepas foram estocadas, por seis e nove meses, em salina e salina com óleo mineral a 28°C, bem como, em ágar Dixon, ágar Dixon acrescido de glicerol e ágar Dixon acrescido de dimetil-sulfóxido (DMSO) a -20°C. Os meios de Dixon e Dixon acrescido de glicerol foram os mais adequados para manter a viabilidade das cepas, em seis meses e nove meses de estoque. Os métodos utilizados foram convenientes para manutenção da atividade de urease e da característica de *M. pachydermatis* de ser a única do gênero a não apresentar lipodependência.

### **1.9 Prospecção terapêutica e biotecnológica de produtos naturais derivados de sementes de frutas: Perspectivas de uso criotecnológico e antifúngicos naturais.**

Vários estudos têm sido desenvolvidos na descrição de atividades biológicas de produtos derivados de plantas, abrindo possibilidades destes serem utilizados no tratamento de uma variedade de doenças, como suplementos alimentares entre outros. Com isso, a exploração desses recursos pode levar a identificação de metabólitos valiosos que podem servir como drogas ou conduzir ao desenvolvimento de novas substâncias terapêuticas e nutritivas (COWAN, 1999). Dentre os produtos naturais que vêm sendo explorados, podem-se destacar os derivados de sementes de frutas. Pois, além do fato de serem fonte de compostos fitoquímicos, as sementes são descartadas em grande quantidade pelas indústrias alimentícias, podendo causar problemas ecológicos, como a proliferação de insetos e roedores, além das perdas econômicas. No entanto,

estes resíduos poderiam ter uma finalidade muito mais benéfica ao homem e ao meio ambiente (KARBORI & JORGE, 2005). Em um estudo realizado por Leite (2006), extratos hexânicos e metanólicos de algumas sementes de frutas foram avaliados quanto a bioatividades relevantes, como: atividade antibacteriana, toxicidade frente a *Artemia salina*, atividade larvicida contra o *Aedes aegypti* e ação citotóxica para linhagens de células tumorais. Também foram descritas as classes de fitoquímicos que constituíam estes produtos naturais. Este trabalho abriu possibilidades para estudos mais aprofundados sobre estas sementes, principalmente sobre as sementes do abacate (*Persea americana*), goiaba (*Psidium guava*) e manga (*Mangifera indica*).

Produtos naturais, como gema do ovo, leite e açúcares são utilizados como agentes crioprotetores. Contudo estudos demonstram que, além de capacidade crioprotetora devido a seus metabólitos primários (proteínas, lipídios e açúcares), alguns destes produtos naturais contêm antioxidantes que auxiliam na proteção e conservação de células (ex. gema de ovo) (CAROLSFELD et al., 2003). Desta maneira outros produtos naturais como óleos vegetais poderiam ser utilizados para este fim, pois além do seu conteúdo lipídico, os óleos vegetais são fontes de compostos antioxidantes como os carotenóides e compostos fenólicos (SOONG, BARLOW, 2004). Assim, as sementes de frutas possuem na sua composição lipídios e fitoquímicos que poderiam ser utilizados para vários fins, até mesmo na criotecnologia. Este destino agregaria a estas sementes, consideradas subprodutos na indústria de processamento de alimentos, valor econômico e científico.

Assim, na tentativa de contribuir para a valorização científica destes produtos naturais, foram trabalhadas neste estudo as sementes de goiaba (*P. guava*), mamão (*Carica papaya*), manga (*M. indica*), maracujá (*Passiflora edulis*) e melancia (*Citrullus lanatus*), buscando perspectivas de uso dos seus óleos fixos como agentes crioprotetores. Algumas destas sementes vêm sendo estudadas, como a semente da manga que possui propriedades antimicrobianas e antiparasitária (TONA et al., 1998; KABUKI et al., 2000) e investigações fitoquímicas dos extratos das sementes da manga conduziu ao isolamento de derivados do ácido gálico e do ácido benzólico, mangiferina, (+)-catequina, (-)-epicatequina (ALBERTO et al., 2002), bem como ácido esteárico,  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, mirceno, limoneno, ácido oléico, araquidônico, linonênico e palmítico (SCARTEZZINI E SPERONI, 2000). As sementes do maracujá são fonte de macromoléculas como fibras insolúveis e óleos fixos (CHAU, HUANG, 2004) que possuem em sua composição ácido linoléico, oléico, palmítico e linolênico (FERRARI, COLUSSI, AYUB, 2004). As sementes do mamão possuem propriedades vermífugas (BRAGA, 1976).

Outra semente utilizada neste estudo foi a semente do abacate (*P. americana*), onde estas tem sido usadas popularmente em micoses e infestações por parasitas, possuindo também efeito mio-relaxante local em dores musculares (BRAGA, 1976; RAMOS et al., 2004). Estudos fitoquímicos precedentes nas sementes do abacate identificaram várias classes de produtos naturais, tais como: fitoesteróis, triterpenos, ácidos graxos saturados e insaturados, ácido furanóico, dímeros de flavonóides, proantocianidinas e ácido absínico (RAMOS et al., 2005). Como demonstrado por Leite (2006) os extratos hexânico e metanólico da semente do abacate, apresentaram atividade antibacteriana e ação frente às larvas do mosquito *Aedes aegypti*, assim nesta dissertação estes produtos naturais foram destinados a testes de atividade antifúngica.

## 2 PERGUNTAS DE PARTIDA

2.1 Considerando-se a evolução taxonômica do gênero *Malassezia*, nos últimos doze anos, ainda é possível estabelecer a fenotipagem destas leveduras através de chaves de identificação convencionais?

2.2 Os produtos naturais extraídos de sementes goiaba, mamão, manga, maracujá e melancia têm importância na preservação de *Malassezia* spp. em micoteca?

2.3 Os extratos hexânico e metanólico da semente do abacate possuem atividade antifúngica, *in vitro*, frente a *M. pachydermatis*?

### **3 HIPOTESES CIENTÍFICAS**

3.1 A diversidade intra-específica do gênero *Malassezia* promove uma variação nos testes fenotípicos, gerando dificuldades de identificação das espécies, através das estratégias micológicas convencionais.

3.2. Os óleos extraídos de sementes goiaba, mamão, manga, maracujá e melancia possuem moléculas biologicamente ativas para a prospecção de novos agentes crioprotetores.

3.3. Os extratos hexânico e metanólico das sementes do abacate possuem atividade antifúngica frente a cepas de *M. pachydermatis*

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo Geral**

Com este estudo buscou-se contribuir para melhor entendimento sobre a identificação fenotípica, manutenção em micoteca e sensibilidade a antifúngicos *in vitro* de *Malassezia* spp.

### **4.2 Objetivos Específicos**

- 4.2.1. Catalogar as características fenotípicas das espécies de *Malassezia*;
- 4.2.2. tentar montar uma chave de identificação para espécies de *Malassezia*;
- 4.2.3 desenvolver um método eficaz para estocagem das cepas de *Malassezia* spp. utilizando óleos fixos extraídos de sementes de goiaba (*Psidium guava*), mamão (*Carica papaya*), manga (*Mangifera indica*), maracujá (*Passiflora edulis*) e melancia (*Citrullus lanatus*);
- 4.2.4 avaliar o perfil de sensibilidade, *in vitro*, de *Malassezia* spp. frente ao fluconazol, itraconazol, cetoconazol, anfotericina B e caspofungina;
- 4.2.5 investigar o potencial antifúngico de sementes de abacate contra cepas de *M. pachydermatis*.

.

.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Microorganismos

#### 5.1.1 Coleção de exemplares fúngicos do CEMM

A micoteca do Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM) é um acervo que armazena fungos em diversas técnicas de estocagem. Em relação ao gênero *Malassezia*, a coleção disponibiliza estocagem a -20°C em ágar Dixon (n=163) e em solução de cloreto de sódio 0,9% a temperatura ambiente (n=130).

#### 5.1.2 Recuperação das cepas estocadas na micoteca do CEMM

Os exemplares do gênero *Malassezia* encontravam-se em meio Dixon e em diferentes tempos de estocagem, variando de 1 a 5 anos. Após a retirada do estoque e serem descongeladas, um pequeno fragmento da colônia era repicado para um tubo de ensaio contendo, ágar Dixon. Para as cepas estocadas em solução salina, 200µL desta eram inoculados em ágar Dixon.

Os tubos inoculados foram incubados a 32°C e observados diariamente por um período de até 15 dias, a fim de verificar o crescimento e a manutenção da viabilidade das cepas.

#### 5.1.3 Cepas estudadas

O total de 38 cepas de *Malassezia* sp., isolados de humanos e cães, em Fortaleza-Ceará, foram avaliadas neste estudo. Foram utilizadas 33 cepas de *Malassezia* spp. estocadas na micoteca do Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM) da Universidade Federal do Ceará, como também 5 cepas que não sofreram nenhum processo de estocagem, como controle.

## 5.2 Identificação

### 5.2.1 Identificação fenotípica convencional

Após a confirmação da viabilidade das cepas estocadas, com a observação da presença de colônias com macromorfologia características do gênero *Malassezia*, lâminas eram confeccionadas e coradas pela técnica de Gram, tornando possível a visualização de blastoconídios típicos de *Malassezia* spp.

A fenotipagem das cepas de *Malassezia* spp. foi realizada a partir da junção de características morfológicas e bioquímicas, de acordo com Guého et al. (1996). Guillot et al., (1996) e Hoog et al. (2000), como: atividade de  $\beta$ -glicosidase (hidrólise da esculina), catalase e urease; assimilação dos *Tweens* 20 (10%) (Labsynth, São Paulo, SP), 40 (0,5%), 60 (1%) 80 (1%) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO), e Chremophor EL (10%) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) em ágar Sabouraud dextrose 2%, bem como a capacidade de crescer em ágar Sabouraud simples e termotolerância a 40°C .

Todos os testes foram realizados com culturas de *Malassezia* spp. com 4 a 5 dias de incubação. O teste de atividade de  $\beta$ -glicosidase foi realizado utilizando meio de cultura sólido contendo esculina (Sigma Chemical Co., St Louis, MO), para tanto uma porção da colônia foi repicada ao meio e este incubado a 32°C, sendo examinado durante 4 dias, afim de verificar o surgimento de pigmento enegrecido difundido no meio. Para verificar a produção de catalase, uma gota de peróxido de hidrogênio foi adicionada a uma lâmina de vidro e imediatamente uma porção da colônia de *Malassezia* spp. foi colocada em contato com o peróxido de hidrogênio, havendo produção de bolhas indicativo de produção desta enzima. Outra enzima testada foi a urease, no entanto, esta prova é utilizada apenas para identificação de *M. pachydermatis*. Neste teste, um fragmento da colônia fúngica foi repicado no meio ágar uréia de Chistensen, seguido de incubação a 32°C por 24h, havendo produção desta enzima há mudança da coloração do meio, passando de amarelo a róseo intenso.

Para o teste de assimilação de *Tween* e Chremophor EL, foi produzido ágar Sabouraud dextrose 2% e adicionado a este os *Tweens* 20 (10%), 40 (0,5%), 60 (1%), 80 (1%) (v/v); para o Chremophor EL a concentração foi de 10% (v/v). Após total solubilização sob aquecimento, os meios foram autoclavados e distribuídos a tubos de ensaio e inclinados. Para o teste de

crescimento em ágar Sabouraud dextrose 2% simples o mesmo procedimento foi realizado, no entanto não haver suplementação de lipídios ao meio. Para realização do teste, um fragmento da colônia foi repicado aos tubos e estes incubados durante 4 dias a 32°C, havendo crescimento de colônias, o que leva a considerar o teste positivo.

A avaliação da resistência a 40°C foi realizada em ágar Dixon , onde porções das colônias de *Malassezia* spp. foram repicadas e incubadas nesta temperatura durante 7 dias. Os teste eram considerados positivos quando havia crescimento fúngico.

### **5.3 Avaliação do efeito crioprotetor de óleos fixos de sementes de frutas**

#### **5.3.1 Obtenção das sementes e preparação dos extratos**

Os óleos fixos das sementes (OFS) de goiaba (*P. guava*), mamão (*C. papaya*), manga (*M. indica*), maracujá (*P. edulis*) e melancia (*C. lanatus*) foram gentilmente cedidos pelo Laboratório de Produtos Naturais (UECE- Universidade Estadual do Ceará). Os óleos fixos foram preparados inicialmente, separando as sementes do restante de polpa e estas foram secas em estufa a 50°C e moídas para a obtenção de um farelo. Os óleos fixos foram extraídos pelo método de extração a quente em refluxo, Soxlet, utilizando como solvente o hexano (Merck, Darmstadt, Germany).

#### **5.3.2 Teste pré-estocagem de *Malassezia* spp. em óleos fixos das sementes**

Para avaliar a esterilidade dos óleos estudados, uma alíquota de 100 $\mu$ L de cada óleo foi adicionado em um tubo de ensaio contendo caldo BHI e incubado em estufa a 37°C. Após 24h, foi verificada a turvação do caldo BHI. Havendo turvação suspeita, 10 $\mu$ L do meio contendo o óleo era cultivado em ágar BHI. Foi averiguado também se estes produtos naturais exerciam efeito fungicida, para tanto uma cepa de *M. furfur* foi incubada em caldo Dixon e os óleos fixos

das sementes (1:1) em estufa por 96h. Após esse período, uma alíquota foi retirada e subcultivada em ágar Dixon .

### **5.3.3 Estocagem de diferentes cepas de *Malassezia* spp. em meio sólido**

Em Ependorffs® foram adicionados 300 $\mu$ L de ágar Dixon, e solidificados inclinados. Após solidificação, 12 cepas foram inoculadas e incubadas em estufa a 32°C durante 72h. Após este período, foram adicionados 300 $\mu$ L da solução de óleo fixos de sementes e óleo mineral (1:1) sobre a coluna de ágar Dixon de modo que as colônias formadas foram recobertas (Figura 10). A mistura ficou em contato com as colônias por 45min e acondicionados em freezer a -80°C. Grupos controle contendo somente ágar Dixon sem crioprotetores, ágar Dixon com óleo mineral foram preparados. As cepas foram estocadas durante 6 meses, após este período o conteúdo era adicionado em tubos contendo caldo Dixon, onde estes eram incubados por até 7 dias, finalizando este tempo, 100 $\mu$ L do caldo inoculado eram transferidos a tubos com ágar Dixon, para posterior análise pós-estoque.

### **5.3.4 Estocagem de diferentes cepas de *Malassezia* spp. em caldo**

Após 96h de crescimento em ágar Dixon, colônias de 12 cepas de *Malassezia* spp. foram retiradas e inoculadas em Ependorffs® contendo 150 $\mu$ L de caldo Dixon e 150 $\mu$ L da solução de óleo fixos de sementes e óleo mineral (1:1). A mistura ficou em contato com as leveduras por 45min e acondicionados em freezer a -80°C. Grupos controle contendo somente caldo Dixon sem crioprotetores, caldo Dixon com óleo mineral e caldo Dixon com glicerol foram preparados. As cepas foram estocadas por 6 e 9 meses, após este período o conteúdo era adicionado em tubos contendo caldo Dixon, onde estes eram incubados por até 7 dias, finalizando este tempo, 100 $\mu$ L do caldo inoculado eram transferidos a tubos com ágar Dixon, para posterior análise pós-estoque.

### **5.3.5 Avaliação fenotípica pós-estocagem de cepas de *Malassezia* spp.**

As cepas reativadas que foram repicadas em ágar Dixon foram testadas de acordo com algumas de suas características fenotípicas, incluindo: atividade de catalase e  $\beta$ -glicosidase, assimilação de Tween 60 e Chremophor EL. Para as cepas de *M. pachydermatis* foram testadas também em relação à atividade de urease e crescimento em ágar Sabouraud dextrose 2% sem suplementação lipídica.

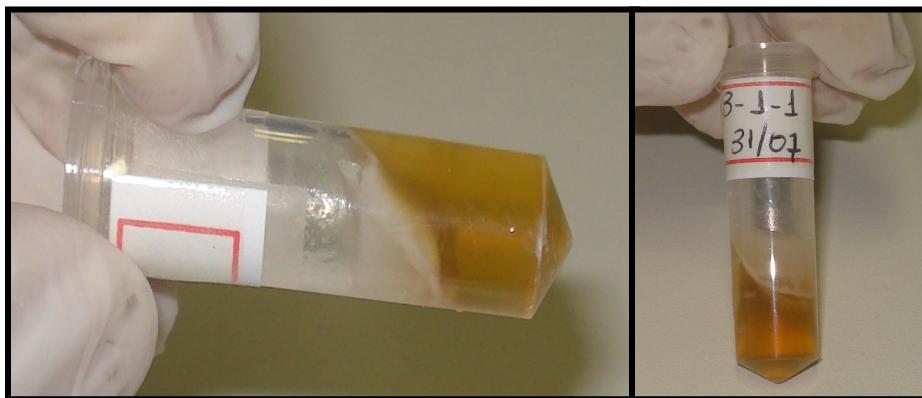


Figura 10: Tubos Eppendorffs® contendo ágar Dixon, inoculado com *Malassezia* spp. Após, incubado por 4 dias a 32°C e acrescido de óleo mineral e óleo da semente de manga, produzindo uma coluna de material viscoso sobre as colônias.

Fonte: LEITE, 2008.

## 5.4 Testes de sensibilidade antifúngica *in vitro*

### 5.4.1 Sensibilidade *in vitro* das cepas de *Malassezia* spp.

A sensibilidade das cepas de *Malassezia* spp. frente a diferentes antifúngicos foi obtida a partir da realização da técnica de microdiluição em caldo descrita por Velegraki et al. (2004), com modificações realizadas por Prado et al. (2008). Estes autores desenvolveram esta metodologia baseada na suplementação do meio RPMI 1640, buscando adaptar a técnica de microdiluição preconizada pelo CLSI (*Clinical Laboratory Standard Institute*) que abrange somente as leveduras do gênero *Candida* spp. e *Cryptococcus* spp. para as espécies lipodependentes de *Malassezia*.

Cinco antifúngicos foram utilizados na presente pesquisa: cetoconazol, itraconazol, voriconazol (Jansen Research Foundation, Beerse), fluconazol (Pfizer, Madri, Spain), caspofungina (Merck Sharp & Dohme, Brazil) e anfotericina B (Sigma, St. Louis, Mo.).

Cetoconazol, itraconazol, voriconazol, anfotericina B e caspofungina foram diluídos em dimetilsulfóxido (100%) (DMSO) (Merck, Darmstadt, Germany) e o fluconazol foi preparado em água destilada.

Soluções estoque com concentração 100 vezes maior que a concentração mais alta avaliada na placa de microdiluição foram preparadas. Os intervalos de concentrações das drogas testadas, foram: 0,03 - 16 $\mu$ g/mL para cetoconazol, itraconazol, voriconazol e anfotericina B; 0,125 - 64 $\mu$ g/mL para o fluconazol. Para a caspofungina o intervalo foi 0,015 - 8 $\mu$ g/mL.

Com relação ao inóculo fúngico, este foi preparado a partir de colônias fúngicas de *Malassezia* spp. com 4 a 5 dias de crescimento, em ágar Dixon a 32°C. As colônias formadas eram gentilmente retiradas e suspendidas em solução salina (0,9%) estéril, sob agitação manual, a fim de obter concentração igual a  $2,0 - 3,5 \times 10^3$  UFC/ml, ajustado por turbimetria.

Para a produção do caldo RPMI 1640, inicialmente foram pesados 2,16g de RPMI 1640 (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) com L-glutamina, 2,0 g/L de glicose sem bicarbonato de sódio e dissolvido em 900mL de água destilada, em seguida esta solução foi suplementada com 20g de glicose, 4g de bile bovina, 1mL de glicerol e 0,4mL de Tween 20. Com a ajuda de um potenciômetro, o meio de cultura foi tamponado com MOPS (ácido 2-[N-morfolino]-propoanossulfônico) 0,165M, e o pH ajustado para 7,0. Em seguida o volume final de 1 litro foi aferido com água destilada. A esterilização deste meio de cultura é realizada por meio de filtração a vácuo com membrana filtrante de 0,2  $\mu$ m. Um alíquota do caldo foi incubada por 48h a 37°C para garantir sua esterilidade.

Para a realização do teste de sensibilidade, foram utilizadas placas de microdiluição de 96 micropoços (fungo redondo) onde, inicialmente foram adicionados 100 $\mu$ L de meio RPMI 1640 suplementado, anteriormente preparado. Após este procedimento 100 $\mu$ L do antifúngico a ser avaliado foram adicionados na primeira coluna. A partir de então, este antifúngico foi diluído de forma seriada (1:2) até a 11º coluna. Por fim, 100 $\mu$ L da suspensão do fungo foram distribuídos em cada poço. Controles positivos de crescimento e esterilidade foram incluídos para cada isolado testado. As placas eram colocadas em estufa na temperatura de 32°C (NCCLS, 2002).

Após um período de incubação das placas de microdiluição por 48h para *M. pachydermatis* e 96h para as cepas lipodependentes de *Malassezia* spp., uma alíquota de 1 $\mu$ L do conteúdo de cada poço era retirada e semeada em placas de Petri contendo ágar Dixon (Figura 11). As placas de Petri eram então, incubadas em estufa a 32°C. Após 96 h de incubação foi realizada a contagem de colônias crescidas em cada concentração, de forma que a menor concentração

que foi capaz de inibir 100% e 80% do crescimento fúngico foi considerada como a CFM e CIM, respectivamente, tendo como referência o seu controle positivo (Prado et al., 2008)

Vale salientar que primeiramente foi realizado o subcultivo após 72h de contato das leveduras lipodependentes de cepas de *Malassezia* spp com as drogas estudadas, de acordo com os parâmetros de Velegraki et al. (2004). No entanto não foi possível verificar a inibição (CIM) ou a parada (CFM) do crescimento fúngico. Desta forma o tempo de incubação foi aumentado para 96h a 32°C. Através deste procedimento, foi possível determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração fungicida mínima (CFM), pois somente com a leitura visual da placa de microdiluição não fica possível verificar a redução e a parada total de crescimento, devido a formação de “clumps”, resultado de debris celulares insolúveis oriundos da parede celular das células de *Malassezia* spp.

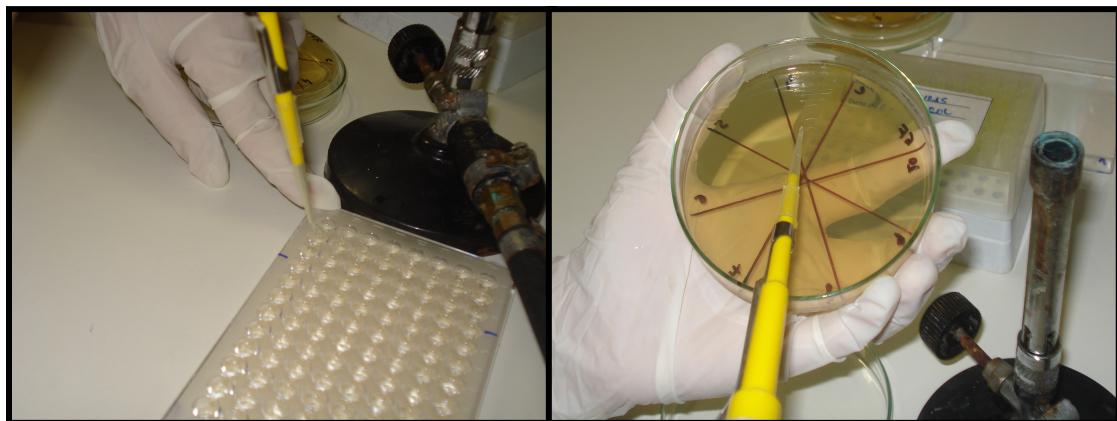


Figura 11: Subcultivo em ágar Dixon das concentrações de antifúngicos contidas nos poços da placa de microdiluição.

Fonte: LEITE, 2008.

#### 5.4.2 Avaliação da atividade antifúngica dos extratos hexânico e metanólico da semente do abacate frente a *M. pachydermatis*, *Candida* spp. e *C. neoformans*

Os extratos hexânico e metanólico de semente de abacate (*Persea americana*), foram cedidos pelo Laboratório de Produtos Naturais (UECE-Universidade Estadual do Ceará). As cepas fúngicas utilizadas foram obtidas a partir da micoteca do CEMM (UFC). A avaliação da sensibilidade a antifúngicos foi desenvolvida utilizando o método de microdiluição em caldo RPMI 1640 de acordo com a metodologia recomendada pelo CLSI, com modificações

preconizadas por Velegraki et al. (2004) e Prado et al. (2008), para as cepas de *M. pachydermatis*. Cepas de *Candida* spp. e *C. neoformans* foram incluídas no ensaio, pois estas espécies são incluídas no documento M27-A (CLSI). O inóculo das leveduras foi primeiramente preparado em salina esterilizada (0,9%) na escala 0,5 de McFarland, posteriormente, esta suspensão passou por duas diluições, a primeira de 1:100 e depois 1:20. Para isto, foi utilizado RPMI 1640, cujo pH foi ajustado com MOPS 0,165M pH 7. Após todas as diluições, a concentração final do inóculo foi aproximadamente igual a  $2,5 - 5 \times 10^3$  UFC/mL.

Inicialmente, foram adicionados 100 $\mu$ L de RPMI 1640 em cada poço da placa de microdiluição, e à primeira coluna foram incorporados 100 $\mu$ L da solução estoque do extrato, obtendo-se concentração de 2,5mg/mL. A partir de então, o extrato foi diluído de forma seriada na razão de 1:2, até a 11º coluna. Em cada placa foram incluídos controles negativo e positivo; também foi realizado um teste de cada levedura com DMSO e suas diluições. As microplacas foram incubadas a 32 °C por 48 h. A leitura do teste foi feita através de comparação visual. A CFM foi considerada a menor concentração do extrato capaz de inibir 100% do crescimento de cada levedura, tendo como referência o seu respectivo controle positivo. Para as cepas de *M. pachydermatis*, utilizou-se a técnica descrita no item 6.4.1., porém o subcultivo foi realizado em ágar batata dextrose (Himedia, Mumbai, In).

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Recuperação das cepas

A micoteca do CEMM dispunha de 163 cepas de *Malassezia* spp. estocadas em ágar Dixon a -20°C e 130 cepas estocadas em salina 0,9% a temperatura ambiente. No primeiro método de estocagem a taxa de recuperação foi de 20,24%, sendo recuperadas somente 33 exemplares do gênero. Foi verificado que a viabilidade decresce quanto maior é o tempo de estocagem, como mostrado na figura 14, tendo após 46 meses de estoque, nestas condições, uma taxa de recuperação nula. Todas as cepas estocadas em salina 0,9% a temperatura ambiente, independente do tempo, não foram recuperadas.

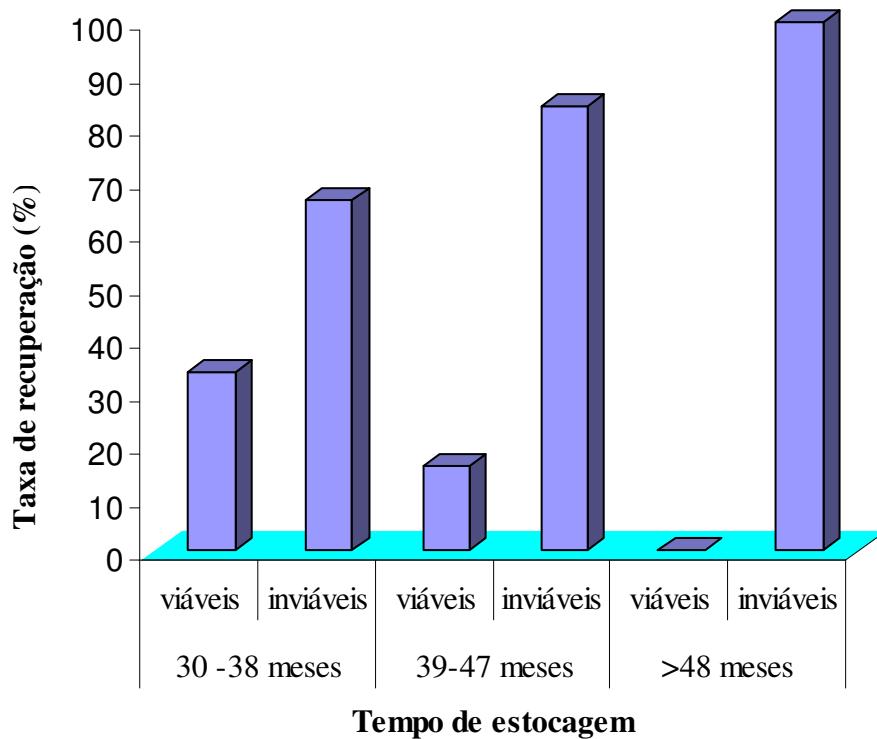


Figura 12- Taxa de recuperação das cepas de *Malassezia* spp. em ágar Dixon, após diferentes tempos de estoque a -20°C

## 6.2 Análise fenotípica

Um total de 38 cepas de *Malassezia* spp. foram analisadas neste estudo, sendo 33 oriundas da estocagem a -20°C em ágar Dixon e cinco exemplares que não sofreram estocagem (controle). A avaliação fenotípica destas cepas deu-se inicialmente com a caracterização macromorfológica das colônias, onde foi verificado que todos os exemplares produziram colônias com coloração amarelo-creme e textura glabrosa seca (Figura 13.a). Após esta constatação, lâminas com fragmentos das colônias foram coradas pelo método de Gram, para evidenciar a morfologia dos blastoconídios. Assim foi possível notar a presença de células fúngicas leveduriformes ovais e/ou elípticas com brotamento unipolar com a presença de colarete (Figura 13.b).

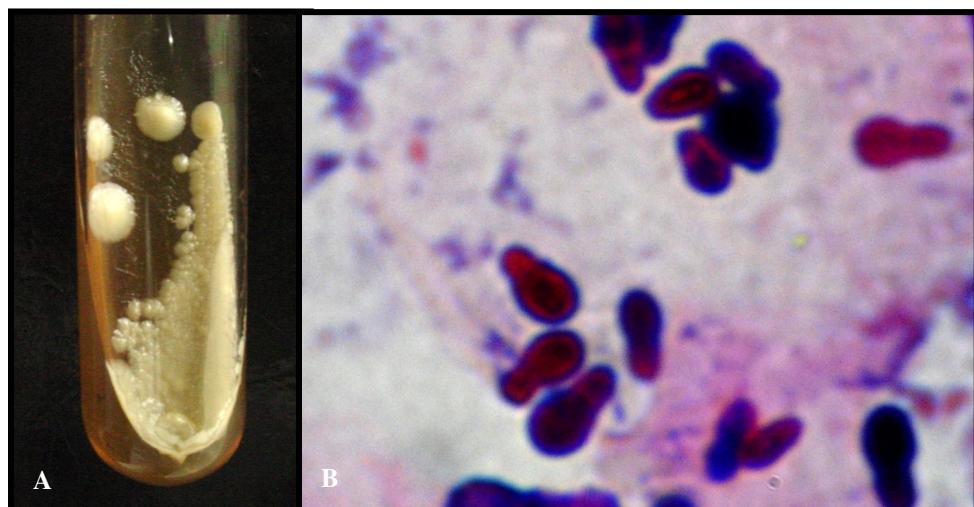


Figura 13: Colônias de *Malassezia* spp. em ágar Dixon (A) e micromorfologia dos seus blastoconídios corados por Gram, evidenciando o “colarete” (B).

O primeiro teste bioquímico realizado foi o teste da catalase. Todas as cepas trabalhadas ( $n=38$ ) foram capazes de dismutar o peróxido de hidrogênio.

Das 38 cepas estudadas, 8 cepas (21,05%) cresceram em meio ágar Sabouraud sem suplementação lipídica (S/A). Destas 8 cepas, todas se mostraram positivas em relação ao teste de produção de urease. A partir destes dados, evidenciou-se a presença de 8 exemplares não lipodependentes e 30 exemplares de *Malassezia* spp. lipodependentes.

Para o teste de atividade de  $\beta$ -glicosidase, 23 cepas foram positivas, perfazendo 60,52% do total das cepas estudadas. No entanto, para os exemplares lipodependentes 17 cepas

foram capazes de hidrolisar a esculina, portanto 44,73%. Enquanto, só uma cepa não lipodependente foi negativa para esta prova.

O uso do Chremophor EL, como fonte lipídica, foi verificado em 23 cepas (63,52%) incluindo as espécies de *M. pachydermatis*. Contudo, para as cepas lipodependentes (n=30) esta característica foi demonstrada em 16 exemplares (42,10%).

Para o teste de assimilação de Tween 20: 5,26% foram negativas, 2,63% assimilaram fracamente, enquanto 92% das cepas foram positivas, isto é, assimilaram este composto. Todas as cepas assimilaram os *Tweens* 40 e 60, como fonte exógena de lipídios. Por fim, para o teste de assimilação do *Tween* 80, foi verificado que 7 cepas, 18,42% assimilaram fracamente, enquanto 81,57% das cepas assimilaram o *Tween* 80.

Para as cepas lipodependentes de *Malassezia* spp. 19 exemplares (63,33%) se mostraram termotolerantes à temperatura de 40°C, enquanto 11 cepas foram sensíveis a esta temperatura. Em relação às cepas não lipodependentes (*M. pachydermatis*), seis cepas (75%) foram termoresistentes, enquanto duas (25%) não resistiram ao crescimento em temperatura de 40°C.

Assim, a partir das características fisiológicas que foram realizadas neste estudo, pode-se sugerir a presença das espécies *M. furfur* / *M. dermatis* (n=17; cepas CEMM 1-5-071 a 1-5-062; SDA negativo, assimilações de Chremophor EL e *Tween* 60 positivas), *M. sympodialis* (n=8; cepas CEMM 1-5-060 a 1-5-065; SDA negativo, assimilação de Chremophor EL negativa, atividade de β-glicosidase positiva e assimilação de *Tween* 60 positiva), *M. slooffiae* (n=5; cepas CEMM 1-5-080 a 1-3-066; SDA negativo, assimilação de Chremophor EL negativa, atividade de β-glicosidase negativa e assimilação de *Tween* 60 positiva) e *M. pachydermatis* (n=8; cepas CEMM de 1-3-088 a 1-5-066; SDA positivo) (Tabela 2).

Tabela 2: Resultados dos testes fisiológicos das cepas de *Malassezia* spp.

Cepas	S/A	Urease	Catalase	Esculina	Chrem. EL	<i>Tween</i> 20*	<i>Tween</i> 40*	<i>Tween</i> 60*	<i>Tween</i> 80*	40°C
CEMM 1-5-071	(-)	(nt)	(+)	(+)	(±)	(+)	(+)	(+)	(±)	(+)
CEMM 1-5-072	(-)	(nt)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
CEMM 1-5-067	(-)	(nt)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(±)	(+)
CEMM 1-5-069	(-)	(nt)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(±)	(+)
CEMM 1-5-084	(-)	(nt)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
CEMM 1-5-085	(-)	(nt)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
CEMM 1-5-052	(-)	(nt)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
CEMM 1-5-053	(-)	(nt)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
CEMM 1-5-056	(-)	(nt)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
CEMM 1-5-057	(-)	(nt)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
CEMM 1-5-059	(-)	(nt)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
CEMM 1-5-066	(-)	(nt)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
CEMM 2-5-076	(-)	(nt)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
CEMM 1-2-071	(-)	(nt)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
CEMM 1-5-073	(-)	(nt)	(+)	(+)	(+)	(±)	(+)	(+)	(+)	(-)
CEMM 1-5-063	(-)	(nt)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
CEMM 1-5-062	(-)	(nt)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
CEMM 1-5-060	(-)	(nt)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
CEMM 1-5-077	(-)	(nt)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(±)	(-)
CEMM 1-5-078	(-)	(nt)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
CEMM 1-5-058	(-)	(nt)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
CEMM 1-5-079	(-)	(nt)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
CEMM 1-5-070	(-)	(nt)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
CEMM 1-5-064	(-)	(nt)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
CEMM 1-5-065	(-)	(nt)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
CEMM 1-5-080	(-)	(nt)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
CEMM 1-5-083	(-)	(nt)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
CEMM 1-5-051	(-)	(nt)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(±)	(+)
CEMM 1-5-076	(-)	(nt)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(±)	(+)
CEMM 1-3-066	(-)	(nt)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(±)	(+)
CEMM 1-3-008	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
CEMM 1-4-012	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
CEMM 1-5-065	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
CEMM 1-3-189	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
CEMM 1-5-171	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
CEMM 1-5-174	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
CEMM 1-5-173	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
CEMM 1-5-066	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)

(+) resultado positivo; (-) resultado negativo; (±) crescimento fraco; \* Tween 20 na concentração de 10%; Tween 40 a 0,5%; Tween 60 a 10%; Tween 80 a 1% em ágar Sabouraud dextrose.

### 6.3 Estocagem de cepas de *Malassezia* spp. em óleos fixos de sementes (OFS)

Foi verificado que todas 12 cepas estocadas nos oito diferentes tratamentos em ágar Dixon foram viáveis em seis meses. Em relação a suas características fenotípicas, algumas foram modificadas, como a produção de  $\beta$ -glicosidase que foi anulada em 3 cepas (3,12%), sendo 2 cepas estocadas com óleo mineral (81,81%) e uma cepa com OFS de melancia (90,90%). Outra característica modificada foi a capacidade de assimilação de Chremophor EL, onde 3 cepas (70%) estocadas com OFS de mamão, 3 cepas (70%) com OFS de melancia, 1 cepa (90%) com OFS de maracujá e uma cepa (90%) com OFS de goiaba, não assimilam mais este composto.

A primeira retirada do estoque em caldo a -80°C que foi realizada em seis meses de armazenagem, onde verificou-se que todas as 12 cepas estocadas nos oitos tratamentos foram viáveis. A produção de  $\beta$ -glicosidase foi anulada em 7 situações (7,29%), sendo 2 cepas (81,81%) estocadas com óleo mineral, uma cepa (90,90%) com OFS de mamão, 3 cepas (72,72%) com OFS de melancia e uma cepa (90,90%) com OFS de maracujá. Outra característica fenotípica afetada com o congelamento foi a capacidade de assimilação do Chremophor EL, havendo negativação dos resultados em 10 situações (10,41%) de estoque, entre estas 3 cepas (70%) estocadas em OFS de mamão, 3 cepas (70%) estocadas com o OFS de maracujá, bem como em 2 cepas (80%) mantidas em OFS de melancia e 2 cepas (80%) estocadas em OFS de goiaba.

Com nove meses de estoque, dois exemplares do estoque contaminaram, o que impediu a realização das provas fenotípicas pós-estoque, no entanto todas as demais foram viáveis. Como descrito aos 6 meses, houve perda de atividade de  $\beta$ -glicosidase em 10 cepas (10,63%), adicionalmente aos resultados evidenciados em 6 meses, 3 cepas a mais foram afetadas, onde podemos citar uma cepa estocada com óleo mineral (72,72%), uma cepa (90,90%) em OFS de goiaba e outra cepa (70,72%) em OFS de melancia. Uma cepa de *M. pachydermatis* perdeu sua atividade de urease, no entanto sua capacidade de crescimento em ágar Sabouraud sem suplementação lipídica não foi afetada. A assimilação de Chremophor EL foi a característica que mais sofreu danos, 35 cepas (37,13%), com o congelamento, isto foi verificado em 4 cepas (60%) estocadas com óleo mineral, 4 cepas (60%) com glicerol e 3 cepas (70%) estocadas apenas em ágar Dixon sem adição de crioprotetores. Para as cepas estocadas em óleos de sementes também foi verificada a perda desta identidade fenotípica, sendo observado em 5 cepas (50%) mantidas com OFS de semente de manga, 5 cepas (20%) em OFS de mamão, 4 cepas (40%) em OFS de melancia, 4 cepas (30%) com OFS de maracujá e 6 cepas (20%) com OFS de goiaba.

#### 6.4 Sensibilidade antifúngica *in vitro* das cepas de *Malassezia* spp.

Os valores de CIM e CFM das cepas de *Malassezia* spp. testadas encontram-se na tabela 3. Para as 38 cepas avaliadas, os CIMs para itraconazol e cetoconazol variaram de <0,03 a 0,06  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; de 4 a >64  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para o fluconazol; de <0,03 a >16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para voriconazol. Perante a anfotericina B os valores de CIM variaram de 1 a >16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Não foi possível determinar os valores de CIM e CFM frente a caspofungina para todas as cepas de *Malassezia* spp. estudadas, pois mesmo na concentração de 256  $\mu\text{g}/\text{mL}$  não houve inibição de crescimento fúngico.

Em relação aos derivados azólicos, as cepas lipodependentes de *Malassezia* spp. (n=30) exibiram CIMs que variaram de <0,03 a 0,06  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para o cetoconazol; <0,03 a >64  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para o itraconazol; de 4 a >64  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para o fluconazol; <0,03 a >16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para o voriconazol. Os valores de CFM encontrados foram de <0,03 a >16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para o cetoconazol; de <0,03 a >16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para o itraconazol; de 8 a >64  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para o fluconazol; de <0,03 a >16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para o voriconazol. Para o derivado poliênico, anfotericina B, os valores de CIM encontrados variaram de 1 a >16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Com relação às cepas de *Malassezia* spp. não lipodependentes, isto é, as pertencentes a espécie *M. pachydermatis*, as CIMs variaram de <0,03 a 0,125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para o cetoconazol, <0,03  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para o itraconazol; de 4 a 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para o fluconazol; de <0,03 a 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para o voriconazol. Adicionalmente, os CFMs variaram de 0,03 a 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para o cetoconazol, <0,03 a 0,125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para o itraconazol; de 8 a 64  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para o fluconazol; de 4 a >16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para o voriconazol. Perante a anfotericina B, as cepas de *M. pachydermatis* exibiram CIM entre 4 a >16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Tabela 3: Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) dos derivados azólicos, anfotericina B e caspofungina perante as cepas de *Malassezia* spp.

<i>Malassezia</i> sp. lipodependentes	Concentrações de CIM e CFM (µg/mL)											
	Cetoconazol		Itraconazol		Fluconazol		Voriconazol		Anfotericina B		Caspofungina	
	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC
n= 30	<0,03(15) <sup>a</sup>	<0,03(4)	<0,03(24)	<0,03(15)	4(5)	8(1)	<0,03(5)	<0,03(5)	1(3)	1(3)	>256(10)	> 256(10)
	0,03(12)	0,03(3)	0,03(2)	0,03(1)	8(5)	16(4)	0,125(12)	0,25(5)	2(1)	2(1)		
	0,06(3)	0,06(2)	0,5(1)	0,15(1)	16(7)	32(4)	0,25(5)	0,5(1)	4(1)	4(1)		
		1(8)	1(1)	1(1)	32(9)	64(3)	2(2)	2(3)	8(2)	8(2)		
		2(2)	8(1)	8(1)	64(4)	>64(18)	4(1)	> 16(16)	16(2)	16(2)		
		>16(11)	>16(1)	>16(11)			8(1)		>16 (21)	>16 (21)		
							>16(4)					
<i>M. pachydermatis</i>	<0,03(7)	<0,03(5)	<0,03(8)	0,03(2)	4(3)	8(3)	<0,03(2)	<0,03(2)	2(1)	2(1)	>256(8)	> 256 (8)
n= 8	0,125(1)	0,06(3)		0,125(6)	8(2)	16(2)	0,25(2)	0,5(2)	4(5)	4(5)		
					16(1)	64(3)	2(4)	8(4)	8(1)	8(1)		
					64(2)				>16(1)	>16 (1)		

<sup>a</sup> número de cepas de *Malassezia* spp. relacionadas a CIM correspondente.

\* perante as caspofugina, foram testadas 10 cepas lipodependentes.

## **6.5 Avaliação da atividade antifúngica dos extratos hexânico e metanólico da semente do abacate frente à *M. pachydermatis*, *Candida* spp. e *C. neoformans***

Os resultados de CIM para os extratos hexânico (EHSPA) e metanólico (EMSPA) das sementes do abacate estão expostos na tabela 4. As cepas de *M. pachydermatis* (n=7), o EHSPA apresentou os seguintes valores de CIM: 0,625 $\mu$ g/mL (n=1), 0,312 $\mu$ g/mL (n=3), 0,156 $\mu$ g/mL (n=2) e 0,031 $\mu$ g/mL (n=1). Perante o EMSPA quatro cepas tiveram valores de CIM = 0,625 $\mu$ g/mL, enquanto três cepas obtiveram CIM = 0,312 $\mu$ g/mL. Com relação às 12 cepas de *Candida* spp. (incluindo as cepas padrão) estudadas, apresentaram valores de CIM equivalentes a 1,25 $\mu$ g/mL (n=2), 0,625 $\mu$ g/mL (n=9) e 0,312 $\mu$ g/mL (n=1) para EHSPA. Enquanto, para EMSPA as cepas apresentaram CIM iguais a 0,625 $\mu$ g/mL (n=10), 0,312 $\mu$ g/mL (n=1) e 0,125 $\mu$ g/mL (n=1). Frente a cepas de *C. neoformans* (n=6) o EHSPA apresentou CIM para uma cepa de 0,625 $\mu$ g/mL e cinco cepas obtiveram CIM = 0,312 $\mu$ g/mL. Para o EMSPA foram encontrados valores de CIM = 0,156 $\mu$ g/mL para uma cepa, enquanto cinco cepas apresentaram CIM = 0,08 $\mu$ g/mL.

Tabela 4: Concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos das sementes de abacate (*Persea americana*) frente a *M. Pachydermatis*, *Candida* spp. e *C. neoformans*.

Fungos	n	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )	
		EHSPA <sup>a</sup>	EMSPA <sup>b</sup>
<i>M. pachydermatis</i>	7	0,625 (1) <sup>c</sup>	0,625 (4)
		0,312 (3)	0,312 (3)
		0,031 (1)	
		0,156 (2)	
<i>Candida</i> spp.	10	1,25 (2)	0,625 (8)
		0,625 (7)	0,312 (1)
		0,312 (1)	0,125 (1)
<i>C. neoformans</i>	6	0,625 (1)	0,156 (1)
		0,312 (5)	0,08 (5)
<i>C. krusei</i> ATCC 6528	1	0,625 (1)	0,625 (1)
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	1	0,625 (1)	0,625 (1)

<sup>a</sup> extrato hexânico de semente de abacate

<sup>b</sup> extrato metanólico de semente de abacate

<sup>c</sup> número de cepas relacionadas a CIM correspondente.

## 7 DISCUSSÃO

Desde o trabalho publicado por Guého, Midgley e Guillot (1996), onde se sustentam as bases para a reclassificação das espécies de *Malassezia*, mediante metodologia bioquímica e molecular, o gênero *Malassezia* passou por várias mudanças taxonômicas, e ainda não foi alcançada uma solução definitiva para a classificação sistemática destas leveduras. Considerando correta a classificação atual, o gênero *Malassezia* apresenta treze espécies: *M. pachydermatis*, *M. furfur*, *M. sympodialis*, *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. restricta*, *M. slooffiae*, *M. dermatitis*, *M. yamatoensis*, *M. japonica*, *M. nana*, *M. caprae* e *M. equiina* (CABAÑES et al., 2007). A importância na diferenciação das espécies de *Malassezia* não reside apenas no fato da identificação por si só, mas, sim, no fato de que possam existir possíveis diferenças, ainda não determinadas, na sua patogenicidade (SCHLOTTFELDT et al., 2002). Já tem sido descrita variação na freqüência e intensidade das lesões, além de diferenças na sua sensibilidade *in vitro* a vários antifúngicos (GUPTA et al., 2000). Assim, estudos que abranjam as peculiaridades destas leveduras são de suma importância para melhor compreensão do gênero *Malassezia*.

Neste estudo foram utilizadas 38 cepas, 33 advindas da micoteca do CEMM e cinco cepas que não sofreram estoque (controle). Dentre os testes fenotípicos utilizados nas chaves de identificação, inclui-se o teste de atividade de catalase. Esta enzima faz parte de um grupo que reduz os efeitos tóxicos de espécies reativas do oxigênio (EROs) que incluem peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) e o radical hidroxil ( $^{\bullet}OH$ ), e estes possuem habilidade de reagir com uma variedade de componentes celulares, como lipídios, proteínas e DNA (ÖZYÜREK et al., 2008). Espécies reativas de oxigênio, como as citadas anteriormente, são produzidas em diversos sistemas biológicos, como os leucócitos com propriedade fagocítica, neutrófilos e macrófagos, os quais produzem estas moléculas em seus vacúolos digestivos, que levam a lise dos microrganismos fagocitados (ABBAS, LICHTMAN, 2005). Contudo, microrganismos, que produzem a catalase conseguem reduzir os efeitos tóxicos do peróxido de hidrogênio, dismutando-o em compostos menos reativos. Todas as cepas estudadas tiveram atividade de catalase positiva, deste modo, verificou-se que

nenhuma destas pertencia à espécie *M. restricta*, única espécie do gênero *Malassezia* que não produz catalase (CARBAÑES et al., 2007).

Oito cepas foram capazes de crescer em ágar Sabouraud sem suplementação lipídica, sendo caracterizadas, portanto, como *M. pachydermatis*. Adicionalmente, estas cepas também foram capazes de assimilar os *Tweens* 20, 40, 60, e 80, além do Chremophor EL, demonstrando que a espécie *M. pachydermatis* embora seja lipofílica, não necessita de fonte lipídica exógena como as demais espécies do gênero, que são lipodependentes (GUÉHO, MIDGLEY, GUILLOT, 1996). Para atividade de  $\beta$ -glicosidase, apenas uma cepa de *M. pachydermatis* se mostrou negativa, sendo esta variação de resultado já verificada por Cabañes et al. (2007). Três cepas de *M. pachydermatis*, incluindo uma cepa controle, não suportaram o crescimento a 40°C, o que contradiz alguns trabalhos que mostram que esta espécie é termotolerante a esta temperatura (HIRAI et al., 2004; CABAÑES et al., 2007). Outra característica fenotípica importante desta espécie é a capacidade de hidrolisar a uréia, por meio da enzima urease (GUÉHO, MIDGLEY, GUILLOT, 1996), no entanto, a atividade desta enzima pode ser afetada pelo período e condições de manutenção do microorganismo (GIRÃO et al., 2004). Nas condições testadas, todas as cepas estocadas, bem como a cepa controle foram capazes de produzir esta enzima, mesmo tendo o período de armazenamento variado de 1 a 4 anos. Girão et al., (2004) descreveram que 50% das cepas de *M. pachydermatis* utilizadas por eles tornaram-se negativas no teste da urease, após seis meses de estocagem em ágar Dixon na temperatura de -20°C.

Para os exemplares lipodependentes (n=30), 17 cepas foram capazes de hidrolisar a esculina. Portanto, são produtoras de  $\beta$ -glicosidases, que fazem parte de um complexo enzimático de degradação de celulose, sendo esta enzima responsável pela hidrólise de celobiose e pequenos celo-oligosacarídeos (NAKKHARAT, HALTRICH, 2006). Este teste gera dúvidas em relação a sua aplicação, pois alguns autores divergem sobre as espécies que são capazes de produzir esta enzima, além do fato que, entre isolados da mesma espécie pode haver ou não produção de  $\beta$ -glicosidase (KANEKO et al., 2006, CABAÑES et al., 2007).

O teste de  $\beta$ -glicosidase tem sido utilizado para a diferenciação de *M. globosa* e *M. obtusa*, pois as demais características fenotípicas dessas espécies são idênticas. Nesta pesquisa não foi detectada a presença de tais espécies, devido ao fato de que todos os exemplares trabalhos assimilaram pelo menos três dos quatro *Tweens*, visto que estas espécies não utilizam estes compostos como fonte lipídica (CABAÑES

et al., 2007). No entanto, é sabido que há grande dificuldade de recuperação destas espécies *in vitro*, principalmente pós-estocagem (CRESPO, ABARCA, CABAÑES, 2000), podendo os exemplares destas espécies, terem se tornado inviáveis após a estocagem em ágar Dixon a -20°C, pelo período de 30 a 47 meses, onde as demais 33 cepas estudadas foram recuperadas.

Cinco cepas assimilaram os *Tweens* 20, 40, 60 e 80, porém não assimilaram o Chremophor EL e não apresentaram atividade de  $\beta$ -glicosidase. Assim, pode-se sugerir que estas sejam classificadas como *M. slooffiae*. Contudo, estas características podem raramente ser expressadas por cepas de *M. furfur* ou *M. dermatis*, bem como de *M. yamatoensis*, pois não é conhecida se esta espécie é produtora de  $\beta$ -glicosidase (CABAÑES et al., 2007).

Oito cepas assimilaram os *Tweens* 40, 60 e 80, no entanto, foram variáveis na assimilação do *Tween* 20 e não assimilaram o Chremophor EL, todavia, foram capazes de hidrolisar a esculina, podendo ser enquadradas como *M. sympodialis*. A incapacidade de assimilação do Chremophor EL, é a única característica capaz de diferenciar a *M. sympodialis* das espécies *M. furfur* ou *M. dermatis* (KANEKO et al., 2006). A *M. sympodialis* possui características fenotípicas semelhantes a *M. caprae*, porém, até o presente momento, não há estudos que comprovem a participação desta última em quadros patológicos em humanos (CABAÑES et al., 2007).

Dezessete cepas assimilaram os *Tweens* 40, 60 e 80, mas variaram quanto à utilização dos lipídios derivados do *Tween* 20 e a produção de  $\beta$ -glicosidase e foram positivas ao teste de assimilação de Chremophor EL. Assim, pode-se sugerir que estes exemplares pertencem às espécies *M. furfur* ou *M. dermatis*. Devido à escassez dos dados sobre essas duas espécies, elas não foram diferenciadas pelos métodos empregados. Tem sido descrito que estas espécies compartilham as mesmas características observadas nesta pesquisa (CABAÑES et al., 2007). Deste modo o uso de técnicas moleculares é necessário para que estas espécies sejam desagregadas (MIRHENDI et al., 2005).

A termotolerância a 40°C foi outra característica fenotípica testada, porém verificou-se que os dados gerados neste teste eram confusos, deste modo não foi incluída nas identificações deste estudo, pois como verificado por Canteros et al., (2007), esta característica é variável, pois estes autores verificaram cepas de *M. furfur* sensíveis a 40°C. Outros autores que realizaram classificação fenotípica de *Malassezia*

spp., também não utilizaram resultados de termotolerância em suas chaves de identificação (KANEKO et al., 2006; MIRANDA et al., 2007).

Para confirmar a que espécies as cepas estudas pertenciam, este trabalho deveria ter feito uso de técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) associada à análise eletroforética dos fragmentos de restrição pelas enzimas *CfoI* e *BstF51* (MIRHEND et al., 2005). Porém, devido a problemas elétricos, os *primers*, 5'-TAACAAGGATTCCCCTAGTA-3' e 5'-ATTACGCCAGCATCCTAAG-3', que já haviam sido diluídos para preparação da reação de PCR, sofreram descongelamento e com isso foram prejudicados. Deste modo, não foi possível reaver novos *primers*, considerando o tempo hábil para execução desta dissertação. Ademais, em virtude da dificuldade para importação de cepas padrão das diversas espécies de *Malassezia*, não foi possível ser definida, neste momento a chave de identificação destas leveduras. Vale salientar que, em 2007, Cabañes et al. identificaram duas novas espécies deste gênero, *M. caprae* e *M. equiina*, o que descartaria a identificação destas, pelo método proposto por Mirhendi et al. (2005), o qual seria utilizado nas cepas estudadas nesta dissertação.

Diversos métodos vêm sendo empregados para conservação de fungos apresentando cada um deles, vantagens e desvantagens (MARIANO, 2006). Importantes características, como produção de enzimas e metabólitos, estruturas reprodutivas, virulência entre outros, podem ser perdidas, dependendo do método de preservação aplicado (ABADIAS et al., 2001). Tais perdas justificam a tentativa de selecionar e implementar os métodos de conservação de microrganismos, especialmente para cepas industriais e de laboratórios de pesquisa. Na escolha de um método para preservação de um determinado grupamento de fungos, deve ser levada em consideração a capacidade de manutenção das características fenotípicas, genotípicas e patogênicas das cepas estocadas. Assim, o emprego de sistemas adequados de conservação de microrganismos, que permitam o manuseio de amostras fenotípica e genotipicamente estáveis, deve fazer parte da preocupação de cientistas e pesquisadores da área (SANTOS et al., 2002; GIRÃO et al., 2004).

Devido à evolução taxonômica do gênero *Malassezia* spp. e problemas como baixa viabilidade *in vitro*, identificação efetiva de suas espécies, alguns pesquisadores tentam otimizar a conservação destas leveduras em micotecas (CRESPO et al., 2000; GIRÃO et al., 2004). Todavia, as técnicas que apresentam resultados mais significativos são pouco acessíveis aos laboratórios de micologia, como a liofilização ou estocagem em nitrogênio líquido. Crespo et al. (2000), que testaram diferentes condições de

estoque, como: congelamento a -80°C, liofilização e acondicionamento a temperatura ambiente (TA) e a -80°C, estocagem em água destilada e diferentes meios de cultura a 4°C, TA e 28°C. Sendo observado que apenas o congelamento a -80°C obteve sucesso na viabilidade das espécies de *Malassezia* testadas. Estes dados reportam que este gênero possui limitações, que se tornam pertinentes ao estudo de técnicas conservativas eficazes para estas leveduras.

Como verificado neste estudo a viabilidade de cepas de *Malassezia* spp. após estocagem em ágar Dixon a -20°C não foi suficientemente favorável, pois apenas 33% dos exemplares foram recuperados em até 47 meses de estoque. Mesmo, tendo essa baixa taxa de recuperação, este método foi mais eficiente que o estoque em salina (0,9%) coberta com uma camada de óleo mineral, pois não foi possível recuperar nenhuma cepa por meio desta técnica de armazenagem. Embora o estoque em salina seja de fácil acesso a vários laboratórios de micologia, deve-se levar em consideração quais gêneros podem ser estocados nesta condição forma. Girão et al., (2004) afirmam que embora a técnica de estocagem em salina seja pouco onerosa e de fácil execução para preservação de microrganismos, não se mostra eficaz na manutenção de cepas de *M. pachydermatis*, conforme foi observado com os índices de recuperação de 39,6 e 8,4% das cepas estocadas há seis e nove meses, respectivamente. Salientaram, também, que o uso de óleo mineral com salina melhora a viabilidade das cepas, em ambos os períodos de estoque, sendo provavelmente devido à sua capacidade em prevenir a desidratação do meio e diminuir a atividade metabólica do fungo estocado; assim como em virtude da lipofilia da *M. pachydermatis*. Brilhante et al., (2004), utilizaram salina estéril coberta com óleo mineral em estoque de cepas de *M. canis*, e verificaram que este fungo reduziu sua capacidade de produção de macroconídios, estes autores sugerem que a perda desta característica pode estar relacionada com as condições de microaerofilia, bem como a redução de nutrientes e acumulo de metabólitos tóxicos.

Uma técnica semelhante ao armazenamento em salina é o estoque em água destilada estéril, que foi primeiramente testada por Castelanni (1939) e até o momento é utilizada devido ao seu baixo custo e recuperação significativa dos espécimes estocados. Diogo, Sarpiere e Pires (2005) realizaram estoque de 43 espécies diferentes, incluindo fungos hialinos, demáceos e leveduriformes em água destilada. Estes autores conseguiram recuperar todas as cepas estocadas, porém não foi realizado um estudo fenotípico pós-estoque com exceção da capacidade de esporulação dos fungos filamentosos. Mesmo este estudo tendo sido realizado a partir de fungos isolados de um

centro de dermatologia, espécies do gênero *Malassezia*, que são largamente implicadas em desordens dermatológicas, não foram incluídas no estudo. Crespo, Abarca e Cabañas (2000) realizaram a estocagem de *Malassezia* spp. em água destilada, no entanto verificaram baixas taxas de recuperação entre 0,9 a 1%, em cinco meses de estoque.

Em nosso estudo, 12 cepas de *Malassezia* spp. foram estocadas a -80°C em cinco óleos fixos extraídos de sementes de goiaba (*P. guava*), mamão (*C. papaya*), manga (*M. indica*), maracujá (*P. edulis*) e melancia (*C. lanatus*), em crioprotetores usuais como o glicerol e o óleo mineral, além do meio Dixon (ágar ou caldo) sem crioprotetor adicional. Para a estocagem em ágar Dixon foi realizada apenas uma retirada do estoque em seis meses, pois devido à reduzida extensão da superfície do ágar, houve pouco desenvolvimento de massa fúngica, onde em alguns tratamentos foi totalmente retirada, deste modo padronizou-se apenas em seis meses, para este tipo de estoque. Nesta técnica foi verificada 100% de viabilidade, no entanto 3,12% das cepas tiveram redução da atividade de  $\beta$ -glicosidase e 7,29% deixaram de assimilar o Chremophor EL.

Para a estocagem por seis meses em caldo Dixon, a taxa de viabilidade foi de 100% em todos os tratamentos. Nove meses após a retirada do estoque verificou-se que duas cepas contaminaram no primeiro repique pós-estoque em caldo Dixon, porém nos outros tratamentos a taxa de recuperação também foi de 100%. Novamente, a atividade de  $\beta$ -glicosidase e assimilação de Chremophor EL foram às características fenotípicas modificadas pela estocagem, tendo 7,29% e 10,41% em 6 meses e 17,29% e 37,13% em 9 meses, respectivamente. Não houve diferença entre o uso de crioprotetores, seja natural ou convencional, e o controle sem adição de crioprotetores. No entanto, é verificado que a própria composição do meio Dixon, possui constituintes que promovem crioproteção, entre eles o *Tween* 40 e o extrato de malte (HUBÁLEK, 2003). O extrato de malte é constituído (m/m) por cerca de 52% de maltose, 20% de glicose, 15% de dextrina, 6% de outros carboidratos e 5% de proteína, sendo usado com bons resultados como meio protetor para preservar bactérias produtoras de ácido lático (HUBÁLEK, 2003). Soares Júnior et al. (2007) demonstraram o potencial crioprotetor da glicose (12%) em dermatófitos (*Trichophyton mentagrophytes* var. *mentagrophytes* e *M. canis*) submetidos a nove meses de estocagem a -20°C, verificando alta taxa de recuperação, sem desenvolvimento de pleomorfismo nas cepas dermatofíticas analisadas. Os detergentes não-iônicos, como o *Tween* 80, são utilizados em meios de

congelamento como dispersantes além de possuírem atividade crioprotetora, mas seu papel como crioprotetor ainda permanece obscuro (HUBÁLEK, 2003).

As sementes são conhecidamente fontes de lipídios, visto que, muitos óleos e gorduras são extraídos destas, para vários fins industriais (MOYA, HEINZEN, 2004). Os lipídios são compostos de origem biológica que dissolvem em solventes apolares, e englobam os acilgliceróis, os terpenóides, os esteróides e os fosfatídios (SOLOMONS, FRYHLE, 2001). A maioria dos lipídios extraídos nas sementes são os acilgliceróis (ésteres do glicerol), no entanto, são também encontrados fitoesteróides e carotenóides (MOYA, HEINZEN, 2004). Os lipídios atuam como agentes crioprotetores não penetrantes (CAROLSFELD et al., 2003) que são adsorvidos pela parede celular, principalmente de espécies do gênero *Malassezia*, que produzem uma camada lamelar acima de sua parede celular gerada a partir dos lipídios dispostos no meio de cultura (ASHBEEN, EVANS, 2002; DAVID, GABRIEL, KOPECKA, 2007); com isso, os lipídios extraídos das sementes atuariam no aumento da viscosidade extracelular e gerando um parcial efluxo de água intracelular, reduzindo assim, a formação de cristais de gelo dentro e nas proximidades da célula (HUBÁLEK, 2003). Porém, além dos acilgliceróis, os óleos vegetais possuem em sua composição, carotenóides e também compostos fenólicos, sendo estes, conhecidos agentes antioxidantes (TUBEROSO et al., 2007). O uso de compostos antioxidantes vem sendo investigado como otimizadores na criotecnologia, pois as células que são submetidas a processos de congelamento sofrem estresse oxidativo devido a queda de temperatura (CAROLSFELD et al., 2003), podendo ocasionar lesões celulares que irão refletir em sua viabilidade e características fenotípicas.

Poucos trabalhos têm demonstrado a viabilidade e a conservação das características fenotípicas de cepas de *Malassezia* ssp. sob condições de estocagem. Em 2004, Girão et al. realizaram um estudo com estes parâmetros para a espécie *M. pachydermatis*, e após estocagem de 6 e 9 meses, verificaram a atividade de urease e o crescimento em ágar Sabouraud simples sem suplementação lipídica. Observando-se então, que o ágar Dixon e ágar Dixon acrescido de glicerol obtiveram os melhores resultados, tanto em vista que, além de alta taxa de recuperação, conseguiram conservar as características fenotípicas em questão.

Em nosso estudo foram estocadas duas cepas de *M. pachydermatis* e em nove meses de armazenamento estas cepas foram recuperadas, sendo que em um tratamento houve perda da atividade de urease, corroborando assim com os dados

obtidos por Girão et al., (2004). Outro dado importante entre esses estudos é que, mesmo sem adição de agentes crioprotetores houve recuperação expressiva. Estas evidências divergem de outros achados que mostram que algumas espécies de *Malassezia* são sensíveis ao congelamento sem essas substâncias (CRESPO, ABARCA, CABANÉS, 2000)

Embora existam diferentes drogas antifúngicas disponíveis, as drogas de primeira escolha para o tratamento de infecções causadas por *Malassezia* spp. são os derivados azólicos, cetoconazol e itraconazol (CHEN, HILL, 2005; KOSE et al., 2005). Apesar disso, o tratamento destas infecções tem sido realizado de maneira empírica e na maioria das vezes não se obtém sucesso na terapêutica (EICHENBERG et al., 2003). Assim estudos que venham a contribuir sobre a sensibilidade de *Malassezia* spp. às drogas antifúngicas se fazem necessários.

Desde 1997, o CLSI padronizou as técnicas de micro e macrodiluição em caldo para testar a sensibilidade, *in vitro*, de leveduras. Desta forma, a técnica de microdiluição em caldo é empregada de forma eficiente para testar a sensibilidade de leveduras dos gêneros *Candida* e para a espécie *C. neoformans* (MING-FANG CHENG et al., 2004). Este documento, no entanto, não se aplica às espécies de *Malassezia*, e, apesar da possibilidade de ser utilizado para *M. pachydermatis*, dificuldades são encontradas, como, por exemplo, a padronização do inóculo. Desta forma, várias metodologias são utilizadas para testar a sensibilidade *in vitro* de cepas de *Malassezia* spp., como citadas por Eichenberg et al. (2003), Velegraki et al. (2004), Miranda et al. (2007) e Prado et al. (2008).

Como visto por muitos pesquisadores, o gênero *Malassezia* permanece com algumas lacunas em sua biologia que não foram preenchidas, entre elas está o estudo da sensibilidade *in vitro* destas leveduras. Deste modo, pode-se verificar que do trabalho precedido por Eichenberg et al. (2003) até o presente momento (PRADO et al., 2008), houve mudanças significativas nos protocolos dos testes de sensibilidade antifúngica, como tamanho e preparação do inóculo, composição dos meios de cultura, tempo de incubação e leitura dos resultados.

A metodologia adotada no presente trabalho foi preconizada por Velegraki et al., (2004) com modificações sugeridas por Prado et al. (2008). Ambos utilizaram a técnica de microdiluição em caldo RPMI 1640 suplementado com bile, Tween 20 e glicerol, provendo as necessidades lipídicas do gênero *Malassezia*. Contudo, Prado et al.

(2008) realizaram subcultivo em ágar batata a partir da microdiluição, a fim de verificar o crescimento de colônias e com isso definir os valores de CIM e CFM.

As 8 cepas de *M. pachydermatis* utilizadas neste estudo foram sensíveis aos derivados azólicos testados, sendo que todas as cepas apresentaram maior sensibilidade ao cetoconazol e itraconazol, com CIM variando de <0,03 a 0,125. Para o fluconazol, os valores de CIM variaram de 4 a 64 $\mu$ g/mL. Os resultados obtidos para esses derivados azólicos mostraram-se semelhantes aos encontrados por Eichenberg et al. (2003), Velegraki et al. (2004) e Prado et al. (2008). Perante o voriconazol, os CIMs variaram de <0,03 a 2 $\mu$ g/mL, sendo este intervalo coincidente com os resultados de Velegraki et al (2004) e Prado et al. (2008). Frente a anfotericina B os valores de CIM variaram de 2 a >16 $\mu$ g/mL, diferiram dos achados de Prado et al (2008) onde todas as 50 cepas apresentaram CIM de 4 $\mu$ g/mL, porém Velegraki et al. (2004) encontrou para a única cepa testada, o CIM de 0,12 $\mu$ g/mL. Quando testadas frente à caspofungina, as cepas de *M. pachydermatis* mostram-se resistentes até na concentração de 256 $\mu$ g/mL, sendo esta concentração 32 vezes maior que a concentração mais alta definida ao teste de microdiluição em caldo recomendada pelo CLSI para *Candida* spp. e *C. neoformans*.

A maioria das cepas lipodependentes de *Malassezia* spp. tiveram valores de MIC <0,03 $\mu$ g/mL para cetoconazol e itraconazol, correspondendo a 50% e 80% das cepas, respectivamente. Sendo os dados encontrados semelhantes aos descritos por Velegraki et al. (2004) e Miranda et al. (2007). Para o fluconazol, o CIM variou de 4 a 64 $\mu$ g/mL, este resultado resultou de outros autores, que encontraram CIM variando de 0,125 a 64 $\mu$ g/mL (VELEGRAKI et al., 2004; MIRANDA et al., 2007). Frente ao voriconazol, as CIMs variaram de <0,03 a >16 $\mu$ g/mL, sendo que doze cepas (40%) tiveram CIM de 0,125 $\mu$ g/mL, esta ampla variação também foi verificada por Velegraki et al. (2004) e por Miranda et al (2007). Por fim, frente ao derivado poliênico, anfotericina B obteve-se variação de 1 a >16 $\mu$ g/mL, sendo que 70% das cepas tiveram CIM acima de 16 $\mu$ g/mL, embora Velegraki et al. (2004) tenham encontrado cepas com CIM de 16 $\mu$ g/mL, estes autores obtiveram CIMs muito menores (0,03 $\mu$ g/mL) que os valores encontrados nesta dissertação

Além dos dados de CIM gerados, a técnica de subcultivo em ágar Dixon como complemento para a microdiluição em caldo, possibilitou a determinação da CFM, porém estes dados só podem ser comparados com Prado et al. (2008) que realizaram esta metodologia para cepas de *M. pachydermatis*. Tendo os resultados obtidos nesta dissertação corroborados com as CFMs obtidos por Prado et al. (2008).

Durante a determinação da CFM observou-se que algumas cepas lipodependentes de *Malassezia* spp. com baixos valores de CIM para cetoconazol e itraconazol não eram completamente inibidas nas maiores concentrações testadas, impossibilitando assim a determinação da CFM.

O tempo de incubação, das leveduras lipodependentes, em contato com as drogas antifúngicas testadas (96h), foi determinante para a sugestão dos valores de CIM e CFM. A priori foi testado, para estas cepas, o tempo de incubação de 72h, como determinado por Velegraki et al. (2004). Porém, verificou-se, após subcultivo em ágar Dixon, que não havia inibição ou parada de crescimento fúngico, mesmo nas concentrações mais altas para cada droga (CLSI). Miranda et al. (2007), entretanto, fixaram seu tempo de incubação em três dias (72h) para *M. furfur* e *M. sympodialis*, e para *M. globosa* e *M. obtusa* cinco dias (120h), e com isso determinou os valores de CIM, para derivados azólicos. O tempo de incubação para as cepas de *M. pachydermatis*, permaneceu em 24h, como preconizado por Velegraki et al. (2004) e Prado et al. (2008).

Os resultados dos testes de sensibilidade *in vitro* são, muitas vezes, difíceis de correlacionar com os resultados obtidos no tratamento clínico, porém a realização desses testes é importante para a vigilância e monitoramento de cepas resistentes (ROCHETTE, ENGELEN, VANDEN BOSSCHE, 2003).

Além da atividade antifúngica, *in vitro*, de algumas drogas disponíveis comercialmente, foi avaliada a sensibilidade antifúngica de cepas de *M. pachydermatis* frente a produtos naturais extraídos da semente do abacate (EHSPA e EMSPA). Cepas de *Candida* spp. e *C. neoformans*, que possuem protocolo padronizado pelo CLSI, foram utilizadas como padrão, para validação dos resultados. Para as cepas de *M. pachydermatis* os valores de CIM variaram EHSPA de 0,625 a 0,031mg/mL e EMSPA de 0,312 a 0,625mg/mL. Os extratos das sementes do abacate induziram inibição do crescimento das espécies de *Candida* sp. testadas gerando CIM que variaram para o EHSPA de 0,312 a 1,25mg/mL e EMSPA de 0,625 a 0,125mg/mL. As espécies de *Candida* são as principais envolvidas em infecções de seres humanos, estando também presente na clínica veterinária (BRITO et al., 2007). Este gênero é um dos principais responsáveis por infecções fúngicas em ambientes hospitalares (TAMURA et al., 2007), e ultimamente tem sido descrito, com freqüência, casos de resistência a antifúngicos dentro deste grupamento fúngico (BRITO et al., 2007). Frente as cepas de *C. neoformans*, os extratos mostraram um espectro menor, apresentando valores de

0,312mg/mL (n=5) a 0,625mg/mL (n=1) para o EHSPA e 0,08mg/mL (n=6) a 0,156mg/mL (n=1) para o EMSPA. *C. neoformans*, levedura essencialmente oportunista, responsável por casos de criptococcose em pacientes com AIDS/SIDA (MANFREDI et al., 2003).

Por fim, esta dissertação trouxe resultados significativos para compreensão do gênero *Malassezia*, em relação a sua identificação fenotípica, técnicas de estocagem em coleção, além de parâmetros de sensibilidade do gênero em relação a drogas antifúngicas convencionais e produtos naturais derivados da semente do abacate. Entretanto, considerando-se a complexidade deste gênero, conforme apresentado ao longo desta dissertação, estudos mais detalhados fazem-se necessários para melhor entendimento da biologia destas leveduras.

## 8 CONCLUSÕES

1. A identificação fenotípica convencional utilizada para o gênero *Malassezia*, não é capaz de discriminar de forma conclusiva suas espécies, o que torna imprescindível o uso de técnicas de biologia molecular;
2. a estocagem das cepas *Malassezia* spp. em óleos de sementes de frutas de manga, mamão, melancia, maracujá e goiaba, mostra-se promissora ;
3. as cepas de *Malassezia* spp. são sensíveis aos derivados azólicos, em especial, ao cetoconazol e itraconazol, mas são resistentes a caspofungina; e
5. os extratos hexânico e metanólico obtidos de sementes de abacate, mostraram-se eficazes contra as cepas de *M. pachydermatis*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABADIAS, M.; TEIXIDÓ, N.; USALL, J.; BENABARRE, A.; VIÑAS, I. Viability, efficacy, and storage stability of freeze-dried biocontrol agent *Candida* sake using different protective and rehydration media. **Journal of Food Protection.**; v. 64, p. 856-261, 2001.

ABBAS, A. K. ; LICHTMAN, A. H.. Células e Tecidos do Sistema Imunológico. In: \_\_\_\_\_. **Imunologia Celular e Molecular**, Rio de Janeiro: Editora Elsevier, p. 17-40, 2005.

ALBERTO, J. N. S.; HERMAN, T. V. C.; JUAN, A.; JOHANES, G.; FABIO, N.; FRANCESCO, D. S.; LUCA, R. Isolation and quantitative analysis of phenolic antioxidants, free sugars, and polyols from mango (*Mangifera indica* L.) stem bark aqueous decoction used in Cuba as nutritional supplement. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 762-766, 2002.

ARACTINGI, S.; CADRANEL, S.; REYGAGNE, P.; WALLACH, D. Pustulose neonatale induite par *Malassezia furfur*. **Ann Dermatol Venereol**, v. 118, p. 856-858, 1991.

ASHBEE, H. R.; EVANS, E. G. V. Immunology of Diseases Associated with *Malassezia* species. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, p. 21-57, 2002.

AYHAN, M.; SANCAK, B.; KARADUMAN, A.; ARIKAN, S.; SXAHIN, S. Colonization of neonate skin by *Malassezia* species: Relationship with neonatal cephalic pustulosis **Journal American Academy of Dermatology**, v. 57, p. 1012-1018, 2007.

BOGUNIEWICZ, M.; SCHMID-GRENDELMEIER, P.; LEUNG, D. Y. M. Atopic dermatitis The **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 118, p. 40-43, 2006.

BOWMAN, P. H.; DAVIS, L. S. Confluent and reticulated papillomatosis: Response to tazarotene. **Journal American Academy of Dermatology**, v. 48, p. 80-81, 2003.

BRAGA, R. **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará**. Fortaleza: Escola Superior de Agricultura de Mossoró, 1976, 540p.

BRILHANTE, R.S.N., CAVALCANTE, C.S.P., SOARES-JUNIOR, F.A., MONTEIRO, A.J., BRITO, E.H.S., CORDEIRO, R.A., SIDRIM, J.J.C., ROCHA, M.F.G. Evaluation of *Microsporum canis* in different methods of storage. **Medical Mycology**, v. 42, p. 499–504, 2004.

BRILHANTE, R. S. N. **Métodos de estocagem de cepas de *M. Canis* isolados de cães e gatos de Fortaleza-Ce.** 2003. 85f. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, 2003.

BRITO, E. H. S.; FONTENELLE, R. O. S.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; SOARES JÚNIOR, F. A.; MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Phenotypic characterization and in vitro antifungal sensitivity of *Candida* spp. and *Malassezia pachydermatis* strains from dogs. The **Veterinary Journal**, v. 174, p. 147-153, 2007.

CABAÑES, F. J.; THEELEN, B.; CASTELLÁ, G.; OEKHOUT, T. Two newlipid-dependent *Malassezia* species from domestic Animals. **Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Yeast Research**, doi:10.111/j.1567-1364.2007.00217.x, 2007.

CANTEROS, C. E.; RIVAS, M. C.; LEE, W.; PERROTTA, D.; BOSCO-BORGEAT, M. E.; DAVEL, G. Concordancia entre características fenotípicas y PCR-REA en la identificación de especies de *Malassezia*. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 24, p. 278-282, 2007.

CAROLSFELD, J.; GODINHO, H. P.; ZANIBONI FILHO, E.; HARVEY B. J. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. **Journal of Fish Biology**, v. 63, p. 472-489, 2003.

CHAU, C.F.; HUANG, Y.L. Characterization of passion fruit seed fibres—a potential fibre source. **Food Chemistry**, v. 85, 189–194, 2004.

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.

CHRYSSANTHOU, E.; BROBERGER, U. ; PETRINI, B. *Malassezia pachydermatis* fungemia in a neonatal intensive care unit. **Acta Paediatrica**, v. 90, p. 323-327, 2001.

COLOMBO, A. L; SALES, S. H. Testes de susceptibilidade a antifúngicos. In: SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos**, Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., p.102-111, 2004.

COSTA, C. P.; FERREIRA, M. C. Preservação de microrganismos. **Revista Brasileira de Microbiologia**, v. 22, p. 263-268, 1991.

COWAN, M. M. Plants products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, p. 564-582, 1999.

CRESPO, M. J.; ABARCA, M .L.; CABANES, F. J. Evaluation od different preservation and storage methods for *Malassezia* spp. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 3872-3875, 2000.

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

DAVID, M.; GABRIEL, M.; KOPECKA, M. Microtubular and actin cytoskeletons and ultrastructural characteristics of the potentially pathogenic basidiomycetous yeast *Malassezia pachydermatis*. **Cell Biology International**, v. 31, p. 16-23, p. 2007

DIOGO, H. C.; SARPIERI, A.; PIRES, M. C. Preservação de fungos em água destilada. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 80, p. 591-594, 2005.

EICHENBERG, M. L., APPELT, C. E., BERG, V., MUSCHNER, A. C., NOBRE, M. O., MATTA, D., ALVES, S., H., FERREIRO, L. Susceptibility of *Malassezia pachydermatis* to azole antifungal agents evaluated by a new broth microdilution method. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.31, p.75-80, 2003.

FERRARI, A., COLUSSI, F., AYUB, R. A. Caracterização de subprodutos da industrialização do maracujá - aproveitamento das sementes. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, p. 101-102, 2004

FRY, L.; BAKER, B. S. Triggering psoriasis: the role of infections and medications **Clinics in Dermatology**, v. 25, p. 606–615, 2007.

GAITANIS, G.; VELEGRAKI, A.; ALEXOPOULOS, E. C.; CHASAPI, V.; TSIGONIAS, A.; KATSAMBAS, A. Distribution of *Malassezia* species in pityriasis versicolor and seborrheic dermatitis in Greece. Typing of the major pityriasis versicolor isolate *M. globosa*. **British Journal of Dermatology**, v. 154, p. 854–859, 2006.

GHÉHO, E.; MIDGLEY, G.; GUILLOT, J. The genus *Malassezia* with description of four new species. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.69, p.337-55, 1996.

GIRÃO, M. D.; PRADO, M. R.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Viability of *Malassezia pachydermatis* strains maintained in various storage mediums. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, p. 229-233, 2004.

GARAU, M.; PEREIRO, M.; PALACIO, A. *In vitro* susceptibilities of *Malassezia* species to a newtriazole, albaconazole (UR-9825), and other antifungal compounds. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 47, p. 2342–2344, 2003.

GUÉHO, E.; MIDGLEY, G.; GUILLOT, J. The genus *Malassezia* with description of four new species. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 69, p. 337-355, 1996.

GUPTA, A. K.; KOHLI, Y.; SUMMERBELL, R. C. Molecular differentiation of seven *Malassezia* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 1869-1875, 2000.

GUPTA, A. K.; KOHLI, Y.; FAERGEMANN, J.; SUMMERBELL, R. C. *In vitro* susceptibility of the seven *Malassezia* species to ketoconazole, voriconazole, itraconazole and terbinafine. **British Journal of Dermatology**, v. 142, p. 758–765, 2000.

GUPTA, A. K.; KOHLI, Y.; FAERGEMANN, J.; SUMMERBELL, R. C. Epidemiology of *Malassezia* yeasts associated with pityriasis versicolor in Ontario, Canada. **Medical Mycology**, v. 39, p. 199–206, 2001.

GUPTA, A. K.; BATRA, R.; BLUHM, R.; BOEKHOUT, T.; DAWSON JR; T. L. Skin diseases associated with *Malassezia* species. **Journal American Academy of Dermatology**, v. 51, p. 785-98, 2004.

GUILLOT, J.; GUÉHO, E.; LESOURD, M.; MIDGLEY, G.; CHÉVRIER, G.; DUPONT, B. Identification of *Malassezia* species. A practical approach. **Journal de mycologie médicale**, v. 6, p.103-110, 1996.

HIRAI, A.; KANO, R.; MAKIMURA, K.; DUARTE, E.R.; HAMDAN, J.S.; LACHANCE, M.A.; YAMAGUCHI, H.; HASEGAWA, A. *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.

HOOG, G. S.; GUARRO, J.; GENÉ, J.; FIGUEIRAS, M. J. Basidiomycetous yeasts. In: \_\_\_\_\_ **Atlas of Clinical Fungi**. Utrecht: Central bureau voor Schimmelcultures, 130-176, 2000.

HUBÁLEK, Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. **Cryobiology**, v. 46, p. 205-229, 2003.

<http://www.chemblink.com>. Acesso em: 01 jul. 2008.

KABORI, C. N.; JORGE, N. Caracterização dos Óleos de Algumas Sementes de Frutas como Aproveitamento de Resíduos Industriais. **Ciência agrotécnica**, v. 29, p. 1008-1014, 2005

KABUKI, T., NAKAJIMA, H.; ARAI M.; UEDA S.; KUWABARA Y.; DOSAKO S., Characterization of novel antimicrobial compounds from mango (*Mangifera indica* L.) kernel seeds. **Food Chemistry**, v. 71, p. 61-66, 2000.

KANEKO, T.; MAKIMURA, K.; SUGITA, T.; YAMAGUCHI, H. Tween 40-based precipitate production observed on modified chomogenic agar and development of biological identification kit for *Malassezia* species. **Medical Mycology**, v. 44, p. 227-231, 2006.

KOSE, O.; ERBIL, H.; GUR, A.R. Oral itraconazole for the treatment of seborrhoeic dermatitis: an open, noncomparative trial. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**. v.19, p.172-175, 2005.

LACAZ, C. S., PORTO, E., MARTINS, J. E. C., HEINS-VACCARI, E. M., MELO, N. T. Leveduras de Interesse Médico. In:\_\_\_\_\_. **Tratado de Micologia Médica Lacaz**. São Paulo: Editora Sarvier, 2002, p. 156-160.

LEITE, J. J. G. **Sementes de frutas: aproveitamento de resíduos industriais na perspectiva de moléculas bioativas**. 2006. 122f. Monografia (Graduação) – Departamento de Química, Universidade Estadual do Ceará, 2006.

MAKIMURA, K.; TAMURA, Y.; KUDO, M.; UCHIDA, K.; SAITO, H.; YAMAGUCHI, H. Species identification and strain typing of *Malassezia* species stock

strains and clinical isolates based on the DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 regions. **Journal of Medical Microbiology**, v. 49, p. 29–35, 2000.

MANFREDI, R.; CALZA, L.; CHIODO, F. AIDS-associated Cryptococcus infection before and after the highly active antiretroviral therapy era: emerging management problems. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 22, p. 449-452, 2003.

MARIANO, P. L. **Diferentes processos de armazenamento de leveduras; estudos sobre a variabilidade Fenotípica e Genotípica.** 2006. 118f. Tese (Doutorado)-Departamento de Odontologia, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, 2006.

MAYSER, P.; HAZE P.; PAPAVASSILIS, C.; PICKEL, M.; GRUENDER, K.; GUÉHO, E. Differentiation of *Malassezia* species: selectivity of Chremophor EL, castor oil and ricinoleic acid for *M. furfur*. **British Journal of Dermatology**, v. 137, p. 208-213, 1997.

MEYER, V. Genetic engineering of filamentous fungi — Progress, obstacles and future trends **Biotechnology Advances**, v. 26, p. 177–185, 2008

MING-FANG, CHENG, KWOK-WOON YU, RAN-BIN TANG, YU-LIANG, KAI-SHENG HSIEH, MONTO HO, HSIU-JUNG LO. Distribution and antifungal susceptibility of *Candida* species causing candidemia from 1996 to 1999. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 48, p. 33-37, 2004.

MIRANDA, K. C.; ARAÚJO, C. R.; COSTA, C. R.; PASSOS, X. S.; FERNANDES, O. F. L.; SILVA, M. R. R. Antifungal activities of azole agents against the *Malassezia* species. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.29, p.281-284, 2007.

MIRHENDI, H.; MAKIMURA, K.; ZOMORODIAN, K.; YAMADA, T.; SUGITA, T.; YAMAGUCHI, H. A simple PCR-RFLP method for identification and differentiation of 11 *Malassezia* species. **Journal of Microbiology Methods**, v. 61, p. 281-284, 2005.

MORICHI, T; IRIE, R. Factors affecting repair of sublethal injury in frozen or freeze-dried bacteria. **Cryobiology**, v. 10, p. 393-399, 1973.

MOYA, P.; HEINZEN, H. Lípidos: Química y productos naturales los contienen. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia**. Santa Catarina: Editora da UFSC, 2004, 435-465.

NAGAI, T.; TOMIOKA, K.; TAKEUCHI, K.; IIDA, M.; KAWADA, M.; SATO, T. Evaluation of preservation techniques of microorganism resources in the MAFF Genebank. **Japan Agricultural Research Quarterly**, v. 39, p. 19-27, 2005.

NAKKHARAT, P.; HALTRICH, D. Purification and characterisation of an intracellular enzyme with  $\beta$ -glucosidase and  $\beta$ -galactosidase activity from the thermophilic fungus *Talaromyces thermophilus* CBS 236.58. **Journal of Biotechnology**, v. 123, p. 304-313, 2006.

NAKABAYASHI, A.; SEI, Y.; GUILLOT, J. Identification of *Malassezia* species isolated from patients with seborrheic dermatitis, atopic dermatitis, pityriasis versicolor and normal subjects. **Medical Mycology**, v. 38, p.337-341, 2000.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS – Reference method for broth antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standards. Wayne, **NCCLS**, 2002. (NCCLS document M27-A2).

NELL, A.; JAMES, S.A.; BOND, C.J.; HUNT, B; HERRTAGE, M.E. Identification and distribution of the novel *Malassezia* species yeast on a normal equine skin. **Veterinary Record**, v. 150, p. 395-398, 2002.

NEVES, R. P.; MAGALHÃES, O. M. C.; SILVA, M. L.; MOTTA, C. M. S.; QUEIROZ, L. A. Identification and pathogenicity of *Malassezia* species isolated from human healthy skin and with macules. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 114-117, 2005.

PAULINO, L. C.; TSENG, C.; BLASER, M. J. Analysis of *Malassezia* microbiota in healthy superficial human skin and in psoriatic lesions bymultiplex real-time PCR. **Federation of European Microbiology Societies (FEMS) Yeast Research**, v. 8, p. 460-471, 2008.

PRADO, M. R.; BRITO, E. H. S.; GIRÃO, M. D.; MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J. J. C., ROCHA, M. F. G. Higher incidence of *Malassezia pachydermatis* in the eyes of dogs with corneal ulcer than in healthy dogs. **Veterinary Microbiology**, v.100, p.115-120, 2004.

PRADO, M. R.; BRITO, É. H. S.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; LEITE, J. J. G. L.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Subculture on potato dextrose agar as a complement to the broth microdilution assay for *Malassezia pachydermatis*. **Journal of Microbiological Methods**, DOI:10.1016/j.mimet.2008.05.022, 2008.

ODDS, F. C. Long-term laboratory preservation of pathogenic yeasts in water. **Medical Micology**, v. 29, p. 413-415, 1991.

ÖZYÜREK, M.; BEKTASOLU, B.; GÜCLÜ, K.; APAK, R. Hydroxyl radical scavenging assay of phenolics and flavonoids with a modified cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) method using catalase for hydrogen peroxide degradation. **Analytica Chimica Acta**, v. 616, p.196–206, 2008.

RAMOS, M. R.; JERZ, G.; Villanueva, S.; LÓPEZ-DELLAMARY, F.; WAIBEL, R.; WINTERHALTER, P. Two glucosylated abscisic acid derivates from avocado seeds (*Persea americana* Mill. Lauraceae cv. Hass). **Phytochemistry**, v. 65, p. 955–962, 2004.

RAPELANORO, R.; MORTUREUX, P.; COUPRIE, B.; MALEVILLE, J.; TAÏEB, A. Neonatal *Malassezia furfur* pustulosis. **Archives of Dermatology**, v.132, p. 190-193, 1996.

RENDIC, E.; DÍAZ, C.; FICH, F. Caracterización de especies del género *Malassezia* en pacientes con dermatitis seborreica y en controles **Revista Médica del Chile**, v. 131, p. 1295-1300, 2003.

RIAUX, A. ; BOURRAT, E. ; PINQUIER, L. ; MOREL, P. ; DUBERTRET, L. ; PETIT, A. Papillomatose confluente et réticulée de Gougerot et Carteaud : étude rétrospective de neuf cas. **Ann Dermatol Venereol**, v. 134, p. 327-331, 2007.

ROCHA, M. F. G.; SIDRIM, J. J. C. Drogas antifúngicas utilizadas na terapêutica contemporânea. In: \_\_\_\_\_. **Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos**, Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., p. 50-62, 2004.

ROCHETTE, F.; ENGELEN, M.; VANDER BOSSCHE, H. Antifungal agents of use in animal health – practical applications. **Jounal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 26, p. 31-53, 2003.

ROMEIRO, R. S. Determinação de espécie - provas bioquímicas, tintoriais e biológicas. <http://www.ufv.br/dfp/bac/uni14.pdf>. Acesso em: 05 ago. 2007

ROSS, S.; RICHARDSON, M. D.; GRAYBILL, J. R. Association between *Malassezia furfur* colonization and seborrhoeic dermatitis in AIDS patients. **Mycoses**, v. 37, p. 367-370, 1994.

SANTOS, I. M.; ABRUNHOSA, L.; VENÂNCIO, A.; LIMA, N. The effect of culture preservation techniques on patulin and citrinin production by *Penicillium expansum* Link. **Letters in Applied Microbiology**, v. 35, 272-275, 2002.

SCARTEZZINI, P.; SPERONI, E. Review on some plants of Índia Traditional Medicine with antioxidant active. **Journal of Ethnopharmacology**, n.71, p. 23-43, 2000.

SCHLOTTFELDT, F. S., TRAMONTIN, S. W., NAPPI, B. P., SANTOS, J. I. Reclassificação taxonômica de espécies do gênero *Malassezia*: revisão da literatura sobre as implicações clinicolaboratoriais. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 38, p.199-204, 2002.

SILVA, V.; MORENO, G. A.; ZAROR, L.; OLIVEIRA, E.; FISCHMAN, O. Isolation of *Malassezia furfur* from patients with onychomycosis. **Medical Micology**, v. 35, p. 73-74, 1997.

SIMMONS, R. B.; GUÉHO, E. A new species of *Malassezia*. **Mycology Research**, v. 94, p. 1146-149, 1990.

SOARES JÚNIOR, F.A.; BRILHANTE, R.S.N., CORDEIRO, R.A.; BRITO, E.H.S.; SIDRIM, J.J.C.; M.F.G. ROCHA. Glucose improves the in vitro viability of *Microsporum canis* and *Trichophyton mentagrophytes* var. *mentagrophytes*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 69, p. 218–221, 2007.

SOLOMONS, G.; FRYHLE C. Lipídios. In: \_\_\_\_\_. **Química Orgânica**, Rio de Janeiro: Editora LTC, p. 366-396, 2001.

SOONG, Y. Y.; BARLOW, P. J. Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. **Food Chemistry**, v.88 p. 411-417, 2004.

SOUZA, C.L.F.; MARANGON, J. F.; VALLE, A. F. ; OLIVEIRA, M. A. P. A.; CARVALHO, M. T. F.; PEREIRA, C. A.; GOMPERTZ, O. F. Pesquisa da *Malassezia furfur* em couro cabeludo de lactentes. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 71, p. 289-292, 1996.

SUGITA, T.; TAKASHIMA, M.; SHINODA, T.; SUTO, H.; UNNO, T.; TSUBOI, R.; OGAWA, H.; NISHIKAWA, A. New yeast species, *Malassezia dermatitis*, isolated from patients with atopic dermatitis. **Journal Clinical of Microbiology**, v. 40, p. 1363-1367, 2002.

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

SUGITA, T.; TAJIMA, M.; TAKASHIMA, M.; AMAYA, M. T.; SAITO, M.; TSUBOI, R.; NISHIKAWA, A. A new yeast, *Malassezia yamatoensis*, isolated from a patient with seborrheic dermatitis, and its distribution in patients and healthy subjects. **Microbiology and Immunology**, v. 48, p. 579-583, 2004.

SUGITA, T.; TAJIMA, M.; TSUBUKU, H.; TSUBOI, R.; NISHIKAWA, A. Quantitative Analysis of cutaneous *Malassezia* in Atopic dermatitis patients using real-time PCR **Microbiology and Immunology**, v. 50, p. 549-552, 2006.

TAKAHATA, Y.; SUGITA, T.; HIRUMA, M.; MUTO, M. Clinical And Laboratory Investigations Quantitative analysis of *Malassezia* in the scale of patients with psoriasis using a real-time polymerase chain reaction assay. **British Journal of Dermatology**, v. 157, p. 670-673, 2007.

TAMURA, N. K.; NEGRI, M.F. N.; BONASSOLI, L. A.; SVIDZINSKI, T. I. E. Fatores de virulência de *Candida* spp isoladas de cateteres venosos e mãos de servidores hospitalares. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, p. 91-93, 2007.

TONA, L.; KAMBU, K.; NGIMBI, N.; CIMANGA, K.; VLIETINCK, A. J. Antiamoebic and phytochemical screening of some Congolese medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 61, p. 57-65, 1998

TROPE, B. M.; ASSIS, T. L.; MARQUES, A. S. Pitiríase versicolor: atualização bibliográfica. **Anais Brasileiros Dermatologia**, v. 67, p. 159-66, 1992.

TUBEROSO, C. I. G.; KOWALCZYK, A.; SARRITZU, E.; CABRAS, P. Determination of antioxidant compounds and antioxidant activity in commercial oilseeds for food use. **Food Chemistry**, v. 103, 1494-1501, 2007.

VARGAS, V. E. S.; GOMPERTZ, O. F.; SIDRIM, J. J. C.; JARABRAN, M. C. D. Pitiríase versicolor e doenças por *Malassezia* spp. In: SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 112-123, 2004.

VELEGRAKI, A.; ALEXOPOULOS, E. C.; KRITIKOU, S.; GAITANIS, G. Use of fatty acid RPMI 1640 media for testing susceptibilities of eight *Malassezia* species to

the new triazole posaconazole and to six established antifungal agents by a modified NCCLS M27-A2 microdilution method and Etest. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 3589-3593, 2004.

ZAITZ, C.; RANGEL, L.; RUIZ, L. R. B.; SOUZA, V. M. Dermatoses associadas às leveduras do gênero *Malassezia* **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 75, p. 129-142, 2000.

ZAWAR,V.; CHUH, A. Case report on *Malassezia* infection of palms and fingernails – speculations on cause for therapeutic failure in pityriasis versicolor. **Journal European Academy of Dermatology and Venereology** DOI: 10.1111/j.1468-3083.2008.02750.x, 2008.

ZOMORODAIN, K.; MIRHENDI, H.; TARAZOOIE, B.; KORDBACHEH, P.; ZERAATI, H.; YERI, F. N. Molecular Analysis of *Malassezia* Species Isolated from Hospitalized Neonates. **Pediatric Dermatology**, v. 25, p. 312–316, 2008.

---

**ANEXO I**  
**MEIOS DE CULTURA, CORANTES E SOLUÇÕES**

---

## MEIOS DE CULTURA

### Ágar Batata

Infusão de batatas	500 mL
Dextrose	10 g
Ágar bacteriológico	15 g
Água destilada	1000 mL

### Ágar Sabouraud Dextrose 2% suplementado

Peptona	10 g
Dextrose	20 g
Ágar bacteriológico	20 g
Água destilada	1000 mL

### Meio Ágar Uréia de Christensen's

Peptona	1 g
Glicose	1 g
Cloreto de sódio	5 g
Fosfato de potássio monobásico	2 g
Fenol vermelho	12 mg
Ágar bacteriológico	20 g
Água destilada	1000 mL

### Meio Ágar Dixon

Extrato de Malte	18 g
Triptona	3g
Bile bovina	3 g
<i>Tween</i> 40	5mL
Cloranfenicol	0,025 g
Clicoeximida	0,025 g
Água destilada	1000 mL

### Ágar Sabouraud Dextrose 2% suplementado com 10% Chremophor EL

Peptona	10 g
Dextrose	20 g
Ágar bacteriológico	20 g
Água destilada	1000 mL
Chremophor EL	100 mL

### Ágar Esculina

Esculina	1g
Citrato férrico	0,5 g
Ágar bacteriológico	16 g
BHI caldo	25

**Ágar Sabouraud Dextrose 2% suplementado com 10% Tween 20**

Peptona	10 g
Dextrose	20 g
Ágar bacteriológico	20 g
<i>Tween</i> 20	100 mL
Água destilada	1000 mL

**Ágar Sabouraud Dextrose 2% suplementado com 0,5% Tween 40**

Peptona	10 g
Dextrose	20 g
Ágar bacteriológico	20 g
<i>Tween</i> 40	5 mL
Água destilada	1000 mL

**Ágar Sabouraud Dextrose 2% suplementado com 1% Tween 80**

Peptona	10 g
Dextrose	20 g
Ágar bacteriológico	20 g
<i>Tween</i> 80	10 mL
Água destilada	1000 mL

**Ágar Sabouraud Dextrose 2% suplementado 1% Tween 60**

Peptona	10 g
Dextrose	20 g
Ágar bacteriológico	20 g
<i>Tween</i> 20	10 mL
Água destilada	1000 mL

## CORANTES E SOLUÇÕES

### Corante Lactofenol Azul-Algodão

Ácido lático	20 g
Fenol	20 g
Glicerina	20 g
Azul algodão	0.05 g
Água destilada	20 mL

### Solução de Cristal-violeta

Cristal-violeta	1 g
Água destilada	100 mL

### Lugol

Iodo	1 g
Iodeto de potássio	2 g
Água destilada	300 mL

### Solução de Fucsina de Gram

Fucsina básica	1,1 g
Álcool absoluto	10 g
Água destilada	100 mL

**Solução Descorante de Éter-acetona**

Éter etílico	100 mL
Acetona	100 mL

**Solução de Hidróxido de Potássio**

Hidróxido de potássio	30 g
Água destilada	100 mL

**Solução Salina**

Cloreto de sódio	0.9 g
Água destilada	100 mL

---

**ANEXO II**

**TÉCNICAS E TESTES COMPLEMENTARES**

---

## **Técnica da Preparação por Desagregação**

### **Procedimento**

- 1) Extrair com um garfo de platina uma pequena porção da colônia, em seguida, colocar o fragmento da colônia em uma gota de lactofenol azul-algodão (anexo VI) sobre uma lâmina.
- 2) Desagregar o fragmento com a alça e cobrir com uma lamínula.
- 2) Em seguida levar o preparado ao microscópio óptico.

### **Coloração de Gram**

### **Procedimento**

- 1) Identificar a lâmina e preparar o esfregaço
- 2) Fixar o esfregaço com álcool ou sob a chama
- 3) Cobrir a lâmina com cristal-violeta e adicionar 2 gotas de bicarbonato de sódio.  
Esperar por 2 minutos
- 4) Desprezar o corante e lavar com água corrente
- 5) Cobrir a lâmina com lugol por 1 minuto
- 6) Lavar com água corrente
- 7) Descorar o esfregaço com éter-acetona, até não desprender corante da lâmina.  
Alternar lavagens com água
- 8) Cobrir a lâmina com fucsina por 1 minuto
- 9) Secar a lâmina com papel-filtro e observar ao microscópio óptico

---

## PUBLICAÇÕES

---

# ARTIGO 1

---

## **Chemical composition, toxicity, larvicidal and antifungal activity of *Persea americana* (avocado) seed extracts**

### **Composição química, toxicidade, atividade larvicida e antifúngica de extratos de semente de *Persea americana* (abacate)**

João Jaime G. Leite<sup>1,2\*</sup>, Érika H. S. Brito<sup>1,4</sup>, Rossana A. Cordeiro<sup>1,4</sup>, Raimunda S. N. Brilhante<sup>1,3</sup>, José J. C. Sidrim<sup>1,2</sup>, Luciana M. Bertini<sup>5</sup>, Selene M. Moraes<sup>4</sup>, Marcos F. G. Rocha<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> Specialized Medical Mycology Center, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil.

<sup>2</sup> Postgraduate Program in Medical Microbiology, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil.

<sup>3</sup> Department of Biological Science, State University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil.

<sup>4</sup> Postgraduate Program in Veterinary Science, State University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil.

<sup>5</sup> Postgraduate Program in Chemistry, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil.

\*Corresponding author. Address: Rua Aracati 149, Benfica, CEP: 60020-240, Fortaleza, CE, Brazil. Tel: + 55 85 3252 2958.

E-mail address: [jjgiffoni@yahoo.com.br](mailto:jjgiffoni@yahoo.com.br)

**Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**

(Artigo submetido)

## RESUMO

O presente estudo teve como objetivo testar os extratos hexânico e metanólico das sementes do abacate, a fim de determinar sua toxicidade em *Artemia salina*, avaliar a atividade larvicida frente ao *Aedes aegypti*, bem como verificar o potencial antifúngico *in vitro* contra cepas de *Candida* spp, *Cryptococcus neoformans* e *Malassezia pachydermatis*, através da técnica de microdiluição. Os extratos hexânico (HEAS) e metanólico (MEAS) das sementes de abacate apresentaram no teste de toxicidade frente à *A. salina*, valores de  $LC_{50}$  2,37 e 24,13 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente, contra as larvas do *A. aegypti* os resultados obtidos foram  $LC_{50}$  16,7 mg L<sup>-1</sup> para HEAS e 8,87 mg L<sup>-1</sup> para MEAS. Os extratos testados também foram ativos contra todas as cepas de leveduras, testadas *in vitro*, apresentando diferentes resultados. Resumidamente, ambos os extratos mostraram-se bioativos com base nos dados de toxicidade em *A. salina*, refletindo no seu potencial larvicida e antifúngico.

**Palavras Chave:** Sementes do abacate, *A. salina*, *A. aegypti* e leveduras

**ABSTRACT**

The present study had the purpose of testing the hexanic and methanolic extracts of avocado seeds, in order to settle their toxicity in *Artemia salina* and to assay its lethal activity on *Aedes aegypti* through the LC<sub>50</sub> determination, as weel as to *in vitro* verify the antifungal potential against strains of *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans* and *Malassezia pachydermatis* through the microdilution method. In the toxicity assay using *A. salina*, the hexanic (HEAS) and methanolic (MEAS) extracts showed values of LC<sub>50</sub> 2.37 and 24.13 mg L<sup>-1</sup> respectively, against *A. aegypti* larvae the obtaining results were LC<sub>50</sub> 16.7 mg L<sup>-1</sup> for HEAS and 8.87 mg L<sup>-1</sup> for MEAS. The tested extracts also were actives against all strains of yeasts, tested *in vitro*, showing differents MICs. In summary, both extracts showed themselves bioactives based on the toxicity data in *A. salina*, reflecting on their larvicidal and antifungal potential.

Keywords: Avocado seeds, *A. salina*, *A. aegypti* and *Yeasts*.

## INTRODUCTION

*Persea americana* Mill. (Lauraceae) is a plant from Central America (Mexico, Guatemala, Antilles), however it showed easy adaptation in another tropical regions. It has fruits commonly known as avocado with olive-green peel and thick pale-yellow colour pulp, rich in vegetable oils and appreciated because of its sensory attributes. There is a global tendency of using processed fruits and after that industrialization the sub-products, like the avocado seeds are normally disposed. These sub-products got from theat industrialization can cause ecological problems like increase the number of insects and rodents. Besides the economics losts because of the high costs of transportation of these sub-products to depository<sup>5</sup>. Thus studies are necessary to inverstigate benefits from those sub-products as source of food supplements or medicinal products<sup>17</sup>.

In the perspective of the usage of avocado seeds as phytotherapeutic source, they have been traditionaly used in mycoses and parasitic infections, also local anesthetic effects of avocado seeds preparation are known to decrease muscle pain<sup>17</sup>.

Previous phytochemical studies on avocado seeds identified various classes of natural products such as phytosterols, triterpenes, fatty acids, furanoic acids, dimers of flavonols, proanthocyanidins and abscisic acid, some of them related with antifungal activity<sup>1</sup> and with larvicidal effect<sup>12</sup>.

In present study the methanolic and hexanic extracts of avocado seeds were tested concerning to their toxicity using microcrustaceous *Artemia salina* and third stage *Aedes aegypti* larvae. Additionally, it was evaluated the antifungal potential by microdilution method against *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans* e *Malassezia pachydermatis*.

## MATERIAL AND METHODS

### Botanic material

The seeds used in this study were obtained from a food industry located in Fortaleza, Ceará, Brazil during August and September of 2005.

### Sample Preparation

Previously, the seeds were separated from pulp, dried in oven at 50°C and grounded to powder in a laboratory mill, and wrapped in cartridge of filter paper. The extracts were obtained by heat extraction in reflow method, soxlet, used separately as solvent hexane and methanol for six hours and named HEAS and MEAS, respectively. The extracts were concentrated in rotative evaporator, under reduced pressure (60 rpm a 80°C).

### Toxicity using *Artemia salina* (TAS)

The assay was developed as described Krishnaraju et al<sup>8</sup> with modifications. Thus 50mg of hexanic and methanolic extracts from avocado seeds were weighed and solubilized in 500µL DMSO. Sea water was added until 50mL of final volume. Some concentrations were obtained through dilutions resulting in ending concentrations of 1, 10, 100, 1000 mg L<sup>-1</sup>. The assay was developed in triplicates, and a control assay with only DMSO and sea water. *A. salina* larvae were added, after 24h of contact, the survivors were counted and their LC<sub>50</sub> was determinated.

### Larvicidal activity against *Aedes aegypti*

To detect larvicidal activity, *A. aegypti* larvae of third stage were used. Different mass of extract were solubilized with 300µL of DMSO and 19.7mL of water were added to

obtained solution resulting in concentration of 500, 250, 100 e 50 mg L<sup>-1</sup> being tested against 50 *A. aegypti* larvae. The assay was developed in triplicate at 28±1°C with 80±5% of air relative humidity and photofase of 12h. All the experiments were followed by control series with the same number of larvae in DMSO and water. The mortality was observed 24h after exposition. According to mortality verified on initial concentrations, intermediary concentrations were tested in order to determine the LC<sub>50</sub> of the samples<sup>3</sup>.

### **Antifungal Activity**

The fungal strains were obtained from Specialized Medical Mycology Center, Federal University of Ceará, Brazil. The evaluation of the sensibility of antifungal agents was developed using the microdilution in broth RPMI 1640 method according to methodology suggested by CLSI (Clinical Laboratory Standard Institute) to *Candida* spp. and *C. neoformans* strains. The inoculum of the yeast was adjusted to obtain a 2.5 - 5 x 10<sup>3</sup> cels/mL. In each plate with 96-wells, negative and positive controls were added and also tested each yeast with DMSO and its dilutions. The microplates were incubated at 32°C for 48h. The test reading was done by visual comparison. The CFM was considered the lowest concentration able to inhibit 100% of the growth of each yeast, having as reference its respective positive control. To *M. pachydermatis* yeast used the microdilution in RPMI 1640 method, supplemented with per liter, with 20 g of glucose, 4 g of ox bile, 1 ml of glycerol, 0.5 g of glycerol monostearate, and 0.4 ml of Tween 20<sup>19</sup>. The inoculum of the yeast was adjusted to obtain a 2.5 - 5 x 10<sup>3</sup> cels/mL. In each plate with 96-wells, negative and positive controls were added and also tested each yeast with DMSO and its dilutions. The microplates were incubated at 32°C for 48h. After this period 1µL of each well was distributed on Petri plates with potato-dextrose

agar. These plates were incubated at 32°C. After 96h of incubation, the CFM was considered the lowest concentration able to inhibit 100% of the growth of each yeast, having as reference its respective positive control.

### **Phytochemical screening and isolation of compounds**

The phytochemical screening was developed using the methodology described by Matos<sup>11</sup>, to determine the presence of flavonoids, anthocianins, saponins, tannins, sterols, triterpenoids, fixed acids and alkaloids. The analysis of the methylic esters was accomplished by transmethylation technique followed by GC-MS spectroscopy. The hexanic extract was subjected to a silica gel chromatographic column using as eluents hexane, chloroform, ethyl acetate and methanol in mixtures of increasing polarity. The ethyl acetate fraction was subjected to a subsequent silica gel column chromatography following the same above procedure. The obtained fractions were chemically monitored by thin layer chromatography (TLC), reaching to the isolation of two compounds. The chemical structures of the compounds were determined by spectroscopic methods (<sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR) and comparison with authentic samples.

## **RESULTS**

The hexanic (HEAS) and methanolic (MEAS) extract of the avocado seeds showed values of LC<sub>50</sub> 2.37 and 24.13 mg L<sup>-1</sup>, respectively, on the toxicity assay using *A. salina*. In the larvicidal assay the extracts showed activity against *A. aegypti* obtaining with LC<sub>50</sub> 8.87 mg L<sup>-1</sup> for HEAS and 16.7 mg L<sup>-1</sup> for MEAS (Table 1). The hexanic and methanolic extracts were active against all the yeasts tested by the microdilution method and reported on the Table 2.

The preliminary phytochemical studies revealed the presence of flavonoids, anthocianins, condensed tannins, alkaloids and triterpenes in methanol extracts. Sterols and triterpenes were detected in hexane extract. The HEAS lipid analysis showed the presence of palmitic acid (21.31%), palmitoleic acid (1.61%), stearic acid (2.24%), oleic acid (24.06%) and linoleic acids (27.63%). The compounds isolated from HEAS were identified by <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR data as a 1,2,4-trihydroxynonadecane and  $\beta$ -sitosterol (Figure 1).

## DISCUSSION

In the present research the various extracts were submitted to TAS assay, being considered bioactive, since they showed a medium lethal concentration (LC<sub>50</sub>) lower than 1000 mg L<sup>-1</sup><sup>4</sup>. The hexanic extract of avocado seeds showed the highest toxicity (LC<sub>50</sub> 2.37 mg L<sup>-1</sup>) to *A. salina*.

The determination of the toxicity in *A. salina* has been used efficiently to analyse the biological potential of the extracts of plants. Several natural products, specially the ones with antifungal, antiviral, antibacterial and trypanosomicidal, were tested through this assay, showing significant relationship. Parra et al<sup>15</sup> showed that its is a fast, simple, practical and low cost assay, avoiding the unnecessary the use of animal in laboratories, because the values of LC<sub>50</sub> and LD<sub>50</sub> show a good relationship between *in vivo* tests with r=0.85 rate. Besides, this method request small quantities (20-2mg) of the samples that can be tested in large scale.

Both extracts showed larvicidal effects, however, the highest larval mortality was found in hexanic extract of *P. americana*. Rahuman et al<sup>16</sup> demonstrated that the petroleum ether extract of *A. indicum* showed high larvicidal activity against *A. aegypti*, *A. stephensi* and *Culex quinquefasciatus* due the presence of  $\beta$ -sitosterol in the extract

composition. In previous phytochemical study, Oberlies et al<sup>13</sup> isolated the compounds: 1,2,4-trihydroxynonadecane, 1,2,4-trihydroxyheptadec-16-ene, and 1,2,4-trihydroxyheptadec-16-yne from ripe avocado fruits that showed the following values of toxicity using *A. salina* LC<sub>50</sub> of: 2.8; 1.3 and 6.4 x 10<sup>-1</sup> mg L<sup>-1</sup>, respectively, and the values of LC<sub>50</sub>: 1.8; 2.1 x 10<sup>-1</sup> e 7.5 x 10<sup>-2</sup> mg L<sup>-1</sup>, respectively, against *A. aegypti* larvae.  $\beta$ -sitosterol and 1,2,4-trihydroxynonadecane were detected in the hexanic extract of seeds of *P. americana* and could be responsible for its larvicidal activity.

This study also verified the antifungal potential of the extracts of avocado seeds against *Candida* spp., *Cryptococcus* spp. and *Malassezia* spp, yeasts of great importance for human and veterinary medicine<sup>2</sup>. *Candida* is one of the main responsible agents for fungal infections in hospitals, and more recently have been described cases of antifungal resistance inside this fungal group. The extract of avocado seeds induced inhibition of growth of *Candida* sp. species tested, producing MIC that ranged to HEAS from 0.312 to 1.25 mg/mL and to MEAS from 0.125 to 0.625. The values of HEAS MIC ranged from 0.031 to 0.625 mg/mL and of MEAS from 0.321 to 0.625 mg/mL for *M. pachydermatis* strains. *M. pachydermatis* shows high veterinary importance by its intense pathological activity on carnivorous animals, but also has been related to fungemia cases in neonates<sup>2</sup>.

The extracts demonstrated lower concentration ranges against *C. neoformans* strains, showing values from 0.312 mg/mL (n=5) to 0.625 mg/mL (n=1) for the HEAS, and from 0.08 mg/mL (n=6) to 0.156 (n=1) for the MEAS. *C. neoformans* is a yeast essentially opportunist responsible for cryptococcosis cases in HIV positive patients<sup>10</sup>. The values of MIC obtained against *C. neoformans* strains were lower than against *Candida* sp. and *M. pachydermatis* strains.

Besides its anti-atherogenic and anticancer activity,  $\beta$ -sitosterol has been reported to have anti-inflammatory, anti-microbial, anti-bacterial and anti-fungal effects<sup>14</sup>. Lall et al.<sup>9</sup> isolated six compounds of *Euclea natalensis* and assayed them against *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Cladosporium cladosporioides*, and  $\beta$ -sitosterol showed the best inhibitory activity against all fungi tested except against *A. flavus*. Some fatty acids also exhibit antimicrobial activity and this action is related to the presence and position of a double or a triple bond, as well as the length of fatty acids chain ( $>C_{14}$ ). Optimum antimicrobial activity was found for fatty acids and their corresponding monoglycerides when the chain length was  $C_{12}$ <sup>7</sup>. The methanolic extract showed the presence of phenolic compounds, such as flavonoids, anthocianins, that have antimicrobial activity related, as well as alkaloids that have several actions, such as antiviral, antimalarical and antiamoebic activity<sup>18</sup>.

In our previous studies with natural products against fungi<sup>6</sup>, values of MICs  $\leq 1.00$  mg/mL, as the obtained in this study, represent an important data in the search of phytotherapics drugs with antifungal potential. Furthermore the extracts obtained from avocado seeds (*Persea americana L.*) and their constituents represent possible candidates to be utilized as alternative ways in dengue control, and also act as antifungal agents against pathogenic yeasts.

**REFERENCES**

1. Alcerito T, Barbo FE, Negri G, Santos DYAC, Meda CI., Young MCM, Chávez D, Blatt CTT. Foliar epicuticular wax of *Arrabidaea brachypoda*: flavonoids and antifungal activity. *Biochemical Systematics and Ecollogy* 30: 677-683, 2002.
2. Brito EHS, Fontenelle ROS, Brilhante RSN, Cordeiro RA, Soares Júnior FA., Monteiro, AJ, Sidrim JJC, Rocha MFG. Phenotypic characterization and in vitro antifungal sensitivity of *Candida* spp. and *Malassezia pachydermatis* strains from dogs. *The Veterinary Journal* 174: 147-153, 2007.
3. Céspedes CL, Salazar JR, Martinez M, Aranda E. Insect growth regulatory effects of some extracts and sterols from *Myrtillocactus geometrizans* (Cactaceae) against *Spodoptera frugiperda* and *Tenebrio molitor*. *Phytochemistry* 66: 2481, 2005.
4. Citó, A.M.G.L., Souza, A.A, Lopes, J. A. D. Chaves, M. H., costa, F. B., Souza, S. A., Amaral, M.P.M. Resina de *Protium heptaphyllum* March (Burceraceae). Composição química do óleo essencial e avaliação citotóxica frente a *Artemia salina* Leach. *Anais da Associação Brasileira de Química*, 52: 74-76, 2003.
5. Ferrari RA, Colussi F, Ayub RA. Caracterização de subprodutos da industrialização do maracujá- aproveitamento das sementes. *Revista Brasileira de Fruticultura* 26:101-102, 2004.
6. Fontenelle ROS, Moraes SM, Brito EHS, Kerntopf MR, Brilhante RSN, Cordeiro RA, Tomé AR, Queiroz MR, Nascimento NRF, Sidrim JJC, Rocha MFG. Chemical

composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 59: 934-940, 2007.

7. Kabara JJ, Vrable R and Lie Ken Jie MSF. Antimicrobial lipids: Natural and synthetic fatty acids and monoglycerides. *Lipids* 12: 753-759, 1977.

8. Krishnaraju AV, Rao TVN, Sundararaju D, Vanisree M, Tsay HS, Subbaraju GV. Biological screening of medicinal plants collected from eastern ghats of india using *Artemia salina* (Brine Shrimp Test). *The International Journal of Applied Science, Engineering and Technology* 4: 115-125, 2006.

9. Lall N, Weiganand O, Hussein AA, Meyer JJM. Antifungal activity of naphthoquinones and triterpenes isolated from the root bark of *Euclea natalensis*. *South African Journal of Botany* 72:579–583, 2006

10. Manfredi R, Calza L, Chiodo F. AIDS-associated Cryptococcus infection before and after the highly active antiretroviral therapy era: emerging management problems. *International Journal of Antimicrobial Agents* 22:449-452, 2003.

11. Matos FJA. *Introdução a Fitoquímica Experimental*. Fortaleza, Brasil, 2000.

12. Morais SM, Facundo VA, Bertini LM, Cavalcanti ESB, Anjos Júnior JF, Ferreira SA, Brito ES, Neto MAS. Chemical composition and larvicidal activity of essential oils from *Piper* species. *Biochemical Systematics and Ecology* 35: 670-675, 2007.

13. Oberlies NH, Rogers LL, Martin JM, McLaughlin JL. Cytotoxic and Insecticidal Constituents of the Unripe Fruit of *Persea americana*. *Journal of Natural Products* 61: 781-785, 1998.
14. Ovesná Z, Vachálková A, Horváthová K. Taraxasterol and beta-sitosterol: New naturally compounds with chemoprotective/chemopreventive effects, *Neoplasma* 51:407–414, 2004.
15. Parra AL, Yhebra RS, Sardiñas IG, Buela LI. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine* 8:395-400, 2001.
16. Rahuman AA, Gopalakrishnan G, Venkatesan P, Geetha K. Isolation and identification of mosquito larvicidal compound from *Abutilon indicum* (Linn.) Sweet. *Parasitology Research* 102: 981–988, 2008.
17. Ramos MR, Jerz G, Villanueva S, Lopez-Dellamary F, Waibe R, Winterhalter P. Two glucosylated abscisic acid derivates from avocado seeds (*Persea americana* Mill. Lauraceae cv. Hass) *Phytochemistry* 65: 955-962, 2004.
18. Simões CMO, Schenkel E P; Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Florianópolis, Brasil, 2004.
19. Velegraki A, Alexopoulos EC, Kritikou S, Gaitanis G. Use of Fatty Acid RPMI 1640 Media for Testing Susceptibilities of Eight *Malassezia* Species to the New Triazole Posaconazole and to Six Established Antifungal Agents by a Modified NCCLS

M27-A2 Microdilution Method and Etest. *Journal of Clinical Microbiology* 42:3589-3593, 2004.

**Table 1:** Lethal concentration (LC<sub>50</sub>) of extracts of avocado seeds against *A. salina* and *A. aegypti* larvae.

Extracts	CL <sub>50</sub> ( mg L <sup>-1</sup> )	
	<i>A. salina</i>	<i>A. aegypti</i>
HEAS <sup>*</sup>	2.37	8.87
MEAS <sup>†</sup>	24.13	16.7

<sup>\*</sup> Hexanic extract of avocado seeds

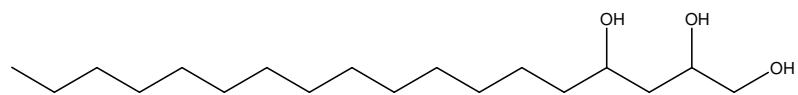
<sup>†</sup> Metanolic extract of avocado seeds

**Table 2:** Minimal Inhibitory Concentration of extracts of avocado (*Persea americana*)seeds against *Candida* spp., *C. neoformans* and *M. Pachydermatis*

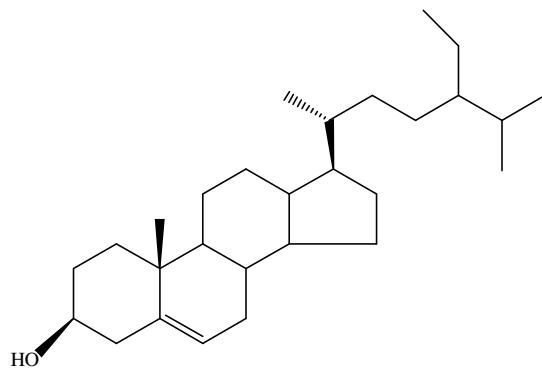
Fungi	n	MIC (mg/mL)	
		HEAS <sup>*</sup>	MEAS <sup>†</sup>
<i>C. parapsilosis</i>	4	1.25 (2) <sup>‡</sup>	0.625 (4)
		0.625 (2)	
<i>C. tropicalis</i>	4	0.625 (3)	0.625 (3)
		0.312 (1)	0.312 (1)
<i>C. albicans</i>	2	0.625 (2)	0.625 (1)
			0.125 (1)
<i>C. krusei</i> ATCC 6528	1	0.625 (1)	0.625 (1)
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	1	0.625 (1)	0.625 (1)
<i>C. neoformans</i>	6	0.625 (1)	0.156 (1)
		0.312 (5)	0.08 (5)
<i>M. pachydermatis</i>	7	0.625 (1)	0.625 (4)
		0.312 (3)	0.312 (3)
			0.156 (2)
			0.031 (1)

<sup>\*</sup> Hexanic extract of avocado seeds<sup>†</sup> Metanolic extract of avocado seeds<sup>‡</sup> Represents the number of strains for the MIC indicated.

**Figure 1:** Molecular estruture of the compounds isolated from hexanic extract of avocado seeds (HEAS).



1,2,4-trihydroxynonadecane



$\beta$ -sitosterol

## Artigo II

---

### Preservation of *Malassezia* spp. in fixed seed oils and *in vitro* antifungal susceptibility

João Jaime Giffoni Leite <sup>\*c</sup>, José Júlio Costa Sidrim<sup>c</sup>, Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante<sup>c</sup>, Rossana de Aguiar Cordeiro<sup>c, d</sup>, Charles Ielpo Mourão<sup>c, d</sup>, Selene Maia de Morais<sup>a, b</sup>, Marcos Fábio Gadelha Rocha<sup>a, c</sup>

<sup>a</sup>Faculty of Veterinary, Postgraduate Program in Veterinary Sciences, State University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

<sup>b</sup>Department of Chemistry, State University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

<sup>c</sup>Department of Pathology and Legal Medicine, School of Medicine, Specialized Medical Mycology Center, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

<sup>d</sup>Department of Biology, State University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

\*Corresponding author. Address: Rua Aracati 149, Benfica, CEP: 60020-240, Fortaleza, CE, Brazil. Tel: + 55 85 3252 2958.

E-mail: jjgiffoni@yahoo.com.br

**Canadian Journal of Microbiology**

(Artigo submetido)

## ABSTRACT

The principal aim of this study was to verify the potential as cryoprotectors of five fixed seed oils from some fruits and to determine the MIC and MFC of azole derivatives, amphotericin B and caspofungine using subculture on Dixon agar as a complement to the *in vitro* susceptibility test for *Malassezia* spp. by the broth microdilution method. The storage in vegetable oils at -80° showed a high rate of recovery, but some physiological characteristics were lost, such as esculin hydrolysis and assimilation of Chremophor. The microdilution assay was performed in 96-well plates using a modified RPMI 1640 medium. The subculture on Dixon agar improved the MIC reading and allowed the reading of MFC as well. Most of the strains (84.21%) were sensitive to ketoconazole and itraconazole, obtaining MIC values  $\leq$  0.03 $\mu$ g/mL. Against amphotericin B, the MIC range was 1 to >16 $\mu$ g/mL. All the *M. pachydermatis* and lipid-dependent strains showed resistance against caspofungine.

**Keywords:** *Malassezia* spp., antifungal susceptibility, fungal collection and fixed seeds oils

## INTRODUCTION

The genus *Malassezia* contains lipophilic and lipid-dependent yeast species that are part of the resident skin flora of human beings and other warm-blooded vertebrates (Leming et al., 1989). *Malassezia* yeast species have been associated with diseases that affect the human skin, such as pityriasis versicolor, folliculitis, seborrheic dermatitis and dandruff (Gupta et al., 2004), as well as nosocomial bloodstream infections in pediatric care units (Chryssanthou et al., 2001). This genus has recently been revised to include 13 species: *M. pachydermatis*, *M. furfur*, *M. sympodialis*, *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. restricta*, *M. slooffiae*, *M. dermatitis*, *M. japonica*, *M. yamatoensis*, *M. nana*, *M. equine*, and *M. caprae* (Cabañes et al., 2007). Since the study published by Guého et al. (1996), which supports the reclassification of *Malassezia* species through biochemistry and molecular examination, the genus *Malassezia* has undergone many taxonomic changes, causing difficulties in the phenotype identification of the species.

Some studies show the difficulties of storing *Malassezia* spp. in fungus collections, because *Malassezia* species have low viability and do not maintain their phenotypic characteristics well after storage (Crespo et al., 2000; Girão et al., 2004). The preservation of these yeasts in fungus collections is very important for clinical and research laboratories, prompting studies that focus on their biology.

Although there are different antifungal drugs available, the first choice drugs to treat infections caused by *Malassezia* spp. are the azole derivatives ketoconazole and itraconazole (Chen and Hill, 2005; Kose et al., 2005). However, the treatment of these fungal infections has been rather empirical and most often unsuccessful (Eichenberg et al., 2003). Therefore, studies that can add knowledge of the susceptibility of *Malassezia* spp. to antifungal drugs are important.

The purpose of this study was to contribute to better knowledge of the storage in fungus collections and *in vitro* antifungal susceptibility of *Malassezia* spp.

## MATERIALS AND METHODS

### Microorganisms

The fungal strains were obtained from the Specialized Medical Mycology Center of Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil. The identification was performed according to the method of Guillot et al. (1996). The yeasts were submitted to morphological analysis, catalase testing, esculin hydrolysis, urease production, growth in the presence of Tween 20, 40, 60 and 80 and Chremophor EL, as well as growth on Sabouraud agar without lipid supplementation (SDA).

### *In vitro* susceptibility tests of *Malassezia* spp.

The susceptibility of *Malassezia* spp. strains (thirty non lipid-dependent strains and eight *M. pachydermatis* strains) to different antifungal agents was obtained through the microdilution in broth method described by Velegraki et al. (2004), with the modifications proposed by Prado et al. (2008). These authors developed this methodology based on supplementation of the RPMI 1640 medium, to adapt the microdilution method recommended by the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI), which comprises only yeasts of *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans*.

The final concentrations of the antifungal agents were 0.03 to 16 $\mu$ g/mL for itraconazole, ketoconazole, fluconazole (Jansen Research Foundation, Beerse) and amphotericin B (Sigma, Saint Louis, Mo.). For fluconazole (Pfizer, Madrid, Spain), the range was 0.125 to 64 $\mu$ g /mL and for caspofungin (Merck Sharp & Dohme, Brazil) it was 0.015 to 8 $\mu$ g/mL.

The inoculum was prepared in saline solution (0.9%) and the culture was grown for 4 to 5 days on Dixon agar, at 32°C. The inoculum was standardized by the turbimetric method, obtaining a final inoculum of  $2.0 - 3.5 \times 10^3$  CFU/ml (Velegraki et al., 2004).

The microdilution assay was performed in 96-well plates (Velegraki et al., 2004). Growth and sterile controls were included for each strain tested. The microplates were incubated at 32°C for 24 hours for *M. pachydermatis* and 96 hours for lipid-dependent *Malassezia* species. Then 1- $\mu$ l aliquots from each well with *Malassezia* spp. plus different drug concentrations and the positive control were subcultured on Petri dishes with Dixon agar to determine the minimum fungicidal concentration (MFC) and the minimum inhibition concentration (MIC). Subcultures were incubated for 2-5 days at 32°C until colonies were visible. The colonies were then counted, comparing the number of colonies with different drug concentrations with the number of colonies observed in the positive control. For azole derivatives and caspofungine, the MIC was defined as the lowest antifungal concentration with the lowest number of strains with similar colony counts as the drug-free controls. The MFC for all tested drugs, and the MIC for amphotericin B, was defined as the lowest concentration that completely inhibited fungal growth (Prado et al., 2008). The quality control strains *C. parapsilosis* ATCC 22019 and *C. krusei* ATCC 6258 were included.

The reading of the MIC from the microdilution plate is difficult due the formation of clumps, resulting from the insoluble debris from the cell walls of *Malassezia* spp. Therefore, we carried out the subculture on Dixon agar to facilitate determining the MIC and MFC. We first carried out the subculture after 72h of contact of the lipid-dependent yeasts with the drugs studied, according to the parameters described by Velegraki et al. (2004). However, growth still occurred at all drug concentrations after this interval. Therefore, we increased the incubation period to 96h at 32°C, after which it was possible to obtain these values.

### **Preparation and pre-storage tests of fixed seed oils**

The seeds of guava (*Psidium guava*), papaya (*Carica papaya*), mango (*Mangifera indica*), watermelon (*Citrullus lanatus*) and passion fruit (*Passiflora edulis*) were kindly provided by the Natural Products Laboratory (State University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil). For preparation of fixed oils, the seeds were separated from the pulp, dried in an oven at 50°C and ground into powder in a laboratory mill. The fixed oils were obtained by heat extraction through the reflow method in a Soxhlet extractor for six hours, using hexane (Merck, Darmstadt, Germany) as the solvent. The extracts were concentrated in a rotary evaporator, under reduced pressure (20 rpm at 80°C). The fixed oils were first tested to verify their sterility and to investigate their toxicity against *Malassezia* spp. yeasts.

### **Storage of different *Malassezia* spp. strains in Dixon broth and Dixon agar and post-storage analysis**

A total of 12 strains of *Malassezia* spp. (ten non lipid-dependent strains and two *M. pachydermatis* strains) were evaluated in this study. 300µL of Dixon agar was added in an Eppendorf apparatus. After solidification of the agar, the strains were inoculated and incubated at 32°C for 72h. After this period, 300µL of a solution of fixed seed oil and mineral oil (1:1) was added on the Dixon agar column covering the colonies. For storage in broth, colonies of *Malassezia* spp. strains grown for 96h on Dixon agar were removed and incubated in an Eppendorf apparatus containing 150µL of Dixon broth and 150µL of fixed seed oil and mineral oil (1:1) solution. The mixture was left in contact with the yeasts for 45min at room temperature, followed by freezing at -80°C. Control groups containing Dixon medium (broth and agar) without cryoprotectors, Dixon medium with mineral oil, and glycerol alone were prepared.

The strains were stored for 6 and 9 months. After this period a portion of fungal mass was added in tubes containing Dixon broth and incubated for 7 days. Then 100µL of inoculated broth was transferred to tubes containing Dixon agar, for later post-storage analysis. The reactivated stains were tested according to some of the phenotypical characteristics, including: catalase and esculin hydrolysis, growth in the presence of Tween 60 and Chremophor EL. The strains of *M. pachydermatis* were also tested for urease production and growth on 2% Sabouraud agar dextrose without lipid supplementation.

## RESULTS

The results of storage for six months on Dixon agar or into broth demonstrated 100% recovery for all treatments in vegetable oils, mineral oil, glycerol and medium without cryoprotectors. Observation of the phenotype characteristics after storage

showed that catalase and urease activity, growth on medium containing Tween 60 were maintained. However, esculin hydrolysis (Figure 1b) and the ability to use Chremophor EL (Figure 1c) as the sole lipid source were lost.

After nine months of storage in Dixon broth only, two strains were contaminated, although all the others were viable with maintenance of the catalase and urease activity and Tween 60 assimilation. Changes of esculin hydrolysis (Figure 2b) and growth on medium with Chremophor EL (Figure 2c) as lipid source were verified, as observed after six months. One strain of *M. pachydermatis* lost its urease production activity, but its ability to grow on Sabouraud agar without lipid supplementation was not affected.

The MIC and MFC values for the *Malassezia* spp. strains tested are reported in Table 1. In respect to azole derivates, the lipid-dependent strains of *Malassezia* spp. (n=30) showed MICs ranging from <0.03 to 0.06 $\mu$ g/mL for ketoconazole; <0.03 to >64 $\mu$ g/mL for itraconazole; and 4 to >64 $\mu$ g/mL for fluconazole; <0.03 to >16 for voriconazole. The results for MFC were <0.03 to >16 $\mu$ g/mL for ketoconazole; <0.03 to >16 $\mu$ g/mL for itraconazole; 8 to >64 $\mu$ g/mL for fluconazole; and < 0.03 to >16 $\mu$ g/mL for voriconazole. For amphotericin B, the MIC values varied from 1 to >16 $\mu$ g/mL.

For the non lipid-dependent strains (*M. pachydermatis*), the MIC ranges were <0.03 to 0.125 $\mu$ g/mL for ketoconazole, <0.03  $\mu$ g/mL for itraconazole; and 4 to 16 $\mu$ g/mL for fluconazole; <0.03 to 2 $\mu$ g/mL for voriconazole. The MFC ranges were 0.03 to 5  $\mu$ g/mL for ketoconazole, <0.03 to 0.125  $\mu$ g/mL for itraconazole; 8 to 64 $\mu$ g/mL for fluconazole; and 4 to >16 $\mu$ g/mL for voriconazole. Amphotericin B presented MFC against *M. pachydermatis* ranging from 4 to >16 $\mu$ g/mL (Table 2).

## DISCUSSION

Many methods have been developed to maintain fungi, but because of these microorganisms' biodiversity, there is no standard technique that is able to preserve them in a suitable and generalized way (Girão et al., 2004). In choosing the best method to preserve a determined fungal group, one must consider the capacity of maintaining their phenotypical, genotypical and pathogenic characteristics (Santos et al., 2002; Girão et al., 2004).

Due to the taxonomic evolution of the *Malassezia* genus and problems such as low viability *in vitro*, some researchers have tried to improve the conservation of these yeasts in fungus collections (Crespo et al., 2000; Girão et al., 2004). Crespo et al. (2000) tested different storage conditions. They observed that freezing at -80°C was the only method successful at maintaining all *Malassezia* species viable. In our study, 12 strains of *Malassezia* spp. were stored at -80°C in five fixed oils, extracted from seeds of guava, papaya, mango, watermelon and passion fruit, in common cryoprotectors such as glycerol and mineral oil, as well as Dixon media (agar and broth) without an additional cryoprotector. Despite of the high rate of recovery, some strains lost esculin hydrolysis and the ability to use Chremophor EL as a lipid source. In one treatment, after nine months, one strain of *M. pachydermatis* lost its urease activity, corroborating the data obtained by Girão et al. (2004). There was no difference between the use of natural or conventional cryoprotectors and the control without addition of cryoprotectors. However, the Dixon media themselves contain compounds that promote cryoprotection, such as Tween 40 and malt extract (Hubálek, 2003).

The lipid extracts of the seeds contain acylglycerols along with phytosterols, carotenoids and phenolic compounds (Moya and Heinzen, 2004). Lipids act as impermeable cryoprotectors, increasing extracellular viscosity, causing partial efflux of

water from cells and inhibiting the growth of ice crystals inside and in close proximity to the cells (Hubálek, 2003). In addition, the vegetables contain carotenoids and phenolic compounds, which are known to have antioxidant properties. The use of antioxidant compounds has been investigated in cryotechnology because cells submitted to freezing suffer oxidative stress due the temperature fall (Carolsfeld et al., 2003), causing damage to the cells.

Various authors have reported that some biological aspects of the *Malassezia* genus are not totally clear. One of the factors is the pattern of antifungal susceptibility *in vitro*. The method used in our study was that described by Velegraki et al. (2004), with the modifications suggested by Prado et al., (2008). Both these research groups used the broth microdilution assay with RPMI 1640 medium, supplemented with ox bile, Tween 20 and glycerol, which support good growth of *Malassezia* spp. The only difference in our study was that this supplementation did not include glycerol monostearate, which was included by Velegraki et al. (2004). Prado et al. (2008) used subculture on potato dextrose agar as a complement to the *in vitro* susceptibility test for *M. pachydermatis* strains by the broth microdilution method, to determine the MIC and MFC of azole derivatives, amphotericin B and caspofungine.

The eight strains of *M. pachydermatis* used in our study were sensitive to the azole derivatives: all the strains showed higher susceptibility to ketoconazole and itraconazole, with MIC ranging from <0.03 to 0.125. Fluconazole and amphotericin B were the drugs with the highest MIC values against these yeasts. Figures similar to these were reported by Eichenberg et al. (2003), Velegraki et al. (2004) and Prado et al. (2008).

Most of the lipid-dependent strains of *Malassezia* spp. obtained MIC values <0.03 $\mu$ g/mL for ketoconazole and itraconazole, corresponding 50% and 80% of the

strains, respectively. These results are similar to those of Gupta et al. (2000), Velegraki et al. (2004) and Miranda et al. (2007). In our study, the MIC of fluconazole was higher than for the other azoles and ranged between 4g/mL and >64 $\mu$ g/mL. Approximately 66.66% of the lipid-dependent strains of *Malassezia* had a MIC >16  $\mu$ g/mL for this drug. Nevertheless, fluconazole can be an effective treatment option for pityriasis versicolor (Shahid et al., 2000). Similar results were also obtained by Velegraki et al. (2004) and Miranda (2007), who verified high MICs of fluconazole for *Malassezia* isolates. Those authors also observed that voriconazole, a drug synthesized from fluconazole, showed an ample MIC range. In our study, the MIC range was <0.03 to >16 $\mu$ g/mL. Twelve stains (40%) had MIC of 0.125  $\mu$ g/mL. Against amphotericin B, the range was 1 to >16  $\mu$ g/mL and 70% of the strains had MIC above of 16  $\mu$ g/mL, although Velegraki at al. (2004) found strains with MIC of 16 $\mu$ g/mL, these author also obtained MIC values lower than found in our study.

Besides the MIC data generated, the subculture on modified Dixon agar as a complement to broth microdilution allowed determination of the MFC. However, these data only can be compared with Prado et al. (2008), who employed this methodology for strains of *M. pachydermatis*. The results obtained in the study corroborate the MFC values obtained by Prado et al. (2008). While determining the MFC values, we observed that some lipid-dependent strains of *Malassezia* spp. with low MIC values for ketoconazole and itraconazole were not completely inhibited at most of the concentrations tested, making it impossible to determine the MFC, being necessary an investigation more detailed about this finding. When tested against caspofungine, the strains of *Malassezia* spp. were not sensitive even at a concentration 256 $\mu$ g/mL, 32 times higher than the highest concentration for the broth microdilution assay recommended by the CLSI for *Candida* spp. and *C. neoformans*.

The time of incubation of the lipid-dependent yeasts in contact with the antifungal drugs tested (96h) was crucial to suggest the MIC and MFC values. We had earlier tested these strains with incubation of 72h, as determined by Velegraki et al. (2004) and Miranda et al. (2007), but we found that after subculture on Dixon agar there was no inhibition or stopping of fungal growth, even at the highest concentrations of each drug recommended by the CLSI.

In summary, this study brings some important results to aid understanding of ways to preserve strains of the *Malassezia* genus in fungus collections and *in vitro* susceptibility of the genus against antifungal drugs. The storage of *Malassezia* spp. strains in fixed oils of seeds of mango, papaya, watermelon, passion fruit and guava showed promising results for use in mycology. The strains of *Malassezia* spp. are sensitive to azole derivatives, especially ketoconazole and itraconazole, but are resistant to caspofungine.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors thank the governmental agencies CAPES and CNPq for financial support.

**REFERENCES**

- Cabañes, F. J., Theelen, B., Castellá, G. and Oekhout, T. 2007. Two newlipid-dependent *Malassezia* species fromdomestic Animals. FEMS Yeast Res. **7**(6):1064 – 1076.
- Chen T., and Hill P.B. 2005. The biology of *Malassezia* organisms and their ability to induce immune responses and skin disease. Vet. dermatol. **16**(1): 4-26.
- Chryssanthou, E., Broberger, U., and Petrini, B. 2001. *Malassezia pachydermatis* fungemia in a neonatal intensive care unit. Acta Paediatr. **90**(3): 323-327.
- Crespo, M.J., Abarca, M.L., and Cabañes, F.J. 2000. Evaluation of different preservation and storage methods for *Malassezia* spp. J. Clin. Microbiol. **38**(10): 3872-3875.
- Carolsfeld, J., Godinho, H.P., Zaniboni Filho, E., and Harvey, B.J. 2003. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. J. Fish biol. **63**(2): 472-489.
- Eichenberg, M.L., Appelt, C.E., Berg, V., Muschner, A.C., Nobre, M.O., Matta, D., Alves, S.H., and Ferreiro, L. 2003. Susceptibility of *Malassezia pachydermatis* to azole antifungal agents evaluated by a new broth microdilution method. Acta Scientiae Veterinariae. **31**(2): 75-80.

Girão, M.D., Prado, M.R., Brilhante, R.S.N., Cordeiro, R.A., Monteiro, A.J., Sidrim, J. J.C., and Rocha, M.F.G. 2004. Viability of *Malassezia pachydermatis* strains maintained in various storage mediums. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. **37**(3): 229-233.

Guého, E., Midgley, G., and Guillot, J. 1996. The genus *Malassezia* with description of four new species. Antonie Leeuwenhoek. **69**(1): 337-355.

Gupta, A.K., Kohli, Y., Faergemann, J., and Summerbell, R.C. 2000. *In vitro* susceptibility of the seven *Malassezia* species to ketoconazole, voriconazole, itraconazole and terbinafine. Brit. J. Dermatol. **142**(4): 758-765.

Gupta, A.K., Batra, R., Bluhm, R., Boekhout, T., and Dawson Jr; T.L. 2004. Skin diseases associated with *Malassezia* species. J. Am. Acad. Dermatol. **51**(5): 785-98.

Kose, O., Erbil, H., and Gur, A.R. 2005. Oral itraconazole for the treatment of seborrhoeic dermatitis: an open, noncomparative trial. J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. **19**(2): 172-175.

Miranda, K.C., Araújo, C.R., Costa, C.R., Passos, X.S., Fernandes, O.F.L., and Silva, M.R.R. 2007. Antifungal activities of azole agents against the *Malassezia* species. Int. J. Antimicrob. Ag. **29**(3): 281-284.

Moya, P., and Heinzen, H. 2004. Lípidos: Química y productos naturales los contienen. In: Farmacognosia. Edited by Simões, C.M.O., Schenkel, E., Gosmann, G., Mello, J. C.P., Mentz, L.A., and Petrovick, P.R. UFSC Press, Santa Catarina, 435-465.

Prado, M.R., Brito, E.H.S., Brilhante, R.S.N., Cordeiro, R.A., Leite, J.J.G., Sidrim, J.J.C., and Rocha, M.F.G. 2008. Subculture on potato dextrose agar as a complement to the broth microdilution assay for *Malassezia pachydermatis*. *J. Microbiol. Meth.* **75**(2): 341-343.

Santos, I.M., Abrunhosa, L., Venâncio, A., and Lima, N. 2002. The effect of culture preservation techniques on patulin and citrinin production by *Penicillium expansum* Link. *Lett. Appl. Microbiol.* **35**(4): 272-275.

Shahid, J., Ihsan, Z., and Khan, S. 2000. Oral fluconazole in the treatment of pityriasis versicolor. *J. Dermatol. Treat.* **11**(2): 101–103.

Velegraki, A., Alexopoulos, E. C., Kritikou, S., and Gaitanis, G. 2004. Use of fatty acid RPMI 1640 media for testing susceptibilities of eight *Malassezia* species to the new triazole posaconazole and to six established antifungal agents by a modified NCCLS M27-A2 microdilution method and Etest. *J. Clin. Microbiol.* **42**(8):3589-3593.

Table 1- Minimal Inhibitory Concentration (MIC) and Minimal Fungicidal Concentration (MFC) to ketoconazole, itraconazole, voriconazole, fluconazole, amphotericin B and caspofungine against the strains of *Malassezia* spp. determined by broth microdilution followed by subculture on Dixon agar.

<i>Malassezia</i> sp. lipodependentes	MIC and MFC (µg/mL)											
	Ketoconazole		Itraconazole		Fluconazole		Voriconazole		Amphotericin B		Caspofungine*	
n= 30	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC
	<0.03(15) <sup>a</sup>	<0.03(4)	<0.03(24)	<0.03(15)	4(5)	8(1)	<0.03(5)	<0.03(5)	1(3)	1(3)	>256(10)	> 256(10)
	0.03(12)	0.03(3)	0.03(2)	0.03(1)	8(5)	16(4)	0.125(12)	0.25(5)	2(1)	2(1)		
	0.06(3)	0,06(2)	0.5(1)	0.15(1)	16(7)	32(4)	0.25(5)	0.5(1)	4(1)	4(1)		
		1(8)	1(1)	1(1)	32(9)	64(3)	2(2)	2(3)	8(2)	8(2)		
		2(2)	8(1)	8(1)	64(4)	>64(18)	4(1)	> 16(16)	16(2)	16(2)		
		>16(11)	>16(1)	>16(11)			8(1)		>16 (21)	>16 (21)		
							>16(4)					
<i>M. pachydermatis</i>	<0.03(7)	<0.03(5)	<0.03(8)	0.03(2)	4(3)	8(3)	<0.03(2)	<0.03(2)	2(1)	2(1)	>256(8)	> 256 (8)
n= 8	0.125(1)	0.06(3)		0.125(6)	8(2)	16(2)	0.25(2)	0.5(2)	4(5)	4(5)		
					16(1)	64(3)	2(4)	8(4)	8(1)	8(1)		
					64(2)				>16(1)	>16 (1)		

<sup>a</sup> Represents the number of *Malassezia* spp. strains related to corresponding MIC and MFC.

\* The evaluation of the susceptibility to caspofungine was made using 10 strains lipid-dependents of *Malassezia* spp.

**Figure 1: Viability and Biochemistry pattern of *Malassezia* spp. strains stored under different strategies.** Viability (A) and biochemistry changes of the esculin hydrolysis (B) and Chremophor EL assimilation (C) after storage in Dixon agar supplemented with fixed seeds oils, mineral oil, glycerol and Dixon broth without external cryoprotector (WEC). The others biochemistry characteristics tested do not suffer changes.

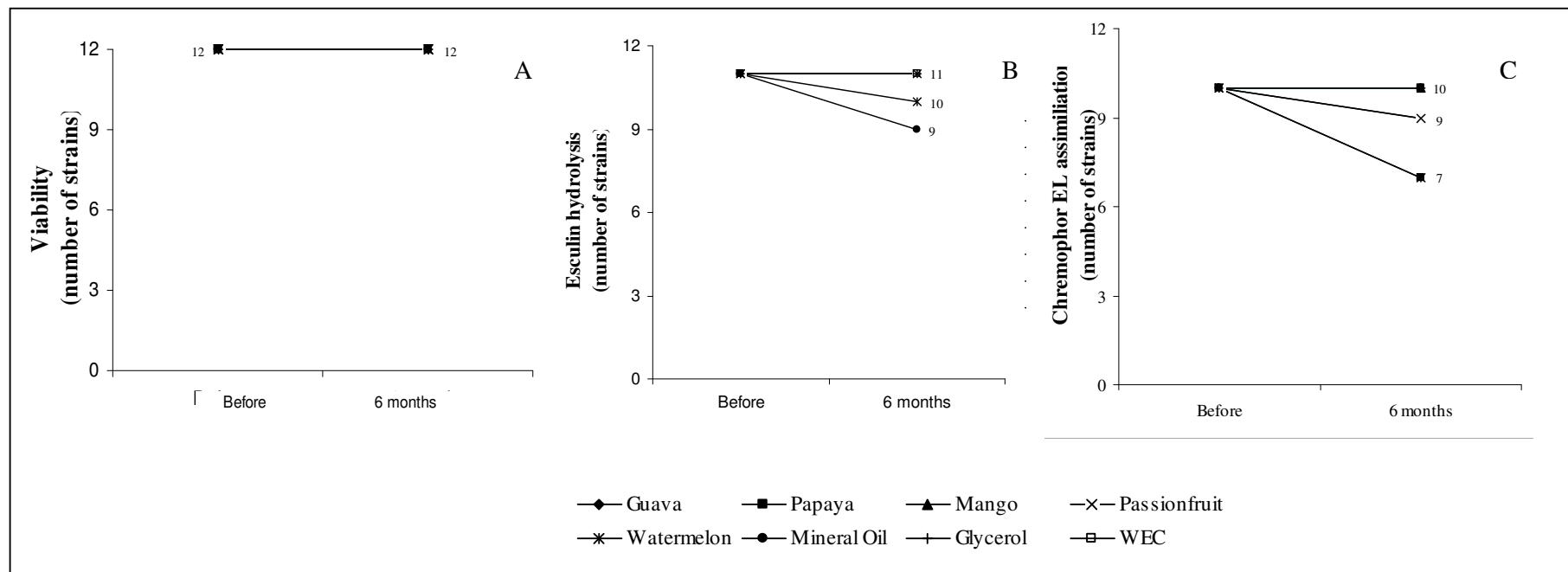


Figure 2: **Viability and Biochemistry pattern of *Malassezia* spp. strains stored under different strategies.** Viability (A) and biochemistry changes of the esculin hydrolysis (B) and Chremophor EL assimilation (C) after storage in Dixon broth supplemented with fixed seeds oils, mineral oil, glycerol and Dixon broth without external crioprotector (WEC). The others biochemistry characteristics tested do not suffer changes.

