



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FACULDADE DE MEDICINA

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
MÉDICA

DANIEL TEIXEIRA LIMA

**Efeito crioprotetor de lactose e glicose em células
fúngicas imobilizadas em alginato de sódio como método
de preservação de culturas**

FORTALEZA/CE

2011

**Efeito crioprotetor de lactose e glicose em células
fúngicas imobilizadas em alginato de sódio como método
de preservação de culturas.**

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 título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. José Júlio Costa Sidrim
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Raimunda Sâmia
Nogueira Brilhante

FORTALEZA/CE

2011

RESUMO

A criopreservação é a metodologia de escolha em muitos bancos de microrganismos, pois conduz a uma situação de dormência metabólica e, em consequência, as culturas mantêm-se estáveis por longos períodos. Ao reduzir a temperatura pode, todavia, ocorrer a formação de cristais de gelo que tendem a promover lesão celular. A lesão celular, por sua vez, pode ser evitada pelo processo de vitrificação que ocorre, combinando uma solução concentrada com o congelamento rápido. A literatura relata o uso de carboidratos como agentes vitrificadores e crioprotetores. Também informa que a técnica de imobilização de células em alginato de sódio permite o fracionamento da cultura e favorece a preservação de microrganismos. O objetivo deste trabalho consiste em avaliar a viabilidade dos fungos dos gêneros *Malassezia* spp. e do grupo dos Zigomicetos imobilizados em alginato de sódio, utilizando glicose e lactose como crioprotetores. Doze cepas de espécies de *Malassezia* spp (9 *M. furfur*, 2 *M. globosa*, 1 *M. sympodialis*) e doze cepas de Zigomicetos (7 *Mucor* sp. e 5 *Rhizopus* sp.) pertencentes à micoteca do Centro Especializado em Micologia Médica da Universidade Federal do Ceará. O gênero *Malassezia* abrange leveduras lipodependentes associadas a várias enfermidades dermatológicas, compreendem na atualidade 13 espécies. Zigomicetos, por sua vez, são fungos saprófitas e ubíquos cujas hifas, por apresentarem elevado tamanho e reduzido conteúdo protéico, estão mais vulneráveis a danos mecânicos. Dessa forma, constituem grupos fúngicos de preservação difícil em estoque, portanto, uma metodologia que mantenham a viabilidade de *Malassezia* spp. e Zigomicetos também poderia ser empregada com eficiência para a estocagem de outros fungos. As estruturas fúngicas foram removidas e transferidas para duas soluções de estoque, formadas por 3% de caldo Sabouraud, 1,5% de alginato de sódio e diferenciadas nas concentrações de glicose e lactose de 9% ou 23%. Em seguida, foram adicionadas esferas plásticas, medindo 0,7cm de diâmetro com orifício central e 0,5cm de comprimento. Após a gelificação iônica com cloreto de cálcio, cada cepa foi estocada à temperatura de -20 °C e -80 °C distribuídas em cinco tubos criogênicos de 1,5mL contendo cinco esferas cada uma, sendo avaliados em cinco períodos. Após nove meses, foi verificado que não houve recuperação de nenhuma cepa de *Malassezia* spp. Com relação às espécies de Zigomicetos, observou-se que, após nove meses de estoque, quatro cepas mostraram viáveis a -80 °C, empregando glicose a 9%, seis cepas foram preservadas a -80 °C, utilizando glicose a 23%; finalmente, seis e sete exemplares foram recuperados a -80 °C, utilizando lactose a 9% e 23%, respectivamente. Dessa forma, o uso de carboidratos como crioprotetores, em conjunto com a técnica de imobilização de células em alginato de sódio, constitui alternativa à manutenção de algumas espécies fúngicas.

Palavras-chave: Criopreservação. Imobilização de células. Alginato de sódio. *Malassezia* spp., Zigomicetos. Glicose. Lactos.

LISTA DE TABELAS

1 Características fisiológicas e bioquímicas de espécies de <i>Malassezia</i> (adaptado de Cafarchia et al., 2011).....	25
2 Técnicas moleculares para identificação e diferenciação de espécies de <i>Malassezia spp.</i> , (adaptado de Cafarchia et al., 2011).....	27
3 Relação das cepas de <i>Malassezia spp.</i> da micoteca do CEMM utilizadas nesta pesquisa. ..	37
4 Relação das cepas de Zigomicetos da micoteca do CEMM utilizadas nesta pesquisa.....	37
5 Resultados dos testes fisiológicos das cepas de <i>Malassezia spp</i>	48
6 Cepas de <i>Malassezia spp.</i> recuperadas em estoque até o período de 270 dias.....	53
7 Exemplares de Zigomicetos recuperados em estoque até o período de 270 dias	53

LISTA DE FIGURAS

1 Mecanismo de gelificação iônica alginato de sódio - cloreto de cálcio..	20
2 Zigomicetos imobilizados em esferas de alginato de sódio mergulhadas em solução de cloreto de cálcio.....	21
3 Crescimento de Zigomicetos a partir de esferas de alginato de sódio.....	21
4 Micromorfologia de espécie de <i>Mucor</i> sp.	31
5 Micromorfologia de <i>Rhizopus</i> sp.....	32
6 Aprisionamento das células fúngicas no interior das esferas	45
7 Macromorfologia e micromorfologia de <i>Malassezia</i> sp.....	46
8 Testes bioquímicos para identificação de espécies de <i>Malassezia</i> spp..	47
9 Visualização da reação de PCR em eletroforese em gel de agarose 1,5% direcionado à região 26s rDNA.....	49
10 Restrição enzimática promovido pela enzima HhAI.....	50
11 Restrição enzimática promovida pela enzima BtsCI.....	50
12 Micromorfologia de <i>Mucor</i> sp. e <i>Rhizopus</i> sp.....	51
13 Secagem de esferas de alginato de sódio.....	52
14 Aglomerados de esferas de alginato de sódio.....	52
15 Macromorfologia e Micromorfologia de <i>Malassezia</i> sp. <i>Rhizopus</i> sp. <i>Mucor</i> sp. após 180 dias de estoque à temperatura de - 80 °C, utilizando glicose na concentração de 23%.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AFLP- *Amplified Fragment Length Polymorphism*

ATCC- *Americal Type Culture Colletion*

BHI- *Brain Heart Infusion*

CHS2 – *Chitin-synthase 2*

DGGE - *Denaturing gradient gel electrophoresis*

DMSO – Dimetilsulfóxido

H₂O₂- Peróxido de hidrogênio

IGS – *Intergenic spacer*

ITS- *Internal Transcribed Spacer*

KOH- Hidróxido de potássio

LSU – *Large subunit*

PCR- *Polymerase Chain Reaction*

PCR-RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism*

PFGE – *Pulsed field gel eletroctrophoresis*

RAPD-PCR- *Random Amplification of Polymorphic DNA*

rDNA- DNA Ribossômico

S/A- Ágar-Sabouraud

SSU - *Small subunit*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	7
1.1 Métodos de preservação de culturas	7
1.1.1 Manutenção em água destilada ou solução salina à temperatura de 25 °C.....	10
1.1.2 Manutenção em óleo mineral	10
1.1.3 Nitrogênio líquido	11
1.1.4 Liofilização	11
1.1.5 Criopreservação	12
1.1.5.1 Agentes crioprotetores.....	14
1.1.5.2 Dimetilsulfoxido (DMSO).....	15
1.1.5.3 Glicerol	16
1.1.5.4 Carboidratos	16
1.1.6 Vitrificação	17
1.1.7 Imobilização de células	19
1.1.8 Estocagem de microrganismos em esferas de plástico	21
1.3 <i>Malassezia</i> spp.....	22
1.4 Zigomicetos	28
1.4.1 <i>Mucor</i> sp.	30
1.4.2 <i>Rhizopus</i> sp.	31
2 PERGUNTAS DE PARTIDA.....	33
4 OBJETIVOS.....	35
4.1 Objetivo geral	35
4.2 Objetivos específicos.....	35
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	36
5.1 Microrganismos.....	36
5.1.1 Coleção de espécies fúngicas CEMM	36
5.1.2 Recuperação das cepas estocadas na micoteca do CEMM.....	36
5.1.3 Revalidação fenotípica convencional para leveduras do gênero <i>Malassezia</i>	38

5.1.4 Identificação molecular de <i>Malassezia</i> spp.	41
5.1.4.1 Extração de DNA de leveduras do gênero <i>Malassezia</i>	41
5.1.4.2 Reação de PCR	42
5.1.4.3 Digestão do amplicon por enzimas de restrição	42
5.1.5 Revalidação fenotípica de <i>Mucor</i> sp. e <i>Rhizopus</i> sp.	43
5.2 Desenvolvimento da técnica de imobilização de células para a criopreservação de espécies fúngicas.....	43
5.2.1 Criopreservação de espécies fúngicas imobilizadas em alginato de sódio e esferas plásticas	44
6 RESULTADOS	46
6.1 Análise fenotípica para <i>Malassezia</i> spp.	46
6.2 Análise molecular para <i>Malassezia</i> spp.	49
6.3 Análise fenotípica de <i>Mucor</i> sp. e <i>Rhizopus</i> sp.	50
6.4 Resultados da adaptação da técnica de imobilização de células em alginato de sódio para a criopreservação de fungos.....	51
6.5 Resultados de viabilidade de cepas de <i>Malassezia</i> spp.	53
6.6 Resultados da viabilidade de cepas de <i>Mucor</i> sp. e <i>Rhizopus</i> sp.	53
7 DISCUSSÃO	54
8 CONCLUSÃO.....	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
APÊNDICES	Erro! Indicador não definido.
Meios de Cultura e Reagentes	83
Tabelas de resultados.....	95

1 INTRODUÇÃO

1.1 Métodos de preservação de culturas

A compilação de organismos em coleções biológicas data de 1750, um período caracterizado pela emergência da sistemática como ciência. No século XIX, foram criadas as primeiras coleções de culturas de microrganismos, inicialmente com base no acervo de amostras particulares de cientistas. Desde então, o estudo de culturas mantidas em coleções permanentes tem proporcionado grande avanço na preservação da biodiversidade e na compreensão da biopotencialidade microbiana. Coleções de culturas microbianas são centros de conservação de recursos genéticos *ex situ* que têm como principais objetivos a preservação e o fornecimento de material biológico e informação associada para pesquisa e desenvolvimento científico e industrial; a realização de pesquisa (morfologia, fisiologia, genética, preservação etc.); a conservação da biodiversidade; o depósito de material envolvido em processos de patente; a educação e capacitação de recursos humanos, além do funcionamento como centros de informação para a formulação de políticas e para o público em geral. Desta forma, os bancos de cultura são reconhecidos por seus valores científico, educacional e profissional, mediante troca de materiais e treinamento acadêmico (CANHOS et al., 1995).

A preservação de recursos microbiológicos é considerada meta prioritária do Programa Nacional de Biotecnologia e Recursos Genéticos do Ministério da Ciência e Tecnologia do Brasil, que desde 2002, incentiva a formação de bancos de espécies microbianas por intermédio do Sistema de Informação de Coleções de Interesse Biotecnológico (SICol). Dentre as ações previstas neste Programa, citam-se a ampliação e o fortalecimento da infraestrutura de suporte à biotecnologia, incluindo as coleções de culturas (KURY et al., 2000).

De acordo com o WFCC (*World Federation of Culture Collections*), o Brasil possui mais de 37.700 culturas microbianas, estocadas em 53 bancos diferentes. Dentre as coleções de culturas fúngicas de maior expressão no País, pode-se mencionar: Coleção de Culturas do Centro Especializado em Micologia Médica Universidade Federal do Ceará; Coleção de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco; Coleção de Culturas de Fungos do Instituto Oswaldo Cruz, no Rio de Janeiro; a Micoteca do Instituto de Medicina Tropical

de São Paulo; a Coleção de Fungos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia; e a Coleção de Microrganismos do Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, da Universidade de São Paulo (WFCC, 2011).

Atualmente, a micoteca do Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM) alberga em torno de 4000 cepas fúngicas, tanto de origem humana, veterinária como ambiental, estando estas cadastradas em um programa de computação apropriado, denominado SISCEMM. Nos últimos anos, diversas pesquisas buscando estabelecer os métodos mais adequados para manutenção da viabilidade de espécies fúngicas estocadas foram realizadas (BRILHANTE et al., 2004; GIRÃO et al., 2004; SOARES-JUNIOR et al., 2007). Atualmente, o acervo é mantido em diferentes condições de estoque (salina a temperatura de 25 °C; em meio ágar-batata a -20 °C com ou sem a adição do crioprotetor, e -80 °C em glicerol).

Em decorrência da grande diversidade biológica dos fungos, nenhum método de armazenamento é completamente satisfatório, requerendo-se a conjunção de dois ou mais procedimentos para garantir melhor recuperação das cepas. Considerando-se a indiscutível importância científica das coleções de culturas e a necessidade da busca de métodos mais eficazes na preservação das espécies fúngicas, esta pesquisa pretende investigar o efeito crioprotetor da lactose e glicose em células fúngicas imobilizadas em alginato de sódio como método de preservação de cepas estocadas em micoteca.

Em Micologia, as técnicas mais preconizadas para o estoque de culturas são (1) congelamento a -20 °C ou a -80 °C (utilizando-se ágar-batata acrescido ou não de crioprotetores); (2) estoque em água destilada ou em salina (0,9%); (3) conservação em ágar-Sabouraud ou ágar-batata com tampão de óleo mineral à temperatura de 25 °C; (4) liofilização após imersão das células fúngicas em leite desnatado *skin milk* e (5) congelamento em nitrogênio líquido (BREIEROVA et al., 1987; BOUCHET et al., 1989; BARCHIESI et al., 1994; DINIZ-MENDES et al., 1999). Cada uma dessas técnicas apresenta vantagens e desvantagens intrínsecas. Por exemplo, o congelamento e descongelamento de uma mesma cepa sem repique posterior pode levar a danos permanentes nas células fúngicas por meio de eventos como desnaturação protéica, aumento da concentração de eletrólitos e de radicais livres, desidratação celular, alterações no pH e formação de cristais, no espaço intracelular (CAVALCANTE, 2006; MARIANO, 2006). Já o estoque em temperatura de 25 °C, apesar da praticidade, necessita de mão de obra qualificada para a realização de repiques contínuos das

cepas e vigilância, a fim de evitar a contaminação das culturas por ácaros micófagos. Em adição, cepas de alguns fungos, como os dermatófitos, por exemplo, podem desenvolver pleomorfismo, comprometendo a estabilidade fenotípica das cepas e inviabilizando pesquisas futuras (LARONE, 2002)

1.1.1 Manutenção em água destilada ou solução salina à temperatura de 25 °C

Essa forma de estocagem é baseada no método desenvolvido por Castellani (1939). *The National Collection of Pathogenic Fungi* emprega essa metodologia, que consiste em armazenar na forma de hifas e conídios suspensos em água destilada estéril em tubos de ensaio ou microtubos hermeticamente fechados, mantendo-se a temperatura de 25 °C (DIOGO, 2005; BORMAM, 2006).

Essa técnica apresenta vantagens em relação a outros processos, tais como o baixo custo, a capacidade de evitar o pleomorfismo das espécies fúngicas e facilidade de manuseio e transporte (RODRIGUES, 1992). Uma alteração dessa forma de estocagem consiste na substituição da água destilada por solução fisiológica salina, a fim de favorecer o equilíbrio da pressão osmótica e contribuir para a manutenção de fungos de reduzida viabilidade (GIRÃO et al., 2004).

Apesar da simplicidade desse método de estocagem, existem desvantagens, como necessidade de mão de obra especializada para a realização de repiques, frequente monitoramento para prevenir a contaminação das culturas por ácaros micófagos e cuidado para evitar a evaporação da água (LARONE, 2002).

1.1.2 Manutenção em óleo mineral

Esse método consiste em adicionar óleo mineral autoclavado até cobrir a cultura fúngica em 1 centímetro acima do topo. É particularmente útil em locais de clima tropical, pois a camada de óleo mineral impede a desidratação das culturas, previne a evaporação da água quando empregada em conjunto com o método de Castellani e evita a penetração de ácaros micófagos. Algumas cepas, todavia, permanecem a crescer lentamente, podendo conduzir a alterações na morfologia, de tal forma que existe a necessidade de repique em intervalos de um a dois anos (DESHMUKH, 2003). Essa metodologia é amplamente empregada, para preservação de cepas de origem ambiental, clínica e industrial por longos períodos, conservando as características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas (SANTOS, 2003; BRAZ et al., 2009).

1.1.3 Nitrogênio líquido

Baseados nos eventos físico-químicos que ocorrem durante o processo de congelamento em condições naturais, os protocolos iniciais de criopreservação utilizavam congelamento em duas fases: congelamento lento, até uma temperatura de pré-congelamento (- 30 °C a - 40 °C), a uma velocidade de congelamento definida (1 a 10 °C/hora) e fazendo uso de um congelador programável, seguido de imersão direta em nitrogênio líquido (BENITO et al., 2004).

Nesse tipo de estocagem, as cepas não têm prazo de validade, de forma que elimina o inconveniente de constantes repicagens, além de diminuir a chance de contaminações. Outra característica importante desse processo é que, pelo fato de o metabolismo do fungo ser totalmente inibido, as possibilidades de ocorrerem mutações e perda de viabilidade do fungo diminuem (CAMPOS, 2004). A conservação de microrganismos em nitrogênio líquido a -196 °C ou em vapor de nitrogênio líquido a -150 °C, embora seja considerada uma das técnicas mais efetivas na preservação de fungos por longo período, é considerado incompatível com a realidade de muitos laboratórios, em razão do elevado investimento e da necessidade de uma infraestrutura adequada para manutenção desse método (CAVALCANTE, 2006).

1.1.4 Liofilização

A liofilização é o método de preservação de microrganismos por décadas e é o preferido por vários centros de estudo para manutenção de coleções de culturas incluindo *The American Type Culture Collection* (ATCC) e *National Collection of Type Cultures* (NCTC). Esse método consiste na secagem ou desidratação celular alcançada por meio do congelamento da cultura, seguindo-se para a produção de vácuo e elevação gradativa da temperatura, o que diminui a pressão adjacente e permite que a água congelada passe diretamente da fase sólida para a gasosa, mantendo intactas as estruturas celulares que seriam destruídas pela evaporação. Geralmente, recomenda-se a liofilização de culturas cuja concentração esteja acima de 10^7 células para garantir que haja células suficientes após os processos de liofilização, estocagem em longo prazo e reconstituição para a propagação da cepa (MORGAN, 2006).

A sobrevivência de microrganismos, na maioria dos casos, é obtida principalmente pela desidratação e não pelo congelamento, pois a amostra deve ser

desidratada para um teor de umidade apropriado (SANTOS, 2001). Portanto, a liofilização consiste em um método ideal para estocagem de espécies diversas, evitando assim que os microrganismos sejam alvo de mutações, bem como mantém as características morfológicas e bioquímicas das cepas, impedindo o pleomorfismo no momento do recultivo, eliminando a contaminação por outros microrganismos e facilitando o manejo dos estoques, pois não requer muito espaço. Alguns dermatófitos, no entanto - por exemplo, espécies de *Epidermophyton floccosum*, desprovida totalmente de microconídios e espécies de *Microsporum gypseum*, que produz poucos microconídios - possuem menor possibilidade de se manterem viáveis com a liofilização (BUNSE et al, 1991).

1.1.5 Criopreservação

A criopreservação é a metodologia de escolha em muitos bancos de microrganismos, pois conduz a uma situação de dormência metabólica em virtude do resfriamento e, em consequência, as culturas mantêm-se estáveis por longos períodos (CAVALCANTE, 2006). De forma geral, a criopreservação inclui redução da temperatura, desidratação celular, congelamento e degelo (BARBAS & MASCARENHAS, 2009).

Todos os organismos vivos possuem a capacidade de enfrentar condições térmicas adversas ao adequar-se às modificações de temperatura de 25 °C (GROB, 1999). O tratamento prévio de células pela exposição a um estresse leve induz a uma resistência maior na exposição a um estresse mais intenso, fenômeno conhecido como tolerância, adaptação fenotípica ou habituação (THAMMAVONGS et al., 2000).

Ocorrendo a uma redução repentina de temperatura, os organismos passam por algumas mudanças bioquímicas e fisiológicas, geralmente descritas como resposta ao choque térmico ou ao resfriamento (JONES & INOUE, 1994; GRAUMANN & MARAHIEL, 1996). Além disso, ao serem expostos ao congelamento, produzem proteínas específicas denominadas proteínas da aclimação ao frio ou proteínas transicionais de choque térmico (PANOFF et al., 1995). Portanto, essa resposta abrange diversos processos celulares, inclusive a aquisição de uma criotolerância (CAVALCANTE, 2006).

À proporção que a temperatura se aproxima de 0 °C, a atividade celular metabólica é reduzida e a expectativa de vida das células é elevada. Portanto, a criopreservação interrompe a atividade celular, retornando as suas funções após o descongelamento (BARBAS & MASCARENHAS, 2009). A célula e seu meio externo

atingem um estado de super-resfriamento e, em seguida, ocorre a formação de gelo no meio extracelular. O conteúdo da célula super-resfriada permanece descongelado, possivelmente porque a membrana plasmática e a parede celular impedem que os cristais de gelo presentes nos espaços intercelulares penetrem a célula e promovam o congelamento do citoplasma (SANTOS, 2001).

Múltiplos fatores modificam a eficácia da criopreservação de microrganismos, como a espécie, cepa, tamanho, formato celular, fase e taxa de crescimento, temperatura de incubação, meio de crescimento, pH, osmolaridade, aeração, conteúdo de água e lipídio na célula, composição do meio de congelamento, temperatura, taxa e período de estocagem e degelo e meio apropriado para reconstituição (CALCOTT, 1978; HECKLY, 1978; ASHWOOD-SMITH, 1980; KIRSOP & SNELL, 1984; KIRSOP & DOYLE, 1991; DAY & MCLELLAN, 1995; HUBÁLEK, 1996; HUBÁLEK, 2003).

A taxa de congelamento pode ser lenta o bastante para permitir a saída de água das células por osmose (BARBAS & MASCARENHAS, 2009). Caso o congelamento seja lento, a água se difunde do interior da célula supercongelada para o meio externo em virtude da diferença de pressão de vapor da água, que é maior dentro da célula do que nos espaços intercelulares congelados, e solidifica-se na superfície das células ou entre o citoplasma e a parede celular (MAZUR, 1970). Com isso, a célula desidrata-se, perde turgor, aumenta a concentração de solutos no seu interior e não congela o conteúdo intracelular. Portanto, o método de congelamento lento é um procedimento complexo, no qual a velocidade de congelamento e a temperatura de pré-congelamento têm um papel crítico na preservação da viabilidade do material (SANTOS, 2001; OZKAVUKCU, 2002).

No congelamento rápido, a célula não está pronta para perda de água repentina, portanto, a desidratação por congelamento não ocorre e, para manter o equilíbrio, as células se tornam cada vez mais super-resfriadas, e a solução intracelular, que contém alto teor de água livre, congela-se, formando cristais de gelo, o que ocasiona morte celular (OZKAVUKCU, 2002). Estudos especulam, todavia, que a eficácia da criopreservação em rápida taxa de congelamento de espermatozóides, hemácias e células bacterianas pode ser melhorada com a utilização de agentes crioprotetores mais viscosos, por exemplo: glicerol, propilenoglicol e açúcares. Enquanto isso, crioprotetores com baixa viscosidade como DMSO e metanol, os quais não modificam a estrutura do material congelado, exercem pobre proteção a essas células (MORRIS, 2006).

A formação de gelo no meio intracelular proporciona ruptura do sistema de membranas celulares, resultando em perda da semipermeabilidade e da compartimentação celular. A injúria mecânica passada pelas células advém de dois fenômenos: o comportamento próprio da água, que se expande ao congelar-se, e a formação de cristais de gelo. Evitar a formação desses cristais não é simples, pois a água apresenta muitas funções biológicas essenciais nos microrganismos e, portanto, esses possuem elevados teores de água. Dessa forma, ocorre excessiva formação de cristais de gelo intracelular, caso sejam congelados em estado hidratado. Consequentemente, o sucesso de um protocolo de criopreservação depende da desidratação para um teor de umidade que seja reduzido o suficiente para evitar a formação de gelo intracelular, porém não tão baixo que ocasione desidratação (SANTOS, 2001).

1.1.5.1 Agentes Crioprotetores

Agentes crioprotetores reduzem o estresse físico e químico derivado do congelamento e do degelo das células. As características físico-químicas ideais para um crioprotetor devem abranger baixo peso molecular, alta solubilidade em água e baixa toxicidade celular (GONZALEZ, 2004)

A presença de um agente crioprotetor apropriado, na composição do meio utilizado para o congelamento, geralmente aumenta a sobrevivência de microrganismos mantidos a temperaturas abaixo de 0 °C . Existe, então, uma grande quantidade de compostos químicos simples e complexos com potencial função crioprotetora, porém poucos apresentam resultados satisfatórios, por exemplo: dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol, carboidratos, soro sanguíneo, albumina, *skim milk*, peptona, extrato de levedura, e extrato de malte. Esses compostos podem ser adicionados durante o crescimento do microrganismo ou anterior ao congelamento (HUBÁLEK, 2003).

Crioprotetores são agrupados de acordo com a taxa de permeabilidade na célula e quanto à formação de estado vítreo amorfo. Crioprotetores de alta taxa de penetração na célula são, por exemplo: etanol, metanol, etilenoglicol, propilenoglicol e o DMSO. Já os monossacarídeos, oligossacarídeos, polissacarídeos, proteínas e o polietilenoglicol não penetram a célula e proporcionam uma crioproteção extracelular (MORGAN, 2006).

As diferenças de permeabilidade dos crioprotetores afetam os mecanismos pelos quais exercem seus efeitos. Crioprotetores penetrantes (glicerol, DMSO, etilenoglicol, propilenoglicol) promovem rearranjo lipídico e protéico, resultando no aumento da fluidez da

membrana, grande desidratação a baixas temperaturas, reduzem a formação de gelo intracelular e aumentam a sobrevivência por criopreservação. Também desenvolvem a função de solventes de açúcares e sais do próprio meio de preservação. Esses agentes atuam no meio intracelular ou extracelular e a capacidade de permeabilidade está diretamente relacionada com a hidrofiliabilidade desses compostos, em razão da presença de grupos químicos capazes de formar fortes pontes de hidrogênio (BARBAS & MASCARENHAS, 2009).

Crioprotetores semipermeáveis induzem uma desidratação parcial antes do congelamento, depositam-se entre a membrana e a parede celular, atuando como uma camada de tampão, impedindo assim a expansão do gelo e conferindo uma proteção mecânica à célula. Crioprotetores não permeáveis formam uma camada viscosa na superfície do microrganismo, causando um efluxo parcial de água da célula, inibem a expansão de cristais de gelo e mantêm a estrutura de gelo amorfo muito próximo à célula, protegendo-a quanto à formação de gelo extracelular. Não há, porém, interação direta desses agentes crioprotetores com a membrana e a parede celular (HUBALEK, 2003).

Muitas substâncias com propriedades crioprotetoras elevam a permeabilidade da membrana, diminuem o ponto de congelamento da água e de fluidos biológicos por meio de ações coligativas. Portanto, reduzem a concentração de sais dissolvidos em solução e evitam assim o choque osmótico. Além de efeitos coligativos, a ação crioprotetora de determinados compostos pode estar relacionada com a capacidade de defender a superfície da célula do estresse hiperosmolar. Crioprotetores também podem proteger microrganismos e suas proteínas contra desidratação, destruição térmica e radiação (HUBALEK, 2003).

1.1.5.2 Dimetilsulfoxido (DMSO)

Inicialmente empregado na criopreservação de hemácias e espermatozóides, é produzido pela oxidação do dimetil sulfeto. O dimetilsulfóxido (DMSO) é um crioprotetor bastante conhecido, empregado como solvente apolar em laboratórios e na indústria. Classificado como sulfóxido, o grupamento S-O presente na molécula é quimicamente inerte, e é caracterizado pela elevada eficiência e rápida penetração celular. Acredita-se que o DMSO diminua o ponto de congelamento, o que conduz a formação de gelo somente em baixas temperaturas, - 40°C a - 50°C (MASSUMOTO, 1997).

A literatura relata amplo uso do DMSO como crioprotetor nos estoques de diversos microrganismos, tanto eucariotos como procariotos, inclusive leveduras e fungos filamentosos, nas concentrações que variam desde 1% a 32%. Também possui propriedades

radioprotetoras, portanto, é denominado agente crioprotetor universal. Apesar de alguns estudos sugerirem que DMSO apresenta efeito crioprotetor superior ao glicerol e aos demais crioprotetores, esse pode ser tóxico para alguns sistemas biológicos, principalmente quando mantidos por longo período em temperaturas acima de 5 °C (HUBALEK, 2003).

1.1.5.3 Glicerol

Sua atividade de crioproteção foi inicialmente aplicada em 1913, quando Keith observou que a adição de glicerol em variadas concentrações (5 - 42%) em suspensão de *Escherichia coli* permitiu mantê-las viável por seis meses mantidos a - 20 °C. Portanto, o início da criotecnologia moderna foi marcado com a descoberta de que o glicerol protegia células eucarióticas contra os danos de congelamento (POLGE et al., 1949; LOVELOCK e BISHOP, 1959). Dessa forma, alcoóis poli-hídricos como o glicerol, por exemplo, têm sido amplamente empregados como agente crioprotetor e, juntamente com DMSO, são os crioprotetores mais utilizados em Microbiologia. O uso de alcoóis monovalentes é pouco freqüente em decorrência da elevada toxicidade a diversos sistemas biológicos (HUBALEK, 2003).

1.1.5.4 Carboidratos

Os açúcares (sacarose, trelose, glicose, lactose) como substâncias crioprotetoras não apresentam citotoxicidade, mesmo quando se acumulam em grande quantidade. Em comparação com os crioprotetores tradicionais, esses açúcares mostram alta eficiência na estabilização de membranas celulares durante o congelamento (HUBALEK, 2003).

Carboidratos estão presentes em muitas estruturas biológicas vegetais. De fato, sementes contêm entre 10 – 20% de dissacarídeos e oligossacarídeos. Dessa forma, a mistura desses compostos inibe a cristalização e, portanto, ajuda na preservação desses organismos em condições adversas (BUTINK, 2000; MORGAN, 2006).

Conforme se adiantou há pouco, o uso de carboidratos como crioprotetores foi descrito em 1913 quando Keith utilizou uma solução de cana de açúcar para preservação de bactérias a - 10 °C e as manteve por oito meses. Desde então, foram realizados diversos estudos empregando glicose, lactose, sacarose e maltose, em variadas concentrações sozinhas ou em combinação com outros crioprotetores, para manutenção de microrganismos (HUBALEK, 2003).

De forma geral, açúcares não são capazes de se difundir através da membrana plasmática, pois atuam criando uma pressão osmótica que induzem a desidratação celular, portanto, agem como agentes osmóticos externos, removendo o excesso de água intracelular através de um gradiente osmótico e conduzindo a uma baixa incidência de formação de cristais de gelo dentro da célula. Também elevam a sobrevivência de espécies no processo de criopreservação, pois podem exercer a função de solutos, reduzindo o ponto de congelamento e minimizando a formação do gelo extracelular (BARBAS & MASCARENHAS, 2009).

No estado amorfo, ocorre o aprisionamento de solutos, evitando sua concentração, permitindo a continuidade das ligações por pontes de hidrogênio entre a solução vítrea e a superfície hidrofílica das células (KOSTER, 1991). Os componentes hidroxila das moléculas de açúcar tem a capacidade de proteger a células da injúria causada pelo congelamento do meio biológico pela sua capacidade de capturar sais, como NaCl, em meio viscoso ou em fase cristalina (GONZALEZ, 2004).

Relata-se, amiúde, que açúcares exibem uma melhora na tolerância a dessecação em muitos organismos em virtude da estabilização de membranas e proteínas, pela substituição da água em torno de resíduos polares dentro dessas estruturas macromoleculares. Esses açúcares preservam a estrutura e a função de proteínas durante a desidratação, pois previnem a desnaturação protéica pela formação de pontes de hidrogênio, as quais ajudam a manter a estrutura terciária das proteínas na ausência de água (MORGAN, 2006).

Pesquisas sugerem que a glicose na concentração de 9% pode ser empregada como crioprotetor na preservação de espécies dermatofíticas a -20 °C (SOARES-JUNIOR, 2007). Enquanto isso, os dissacarídeos trealose, sacarose e maltose na concentração de 23% aumentaram a sobrevivência de espécies de *Geotrichum candidum*, após liofilização (HAMOUDI et al., 2007).

1.1.6 Vitrificação

No processo de vitrificação ocorre uma combinação do uso de uma solução concentrada com o congelamento rápido para evitar a formação de cristais de gelo, sem o emprego de equipamentos para o controle da taxa de congelamento. Dessa forma, o sólido assim formado é, na realidade, uma solução de elevada concentração, que possui a estrutura molecular de um líquido viscoso e não de uma estrutura cristalina, embora conserve as propriedades mecânicas de um sólido (KOSTER, 1991; OZKAVUKCU, 2002).

A vitrificação restringe a difusão de substratos e de produtos dentro da célula, levando a um estado de quiescência metabólica e resultando na exclusão de reações químicas dependentes do processo de difusão, o que assegura a estabilidade durante o período de dormência, além de outras vantagens, como limitação da perda de água, limitação da cristalização de sais e proteínas no citoplasma, proteção contra mudanças no pH à medida que a água é removida, e prevenção de colapso celular durante extensiva perda de água (SANTOS, 2001).

A permeabilidade dos crioprotetores torna a membrana celular mais plástica e promove a ligação da água intracelular, o que reduz a excessiva desidratação, diminui a toxicidade por sais e previne a formação de cristais de gelo dentro da célula. Os crioprotetores, ao penetrar a célula, estimulam a formação de uma estrutura de gelo finamente cristalina, formando, assim, um tipo de gel conhecido como fase vítrea. Dessa forma, impede que a célula seja objeto de injúria hiperosmolar e lesões de superfície causadas por sais (HUBALEK, 2003).

Os formadores de estado vítreo compreendem carboidratos, proteínas e polímeros. A vitrificação constitui uma solução supersaturada com alta viscosidade. Essa situação promove alta proteção durante o congelamento, pois a formação do estado vítreo induz suficiente viscosidade dentro e ao redor da célula, estabilizando a mobilidade molecular. Outra propriedade da vitrificação consiste em reter produtos liberados pela célula dentro de uma estrutura vítrea antes de congelar, significando que não há concentração e início de mudanças eletroquímicas irreversíveis na membrana plasmática durante a estocagem (MORGAN, 2006).

Compostos como açúcares ou glicerol previnem lesões celulares por meio do congelamento de fluidos celulares por interceptação de sais (NaCl), em razão da alta viscosidade ou a formação de uma fase vítrea. Dessa forma, em uma solução altamente viscosa de açúcar e água, acondicionada a uma temperatura inferior a 0 °C, as moléculas de água ficam aprisionadas entre as moléculas do açúcar, inibindo, assim, a formação de cristais de gelo (HUBALEK, 2003).

Embora se creia que os açúcares sejam os principais componentes promotores da formação do estado vítreo (MORGAN, 2006), também é demonstrado que polipeptídeos podem alterar as propriedades vítreas do açúcar. Dessa forma, as proteínas possuem maior estabilidade acima da temperatura de transição do estado vítreo do que os carboidratos. Isso

sugere que proteínas também exercem importante função na constituição para a vitrificação. Isso pode explicar por que soro e leite desnatado possuem efeito protetor (BUTINK, 2000).

1.1.7 Imobilização de células

Nos últimos anos, as indústrias alimentícias, de biocombustíveis, de produtos para controle de pragas na agricultura e de bioprodução enzimática têm desenvolvido e aprimorado técnicas de imobilização de células microbianas, com o objetivo de aumentar a produção de metabólitos para uso como biocatalizadores, bem como a aplicação de microrganismos para o controle biológico de fitopatógenos (LEWIS & PAPAVIZAS, 1985; BOFO et al., 2005; CANILHA et al., 2006; CARVALHO et al., 2006; BUENO & GATTÁS, 2009). Por meio de técnicas diferentes, as células microbianas e/ou seus produtos metabólicos são aprisionadas em esferas ou lâminas formadas por suportes quimicamente pouco reativos ou inertes, onde são preservadas suas funções metabólicas de forma contínua ou descontínua (PARK et al., 2006).

Os suportes empregados para a imobilização microbiana podem ser de origem biológica, como alginato, ágar, carragena, derivados da celulose, quitosana, ou sintética, como a poliacrilamida e polivinil álcool (PVA) (MORETINI & MELO, 2007). Em geral, os suportes naturais são atóxicos, embora sejam mais quebradiços e de menor durabilidade, ao passo que os polímeros sintéticos possuem maior resistência física, conquanto possam apresentar toxicidade celular (CARVALHO et al., 2006; COVIZZI et al., 2007; ZHANG et al., 2007). Dados da literatura mostram que o alginato de sódio e criogéis de polivinil álcool são os suportes químicos mais eficientes na imobilização de células microbianas (CARVALHO et al., 2006; COVIZZI et al., 2007; BUENO e GATTÁS, 2009).

Polímeros naturais, como alginato e quitina, são amplamente empregados como matrizes para o aprisionamento de células microbianas pela técnica de emaranhamento. Esses polímeros também são conhecidos por se unirem fortemente a íons metálicos (Figura 1). O alginato de sódio é um polissacarídeo solúvel em água e extraído de várias espécies de algas marinhas. Em contato com cátions metálicos, tais como cálcio (Ca^{2+}), a substância é alvo de gelificação e se mantém estável por longos períodos. Por sua vez, criogéis de polivinil álcool são polímeros sintéticos muito empregados na imobilização celular, uma vez que apresentam termoestabilidade e resistência a decomposição microbiana. Em adição, tais substâncias são quimicamente inertes e possuem baixo custo e as células microbianas imobilizadas mostraram

ser mais estáveis por mais tempo do que células não aprisionadas (SAG et al., 1995; YAKUP et al., 2001; CUNHA et al., 2005; ZHANG et al., 2007; MORETINI e MELO, 2007).

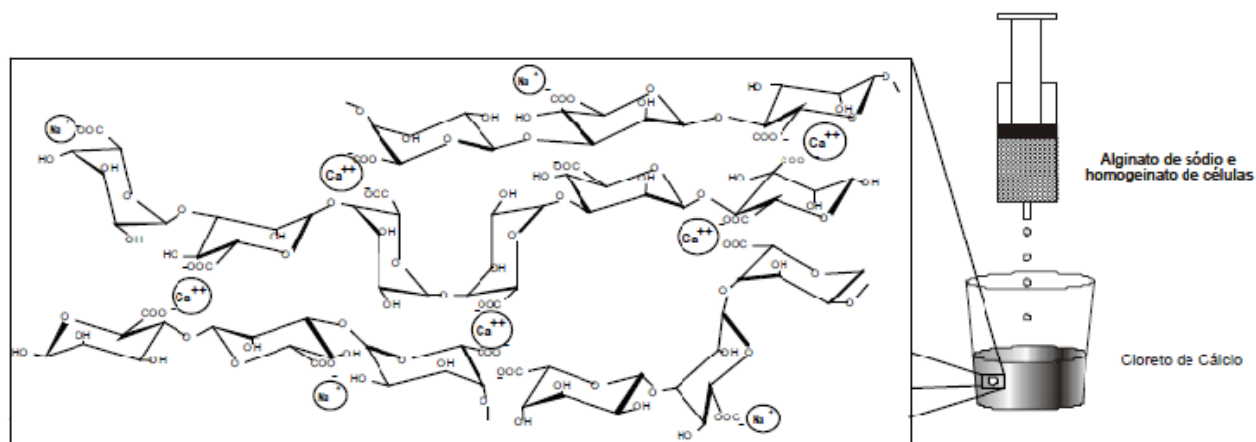


Figura 1- Mecanismo de gelificação iônica alginato de sódio - cloreto de cálcio. O gotejamento do alginato de sódio na solução de cloreto de cálcio produz uma malha de textura gelatinosa, formato esférico, semelhante às gotas vertidas. As células que estavam homogeneizadas na solução de alginato de sódio são então aprisionadas.

Fonte: GOVIZZI et al., 2007

Muitos produtos microbianos de interesse industrial são imobilizados, nas formas de massas esféricas ou elípticas de hifas formadas pelos fungos sob condições de submersão em cultura (Figuras 2 e 3) (GEHRIG et al. 1998, HELLENDORRN et al. 1998). Pellets estáveis de micélios podem ser usados como biomassa naturalmente imobilizada, o que permite a aplicação de um processo de utilização contínua, aperfeiçoando o desenvolvimento das culturas e direcionando o metabolismo para a produção de metabólitos específicos, indisponíveis em condições de crescimento micelial livre (BRAUN & VECHT-LIFSHITZ, 1991).

Apesar da grande vantagem do uso de células imobilizadas em processos biotecnológicos, até o momento, poucos estudos investigam o seu uso na preservação de cepas fúngicas em coleções (GOVIZZI et al., 2007).



Figura 2 - Zigomicetos imobilizados em esferas de alginato de sódio mergulhadas em solução de cloreto de cálcio. Fonte: CEMM – 2009

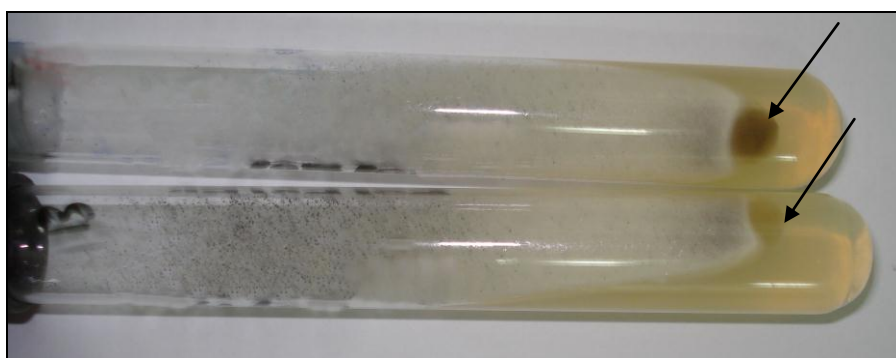


Figura 3 – Crescimento de Zigomicetos a partir de esferas de alginato de sódio. As setas apontam a esferas inoculadas no meio de cultura. Fonte: CEMM 2009.

1.1.8 Estocagem de microrganismos em esferas de plástico

Sistemas comerciais originalmente desenvolvidos para o armazenamento de células bacterianas *Microbank* (Prolab Diagnósticos, Austin, Texas) consistem em frascos estéreis, que contêm esferas plásticas coloridas e um fluido crioprotetor. As esferas são lavadas com ácido, possuem natureza porosa e permitem a adesão das células à superfície, servindo como veículos para as células a serem armazenadas. Portanto, a principal vantagem desse método consiste no congelamento individualizado das esferas, pois, como as células estão aderidas às contas, evita-se a degradação de todo o sistema, podendo ser removidas facilmente com risco mínimo de descongelamento. Por outro lado, a raspagem do material

fúngico a partir da cultura em ágar ao longo do tempo pode dar origem a danos celulares em decorrência do congelamento e descongelamento da cultura (ESPINEL-INGROFF, 2004; BAKER & JEFFRIS, 2006; SILVA et al., 2008).

1.3 *Malassezia* spp.

O gênero *Malassezia*, antigamente também conhecido como *Pityrosporum*, pertenceu à divisão Basidiomycota, classe Hymenomycetes, ordem Tremellales e família Filobasidiaceae (DE HOOG et al., 2002). A atual classificação filogenética do reino Fungi inclui este gênero no filo Basidiomycota, subfilo Ustilaginomycotina e ordem Malasseziales, sem, no entanto, agrupá-lo em determinada classe, pois apresenta características que tanto podem classificá-lo na Classe Exobasidiomycetes, quanto na Classe Ustilaginomycetes (HIBBETT et al., 2007).

Atualmente, são 14 as espécies conhecidas do gênero *Malassezia*, no entanto, até 1996, compreendia apenas três espécies: *Malassezia sympodialis*, *Malassezia pachydermatis* e *Malassezia furfur*, de acordo com as características dos ácidos nucleicos, demonstrando relação guanina-citosina de 54, 55,5 e 66%, respectivamente (VARGAS et al., 2004). Por meio de ensaios bioquímicos, fisiológicos e moleculares, Guého et al. (1996) revisaram a taxonomia do gênero, que passou a albergar mais quatro espécies: *Malassezia globosa*, *Malassezia slooffiae*, *Malassezia obtusa* e *Malassezia restricta*. Novas análises moleculares permitiram a inclusão de quatro novas espécies: *Malassezia dermatis*, *Malassezia japonica*, *Malassezia yamatoensis* e *Malassezia nana* (SUGITA et al., 2002, 2003, 2004; HIRAI et al., 2004). Mais recentemente, três novas espécies lipodependentes foram identificadas: *Malassezia equina*, *Malassezia caprae* e *Malassezia cuniculi* (PRADO et al., 2007; CABAÑES et al., 2007, 2010).

O gênero *Malassezia* é composto por leveduras lipofílicas que fazem parte da microbiota cutânea do homem e animais. O seu isolamento a partir do meio ambiente é excepcional, pois sua sobrevivência está condicionada à presença de uma fonte lipídica, excetuando-se a espécie *Malassezia pachydermatis*, que é menos exigente no requerimento de lipídios para seu desenvolvimento (GIRÃO, 2004, PRADO et al., 2007).

Malassezia spp. lipodependente foi considerada por muitos anos como organismo não cultivável *in vitro*. Os primeiros a isolar o fungo foram Acton e Panja em 1927, que usaram o meio de Petroff glicerinado, adicionado de violeta de genciana. Seis anos depois, Ota e Huang (1933) descreveram o isolamento da levedura em meios enriquecidos com

manteiga. Posteriormente, Benham, em 1941, pôs em evidência a lipofilia do microrganismo ao adicionar diversas substâncias graxas ao meio (VARGAS et al., 2004).

Portanto, em virtude da natureza lipofílica do gênero, vários meios de cultura acrescidos com diferentes fontes lipídicas têm sido empregados. Ágar-Sabouraud suplementado com azeite de oliva estéril foi usado pela primeira vez. Gordon (1951) cultivou o agente da pitíriase versicolor em ágar-Sabouraud-glicose coberto de óleo de oliva. Na década de 90 do último século, diversos pesquisadores concluíram que os meios suplementados com leite de vaca ou bile de boi apresentaram resultados superiores ao meio com óleo de oliva na recuperação de leveduras lipodependentes do gênero, não sendo os lipídios essenciais para o crescimento de *M. pachydermatis* (VARGAS et al., 2004). Outros meios seletivos, tais como ágar-Dixon, ágar-Notman e Ushijima, foram também desenvolvidos e aplicadas com sucesso (CAFARCHIA et al., 2011).

Existe certa dificuldade para a escolha de métodos de estocagem para leveduras do gênero *Malassezia*, pois, embora o método de Castellani seja um dos mais eficientes e utilizados para a maioria dos fungos, não é eficaz para leveduras do gênero *Malassezia* spp. Dados da literatura sugerem que, para tais fungos lipofílicos, o método mais adequado é o congelamento a -80 °C, imediatamente após o primeiro isolamento, sendo adicionado glicerol como agente crioprotetor (CRESPO et al., 2000).

Dessa forma, a preservação de leveduras do gênero *Malassezia*, principalmente as espécies dependentes de fonte de lipídio, constitui grande desafio, especialmente em razão do desequilíbrio na homeostase resultante das condições de conservação (CRESPO et al., 2000). Girão et al (2004), avaliando diversos métodos de conservação, observaram a continuidade da propriedade de não lipodependência das cepas de *M. pachydermatis* e evidenciaram que mais de 78,8 e 66,7% das cepas, após seis e nove meses de estoque, respectivamente, conseguiram manter sua característica de crescer em meio sem adição de lipídios (CRESPO et al., 2000).

Morfologicamente, as leveduras do gênero *Malassezia* variam de 1,5 a 10 µm de tamanho e apresentam geralmente formato unipolar e ovóide. Diferente de outras *Malassezia* spp., as células de *M. globosa* normalmente são esféricas, com brotamentos emergindo de uma base estreita (CAFARCHIA et al., 2011).

Espécies de *Malassezia* colonizam a pele e podem causar pitíriase versicolor (especialmente por *M. globosa*) e outras doenças dermatológicas em imunocompetentes, assim como infecções fúngicas relacionadas a neonatos, pacientes pediátricos e

imunodeprimidos (especialmente *M. furfur*). A partir dos anos 80, as leveduras do gênero *Malassezia* destacaram-se, principalmente na Medicina humana, em decorrência das formas recidivantes de dermatite seborréicas ou de foliculites em indivíduos. A distribuição de novos casos é esporádica ou está associada a surtos nosocomiais em pacientes em unidade de terapia intensiva, especialmente em contexto pediátrico. Esses organismos, no entanto, são menos virulentos do que outros patógenos fúngicos. (SANTOS et al., 2008; MICELI et al., 2011). Na Medicina veterinária, causam principalmente as otites externas nos carnívoros domésticos, além de relatos em animais silvestres (CRESPO et al., 2002; SANTOS et al., 2008).

Os métodos bioquímicos e fisiológicos disponíveis para identificação de espécies de *Malassezia* (Tabela 1) baseiam-se em perfis de crescimento em meios de cultura, enriquecidos ou não com fonte de lipídio, crescimento em temperatura de 37 °C e 40 °C, assimilação de diferentes tweens e PEG-35 óleo castor (Cremophor EL, Sigma), avaliação da atividade das enzimas catalase, urease e *b*-glucosidase ou teste da esculina (CAFARCHIA et al., 2011).

Os testes fenotípicos para a identificação das espécies de *Malassezia* demandam tempo e seus resultados são subjetivos ou inconclusivos. Além disso, são incapazes de diferenciar as espécies *M. dermatis*, *M. nana*, *M. japonica*, *M. yamatoensis*, bem como as espécies *M. caprae* e *M. equina*, identificadas em 2007 (MIRHEND et al., 2005).

Tabela 1-Características fisiológicas e bioquímicas de espécies de *Malassezia* (adaptado de Cafarchia et al., 2011).

Espécies	Perfil de Crescimento				Assimilação de tween (T) e Cremophor EL					Atividade enzimática		
	Ágar-Sabouraud simples	Ágar-Dixon			T20	T40	T60	T80	Cremophor EL	Catalase	Urease	b-glicosidase (Esculina)
	32 °C	32 °C	37 °C	40 °C								
<i>M. pachydermatis</i>	+	+	+	+	+/-	+	+	(±)	-	+/-	+	+/-
<i>M. furfur</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>M. sympodialis</i>	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
<i>M.globosa</i>	-	+	(±)	(±)	-	-	-	-	-	+	+	-
<i>M. obtusa</i>	-	+	(±)	(±)	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>M. restricta</i>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>M. slooffiae</i>	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-
<i>M. dermatis</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
<i>M. japonica</i>	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	?
<i>M. yamatoensis</i>	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	?
<i>M. nana</i>	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-
<i>M. caprae</i>	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>M. equina</i>	-	+	(±)	-	-	(±)	(±)	(±)	-	+	+	-
<i>M. cuniculi</i>	-	- / (±)	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+

positivo (+); negativo (-); fracamente positivo (±); variável positivo ou negativo (+/-); desconhecido (?)

Diversos trabalhos foram desenvolvidos com o objetivo de aperfeiçoar a identificação dessas leveduras. Dentre os novos métodos, está o uso de técnicas moleculares, porém, alguns desses, 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, por serem laboriosos e exigirem equipamentos de alto custo (CANTEROS et al., 2007) .

Mirhendi et al. (2005) descreveram um simples método de PCR com enzimas de restrição para a identificação e diferenciação de 11 espécies de *Malassezia* spp. 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 1,5%. Usando a enzima *CfoI*, distinguem 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. dermatis* produziram o mesmo padrão. Estas duas espécies, contudo, podem ser diferenciadas usando a enzima *BstF51*.

Dessa forma, métodos moleculares, embora possuam limitações, são empregados para a identificação dessas espécies (Tabela 2) e também para o melhor entendimento da ecologia e epidemiologia de *Malassezia* spp., assim como sua associação com doenças (CAFARCHIA et al., 2011).

Tabela 2-Técnicas moleculares para identificação e diferenciação de espécies de *Malassezia* spp. (adaptado de Cafarchia et al., 2011).

Técnica molecular	Regiões do DNA pesquisadas	Espécies de leveduras do gênero <i>Malassezia</i> estudadas
Sequenciamento direto de DNA	ITS-1	<i>M. furfur</i> , <i>M. globosa</i> , <i>M. restricta</i> , <i>M. sympodialis</i> , <i>M. pachydermatis</i> , <i>M. slooffiae</i> , <i>M. obtusa</i> , <i>M. nana</i>
	LSU	<i>M. furfur</i> , <i>M. globosa</i> , <i>M. restricta</i> , <i>M. sympodialis</i> , <i>M. pachydermatis</i> , <i>M. slooffiae</i> , <i>M. obtusa</i> , <i>M. nana</i>
	CHS-2	<i>M. furfur</i> , <i>M. globosa</i> , <i>M. restricta</i> , <i>M. sympodialis</i> , <i>M. pachydermatis</i> , <i>M. slooffiae</i> , <i>M. obtusa</i> ,
	ITS-2 e IGS-1	<i>M. furfur</i> , <i>M. globosa</i> , <i>M. restricta</i> , <i>M. pachydermatis</i> , <i>M. japônica</i>
PCR-RFLP	ITS-1, ITS-2 e LSU	<i>M. furfur</i> , <i>M. globosa</i> , <i>M. restricta</i> , <i>M. sympodialis</i> , <i>M. pachydermatis</i> , <i>M. slooffiae</i> , <i>M. obtusa</i> , <i>M. nana</i> , <i>M. japonica</i> , <i>M. yamatoensis</i> e <i>M. dermatitis</i>
PCR-SSCP	ITS-1 e CHS-2	<i>M. globosa</i> , <i>M. sympodialis</i> , <i>M. pachydermatis</i> ,
PCR tempo real	ITS-1 e ITS-2	<i>M. globosa</i> , <i>M. restricta</i> , <i>M. sympodialis</i> , <i>M. pachydermatis</i> ,
RAPD	DNA genômico total	<i>M. furfur</i> , <i>M. globosa</i> , <i>M. restricta</i> , <i>M. sympodialis</i> , <i>M. pachydermatis</i> , <i>M. slooffiae</i> , <i>M. obtusa</i> ,
AFLP	DNA genômico total	<i>M. furfur</i> , <i>M. globosa</i> , <i>M. restricta</i> , <i>M. sympodialis</i> , <i>M. pachydermatis</i> , <i>M. slooffiae</i> , <i>M. obtusa</i> , <i>M. dermatitis</i>
DGGE	SSU	<i>M. furfur</i> , <i>M. globosa</i> , <i>M. restricta</i> , <i>M. sympodialis</i> , <i>M. pachydermatis</i> , <i>M. slooffiae</i> , <i>M. obtusa</i> ,
PFGE	DNA cromossômico	<i>M. furfur</i> , <i>M. globosa</i> , <i>M. restricta</i> , <i>M. sympodialis</i> , <i>M. pachydermatis</i> , <i>M. slooffiae</i> , <i>M. obtusa</i> ,

1.4 Zigomicetos

Dentre os diversos fungos pertencentes à classe Zigomicetos, os exemplares dos gêneros *Rhizopus* e *Mucor*, os quais são microrganismos saprófitas ubíquos, da ordem Mucorales, família Mucoraceae. Esse fungos possuem hifas hialinas largas, cujas dimensões variam de 4 a 20 micrômetros e cenocíticas. As septações são mais comumente observadas nos esporangióforos, em regiões próximas aos esporângios ou em hifas vegetativas de culturas maduras. Podem apresentar tanto a reprodução assexuada, mediante a produção de esporangiósporos, como também reprodução sexuada, caracterizada pela produção de zigosporos, após a fusão dos órgãos sexuais isogâmicos (SIDRIM e ROCHA, 2004).

A escolha do método de preservação de culturas para Zigomicetos constitui grande desafio em virtude do baixo teor de proteína celular, dando as suas hifas uma aparência vazia. Em adição, as hifas de Zigomicetos possuem poucos septos, e as ramificações podem estar dispostas em ângulos aleatórios, incluindo em ângulos retos e ângulos não agudos. Portanto, em consequência do tamanho e do baixo conteúdo protéico, as hifas de Zigomicetos estão mais vulneráveis a danos mecânicos e frequentemente entram em colapso, mostrando uma aparência de “fita trançada” observada na microscopia (NICHOLS et al., 2011). Portanto, o desenvolvimento de uma metodologia eficiente para a preservação de Zigomicetos poderia ser aplicada para outros fungos.

Os Zigomicetos são fungos termotolerantes que crescem em temperaturas que variam de 36 a 43 °C. Estão amplamente distribuídos na natureza, em substratos orgânicos, incluindo pães, frutas em decomposição, material vegetal, solo e excrementos de animais. As melhores condições ambientais para o crescimento e a esporulação dos Zigomicetos nesses substratos são observados à temperatura de 25 °C e elevada umidade (RICHARDSON, 2009).

Os *Mucorales* mostram crescimento rápido em diversos meios de cultura (ágar-Sabouraud, ágar-batata, ágar-malte), com maturação das colônias em quatro dias após incubação em temperatura de 25 °C ou 37 °C. Colônias de fungos do gênero *Rhizopus* sp. e *Mucor* sp. apresentam micélio aéreo com textura algodonosa e de coloração branca, marrom, cinza ou preta (SIDRIM e ROCHA, 2004). A maioria dos isolados são heterotáticos, assim zigosporos estão ausentes e, portanto, a identificação se baseia principalmente na morfologia dos esporângios. Isso inclui o arranjo e o número de esporangiósporos, a forma, a cor, a

presença ou ausência de columela e apófises, assim como o arranjo dos esporangióforos e a presença ou ausência de rizóides (LASS-FLORL, 2009).

As ferramentas diagnósticas que podem ser utilizadas são a cultura e exames histopatológicos, empregando diferentes colorações (Grocott-Gomori, PAS, calcofluor e hematoxilina-eosina) para visualização de hifas de Zigomicetos em espécimes clínicos (SEVERO et al., 2010); no entanto, a identificação de Zigomycetes e o diagnóstico de zigomicoses são notoriamente difíceis. Usando vários alvos moleculares e aumentando o número de sequências disponíveis de DNA em bancos de dados internacionais, estudos mostram que a identificação molecular de Zigomycetes é precisa ao nível de espécie (DANNAOUI, 2009). A região ITS pode ser usada como um destino de primeira linha molecular tanto para a identificação de Zygomycetes em cultura pura como em amostras diretamente de espécimes clínicos (ALVAREZ et al., 2009). O gene 18S ribossomal é caracterizado por uma taxa relativamente baixa de evolução molecular e, portanto, representa um marcador adequado para identificação taxonômica. Ademais, em decorrência de algumas variações particulares, esse gene tem a vantagem de ser explorado para distinguir entre os vários gêneros de fungos e espécies pertencentes à mesma ordem. Portanto, ferramentas moleculares, como o PCR-RFLP, que permitam a amplificação de parte da região 18S rDNA poderiam ser empregadas com sucesso (MACHOUART et al., 2006).

A compreensão das necessidades nutricionais dos Zigomicetos indica em quais substratos esses fungos podem ser encontrados. A glicose é a principal fonte de carbono para o crescimento. Da mesma forma como outros fungos, Zigomicetos possuem uma exigência para as proteínas e para uma variedade de substâncias orgânicas e inorgânicas. O pH de um determinado ambiente pode afetar notavelmente o crescimento e a esporulação. Outro fator que também pode afetar a qualidade do crescimento é a exposição à luz. A ampla distribuição ecológica e o rápido crescimento são importantes para o desenvolvimento de doenças (RICHARDSON, 2009).

Zigomicetos podem desenvolver processos infecciosos, principalmente nos pulmões, infecções cutâneas, gastrointestinais e rinocerebral. Os principais fatores que podem contribuir são: sistema imunológico debilitado, neutropenia, uso prolongado de corticóides, *Diabetes mellitus* mal controlado, queimadura, desnutrição. As principais portas de entrada de Zigomicetos são normalmente os pulmões, pele e trato gastrointestinal. Uma propriedade característica dos Zigomicetos é a tendência a invadir os vasos sanguíneos e causar trombose,

processo que resulta em necrose posterior dos tecidos envolvidos (MANTADAKIS E SAMONIS, 2009).

Nos Zigomicetos, a unidade de dispersão é normalmente um esporangiósporo situado dentro de um esporângio. Normalmente, um esporângio pode conter até 100.000 esporos, enquanto esporângios menores podem formar apenas algumas centenas de esporos (RICHARDSON, 2009).

O aspecto do esporângio promove importantes dicas para a diferenciação desses microrganismos. Portanto, existem esporangângio nas formas globosa, piriforme e na forma de vaso. Para os Mucorales de esporângio globoso, a diferenciação ao nível de gênero é realizada pela observação da produção e localização de rizóides e pela ramificação dos esporangióforos. Essas duas características, sozinhas, permitem distinguir *Rhizopus* spp. que produzem rizóides nodais na base do esporangióforo e a presença de esporangióforos não ramificados. *Absidia* spp. produz esporangióforo ramificada e rizóides internodais, enquanto, *Mucor* sp. produz esporangióforo ramificados e não apresenta rizóides (RIBES et al., 2000).

1.4.1 *Mucor* sp.

Esse gênero foi criado por Micheli e Saint Amans, em 1921. São fungos de crescimento rápido com maturação por volta do segundo ao quarto dia da semana, em vários meios de rotina laboratorial. Na Macromorfologia, as colônias de *Mucor* sp. mostram-se com uma textura algodonosa alta e exuberante, com tonalidade branca ou amarelada nos primeiros dias, tornando-se cinza ou castanha durante a maturação dos esporângios. O reverso da colônia geralmente é branco ou, ainda, acompanha a coloração do verso, não se observando pigmento difusível no meio (CORDEIRO et al., 2004).

Na observação microscópica de *Mucor* sp. não se constata a presença de rizóides, apófise e estolões. Os esporangióforos são derivados isoladamente do micélio e podem apresentar ou não ramificação. Cada esporangiósforo termina em uma columela discretamente bulbosa, que se estende para o esporângio esférico de parede lisa. Os esporangióporos são esféricos ou elipsóides e podem ser hialinos ou apresentar pigmentação amarela-marrom (KONEMAN, 2008). A membrana do esporângio é muito frágil, rompendo-se com facilidade, deixando após a ruptura um colarete que fica aderido à base da columela (Figura 4) (CORDEIRO et al., 2004).

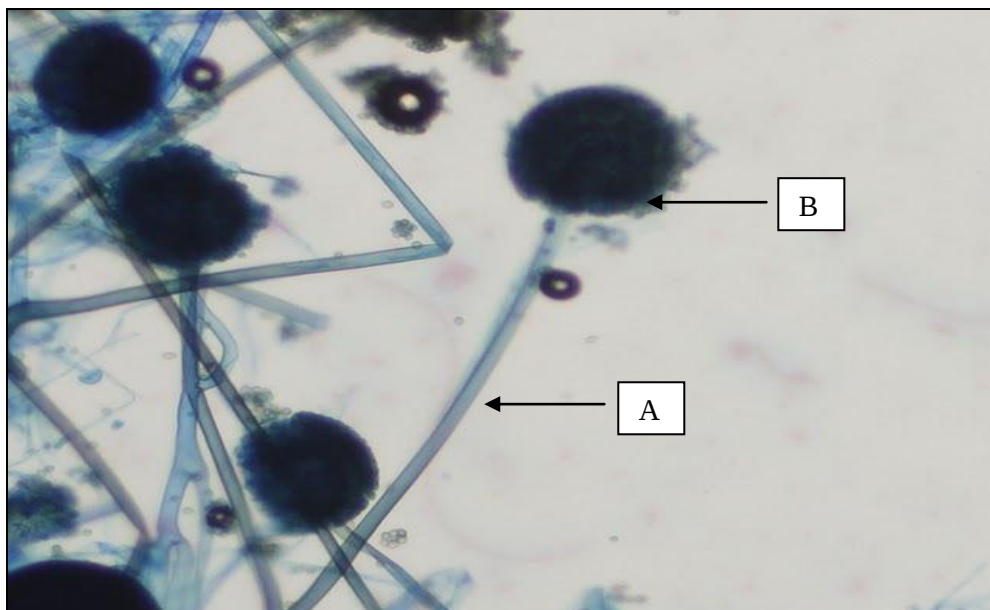


Figura 4 – Na Micromorfologia de espécie de *Mucor* sp. não se observa a presença de rizóides. (A) A seta aponta esporangióforos que são derivados isoladamente do micélio e podem apresentar ou não ramificação. (B) A seta aponta o esporângio que contém os esporangiósporos. Fonte: CEMM – 2010

1.4.2 *Rhizopus* sp.

Esse gênero foi criado por Ehrenberg em 1820. As colônias apresentam textura algodonosa de crescimento denso e tom branco, as quais ocupam, na maioria das vezes, todo o espaço do recipiente onde estão crescendo. À medida que essas colônias vão formando estruturas de frutificação, sua tonalidade muda para cinza ou amarelo-acastanhado. O reverso das colônias é branco, não apresenta pigmento difusível no meio (CORDEIRO et al., 2004).

Na análise microscópica, observa-se a produção de rizóides distintos, semelhantes a raízes, o que é fundamental para a identificação das espécies. Os rizóides, semelhantes a raízes, caracteristicamente derivados das hifas imediatamente adjacentes aos esporangióforos, são denominados nodais. O esporangióforo medindo até 1000 micrômetros terminam em uma columela côncava que se estende para o esporângio sacular. O colapso semelhante a um guarda-chuva do esporângio pós-maduro é observado, com maior frequência, como uma característica secundária nas culturas mais antigas (Figura 5) (RIBES, 2000).

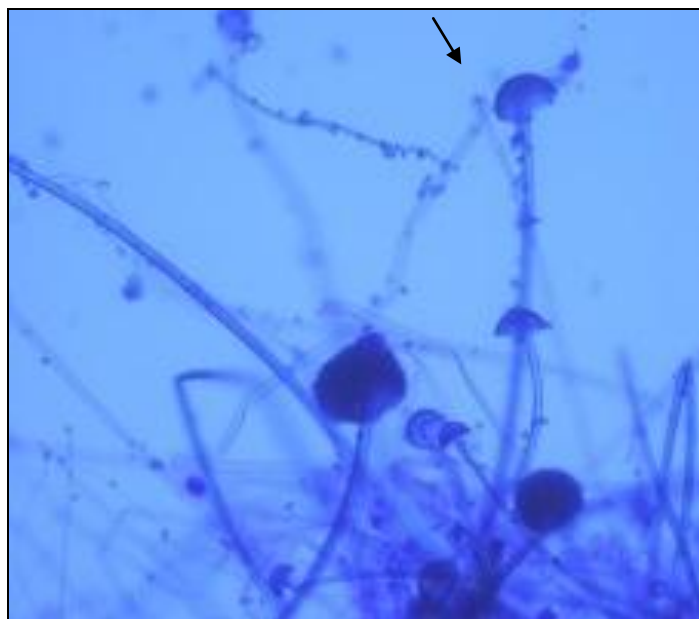


Figura 5 - Micromorfologia de *Rhizopus* sp.. A seta indica o colapso semelhante a um guarda-chuva do esporângio pós-maduro, observado com maior frequência, como uma característica secundária nas culturas mais antigas. (Fonte: CEMM 2010)

2 PERGUNTAS DE PARTIDA

2.1 A glicose e a lactose podem ser empregadas como agentes crioprotetores, mantendo as características fenotípicas de espécies dos gêneros *Malassezia*, *Mucor* e *Rhizopus* submetidas a criopreservação?

2.2 Sistemas formados por células imobilizadas em suportes de alginato de sódio favorecem a manipulação de espécies *Malassezia* spp., *Mucor* sp e *Rhizopus* sp. em estoque?

2.3 A temperatura de estocagem influencia na manutenção de *Malassezia* spp., *Mucor* sp e *Rhizopus* sp.?

3 HIPÓTESES CONSIDERADAS

3.1 Os carboidratos glicose e lactose exercem ação crioprotetora, podendo ser empregados em métodos de preservação de espécies dos gêneros *Malassezia*, *Mucor* e *Rhizopus*.

3.2 A imobilização de células em alginato de sódio facilita a manipulação de células de *Malassezia* spp., *Mucor* sp e *Rhizopus* sp em estoque.

3.3 A escolha da temperatura de estocagem adequada permite otimizar a recuperação de cepas de *Malassezia* spp., *Mucor* sp e *Rhizopus* sp submetidas a criopreservação.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Investigar o uso de lactose e glicose como agentes crioprotetores, em diferentes concentrações e temperaturas, em sistemas formados por células fúngicas imobilizadas em suportes de alginato de sódio.

4.2 Objetivos específicos

4.2.1 Realizar a revalidação fenotípica convencional para leveduras do gênero *Malassezia*.

4.2.2 Determinar, por técnica de Biologia Molecular, a identificação para os exemplares de *Malassezia* spp..

4.2.3 Realizar a revalidação fenotípica convencional para os fungos pertencentes ao grupo dos Zigomicetos exemplificados pelos gêneros *Rhizopus* sp. e *Mucor* sp..

4.2.4 Promover a imobilização de *Malassezia* spp., *Rhizopus* sp. e *Mucor* sp. em alginato de sódio.

4.2.5 Investigar o emprego de glicose e lactose nas concentrações de 9 e 23% como crioprotetores em sistemas constituídos por *Malassezia* spp., *Rhizopus* sp. e *Mucor* spp imobilizados em alginato de sódio.

4.2.6 Avaliar, após diferentes períodos, a viabilidade das cepas fúngicas imobilizadas e estocadas em temperaturas de -20 °C e -80 °C.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Microrganismos

5.1.1 Coleção de espécies fúngicas CEMM

A micoteca do 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 e em solução de cloreto de sódio 0,9% à temperatura de 25 °C. Em relação aos fungos pertencentes à classe dos Zigomicetos, a micoteca do CEMM alberga espécies pertencentes aos gêneros *Rhizopus* e *Mucor*, preservadas a -80 °C em glicerol, a -20 °C em ágar-batata, com e sem adição de glicerol, e em solução salina à temperatura de 25 °C.

5.1.2 Recuperação das cepas estocadas na micoteca do CEMM

Para a realização desta pesquisa, foram utilizadas cepas provenientes da Micoteca CEMM - UFC, sendo 12 cepas de leveduras do gênero *Malassezia* (Tabela 3) e 12 cepas de fungos do grupo dos Zigomicetos, representados pelos gêneros *Rhizopus* e *Mucor* (Tabela 4)

Para recuperação das cepas após a retirada do estoque, os exemplares do gênero *Malassezia* foram semeados para um tubo de ensaio contendo ágar-Dixon e 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. Enquanto isso, os fungos dos gêneros *Rhizopus* e *Mucor* foram semeados em ágar-batata, mantidos à temperatura de 25 °C e observados diariamente por até sete dias.

Tabela 3 – Relação das cepas de *Malassezia* spp. da Micoteca do CEMM utilizadas nesta pesquisa.

Numeração do CEMM	Cepa fúngica
CEMM 03-6-065	<i>Malassezia</i> sp.
CEMM 03-6-066	<i>Malassezia</i> sp.
CEMM 03-6-067	<i>Malassezia</i> sp.
CEMM 03-6-068	<i>Malassezia</i> sp.
CEMM 03-6-069	<i>Malassezia</i> sp.
CEMM 03-6-070	<i>Malassezia</i> sp.
CEMM 03-6-071	<i>Malassezia</i> sp.
CEMM 03-6-072	<i>Malassezia</i> sp.
CEMM 03-6-073	<i>Malassezia</i> sp.
CEMM 03-6-074	<i>Malassezia</i> sp.
CEMM 03-6-075	<i>Malassezia</i> sp.
CEMM 03-6-076	<i>Malassezia</i> sp.

Tabela 4 – Relação das cepas de Zigomicetos da Micoteca do CEMM utilizadas nesta pesquisa.

Numeração da micoteca do CEMM	Cepa fúngica
CEMM 03-1-030	<i>Rhizopus</i> sp.
CEMM 03-1-067	<i>Mucor</i> sp.
CEMM 03-2-006	<i>Rhizopus</i> sp.
CEMM 03-4-013	<i>Rhizopus</i> sp.
CEMM 03-4-027	<i>Rhizopus</i> sp.
CEMM 03-4-086	<i>Mucor</i> sp.
CEMM 03-4-087	<i>Mucor</i> sp.
CEMM 03-4-088	<i>Mucor</i> sp.
CEMM 03-4-089	<i>Mucor</i> sp.
CEMM 03-5-016	<i>Mucor</i> sp.
CEMM 03-5-025	<i>Rhizopus</i> sp.
CEMM 05-2-044	<i>Mucor</i> sp.

5.1.3 Revalidação fenotípica convencional para leveduras do gênero *Malassezia*

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

Foi realizada a fenotipagem das cepas de *Malassezia* spp. fazendo-se a 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 β -glicosidase (hidrólise da esculina), catalase e urease; assimilação do *tween* 20 (10%), *tween* 40 (0,5%), *tween* 60 (1%) *tween* 80 (0,1%) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO), e *Chremophor* EL (10%) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) em ágar-Sabouraud dextrose 2% (Himedia Laboratories, Mumbai, India) bem como a capacidade de crescer em ágar-Sabouraud simples e termotolerância a 32 °C e 37 °C.

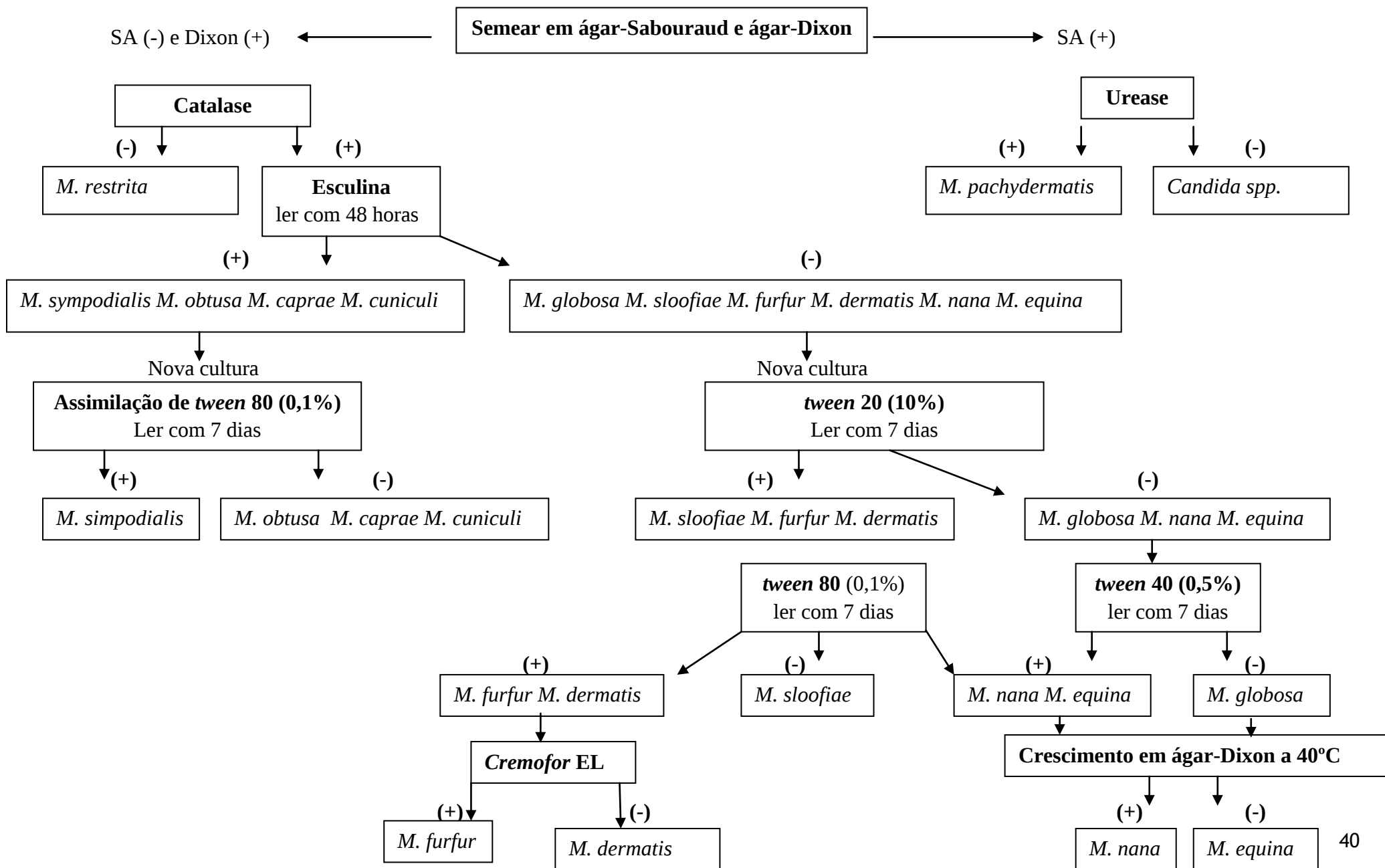
Todos os testes foram realizados com culturas de *Malassezia* spp. com quatro a cinco dias de incubação. O teste de atividade de β -glicosidase foi realizado utilizando meio-base constituído de ágar-bacteriológico (Himedia Laboratories, Mumbai, India) contendo esculina (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) e citrato férrico (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 quatro dias, a fim 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. A observação de bolhas indica uma reação positiva para a 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-ureia de Chistensen, operação seguida de incubação a 32°C por 24 horas. 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 *tween* 20 (10%), *tween* 40 (0,5%), *tween* 60 (1%) *tween* 80 (0,1%); para o *Chemophor* EL a concentração foi de 10% (v/v). Após total solubilização sob aquecimento, os meios foram autoclavados e distribuídos em tubos de ensaio e inclinados. Para o teste de crescimento em ágar-Sabouraud dextrose 2% simples, o

mesmo procedimento foi realizado, no entanto não houve suplementação de lipídios ao meio. Para realização do teste, um fragmento da colônia foi repicado aos tubos e estes incubados durante quatro dias a 32°C. Após o período de incubação, o teste foi considerado positivo quando houve crescimento de colônia. A avaliação da resistência a 37 °C foi realizada em ágar-Dixon onde porções das colônias de *Malassezia* spp. foram repicadas e incubadas nesta temperatura durante sete dias. Os testes foram considerados positivos quando houve crescimento fúngico.

Fluxograma de identificação fenotípica de leveduras do gênero *Malassezia*



5.1.4 Identificação molecular de *Malassezia* spp.

5.1.4.1 Extração de DNA de leveduras do gênero *Malassezia*

Para a extração do DNA das espécies de *Malassezia*, foi utilizado o método de esferas de vidro adaptado de Ausubel et al., 2002 e descrito como segue.

As cepas de *Malassezia* spp. foram semeadas em meio ágar-Dixon e incubadas à temperatura de 32 °C por quatro dias. Passado esse período e com o crescimento das colônias, foi adicionado ao tubo da cultura 1 mL de água destilada estéril e as colônias fúngicas foram raspadas suavemente com alça de platina, de modo a evitar que pedaços de meio de cultura fossem removidos. A suspensão de leveduras foi transferida para microtubos estéreis; centrifugadas (10000 rpm/ 5 min) e removido o sobrenadante. Adicionou-se ao microtubo 1mL de água deionizada, agitando-se no vórtex até as células se dispersarem. Foi centrifugado (12000 RPM / 5 min) e retirado cuidadosamente o sobrenadante e descartado. Esse procedimento foi repetido por três vezes para a lavagem de leveduras cultivadas em meios oleosos como *Malassezia* spp. Agitou-se no vórtex, rapidamente, e foram adicionados: 200µl do *Breaking buffer*, as esferas de vidro (cinco unid/tubo) e 200µl de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (F:C:A) com agitação no vórtex por 3 min para lisar cerca de 80% a 90% das células (o F:C:A deve ser agitado vigorosamente para homogeneização antes de ser adicionado em cada amostra). Foram acrescidos 200 µl de tampão Tris-EDTA, agitados no vórtex brevemente e centrifugados por cinco minutos. A fase aquosa foi removida para novo frasco (aproximadamente 400 µl – fase acima); após esse passo, foi vista formação de três fases. Retirada apenas a fase superior, evitando aspirar a fase opaca, que contém proteínas e restos celulares.

Para a precipitação, adicionou-se 1 ml de etanol absoluto (100%) gelado e misturado 50 vezes por inversão total; os microtubos foram armazenados em *freezer* -20 °C por período compreendido entre 18 e 20 horas. Transcorrido esse tempo, foram centrifugados por 30 minutos; desprezado o sobrenadante, cuidadosamente, foi adicionado ao pellet 1 mL etanol 70% gelado e centrifugado por cinco minutos. Foi descartado o sobrenadante e aguardou-se que este secasse à temperatura de 25 °C (os tubos permaneceram deitados em papel absorvente); o pellet foi ressuspensão em 50µl de água ultra pura, autoclavada, deixando o material eluir por 15 minutos no gelo (ou a 4 °C); e finalmente armazenado em *freezer* -20 °C até o uso.

5.1.4.2 Reação de PCR

A reação de PCR e a digestão com enzimas de restrição foi efetuada de acordo com Mirhendi et al. (2005) e Byung Ho Oh et al. (2009), com algumas adaptações. Para a reação de PCR, foram utilizados *primers* direcionados à sequência 26S rDNA. A amplificação da região-alvo foi realizada utilizando-se os *primers* *Foward* 5'–TAACAAGGATTCCCCTAGTA–3' e *Reverse* 5'–ATTACGCCAGCATCCTAAG–3'.

A amplificação do PCR foi conduzida para um volume final de 50 µl. Portanto, para cada reação, foram empregados: 1 µl de DNA molde, 0,5 µM de cada *primer*, 0,20 mM de cada desoxinucleotídio trifosfato (dNTPs), 5 µl de tampão 10X para PCR e 1,25 U de *Taq* polymerase. A desnaturação inicial foi a 94,8 °C por cinco minutos e seguido por 30 ciclos de desnaturação a 94,8 °C por 45 segundos. O anelamento foi à temperatura de 55,8 °C por 45 segundos e a extensão a 72,8 °C por 1 minuto, com uma extensão final de 72,8 °C por 7 minutos. Os produtos amplificados foram visualizados em eletroforese em gel de agarose 1,5% (peso/volume) em tampão TBE e corado com brometo de etídio (0,5 µg/ml) e fotografado sobre um transluminador UV.

5.1.4.3 Digestão do amplicon por enzimas de restrição

A escolha das enzimas de restrição foi adaptada da metodologia proposta por Mirhendi et al., (2005) e Byung Ho Oh et al., (2009). Portanto, empregaram-se as enzimas *HhaI* (*New England BioLabs*, Estados Unidos) e *BTSC I* (*New England BioLabs*, Estados Unidos) que são consideradas isoesquisômeros das respectivas enzimas *CFoI* e *BSTF51*, uma vez que reconhecem as mesmas sequências.

A reação com as enzimas de restrição foi realizada por intermédio da incubação à temperatura de 37,8 °C por três horas de uma alíquota de 21,5 µl de volume do produto de PCR com 10 U de cada enzima, separadamente, resultando em um volume final de 25 µl. Finalmente, as bandas correspondentes aos cortes enzimáticos foram visualizadas em eletroforese em gel de agarose 1,5% e os fragmentos de restrição foram analisados pelo tamanho e número em transluminador UV.

5.1.5 Revalidação fenotípica de *Mucor sp.* e *Rhizopus sp.*

A revalidação fenotípica desses microrganismos foi alcançada pela análise micromorfológica. Portanto, a diferenciação ao nível de gênero foi realizada pela observação da produção e localização de rizóides e pela ramificação dos esporangióforos. Essas características permitiram distinguir *Rhizopus* spp. que produzem rizóides nodais na base do esporangióforo não ramificados. *Mucor* spp. não produz rizóides e pode apresentar esporangióforos ramificados (RIBES et al., 2000; DE HOOG et al., 2002; KONEMAN et al., 2008).

5.2 Desenvolvimento da técnica de imobilização de células para a criopreservação de espécies fúngicas

Para realização da etapa correspondente à imobilização de células, foi empregada a metodologia proposta por Lewis e Papavizas (1985). Desse modo, realizou-se uma mistura da cultura fúngica, com 1,5 % (p/v) de alginato de sódio. Para formação das esférulas, goteja-se essa mistura em um Erlenmeyer, sob agitação, contendo solução de CaCl_2 0,25M. As esferas mantidas nessa solução por 30 minutos deverão ser filtradas e lavadas com água destilada estéril para remover o excesso de cálcio.

As esferas de alginato de sódio, após congelamento, formam agregados em razão do elevado teor hídrico. Portanto, com o intuito de alcançar a melhor adaptação da técnica, foi inicialmente avaliada a melhor maneira de se obter o descolamento das esferas entre si, sem a necessidade de descongelamento, sendo essa etapa imprescindível no momento da reconstituição das cepas, visto que a alternância do estado físico do sistema pode ocasionar lesões nas células por cristais de gelo. Dessa forma, para essa avaliação inicial, foram realizados ensaios sem o acréscimo de espécies fúngicas, apenas a produção de esferas de alginato de sódio por gotejamento em cloreto de cálcio.

Primeiramente, foi avaliada a resistência das esferas ao congelamento. Dessa forma, as esferas de alginato foram submetidas à temperatura de - 20 °C e - 80 °C e avaliadas após 15 dias. Também foram realizados ensaios para verificação de controle microbiológico, em que as esferas de alginato, antes e depois do teste de resistência ao congelamento, foram transferidas para frascos contendo caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) e ágar-Sabouraud e incubados por 24-48 horas em estufa à temperatura de 35 °C.

Em paralelo, foram realizados ensaios para promover o descolamento das esferas entre si após o congelamento. Então procedeu-se à secagem das esferas, em estufa à temperatura de 50 °C, dentro de placas de Petri sob papel filtro e em frasco Erlemeyer no interior da capela de fluxo laminar próximas à chama por período de 1 hora. Para esse mesmo propósito, separadamente, as esferas foram mergulhadas em óleo mineral, tendo sido acrescentados, ao alginato de sódio, argila, carbonato de cálcio e álcool polivinílico. Em seguida, foram armazenadas em *freezer* à temperatura de - 20 °C e - 80 °C e avaliadas após 15 dias. Finalmente, foi testado o emprego de esferas plásticas (miçangas) envolvendo todo o sistema de imobilização de alginato de sódio.

5.2.1 Criopreservação de espécies fúngicas imobilizadas em alginato de sódio e esferas plásticas

A imobilização de células fúngicas foi realizada pelo processo de gelificação iônica (LEWIS e PAPAVIDAS, 1985), com modificações referentes ao prévio congelamento do cloreto de cálcio e o acréscimo de esferas plásticas para a preservação da estrutura física do material aprisionado em seu interior. Trabalhos publicados por Soares-Junior et al. (2007) e Hamoudi et al. (2007) forneceram informações para a escolha dos agentes crioprotetores glicose e lactose, ambos nas concentrações de 9% e 23%. As cepas foram recuperadas de estoque em solução salina, mantidas à temperatura de 28 °C e cultivadas em tubos contendo ágar-batata.

A solução de cloreto de cálcio 0,25M foi previamente congelada, em tubo de vidro rosqueável (16 cm de comprimento por 150 mm de largura), a fim de constituir uma superfície de sustentação para esferas plásticas estéreis (0,7cm de diâmetro, e com orifício central de 0,4 cm), promovendo maior homogeneidade ao processo de imobilização de células à medida que descongela (Figura 6-A; 6-B).

Os exemplares do gênero *Malassezia* spp. foram semeados em ágar-Dixon e incubados a 32 °C, sendo observados diariamente por um período de até 15 dias. Em seguida, as culturas foram raspadas e transferidas para o meio formado por: alginato de sódio (1,5%) caldo Dixon (3%), glicose (9% ou 23% p/v) e lactose (9% ou 23% p/v)

As cepas de Zigomicetos foram semeadas em ágar-batata e mantidas à temperatura de 25 °C, sendo observadas diariamente por até sete dias, para a constatação do crescimento. Em seguida, as culturas foram raspadas e transferidas para o meio imobilização-

criopreservação, formado por alginato de sódio (1,5% p/v), caldo Sabouraud (3% p/v), glicose (9% ou 23% p/v) e lactose (9% ou 23% p/v).

Às estruturas fúngicas homogeneizadas em solução de imobilização-criopreservação foram acrescidas esferas plásticas que, em seguida, foram colocadas sob o cloreto de cálcio congelado (Figura 6-C). À medida que o cloreto de cálcio descongelava, entrava em contato com o alginato de sódio e promovia a gelificação e o aprisionamento das estruturas fúngicas no interior das esferas plásticas. Finalmente, cada cultura foi então fracionada em esferas plásticas e acondicionada em tubos criogênicos de 1,5mL de volume, contendo cinco esferas cada qual (Figura 6-D) e estocadas à temperatura de -20 °C e -80 °C, sendo avaliadas em 15, 45, 90, 180 e 270 dias para observação da viabilidade.

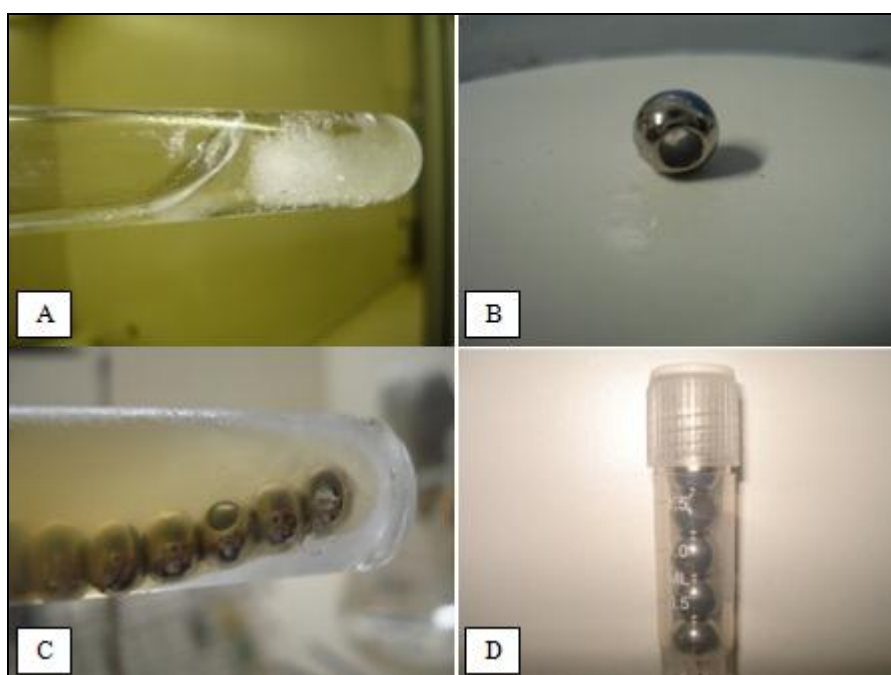


Figura 6 - (A) cloreto de cálcio previamente congelado; (B) esfera de plástico; (C) mistura das células fúngicas com solução de alginato de sódio. À medida que o cloreto de cálcio descongela, ocorre o aprisionamento das células fúngicas no interior das esferas plásticas; (D) acondicionamento em criotubos. Fonte: CEMM, 2010

6 RESULTADOS

6.1 Análise fenotípica para *Malassezia* spp.

A avaliação fenotípica destas cepas deu-se inicialmente com a caracterização macromorfológica das colônias, tendo sido observado que todos os exemplares produziram colônias com coloração amarelo-creme e textura seca (Figura 7-A). Após esta verificação, lâminas com fragmentos das colônias foram coradas pelo método de Gram, para evidenciar a morfologia dos blastoconídios. Dessa forma, foi possível visualizar células fúngicas leveduriformes ovais e/ou elípticas com brotamento unipolar com a presença de colarete (Figura 7-B).

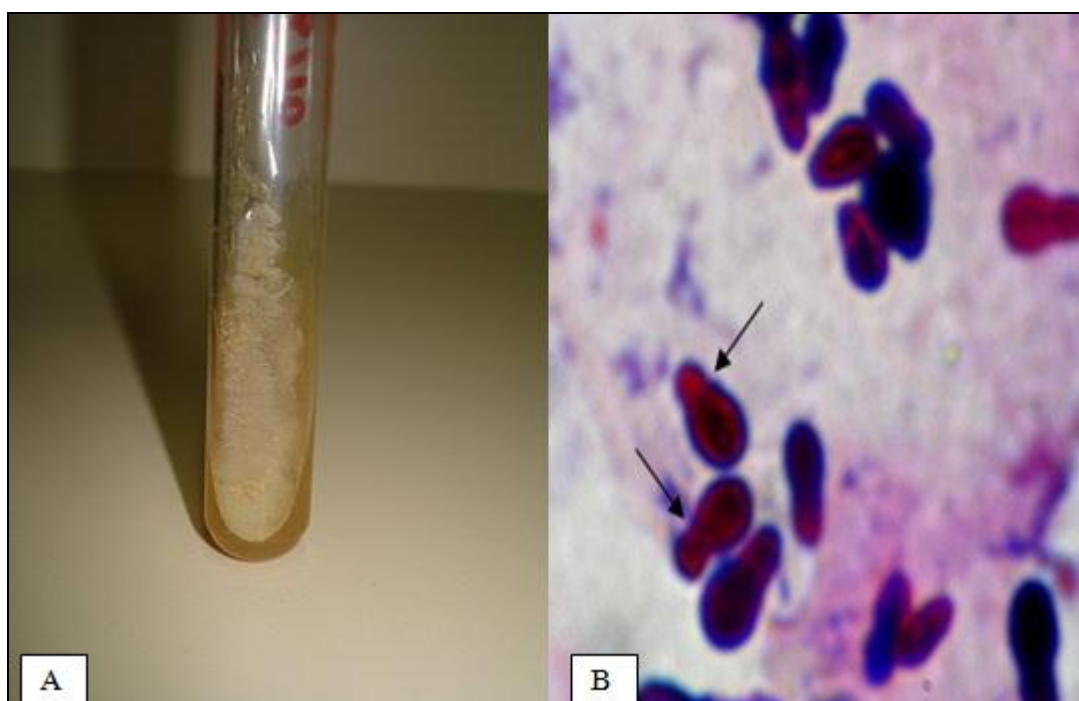


Figura 7- (A) Macromorfologia de leveduras de *Malassezia* sp. colônias com coloração amarelo-creme e textura glabrosa seca. (B) Bastoconídios de *Malassezia* sp. corados pelo método de Gram. As setas indicam o “colarete”, através do qual emergem brotamentos. Fonte: CEMM, 2009.

O primeiro teste bioquímico realizado foi o teste da catalase. Todas as cepas analisadas (n=12) foram capazes de dismutar o peróxido de hidrogênio. Das 12 cepas estudadas, nenhuma apresentou crescimento em meio ágar-Sabouraud sem suplementação lipídica. Portanto, todas as cepas trabalhadas foram lipodependentes. Para o teste de atividade

de β -glicosidase (Figura 8), apenas uma cepa foi positiva. O uso do *Cremophor* EL, como fonte lipídica, foi verificado em nove cepas (tabela 5).

Para o teste de assimilação de *tween* 20; três foram negativas, uma assimilou fracamente, enquanto oito das 12 cepas foram positivas, isto é, assimilaram este composto. Para o teste de assimilação de *tween* 40, foi observado que duas cepas não assimilaram, enquanto dez assimilaram. Uma cepa assimilou fracamente o *tween* 60, como fonte exógena de lipídios, duas cepas não assimilaram e nove cepas assimilaram. Por fim, para o teste de assimilação do *tween* 80, foi verificado que duas cepas assimilaram fracamente, duas cepas não assimilaram, enquanto oito das 12 cepas assimilaram o *tween* 80 (tabela 5).

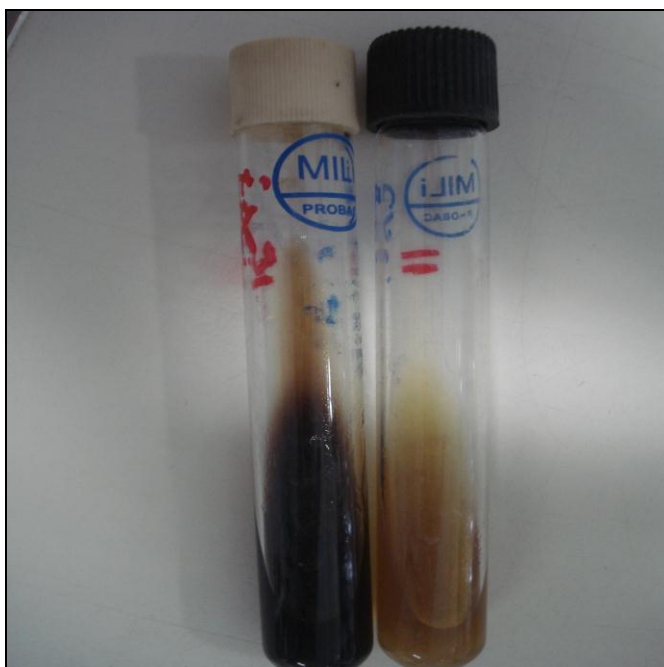


Figura 8 - Testes bioquímicos para identificação de espécies de *Malassezia* spp. Reação positiva para esculina à esquerda, pois ocorre a hidrólise da esculina em esculetina e glicose, mediante a ação da enzima β -glicosidase, que libera sais de ferro solúveis e promove o enegrecimento do meio. Reação negativa à direita. Fonte: CEMM, 2010.

Tabela 5 – Resultados dos testes fisiológicos das cepas de *Malassezia* spp

Código CEMM	Espécies	Perfil de Crescimento			Assimilação de <i>tween</i> (T) e <i>Cremophor</i> EL					Atividade enzimática			
		Ágar-Sabouraud simples	Ágar-Dixon		T20*	T40*	T60*	T80*	<i>Cremophor</i> EL	Catalase	Urease	<i>b</i> -glicosidase (Esculina)	
		32 °C	32 °C	37 °C									
CEMM 03-6-065	<i>M. furfur</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
CEMM 03-6-066	<i>M. furfur</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
CEMM 03-6-067	<i>M. sympodialis</i>	-	+	+	-	+	+	(±)	-	+	+	+	
CEMM 03-6-068	<i>M. furfur</i>	-	+	+	(±)	+	+	+	+	+	+	-	
CEMM 03-6-069	<i>M. furfur</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
CEMM 03-6-070	<i>M. furfur</i>	-	+	(±)	+	+	(±)	(±)	+	+	+	-	
CEMM 03-6-071	<i>M. furfur</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
CEMM 03-6-072	<i>M. furfur</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
CEMM 03-6-073	<i>M.globosa</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	
CEMM 03-6-074	<i>M. furfur</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
CEMM 03-6-075	<i>M.globosa</i>	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	
CEMM 03-6-076	<i>M. furfur</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	

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

6.2 Análise Molecular para *Malassezia* spp.

Os primers (Forward 5'– TAACAAGGATTCCCCTAGTA-3' e Reverse 5'– ATTACGCCAGCATCCTAAG-3') amplificaram com sucesso parte da região-alvo (26S rDNA) para todas as cepas de *Malassezia* estudadas, gerando produtos de PCR de aproximadamente 580 pb de tamanho (Figura 9).

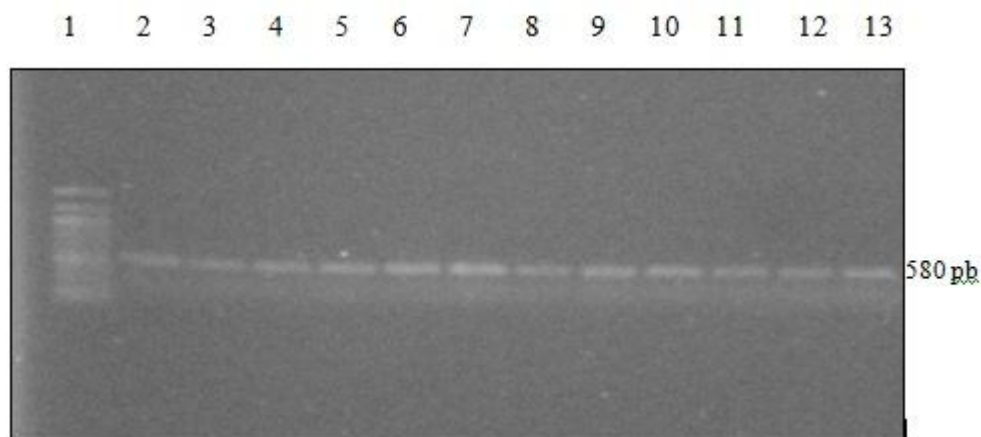


Figura 9 - Visualização da reação de PCR em eletroforese em gel de agarose 1,5% direcionado à região 26S rDNA (bandas de 1 – 13: marcador de peso molecular de 100 pb, CEMM 03-6-065, CEMM 03-6-066, CEMM 03-6-067, CEMM 03-6-068, CEMM 03-6-069, CEMM 03-6-070, CEMM 03-6-071, CEMM 03-6-072, CEMM 03-6-073, CEMM 03-6-074, CEMM 03-6-075, CEMM 03-6-076). Fonte: CEMM, 2010.

Os produtos resultantes da reação de PCR foram submetidos à digestão enzimática. Com o emprego das enzimas *HhaI* e *BTSC I*, verificou-se corte nas sequências CGC/C e GGATG (2/0), respectivamente, e dessa forma, tomando como referência Byung Ho Oh et al., (2009), que identificou espécies de *Malassezia* de acordo com o tamanho e o número de fragmentos de restrição do DNA, visualizados em eletroforese em gel de agarose 1,5%, pôde-se classificar as espécies em estudo. De tal modo, com o emprego das enzimas *HhaI* e *BTSC*, foi possível discriminar as espécies de *Malassezia* spp.

Portanto, de acordo com a restrição gerada pela enzima *HhaI*, *M. furfur* apresentou duas bandas de tamanho aproximado de 100 pb e 300 pb, sendo a espécie predominante (nove cepas), seguindo de *M. globosa*, com bandas de 100 pb e 500 pb (02 cepas) e *M. sympodialis* com bandas de 200 pb e 400 pb (01 cepa) (Figura 10).



Figura 10 - Restrição enzimática promovido pela enzima HhaI. Visualização em eletroforese em gel de agarose 1,5%. (bandas 1-13: marcador de peso molecular de 100 pb, CEMM 03-6-065, CEMM 03-6-066, CEMM 03-6-067, CEMM 03-6-068, CEMM 03-6-069, CEMM 03-6-070 CEMM 03-6-071, CEMM 03-6-072, CEMM 03-6-073, CEMM 03-6-074, CEMM 03-6-075, CEMM 03-6-076). Fonte: CEMM, 2010.

Com a restrição promovida pela enzima *BTSC I*, *M. furfur* e *M. simpodialis* apresentaram duas bandas de tamanho aproximado de 180 pb e 400 pb, e *M. globosa*, com uma banda de aproximadamente 600 pb (Figura 11).

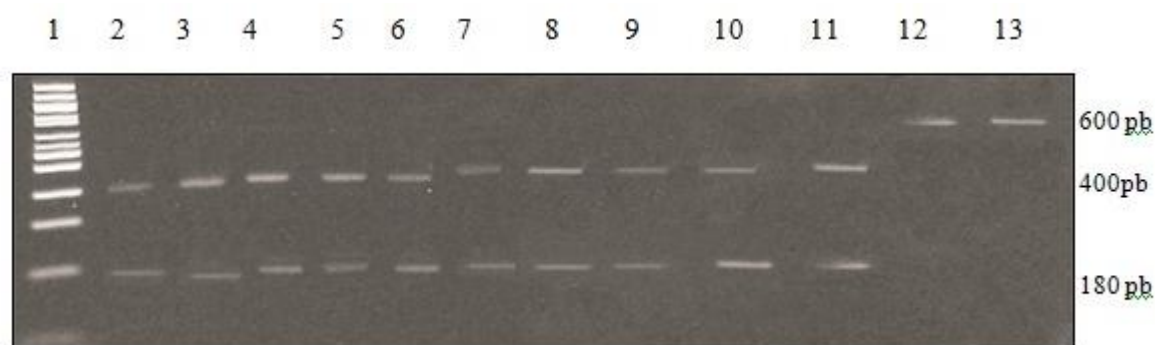


Figura 11 - Restrição enzimática promovida pela enzima BtsC I. Visualização por meio de eletroforese em gel de agarose 1,5%. (bandas 1 – 13: marcador de peso molecular de 100 pb, CEMM 03-6-065, CEMM 03-6-066, CEMM 03-6-068, CEMM 03-6-069, CEMM 03-6-070, CEMM 03-6-071, CEMM 03-6-072, CEMM 03-6-074, CEMM 03-6-076, CEMM 03-6-067, CEMM 03-6-073, CEMM 03-6-075). Fonte: CEMM, 2010.

6.3 Análise fenotípica de *Mucor* sp. e *Rhizopus* sp.

A avaliação fenotípica destas cepas deu-se inicialmente pela caracterização macromorfológica das colônias, tendo sido observado que todos os exemplares produziram colônias de crescimento rápido com coloração da colônia variando de branco a cinza e abundante produção de esporangióforos eretos. Na observação microscópica de *Mucor* sp. não se notou a presença de rizóides. Os esporangióforos são derivados isoladamente do micélio e podem apresentar ou não ramificação (Figura 12-A). Na análise microscópica de *Rhizopus* sp., evidenciou-se a produção de rizóides semelhantes a raízes, o que é fundamental para a

identificação das espécies. O esporangióforo medindo até 1000 micrômetros terminam em uma columela côncava que se estende para o esporângio sacular. O esporângio semelhante a um guarda-chuva é observado, com maior frequência, como uma característica secundária nas culturas mais antigas (Figura 12-B)

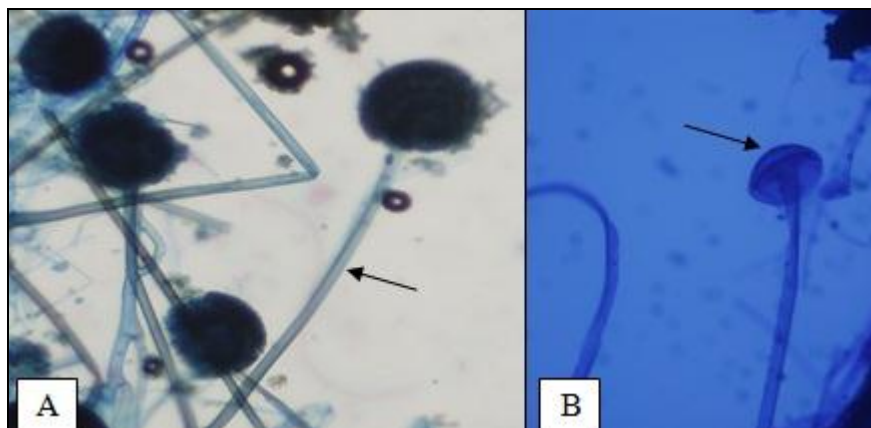


Figura 12 - (A) Na Micromorfologia de *Mucor* sp. não se observam rizóides. A seta aponta o esporangióforo que pode ou não ser ramificado. (B) Micromorfologia de *Rhizopus* sp. A seta indica o esporângio semelhante a um guardachuva, o que é característico de culturas mais antigas. Fonte: CEMM 2010

6.4 Resultados da adaptação da técnica de imobilização de células em alginato de sódio para a criopreservação de fungos

Quanto à resistência à temperatura de - 80 °C, as esferas formadas pela gelificação iônica por gotejamento de alginato de sódio em cloreto de cálcio preservaram seu formato esférico quando submetidas às temperaturas de - 20 °C e - 80 °C.

Quando as esferas de alginato de sódio foram submetidas aos procedimentos de secagem, tanto em estufa dentro de placas de Petri sob papel filtro, como também em frasco Erlemeyer no interior da capela de fluxo laminar próximo à chama, por período de uma hora, não ocorreu contaminação microbiana, no entanto, a secagem foi ineficiente e ainda ocorreu perda de volume em decorrência da desidratação (Figura 13).

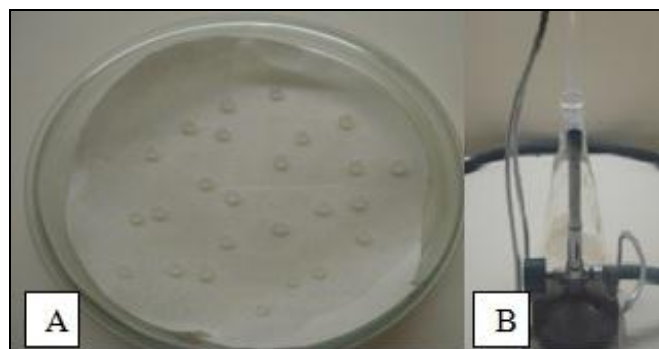


Figura 13 - (A) Secagem de esferas de alginato de sódio em placas. (B) secagem de esferas de alginato de sódio próximo à chama. Fonte: CEMM 2009

As esferas mergulhadas em óleo mineral mostraram-se ineficientes, uma vez que depois de submetidas ao congelamento em *freezer* - 80 °C, ocorreu congelamento do óleo mineral, dificultando o descolamento e ocasionando ruptura das esferas (Figura 14-A). O acréscimo de argila, carbonato de cálcio e ou álcool polivinílico não evitou a formação de aglomerados de esferas e não foi possível desprendê-las com facilidade (Figura 14-B).

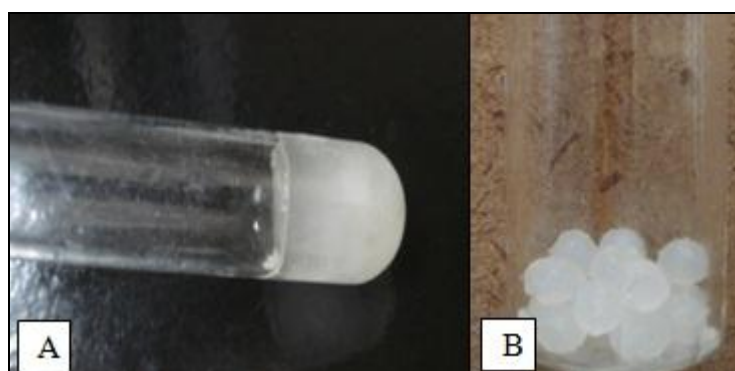


Figura 14 - (A) Congelamento do óleo mineral, dificultando a reconstituição das esferas. (B) Aglomerados de esferas de alginato de sódio. Fonte: CEMM 2009

Experimentalmente foi constatado que uso de esferas plásticas representou o método mais eficiente para abrigar as esferas de alginato de sódio, pois não foi detectada contaminação microbiana e também protegeram as esferas de alginato de sódio da formação de aglomerados congelados, evitando, assim, a ruptura no momento da reconstituição. Ademais, não houve a necessidade de aguardar o degelo das contas o que representa uma vantagem em relação a outros métodos de estocagem, pois as demais esferas não utilizadas podem ser novamente guardadas, sem haver descongelamento.

6.5 Resultados de viabilidade de cepas de *Malassezia* spp.

Empregando os carboidratos glicose e lactose em diferentes concentrações (9 e 23%), em sistemas de imobilização de células submetidos a criopreservação, constatou-se que a recuperação de cepas de *Malassezia* spp. foi detectada até o período de 90 dias, sendo que o maior número de cepas viáveis foi observado nos períodos anteriores (15 e 45 dias). Em relação à temperatura, a preservação a - 80 °C mostrou-se mais eficiente (Tabela 6).

Tabela 6 - Cepas de *Malassezia* spp. recuperadas em estoque até o período de 270 dias

Cepas	Tempo	- 20 °C		- 80 °C		- 20 °C		- 80 °C	
		Glicose		Glicose		Lactose		Lactose	
		9%	23%	9%	23%	9%	23%	9%	23%
<i>Malassezia</i> spp. (n=12)	15 dias	10	11	12	12	12	12	12	12
	45 dias	08	07	08	08	07	07	08	08
	90 dias	0	01	02	03	0	0	01	02
	180 dias	0	0	0	0	0	0	0	0
	270 dias	0	0	0	0	0	0	0	0

6.6 Resultados da viabilidade de cepas de *Mucor* sp. e *Rhizopus* sp.

Com relação às espécies de Zigomicetos, foi possível recuperar exemplares até 270 dias após a estocagem inicial, sendo observadas maior taxa de viabilidade nos tempos 15, 45, 90 e 180 dias de estocagem (Tabela 7). Também foi constatado que à temperatura de - 80 °C mostrou-se mais eficiente para a recuperação de cepas de Zigomicetos em relação à estocagem a - 20 °C (Tabela 7).

Tabela 7 - Exemplares de Zigomicetos recuperados em estoque até o período de 270 dias

Cepas	Tempo	- 20 °C		- 80 °C		- 20 °C		- 80 °C	
		Glicose		Glicose		Lactose		Lactose	
		9%	23%	9%	23%	9%	23%	9%	23%
Zigomicetos (n=12)	15 dias	08	09	11	11	09	08	10	11
	45 dias	04	06	06	09	08	06	09	10
	90 dias	04	05	06	08	06	03	05	08
	180 dias	01	01	04	08	03	01	05	08
	270 dias	0	0	04	06	01	0	05	07

A exemplo das cepas de *Malassezia* spp. os exemplares de Zigomicetos viáveis após o processo de estocagem mostraram suas características macromicromorfológicas preservadas (Figura 15).

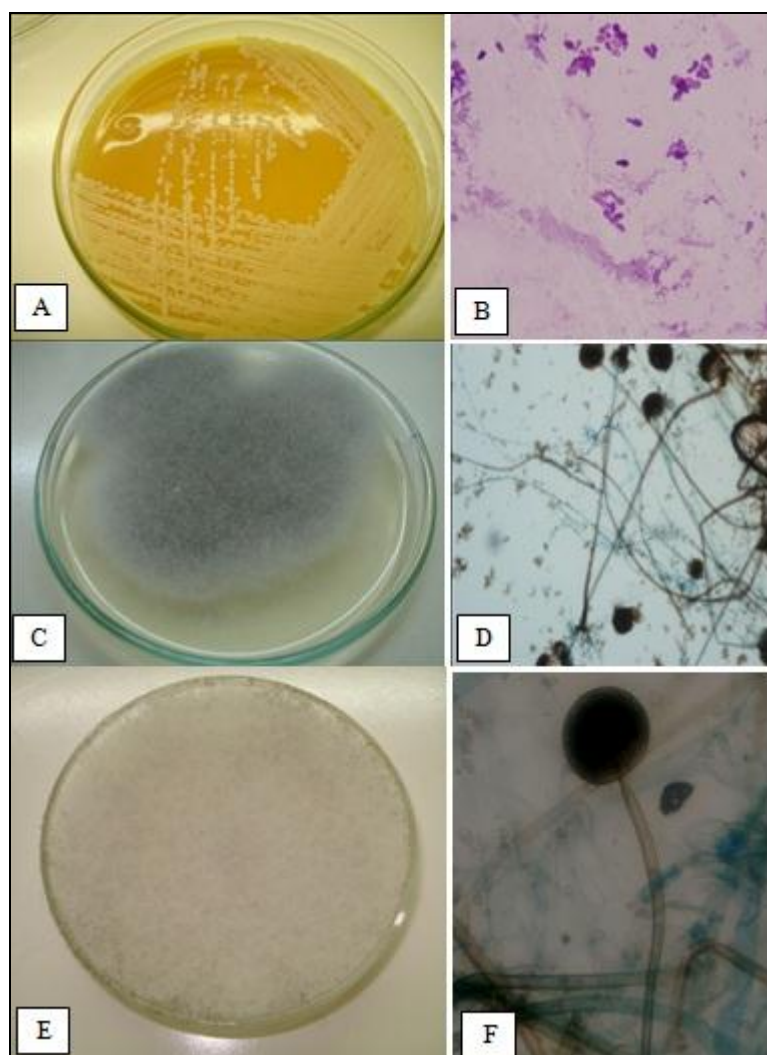


Figura 15 – Macromorfologia (A) e Micromorfologia (B) de *Malassezia* sp. após 45 dias de estoque à temperatura de - 80 °C, utilizando glicose na concentração de 23%. Macromorfologia (C) e Micromorfologia (D) de *Rhizopus* sp. após 180 dias de estoque à temperatura de - 80 °C, utilizando glicose na concentração de 23%. Macromorfologia (E) e Micromorfologia (F) de *Mucor* sp. após 180 dias de estoque à temperatura de - 80 °C, utilizando glicose na concentração de 23%. Fonte: CEMM, 2011.

7 DISCUSSÃO

Os fungos são um importante grupo de microrganismos que podem ser utilizados para a produção de alimentos, fármacos e para o controle biológico de fitopatógenos e devem ser mantidos exemplares depositados em coleções de culturas para satisfazer os requerimentos legais da conservação da biodiversidade, como também para depósitos de patentes e formação de pesquisadores (RYAN et al., 2001). Portanto, diversos métodos são empregados para conservação de fungos, apresentando, cada um deles, vantagens e desvantagens (MARIANO, 2006). Não somente a manutenção da viabilidade, mas também é importante que características, como produção de enzimas e metabólitos, estruturas reprodutivas, virulência, entre outros, não sejam perdidas, o que pode ocorrer dependendo do método de preservação aplicado (ABADIAS et al., 2001, VOYRON et al., 2009). Tais perdas justificam a tentativa de desenvolver métodos alternativos de conservação de microrganismos, especialmente para cepas industriais e de laboratórios de pesquisa. Na escolha de um método para preservação de um determinado grupo de fungos, deve ser considerada a capacidade de manutenção das características fenotípicas, genotípicas e patogênicas das cepas estocadas.

Neste trabalho, foi proposto o desenvolvimento de uma metodologia de criopreservação baseada na imobilização de células em alginato de sódio e o emprego dos carboidratos glicose e lactose como opções de agentes crioprotetores. A imobilização de células em alginato de sódio consiste em método alternativo ainda pouco explorado para a estocagem de microrganismos e, embora seja muito utilizado para a criopreservação de material vegetal, pode ser adaptado para sistemas fúngicos. As células aprisionadas em matrizes esféricas de alginato de sódio são mais fáceis de manusear durante a preservação, estocagem e reconstituição das cepas, em razão do fracionamento da cultura, e também permitem um adequado controle da desidratação que pode reduzir a formação de cristais de gelo durante o congelamento (RYAN, 2001). Para o sucesso de um processo de criopreservação, também é necessário o uso de substâncias crioprotetoras. Os carboidratos são exemplos de crioprotetores, pois promovem a vitrificação que protege a célula durante o congelamento, tornam a membrana celular mais plástica, reduzem a excessiva desidratação, diminuem a toxicidade por sais e evitam a formação de cristais de gelo (HUBALEK, 2003).

Os microrganismos selecionados para esta pesquisa pertencem aos gêneros *Malassezia*, *Rhizopus* e *Mucor*, pois já é conhecida a dificuldade desses microrganismos de permanecerem viáveis nos mais diversos métodos de preservação (CRESPO et al., 2000;

SCHLOTTFELDT et al., 2002; RICHARDSON et al., 2009). Assim, o emprego de sistemas que permitam a conservação de microrganismos de baixa viabilidade constitui o passo inicial para o desenvolvimento de protocolos de estocagem mais eficientes para os demais grupos.

Desde um trabalho publicado por Guého, Midgley e Guillot (1996), onde se fundamentam as bases para a reclassificação das espécies de *Malassezia*, mediante testes bioquímicos e moleculares, o gênero *Malassezia* passou por várias mudanças taxonômicas. Considerando a classificação atual, o gênero *Malassezia* alberga 14 espécies: *M. pachydermatis*, *M. furfur*, *M. sympodialis*, *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. restricta*, *M. slooffiae*, *M. dermatis*, *M. yamatoensis*, *M. japonica*, *M. nana*, *M. caprae* e *M. equina* e *M. cuniculi* (SUGITA et al., 2002, 2003, 2004; HIRAI et al., 2004; CABAÑES et al., 2007, 2010). A importância na diferenciação das espécies de *Malassezia* não reside apenas no fato da identificação por si só, mas, sim, na possibilidade da existência de possíveis diferenças, ainda não determinadas, na sua patogenicidade e no comportamento a ante os diversos métodos de estocagem (CRESCO et al., 2000; SCHLOTTFELDT et al., 2002). Já é descrita variação na frequência e intensidade das lesões, além de diferenças na sua sensibilidade *in vitro* a vários antifúngicos (GUPTA et al., 2000). Assim, pesquisas que abranjam as particularidades destas leveduras são de suma importância para melhor entender o gênero *Malassezia*.

Neste estudo, foram empregadas 12 cepas da micoteca do CEMM. Nenhuma cepa foi capaz de crescer em ágar-Sabouraud sem suplementação lipídica, portanto, todas as cepas trabalhadas eram lipodependentes. Dentre os testes fenotípicos utilizados para a identificação, inclui-se o teste de atividade da enzima catalase. Esta enzima faz parte de um grupo que reduz os efeitos tóxicos de espécies reativas do oxigênio. Espécies reativas de oxigênio são produzidas em células do sistema imunológico do hospedeiro, como os leucócitos, neutrófilos e macrófagos, cuja função é promover a lise dos microrganismos fagocitados (ABBAS, LICHTMAN, 2005). Todas as cepas estudadas tiveram atividade de catalase positiva, de modo que se verificou que nenhuma destas pertencia à espécie *M. restricta*, única espécie do gênero *Malassezia* que não produz catalase (CARBAÑES et al., 2007). Outro aspecto fenotípico observado foi a capacidade de hidrolisar a ureia, por meio da enzima urease (GUÉHO, MIDGLEY, GUILLOT, 1996), no entanto, a atividade desta enzima pode ser modificada pelo período e condições de manutenção do microorganismo (GIRÃO et al., 2004).

Apenas uma cepa (n=12) (CEMM 03-6-067) foi capaz de produzir β -glicosidase e hidrolisar a esculina. Alguns autores, no entanto, divergem sobre as espécies que são capazes de produzir esta enzima, além do fato de que, entre isolados da mesma espécie, pode ocorrer ou não a produção de β -glicosidase (KANEKO et al., 2006, CABAÑES et al., 2007, CAFARCHIA et al., 2011).

Além de critérios que avaliam a atividade enzimática, a identificação primária de *Malassezia* spp passa pela capacidade de assimilação de diferentes tweens e *cremophor* EL. O *tween* é um surfactante não iônico, pouco tóxico para as membranas biológicas, constituído por ésteres de ácidos graxos de polioxietileno sorbitol. A diferença 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 (AYORINDE et al., 2000). *Cremophor* EL é um polietoxetileno, emulsificante não iônico obtido pela reação de óxido de etileno e do óleo de mamona, produzindo uma mistura de ácido ricinoléico, glicerol e seus éteres (MAYSER et al., 1997).

Nesta pesquisa, foi detectada a presença de duas espécies (CEMM 03-6-073, CEMM 03-6-073) que não utilizaram tweens como fonte lipídica. Pelo fato de que todos os exemplares trabalhados assimilaram pelo menos três dos quatro tweens, sugere-se que esses exemplares sejam de *M. globosa* (CABAÑES et al., 2007); no entanto, é sabido que há grande dificuldade de recuperação destas espécies *in vitro*, principalmente pós-estocagem (CRESPO et al., 2000). A única cepa que foi capaz de produzir β -glicosidase (CEMM 03-6-067) não cresceu em meio ágar-Sabouraud acrescido de *cremophor* EL, assimilou tweens 40, 60 e fracamente o *tween* 80, características sugestivas de *M. sympodialis*.

Foi observado que nove (CEMM 03-6-065, CEMM 03-6-066, CEMM 03-6-068, CEMM 03-6-069, CEMM 03-6-070, CEMM 03-6-071, CEMM 03-6-072, CEMM 03-6-074, CEMM 03-6-076) cepas de 12 foram capazes de crescer em meio ágar-Sabouraud acrescido de *cremophor* EL. As espécies de *M. furfur* são capazes de assimilar o *cremophor* EL e constitui em importante característica discriminatória (KANEKO et al., 2006, CAFARCHIA et al., 2011). Essas nove cepas também assimilaram os tweens 20, 40, 60 e 80, porém uma exemplar (CEMM 03-6-068) apresentou pouco crescimento em meio suplementado com *tween* 20 e 01 cepa (CEMM 03-6-070) não apresentou crescimento satisfatório em meios com tweens 60 e 80. Assim, pode-se sugerir que estes exemplares pertenceriam às espécies *M. furfur* ou *M. dermatis*

A termotolerância a 40 °C foi não foi uma característica fenotípica testada, pois os dados obtidos neste teste eram inconclusivos, de modo que não foi incluída nas identificações deste estudo, pois, como verificado por Canteros et al. (2007), esta característica é variável, pois estes autores verificaram que cepas de *M. furfur* não se desenvolvem 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).

É possível que haja discrepâncias entre métodos moleculares e técnicas baseadas em ensaios bioquímicos e fisiológicos, portanto, ferramentas moleculares são desenvolvidas para o aperfeiçoamento da identificação, o melhor entendimento da epidemiologia e ecologia das espécies de *Malassezia* spp., assim como sua associação com doenças (CAFARCHIA et al., 2011).

Para confirmar a identificação fenotípica, foi empregada a técnica de PCR, que amplificou com sucesso parte da região alvo (26S rDNA) para todas as cepas de *Malassezia* estudadas, gerando produtos de PCR de aproximadamente 580 pb de tamanho, como também verificado por Mirhend et al (2005). Para a restrição enzimática, primeiramente, utilizou-se a enzima *HhaI*, obtendo-se nove cepas com duas bandas de tamanho aproximado de 100 pb e 300 pb sendo a espécie predominante (*M. furfur*), seguindo-se de duas cepas com bandas de 100 pb e 500 pb (*M. globosa*) e uma cepa com bandas de 200 pb e 400 pb (*M. sympodialis*), resultado também obtido por Byung Ho Oh et al (2009). Com a restrição efetuada pela enzima *BstC I*, *M. furfur* e *M. sympodialis* apresentaram duas bandas de tamanho aproximado de 180 pb e 400 pb e *M. globosa* com uma banda de aproximadamente 600 pb, resultado semelhante; para essas espécies também foi observado por Byung Ho Oh et al (2009). Portanto, o emprego de procedimentos genéticos combinados com testes fenotípicos mostrou-se ser o mais adequado para definir as espécies de *Malassezia* spp. em estudo. Isto é confirmado por Canteros et al. (2007), que obteve para as espécies de leveduras do gênero *Malassezia* mais frequentemente envolvidas em patologia humana como *M. sympodialis*, *M. furfur* e *M. globosa*, a concordância entre testes fenotípicos e moleculares entre 84-96%, indicando que estudos baseados na bioquímica e fisiologia desses microrganismos são úteis para a identificação presuntiva destes membros do gênero em laboratórios que não possuem acesso à tecnologia molecular. Neste estudo de revalidação de cepas de *Malassezia* spp., ficou revelado que, das 12 amostras analisadas, nove pertenciam à espécie *M. furfur*, diferente do resultado encontrado por Crespo et al. (2000), que identificaram 97% de *M. globosa* em amostras clínicas. Resultado diferente também foi encontrado por Kindo et al. (2004), em que

as espécies mais prevalentes encontradas foram *M. sympodialis* (58,33%), *M. globosa* (39,58%) e *M. restricta* (2,08%).

Em virtude da evolução taxonômica do gênero *Malassezia* e a da baixa viabilidade *in vitro*, alguns pesquisadores tentaram melhorar a preservação destas leveduras em coleções (CRESPO et al., 2000; GIRÃO et al., 2004). As técnicas que apresentam resultados mais promissores, todavia, são pouco acessíveis aos laboratórios de Micologia, como a liofilização ou criopreservação em nitrogênio líquido. Estes dados indicam que este gênero possui deficiências, que se tornam pertinentes para o estudo de técnicas conservativas eficazes para este grupo fúngico.

No experimento sob relatório, das doze cepas de espécies de *Malassezia* spp (nove *M. furfur*, duas *M. globosa*, uma *M. sympodialis*) imobilizadas em alginato de sódio submetidas ao congelamento à temperatura de - 20 °C e - 80 °C, empregando glicose e lactose, foi detectada viabilidade até 90 dias de estocagem e, embora isto não seja estatisticamente significativo, em razão do reduzido número de cepas avaliadas, o melhor resultado foi alcançado utilizando glicose na concentração de 23% (três cepas) à temperatura de -80 °C. Corroborando Crespo et al (2000), que apontam a dificuldade de preservação do gênero *Malassezia* em micoteca, neste estudo, foi possível recuperar número significativo de cepas somente até 45 dias de estoque. Isto pode estar relacionado com a dificuldade de promover suspensões homogêneas de leveduras lipodependentes (CRESPO et al.,2000). Ademais, nesta pesquisa, foi observado experimentalmente o fato de que a viscosidade do meio de imobilização – criopreservação não contribuiu para uma distribuição uniforme de células aprisionadas em esferas plásticas.

De fato, a taxa de recuperação obtida para as espécies de *Malassezia* spp. foi inferior em relação a outras técnicas testadas. Girão et al. (2004), em estudo, para investigar a manutenção das cepas de *M. pachydermatis*, testaram diferentes condições de estoque, como salina com óleo mineral a 28 °C, bem como em ágar-Dixon, ágar-Dixon acrescido de glicerol e ágar-Dixon acrescido de DMSO a - 20 °C, e 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 durante 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, isto sendo provavelmente decorrente

da capacidade de prevenir a evaporação da água e diminuir a atividade metabólica do fungo estocado; e evidenciaram que melhores resultados foram alcançados para *M. pachydermatis* mantidas a - 20 °C em meio ágar-Dixon acrescido de crioprotetor, pois 78,8 e 66,7% das cepas permaneceram viáveis após seis e nove meses de estoque, respectivamente.

No tocante ao gênero *Malassezia*, não foram obtidos resultados interessantes, considerando que a recuperação dessas cepas só foi possível até 90 dias de estocagem com melhores resultados obtidos nos períodos anteriores (15 e 45 dias). A dificuldade de recuperação de *Malassezia* spp. também foi relatada por Crespo et al (2000), utilizando diversos métodos de estocagem.

Para esta pesquisa foram escolhidos os gêneros *Rhizopus* e *Mucor* por serem os representantes do grupo do Zigomicetos mais comuns na micoteca do CEMM. Considerando Ribes et al. (2000), que descreveram acerca dos *Mucorales* produtores de esporângios globosos, as características mais importantes para a diferenciação ao nível de gênero são a observação de rizóides e a produção de esporangióforos, ramificadas ou não. Estas duas características, por si, permitem a distinção de *Rhizopus* sp. com base na produção de rizóides nodais e a presença de esporangióforos não ramificados. Portanto, como resultado deste ensaio, considera-se que a presença de rizóides do gênero *Rhizopus* e sua ausência do gênero *Mucor* foram as principais características morfológicas que distinguiram esses gêneros.

A identificação desses microrganismos procedeu-se segundo parâmetros morfológicos até o nível de gênero, e não foi possível chegar ao nível de espécie, em consequência da dificuldade e da possibilidade de identificação errônea desses exemplares. Essa dificuldade também foi constatada em Roden et al. (2005), que revisaram 929 casos de Zigomicoses e constataram pobre identificação até o nível de espécie. Além disso, para a maioria dos isolados, a identificação foi duvidosa. Kontoyiannis et al. (2005) compararam a identificação morfológica com molecular de 27 isolados clínicos e notaram que a identificação fenotípica apresentou erro em mais de 20% dos casos. Embora para todo trabalho científico seja de suma importância a identificação de exemplares fúngicos até o nível de espécie, porém essa pesquisa, em particular, visava a avaliar a viabilidade fúngica ante métodos de estocagem. No primeiro momento, não havia interesse em uma identificação completa, visto que a dificuldade de manter a viabilidade desses microrganismos em micoteca é comum, a princípio, a todas as espécies do mesmo gênero. Para identificação, porém, a que

espécies as cepas estudadas pertenciam, poderia ter sido feito uso de técnica de Biologia Molecular (MACHOUART et al., 2006; ALVAREZ, 2009; DANNAOUI, 2009).

Em paralelo à etapa de revalidação das cepas em estudo, foi realizada uma adaptação da técnica de imobilização em alginato de sódio, proposta por Lewis e Papavizas (1985), para a criopreservação de espécies fúngicas. Foi verificado que o gotejamento de alginato de sódio em solução de cloreto de cálcio formou esferas por gelificação iônica e após submetê-las ao congelamento, formaram agregados que dificultavam a reconstituição da cepa, invalidando o princípio de fracionamento da cultura proposto pela técnica. Dessa forma, para solucionar essa limitação, procedeu-se conforme proposto por alguns autores (LEWIS & PAPAIVIZAS, 1985; CARNEIRO & GOMES, 1997; MORETINI & MELO, 2007; PRABAKARAN & HOTI, 2008) e também de forma empírica. Para impedir a formação de agregados de alginato de sódio e obter o descolamento, sem a necessidade de descongelamento, foram testadas a secagem, o acréscimo de argila, carbonato de cálcio, álcool polivinílico, óleo mineral, não obtendo resultados satisfatórios.

Prabakaran e Hoti (2008) verificaram a excelente viabilidade e atividade larvicida da cultura liofilizada de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, quando imobilizados em alginato de sódio e preservadas à temperatura de 4 °C por período de dez anos. Isto porque as esferas de alginato apresentaram várias vantagens, como melhora na estabilidade contra condições extremas de pH, variações de temperatura e radiação ultravioleta.

Com o emprego de esferas plásticas do tipo miçangas, semelhantes a sistemas comerciais de estocagem (*microbank*), foi possível imobilizar as células fúngicas no interior de esferas plásticas, evitando a formação de agregados congelados e facilitando o manuseio dos estoques, sendo possível a observação de viabilidade, tanto para *Malassezia* spp (até 90 dias) como para *Rhizopus* spp. e *Mucor* spp (até 270 dias). Resultados semelhantes também foram observados por vários autores que utilizaram sistemas comerciais de estocagem baseados em esferas plásticas. Balkacemi et al., (1997) lograram manter viáveis cepas de *Aspergillus fumigatus* em esferas à temperatura de - 80 °C. Espinel-Ingroff et al., (2004) notaram viabilidade de 99,3% e 96,2% para leveduras e fungos filamentosos, respectivamente, preservados em sistemas de esferas plásticas à temperatura de - 70 °C. Da mesma forma, Baker e Jeffris (2006) avaliaram a viabilidade de 21 espécies de dermatófitos, e observaram que todas as 200 cepas examinadas mantiveram viabilidade quando armazenadas à temperatura de - 70 °C em diferentes períodos, que variavam de uma

semana a 24 meses. Silva et al., (2008), ao investigarem a viabilidade de leveduras conservadas à temperatura de -20 °C, utilizando contas, e glicerol como agente crioprotetor, obtiveram viabilidade de 90% após 4 anos.

Foi observado que os carboidratos glicose e lactose exercem efeito crioprotetor em culturas imobilizadas em alginato de sódio; até mesmo para as espécies de *Malassezia* spp., pois, no período de até 90 dias de estocagem uma cepa apresentou viabilidade a - 20 °C e três cepas a - 80 °C, quando foi utilizada a glicose na concentração de 23%. Resultado melhor foi obtido com *Rhizopus* sp. e *Mucor* sp., para essa mesma concentração de glicose três cepas de *Rhizopus* sp. e três cepas de *Mucor* sp. permaneceram viáveis após 270 mantidos a - 80 °C, Soares Júnior et al. (2007), utilizando glicose como agente crioprotetor nas concentrações de 9% e 12%, verificaram taxa de recuperação de 100% e 93,3%, respectivamente, em dermatófitos (*Trichophyton mentagrophytes* var. *mentagrophytes* e *M. canis*) submetidos a nove meses de estocagem a -20 °C, sem desenvolvimento de pleomorfismo das cepas dermatofíticas analisadas. **Devido ao reduzido número de cepas testadas não foi possível relacionar se o aumento da concentração de carboidratos pode melhorar a recuperação de cepas em estoque**, no entanto, Hamoudi et al. (2007), constataram que o aumento da taxa de sobrevivência de *Geotrichum candidum*, imediatamente após a liofilização, foi diretamente proporcional à concentração de dissacarídeos, visto que, na concentração de 9%, a taxa de viabilidade após a liofilização foi de menos de 20%, e quando a concentração aumentou para 23%, a taxa de recuperação ficou entre 25% e 85%.

Portanto, os carboidratos têm a habilidade de estabilizar as membranas celulares e, exercer importante função de proteção para as estruturas biológicas da desidratação provocada pelos métodos de criopreservação e liofilização (HINCHA et al., 2008). Evidências sugerem a formulação de duas hipóteses diferentes sobre o modo de ação dos carboidratos. Primeiro, sugere-se que eles sejam excelentes agentes vitrificadores e, por conseguinte, seu efeito protetor é atribuído à vitrificação das membranas celulares e das biomoléculas (KOSTER, 1991). Outra hipótese, denominada hipótese da substituição da água, propõe que estes açúcares podem substituir a água removida das biomoléculas, mantendo, dessa forma, as estruturas hidrofílicas na sua orientação hidratada e evitando perda de funcionalidade, mesmo após a desidratação (CROWE et al., 1988).

Um fato que pode interferir no resultado é a compatibilidade entre o agente protetor e a temperatura de estocagem requerida (MORGAN, 2006). Teixeira et al. (1995)

observaram que ácido ascórbico e o monossódio glutamato forneciam importante proteção a cepas bacterianas, desde que estocadas a 4 °C, todavia um efeito prejudicial foi observado a 20 °C. Os resultados obtidos apontam que a estocagem à temperatura de - 80 °C foi mais eficiente para exemplares de *Malassezia* spp. O fato é confirmado por Cespo et al. (2000), ao observarem que a viabilidade após 18 meses para todos os exemplares de *Malassezia* spp. testadas (n=24) submetidos ao congelamento a - 80 °C, enquanto as outras técnicas testadas (liofilização, estocagem em água destilada e diferentes meios de cultura a 4 °C, 25 °C e 28 °C) apresentaram taxa de recuperação de 1%.

No tocante à estocagem de *Rhizopus* sp. e *Mucor* sp., os resultados apontam que o acondicionamento à temperatura de - 80 °C foi mais eficiente do que à - 20 °C. Isto corrobora os achados de Passarell & McGinnis (1991), que obtiveram viabilidade para diversos fungos, inclusive exemplares do grupo dos Zigomicetos, estocados a - 70 °C.

Embora a quantidade de cepas analisadas não seja suficiente para uma análise estatística mais detalhada, foi observado que a taxa de sobrevivência para cepas de *Rhizopus* sp. e *Mucor* sp. foi superior àquela para as espécies de *Malassezia* spp., o que pode ser explicado pelo fato de não existir uma metodologia que atenda às necessidades de preservação para todos os microrganismos. Também foi verificado que algumas cepas dentro de cada gênero foram mais resistentes às condições de estocagem, quando avaliadas durante os períodos de 15, 45, 90, 180 e 270 dias. Esses resultados apontam que a aplicação de um protocolo de preservação ou uma de suas variantes nem sempre produz o mesmo resultado para a totalidade de isolados testados, mesmo que pertençam ao mesmo gênero ou à mesma espécie (VOYRON et al., 2009). Esses achados sugerem que a resposta a um método de preservação pode não ser apenas dependente das particularidades ou das necessidades de um determinado gênero, ou mesmo da espécie, mas pode variar em função de cada cepa em particular, o que parecendo que a resposta aos diversos métodos de preservação pode ser cepa específica. Ryan et al. (2001) reforçaram essa observação quando verificaram que a produção de metabólitos secundários foi interrompida em alguns isolados de *Metarhizium anisopliae* após criopreservação e liofilização, enquanto outras cepas da mesma espécie não foram afetadas. Borman et al. (2006) também notaram que 96% de fungos filamentosos preservados de acordo com a metodologia de Castellani se mantiveram viáveis após um período de 16 a 20 anos, e sugeriram que a viabilidade não está comprometida com o aumento do tempo, porém é influenciada pelas características de cada organismo em particular, assim como a idade do inóculo estocado inicialmente.

Por fim, esta dissertação trouxe resultados significativos para compreensão dos gêneros *Malassezia*, *Rhizopus sp.* e *Mucor sp.* em relação a sua identificação e técnicas de estocagem em micotecas. Além disso, mostrou que a técnica de imobilização de células e o uso de carboidratos podem ser empregados como ferramentas alternativas para a manutenção de microrganismos de baixa viabilidade. Considerando, porém, a dificuldade de manutenção de fungos em micotecas, conforme apresentado ao longo desse ensaio, estudos mais detalhados fazem-se necessários para o aperfeiçoamento dessa metodologia.

8 CONCLUSÃO

1 A identificação fenotípica convencional utilizada para o gênero *Malassezia*, foi capaz de distinguir as espécies *M. sympodialis*, *M. furfur* e *M. globosa* entre si. Não é, todavia, capaz de discriminar de forma conclusiva todas as espécies do referido gênero, o que torna imprescindível o uso de técnicas de Biologia Molecular.

2 A viabilidade de leveduras do gênero *Malassezia* preservadas por intermédio da técnica de imobilização em alginato de sódio mostrou-se inferior em relação a outras metodologias de estocagem.

3 A preservação de *Rhizopus sp.* e *Mucor sp.*, imobilizados em alginato de sódio com o uso de glicose e lactose na concentração de 23%, mostrou-se ser mais adequada, visto que foram recuperadas cepas até 270 dias mantidas em *freezer* à - 80 °C, sendo que os melhores resultados foram observados nos períodos anteriores.

4 Foi verificado o fato de que glicose e lactose podem ser empregadas como agentes crioprotetores na criopreservação de culturas, minimizando os danos celulares provocados pela formação de cristais de gelo.

5 A Imobilização de células em alginato de sódio, somada ao uso de esferas plásticas, pode representar uma ferramenta eficiente para a manipulação de culturas em estoque.

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.

ALVAREZ, E., SUTTON, D. A., CANO, J. A., FOTHERGILL, W., STCHIGEL, A., RINALDI, M. G., GUARRO, J. Spectrum of Zygomycete Species Identified in Clinically Significant Specimens in the United States. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 47, p. 1650–1656, 2009.

ASHWOOD-SMITH, M. J. Preservation of microorganisms by freezing, freeze-drying and desiccation, in: M.J. Ashwood-Smith, J. Farrant (Eds.), *Low Temperature Preservation in Medicine and Biology*, Pitman Medical, Tunbridge Wells, p. 219–252, 1980.

AUSUBEL, F. M. *Short Protocols in Molecular Biology: a compendium of methods from current protocols in molecular biology*. Wiley. 5th ed. 2002.

BAKER, M., JEFFRIES, P. Use of Commercially Available Cryogenic Vials for Long-Term Preservation of Dermatophyte Fungi. *Journal of Clinical Microbiology*, p. 617–618, 2006.

BARBAS, J. P., MASCARENHA, E.R.D. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell Tissue Bank*, v.10, p. 49–62, 2009.

BARCHIESI, F., COLOMBO, A. L., MCGOUGH, D. A., RINALDI, M. G. Comparative study of broth Macrodilution and Microdilution technique for In Vitro antifungal susceptibility testing of yeasts by using the National Committee for Clinical Laboratory Standard's proposed standard. *Journal Clinical Microbiology*, v. 32, p. 2494-2500, 1994.

BENITO, M. E. G., RAMÍREZ, I. C., ARANDA, L. J. M. The use of cryopreservation for germplasm conservation of vegetatively propagated crops. *Spanish Journal of Agricultural Research*, v. 2, p. 341-351, 2004.

BOFO, D. C. S., CASTRO, H. F. C., MEDEIROS, M. B. M. Comparação da eficiência de imobilização das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* CB-IX (osmotolerante) e *S. cerevisiae*, em bagaço de cana-de-açúcar. *Brazilian Journal of Food Technology*, v.5, p.121-124, 2005.

BORMAN, A. M., SZEKELY, A., CAMPBELL, C. K., JOHNSON, E. M. Evaluation of viability of pathogenic filamentous fungi after prolonged stored in sterile water and review published studies on storage methods. *Mycopathologia*, v. 161, p. 361-368, 2006.

BOUCHET, P. H., GUIGARD, J. L., MADULO-LEBLOND, G., RÉGILI, P. *Mycologie générale et médicale*. Ed. Masson, 1989.

BRAUN, S., VECHT-LIFSHITZ, S. E. Mycelial morphology and metabolite production. *Tibtech*, v. 9, p. 63-68, 1991.

BRAZ, S. C. M., MOTTA, C. M. S., MASSA, D. M. L., NEVES, R. P., MAGALHÃES, O. M. C. Viabilidade, confirmação taxonômica e detecção enzimática de espécies de *Acremonium* preservada sob óleo mineral na Coleção de culturas University Recife Mycology. *Revista da sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.42, p. 63-66, 2009.

BREIEROVÁ, E., KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A., DELGADO, R. Storage of *Candida albicans*, *Candida tropicalis* and related species in liquid nitrogen. Folia Microbiology (Praha), v.32, p.426-30, 1987.

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.

BUENO, M. C., EDWIL, GATTÁS, E. A. L. Imobilização de *Aspergillus* sp. por encapsulação em alginato de cálcio para produção de poligalacturonase Alimentação e Nutrição, v.20, p. 533-538, 2009.

BUITINK, J., VAN DEN DRIES, I. J., HOEKSTRA, F. A., ALBERDA, M., HEMMINGA, M. A. High critical temperature above T_g may contribute to the stability of biological systems. Biophys, v. 79, p. 1119-1128, 2000.

BUNSE, T., STEIGLEDER, G. K. The preservation of fungal cultures by lyophilization. Journauls Mycoses, v.34, p.173-176, 1991.

BYUNG H. O., YOUNG C. S., YANG W. L., YONG B. C., KYU J. A. Comparison of Nested PCR and RFLP for Identification and Classification of *Malassezia* Yeasts from Healthy Human Skin. Ann Dermatol v. 21, p. 352 – 357, 2009.

CABAÑES, F. J., THEELEN, B., CASTELLÁ, G., BOEKHOUT, T. Two new lipid-dependent *Malassezia* species from domestic animals. FEMS Yeast Research. v.7, p.1064-1076, 2007.

CABAÑES, F. J., VEGA, S., CASTELLÁ, G. *Malassezia cuniculi* sp. a novel yeast species isolated from rabbit skin. *Medical Mycology*, v. 49, p. 40-48, 2010.

CAFARCHIA, C., GASSER, R. B., FIGUEREDO, L.A., LATROFA, M.S. Advances in the identification of *Malassezia*. *Molecular and cellular probes*, v. 25, p. 1-7, 2011.

CALCOTT, P. H. *Freezing and Thawing Microbes*, Meadowfield Press, Durham, 1978.

CAMPOS, A. K., MOTA, M. A., ARAÚJO, J. V., CECON, P. R. Atividade predatória, crescimento radial e esporulação de fungos predadores de nematóides *Monacrosporium* spp, submetidos à criopreservação *Ciência Rural*, v. 34, 2004.

CANHOS, V.P.; UMINO, C.Y.; MANFIO, G.P. Coleções de Culturas de Microrganismos In: Allsop, D.; Colwell, R.R. & Hawksworth, D.L. (eds.). *Microbial diversity and ecosystem function*. London: CAB International. p. 439-46, 1995.

CANILHA, L., CARVALHO, W., SILVA, J. B. A. Biocatalizadores imobilizados: uso de células e enzimas imobilizadas em processos biotecnológicos *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, v. 36, p.48-57, 2006.

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.

CARNEIRO, R. M. D., GOMES, C. B., Encapsulação do fungo *Paecilomyces lilacinus* em matrizes de arginato-argila e avaliação da viabilidade dos conídios em duas temperaturas. *Nematologia brasileira*, v.21, 1997.

CARVALHO, A. H. O., SANTOS, K. N. S. S., NUNES, N. S. O. , RESENDE, D. G., REIS, Y. P. B. Verificação de atividade antimicrobiana de extratos de plantas silvestres. *Revista Eletrônica de Biologia*, v.1, p. 2-7, 2008.

CARVALHO, W., CANILHA, L., SILVA, S. S. Uso de biocatalisadores imobilizados: uma alternativa para a condução de bioprocessos. *Revista Analytica*, v. 23, p. 60-70, 2006.

CARVALHO, W., SANTOS, J. C., CANILHA, L., SILVA, S. S., PEREGO, P. CONVERTI, A. Xylitol production from sugarcane bagasse hydrolysate. Metabolic behavior of *Candida guilliermondii* cells entrapped in Ca-alginate. *Biochemical Engineering Journal*, v.25, p.25-31, 2005.

CAVALCANTE, C. S. P. Caracterização das dermatofitoses canina e felina e manutenção de cepas dermatofíticas *in vitro*. Dissertação de Mestrado em Ciências Veterinárias. Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária. Fortaleza, 2006.

CORDEIRO, R. A., BRILHANTE, R. S. N., SIDRIM, J. J. C. 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. 112-123, 2004.

COVIZZI, L. G., GIESE, E. C., GOMES, E., ROBERT, F. H. D., SILVA, R. Immobilization of microbial cells and their biotechnological applications. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*, Londrina, v.28, p. 143-160, 2007.

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

CRESPO, M. J., ABARCA, M. L., CABAÑES, F. J. Occurrence of *Malassezia* spp in the external ear canals of dogs and cats with and without otitis externa. *Medical Mycology*, v. 40, p. 115-121, 2002.

CUNHA, M. A. A., SILVA, S. S., CARVALHO, W., SANTOS, J. C. Uso de células imobilizadas em gel de PVA: uma nova estratégia para produção biotecnológica de Xilitol a partir de bagaço de cana-de-açúcar. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, v.26, v.1, p.61-70, 2005.

DANNAOUI, E. Molecular tools for identification of Zygomycetes and the diagnosis of zygomycosis. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 15, p. 66-70, 2009.

DAY J. G., MCLELLAN M. R. *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*, Humana Press, Totowa, NJ, 1995.

DE HOOG G. S., GUARRO J., GENE J., FIGUERAS M. J. *Atlas of Clinical Fungi*. Delf: Centraalbureau voor Schimmelcultures/ Universitat Rovira i Virgili 2002.

DESHMUKH, S. K . The maintenance and preservation of keratinophilic fungi and related dermatophytes. *Mycoses*, v. 46, p. 203-207, 2003.

DINIZ-MENDES, L., BERNARDES, E., ARAÚJO, P. S., PANEK A.D., PASCHOALIN, V. M. F. Preservation of frozen yeast cells by trehalose. *Biothechnol Bioengin*, v. 65, p. 572-578, 1999.

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

ESPINEL-INGROFF, A., MONTERO, D., MARTIN-MAZUELOS, E. Long-Term Preservation of Fungal Isolates in Commercially Prepared Cryogenic Microbank Vials. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 42, p. 1257–1259, 2004.

FERREIRA, S. T. S., LOPES, K. F., CUNHA, M. A. A., SILVA, S. S. Imobilização de *Candida guilliermondii* em PVA-Criogel para bioprodução de xilitol a partir de bagaço de cana-de-açúcar. In: *Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica*, VI., 2005, Campinas: Faculdade de Engenharia Química de Lorena – Departamento de Biotecnologia Lorena-SP, 2005.

GEHRIG, I., BART, H. J., ANKE, T., GERMERDONK, R. Influence of morphology and rheology on the production characteristics of the basidiomycete *Cyathus striatus*. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 59, p. 525-533, 1998.

GHÉHO, E.; MIDGLEY, G.; GUILLOT, J. The genus *Malassezia* with description of four new species. *Antonie van Leewenhock*, 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., Viabilidade de cepas de *Malassezia pachydermatis*

mantidas em diferentes métodos de conservação. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 37, p. 229-233, 2004.

GRAUMANN, P., MARAHIEL, M. Some like it cold: response of micro-organisms to cold shock. Arch. Microbiol, v. 166, p. 293– 300, 1996.

GROB, M. L. A. Parade cellulaire aux variations thermiques. La Recherche, v. 317, p. 82–86, 1999.

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

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.

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.

HAMOUDI, L., GOULET, J., RATTI, C. Effect of Protective Agents on the Viability of *Geotrichum candidum* during Freeze-Drying and Storage. Journal of Food Science, v. 72, p.45-49, 2007.

HECKLY, R. J. Preservation of microorganisms, *Advances. Applied. Microbiology*, v. 24, p.1–53, 1978.

HELLEDOORN, L., MULDER, H., VAN DENHEUVEL, J. C. OTTENGRAF, S. P. P. Intrinsic kinetic parameters of the pellet forming fungus *Aspergillus awamori*. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 58, p. 478 - 485. 1998.

HIBBETT et al., A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*, v.111, p. 509-547, 2007.

HINCHA, D. K., RENNECKE, P., OLIVER, A. E. Protection of liposomes against fusion during drying by oligosaccharides is not predicted by the calorimetric glass transition temperatures of the dry sugars. *European Biophysics Journal*, v. 37, p. 503–508, 2008.

HIRAI, A., KANO, R., MAKIMURA, K., DUARTE, E.R., HANDAM, J.S., LACHANCE, M.A., YAMAGUCHI, H., HASEGAWA, A. *Malassezia nana* sp., a novel lipid-dependent yeast species isolated from animals. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.54, p.623-627, 2004.

HUBÁLEK Z. Cryopreservation of Microorganisms at Ultra-low Temperatures, Academia, Prague, 1996.

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

JONES, P. G., INOUE, M. The cold-shock response a hot topic. *Molecular Microbiology*, v.11, p. 811–818, 1994.

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

KINDO, A. J., SOPHIA, J., ANANDA, S. Identification of *Malassezia* Species. *Indian Journal of Medical Microbiology*, v. 22, p. 179-181, 2004.

KIRSOP B. E., DOYLE A. *Maintenance of Microorganisms and Cultured Cells*, second ed., Academic Press, London, 1991.

KIRSOP B. E., SNELL J. J. S. *Maintenance of Microorganisms*, Academic Press, New York, 1984.

KONEMAN. *Diagnostic microbiológico: texto e atlas colorido* 6ª edição, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2008.

KONTOYIANNIS, D. P., LIONAKIS, M. S., LEWIS, R. E., CHAMILOS, G., HEALY, M., PEREGO, C., SAFDAR, A., KANTARJIAN, H., CHAMPLIN, R., WALSH, T. J., RAAD, I. I. Zygomycosis in a tertiary-care cancer center in the era of *aspergillus*-active antifungal therapy: a case-control observational study of 27 recent cases. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 191, p. 1350–1360, 2005.

KONTOYIANNIS, D. P., WALSH, T. J., Epidemiology and Outcome of Zygomycosis: A Review of 929 Reported Cases. *Clinical Infectious Diseases*, v. 41, p. 634–653, 2005.

KOSTER, K. L. Glass formation and desiccation tolerance in seeds. *Plant Physiology*, v.96, p.302-304, 1991.

KURY, B. A. et al., Diretrizes e estratégias para a modernização de coleções biológicas e a consolidação de sistemas integrados de informação sobre biodiversidade. Brasília Centro de Gestão e Estudos Estratégicos. Ministério da Ciência e Tecnologia, 2000.

LARONE, D. H. Medically important fungi. A guide to identification. 2nd. ed. Washington, D.C., American Society for Microbiology, 2002.

LASS-FLORL, C. Zygomycosis: conventional laboratory diagnosis *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, CMI, 15, p. 60–65, 2009.

LEWIS, J. A., PAPAIVIZAS, G. C. Characteristics of alginate pellets formulated with *Trichoderma* and *Gliocladium* and their effect on the proliferation of the fungi in soil. *Plant Pathology*, v. 34, p. 571-577, 1985.

LIU, F., NG, S. K., LU, Y., LOW, W., LAI, J., JEDD, G. Making two organelles from one: Woronin body biogenesis by peroxisomal protein sorting. *The Journal of Cell Biology*, v. 180, p. 325–339, 2008.

LOVELOCK, J. E., BISHOP, M. W. H. Prevention of freezing damage to living cells by dimethylsulphoxide. *Nature*, v. 183, p. 1394–1395, 1959.

MACHOUART, M., LARCHE, J., BURTON, K., COLLOMB, J., MAURER, P., CINTRAT, A., BIAVA, M. F., GRECIANO, S., KUIJPERS, A. F. A., CONTET-AUDONNEAU, N., DE HOOG, G. S., GERARD, A., FORTIER, B. Genetic Identification of the Main Opportunistic

Mucorales by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism. Journal of Clinical Microbiology, v. 44, p. 805-810, 2006.

MANTADAKIS, E., SAMONIS, G. Clinical presentation of zygomycosis Clinical Microbiology and Infection, v. 15, p. 15–20, 2009.

MARIANO, P.L.S. Diferentes processos de armazenamento de leveduras; estudos sobre a variabilidade fenotípica e genotípica. Doutorado em Microbiologia e Imunologi. p. 120 Piracicaba Universidade Estadual de Campinas Faculdade de Odontologia de Piracicaba em Biologia Muco Dental, 2006.

MASSUMOTO, C. M., MIZUKAMI, S., CAMPOS, M. F., SILVA, L. A. G., MENDRONE J. R., A., SAKASHITA, A., ZAMBON, E., OSTRONOFF, M., MACEDO, M. C. A., MEDEIROS, R., DORLHIAC, P., CHAMONE, D., DULLEY, F. Criopreservação de medula óssea e células pluripotentes periféricas utilizando um congelador programável: experiência em 86 congelamentos. Revista da Associação Médica. Brasileira, vol. 43, p. 93-98, 1997.

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

MAZUR, P. Cryobiology: The Freezing of Biological Systems. Science, v. 168, p. 939-949, 1970.

MICELI, M. H., DÍAZ, J.A., LEE, A.S. Emerging opportunistic yeast infections. Lancet Infection Disease, p. 142–151, 2011.

MORETINI, A.; MELO, I.S. Formulação do fungo *Coniothyrium minitans* para controle do mofo-branco causado por *Sclerotinia sclerotiorum*. Pesquisa agropecuária brasileira, v.42, p.155-161, 2007.

MORGAN, C. A., HEERMAN, N., WHITE, P.A., VESEY, G. Preservation of microorganisms by drying; a review, journal of microbiological methods, v. 66, p.183-193, 2006.

MORRIS, G. J., GOODRICH, M., ACTON, E., FONSECA, F. The high viscosity encountered during freezing in glycerol solutions: Effects on cryopreservation. Cryobiology, v. 52, p. 323 334, 2006.

NICHOLS, L., OCQUE, R. Z., DALY, I. Zygomycosis associated with HIV Infection and liver transplantation. Pathology Research Internationalt , v. 23, p. 1-4, 2011.

OZKAVUKCU, S., ERDEMIL, E. Cryopreservation: Basic Knowledge and biophysical effects. Journal of Ankara Medical School, v.24, p. 187-196, 2002.

PANOFF, J. M., THAMMAVONGS, B., LAPLACE, J. M., HARTKE A., BOUTIBONNES, P., AUFFRAY, Y. Cryotolerance and cold aptation in *Lactococcus lactis subsp. lactis* IL1403. Cryobiology, v. 32, p. 516–520, 1995.

PARK, C., LEE, B., HANA, E., LEE, J., KIMA, S. Decolorization of acid black 52 by fungal immobilization. Enzyme and Microbial Technology, v. 39, p. 371–374, 2006.

PASARELL, L., MCGINNIS, M. R. Viability of Fungal Cultures Maintained at -70°C. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 30, p. 1000-1004, 1991.

POLGE C., SMITH A. U., PARKES A. S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, v. 164, p. 666. 1949.

PRABAKARAN, G., HOTI, S. L. Immobilization in alginate as a technique for the preservation of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* for long-term. *Journal of Microbiological Methods*, v. 72, p. 91-94, 2008.

PRADO, M. R., BRILHANTE, R. S. N., SIDRIM, J. J. C., ROCHA, M. F. G. *Malassezia* spp. em humanos e pequenos animais: uma abordagem teórica. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, v. 102, p. 207-214, 2007.

RIBES, J. A., VANOVER-SAMS, C. L., BAKER, D. J. Zygomycetes in Human Disease. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 13, p. 236–301, 2000.

RICHARDSON, M. The ecology of the Zygomycetes and its impact on environmental exposure. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 15, p.2-9, 2009.

RODEN, M. M., ZAOUTIS, T. E., BUCHANAN, TENA, W. L., KNUDSEN, A., SARKISOVA, T. A., SCHAUFLE, R. L., SEIN, M., SEIN, T., CHIOU, C. C., CHU, J. H. KONTTOYIANNIS, D. P., WALSH, T. J. Epidemiology and Outcome of Zygomycosis: A Review of 929 Reported Cases. *Clinical Infectious Diseases*; v. 41, p. 634–653, 2005.

RODRIGUES, E.G., LÍRIO, V.S., LACAZ, C.S. Preservação de fungos e actinomicetos de interesse médico em água destilada. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v.34, p. 159-165, 1992.

RYAN, J. M., JEFFRIES, P., BRIDGE, P. D., SMITH, D. Developing cryopreservation protocols secure fungal gene function. Cryoletters, v. 22, p. 115-124, 2001.

SAG, Y., NOURBAKHS, M., KUTSAL, T. Comparison of Ca-alginate and immobilized *Z. ramigera* as sorbents for copper removal. Process Biochemical, v. 30, p. 175-181. 1995.

SANTOS, I. R. I. Criopreservação de germoplasma vegetal, Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, v. 20, p. 60-65, 2001.

SANTOS, M. J., OLIVEIRA P. C., TRUFEM, S. F. Morphological observations on *Absidia corymbifera* and *Absidia blakesleeana* strains preserved under mineral oil. Mycoses, v. 46, p.402-406, 2003.

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.

SEVERO, C. B., GUAZZELLI, L. S., SEVERO, L. C. Jornal Brasileiro de Pneumologia, v.36, p. 356-362, 2010.

SILVA, J. O., COSTA, P. P., CHINARELLI, S. H. Manutenção de leveduras por congelamento a – 20C. Revista Brasileira de Análises Clínicas, v. 40, p. 73-74, 2008.

SMITH D., Filamentous fungi. In: Kirsop BE, Doyle A (eds), Maintenance of Microorganisms and Cultured Cells: a Manual of Laboratory Methods, 2nd edn. Academic Press, New York, p. 133–159. 1991.

SMITH, D., ONIONS, A. H. S., The Preservation and Maintenance of Living Fungi, 2nd edn. IMI Technical Handbooks 1. CAB International, Wallingford, p. 1–120, 1994.

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

SUGITA, T., TAJIMA, M., ITO T., SAITO, M., TSUBOI, R., NISHIKAWA, A. Antifungal activities of tacrolimus and azole agents against the eleven currently accepted *Malassezia* species. Journal of Clinical Microbiology. v. 43, p. 2824-2829, 2005.

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., 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 of Clinical Microbiology. v. 41, p. 4695-4699, 2003.

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

TEIXEIRA, P.C., CASTRO, M. H., MALCATA, F. X., KIRBY, R. M. Survival of *Lactobacillus delbruckii* spp. *Bulgaricus* following spray drying. *Journal of Dairy Science*, v.78, p. 1025-1031, 1995.

THAMMAVONGS, B., PANOFF, J. M., GUEGUEN, Phenotypic adaptation to freeze–thaw stress of the yeast-like fungus *Geotrichum candidum*. *International Journal of Food Microbiology*. v. 60, p. 99–105, 2000.

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., p. 112-123, 2004.

VOYRON, S. ROUSSEL, S. MUNAUT, F. VARESE, G. C. GINEPRO, M. DECLERCK, S. FILIPELLO, MARCHISIO, V. F. Vitality and genetic fidelity of white-rot fungi mycelia following different methods of preservation. *Mycological Research*, p. 1-12, 2009.

YAKUP A.M., KAÇAR, Y. Entrapment of white-rot fungus *Trametes versicolor* in Ca-alginate beads: preparation and biosorption kinetic analysis for cadmium removal from an aqueous solution. *Bioresource Technology*, v. 80, p. 121-129. 2001.

ZHANG, L. S., WU, W. Z.; WANG, J. J. Immobilization of activated sludge using improved polyvinyl alcohol (PVA) gel. *Journal of Environmental Sciences*, v.10, p.1203-1297, 2007.

APÊNDICES

Meios de Cultura e Reagentes

Meio Dixon modificado

Objetivo: Promove o crescimento de fungos lipofílicos, especialmente leveduras do gênero *Malassezia*

Composição	Fabricante	Quantidade
Ágar extrato de Malte	Himedia	36 g
Bile Bovina dessecada	Sigma	20 g
tween 40	Sigma	10 ml
Glicerol	Sigma	2 ml
Ágar bacteriológico	Difco	12 g
Óleo de oliva puro		2 ml
Água destilada q.s.p		1000 ml

Preparo: Dissolver o extrato de malte, a bile, o ágar-Mycosel em água destilada, sob aquecimento, adicionar o tween 40, o azeite e o glicerol. Homogeneizar e ajustar o pH final para 6,0. Autoclavar, por 15 minutos, a 121 °C. Distribuir, alíquotas de 4 ml, em tubos de ensaio. Deixar solidificar na posição inclinada, de modo a obter uma superfície aproximada de 6 cm.

Ágar Sabouraud com óleo de oliva

Objetivo: promover o crescimento de fungos lipofílicos, especialmente do gênero *Malassezia*. É um bom substituto para o ágar Dixon.

Composição	Fabricante	Quantidade
Ágar sabouraud 2% de dextrose	Himedia	1000 ml
Bile bovina dessecada	Sigma	30 g
Óleo de oliva puro		1 ml

Preparo: Adicionar ao Ágar Sabouraud a bile bovina, o óleo de oliva. Homogeneizar. Autoclavar, por 15 minutos, a 121 °C. Distribuir, alíquotas de 4 ml, em tubos de ensaio. Deixar solidificar na posição inclinada, de modo a obter uma superfície aproximada de 6 cm.

Adição de diferentes concentrações e tipos de tween:

Ágar Sabouraud com 10% de tween 20

Objetivo: utilizado para diferenciação de espécies do gênero *Malassezia*, especialmente *M. furfur* e *M. sloofiae* (capazes de assimilar o tween 20 e crescer no meio), de *M. globosa* (não apresenta crescimento nesse meio).

Composição	Fabricante	Quantidade
Ágar sabouraud 2% de dextrose (desidratado)	Himedia	1000 ml
tween 20	Sigma	100 ml

Preparo: hidratar o ágar Sabouraud em água destilada sob aquecimento. Acrescentar o tween 20. Homogeneizar bem a mistura. Autoclavar, por 15 minutos, a 121 °C. distribuir em alíquotas de 3 ml, em tubos de ensaio.

Ágar Sabouraud com 0.5% de tween 40

Objetivo: Utilizado para a diferenciação de diferentes espécies de *Malassezia*, especialmente *M. sympodialis* (que assimila tween 40 e mostra crescimento) de *M. obtusa* (não apresenta crescimento no meio).

Composição	Fabricante	Quantidade
Ágar sabouraud 2% de dextrose (desidratado)	Himedia	1000 ml
tween 40	Sigma	5 ml

Preparo: hidratar o ágar Sabouraud em água destilada sob aquecimento. Acrescentar o tween 80. Homogeneizar bem a mistura. Autoclavar, por 15 minutos, a 121 °C. distribuir em alíquotas de 3 ml, em tubos de ensaio.

Ágar Sabouraud com 1% de tween 60:

Composição	Fabricante	Quantidade
Ágar sabouraud 2% de dextrose	Himedia	1000 ml
tween 60	Sigma	10 ml

Preparo: Preparar o ágar Sabouraud e acrescentar o tween 60. Homogeneizar e autoclavar, por 15 minutos, a 121 °C. Distribuir, alíquotas de 4 ml, em tubos de ensaio. Deixar solidificar na posição inclinada, de modo a obter uma superfície aproximada de 6 cm.

Ágar Sabouraud com 0,1% de tween 80:

Objetivo: Utilizado para separar *M. furfur* de *M. sloofiae*. Essa diferenciação baseia-se na constatação de que *M. sloofiae* só assimila o tween 80 em altas concentrações, sendo incapaz de fazê-lo nessa concentração de 0,1%, ao contrário de *M. furfur*, que assimila o tween 80 mesmo em pequenas concentrações.

Composição	Fabricante	Quantidade
Ágar sabouraud 2% de dextrose	Himedia	1000 ml
tween 80	Sigma	1 ml

Preparo: Preparar o ágar Sabouraud e acrescentar o tween 80. Homogeneizar e autoclavar, por 15 minutos, a 121 °C. Distribuir, alíquotas de 4 ml, em tubos de ensaio. Deixar solidificar na posição inclinada, de modo a obter uma superfície aproximada de 6 cm.

Esculina

Objetivo: utilizado para promover o diagnóstico diferencial entre várias espécies de *Malassezia* sp. a diferenciação baseia-se na capacidade de algumas espécies de hidrolizar a esculina em esculetina e glicose, através da ação da enzima β -glicosidase. Essa hidrólise é evidenciada através da liberação de sais de ferro solúveis, que são prontamente incorporados no meio, promovendo um enegrecimento do mesmo.

Composição	Fabricante	Quantidade
Esculina	Sigma	1 g
Citrato férrico	Reagen	0,5 g
Ágar bacteriológico	Difco	16 g
BHI caldo	Himedia	25 g
Água destilada q.s.p.		1000 ml

Preparo: pesar todos os componentes e dissolvê-los sob aquecimento até liquefação do ágar. Esterilizar em autoclave, por 15 minutos, a 121 °C, distribuir, alíquotas de 1,5 ml em tubos de ensaio. Deixar solidificar na posição inclinada. Acondicionar sob refrigeração, até o momento de uso

Ágar uréia de Christensen's

Objetivo: Utilizado para diferenciar as leveduras pertencentes aos filos Ascomycotina (por exemplo, Candida sp., que não hidrolisa a uréia) e Basidiomicotina (por exemplo, Malassezia sp., que hidrolisa a uréia). Esse teste baseia-se na capacidade de determinadas espécies fúngicas de produzir a enzima uréase, a qual hidrolisa a uréia, liberando amônia e alcalinizando o meio, fazendo com que a coloração do meio passe do amarelo para o rosa escuro.

Composição da Solução A	Fabricante	Quantidade
Ágar base uréia (Christensen's)	Vetec	29g
Água destilada q.s.p.		100ml

Preparo: suspender o ágar base uréia e, em água destilada, misturar até dissolver completamente. Esterilizar por filtração. Distribuir, alíquotas de 100 ml, e manter, sob refrigeração, até o momento do uso.

Composição da Solução B	Fabricante	Quantidade
Ágar bacteriológico	Himedia	15g
Água destilada q.s.p.		900 ml

Preparo: Dissolver o ágar em água destilada. Distribuir, alíquotas de 90 ml, em balões de vidro e esterilizar em autoclave, a 121 °C por 15 minutos.

Para preparar 100 ml do meio, é necessário fundir 90 ml da solução B, esperar esfriar até que a mesma atinja aproximadamente 50 °C e adicionar 10 ml da solução A. Homogeneizar bem a mistura e distribuir, alíquotas de 1 ml, em tubos de ensaio estéreis. Deixar solidificar na posição inclinada.

A leitura desse teste deve ser feita até 96 horas após semeadura, uma vez que, em longo prazo, com o esgotamento do substrato do meio, os fungos morrem e, conseqüentemente, liberam metabólitos alcalinos que promoverão a viragem da coloração do meio, inutilizando a leitura.

Preparo das soluções para extração de DNA de leveduras

1 ° - Preparo das soluções estoque

NaCl 5M

Reagente	Fabricante	Quantidade
Cloreto de sódio (NaCl)	QEEL	14,61
Água destilada		50 ml

SDS 10%

Reagente	Fabricante	Quantidade
SDS	Sigma	1,4 g
Água destilada		50 ml

EDTA 0,5M

Reagente	Fabricante	Quantidade
EDTA	Sigma	9,305 g
Água destilada		50 ml

Obs: ajustar o PH para 8,0

Tris-HCl 1M

Reagente	Fabricante	Quantidade
Tris	Merck	6,057 g
HCl	Dinâmica	2,1 ml (ajustar o pH p/ 8)
Água destilada		50 ml

1. Pesar em balança analítica, a quantidade de TRIS, EDTA, NaCl e SDS
2. Dissolver os reagentes em 50 ml de água destilada até sua completa homogeneização
3. Aferir o pH que deve ser ajustado para 8,0
4. Transferir as soluções para tubo falcon de 50 ml

2 ° Preparo do *Breaking buffer* a partir das soluções estoques

Breaking buffer

Reagente	Quantidade
Tris-HCl	0,5 ml
EDTA	0,1 ml
NaCl	1 ml
SDS 1%	5 ml
2 % Triton X-100	1 ml
Água destilada q.s.p	50 ml

Obs: o *Breaking buffer* deve ser mantido a temperatura de 25 °C

3 ° - Preparo do Tampão TE

Reagente	Quantidade
Tris-HCl 1M	500 ul
EDTA	100 ul
Água destilada q.s.p	50 ml

4° - Preparo do Fenol/Clorofórmio/Álcool isoamílico (F:Cl:AI) (24:24:1)

Reagente	Fabricante	Quantidade
Fenol	Nuclear	12,5 ml
Clorofórmio	Dinâmica	12 ml
Álcool isoamílico	Synth	0,5 ml

Reagentes para estocagem de fungos por imobilização de células

Cloreto de Cálcio 0,25M

Reagente	Fabricante	Quantidade
Cloreto de cálcio	Sigma	36,75g
Água destilada q.s.p.		1000 ml

Alginato de sódio 2%

Reagente	Fabricante	Quantidade
Alginato de sódio	Dinâmica	20 g
Água destilada q.s.p.		1000 ml

Meio de estocagem por imobilização acrescido de glicose 9%

Reagente	Fabricante	Quantidade
Alginato de sódio 2%	Dinâmica	20 g
Caldo Sabouraud	Himedia	30 g
Glicose	Himedia	90 g
Água destilada q.s.p.		1000 ml

Meio de estocagem por imobilização acrescido de glicose 9% (Para leveduras lipofílico-dependente)

Reagente	Fabricante	Quantidade
Caldo Sabouraud	Himedia	30 g
Extrato de Malte	Himedia	10 g
Bile bovina dessecada	Fluka	15 g
Alginato de sódio	Dinâmica	20 g
Glicose	Himedia	90 g
Óleo de oliva puro		2 ml
Água destilada q.s.p.		1000 ml

Meio de estocagem por imobilização acrescido de glicose 23%

Reagente	Fabricante	Quantidade
Alginato de sódio	Dinâmica	20 g
Caldo Sabouraud	Himedia	30 g
Glicose	Himedia	230 g
Água destilada q.s.p.		1000 ml

Meio de estocagem por imobilização acrescido de glicose 23% (Para leveduras lipofílico-dependente)

Reagente	Fabricante	Quantidade
Caldo Sabouraud	Himedia	30 g
Extrato de Malte	Himedia	10 g
Bile bovina dessecada	Fluka	15 g
Alginato de sódio	Dinâmica	20 g
Glicose	Himedia	230 g
Óleo de oliva puro		2 ml
Água destilada q.s.p.		1000 ml

Meio de estocagem por imobilização acrescido de lactose 9%

Reagente	Fabricante	Quantidade
Alginato de sódio	Dinâmica	20 g
Caldo Sabouraud	Himedia	30g
Lactose	Vetec	90 g
Água destilada q.s.p.		1000 ml

Meio de estocagem por imobilização acrescido de lactose 9% (Para leveduras lipofílico-dependente)

Reagente	Fabricante	Quantidade
Caldo Sabouraud	Himedia	30 g
Extrato de Malte	Himedia	10 g
Bile bovina dessecada	Fluka	15 g
Alginato de sódio	Dinâmica	20 g
Lactose	Vetec	90 g
Óleo de oliva puro		2 ml
Água destilada q.s.p.		1000 ml

Meio de estocagem por imobilização acrescido de lactose 23%

Reagente	Fabricante	Quantidade
Alginato de sódio	Dinâmica	20 g
Caldo Sabouraud	Caldo Sabouraud	30g
Lactose	Vetec	230 g
Água destilada q.s.p.		1000 ml

Meio de estocagem por imobilização acrescido de lactose 23% (Para leveduras lipofílico-dependente)

Reagente	Fabricante	Quantidade
Caldo Sabouraud	Himedia	30g
Extrato de Malte	Himedia	10g
Bile bovina dessecada	Fluka	15 g
Alginato de sódio	Dinâmica	20 g
Lactose	Vetec	230 g
Óleo de oliva puro		2 ml
Água destilada q.s.p.		1000 ml

Tabelas de resultados

		Cepas fúngicas viáveis			
		Temperatura -20 °C		Temperatura – 80 °C	
Período	Crioprotetor	<i>Rhizopus</i> sp.	<i>Mucor</i> sp.	<i>Rhizopus</i> sp.	<i>Mucor</i> sp.
15 dias	Glicose 9%	CEMM 03-2-006 CEMM 03-2-027 CEMM 03-1-030	CEMM 03-5-016 CEMM 03-1-067 CEMM 03-4-087 CEMM 03-4-088 CEMM 03-4-089	CEMM 03-2-006 CEMM 03-4-013 CEMM 03-5-025 CEMM 03-2-027 CEMM 03-1-030	CEMM 03-5-016 CEMM 03-1-067 CEMM 03-4-086 CEMM 03-4-087 CEMM 03-4-088 CEMM 03-4-089
45 dias	Glicose 9%	CEMM 03-2-006	CEMM 03-1-067 CEMM 03-4-088 CEMM 03-4-089	CEMM 03-2-006 CEMM 03-2-027	CEMM 03-5-016 CEMM 03-4-087 CEMM 03-4-088 CEMM 03-4-089
90 dias	Glicose 9%	CEMM 03-2-006	CEMM 03-1-067 CEMM 03-4-088 CEMM 03-4-089	CEMM 03-2-006 CEMM 03-2-027	CEMM 03-5-016 CEMM 03-4-087 CEMM 03-4-088 CEMM 03-4-089
180 dias	Glicose 9%	sem crescimento	CEMM 03-4-089	sem crescimento	CEMM 03-5-016 CEMM 03-4-087 CEMM 03-4-088 CEMM 03-4-089
270 dias	Glicose 9%	sem crescimento	sem crescimento	sem crescimento	CEMM 03-5-016 CEMM 03-4-087 CEMM 03-4-088 CEMM 03-4-089

		Cepas fúngicas viáveis			
		Temperatura -20 °C		Temperatura – 80 °C	
		<i>Rhizopus</i> sp.	<i>Mucor</i> sp.	<i>Rhizopus</i> sp.	<i>Mucor</i> sp.
15 dias	Glicose 23%	CEMM 03-2-006 CEMM 03-2-027	CEMM 03-5-016 CEMM 05-2-044 CEMM 03-1-067 CEMM 03-4-086 CEMM 03-4-087 CEMM 03-4-088 CEMM 03-4-089	CEMM 03-2-006 CEMM 03-4-013 CEMM 03-5-025 CEMM 03-2-027 CEMM 03-1-030	CEMM 03-5-016 CEMM 05-2-044 CEMM 03-1-067 CEMM 03-4-087 CEMM 03-4-088 CEMM 03-4-089
45 dias	Glicose 23%	CEMM 03-2-006	CEMM 03-5-016 CEMM 03-1-067 CEMM 03-4-087 CEMM 03-4-088 CEMM 03-4-089	CEMM 03-2-006 CEMM 03-4-013 CEMM 03-2-027 CEMM 03-1-030	CEMM 03-5-016 CEMM 03-1-067 CEMM 03-4-087 CEMM 03-4-088 CEMM 03-4-089
90 dias	Glicose 23%	CEMM 03-2-006	CEMM 03-5-016 CEMM 03-1-067 CEMM 03-4-088 CEMM 03-4-089	CEMM 03-2-006 CEMM 03-4-013 CEMM 03-2-027 CEMM 03-1-030	CEMM 03-5-016 CEMM 03-4-087 CEMM 03-4-088 CEMM 03-4-089
180 dias	Glicose 23%	CEMM 03-2-006	sem crescimento	CEMM 03-2-006 CEMM 03-4-013 CEMM 03-2-027 CEMM 03-1-030	CEMM 03-5-016 CEMM 03-4-087 CEMM 03-4-088 CEMM 03-4-089
270 dias	Glicose 23%	sem crescimento	sem crescimento	CEMM 03-2-006 CEMM 03-2-027 CEMM 03-1-030	CEMM 03-5-016 CEMM 03-4-087 CEMM 03-4-089

		Cepas Fúngicas Viáveis			
		Temperatura -20 °C		Temperatura – 80 °C	
		<i>Rhizopus</i> sp.	<i>Mucor</i> sp.	<i>Rhizopus</i> sp.	<i>Mucor</i> sp.
15 dias	Lactose 9%	CEMM 03-4-013 CEMM 03-2-027 CEMM 03-1-030	CEMM 03-5-016 CEMM 03-1-067 CEMM 03-4-086 CEMM 03-4-087 CEMM 03-4-088 CEMM 03-4-089	CEMM 03-4-013 CEMM 03-5-025 CEMM 03-2-027 CEMM 03-1-030	CEMM 03-5-016 CEMM 03-1-067 CEMM 03-4-086 CEMM 03-4-087 CEMM 03-4-088 CEMM 03-4-089
45 dias	Lactose 9%	CEMM 03-4-013 CEMM 03-2-027 CEMM 03-1-030	CEMM 03-1-067 CEMM 03-4-086 CEMM 03-4-087 CEMM 03-4-088 CEMM 03-4-089	CEMM 03-4-013 CEMM 03-2-027 CEMM 03-1-030	CEMM 03-5-016 CEMM 03-1-067 CEMM 03-4-086 CEMM 03-4-087 CEMM 03-4-088 CEMM 03-4-089
90 dias	Lactose 9%	CEMM 03-4-013 CEMM 03-2-027 CEMM 03-1-030	CEMM 03-4-086 CEMM 03-4-087 CEMM 03-4-088	CEMM 03-4-013 CEMM 03-2-027 CEMM 03-1-030	CEMM 03-5-016 CEMM 03-1-067
180 dias	Lactose 9%	CEMM 03-2-027 CEMM 03-1-030	CEMM 03-4-088	CEMM 03-4-013 CEMM 03-2-027 CEMM 03-1-030	CEMM 03-5-016 CEMM 03-1-067
270 dias	Lactose 9%	CEMM 03-1-030	sem crescimento	CEMM 03-4-013 CEMM 03-2-027 CEMM 03-1-030	CEMM 03-5-016 CEMM 03-1-067

		Cepas Fúngicas Viáveis			
		Temperatura -20 °C		Temperatura – 80 °C	
		<i>Rhizopus</i> sp.	<i>Mucor</i> sp.	<i>Rhizopus</i> sp.	<i>Mucor</i> sp.
15 dias	Lactose 23%	CEMM 03-2-006 CEMM 03-5-025	CEMM 03-5-016 CEMM 03-1-067 CEMM 03-4-086 CEMM 03-4-087 CEMM 03-4-088 CEMM 03-4-089	CEMM 03-2-006 CEMM 03-4-013 CEMM 03-5-025 CEMM 03-2-027 CEMM 03-1-030	CEMM 03-5-016 CEMM 03-1-067 CEMM 03-4-086 CEMM 03-4-087 CEMM 03-4-088 CEMM 03-4-089
45 dias	Lactose 23%	CEMM 03-2-006 CEMM 03-5-025	CEMM 03-1-067 CEMM 03-4-087 CEMM 03-4-088 CEMM 03-4-089	CEMM 03-2-006 CEMM 03-4-013 CEMM 03-2-027 CEMM 03-1-030	CEMM 03-5-016 CEMM 03-1-067 CEMM 03-4-086 CEMM 03-4-087 CEMM 03-4-088 CEMM 03-4-089
90 dias	Lactose 23%	CEMM 03-2-006	CEMM 03-4-087 CEMM 03-4-088	CEMM 03-2-006 CEMM 03-2-027 CEMM 03-1-030	CEMM 03-1-067 CEMM 03-4-086 CEMM 03-4-087 CEMM 03-4-088 CEMM 03-4-089
180 dias	Lactose 23%	CEMM 03-2-006	sem crescimento	CEMM 03-2-006 CEMM 03-2-027 CEMM 03-1-030	CEMM 03-1-067 CEMM 03-4-086 CEMM 03-4-087 CEMM 03-4-088 CEMM 03-4-089
270 dias	Lactose 23%	sem crescimento	sem crescimento	CEMM 03-2-006 CEMM 03-2-027 CEMM 03-1-030	CEMM 03-1-067 CEMM 03-4-086 CEMM 03-4-087 CEMM 03-4-089

		Cepas fúngicas viáveis	
		Temperatura - 20 °C	Temperatura – 80 °C
Período	Crioprotetor	<i>Malassezia</i> spp.	<i>Malassezia</i> spp.
15 dias	Glicose 9%	CEMM 03-6-065 CEMM 03-6-068 CEMM 03-6-069 CEMM 03-6-070 CEMM 03-6-071 CEMM 03-6-072 CEMM 03-6-073 CEMM 03-6-074 CEMM 03-6-075 CEMM 03-6-076	CEMM 03-6-065 CEMM 03-6-066 CEMM 03-6-067 CEMM 03-6-068 CEMM 03-6-069 CEMM 03-6-070 CEMM 03-6-071 CEMM 03-6-072 CEMM 03-6-073 CEMM 03-6-074 CEMM 03-6-075 CEMM 03-6-076
45 dias	Glicose 9%	CEMM 03-6-065 CEMM 03-6-068 CEMM 03-6-069 CEMM 03-6-070 CEMM 03-6-071 CEMM 03-6-073 CEMM 03-6-074 CEMM 03-6-076	CEMM 03-6-065 CEMM 03-6-068 CEMM 03-6-069 CEMM 03-6-070 CEMM 03-6-071 CEMM 03-6-073 CEMM 03-6-074 CEMM 03-6-076
90 dias	Glicose 9%	Sem crescimento	CEMM 03-6-069 CEMM 03-6-071

		Cepas fúngicas viáveis	
		Temperatura - 20 °C	Temperatura – 80 °C
Período	Crioprotetor	<i>Malassezia spp.</i>	<i>Malassezia spp.</i>
15 dias	Glicose 23%	CEMM 03-6-065 CEMM 03-6-067 CEMM 03-6-068 CEMM 03-6-069 CEMM 03-6-070 CEMM 03-6-071 CEMM 03-6-072 CEMM 03-6-073 CEMM 03-6-074 CEMM 03-6-075 CEMM 03-6-076	CEMM 03-6-065 CEMM 03-6-066 CEMM 03-6-067 CEMM 03-6-068 CEMM 03-6-069 CEMM 03-6-070 CEMM 03-6-071 CEMM 03-6-072 CEMM 03-6-073 CEMM 03-6-074 CEMM 03-6-075 CEMM 03-6-076
45 dias	Glicose 23%	CEMM 03-6-065 CEMM 03-6-069 CEMM 03-6-070 CEMM 03-6-072 CEMM 03-6-073 CEMM 03-6-074 CEMM 03-6-076	CEMM 03-6-065 CEMM 03-6-069 CEMM 03-6-070 CEMM 03-6-072 CEMM 03-6-073 CEMM 03-6-074 CEMM 03-6-075 CEMM 03-6-076
90 dias	Glicose 23%	CEMM 03-6-065	CEMM 03-6-069 CEMM 03-6-070 CEMM 03-6-073

		Cepas fúngicas viáveis	
		Temperatura - 20 °C	Temperatura – 80 °C
Período	Crioprotetor	<i>Malassezia spp.</i>	<i>Malassezia spp.</i>
15 dias	Lactose 9%	CEMM 03-6-065 CEMM 03-6-066 CEMM 03-6-067 CEMM 03-6-068 CEMM 03-6-069 CEMM 03-6-070 CEMM 03-6-071 CEMM 03-6-072 CEMM 03-6-073 CEMM 03-6-074 CEMM 03-6-075 CEMM 03-6-076	CEMM 03-6-065 CEMM 03-6-066 CEMM 03-6-067 CEMM 03-6-068 CEMM 03-6-069 CEMM 03-6-070 CEMM 03-6-071 CEMM 03-6-072 CEMM 03-6-073 CEMM 03-6-074 CEMM 03-6-075 CEMM 03-6-076
45 dias	Lactose 9%	CEMM 03-6-069 CEMM 03-6-070 CEMM 03-6-071 CEMM 03-6-072 CEMM 03-6-073 CEMM 03-6-075 CEMM 03-6-076	CEMM 03-6-067 CEMM 03-6-068 CEMM 03-6-069 CEMM 03-6-070 CEMM 03-6-071 CEMM 03-6-072 CEMM 03-6-073 CEMM 03-6-074
90 dias	Lactose 9%	Sem crescimento	CEMM 03-6-069

		Cepas fúngicas viáveis	
		Temperatura -20 °C	Temperatura – 80 °C
Período	Crioprotetor	<i>Malassezia spp.</i>	<i>Malassezia spp.</i>
15 dias	Lactose 23%	CEMM 03-6-065 CEMM 03-6-066 CEMM 03-6-067 CEMM 03-6-068 CEMM 03-6-069 CEMM 03-6-070 CEMM 03-6-071 CEMM 03-6-072 CEMM 03-6-073 CEMM 03-6-074 CEMM 03-6-075 CEMM 03-6-076	CEMM 03-6-065 CEMM 03-6-066 CEMM 03-6-067 CEMM 03-6-068 CEMM 03-6-069 CEMM 03-6-070 CEMM 03-6-071 CEMM 03-6-072 CEMM 03-6-073 CEMM 03-6-074 CEMM 03-6-075 CEMM 03-6-076
45 dias	Lactose 23%	CEMM 03-6-065 CEMM 03-6-066 CEMM 03-6-067 CEMM 03-6-068 CEMM 03-6-069 CEMM 03-6-070 CEMM 03-6-071	CEMM 03-6-065 CEMM 03-6-066 CEMM 03-6-067 CEMM 03-6-068 CEMM 03-6-069 CEMM 03-6-070 CEMM 03-6-071 CEMM 03-6-076
90 dias	Lactose 23%	Sem crescimento	CEMM 03-6-065 CEMM 03-6-070