

Fernando L. Leite de S. de Noronha



CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO
DAS LEVEDURAS

Tese de doutoramento apresentada
à Faculdade de Medicina do Porto

JULHO DE 1924



208/5 FNP

— 1924 —
IMPRENSA NACIONAL
— de Jaime Vasconcelos —
204, Rua José Falcão, 206
— PORTO —

N.º 192

**Contribuição para o estudo
das Leneduras**

Fernando b. leite de S. de Noronha

CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO
DAS LEVEDURAS

Tese de doutoramento apresentada
à Faculdade de Medicina do Porto

JULHO DE 1924



— 1924 —
IMPRESSA NACIONAL
— de Jaime Vasconcelos —
204, Rua José Falcão, 206
— PORTO —

N.º 192

FACULDADE DE MEDICINA DO PÔRTO

DIRECTOR

Dr. José Alfredo Mendes de Magalhães

SECRETÁRIO INTERINO

Dr. Hernâni Bastos Monteiro

CORPO DOCENTE

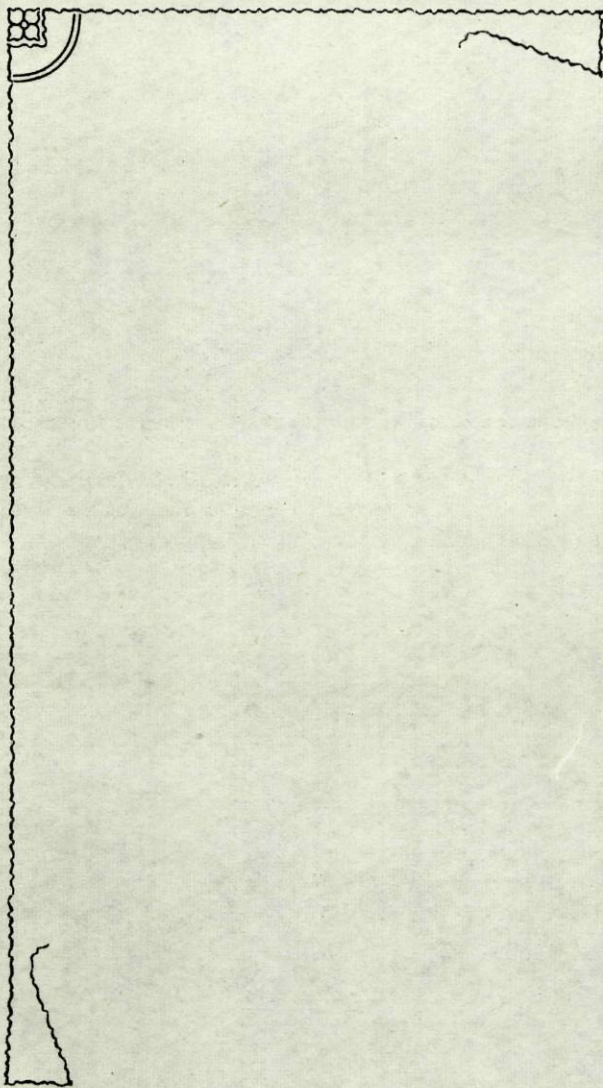
Professores Ordinários

Anatomia descritiva	Dr. Joaquim Alberto Pires de Lima
Histologia e Embriologia	Dr. Abel de Lima Salazar
Fisiologia geral e especial	Vaga
Farmacologia	Vaga
Patologia geral	Dr. Alberto Pereira Pinto de Aguiar
Anatomia Patológica	Dr. António Joaquim de Sousa Júnior
Bacteriologia e Clínica das doen- ças infecciosas	Dr. Carlos Faria Moreira Ramalhão
Higiene	Dr. João Lopes da Silva Martins Júnior
Medicina Legal	Dr. Manuel Lourenço Gomes
Anatomia Cirúrgica	Dr. Hernâni Bastos Monteiro
Patologia Cirúrgica	Dr. Carlos Alberto de Lima
Clínica Cirúrgica	Dr. Álvaro Teixeira Bastos
Patologia Médica	Dr. Alfredo da Rocha Pereira
Clínica Médica	Dr. Tiago Augusto de Almeida
Terapêutica Geral	Dr. José Alfredo Mendes de Magalhães
Clínica obstétrica	Dr. Manuel António de Morais Frias
Parasitologia e Clínica das doen- ças parasitárias	Vaga
Dermatologia e Sifilografia	Dr. Luís de Freitas Viegas
Psiquiatria	Dr. António de Sousa Magalhães Lemos
Pediatria	Dr. António de Almeida Garrett

Professores Jubilados

Dr. Pedro Augusto Dias

Dr. Augusto Henrique de Almeida Brandão



O que mais me preocupava durante o curso médico, era a escolha, dentre os vários e complexos problemas das sciências médicas, de um assunto sôbre o qual versasse a minha tese de doutoramento.

Foi o Ex.^{mo} Snr. Prof. Froilano de Melo, distinto parasitologista que, tendo vindo para a cidade do Pôrto, reger um curso de Investigações de Micologia e Protozoologia médicas, a convite da Faculdade de Medicina desta cidade, que sugeriu a ideia de escolher o assunto que apresento, quer por não ter sido ainda apresentado nesta Faculdade nenhum trabalho sôbre as leveduras, quer por ser um assunto a que me dedico, sob a sua direcção, há alguns anos.

Êste meu modesto trabalho não tem o desen-

volvimento que desejava dar-lhe, devido à escassez do tempo de que dispunha e por terem surgido, à última hora, contratempos que fizeram com que não conseguisse completar o estudo de todas as leveduras cultivadas.

Cumpre-me agora agradecer a todos que me auxiliaram nos meus trabalhos, permitindo-me especialisar:

O Ex.^{mo} Snr. Prof. J. A. Pires de Lima que tão amavelmente me forneceu os dados clínicos sobre os casos de estomatite ulcerosa que vêm descritos na segunda parte dêste meu trabalho.

O Ex.^{mo} Snr. Prof. Carlos Ramalhão que poz à minha disposição todos os recursos do Instituto de Bacteriologia de que é illustre Director.

O Ex.^{mo} Snr. Prof. Froilano de Melo, pelo

valioso auxílio que me prestou com os seus ensinamentos e pela orientação que deu aos meus trabalhos.

O Ex.^{mo} Snr. Prof. Abel Salazar, que com tanta amabilidade se ofereceu a ilustrar êste meu trabalho, com os seus desenhos, e pela honra que me concedeu presidindo à defesa da minha tese.

O Ex.^{mo} Snr. Prof. J. Leite de Vasconcelos pelos preciosos dados que me forneceu para a primeira parte da introdução dêste trabalho.

Por último cumpre-me agradecer aos meus amigos e companheiros de trabalho, em especial os Snrs. Mário Andrade e Joaquim Pinto Nunes.

INTRODUÇÃO

A palavra levedura parece ter a sua origem em *levêdo* (e *lêvado*) que como o termo *liévito* (em italiano) assenta em *lévitus*, suposto particípio latino formado de *levare* "levantar", segundo o modelo de *cubitus* (de *cubare*) e *domitus* (de *domare*).

De *levêdo* forma-se levedura, com o sufixo-*ura*, que se junta aos têmeas dos adjectivos, para se formarem nomes abstractos, segundo o modelo de *quentura* que deriva de *quente*.

Designa-se vulgarmente por levedura todo o microorganismo possuindo a propriedade de provocar a fermentação alcoólica, isto é, capaz de desdobrar o açúcar, de uma solução açucarada, em álcool e ácido carbónico.

Actualmente os botânicos consideram como levedura todo o fungo unicelular, quaisquer que se-

jam as suas propriedades bio-químicas, de forma oval ou esférica que se multiplica por gemação.

Esta definição é muito vaga e nada explica porque existem fungos que, vivendo normalmente sob a forma de micélios, podem em certas condições, por meio de secessão dos seus filamentos, dar origem às células de forma perfeitamente levedural, forma que se mantêm durante muitos anos. Tais são os *basidiosporos* de certos *Basidiomicetas*, os ascosporos de certos *Ascomicetas*, etc.

Ao lado destas leveduras, meras formas de desenvolvimento, há outras designadas vulgarmente por *leveduras verdadeiras*, em opposição às *formas levedurais*, que vivem sempre em estado de levedura, não apresentando nunca verdadeiros micélios mas sim, pseudo-micélios, os quais são formados quer devido ao alongamento das suas células quer à sua junção num mesmo sentido. É a existência destas formas de desenvolvimento que fez com que os primeiros observadores lutassem com grandes dificuldades para conseguirem fazer uma descrição fiel dos caracteres das leveduras.

Entre estas duas *leveduras* existe contudo uma diferença fundamental que só por si basta para as destrinçar — é a formação de esporos internos, efectuada sómente pelas leveduras verdadeiras, todas as vezes que elas estejam colocadas em condições desfavoráveis. De Bary, Reess e Hansen foram os primeiros que compararam estes corpos, às ascas

dos Ascomicetas e consideraram as verdadeiras leveduras como fungos autónomos vivendo exclusivamente sob a forma levedural e incapazes de se desenvolverem sob a forma de micélio.

Desde que Hansen observou o ciclo evolutivo das leveduras na natureza e desde que foi demonstrada a existência de uma sexualidade absolutamente comparável ao que se observa nos Ascomicetas inferiores, todos os micologistas admitem a autonomia das leveduras e a sua entrada no grupo dos Ascomicetas.

As leveduras constituem pois uma família dos Ascomicetas conhecidos pelo nome de *Saccharomycetaceas*. Entre os *Saccharomycetaceas* existem contudo certas espécies que perdem a propriedade de produzir ascosporos, sob a influência de certas condições especiais.

Estas leveduras, cuja origem não é ainda conhecida, formam um grupo distinto e tem a designação de *leveduras duvidosas* ou *leveduras de posição incerta*.

Deve-se a Leuwenhoeck a primeira descrição das leveduras, feita em 1680 que as descreveu como corpos globulares, ovoides ou esféricos, de aspecto organizado.

Em 1799, Fabroni considerou a levedura como uma substância albuminoide. Mais tarde, Desmazières, Mitscherlick, Cognard-Latour, Schwann e Kützing demonstraram que as leveduras de cerveja e do vinho eram células multiplicando-se por gemação, e em 1839 Schwann notou pela primeira vez no interior das leveduras, novas células que se tornavam livres pela ruptura da membrana da célula-mãe.

Mas é desde Pasteur que a natureza das leveduras é verdadeiramente conhecida. Pasteur, Hansen e Buchner dominam a história do estudo das leveduras e marcam nela três etapas distintas.

Até à época em que Pasteur começou as suas pesquisas sobre a fermentação, sabia-se somente que a levedura de cerveja se multiplicava quando introduzida num mosto açucarado e julgava-se que ela se formava espontaneamente, nos casos em que não estivesse colocada em semelhantes condições, possuindo uma força oculta donde provinha a fermentação.

Em 1859 Pasteur provou por inúmeras experiências que a fermentação era correlativa à vida das leveduras, e mais tarde, demonstrando a impossibilidade da geração espontânea, introduziu o método das culturas puras. A partir deste momento as leveduras deram origem a numerosos trabalhos.

Os métodos das culturas não foram porém postos em uso imediatamente e foi Hansen o ver-

dadeiro fundador dêste estudo e do seu aperfeiçoamento, marcando assim a 2.^a étape no estudo das leveduras. Pelas suas numerosas observações e pesquisas de 60 anos, o sábio micologista chegou a descobrir processos que permitem semear culturas com uma só célula e isolar com segurança as espécies distintas umas das outras pelos seus caracteres diferenciais. A obra de Hansen foi coroada com a sua classificação das leveduras hoje universalmente admitida.

A 3.^a étape, marcou-a Buchner com a descoberta da *zymase alcoólica*, dando assim um grande impulso ao estudo fisiológico e principalmente ao conhecimento da nutrição e do mecanismo da fermentação alcoólica das leveduras.

PARTE I

todas estas formas, não se podendo por-
 isso diferenciá-las nitidamente umas das outras.
 Assim por exemplo, há espécies que apresentando o
 aspecto de células arredondadas, possuem no lado
 destas formas, outras, elípticas e alongadas; como

Caracteres gerais das leveduras

também as
 pelo de outras espécies ou leveduras, possuem
 igualmente formas arredondadas.
 Há a notar porém a existência em cada es-
 pécie de uma forma predominantemente que chama a
 atenção do observador e dá a espécie um carácter
 especial. Vê-se isto no *S. cerevisiae*, onde pre-
 domina a forma arredonda no *S. ellipsoideus* etc.

As leveduras são fungos unicelulares, que vi-
 vem geralmente sob a forma de células isoladas
 dividindo-se por gemação.

Forma. — Elas apresentam duas formas diferen-
 tes: a forma *levedural propriamente dita* que re-
 presenta a sua forma normal da vegetação, e a *mi-
 celiana*, observada pela primeira vez por Hansen,
 forma rara que adquire um certo desenvolvimento
 sómente em certas e determinadas espécies.

A forma *levedural propriamente dita* é caracte-
 rizada por células esféricas ou elípticas, envolvidas
 numa membrana espessa e contendo quasi sempre
 gránulos refringentes e vacúolos. A sua dimensão
 é de 1 a 5^m de largura e 5 a 9^m de comprimento.

As diferentes espécies de leveduras possuem

todas quási a mesma forma, não se podendo porisso diferenciá-las nitidamente umas das outras. Assim por exemplo, há espécies que apresentando o aspecto de células arredondadas, possuem ao lado destas formas, outras, elípticas e alongadas; como também, existem espécies que, apresentando o aspecto de células elípticas ou alongadas, possuem igualmente formas redondas.

Há a notar, porêem, a existênciã em cada espécie de uma forma predominante que chama a atencão do observador e dá à espécie um facies especial. Vê-se isto no *S. cerevisiae*, onde predomina a forma redonda, no *S. elipsoideus* onde a forma predominante é elíptica, etc. Essa forma celular predominante, imprimindo a uma determinada espécie, um aspecto especial, sugere ao meu espírito a seguinte ideia: ¿ não se poderia por meio de uma metódica estatística, diferenciar uma espécie da outra, pela percentagem das formas que uma levedura apresenta? É um estudo por fazer e que talvez possa constituir um dos meios para a classificação das espécies.

Ao lado destas leveduras cujas formas celulares são variáveis, há certas espécies em que as células apresentam uma forma característica que constitue um elemento importantíssimo para a sua diferenciação; assim, a *Hansenia apiculata* é caracterizada pela existênciã de um mamilo mais ou menos comprido, numa ou nas duas extremidades da cé-

lula oval e que dá às células uma forma apiculada. Certas *Tórulas* são do mesmo modo facilmente diagnosticadas pela sua forma nitidamente redonda, contendo um grande glóbulo de gordura, e pela sua gemação especial dando origem a muitos gômos, simultâneamente em vários pontos da sua superfície.

Certas leveduras podem apresentar formas anormais como sucede por exemplo com o *S. Bailii* que apresenta nas culturas velhas, formas nitidamente amiboides. Pesquisas posteriores demonstraram que as formas amiboides, estudadas por Lindner não são senão formas de copulação, isto é, células com vários prolongamentos emitidos pela sua superfície e destinados a unirem-se a outros divertículos semelhantes provenientes doutra célula afim de se efectuar a copulação, mas que, não tendo podido cumprir a sua funcção, formam na extremidade uma pequena dilatação ampular, dando-lhes assim um aspecto de amibas.

Divisão.— Em quási todas as leveduras a divisão faz-se por gemação, caracterizada pelo aparecimento de um pequeno gômo à superfície exterior da célula, o qual se separa mais tarde, afim de gemar por sua vez depois de ter atingido a dimensão de uma célula adulta. Quando a divisão é muito rápida, acontece às vezes as células formarem simultâneamente muitos gômos em diferentes pon-

tos da sua superfície os quais continuam a multiplicar-se antes de se separarem da célula-mãe, constituindo assim pequenas colónias compostas de muitas células ligadas umas às outras.

A gemação produz-se sempre que a célula se encontra em boas condições de nutrição. O oxigénio acelera a gemação; todavia, a sua presença não é indispensável como provou Hansen, observando a existência da gemação nas leveduras cultivadas ao abrigo do oxigénio. Hansen demonstrou igualmente que a temperatura exerce uma grande influência na gemação e por uma série de curiosas experiências descobriu que para a maior parte das leveduras a temperatura máxima para a gemação vai de 34° a 47° C. e a mínima de 0,5 a 3° C.

Certas leveduras, que por isso são denominadas *Schizosaccharomices*, dividem-se por scissiparidade. A multiplicação efectua-se do seguinte modo: a célula alonga-se por uma das suas extremidades em forma de tubo que se alarga e toma a forma de um gômo unido à célula por meio de um cólo muito largo, onde mais tarde, aparece um septo transversal que separa por completo o gômo da célula-mãe.

Quando as leveduras não encontram, no meio em que estão cultivadas, condições favoráveis à vida, elas cessam de se multiplicar e formam então certos órgãos de resistência aos quais Will chamou

células duráveis. Estes corpos, são células cercadas de uma membrana muito espessa e cujo conteúdo é rico em glicogénio e gorduras graças aos quais elas se conservam durante muitos anos em estado de vida retardada até que condições favoráveis permitam a sua multiplicação.

Mas, o processo mais empregado pelas leveduras para a perpetuação das espécies é a formação de esporos no interior das suas células, constituindo o que se chama a *asca*. Estes esporos observados pela primeira vez por Schwann, são dotados de uma grande resistência e podem viver neste estado durante muitos anos.

Mais tarde, quando as células encontram condições favoráveis, rompem-se e os esporos assim libertos multiplicam-se pelo processo ordinário.

Não parece contudo que a formação dos ascoporos seja devida exclusivamente à falta de alimento, como afirmou Klebs, porque ela pode existir igualmente nos meios sólidos muito nutritivos como, por exemplo, na cenoura, na batata, etc.

Para Klebs, a existência da esporulação nos meios sólidos seria devida à impossibilidade de a parte superior da cultura poder alimentar-se em virtude da existência de uma espessa camada de células, que a separa do meio nutritivo. Mas Hansen, contrário às ideias de Klebs, constatou que nas culturas em gelatina com môtto de cerveja, os ascoporos formavam-se tanto nas partes centrais

como nas marginais das colónias, o que demonstrava que a falta de alimento não era a causa única da esporulação. Para êste autor a esporulação pode ser determinada por dois factores—falta de alimento e acumulação, no meio da cultura, dos produtos tóxicos segregados pelas leveduras.

Além dêstes dois factores, que só por si não são suficientes, segundo as pesquisas de Barker e do próprio Hansen, há outras condições necessárias para a protecção dos ascosporos. Assim para que uma levedura esporule, entre várias outras condições, é necessário: *a)* que as suas células sejam novas e que tenham matérias de reserva, acumuladas nas culturas anteriores; *b)* livre acesso do ar, demonstrado experimentalmente por Hansen; *c)* temperatura favorável, variável segundo as espécies, podendo-se contudo dizer que a temperatura propícia para a maior parte das leveduras é de 25° aproximadamente, sendo as temperaturas limites — 0,5 a 3° C e 37,5° C.

Hansen observou casos em que os ascosporos germinam transformando-se directamente em ascas sem ter sofrido nenhuma multiplicação prévia.

As ascas, exceptuando os casos em que elas resultam de uma copulação, conservam em regra a forma e as dimensões das células vegetativas simples. O número dos ascosporos que cada asca contém varia de 1 a 12, existindo contudo uma tendência em cada espécie para fixar um certo e

determinado número. As suas dimensões variam de 1,5 a 5^m e apresentam em geral as formas esféricas ou ovais, contendo na parte central um glóbulo de gordura.

Em certas espécies a formação da asca é precedida de um processo sexual e a asca é então o resultado de uma copulação que se assemelha muito à que se observa em certos ascomicetas inferiores.

Guilliermond examinando numa câmara húmida de Böttcher uma gôta de môtto de cerveja gelosado, observou que os ascosporos cultivados neste meio germinavam e produziam células vegetativas que durante os dois primeiros dias se multiplicavam muito activamente; depois a multiplicação retardava-se e as células reuniam-se umas às outras formando pequenas colónias. Destas células, algumas continuam a dividir-se, mas a maior parte toma a forma arredondada e cessa de multiplicar. É neste momento que começa a copulação, efectuando-se pela junção de dois pequenos prolongamentos emitidos por duas células iguais e que ficam assim reunidas por meio de um canal de copulação. O septo mitótico que se encontra no meio do canal da copulação, separando as duas células, é reabsorvido e o núcleo de cada uma destas células transformadas assim em gametas, introduz-se no canal, onde se efectua a fusão protoplásmica e nuclear. Após a fusão, as duas células dão origem a uma única célula oval—ovo ou

zygosporo—que aumenta de volume e não tarda a germinar por meio de duas ou três sucessivas divisões nucleares dando origem a 4 ou 8 núcleos que se espalham no *zygosporo* e cercam-se de uma zona de citoplasma muito denso, transformando-se em 4 ou 8 *ascosporos*.

O *zygosporo* encontra-se então transformado em *asca*.

Há casos em que a fusão dos gametas é incompleta e a *asca* formada conserva um ligeiro sulco mediano que não é senão o vestígio do canal de copulação.

Em certos casos ainda, as *ascas* nascem por parthenogénese em virtude da qual os dois gametas reunidos pelo canal de copulação, cujo septo não se perfura, formam individualmente uma *asca* parthenogénética.

Além das formas descritas, há espécies em que se observa a copulação isogâmica entre *ascosporos* nascidos de uma *asca* formada sem fusão. Foi Hansen quem primeiro observou êste fenómeno. Actualmente considera-se esta copulação dos *ascosporos*, não como uma verdadeira fecundação mas como um processo sexual substituindo a fecundação desaparecida. A célula que dá origem à *asca* deve ser considerada como um gameta—desenvolvendo-se parthenogénicamente. Como a formação dos *ascosporos* necessita de duas divisões seguidas e sem nenhum período de repouso, os

núcleos formados possuem uma pequena quantidade de cromatina, e é a copulação que compensa a falta desta substância.

Citologia.—O estudo da citologia das leveduras restringiu-se muitos anos ao núcleo cujo problema deu origem a inúmeros trabalhos, uns sôbre a sua existência, outros sôbre a sua natureza, etc.

Dangeard, Leblanc, Bouin e outros descobriram nas leveduras um corpo que descreveram como núcleo. Outros autores porém, admitiam a existência de um núcleo difuso, pelo facto de não o terem podido diferenciar e terem notado na célula levedural, a existência de um grande número de grãos, disseminados, que tinham uma grande afinidade pelos corantes. Eischenschitz observando que êsses grãos eram mais abundantes no vacúolo do que em qualquer outra parte da célula, considerou o vacúolo como uma espécie de núcleo rudimentar. Wager e Peniston descrevem nas leveduras um vacúolo nuclear, cheio de grãos crómaticos, e um nucléolo situado sempre ao lado do vacúolo. O conjunto dêste vacúolo com os grãos de cromatina e o nucléolo constituiria para êles um estado primitivo de desenvolvimento filogenético do núcleo.

Trabalhos posteriores demonstraram que a interpretação de Wager é inexacta e que as leveduras apresentam uma estrutura idêntica à dos outros fungos possuindo portanto um núcleo nitidamente

diferenciado. O que Wager considerou como vacúolo nuclear, não é senão um vacúolo secretor encerrando grãos de secreção, conhecidos por corpúsculos metacromáticos e que não são constituídos de cromatina. O nucléolo de Wager, longe de ser homogêneo, apresenta a estrutura de um verdadeiro núcleo.

A estrutura das leveduras é actualmente bem conhecida, não havendo dúvida nenhuma sobre a existência do núcleo. Na célula levedural há pois a considerar — o núcleo, o citoplasma, com os seus elementos figurados, e finalmente, a membrana.

Antes de tratar destes diferentes elementos constitutivos da célula levedural, descreverei alguns dos processos utilizados para o exame citológico das leveduras.

Métodos do exame citológico das leveduras. — É sobre as células vivas que deve recair o primeiro exame, no estudo citológico das leveduras. Estas células devem ser coradas com o vermelho neutro afim de não se alterarem. Para isto coloca-se algumas células levedurais vivas, numa solução aquosa de vermelho neutro a 1 por 10.000 e vê-se então que enquanto o protoplasma e o núcleo ficam incolôres, o vacúolo e os corpúsculos metacromáticos, que são as partes menos vivas da célula, fixam facilmente os corantes. Observado que seja o aspecto das células vivas, deve-se estudar depois, e

com mais atenção, as células fixadas, isto é, as células, mortas por substâncias que as fixam na forma que elas possuíam quando vivas. A fixação obtem-se fácilmente colocando um pedaço de gelatina, cenoura ou batata, meio onde a levedura se tenha desenvolvido, num vaso contendo o líquido fixador.

Os processos de fixação e de coloração variam segundo se quer estudar o núcleo ou os outros elementos das células.

Para o estudo do núcleo deve-se preferir o líquido de Bouin (1) ou o de Perenyi (2), segundo recomenda Guilliermond. A fixação deve durar 12 horas aproximadamente, depois das quais córa-se pelo método de Heidenhaim, com hematoxilina férrica. Por êste método o núcleo córa-se de negro e o protoplasma de cinzento, notando-se assim, uma nítida diferenciação. Os grãos basófilos córam-se também intensamente ao passo que os corpúsculos metacromáticos, não fixam o corante. A hematoxilina de Delafield e o hemalumen dão igualmente bons resultados, após a fixação pelo líquido de Bouin. Por meio dêstes corantes obtem-se uma nítida diferenciação tanto do núcleo, que

(1) *Líquido de Bouin (picroformol)*: - Água saturada de ácido pírico, 75 gr. Ácido acético glacial, 5 gr. Formol, 20 gr.

(2) *Líquido de Perenyi*: - Ácido chrômico a 0,5 %, 3 gr. Ácido nítrico a 10 %, 4 gr. Álcool a 95 %, 3 gr.

toma uma côr difusa, como dos corpúsculos metacromáticos que se córam de vermelho vinoso intenso.

Núcleo.—O núcleo ocupa uma posição variável segundo a forma da célula e o seu estado de desenvolvimento. Está situado quási sempre ao lado do vacúolo que contém os corpúsculos metacromáticos. A sua estrutura compõe-se de uma membrana externa e o nucleoplasma incolôr. Neste, ficam situados o nucléolo e a rêde cromática cuja quantidade varia segundo as espécies. O núcleo é sempre único em cada célula, mesmo nos casos em que as células se alongam e formam filamentos que constituem rudimentos de micélios.

A divisão nuclear parece consistir em uma simples divisão directa e sem nenhum carácter de cariocinese como afirmaram Furhmann e Swellingrebel. Na divisão celular por gemação, o gômo, desde a sua formação, é constituído por um citoplasma muito denso encerrando alguns grãos basófilos emigrados da célula-mãe. Logo que o gômo atinja uma certa dimensão, forma-se no meio do citoplasma, um pequeno vacúolo que se enche logo de corpúsculos metacromáticos. Durante este período, o núcleo conserva a sua primitiva posição até que o gômo adquira o seu máximo desenvolvimento. Só neste momento é que êle, sem todavia mudar de lugar, alonga-se e toma a forma de

haltere, com uma das suas partes grossas introduzida no gômo. No meio da parte delgada do haltere dá-se então uma divisão separando as duas cabeças, das quais, uma formará o núcleo do gômo e a outra, continuará na célula-mãe. Quando a divisão celular se efectua por secessão transversal, como succede nos Schizosaccharomices, dá-se também o mesmo processo de divisão nuclear.

Citoplasma.—O citoplasma, geralmente homogéneo nas células novas, é muito denso, e encerra em quasi todas as leveduras, principalmente nas leveduras esféricas ou ovais, um vacúolo (vacúolo nuclear de Wager) cheio de corpúsculos metacromáticos de Babès. Ao lado dêste vacúolo aparecem mais tarde, durante o seu desenvolvimento, outros vacúolos com glicogénio, dando à célula uma estrutura alveolar. Concomitantemente aparecem glóbulos de gordura e o trâma citoplasmico que limita os vacúolos enche-se de inúmeros grãos de variadas formas e dimensões tomando a côr do núcleo e que tem a designação de *grãos basófilos*.

Resumindo, o citoplasma contém pois, numerosas secreções: corpúsculos metacromáticos, glicogénio, grãos basófilos e gorduras. Os corpúsculos metacromáticos tomam com o azul de metilena, Unna, toluídina, etc., uma côr, que varia de vermelho à violeta, e a côr vermelho-vinoso, com a

hematoxilina ou hemateína. Bütschli designa os corpúsculos de Babès com o nome de *grãos vermelhos* por causa da sua metacromasia, graças à qual pode-se distinguir êstes corpos, do núcleo e dos outros elementos da célula.

O papel da cromatina foi discutido durante muitos anos. Certos bacteriologistas e entre êles Behring, julgavam haver uma certa relação entre a existência dos corpúsculos metacromáticos e a virulência das bactérias patogénicas, e consideravam êstes corpos, como produtos tóxicos das bactérias. Pesquisas posteriores demonstraram não haver nenhuma relação entre êstes dois factores e consideraram a metacromatina simplesmente como um produto de reserva. O papel da metacromatina pode ser bem observado durante a esporulação das leveduras. Os corpúsculos metacromáticos que se encontram acumulados em grande quantidade nas células destinadas a esporular, são absorvidos pelos ascosporos depois de terem sofrido os fenómenos de pulverisação e dissolução; mais tarde, quando os ascosporos atingem a maturação, êstes corpos desaparecem totalmente sofrendo assim a mesma evolução da gordura e do glicogénio que, como êles, constituem matéria de reserva. O glicogénio, facilmente reconhecível pela côr castanho escuro que toma com o iodo-iodeto de potássio, foi observado pela primeira vez nas leveduras, por L. Errera. Esta substância existe em quási todas as leveduras;

aparece nas células desde o início da fermentação, atinge o seu máximo ao cabo de 48 horas e vae desaparecendo pouco a pouco até o fim da fermentação. Durante a esporulação, ela acumula-se em grande quantidade nas ascas e é absorvida pelos ascosporos durante a sua maturação.

As gorduras também aparecem principalmente durante a esporulação e servem igualmente de alimentação aos ascosporos.

Quanto aos grãos basófilos cujo papel ainda não se conhece muito bem, são produtos albuminoides.

Membrana.—A membrana das células leveduras é espessa e apresenta um duplo contôrno, muito nítido. A sua constituição química é ainda pouco conhecida, parecendo ser constituida, segundo Schlossberger, de uma celulose especial semelhante a fungina ou metacelulose, distinguindo-se da verdadeira celulose, por não se dissolver em óxido de cobre amoniacal e comportar-se diferentemente em presença dos reativos iodados.

Hansen notou que as leveduras quando se encontram numas certas condições, segregam umas substâncias mucilaginosas englobando as suas células numa espécie de rede, e apresentando assim um aspecto de zoogléas. Este facto parece desempenhar um papel importante nos fenómenos de coagulação das leveduras seguida da clarificação

que se produzem nos líquidos de fermentação e que são comparáveis às aglutinações das bactérias. Certas leveduras patogénicas quando se encontram parasitando algum hóspede, possuem a propriedade de proteger isoladamente cada uma das suas células, contra a reacção do organismo, por meio de uma cápsula muito espessa e de natureza mucilaginosa.

Fisiologia das leveduras

Neste capítulo tratarei dos fenómenos nutritivos gerais das leveduras, isto é, da nutrição propriamente dita, respiração, fermentação alcoólica, e das suas relações com o mundo exterior.

Nutrição.— A levedura pode viver em contacto com o ar e neste caso ela respira, ou, vive ao abrigo do ar e então ela toma a energia que necessita por meio da chamada fermentação alcoólica a qual consiste em transformar a maior parte do açúcar existente no meio em que ela vive, em álcool e ácido carbónico.

A célula levedural, como já falei no capítulo anterior, compõe-se de uma membrana que parece ser constituída de celulose ou de uma substância vizinha, de um protoplasma, de natureza albuminoide e de um núcleo, rico em nucleína.

A levedura alimenta-se de substâncias mine-rais, azotadas e de hidratos de carbono. Dentre as primeiras, o fosfato de potássio desempenha um papel preponderante na sua nutrição e as pes-quisas de Sterri e de d'Elion demonstraram que os fosfatos são elementos minerais indispensáveis à vida das leveduras. Acerca da nutrição das leveduras à custa das substâncias albuminoides, os conhecimentos são ainda incompletos. Segundo Pasteur e Ad. Mayer, as leveduras não podem desenvolver-se à custa da albumina do ovo, nem da fibrina. Isto é devido, não só por estas substâncias não atravessarem a membrana celular, como tam-bém pelo facto de a endotryptase das leveduras ser uma diastase intracelular que dificilmente se difunde fora da célula. Todavia, em certas condições, a endotryptase é susceptível de atravessar a mem-brana celular. Assim, Boullanger observou que certas leveduras cultivadas no leite, desenvolvem-se muito lentamente, produzindo ao cabo de alguns meses um coágulo que se liquefaz lentamente. Ao contrário do que sucede com estas substâncias, as leveduras assimilam facilmente os derivados dialisáveis dos albuminoides, tais como as albu-moses e as peptonas. Pesquisas recentes demons-traram que os derivados dos albuminoides são mais facilmente assimilados do que as albuminas, constituindo para as leveduras, alimentos azotados de escolha.

Na nutrição hidrocarbonada é necessário distinguir a nutrição da *levedura vegetal*, isto é, da levedura em estado de vida aeróbia, e a da *levedura fermento*, ou por outra, da levedura durante a fermentação. Tratarei primeiramente da levedura em estado de vida aeróbia, deixando o segundo caso para quando descrever a fermentação alcoólica.

As leveduras não podem aproveitar o carbono do ar atmosférico em virtude de serem desprovidas de clorofila e portanto tem de utilizar o carbono das substâncias hidrocarbonadas.

Segundo P. Lindner e Saito, o açúcar mais favorável à assimilação das leveduras é a maltose, que é assimilada por quási todas as leveduras. A dextrina, que constitui um mau alimento para as leveduras em geral, é transformada activamente pelas *Tórulas* e *Micodermas*. A sacarose tem um papel muito reduzido na assimilação, sucedendo o mesmo com a glucose, levulose e com a rafinose.

As experiências de L. Lindner e Saito demonstraram não existir nenhuma relação entre o poder fermentescível dum açúcar e o seu emprêgo na assimilação. Assim, encontra-se leveduras que em condições de vida aeróbia assimilam activamente um açúcar, que não são capazes de fermentar, durante a sua vida anaeróbia. Existem igualmente leveduras, como por exemplo o *S. Ludwiggii* e vários outros, fermentando certos açúcares que são incapazes de assimilar.

Certos autores, atendendo à abundante quantidade de glicogénio existente nas células leveduras consideraram esta substância como um produto intermediário entre o açúcar e o álcool. Para Grüss o glicogénio constituiria um produto exclusivamente destinado à respiração, em presença do ar, e à fermentação alcoólica, na sua ausência. O glicogénio formar-se-ia à custa dos açúcares absorvidos pela célula e transformar-se-ia quer em ácido carbónico e água, na vida aeróbia, quer em álcool e ácido carbónico, na fermentação alcoólica.

Kohl é da mesma opinião, e baseia-se no facto de o glicogénio ser abundante na célula levedural, principalmente durante o período activo da fermentação e no seu desaparecimento quási total, quando as células se preparam para esporular, bem como nos ascósporos.

As observações de Guilliermond veem negar a teoria de Grüss e provar a existência do glicogénio, em abundância, não só durante a fermentação, como também durante a formação das ascas, substância que é completamente absorvido pelos ascósporos no curso da sua maturação.

As pesquisas de Will demonstraram a existência de grande quantidade de glicogénio nas células duráveis.

Respiração.— A levedura além de possuir a propriedade de respirar, como todo o ser vivo, tem a

propriedade de absorver o oxigénio que se encontra em estado de combinação.

Schutzemberger e Risler observaram que colocando uma levedura viva, no sangue arterial ou numa solução de hemoglobina saturada de oxigénio, o líquido passa rápidamente de côr vermelha para azul escuro e para a côr preta. Comtudo é necessário frisar que a levedura pode apoderar-se sómente do oxigénio das combinações instáveis, como a hemoglobina.

A actividade respiratória, medida pela quantidade de oxigénio consumido na unidade do tempo, pela unidade do pêso, não é influenciada pela luminosidade. Ela varia porém sensivelmente segundo o grau da temperatura. Muito fraca a 10° eleva-se lentamente até 18°, atingindo o seu máximo a 60° acima do qual cai bruscamente produzindo a morte da levedura.

Como já se viu, Grüss faz desempenhar ao glicogénio um papel importante na respiração e considera-o como uma reserva, exclusivamente destinada para a respiração e para a fermentação alcoólica. Para êste autor as leveduras oxidariam a glucose, derivada pela hidrólise do glicogénio, e transforma-la-iam em ácido carbónico e água por meio das suas oxidases.

Fermentação alcoólica.—As leveduras em geral desenvolvem-se nos líquidos sob forma de depó-

sito, e é sómente em condições excepcionais que formam à superfície, uma espécie de película, conhecida vulgarmente pelo nome de véu. Quando se cultiva as leveduras numa delgada camada de líquido açucarado, elas desenvolvem-se no fundo, por encontrarem aí, a quantidade do oxigénio que lhes é necessária, em virtude de haver uma fácil e constante renovação do ar. Nestas condições ela é aeróbia, e como tal, comporta-se como todos os vegetais, isto é, absorve o açúcar existente no líquido, utilizando uma parte dêle para a manutenção do seu protoplasma, e para a criação de nova substância viva, e transformando o resto, em ácido carbónico e água, por meio de oxidação.

Introduzida porém, num balão completamente cheio de líquido açucarado, ela, encontrando péssimas condições para o renovamento do ar, consome apenas uma pequena parte do açúcar para o seu sustento, e transforma o resto em alcool e ácido carbónico, por meio da sua zimase, e é êste fenómeno químico que fornece à levedura, nos casos de vida anaeróbia, a energia de que ela necessita.

Pasteur, provou por uma série de experiências demonstrativas que a fermentação é tanto mais activa quanto menor é a quantidade de oxigénio.

As experiências de Denys Cochin, discípulo de Pasteur, provaram que a levedura não era um

organismo estritamente anaeróbio pelo facto de a ausência total de oxigénio, produzir a completa supressão da fermentação.

A fermentação alcoólica, segundo Pasteur, pode ser produzida por todas as células vivas, desde que contenham açúcar.

As experiências de Bérard, Bellamy, Mazé, etc., confirmam que o fenómeno da fermentação alcoólica não é exclusivo das leveduras e demonstram efectivamente que na ausência do oxigénio todas as células vivas que contenham açúcar podem produzir a fermentação alcoólica. E as próprias leveduras, submetidas à inanição numa atmosfera privada de ar, podem fermentar o glicogénio que elas tinham acumulado e que constituia a sua reserva, sofrendo assim, uma espécie de autofermentação.

Muitas leveduras, como as Micodermas e muitas Tórulas, não possuem a propriedade da fermentação alcoólica. Elas formam um denso véu que cobre toda a superfície do líquido, vivendo assim em contacto com o oxigénio necessário para o seu desenvolvimento.

Qual é o mecanismo pelo qual se produz a fermentação? Para Berthelot e Claude Bernard a fermentação provem duma diastase segregada pela levedura.

Pasteur e Denys Cochin não conseguiram isolar esta diastase das células levedurais e porisso

o primeiro, sem todavia eliminar a existência de uma acção diastásica, pensou que a fermentação devia estar ligada à acção vital da própria célula levedural.

Posteriormente, Buchner, conseguindo extrair o suco das leveduras e a zimase que ela contém, veio confirmar a opinião de Berthelot e eliminar por completo a concepção vitalista da fermentação alcoólica.

Descreverei aqui resumidamente o processo seguido por Buchner para extrair o suco das leveduras. Tritura-se, até formar uma massa pastosa, 1.000 grs. de leveduras, bem lavadas e desidratadas, 1.000 grs. de quartzo fino em pó e 250 grs. de tripoli que se junta afim de se obviar a dificuldade da pulverisação, devido à elasticidade e à pequena dimensão das células. Sujeita-se esta massa à acção de uma prensa hidráulica, repetidas vezes e sob uma forte pressão, e recolhe-se em seguida o succo, que possui a côr acastanhada. Aquecido a 40° ou 50°, o líquido deixa separar flocos insolúveis de albumina e perde o seu poder fermentativo.

Albert e Rapp demonstraram um processo de se obter a fermentação alcoólica, com células mortas. Coloca-se a levedura depois de morta, por meio de alcool, éter ou acetona, e depois de desidratada, sobre o papel filtro; lava-se com éter e deixa-se secar à temperatura de 45°. Obtem-se assim um pó branco, constituído de células mortas, cha-

mado *zymina* e ao qual Danerhefe deu o nome de *levedura durável*. Albert e Rapp viram que as células continuavam a ter as propriedades fermentativas pelo facto de produzirem rápida fermentação quando colocadas numa solução açucarada. Lebedeff obteve igualmente uma zimase muito activa, por meio de maceração das leveduras, em água simples, durante muito tempo.

Teorias da fermentação alcoólica.— Todos admitem que a fermentação alcoólica parece desempenhar o papel de libertar a energia necessária à vida da levedura, todas as vezes que esta se encontra em condições em que a respiração não é possível. Quanto ao seu papel biológico e às suas relações com a respiração é que os fisiologistas não estão de acôrdo.

Passo a expôr resumidamente, algumas das várias teorias que existem para explicar êste fenómeno.

Teoria de Pasteur.— Foi Pasteur quem primeiro pensou que as leveduras, vivendo ao abrigo do ar, deviam certamente procurar o oxigénio que lhes faltava, decompondo os elementos que lhes são accessíveis.

Segundo êste sábio, a fermentação seria pois um fenómeno de resistência à asfixia, em virtude do qual, a levedura, não encontrando o oxigénio

indispensável à sua vida, apossar-se-ia do existente em estado de combinação, no açúcar, do meio em que ela vive. Esta teoria, criticada por vários autores, não deixa de ser verdadeira em parte, porque, se é certo que a levedura não se apodera do oxigênio do açúcar que faz fermentar, como afirmava Pasteur, ela liberta, por meio dêste fenómeno, a energia que é necessária para a sua vida.

Teoria de Wortmann e de Delbrück.—Para êstes autores o alcool desempenharia o papel de uma toxina e serviria à levedura para se defender contra os organismos que lhe disputassem o terreno. As primeiras leveduras ou leveduras selvagens, segundo êstes autores, parasitariam em geral, exclusivamente os frutos apodrecidos ou a secreção mucosa das árvores, ao lado doutros organismos vivendo nas mesmas condições e contra os quais elas tinham de travar constantes lutas. Neste *struggle for life*, as leveduras conseguiriam sair sempre vitoriosas, graças ao seu fermento, o qual constitue por assim dizer um meio de conservação da espécie. A cultura das leveduras pelo homem, contribuiu para que elas podessem ter uma vida anaeróbia, desenvolver a propriedade de segregar alcool e suportar doses crescentes desta substância, de maneira que as leveduras primitivamente aeróbias, adaptaram-se lentamente à vida anaeróbia.

Tem-se apresentado contra esta teoria, o facto de as toxinas não serem geralmente segregadas em quantidade suficiente para prejudicar os microorganismos que as produzem, sucedendo porêm com as leveduras, precisamente o contrário — produzem uma tal quantidade de alcool que elas próprias chegam a envenenar-se.

Teoria que considera a fermentação uma das fases da respiração. — Segundo esta teoria, que não é senão a teoria de Pasteur modificada, a fermentação é uma das fases da respiração.

Baseando-se na existência do alcool em vários tecidos e no facto de a fermentação alcoólica não ser um fenómeno exclusivo das leveduras, visto existir na maior parte dos fungos, Mazé, Duclaux, Pfeffer, Palladum, Stoklasa e vários outros, admitem a existência da zimase em todos os organismos, intervindo de uma maneira constante na respiração. O alcool para êstes fisiologistas é sempre um produto intermediário da respiração normal das plantas e dos animais. A respiração, segundo esta teoria, compreende duas fases. Na primeira — respiração intramolecular ou fermentação alcoólica, em que não há necessidade do oxigénio, — dá-se a dissociação do açúcar em alcool e ácido carbónico, pela acção da zimase. Na segunda o alcool formado na primeira fase seria transformado em presença do ar e por meio da

oxidase, em ácido carbónico e água—é a respiração propriamente dita ou respiração externa.

Certos fisiologistas admitem que o álcool não é sómente um produto intermediário da respiração mas também o termo mais simples da assimilação do carbono. Os alimentos hidrocarbonados seriam todos transformados em álcool antes de serem assimilados.

Habitat.—As leveduras são necessariamente saprofitas ou parasitas por não poderem assimilar o carbono atmosférico em virtude de serem desprovidas de clorofila. Quási todas elas, exceptuando as que são cultivadas nos laboratórios e às quais se pode chamar *leveduras domésticas*, vivem em estado saprofítico, nos logares onde existe açúcar. São os frutos que constituem, em regra, o habitat das leveduras, encontrando-se também nas flôres, nas secreções mucosas das árvores, nos detritos vegetais em decomposição, etc. Um grande número de leveduras são parasitas dos animais e do homem e podem produzir neles várias lesões.

Parasitismo.—O parasitismo das leveduras exerce-se unicamente nos animais e no homem. Èle é conhecido desde muitos anos. Remack e Robin observaram nos intestinos de diversos mamíferos, o *Saccharomycopsis guttulatus*. Metchnikoff descobriu nas Daphnias, a *Monospora*

cuspidata que provoca nos crustáceos, uma doença especial.

Por êstes últimos tempos teem sido descobertas muitas leveduras, ocasionando no homem e nos animais domésticos, diversas doenças designadas por *blastomicoses*. Assim, Raynand, Lucet e Guegen encontraram o *Cryptococcus linguæ pilosæ*, num doente de língua negra pilosa. Achalme e Troisier descobriram o *S. anguinae*, agente das anginas que são clinicamente análogas ao sapinho. Dantec considera igualmente as leveduras como agentes de certas disenterias.

Pensou-se ao princípio que certas leveduras, habitualmente saprofitas, poderiam apresentar, em certas condições, propriedades patogénicas ou tóxicas. Por uma série de inoculações feitas em diversos animais, M.^{lle} Lydia Rabinowitch provou que as leveduras não segregavam toxinas capazes de exercer uma acção prejudicial nòs animais, pois que das 50 espécies de leveduras inoculadas, sómente sete foram patogénicas para o coelho e para o rato, e nenhuma para o cobaio, e a morte dêsses animais, parecia ser para ela, por infecção e não por intoxicação.

Não considerando as infecções secundárias, pelas leveduras, de diversas lesões da pele, mucosa e mesmo das vísceras, são raros os casos em que as leveduras exercem um papel patogénico real e exclusivo. As *blastomicoses* parecem ser, doenças excepcionais.

Filogenia das leveduras

As leveduras seriam espécies autónomas ou representariam simplesmente uma forma de evolução dos fungos filamentosos mais desenvolvidos, vivendo em estado de leveduras durante o outono e tomando no inverno uma forma miceliana?

Tal é a questão que foi discutida durante longos anos.

O desconhecimento da origem das leveduras e do seu ciclo evolutivo complicava a solução do assunto. Sabia-se que a levedura de cerveja era transmitida desde longos anos por meio de sucessivas passagens laboratoriais, podendo-se mesmo dizer que as leveduras actualmente utilizadas na indústria, remontam aos tempos egípcios. Mas se a levedura de cerveja pode ser *domesticada* e profundamente modificada pela cultura do homem, e, fixar-se definitivamente em estado de levedura,

donde proviria a levedura do vinho e como seria transportada à superfície das uvas, onde elas vivem habitualmente? Pasteur observou que na uva, a levedura existe sempre associada a um outro fungo, *Dematium pullulans*, que se encontra nas vinhas durante todo o ano. Baseando-se neste facto, êste sábio considerou a levedura como uma transformação do Dematium, tanto mais que êste fungo apresenta no seu desenvolvimento, formas levedurais. Mas, bem depressa teve de abandonar esta ideia, em consequência das experiências do seu aluno Chamberland que demonstrou claramente que as leveduras de Dematium não tinham nenhuma relação com a levedura do vinho, visto não poderem produzir a fermentação alcoólica.

O problema da posição das leveduras na classificação dos fungos, estava pois subordinado ao problema da sua origem, e tanto um como o outro, só poderiam ser resolvidos pelos seguintes métodos: *a)* obtendo a transformação dos fungos em leveduras ou vice-versa; *b)* fazendo um estudo minucioso do ciclo evolutivo das leveduras, na natureza; *c)* estudando a morfologia e a citologia das leveduras, pelo qual se chegasse a provar, nos Saccharomices, a existência de caracteres especiais que os distinguem das outras leveduras, fazendo com que sejam considerados um grupo autónomo.

Numerosas experiências, com o fim de se conseguir a transformação dos fungos em verdadeiras leveduras, deram resultados negativos, parecendo portanto que elas devem constituir um grupo áparte.

Para Jörgensen, as leveduras derivariam, não das leveduras ordinárias do Dematium, mas das suas leveduras, desenvolvidas em condições especiais. Para êste autor, as leveduras do Dematium transformar-se-iam em verdadeiros Saccharomices, possuindo a propriedade de formar esporos internos e de produzir a fermentação alcoólica, sómente quando estivessem nas uvas, à temperatura de 20° aproximadamente.

Os trabalhos de Seiter, Klöcker e Schiönning vieram demonstrar com precisão que os resultados obtidos por Jörgensen e outros, provinham das impurezas da cultura. Êstes autores tentaram igualmente, por meio de experiências, transformar certos fungos em leveduras, sem todavia chegarem a obter tal resultado.

O estudo do ciclo evolutivo das leveduras na natureza, foi iniciado em 1881 por Hansen que tomando para objecto da sua observação o *S. apiculatus*, fácilmente reconhecível em virtude da forma especial das suas células, chegou à conclusão de que é a chuva e a queda dos frutos que transportam as leveduras para o solo onde elas hibernam, em regra.

As experiências de Müller-Thurgan e Berlese

obtiveram o mesmo resultado e o próprio Hansen, estudando mais tarde o ciclo evolutivo de diversas outras leveduras, notou que em todas elas o ciclo era idêntico ao do *S. apiculatus*.

Como é que essas leveduras são depois transportadas do solo para a superfície dos frutos? O ar parece desempenhar um importante papel no transporte das leveduras, e a sua existência em grande quantidade, no ar, principalmente durante o estio e o outono, foi observada por Chamberland. Hansen constatou igualmente a existência das leveduras nas poeiras atmosféricas e o papel que elas desempenham para o regresso das leveduras para a superfície dos frutos na época da sua maturação. Nesta ocasião, as leveduras, encontrando uma temperatura mais elevada e o meio de cultura mais favorável para o seu desenvolvimento, multiplicam-se activamente, favorecendo assim a sua disseminação nas poeiras.

Boutroux descobriu a existência dos *S. cerevisiæ*, *elipsoideus* e *apiculatus* em vários insectos, tais como moscas, abelhas, formigas, etc., demonstrando assim o importante papel que os insectos desempenham no transporte das leveduras.

Wortmann e Berlese são também de opinião que são principalmente os insectos que transportam as leveduras de uma vinha para outra. Para Berlese o transporte não se faria simplesmente pelas patas dos insectos. É de opinião que as leveduras podem

atravessar o tubo digestivo, sem morrer. Esta hipótese foi confirmada pelos trabalhos de Neumayer, demonstrando que as leveduras eram resistentes aos sucos digestivos.

Quanto à morfologia e a citologia das leveduras, trabalhos recentes vieram demonstrar de uma maneira indiscutível, a natureza ascogénica das leveduras, a sua autonomia e o seu parentesco com os Ascomicetas. Os caracteres morfológicos e citológicos da asca das leveduras apresentam verdadeiramente, grande analogia com a asca dos Ascomicetas. Os ascosporos desenvolvem-se por processos idênticos, apresentando ainda, em certas leveduras, formas características, absolutamente análogas às dos ascosporos de certos Ascomicetas. Finalmente, a descoberta da copulação na origem da asca, nos Schizosaccharomices, veio demonstrar, juntamente com os caracteres morfológicos e citológicos das ascas das leveduras, a sua autonomia e comprovar a sua entrada no grupo dos Ascomicetas. A questão da origem e da posição das leveduras está hoje definitivamente resolvida.

As Tórnulas e as Micodermas, acerca das quais já me referi no capítulo anterior, são leveduras que não esporulam e como tal devem ser separadas da família dos Saccharomicetáceas ou leveduras verdadeiras, visto a sua origem e a sua posição na classificação, não estarem ainda estudadas.

atravessar o tubo digestivo, sem morrer. Esta hipótese foi confirmada pelos trabalhos de Neumayer, demonstrando que as leveduras eram resistentes aos sucos digestivos.

Que lugar devem ocupar as leveduras, na classificação dos Ascómicetas? Durante muitos anos, dentre os fungos que se assemelhavam às leveduras, conhecia-se apenas as Exoásceas que, pelos caracteres das suas ascas e pelas formas levedurais, fazem lembrar imenso os Saccharomices. As pesquisas de Dangeard e de Ikeno demonstraram contudo que a asca das Exoásceas encerra no início, dois núcleos, que se fundem num só, pouco antes das divisões nucleares, afim de formarem oito ascósporos. As leveduras pelo contrário, diferem das Exoásceas por não apresentarem fusão nuclear, na asca.

Conhecia-se desde muitos anos a família das *Endomycetáceas* que possui espécies muito vizinhas das leveduras. Desta família, só os géneros *Eremascus* e *Endomyces* são bem conhecidos. O género *Eremascus* possui as espécies *E. albus* e *E. fertilis*. Este último foi descoberto e estudado por M.^le Stoppel que o descreve do seguinte modo. — Apresenta a forma de um núcleo septuado e ramificado, tendo em geral cada célula um só núcleo. Não produz conídias mas dá origem a um considerável número de ascas, derivadas de uma população isogâmica que se efectua geralmente

entre duas células contíguas, do mesmo filamento, que se unem por meio de pequenos divertículos, desempenhando o papel de gametas que se anastomosam formando assim uma espécie de ponte de união entre as células. O septo que separa as duas células, no meio do canal de copulação, não tarda a desaparecer e uma parte do citoplasma introduz-se então neste canal formando na sua parte média — o *zygosporo*. Neste momento cada uma das células divide o seu núcleo em dois núcleos-filhos, um dos quais fica na célula, e o outro, introduz-se no zygosporo, onde os dois núcleos sexuais se fundem dando origem a um núcleo volumoso. Depois desta fusão, o zygosporo separa-se por meio de um septo transversal, dos dois ramos donde êle proveio, engrossa e transforma-se em asca octosporada absolutamente semelhante à asca da levedura. Os ascosporos germinam, produzindo directamente um micélio e possuem duas membranas envolventes, uma das quais, a externa, se abre no momento da germinação.

Da descrição pode-se concluir a estreita relação que existe entre o *Eremascus* e as leveduras: as suas ascas apresentam os mesmos caracteres e resultam de uma copulação que se encontra igualmente nos *Zygo* e *Schizosaccharomices*; o processo da formação da asca precedido de copulação assemelha-se muito ao das leveduras. É certo que a copulação das leveduras em geral, difere da do

E. fertilis por ser incompleta e chegar à formação de uma asca em forma de haltere, mas o *Sch. octosporus* pode ser considerado como o intermediário entre a copulação do *Eremascus* e a das outras leveduras.

O género *Endomyces* possui maiores afinidades com as leveduras; assim, o *Endomyces fibuliger*, descoberto por Lindner, apresenta muitas semelhanças com o *Eremascus fertilis*. É considerado como um intermediário entre as leveduras e o *Eremascus*, pelo facto do seu micélio, que é formado de células uninucleadas, dar origem, por gemação dos artículos, a uma série de formas levedurais.

Eis a descrição do *Endomyces fibuliger* feita por Guilliermond. O *Endomyces fibuliger* produz conídias que se formam igualmente por gemação dos artículos, e que podem ser comparados em parte às células duráveis das leveduras. Possui ascas análogas às do *Eremascus*, encerrando sómente quatro ascosporos. No processo de formação das ascas, existe igualmente muita semelhança. Tanto no *Eremascus fertilis* como no *End. fibuliger*, são duas células contíguas que produzem protuberâncias com tendência a reunirem-se. Pode-se portanto, considerar o *End. fibuliger* como uma forma derivada de um género vizinho do *Eremascus fertilis*. O *Endomyces fibuliger* constitui um intermediário entre o *Eremascus fertilis* e o *End. capsularis*, descoberto

há poucos anos por Schiönning. Êste último apresenta igualmente um micélio septuado e ramificado, formado de células uninucleadas e fornece, por gemação das células, numerosas leveduras. Produz também ascas idênticas às do *E. fibuliger*, com 4 ascosporos providos de duas membranas e dando origem quer às leveduras quer ao micélio. Mas aqui, ao contrário do que sucede com o *End. fibuliger*, não existe traço nenhum de sexualidade ancestral: as ascas nascem por uma espécie de gemação das células ou mesmo à custa de uma célula do micélio, sem existir nenhuma anastomose prévia, como sucede no *End. fibuliger*. O *End. capsularis* representa pois o grau mais elevado que parecem terem atingido na evolução parthenogenética os descendentes do *Eremascus*.

Os estudos filogenéticos destes fungos parecem realmente provar que o género *Eremascus* representa uma forma ancestral donde proviria uma forma ainda hipotética, vizinha do *Endomyces fibuliger*, mas diferindo dêle pela existência da copulação isogâmica, característica do *Eremascus*. Esta copulação, muito reduzida no *E. fibuliger*, desaparece completamente no *End. capsularis*. Desta forma hipotética derivariam as leveduras, graças à regressão, tanto dos fenómenos sexuais, que tenderiam a desaparecer, como da forma miceliana dando logar às formas levedurais.

Em resumo: o fungo hipotético derivado do *Eremascus* daria origem a dois ramos—um, o *E. fibuliger* e o *End. capsularis*, e outro, os *Zygosaccharomices* e os *Saccharomices*. O género *Saccharomices* representaria uma forma partenogénica derivada do *Zygosaccharomices*, segundo parece demonstrar a existência de formas intermédias nas quais as ascas, apesar de se formarem sem copulação, conservam vestígios de sexualidade.

— Donde proviriam os *Schizosaccharomices*? Guílliermond estudando o *End. Magnusii* e o *E. decipiens* observou que tinham muita analogia com as *Schizosaccharomices*. Eis a descrição destas formas do género *Endomyces* feitas por este illustre micologista. Estes dois fungos assemelham-se muito ao *E. fibuliger*, distinguindo-se dele pelo facto de, em lugar de produzir formas levedurais, dar origem, por dissociação dos artículos do micélio, às células designadas com o nome de oídias; estas depois de se isolarem, são susceptíveis de crescerem e de se septuarem de novo, como as células dos *Schizosaccharomices*. Na sua forma geral a oídia é idêntica à célula do *Schizosaccharomices*, notando-se contudo que citologicamente, o *End. Magnusii* se distingue muitas vezes pelo facto de possuir muitos núcleos. Estes fungos apresentam clamidosporos que nascem como as oídias, por uma dissociação das células do micélio, distinguindo-se contudo

pela existência de uma membrana muito espessa e pelo facto de elas, depois de formadas, cessarem de crescer enquanto não encontrarem condições próprias para a germinação. Êstes corpos, espécies de oídias enquistadas, podem ser comparadas às células duráveis das leveduras. O *E. decipiens* e o *E. magnusii* produzem numerosas ascas que nascem nas extremidades dos filamentos. No *E. decipiens* elas não são precedidas de nenhum acto sexual, ao contrário do que sucede no *E. magnusii*, na qual a asca resulta de uma copulação heterogâmica, muito semelhante ao do *Sch. octosporus*, que se efectua entre um gameta macho e um gameta fema, nascidos na extremidade de um ramo miceliano.

Pode-se pois considerar os *Schizosaccharomices* como derivados de uma forma ainda hipotética, análoga ao *E. magnusii*, mas muito menos evoluído. Desta forma derivariam de um lado o *E. magnusii*, com a sua forma partenogenética, e os *Schizosaccharomices*, e do outro lado, o *E. fibuliger*, os *Zygosaccharomices* e as leveduras que germinam.

Para se obter a fermentação de uma levedura, pode-se utilizar indistintamente baldes ou tubos de ensaio, contendo líquido aquecido até ferver por completo os tubos, além de o ar se renovar muito facilmente.

Para as leveduras, os recipientes utilizados nos laboratórios tais como placas de Petri, tubos de Roux etc. Para os estudos de histologia servem-se de preferência os baldes de Pasteur de Chamberland etc.

Os líquidos favoráveis ao desenvolvimento das leveduras são: o líquido de Raillin, muito favorável à vegetação de certas espécies; o mosto de cer-

Para se estudar uma levedura é necessário conhecer os processos que permitem isolar, cultivar e observar as leveduras. Eis sobre o que versará este capítulo.

As leveduras como as bactérias, cultivam-se bem, tanto nos meios líquidos como nos sólidos, sendo todavia conveniente cultiva-las em meios líquidos ligeiramente ácidos, ao contrário do que sucede com as bactérias que preferem os meios alcalinos.

Para se obter o desenvolvimento de uma levedura num meio líquido, Guilliermond aconselha coloca-la em recipientes de superfícies largas nas quais a camada do líquido nutritivo não deve exceder 1 a 2 cm., de maneira que o ar tenha livre acesso.

Para se obter a fermentação de uma levedura, pode-se utilizar indiferentemente balões ou tubos de ensaio, contendo líquido açucarado até encher por completo os tubos, afim de o ar se renovar muito difficilmente.

Para as culturas de leveduras, emprega-se geralmente os recipientes utilizados nos laboratórios, tais como placas de Petri, tubos de Roux, etc. Para os estudos de fisiologia serve-se de preferênciam os balões de Pasteur, de Chamberland, etc.

Os líquidos favoráveis ao desenvolvimento das leveduras são: o líquido de Raulin, muito favorável à vegetação de certas espécies; o môtto de cerveja, que constitue o alimento de predileção das leveduras, sendo por isto o mais utilizado para a sua cultura, e vários outros como o líquido de Mayer, Hansen, etc.

Os meios sólidos utilizados geralmente, são a batata, a cenoura, etc. Êstes meios são de grande utilidade laboratorial pelo facto de as leveduras se desenvolverem nêles muito activamente, apresentando aspectos macroscópicos característicos para cada espécie e sendo assim de grande utilidade para o diagnóstico da espécie. Além disto é nos meios sólidos que as leveduras esporulam mais facilmente.

Método para se obter a esporulação.— Como já disse num dos capítulos anteriores, para que uma

levedura esporule é necessário que as suas células sejam novas, bem alimentadas e que tenham acumulado no protoplasma, reservas suficientes para a formação dos ascosporos. Para isto, cultiva-se a levedura que se quer fazer esporular, durante 48 horas, num meio nutritivo (môsto de cerveja) que se renova duas a três vezes. Depois de rejuvenescida, submete-se à inanição afim de ela se multiplicar por gemação e formar ascosporos.

O melhor processo para êste fim, é o processo de Engel, mais tarde aperfeiçoado por Hansen e que consiste em colocar a levedura, rejuvenescida e tirada do môsto de cerveja, num bloco de gêsso de superfície lisa. Para se obter as três condições indispensáveis para a esporulação,—livre acesso do ar, temperatura favorável e um certo grau de humidade,—coloca-se um bloco de gêsso num vaso contendo água destilada, em quantidade suficiente para atingir a metade da altura do bloco, de modo que as leveduras encontrem assim, as condições de humidade necessárias para formar os ascosporos. O vaso simplesmente coberto por meio duma tampa, afim do ar facilmente penetrar nêle, é esterilizado ao autoclave, à temperatura de 115°, durante meia hora. Em seguida coloca-se as leveduras rejuvenescidas sôbre o bloco, fecha-se o vaso e coloca-se na estufa à temperatura de 25' e 30'. Ao cabo de 30 horas, encontra-se por êste processo a maior parte das células já esporuladas.

Hansen, afim de evitar a fácil infecção do vaso, pelas bactérias, substituiu o vaso de Engel por um aparelho especial, conhecido hoje pelo nome de frasco de Hansen, e que consiste num frasco cilíndrico fechado por meio de uma rôlha esmerilhada, com um tubo contendo algodão, afim de permitir a entrada do ar. Introduce-se no frasco uma camada líquida de gesso, no meio da qual coloca-se um pedaço de gesso, e esteriliza-se à temperatura de 115°. Depois, por meio de uma ansa de platina, deposita-se no bloco, um fragmento da levedura que se quer estudar, fecha-se o frasco e introduz-se no fundo, uma pequena quantidade de água esterilizada, por meio de um tubo lateral que o frasco possui.

M.^{lle} Gorodkowa preconisa um novo processo que tem a vantagem de ser mais fácil que o de Engel-Hansen e que tem dado magníficos resultados. Consiste simplesmente em cultivar as células levedurais jovens e activas no seguinte meio, que actualmente tem o seu nome:

Água destilada	100	grs.
Gelose	1	gr.
Peptona	1	"
Caldo simples	1	"
Cloreto de sódio	0,5	grs.
Glucose	0,25	"

As leveduras desenvolvem-se rapidamente du-

rante as primeiras horas, mas como a pequena quantidade de glucose, que o meio contém, é insufficiente para a nutrição, elas começam a esporular abundantemente ao cabo de 2 ou 3 dias.

Existem vários outros processos para se obter os ascoporos, mas de todos êles, o método de Engel-Hansen e o de M.^{lle} Gorodkowa são os que dão melhores resultados, na opinião de Guilliermond.

Métodos de purificação e de isolamento das leveduras.—As leveduras vivem em geral associadas às bactérias, aos diferentes fungos e mesmo às várias espécies de leveduras, sendo porisso uma operação muito delicada fazer-se o seu isolamento, principalmente quando se quer isolar umas das outras, as diversas espécies levedurais.

Deve-se a Hansen e a Lindner o conhecimento dos métodos que permitem efectuar com segurança, o isolamento das leveduras.

Os métodos de purificação são dois: o método fisiológico e o método de diluição ou de cultura fraccionada.

Método fisiológico.—Êste método baseia-se no facto de, numa associação, os diversos organismos que a compõem multiplicam-se desigualmente embora colocados num mesmo meio nutritivo e a uma mesma temperatura. É pela concorrência vital que se realisa a selecção das espécies em virtude da

qual, certas espécies morrem ou vegetam dificul-
tosamente, até serem eliminadas pelas espécies mais
fortes. Assim, para se separar uma levedura, de
uma bactéria, cultivava-se vulgarmente, num meio
nutritivo ligeiramente ácido, pelo facto de se sa-
ber que as leveduras encontram nos meios ácidos
condições favoráveis à sua existência, ao contrário
do que sucede com as bactérias que preferem os
meios alcalinos.

Pasteur e Cohn preconizam cultivar, as dife-
rentes espécies levedurais que se quer isolar, em
meios nutritivos, de composição química variada,
e a temperaturas diferentes. Por êste processo, êstes
autores pretendem obter o desenvolvimento de cer-
tas espécies, à custa das outras, todas as vezes que
encontrassem um meio nutritivo e uma tempera-
tura que lhes fôsem favoráveis.

Êste processo, segundo afirma Guilliermond, é
puramente empírico e sem nenhuma segurança,
pois que muitas espécies podem desenvolver-se
simultaneamente e de uma maneira igual, sem se
prejudicarem, caso encontrem condições favoráveis
ao seu desenvolvimento. Além disto, pode suceder
que uma espécie, que tenha eliminado uma outra
pelo facto de ter encontrado boas condições de
vida, seja eliminada por sua vez, por uma outra
espécie que até áquele momento se encontrava la-
tente.

O método fisiológico, embora não nos dê re-

sultados precisos é de grande utilidade quando se queira separar as bactérias das leveduras, o que representa já, a primeira étape para o isolamento de uma levedura.

Para se separar umas leveduras das outras, preconisa-se o seguinte método.

Método de diluição ou de culturas fraccionadas.

— Foi Pasteur o primeiro que empregou para a purificação das leveduras, o seguinte método inventado por Lister para isolar as bactérias. Faz-se uma mistura de gêsso e de uma pequena quantidade de leveduras, dissecadas e reduzidas a pó. Espalha-se na atmosfera, o pó assim obtido, deixando-o cair de uma grande altura e abre-se então muitos balões contendo um líquido nutritivo e nos quais préviamente se tenha feito vácuo. As células espalhadas por êste processo, penetram nos balões e desenvolvem-se lá dentro.

Hansen aperfeiçoou êste método e apresentou dois processos que oferecem toda a segurança necessária.

Métodos de Hansen. — Eis como Hansen descrevê os seus métodos. Deita-se uma pequena quantidade de levedura, na água esterilizada, em uma determinada proporção, agita-se o balão de modo que as células se espalhem na água uniformemente, tira-se então uma gôta dêste líquido e conta-se ao

microscópio o número de células que ela contém. Se a gôta tiver por exemplo 10 células, deita-se uma gôta da mesma dimensão, num balão contendo 20^{cc} de água esterilizada, agita-se o líquido, de modo que as células se espalhem, e em seguida, deita-se 1^{cc} dêste líquido, sucessivamente em 20 balões de líquido nutritivo. Se a operação tiver sido bem feita, 10 dos balões semeados, deverão conter uma só célula, enquanto os restantes 10 não devem conter nenhuma. Para se ter a certeza de que as culturas em desenvolvimento provêm de uma só célula, Hansen aconselha agitar bem os balões e deixa-los depois em repouso para que as células, que se encontravam espalhadas no líquido, se depositem isoladamente, no fundo do balão. Cada célula, multiplicando-se, dará origem a uma colônia separada e distinta das outras.

O segundo método de Hansen consiste no emprêgo de meios sólidos contendo gelatina e gelose. Êste método não é senão uma aplicação do método de Koch, o qual consiste em deitar num balão de gelatina, aquecido a 30°, uma gôta da diluição duma cultura impura. Os germens são espalhados na gelatina, agitando bem o balão. Deita-se em seguida a gelatina numa placa de vidro que se coloca, sob uma campânula esterilizada, numa estufa à temperatura de 22°. Depois de resfriada, a gelatina solidifica-se e os germens espalhados desenvolvem-se em várias colônias.

Hansen empregou para o estudo das leveduras, o método de Koch, substituindo a placa de vidro por câmaras húmidas ordinárias, ou câmara de Böttcher que permitem seguir ao microscópio o desenvolvimento das colónias.

A câmara húmida ordinária compõe-se de uma lâmina, tendo uma pequena escavação na sua parte central, e de uma lamela, na face interior da qual deita-se uma gôta do líquido nutritivo contendo algumas células, obtidas pela diluição, segundo o processo anterior.

A câmara de Böttcher, também chamada câmara de Van Tiegen e Lemounier, compõe-se de uma lâmina de vidro e um anel também de vidro, colado na sua parte central por meio de bálsamo de Canadá. Nesta pequena escavação formada pelo anel, deita-se uma gôta do líquido nutritivo contendo uma ou poucas células levedurais. Por meio d'êste aparelho pode-se examinar ao microscópio o desenvolvimento de uma só célula, durante muitos dias.

O processo de isolamento de Hansen, consiste em deitar na lâmina, que está dividida em 16 quadrados, uma gôta de gelatina nutritiva, aquecida a 30° e contando em diluição, as leveduras que se pretende isolar. Depois de a gelatina se solidificar pelo resfriamento, faz-se a contagem do número das células levedurais que a gôta de gelatina contém. Os quadrados existentes na lâmina facilitam

imenso esta contagem. Depois de se ter observado o número dos quadrados ocupados pelas células, leva-se a câmara à estufa, à temperatura de 25° e por meio de sucessivos exames microscópicos, regularmente intervalados, facilmente se observa a multiplicação das células e a formação das suas colônias.

Lindner preconiza outros métodos mais simples, fundados no mesmo princípio. Dos seus vários métodos descreverei apenas dois,--o método de cultura em gôtas e o de cultura em gotículas. O primeiro consiste no seguinte. Depois de se conseguir, por meio de sucessivas diluições da levedura no mosto de cerveja ou qualquer outro líquido, que uma gôta desta solução nutritiva contenha uma só célula, tira-se por meio de uma fina pipeta, uma pequena quantidade da diluição e cultiva-se numa placa de Petri, previamente esterilizada, depositando em gôtas separadas de modo que cada célula dará origem a uma colônia.

O seu segundo método consiste em tirar, por meio de um estilête muito fino, uma pequena quantidade da diluição das leveduras, que se deita em pequeninas gôtas ou em finas estrias sobre uma lâmina que se coloca em seguida numa câmara ordinária ou na de Böttcher. As gotículas que contêm uma só célula produzirão assim uma cultura pura e o seu desenvolvimento pode ser facilmente examinado ao microscópio.

Conservação das leveduras.— A conservação das leveduras, sem necessidade de as cultivar em novos meios é de uma grande vantagem laboratorial. Ela foi o objecto de estudo, de vários micologistas distintos, durante muitos anos. Actualmente, devido às pesquisas de Hansen chegou-se à conclusão de que o melhor meio para a conservação das leveduras consiste em cultivá-las num líquido a 10 % de sacarose, sem ácido. Êste açúcar não fermenta e é consumido muito lentamente.

Will inventou um outro processo que consiste em dissecar a 40° a levedura, pó de silício, gesso e carvão, e colocar a mistura em caixas metálicas herméticamente fechadas, ao abrigo do ar e de luz. Por êste meio, êste autor conseguiu conservar certas espécies de leveduras durante nove anos.

Esta resistência segundo Hansen é devida aos ascósporos que se formam durante a dissecação.

Conhecidos os meios que permitem isolar as leveduras, é necessário conhecer a maneira de as diferenciar, isto é, reconhecer se a levedura isolada pertence a uma espécie já descrita ou a uma espécie nova e neste último caso a que género e a que espécie ela pertence.

Os caracteres morfológicos em virtude de esta-

rêm sujeitos às variações, não constituem caracteres diferenciais que permitam determinar as espécies. É necessário pois procurar, além destes, outros caracteres distintivos das espécies. Hansen, utiliza como caracteres de determinação: a forma e a dimensão das células, em diversas temperaturas e em diferentes meios; os limites da temperatura para a gemação; a forma dos ascósporos e o seu modo de germinação; o aspecto macroscópico dos véus e das culturas e o seu modo de formação; as propriedades bioquímicas das leveduras, principalmente a sua acção nos diferentes açúcares etc. Lindner acrescenta a êstes caracteres, o aspecto macroscópico das *colónias gigantes*.

Passarei a examinar cada um destes caracteres em especial.

a) Quando se quer estudar uma levedura, o exame deve incidir primeiramente sôbre o aspecto macroscópico do depósito e depois sôbre o aspecto microscópico das células. A forma macroscópica do depósito nas fermentações, pode apresentar aspectos característicos, assim, a levedura pode ficar em suspensão e turvar o líquido ou pode aderir-se ao fundo do tubo, formar gômos, colar-se às paredes etc. Depois de se conhecer o aspecto do depósito, deve-se observar ao microscópio a forma e a dimensão das células deste depósito. Embora as dimensões das células não tenham grande importância, visto serem essencialmente variáveis, o estudo

das suas formas porêm, é de um grande valor pois que há leveduras possuindo formas características que permitem diagnostica-las imediatamente. O género *Hansenia* e o *S. apiculatus*, por exemplo, apresentam células de *tipo apiculado* que permitem diferencia-las nitidamente das outras espécies. O género *Sacchoromycodes* distingue-se facilmente, pelas suas células alongadas, tubulosas, em forma de frasco, e pelo seu modo de multiplicação que fica por assim dizer entre a gemação e a secessão transversal. Os géneros *Torulaspóra* e *Debaryomyces* e muitas espécies de *Tóru*las possuem igualmente algumas leveduras de forma perfeitamente esférica, com um glóbulo de gordura no interior e constituindo o *tipo tórula*. Existem também leveduras de formas alongadas, cilíndricas com um conteúdo hialino, gemando sempre nas extremidades e constituindo o *tipo micoderma*. Mas a maior parte das espécies, apresenta células de forma muito variável, sem nenhum carácter nitidamente diferencial e possuindo sómente uma predominância de uma das formas alongada, elíptica ou esférica.

De uma maneira geral pode-se dizer que a forma da levedura não nos dá indicações suficientes e precisas para o conhecimento do género e da espécie.

b) As temperaturas limites da gemação permitem distinguir entre si certas espécies que te-

nam a mesma forma. Hansen, afim de facilitar o estudo, reuniu em um quadro, as temperaturas máximas e mínimas de diversas espécies de leveduras. Por êste quadro constata-se, que certas espécies suportam temperaturas muito elevadas (46° a 47°), e outras não podem gemar acima de 34°. Hansen demonstrou igualmente que, muitas vezes as leveduras apresentam formas particulares, que nos fornecem um importante elemento para o seu estudo, quando cultivadas à temperatura que lhes são extremas.

c) Na caracterização dos géneros, os caracteres morfológicos da asca e dos ascosporos, o seu modo de germinação e a copulação que precede a formação da asca em certas leveduras, são igualmente de grande importância. Assim, o género *Zygosaccharomices*, caracterizado unicamente pela sexualidade, foi creado por Barker, pelo facto de êste autor ter observado nêle a existência de copulação. Todas as leveduras nas quais a asca resulta de uma copulação, pertencem ao género *Zygosaccharomices*, excepto os *Schizosaccharomices* que apesar de possuir uma copulação análoga, encontra-se separado dêle, devido à sua forma e ao seu modo de divisão celular.

Klöcker, constatou fenómenos sexuais análogos, no *Debaryomyces globosus* que êle considerou como pertencendo a um género novo, baseando-se na forma especial dos seus ascosporos.

O *Nematospora coryli* e a *Monospora cuspidata* distinguem-se também, pelas suas ascas, de grandes dimensões e de forma muito mais alongada que as células vegetativas, possuindo um número fixo de ascosporos (4 na primeira e 1 na segunda) que têm a característica forma de fuso ou de agulha e que servem para determinar nitidamente êstes dois géneros.

A forma dos ascosporos é realmente característica em certos casos, assim por exemplo, na *Willia anomala* os ascosporos têm a forma de chapéu e nos *Schwanniomyces*, a forma anular com uma membrana espinhosa.

A existência dos fenómenos sexuais precedendo a formação da asca e dos ascosporos, dão-nos pois, dados suficientes para caracterizar os géneros *Nematospora*, *Monospora*, *Zygosaccharomyces*, *Debaryomyces*, *Schwanniomyces* e *Willia*.

Fornece-nos também um importante auxílio para a determinação das espécies, o modo de germinação dos ascosporos. Baseado nêlé, Hansen caracterizou o género *Saccharomycodes* no qual os ascosporos sofrem em regra uma copulação no início da germinação, ligando-se depois, dois a dois por meio de um canal de copulação que se alonga produzindo novas células, por um processo que fica entre a gemação e a secessão.

A forma e a dimensão dos ascosporos não apresentam contudo, na maior parte das espécies e

em especial nas leveduras industriais, nenhum carácter específico que sirva para a diferenciação das espécies.

d) Podem também ser utilizados como importantes caracteres diferenciais, o modo de formação e o aspecto dos véus. Segundo Hansen, as leveduras podem ser divididas sob êste ponto de vista em dois grupos. Umas, em que o véu se forma logo desde o início da fermentação e nestas os véus, são de côr cinzenta, muito desenvolvidos, sêcos e plissados. Êste grupo compreende os géneros *Willia* e *Pichia*. As leveduras do segundo grupo formam o véu quando a fermentação já está no fim. Os seus véus são pouco desenvolvidos, húmidos e mais ou menos viscosos. Neste grupo existem leveduras que não formam véu nem anel e outras que formam sómente anel.

A formação do véu e dos ascosporos está sujeita, segundo demonstrou Hansen, às condições de determinadas temperaturas, visto que as temperaturas limites e ótimas das leveduras variam de uma espécie para outra, e êste facto pode servir de grande utilidade para a determinação da espécie.

Os véus podem apresentar caracteres morfológicos característicos tais como — película à superfície, grumos flutuando no líquido, anel em volta do tubo, etc., caracteres que variam segundo as temperaturas em que aparecem.

Os aspectos de vegetação que as leveduras

apresentam nos meios sólidos constituem também importantes caracteres de diferenciação. Assim, a gelatina é rapidamente liquefeita por certas espécies, outras, liquefazem-na lentamente e outras ainda são desprovidas desta propriedade.

Para o estudo de uma espécie é conveniente examinar o aspecto microscópico que apresentam as culturas de leveduras, em gelose, gelatina, cenoura, batata, etc.

As culturas podem ser feitas em placa, estria e em picada. Na primeira, vê-se que as leveduras produzem colónias profundas ou superficiais segundo forem anaeróbias ou aeróbias. Na cultura em picada obtêm-se culturas de aspectos diferentes. As colónias podem ter a forma de um funil ou apresentar zonas concêntricas com estrias radiadas partindo de uma saliência central.

Os caracteres que as culturas apresentam em placa ou em picada, embora de grande utilidade, devem ser considerados com certas reservas pelo facto de os aspectos variarem sob a influência de diversos factores externos, como a qualidade da gelatina, a dimensão e a forma do vaso de cultura, etc. Sómente as colónias obtidas nas culturas por estria é que oferecem formas constantes e que são geralmente análogas às que se observa nas colónias gigantes.

e) O método das culturas gigantes preconizado por Lindner é actualmente utilizado em todos

os laboratórios. Consiste em semear a levedura na parte central da gelatina estendida em grande superfície. Obtêm-se as colónias gigantes em grandes balões contendo uma camada de 2^o de gelatina. Elas dão geralmente em cada espécie um aspecto diferente e característico.

f) A acção das leveduras sôbre diferentes açúcares é também de grande utilidade. É necessário examinar se a espécie desdobra certos açúcares (sacarose, maltose e lactose) e quais são os açúcares que ela fermenta (sacarose, maltose, lactose, rafinose, dextrina, ínulina, etc.).

A maior parte das leveduras não têm acção sôbre a lactose.

Os caracteres que as culturas apresentam em placa ou em picada, embora de grande utilidade, devem ser considerados com certas reservas pelo facto de os aspectos variarem sob a influência de diversos factores externos, como a qualidade da gelatina, a dimensão e a forma do vaso de cultura, etc. Sômente as colónias obtidas nas culturas por estria é que oferecem formas constantes e que são geralmente análogas ás que se observa nas colónias gigantes.

e) O método das culturas gigantes preconizado por Lindner é actualmente utilizado em todos

PARTE II

cento a uma ou a outra destas duas famílias as leveduras devem ser consideradas como uma família distinta, que com a família das Endomycetáceas constitui o grupo das Protoplasmas.

Classificação das leveduras

Hansen divide as Saccharomycetáceas em dois grupos: o primeiro compreende as leveduras que formam um véu fino — em lâminas de ar, só no fim da fermentação. Este grupo compreende os géneros *Saccharomyces*, *Xyloascium*, *Saccharomyces*, *myodes* e *Saccharomyces*. O segundo grupo

Como já se viu nos capítulos anteriores, as leveduras devem ser consideradas como um grupo dos *Ascomycetas inferiores*, muito vizinho da família das *Endomycetáceas* e parecendo derivar de uma forma ancestral, vizinha do *Eremascus fertilis*, do qual proviriam também os derivados das *Endomycetáceas* e as leveduras.

Em virtude das afinidades existentes entre as leveduras e as *Endomycetáceas*, Van Tieghem, agrupa-as na família das *Eremascíneas*.

Hansen considera porém as leveduras como uma forma especial dos *Ascomycetas*, vizinhos das *Exoásceas* e das *Endomycetáceas*, que êle designa com o nome de *Saccharomycetáceas*. Embora entre as *Endomycetáceas* e as *Saccharomycetáceas* existam todos os graus de transição e hajam formas que difficilmente se pode considerar como perten-

cente à uma ou à outra, destas duas famílias, as leveduras devem ser consideradas como uma família distinta, que, com a família das Endomycetáceas, constituirá o grupo das *Protoascíneas*.

Como se divide a família das Saccharomycetáceas?

Hansen divide as Saccharomycetáceas em dois grupos: o primeiro compreende as leveduras que formam um véu mucoso e sem bôlhas de ar, só no fim da fermentação. Êste grupo compreende os géneros *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Saccharomycodes* e *Saccharomyopsis*. O segundo grupo abrange os tipos que formam, desde o início da fermentação, um véu sêco e com bôlhas de ar. Pertencem a êste grupo os géneros *Willia* e *Pichia*. Os géneros *Nematospora* e *Monospora* são considerados por Hansen, um grupo distinto e ao qual êle deu o nome de *Saccharomycetáceas duvidosas*.

Nesta classificação, Hansen exclue os Schizosaccharomyces, que considera um grupo especial de leveduras, tendo mais afinidades com os bacilos endosporados do que com as Saccharomycetáceas. Esta exclusão não tem nenhuma razão de ser, porque, se é verdade que estas leveduras diferem das outras, pelo seu modo de divisão (secessão transversal) elas pertencem incontestavelmente à família das Saccharomycetáceas, pela copulação que, em quási todas elas, precede a formação das ascas. Além disto, elas são vizinhas do género Saccharo-

mycodes cujas células se dividem por um processo intermediário entre a secessão típica e a gemação, constituindo assim uma forma de transição entre os Schizosaccharomyces e as outras leveduras.

A actual classificação divide as Saccharomyce-táceas em cinco grupos:

I. Leveduras multiplicando-se pela secessão transversal e cujas ascas, derivadas de uma copulação, possuem 4 ou 8 ascosporos, providos de uma só membrana.

Compreende apenas os *Schizosaccharomyces* com as suas poucas espécies conhecidas.

II. Todas as leveduras que gêmam e nas quais a formação da asca é precedida de uma copulação iso ou heterogâmica, podendo todavia perder esta sexualidade, mas nestes casos, conservam sempre vestígios dos fenómenos sexuais.

Este grupo abrange: o género *Zygosaccharomyces*, caracterizado unicamente pela copulação isogâmica que precede a formação das ascas; o género *Debaryomyces*, possuindo ascosporos com membrana espinhosa; o género *Schwanniomycetes*, cujos ascosporos além de possuírem a membrana espinhosa têm uma orla saliente; o género *Torulaspóra* com a sua forma esférica e que é incluído neste grupo unicamente pelo facto de as células ascógenas conservarem vestígios de atracção sexual.

III. Leveduras cuja formação da asca não é precedida de nenhum fenómeno de sexualidade e

que nos meios líquidos açucarados vegetam sob a forma de depósito, formando contudo em certos casos, embora tardiamente, um véu mucoso.

Abrange o género *Saccharomycodes* cujas células se multiplicam por um processo que fica entre a secessão transversal e a gemação, sendo porisso considerado, como uma forma de transição, entre os *Schizosaccharomyces* e outras leveduras.

Este género é também caracterizado pela tendência que possui, em produzir formações micelianas muito desenvolvidas, e pela substituição da sexualidade ancestral, num estado ulterior de desenvolvimento, por um fenómeno compensador ou *parthenogamia*, que consiste na fusão dos ascosporos.

Pertencem também a este grupo os géneros *Saccharomyopsis*, *Saccharomyces* (1) e *Hansenia*.

O primeiro é caracterizado por possuir ascos-

(1) Hansen juntou as numerosas espécies que possui o gen. *Saccharomyces* em 6 sub-grupos, distintos pelos seus caracteres de fermentação:

1.º Os *Saccharomyces* que fermentam a sacarose, maltose e dextrose, e não actuam sobre a lactose.

2.º Os *Sac.* que fermentam a sacarose e dextrose, e não fermentam a maltose e a lactose.

3.º Os *Sac.* que fermentam a dextrose, maltose e não têm acção sobre a sacarose e lactose.

4.º Os *Sac.* que fermentam a dextrose mas não actuam sobre a sacarose e lactose.

5.º Os *Sac.* que fermentam a lactose.

6.º Os *Sac.* que não produzem nenhuma fermentação ou cuja acção fermentativa é mal conhecida.

póros de membrana dupla, semelhantes aos de certas Endomycetáceas.

O segundo, compreende as leveduras que na sua maioria não produzem micélio e nos quais os fenómenos sexuais desapareceram completamente excepto em algumas espécies, nas quais a copulação é substituída também, por uma fusão dos ascosporos (partenogamia).

Finalmente, o género *Hansenia* que possui células de formas características e de fácil diagnóstico (apiculadas).

IV. Leveduras, em que não existe nenhum vestígio de sexualidade, na origem das ascas, é que formam nos meios líquidos açucarados, logo desde o início, um véu denso que toma mais tarde o aspecto opáco e sêco, devido à penetração do ar nos seus interstícios.

Este grupo compreende o género *Willia*, caracterizado pelos seus ascosporos de formas excêntricas, e o género *Pichia* que possui ascosporos hemisféricos ou angulosos.

V. Leveduras cujas afinidades são mal conhecidas.

Este grupo é constituído pelas Saccharomycetáceas duvidosas de Hansen, compreendendo sómente o género *Monospora* cujas ascas têm um só ascosporo alongado, em forma de agulha, e, o género *Nematospóra*, possuindo ascas com oito ascosporos fusiformes terminando cada um por um longo micélio.

Além destes cinco grupos há ainda a considerar as leveduras que não esporulam e que estão reunidos no grupo provisório das *Anascosporadas* ou leveduras duvidosas. Dividem-se em 3 grupos: 1.º As *Tórulas*, que abrangem todas as leveduras que não esporulando, apresentam os caracteres do 3.º grupo das Saccharomycetáceas, isto é, leveduras que nos meios líquidos açucarados vegetam sob a forma de depósito, formando contudo em certos casos, mas tardiamente, um véu mucoso, sem ar; 2.º As *Micodermas*, leveduras que formam nos meios líquidos açucarados, logo no início do seu desenvolvimento, um véu muito denso, contendo ar, isto é, todas as leveduras asporógenas que correspondem ao 4.º grupo das Saccharomycetáceas; 3.º As leveduras patogénicas (1) às quais se dá genericamente o nome de *Cryptococcus*.

(1) Gougerot e de Beurmann dividem as leveduras patogénicas asporógenas em 3 géneros:

Atelosaccharomyces.—Género provisório (provém do antigo *Cryptococcus* de Kützing). Possuem células idênticas às do *Saccharomyces*. Ausência de ascas. Nas culturas, encontram-se esboços de micélios formados pela reunião de células gemíparas (pseudo-micélio), mas nunca, formas filamentosas.

Parasaccharomyces.—Possuem os mesmos caracteres dos *Atelosaccharomyces*, apresentando, mais formas filamentosas rudimentares, filamentos verdadeiros e formas oídicas.

Zymonema.—Fungos anascosporados caracterizados por formas levedurais, micélio septuado e ramificado, oídias e clamidosporos.

*
Saccharomycetáceas
* *

Após o estudo da classificação das leveduras, procurarei fazer uma resumida descrição das suas espécies. Mas como ser-me-ia impossível descrever todas as espécies conhecidas, pelo facto de serem numerosíssimas, tratarei apenas de algumas delas, cujos caracteres têm sido já bem estudadas.

Depois de expôr os caracteres das leveduras pertencentes às famílias das *Saccharomycetáceas* e das *Não-Saccharomycetáceas*, mais propriamente conhecidas pelo nome de *Anascosporadas* ou *leveduras duvidosas*, pela sua característica de não esporulação e por ocuparem um logar incerto na classificação das leveduras, descreverei, na parte final dêste capítulo, os caracteres de certos fungos pertencentes à família das *Endomycetáceas*, que pela complexidade do seu micélio acham-se separados das leveduras, mas, cujos caracteres morfológicos e fisiológicos possuem tão íntimas afinidades com as *Saccharomycetáceas* que é por vezes muito difícil fazer a sua diferenciação.

Saccharomycetáceas

Fungos monocelulares que se multiplicam por gemação e cujas células possuem a propriedade de se transformarem em ascas, contendo 1 a 12 ascosporos.

Esta família compreende os seguintes géneros, resumidos em 5 grupos.

I GRUPO

Género *Schizosaccharomices*

Sch. Pombe. Lindner—Descobertas por Saare e Zeidler nos produtos de fermentação do milho africano e descrita por Lindner. Células alongadas e com as extremidades geralmente arredondadas, dividindo-se por secessão transversal. Ao abrigo do ar, as células desenvolvem-se e formam longos tubos, simples ou ramificados, transversalmente septuados. Segundo Guilliermond, as ascas derivam de uma copulação isogâmica. Esta fusão é em regra incompleta e a asca dela proveniente, é constituída por dois engrossamentos unidos por meio de um estreito canal. É destes engrossamentos, que provêm por partenogénese os ascosporos, que são sempre em número de 4. Não forma véu nos líquidos

açucarados. Liquefaz a gelatina. Fermenta a maltose, sacarose, dextrose, levulose, rafinose e às vezes a dextrina e a inulina. Não fermenta a d. mannose. Beijerinck observou nesta espécie levedural a existência de raças esporógenas e asporógenas. As primeiras formam colónias brancas e as segundas colónias escuras, quando cultivadas em gelose.

Sch. Octosporus. Beijerinck — Descoberta por êste autor e por Schiönning, nas uvas de Corinto. Células esféricas ou rectangulares, com as extremidades arredondadas, e cuja multiplicação se faz por secessão transversal. A asca que é oval, forma-se por um dos seguintes processos: *a)* pela fusão de duas células irmãs; *b)* pela fusão de duas células não provenientes de uma mesma célula; *c)* pela partenogénese. Os ascosporos em número de 4 ou 8, de forma elíptica, são envolvidos numa fina membrana amiloide. As culturas em gelose, são redondas, convexas e escuras na parte central. No môsto gelosado desenvolvem-se colónias de côr branca, castanho e colónias ligeiramente acastanhadas. As primeiras são compostas de células que dão origem aos ascosporos, as segundas, contêm apenas as células vegetativas, e as terceiras, possuem ascas e células vegetativas. Não produz véu. Liquefaz a gelatina. Fermenta a maltose, dextrose, levulose, d. mannose, rafinose e dextrina. Não tem acção sôbre a sacarose e sôbre a lactose.

Sch. Mellacei. Jörgensen — Descoberta por P. Greg, na sacarina utilizada em Jamaica, na fabricação de rum, e descrita por Jörgensen e Holm. Células quási idênticas às do *Sch. Pombe*. Ascas formadas por copulação isogâmica ou por partenogênese. Os ascosporos, em regra 4, provêm das extremidades da ascas e têm a forma alongada, com uma delgada membrana envolvente, de natureza amiloide. Não forma véu, mas sim um anel, ao cabo de alguns meses. Fermenta a maltose, dextrose, levulose e sacarose.

II GRUPO

Gênero *Zygosaccharomyces*

Zyg. Barkeri. Sacardo-Sydow — Descoberta por Barker, numa solução de sacarose e descrita pela primeira vez por Sacardo e Sydow. Células ovais. Ascas provenientes de uma copulação isogâmica igual à do *Sch. Pombe* e *mellacei*. Dois a quatro ascosporos, derivados das extremidades das ascas. Não produz véu, formando porêem um anel, ao cabo de 10 a 15 dias. Fermenta a dextrose, levulose, sacarose, não tendo acção sôbre a maltose, lactose e dextrina.

Zyg. Prioranus. Klöcker — Isolada por Klöcker do corpo das abelhas e descrita pelo mesmo bacterio-

logista. Células alongadas, arredondadas ou ovais e quási sempre ligadas entre si. Ascas precedidas de uma copulação isogâmica igual à do *Zyg. Barkeri* ou formado por partenogénese. Os ascosporos em número de 4 provêm dos engrossamentos existentes nas extremidades da asca. Forma um espêsso anel e raramente um ligeiro véu. Colónias com o aspecto característico de uma cúpula. Fermenta a dextrose, levulose e maltose. Não fermenta a sacarose e lactose.

Zyg. Japonicus. Saito—Descoberta por Saito em certos produtos de fermentação. Células redondas ou ovais, formando muitas vezes longos filamentos micelianos, compostos de curtos artículos. Ascas formadas por copulação e de forma idêntica às anteriores, com 1 a 4 espóros esféricos possuindo pequenos gránulos no seu interior. Produz um véu branco, ao princípio muito fino, e que engrossa cada vez mais, formando pregas. Colónias em forma de círculos concêntricos, interrompidos por ligeiros sulcos. Cultura em gelatina, de côr amarelada, saliente na parte central e delimitada por um sulco marginal. Fermenta a dextrose, levulose e maltose. Não actua sôbre a lactose, sacarose, rafinose e inulina.

Zyg. Lactis a. W. Dombrowski—Isolada da manteiga, pelo Prof. Jensen e descrita por Dombrowski.

Células redondas. Asca precedida de copulação com 1 a 4 ascosporos. Forma véu pouco denso. Colónias, em regra de forma circular. Cultivada por picada, só se desenvolve até uns 3 cm. da superfície. A colónia gigante apresenta o aspecto crateriforme. Fermenta a lactose, sacarose, dextrose, não tendo acção sôbre a maltose.

Género *Debaryomyces*

Deb. Globosus. Klöcker — Descoberta por Klöcker na ilha de S. Tomé. Células de forma esférica. Ascas formadas por partenogénese ou por copulação, que, em certos casos se realiza entre uma célula adulta e um gômo formado momentos antes pela mesma célula, e que se encontra ainda, ligado a ela. Ascosporo em geral único, de forma globular, com pequenas saliências à superfície e tendo no seu interior um glóbulo de gordura. Produz um anel muito delgado e não forma véu. As colónias gigantes após uns 25 a 30 dias apresentam uma cor branco-acinzentada. Fermenta a dextrose, levulose, rafinose e dificilmente a inulina. Não fermenta a maltose, nem a lactose.

Género *Schwanniomyces*

Schw. Occidentalis. Köcker — Descoberta por Klöcker juntamente com o *Deb. globosus*. Células elíp-

ticas ou esféricas. As ascas, formadas por partogénese, possuem um esporão, que não é senão o vestígio da copulação ancestral, por meio do qual elas procuram ligar-se, antes de esporular, sem todavia o conseguirem. Cada asca tem um só esporo, dividido em duas partes desiguais, por meio de uma delgada saliência que o contorna quasi completamente. Forma um ligeiro véu e um anel espesso. As colónias gigantes são de côr branco-cinzenta e brilhantes, e com um bordo irregular. Fermenta a dextrose, levulose, rafinose e inulina, não actuando sobre a maltose e sobre a lectose.

Género *Torulaspora*

Torulaspora Delbrucki. Lindner—Descoberta por Lindner, numa cerveja inglesa. Células redondas com vacúolos e granulações. Ascas com esporões idênticos aos da espécie anterior e possuindo 3 a 5 ascosporos. Fermenta a dextrose, levulose e d. mannose.

S. Lactis y. *W. Dombrowski*—Isolada por Collan e descrita por Dombrowski esta levedura foi incluída no género *Torulaspora*, apesar de possuir caracteres diferentes deste género, pelo facto de as suas ascas provirem de células que apresentam vestígios de copulação. Células ovoides ou esféricas, com glóbulos de gordura e possuindo um

esporão, quando pertençam ao grupo das células destinadas a esporular. Ascas contendo 1 a 2 esporos, brilhantes e com uma gota de gordura na sua parte central. As culturas em gelatina, em placa, tomam uma forma redonda e quando cultivadas por picada desenvolvem-se mais intensamente, na parte superior. As colónias gigantes têm a forma de um botão central, donde partem finos raios para a parte periférica, constituída por círculos concêntricos. Forma véu e anel. Fermenta a sacarose, dextrose, não actuando sobre a maltose e sobre a lactose.

III GRUPO

Género *Saccharomyces*

Sac. Ludwigii. Hansen — Descoberta por Ludwig na secreção mucosa do carvalho, associado ao *Endomyces Magnusii*, tendo porisso este micologista, considerado esta espécie como uma forma de desenvolvimento do *End. Magnusii*. Células elípticas, alongadas, tubulosas, etc. Nas culturas antigas, produz formações micelianas, com septos e ramificações, muito semelhantes aos verdadeiros micélios. As ascas são redondas, bi ou tetrasporada e os seus esporos encontram-se quasi sempre unidos entre si. A germinação é precedida de um processo comparável à partenogamia. Forma véu. Fermenta

a dextrose, d. mannose, lévulose e rafinose. Não fermenta a maltose e a lactose.

Gênero *Saccharomycopsis*

Sacc. Guttulatus. Scchiönning—Descoberta por Remack e Robin. Células grandes, ovais ou elípticas e em geral unidas às outras, pelas extremidades. Ascas com 1 a 4 esporos ovais, munidos de uma dupla membrana envolvente. Não forma véu. Fermenta a dextrose.

Gênero *Saccharomyces*

S. Cerevisiae. Hansen—Células arredondadas ou ovoides, reunidas, às vezes, em cadeias simples ou ramificadas. Ascas mono ou tetrasporadas, com esporos refringentes. Produz véu, sómente à temperatura de 20° a 34°. Fermenta a sacarose, dextrose e maltose. É inactiva para a lactose.

S. Carlsbergensis. Hansen—Células redondas, ligeiramente aguçadas numa das extremidades, pelas quais se juntam, formando pseudo-micélios. Os ascoporos são raros. As colónias gigantes tomam a forma de uma roseta, tendo na parte central uma ligeira depressão, circundada por um anel saliente. Não forma véu. Liquefaz lentamente a gelatina.

Fermenta a sacarose, maltose e dextrose não actuando sobre a lactose.

S. Marxianus. Hansen—Encontrada nas uvas, por Marx e descrita por Hansen. Células ovais apresentando formações micelianas devido à sua junção. Cultivadas em gelatina produzem verdadeiros micélios, septuados. Ascas com esporos esféricos ou ovais. Forma um ligeiro véu. Fermenta a sacarose, dextrose, d. mannose, levulose e inulina. Não fermenta a maltose, lactose e melibiose.

S. Exiguus. Reess-Hansen—Células pequenas não dando formações micelianas. Fraca formação dos ascosporos e do véu. Fermenta a sacarose, dextrose, levulose, rafinose, dextrina e inulina, mas não actua sobre a maltose, lactose, melibiose e d. mannose.

S. Rouxii. Boutroux—Encontrada no sumo de certas frutas. Células pequenas, esféricas ou elípticas e dispostas em cadeias. Ascas mono ou tetrasporadas. Não produz véu. Fermenta a dextrose e maltose. É inactiva para a sacarose e lactose.

S. Unisporus. Jörgensen—Células ovais e pequenas. Poucas ascas, ascosporos redondos e refringentes e em número de um, em cada asca. Não produz véu. Fermenta a dextrose mas não fermenta a sacarose, maltose e lactose.

S. Fragilis. Jörgensen—Células pequenas, ovais ou alongadas. Produz ascas com esporos redondos ou alongados. Forma véu. Fermenta a lactose, mas não actua sôbre a melibiose.

S. Hanserii. Zopf—Células esféricas ou elípticas contendo um ou mais glóbulos de gordura. Ascas com um ou dois ascosporos esféricos. Não liquefaz a gelatina. Os caracteres de fermentação desta levedura não são conhecidos.

S. Anginae. Achalme e Troisier—Encontrada por êstes bacteriologistas num caso de angina, clinicamente análogo ao sapinho. Células ovoides, isoladas ou em grupo de 8 a 10, contendo um ou dois gránulos refringentes. Ascas tetrasporada. Nos meios sólidos, as culturas são espêssas e de côr rósea. Não liquefaz a gelatina. Fermenta a sacarose.

S. Tumefaciens. Curtis—Observada por Curtis num tumor mixomatoso ao nível do triângulo de Scarpa e num abcesso lombar de um seu doente. Células ovoides ou esféricas providas de uma grossa cápsula que lhes forma uma espécie de auréola transparente. Quando cultivadas, estas células perdem a cápsula e apresentam-se unidas em cadeias de 3 ou 4 elementos. Ascas mono ou tetrasporada. As colónias são punctiformes e fundem-se rápidamente. Não liquefaz a gelatina. Não

forma véu. Fermenta a sacarose. É patogénica para o rato, cão, etc., produzindo sómente lesões locais.

S. Granulatus, Vuillemin e Legrain — Encontrada num hematoma do maxilar inferior. Células ovais ou elípticas, contendo glóbulos de gordura e providos de uma membrana com granulações. Ascas com 1 a 4 esporos esféricos ou elípticos. Nos meios líquidos forma um depósito de côr rósea. Não liquefaz a gelatina. É patogénica para o coelho, produzindo nódulos inflamatórios e abcessos locais quando inoculada por via subcutânea.

Gênero Hansenia

Han. Apiculata, Lindner — Encontrada nos frutos maduros, nas secreções das árvores e em certas flôres. Células ovais, com uma pequena saliência, numa ou em ambas as extremidades, que lhes dá uma forma característica, da qual proveio o nome *apiculatus*. Ascas monosporadas. Hansen e Klöcker conseguiram isolar desta espécie, 4 variedades cuja duração do poder fermentativo era diferente. Fermenta a dextrina e levulose. Não actua sôbre a sacarose, lactose e rafinose.

IV GRUPO

Género *Pichia*

Membranaefaciens. *Hansen*— Isolada por Hansen e Seifert. Células ovais, em forma de chouriço, possuindo muitos vacúolos. Formações micelianas devido à junção das células. Ascas com dois esporos, em regra redondos. Colónias cinzentas ou ligeiramente avermelhadas, em forma dum escudo, com a parte central liquefeita. Segundo Hansen não fermenta nenhum açúcar, mas segundo Lindner fermenta ligeiramente a dextrose e a levulose.

P. Farinosa. *Lindner*— Isolada da cerveja, por Lindner. Células ovais ou alongadas que se reúnem em micélios, simples ou ramificados. As ascas são provenientes de uma copulação e contêm 1 a 4 esporos redondos tendo no seu interior um grânulo refringente. Colónias circulares, com bordo irregular. Liquefaz rapidamente a gelatina. Forma véu nos meios açucarados. Fermenta a dextrose e levulose, não actuando sobre a maltose, sacarose e rafinose.

Género *Willia*

W. Anomala. *Hansen*— Células pequenas, ovais ou em forma de chouriço. Ascas bi ou tetrasporada. Ascosporos hemisféricos, tendo na sua parte acha-

tada, um pequeno rebôrdo saliente que lhe dá o aspecto de um chapéu. A germinação faz-se, produzindo gômos em vários pontos da sua superfície, os quais continuam a multiplicação sem se separarem da célula-mãe. Produz um véu cinzento muito semelhante ao da *Monilia candida*. Fermenta a dextrose. Não tem acção sôbre a sacarose e maltose.

W. Saturnus. Klöcker—Células ovais ou globulares e que mais tarde se tornam redondas, com um glóbulo de gordura e possuindo na sua superfície, um rebôrdo que o cerca completamente em forma de anel e que lhe dá o aspecto do planeta Saturno. Ascas com 1 a 4 esporos que se multiplicam por gemação, precedida às vezes de fusão de 2 ascosporos, acompanhada de fusão nuclear. As colónias apresentam um aspecto crateriforme. Liquefaz lentamente a gelatina. Fermenta a dextrose, rafinose e levulose, não tendo acção sôbre a maltose e lactose.

V GRUPO

Género Monospora

Mon. Cuspidata. Metchnikoff—Células ovais que alongando-se formam ascas monosporadas e em forma de agulha, isto é, aguçada nas extremida-

des. Esta espécie, desde que Metchnikoff a descobriu no estômago das Daphnias, nunca mais foi encontrada.

Género Nematospora

Nem. Coryli. Peglion — Células alongadas ou redondas com membrana de duplo contôrno. Ascas grandes e octosporadas, dispostas em número de 4 e em sentido longitudinal, em cada uma das metades da célula. São alongados, em forma de fuso, tendo numa das extremidades um longo cílio que desaparece no período da germinação do ascosporo o qual se transforma então numa célula curta e delgada.

Anascosporadas

Compreende leveduras que não esporulam e cujo lugar na classificação é incerta.

Neste grupo há a considerar os géneros Torula, Micoderma e Cryptococcus.

Género Tórula

Este género, muito espalhado na natureza, compreende as tórulas das cervejarias ou de diversas origens, tórulas de leite e tórulas coloridas.

Entre as 1.^{as}, além das 7 tórulas que Hansen

descreveu e classificou numerando-as, e das 17 estudadas por Will, temos:

Tórula Brettadomyces de H. Claussen, com as suas raças A e B:

Tórula. A — Células elípticas e às vezes muito alongadas assemelhando-se a filamentos micelianos. Células gigantes com um envólucro espesso e protoplasma refringente, apresentando às vezes, vacúolos onde existe um corpúsculo móvel. Forma véu. Fermenta a dextrose, levulose, sacarose e maltose. Não fermenta a lactose e a dextrina.

Tórula. B — Células quasi idênticas às do tipo A. Forma véu. Fermenta a sacarose, maltose, dextrose, levulose e lactose, não fermentando a dextrina.

Tórula Colliculosa. Hartmann — Células esféricas, com um vacúolo e glóbulos de gordura, que se reúnem às vezes em cadeias de 3 ou 4 elementos. As colónias gigantes apresentam o aspecto de uma verruga muito saliente. Liquefaz lentamente a gelatina. Fermenta a sacarose, dextrose e refinose. Quanto à lactose é fermentada sómente pelas células velhas.

Tórulas de leite

Tórula Lactis. Henze e Cohn — Células ovais, elípticas ou esféricas. Cultivada, em picada, num

tubo de gelatina peptonada, com glicerina a 1 %, forma uma saliência superficial e colónias ao longo da picada donde partem finas ramificações brancas. Não produz véu. Fermenta a lactose, dextrose, sacarose e dificilmente a maltose.

S. Lebenis. Rist e Koury — Células ovais, de contôrno duplo e contendo granulações. Não apresenta formações micelianas. Colónias brancas, transparentes, de bordos circulares e superfície convexa e húmida. Não liquefaz a gelatina. Fermenta a sacarose e maltose, não actuando sôbre a lactose.

Tórulas coloridas

Tórula Pulcherrima. Lindner — Encontrada por êste autor nas uvas e em diferentes frutos. Células elípticas, arredondadas com um grande glóbulo de gordura e envolvidas por uma espessa membrana. As culturas apresentam uma pigmentação vermelha. Fermenta a dextrose, d. mannose e levulose.

Tórula Glutinis. Pringsheim e Bilewsky — Células ovais que se juntam formando pseudo-micélios. Forma véu. Liquefaz lentamente a gelatina. As culturas possuem uma côr rósea. Não fermenta a maltose e inulina.

Gênero *Micoderma*

Mic. cerevisiae. Desm. Hansen—Células de formas variadas, contendo 1 a 3 grãos refringentes. Forma véu logo depois de cultivada. Não produz fermentação alcoólica. Segundo Guilliermond, o *Mic. cerevisiae*, representa, não uma espécie só mas um grupo delas, pois que Lasché descreveu 4 espécies, capazes de produzirem a fermentação alcoólica.

Mic. vini. Desm—Células ovais com 2 vacúolos encerrando grânulos refrigerantes. Estas células, quando gemam, reúnem-se às vezes em cadeias ramificadas que fazem lembrar hifas. De Seynes julgou notar nesta espécie a existência de ascosporos, mas estudos posteriores vieram demonstrar que êsses corpos não eram senão glóbulos de gordura.

Mic. Lebenis. Rist e Konry—Células alongadas que por junção formam pseudomicélios. Colônias acinzentadas, circulares e húmidas. Cultivada em gelatina, desenvolve-se rápida e abundantemente à superfície e lentamente, no trajecto da picada. Não liquefaz a gelatina. Forma véu. Fermenta a maltose, mas não actua sôbre a lactose e sacarose.

Gênero *Cryptococcus*

Cryp. Degenerans. — Encontrada por Roncali num gânglio axilar de uma mulher com cancro do seio. Células redondas, ovais, isoladas ou agrupadas, pobres em granulações e de aspecto homogêneo. Forma véu. Não liquefaz a gelatina. Colônias brancas ou acinzentadas. Não fermenta a sacarose. Patogênico para o cobáio.

Cryp. linguae-pilosae. Vuillemin — Encontrada por Raynaud na língua negra pilosa e estudada por Lucet. Células redondas, ovóides, com membrana de duplo contôrno, protoplasma hialino contendo grânulos refringentes. As células reunidas, formam pseudomicélios. Cultura de aspecto filamentososo, de côr branca e brilhante. Produz véu. Fermenta a levulose. Patogênico só para os animais.

Cryp. Hominis. Vuillemin — Descoberta por Busse, num caso de periostite crônica da tibia. Células redondas ou ovais possuindo uma membrana dupla. Produz véu ou depósito. Não liquefaz a gelatina. Fermenta a dextrose. Patogênica para o coelho, cão e para o ratinho branco.

Cryp. Ruber. Vuillemin — Isolada por Demme, do leite da vaca, da urina dum diabético e das feses

diarréicas das crianças. Células redondas ou ovulares e de côr avermelhada. Forma colónias pequenas, do tamanho de uma ervilha. Liquefaz lentamente a gelatina. É patogénica.

Cryp. Salmoneus. Sartory — Encontrada num caso de estomatite. Células esféricas formando pseudomicélios. Culturas côr de rosa. Desenvolvem-se bem, em todos os meios, quer sólidos quer líquidos. Produz véu. Coagula o leite. Não fermenta a maltose, dextrose e inulina. Não é patogénica para o cão, coelho e cobáio.

Endomycetáceas

Pertencem a esta família os géneros *Endomyces*, *Monilia* e *Oidium*, cujas espécies passo a descrever.

Género *Endomyces*

End. Albicans. Vuillemin — Elementos levedurais esféricos ou ovais, que se reproduzem por esporulação. Filamentos miceliânicos rectos ou curvos, simples ou ramificados, possuindo septos ao nível dos quais se encontra formas levedurais. Estes elementos, que existem também na extremidade terminal do micélio, são mononucleares. Produzem formas de resistência, *clamidospóros*, esféricos, cercados de uma dura e espessa membrana, que dão

origem a elementos levedurais filamentosos todas as vezes que sejam cultivados em meios novos. Ascas elípticas e tetrásporadas. No interior dos filamentos formam-se os *glóbulos internos* que são corpos morfológicamente iguais aos clamidósporos. Vuillemin considera-os também órgãos de resistência. Não produz véu. Culturas brancas cremosas e húmidas. Coagula lentamente o leite. Fermenta a dextrose. Esta levedura, produz aftas do sapinho, *trush* dos autores ingleses e *muguet* dos francêses.

End. Cruzei. Mello e Pais — Isolada das vias respiratórias num caso de asma crónica. Células ovoides ou arredondadas com o protoplasma hialino, e munidas de uma membrana simples e grânulos escuros. Estas células alongam-se, formando filamentos simples ou ramificados e com clamidósporos terminais. Ascas raras, com 2 ou 4 ascósporos circulares. Produz véu. Cultura branco-amarelada. Fermenta a maltose, glucose e dextrose. Não fermenta a levulose, dextrina e lactose.

End. Capsularis. Guilliermond — Formas levedurais ovoides ou elípticas, apresentando às vezes uma saliência aguçada numa das extremidades. Filamentos micelianos ramificados e septuados, tendo cada artículo um só núcleo. Ascas, provenientes dos artículos micelianos, com 4 esporos

ovais e com uma dupla membrana. Produz véu. Liquefaz a gelatina. As culturas no mōsto de cerveja são sêcas, aveludadas e de cōr castanha. Fermenta a maltose, dextrose, levulose, não actuando sōbre a rafinose, lactose e sacarose.

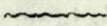
M. Candida. Bonorden— Encontrada por Porak nas aftas duma criança recém-nascida. Células idênticas as do *S. elipsoideus* ou *cerevisiae*. Elementos micelianos fãcilmente dissociãveis. Forma véu nos líquidos açucarados. Fermenta a glucose, sacarose, e a dextrina, na opiniã de Bau.

M. Tropicalis. Castellani— Descoberta por Castellani em alguns casos de broncômicoe, em Ceilã. Células arredondadas ou ovais e micélios, em regra fragmentados. Não tem ascas. Não liquefaz a gelatina. Fermenta a glucose, levulose, maltose e ligeiramente a sacarose.

M. Rosea. Zenoni— Isolada num caso de hepatite febril com icterícia. Células redondas e abundantes micélios no campo microscópico. As culturas em Sabouraud apresentam uma linda cōr rósea. Não liquefaz a gelatina. É patogênico para o coelho, cobãio e para o ratinho branco.

Género *Oïdium*

Oïdium Lactis—Muito espalhada na natureza e nas fermentações industriais, esta levedura é conhecida vulgarmente pelo nome de fermento láctico ou *milk mould*, dos inglêses. Encontra-se também nas conservas de várias espécies, nos excrementos dos animais domésticos, etc. Apresenta o aspecto de uma penugem branca. As culturas formam uma camada uniforme, de côr branca. Micélios irregularmente septuados, com ramificações unilaterais. Conídias provenientes da septuação das extremidades micelianas e da separação dos artículos. Estas conídias alongam-se, dividem-se ou formam tubos germinativos que por sua vez se ramificam e se dividem em conídias de segunda ordem. Liquefaz a gelatina. Coagula o leite. Segundo Lang, fermenta a glucose, lactose e lentamente a sacarose e a maltose. Segundo Castellani esta espécie não fermenta nenhum açúcar, exceptuando a glucose que é fermentada ligeiramente.



PARTE III

Três casos de estomatite ulcerosa de natureza moniliana

Estudo clínico.—A descrição clínica que segue, devemos à amabilidade do Ex.^{mo} Snr. Prof. Pires de Lima.

Muito resumida, pelo facto de não se ter ligado grande importância à doença, que se apresentava, sob a forma de uma estomatite banal, de marcha lenta, ela dá contudo uma ideia bem nítida da evolução que as doenças desta natureza, podem ter.

M.^{lle} M. C. da idade de 12 anos apresenta em junho de 1922 uma intensa estomatite, estendendo-se por toda a mucosa labial, vestibulo da bôca, gengivas, abóbada e véu palatino. Sialorreia abundante, dificuldade de mastigação, deglutição e de fonação, ulcerações em diversos pontos, ectrôpion dos lábios, dôres e pequenas hemorragias nos pontos ulcerados.

Nenhuma elevação térmica. Acha-se curada ao cabo de duas semanas de tratamento, por colutórios de borato de sódica. A doente estivera dias antes, em contacto com duas primas suas, que também apresentavam uma forte estomatite, cuja descrição segue.

Judith, 3 anos de idade, adoece súbitamente no dia 16 de Maio, com febre e agitação. Um ou dois dias depois, manifesta-se uma estomatite de forma aftosa atacando de preferência a face interna dos lábios que se apresentavam tumefactos. Ao fim de 8 dias, a febre (que nunca alcançou 39°) bem como as aftas, tinham desaparecido! A convalescença decorreu sem acidentes.

Celina, irmã de Judith, de 6 anos de idade. Dias depois da irmã, adoece com um início brusco e espectacular: febre intensa (quási 40°) grande agitação (subdelírio). No dia seguinte são-lhe administrados 0,30 de calomelanos e 2 dias depois nota-se uma intensa estomatite, com numerosas aftas na mucosa bucal, gengivas escuras e tumefactas, lábios fortemente edemaciados. Ao fim de 8 dias de tratamento (laxativos, antisepsia da bôca, com água oxigenada e colutórios iodados), a febre e as aftas desaparecem, mas a convalescença é longa, e a tumefacção dos lábios permanece durante algumas semanas.

A doença da M.¹¹⁶ M. C. despertou, no Ex.^{mo} Prof. Pires de Lima, suspeitas da possibilidade de contágio, que parece muito provável neste caso, pois que os três casos constituem uma espécie de epidemia familiar que passaria completamente despercebida se as pesquisas laboratoriais não fornecessem uma tão curiosa contribuição para o estudo da sua etiologia.

A pedido do mesmo Professor, fez-se um exame directo das secreções dos pontos ulcerados, constatando-se uma abundância de elementos do tipo levedura. Fez-se a sementeira em tubos de Sab-gluc. e malt, e ao cabo de 3 dias, vê-se desenvolver nestes tubos uma cultura quasi pura de levedura cujo estudo resolvi fazer, pois que no Curso de Parasitologia, era principalmente o estudo das leveduras patogénicas e saprofitas que as mais das vezes eram distribuído.

Culturas

Gelose.— Ao cabo de 24 h., fraco desenvolvimento, cultura amarela, húmida, brilhante, assemelhando-se a uma cultura bacteriana. No 8.^o dia, a cultura é mais abundante, conservando todavia o mesmo aspecto. Após 3 meses, a cultura toma uma côr ligeiramente acinzentada e apresenta pequenas saliências, pouco maiores do que uma cabeça de alfinete. Ao cabo de 4 meses, a cultura torna-se sêca, encarquilhada e quasi poeirenta.

Sab-gluc. e Sab-malt. — Desenvolvimento fraco, cultura húmida, amarelada e brilhante. Aspecto igual à do meio anterior.

Gorodowka. — Aspecto igual ao da gelose, notando-se só um desenvolvimento pouco mais fraco.

Caldo. — Depósito no fundo. Não forma véu à superfície.

Leite. — Coagulação total. Não produz véu.

Gelatina. — Não há liquefação. A cultura desenvolve-se ao longo do trajecto da picada.

Elementos micológicos. — Cada tubo de cultura foi cuidadosamente examinado ao microscópico, principalmente o meio de Gorodowka. O exame foi feito em diferentes épocas afim de se poder observar todos os elementos micológicos segundo a idade da cultura. Eis os elementos encontrados.

a) Células vegetativas do tipo levedura, redondas e ovalares, contendo ou não, granulações ou vacúolos, apresentando-se muitas vezes em gemação binária ou em cadeias de algumas células formando curtos artículos pseudomicelianos.

b) Células gigantes do tipo levedura tendo um grande vacúolo com a sua periferia tão próxima da membrana celular que se assemelham a cé-

lulas com membrana de duplo contôrno. Êstes elementos tornam-se cada vez mais abundantes, nas culturas antigas.

c) Longos filamentos micelianos, septuados e ramificados com granulações internas, espalhadas irregularmente, gômos laterais que formam mais tarde ramos micelianos ou que evoluem como clamidosporos. O micélio é fácilmente dissociável, dando origem a elementos de dimensões iguais às das células vegetativas.

d) Conídias, situadas nos gômos laterais dos conídioforos, munidos ou não de um curto pedículo, ou dispendo-se em cachos de muitos elementos, ovoides, desiguais e situados na extremidade terminal dos conídioforos.

e) Ausência de ascas.

Poder patogénico.—Tendo injectado 1^{cc} duma emulsão desta levedura (cultura de 48 h.), na veia do coelho, o animal ao cabo de 24 horas apresenta sinais manifestos de doença, recusando-se a alimentar e sucumbindo ao terceiro dia. Á autópsia constata-se macroscopicamente a existência das seguintes lesões: congestão e hipertrofia renal muito pronunciada, notando-se à superfície destes órgãos, pequenos pontos brancos simulando abcessos miliares. Pulmões fortemente congestionados e tendo focos de hepatisação, disseminados pelos dois pulmões. Alguns gânglios torácicos encontram-se

igualmente muito hipertrofiados. Nos outros órgãos não se nota nenhuma lesão apreciável a olho nú. Os frottis do rim dão-nos uma grande quantidade de leveduras. Tendo feito sementeiras com o rim, pulmão, fígado e um gânglio torácico, obtivemos culturas puras da nossa levedura. O coelho morreu pois, de uma septicémia aguda, causada por esta levedura.

Tendo examinado ao microscópio, os cortes anátomo-patológicos dos órgãos afectados, notamos o seguinte. De todos os órgãos examinados, os que se apresentavam mais alterados eram o rim e o fígado.

Em toda a substância cortical do rim, tendo por centro, e, ponto de partida os glomérulos de Malpighi lacerados, encontram-se focos intensos de necrose onde se aglomeram leucócitos, grandes linfócitos, detritos das células endoteliais, leveduras, etc. Á medida que se aproxima da camada medular, as rupturas vasculares vão sendo cada vez mais raras, desaparecendo quási completamente, próximo da papila. Pontos há, em que as embolias, após a ruptura dos glomérulos, foram arrastados juntamente com os fragmentos destes, através dos tubos contornados e porção descendente das ansas de Henle, indo parar na parte mais estreita que estas apresentam, na união dos seus $\frac{2}{3}$ superiores com o $\frac{1}{3}$ inferior.

No fígado notam-se também, focos de necrose,

em tudo semelhantes aos do rim e invadindo um lobo hepático completo, deixando ilesos ou atingidos só em parte, os lobos vizinhos, segundo a ruptura vascular se der, nos capilares intralobulares ou nas artérias interlobulares.

Se atendermos agora à citologia destes dois órgãos, vemos que no rim, junto da papila, onde não há rupturas vasculares e nem embolias, existe um processo de degenerescência, por tumefacção turva, e no fígado, fora dos lóbulos necrosados, nota-se a irregularidade da disposição das células hepáticas que se acham cheios de pigmento biliar e tendo entrado francamente em degenerescência que pertence ao mesmo tipo da do rim.

Se é certo que as zonas de necrose podem ser atribuídas exclusivamente a fenómenos mecânicos, não sucede porém o mesmo, nas partes restantes dos órgãos, onde estes fenómenos não existem. Conseqüentemente não há só perturbações devidas a deficiência de irrigação mas também, alterações devidas aos fenómenos tóxicos.

Quanto ao pulmão e baço, nota-se apenas uma intensa congestão.

Classificação botânica do género da nossa levedura.— Os caracteres que acabamos de descrever, principalmente a ausência de ascas e a existência de micélio dissociável e cachos de conídias situadas na extremidade dos conídioforos, levam-nos a

classificar esta levedura no género *Monilia sensu restricto*.—Gmelin 1791 nec Persoon 1797.

Empregamos o termo *sensu restricto* pelo facto de os patologistas, principalmente os inglêses, considerarem a palavra *Monilia* como sinónimo de *levedura*, dando-lhe a mesma significação que tinham entre nós, as antigas palavras *blastomyces* e *blastomicetas*.

Discussão clínica.—A abundância duma levedura patogénica nas ulcerações bucais de M.^{lle} M. C. leva-nos a considerar a sua estomatite como tendo sido provocada por esta levedura. Parece-nos, que a doença das suas primas era da mesma natureza e que M.^{lle} M. C. adquiriu o contágio por ocasião das suas visitas às doentes.

Afecções desta natureza são muito freqüentes nos trópicos, possuindo as leveduras, como o demonstrou o Ex.^{mo} Prof. Froilano de Melo, na pele, nas mucosas e mesmo nos órgãos, o mesmo grau patogénico e saprofítico das bactérias. Na Europa não se conhecia vulgarmente senão o sapinho (*trush* dos autores inglêses, *Schwänchen*, dos alemães). Doença conhecida desde os tempos mais antigos, ela era denominada *estomatite saccharomictica* ou *oïdiomicose bucal*. Estas duas designações são contudo erróneas, porque o *trush* pode ser produzido por fungos que não pertencem, nem ao género *oïdium* Link 1909 nem à família *Saccharomictá-*

cea. Com efeito as pesquisas de Castellani demonstraram que o *Oïdium albicans* Robin 1851 compreendia pelo menos 2 leveduras, e, que o *trush* (*farfalho* em português e *sapinho* na designação brasileira e indoportuguesa) compreendia um grupo de estomatites produzidas pelos seguintes fungos.

Gen. Oïdium Link. — *Oïdium matalensis* Cast.; *Oïdium rotundatum* Cast.; *Oïdium asteroides* Cast.

Gen. Hemispora Vuillemin: — *Hemispora rugosa* Cast.

Gen. Endomyces Link: — *Endomyces Vuillemin* Landrieux.

Segundo a opinião do Prof. Froilano de Melo e dos partidários do desmembramento das afecções blastomycéticas, que deviam ser separadas dos antigos grupos clínicos, conhecidos pelas suas lesões anátomo-patológicas, e segundo o género da levedura patogénica, nós classificaremos o caso de M.^{lle} M. C. como uma *estomatite ulcerosa moniliana*, tanto mais que os clínicos que seguiram de perto a evolução da sua doença e das outras duas pequenas, reconhecem que a marcha clínica não era semelhante à do *farfalho*.

Classificação da espécie. — Para a classificação das espécies levedurais dum género, baseamo-nos nos elementos fornecidos pelo aspecto das culturas, e nas reacções bioquímicas, principalmente na fer-

mentação dos açúcares. A comparação foi feita segundo o quadro que Castellani publica no *Manual of Tropical Diseases* e por Froilano de Melo no *Ensaio de classificação de fungos pertencentes à classe dos Blastomyces*.

Como Castellani descreveu o género *Monilia sensu lato*, incluindo os géneros *Anascosporados Atelosaccharomyces*, *Parasaccharomyces* e *Zymonema*, as reacções da nossa levedura serão forçosamente comparadas com algumas espécies que devem sair do género *Monilia*, para serem classificadas nos outros géneros acima descritos.

A nossa levedura fermenta a glucose, maltose, lactose, manite e inulina. Infelizmente não conseguimos obter todos os açúcares empregados por Castellani e Chalmers. As espécies descritas por Castellani que não produzem gaz na glucose são: *lustigi* Cast.; *perryi* Cast.; *zeylanica* Cast. A primeira forma gaz na sacarose, não fermenta a lactose, manite e a inulina. A segunda produz as mesmas reacções exceptuando, uma ligeira modificação ácida na inulina. A terceira apresenta as mesmas reacções da nossa; a côr das suas culturas é amarelada e a acidez da inulina muito ligeira, em quanto a nossa acidifica-a fortemente. Na rafinose, a nossa levedura produz só acidez, a *M. Zeylanica* dá ácido e gaz, ambas estas reacções, fracas. Na *M. Zeylanica* não se observa nenhum poder patogénico para os animais.

Apesar destas pequenas diferenças, a nossa levedura assemelha-se muito à *M. Zeylanica* Cast. É certo que não observamos a formação de gaz na rafinose, mas esta reacção na *M. Zeylanica* típica é muito fraca, e em vista da inconstância que se observa muitas vezes nas reacções açucaradas das leveduras, não nos julgamos autorizados a classificar a nossa levedura como uma espécie diferente da *M. Zeylanica* Cast.

Sôbre uma levedura saprofítica extremamente espalhada no Pôrto

Introdução.—O estudo, mais ou menos completo dos fungos saprofitas de uma região, tem grande interesse para a micologia médica, por nos habilitar a excluir facilmente, do grupo dos agentes patogénicos, um grande número de fungos que inquinam por vezes os meios laboratoriais empregados para as culturas. Nas dermatomicoses e nas micoses sistemáticas que classificamos como abertas, por se terem ulcerado ou por incidirem em canais e cavidades que estão em relação com o ar exterior, numerosos são os fungos que acidentalmente vivem nestes logares, como saprofitas ou criando, quando muito, associações mais ou menos graves.

Êste trabalho não tendo por fim insistir em considerações gerais relativas ao assunto, deter-

-nos-emos aqui, não deixando porêr de registrar, que no grupo dos fungos de tipo levedura, que no curso livre de Parasitologia me foi distribuido pelo eminente Prof. desta Cadeira o Snr. Dr. Froilano de Melo, como introdução ao estudo sistemático das blastomicoses no Norte de Portugal, a levedura saprofitica que vamos descrever tem um habitat bastante espalhado no Pôrto e uma história curiosa.

Encontrava-se primeiramente no Laboratório Bacteriológico, inquinando muitos meios de cultura, sobretudo os tubos empregados no estudo das dermatofitias. Nas culturas feitas por um colega do curso, num caso de dermatomicose generalizada do corpo, descrita na tese do Dr. Lima Carneiro como *tinha generalizada*, nota-se a existência de uma inquinação em 17, dos 18 tubos cultivados.

Pensou-se por momentos que o agente daquele interessante caso estava descoberto; a breve trecho porêr uma rápida conferência entre os que no Curso de Parasitologia se têm dedicado aos estudos de micologia, e o desenvolvimento ulterior do mesmo fungo em muitas outras culturas completamente diferentes levou-nos à conclusão de que uma levedura saprofitica, com um habitat extensissimo no Pôrto e que por vezes vinha complicar singularmente o estudo das dermatomicoses desta região.

Culturas

Gelose simples.—Ao cabo de 48 horas a cultura toma uma côr rósea, tendendo para a côr de carne de salmão; a cultura desenvolve-se sob forma cerebrifórme, lembrando ansas intestinais, ou sob a forma de granulações salientes, mais ou menos confluentes. Ao cabo de 3 dias, apresenta o mesmo aspecto, embora pouco mais desenvolvida. No 4.º dia, as granulações confluidas já, formam longas ansas. Após 8 dias apresenta uma côr vermelha (coral) que se acentua cada vez mais.

Sab-malt.—Em 48 horas a cultura torna-se húmida, de côr rósea e cheia de granulações iguais às do meio anterior, tendo a parte central pouco mais escura do que a parte periférica. Até o 3.º e 4.º dia ela apresenta quási o mesmo aspecto, tornando-se talvez pouco menos húmida. No 8.º dia torna-se vermelha (coral) côr que se acentua com a idade.

Cenoura.—Em 48 h.—côr de rosa pálida, arredondada, com pequenas granulações à periferia. No 3.º dia as granulações juntam-se em forma de uma rosêta, forma que tende a desaparecer até o 8.º dia, pela formação de finas estrias ansiformes.

Leite.—Ao 2.º dia nota-se a formação de véu

com finas granulações da côr de tijôlo e comêço da coagulação. Ao 3.º dia, observa-se princípios de caseificação que é mais pronunciada ao cabo de 24 horas, dia em que o depósito se torna róseo, mantendo-se até o 8.º dia.

Caldo simples.—Em 24 h.—Depósito ligeiramente róseo, com finas partículas em suspensão. No 3.º dia nota-se, muitos flócos em suspensão e depósito esbranquiçado, côr que mantem até o 8.º dia.

Caldos malt. e gluc.—Aspectos iguais aos do meio anterior.

Gorodowka.—Cultura sêca e de côr rósea, em forma de ansas intestinais. A cultura desenvolve-se na parede do tubo em forma de crescente. Êste aspecto mantem-se até o 8.º dia.

Açúcares.—Fermenta a glucose, maltose, dulcete, manite e ligeiramente a sacarose. Não fermenta a lactose.

Elementos micológicos.—Um estudo cuidadoso dos elementos micológicos desta levedura, deu-nos:

a) Elementos ovulares e arredondados de tipo levedura, com núcleo e granulações metacromáticas, algumas das quais se encontram em gemação binária.

b) Grupos de células colectando-se em cachos.

c) Curtos artículos de elementos levedurais reunidos, a gemação binária continuando-se sem haver dissociação das células-filhas, originando assim, pequenos elementos pseudomicelianos.

d) Células gigantes, em culturas velhas, fortemente vacuolisadas e com grânulos metacromáticos que poderiam ser erroneamente interpretados com ascosporos.

e) Ausência total de hifas micelianas, formas oídicas, clamidosporos e ascas.

Classificação da espécie.— A nossa levedura pertence ao Gén. *Atelosaccharomyces*, de Beurm e Goug, 1909. Para classificar a espécie, procurámos compara-la com todas as leveduras côm de rosa que se encontram na literatura micológica por nós consultada, mesmo que sejam incluídas em géneros diversos do nosso, visto não haver, nem mesmo actualmente, um critério uniforme para a classificação dos géneros, constituindo isto, uma séria dificuldade para a classificação sistemática, principalmente das leveduras descritas anos atrás e sôbre as quais não encontramos informações detalhadas. Ei-las:

Saccharomyces Granulatus. Vuill. e Legrain. 1900.— Tem ascas.

Zymonema Kochi (von Wettstein). 1885.—As colônias são sempre arredondadas e cobertas de uma camada pulverenta e espessa. O leite é coagulado lentamente.

Cryptococcus Salmoneus. Sarton. 1911.—Não fermenta nenhum açúcar e coagula lentamente o leite.

Monilia rósea. Lenoni. 1912.—Tem filamentos micelianos e cachos conídianos pertencentes ao género *Monilia*.

A única levedura com a qual não conseguimos estabelecer uma diferenciação precisa, por não a encontrarmos suficientemente descrita, é o *Saccharomyces roseus*—Maggiore e Gradenigo. 1896. Encontrada em casos de otite, mas considerada não patogénica, não sabemos se tem ou não ascas. Demos à nossa levedura o nome de *Atelosaccharomyces roseus*. Se o fungo de Maggiore e Gradenigo não tiver ascas, cabe-nos a honra de marcar-lhe o lugar que lhe pertence e de a fazer sair da família das Saccharomycetáceas; se porém a levedura de Maggiore e Gradenigo, é um verdadeiro *Saccharomyces*, então o fungo que inquina os nossos meios laboratoriais é uma espécie nova, à qual, em qualquer dos casos, a designação *Atelosaccharomyces roseus* é bem cabida.

Mais um caso de saprofitismo levedural

Estudo clínico.—Trata-se dum indivíduo, com edêmas nos membros inferiores, edêmas que desapareciam com o regimen lácteo, reaparecendo todas as vezes que se modificasse esta alimentação. O sintoma predominante neste doente era a ardência da língua, que se apresentava quási totalmente revestida dum enduto esbranquiçado estendendo-se até às gengivas, acompanhada de comichão e de sensação dolorosa. Após 4 dias de tratamento (colutórios boratados) o doente apresentou sensíveis melhoras.

O exame dêste enduto, entre a lâmina e lamela, deu-nos abundantes elementos levedurais. As sementeiras feitas em placa de Petri, davam-nos ao cabo de 3 dias muitas colónias de aspecto levedural.

Culturas

Em tubos de gelose simples, as colónias, ao cabo de 3 dias, apresentavam-se — fracamente desenvolvidas, húmidas, esbranquiçadas e com finas granulações, espalhadas. No 8.º dia apresentavam o mesmo aspecto. Ao cabo de duas semanas, a cultura, mantendo o mesmo aspecto, apresentava um desenvolvimento extraordinário.

Nos outros meios sólidos, o aspecto era igual ao do meio anterior, notando-se só, que nos tubos de Sab-gluc. e malt. o desenvolvimento era mais rápido.

No caldo simples, notava-se ao cabo de 48 h. uma ligeira turvação, que no 3.º dia desaparecia para dar lugar a um ligeiro depósito esbranquiçado. No leite, nota-se coagulação completa ao 3.º dia.

Elementos micológicos. — Examinando cuidadosamente ao microscópio as culturas feitas encontramos os seguintes elementos:

a) Elementos cilíndricos providos de finas granulações.

b) Micélios septuados, longos e ramificados unilateralmente.

c) Tubos germinativos formados pela junção das conídias.

- d) Elementos em gemação binária.
 e) Não tem ascas.

Classificação.—A nossa levedura pertence ao *Género Oidium* Link. 1908, emendavit Pinoy.

Para classificarmos a espécie, recorreremos às suas reacções bioquímicas, especialmente à sua acção nos açúcares que tivemos à mão.

A nossa levedura não fermentou e nem produziu gaz em nenhum dos meios açucarados em que foi cultivada.

Comparando esta reacção com o quadro das fermentações açucaradas, das diferentes espécies do *Género Oidium*, que veem descritos no *Manual of Tropical Medicine* de Castellani e Chalmers.

Eis as reacções produzidas por estas espécies:

Lactis. Link. 1809.—Não fermenta nenhum açúcar ou fermenta, muito ligeiramente e com grande inconstância, a glucose.

Asteroides. Cast. 1914.—Fermenta a glucose, levulose, maltose, sacarose, lactose, manite e rafinose, muito ligeiramente. Não fermenta a dextrose e a dulcite.

Matalense. Cast. 1915.—Fermenta ligeiramente a maltose e às vezes, ligeiramente também, a sacarose, galactose e a inulina. Não fermenta a lactose,

manite e a dulcite. As suas reacções são inconstantes na glucose, levulose e na sacarose.

Rotundatum. Cast. 1911. — Fermenta a glucose, levulose. Não fermenta a sacarose. É inconstante na maltose, lactose e na manite.

A nossa levedura é o *Oidium Lactis* Link. 1809.

Sobre uma levedura saprofitando as ulcerações sifilíticas da rinofaringe

Introdução.— Os diversos capítulos do nosso estudo, demonstram que as leveduras vivem no organismo nos mesmos graus de saprofitismo e patogenicidade que as bactérias. Trata-se de uma mulher com extensas ulcerações nas amígdalas e véu palatino. Num exame directo, entre lâmina e lamela, mostra alguns elementos do tipo levedura; o exame ultramicroscópico é positivo para o treponema de Schaudinn. O tratamento específico faz desaparecer rápidamente as lesões, e nos tubos cultivados, nota-se grande desenvolvimento das leveduras.

Chamamo-la saprofita porque as lesões que a doente apresentava, não foram influenciadas pela presença d'êste fungo, nem mesmo a título de uma complicação secundária, como tão frequentemente se vê nas infecções bacterianas associadas.

Culturas

Em tubos de gelose simples a levedura apresentava, o aspecto de uma cultura bacteriana, muito desenvolvida. Nas culturas em cenoura, era branca, húmida, homogénea e brilhante.

Em gelose maltosado e glucosado apresentava o mesmo aspecto.

No caldo simples, bem como no maltosado e glucosado, não havia formação de véu, notando-se, desde o 2.º dia, um depósito pulvurento, branco, sem flocos em suspensão.

No meio de Gorodowka a cultura, ao cabo do 3.º dia, apresenta-se com um grande desenvolvimento, côr branca, húmida, brilhante e homogénea.

Todas as culturas em meios sólidos, após uns 15 dias, tomam uma tonalidade ligeiramente acastanhada.

Elementos micológicos.—A constituição micológica do nosso fungo é das mais simples: células de tipo levedura, em geral ovóides, algumas circulares. No 4.º dia encontram-se esbôços de formações micelianas rudimentares (promicélio), e pseudomicélios, constituídos pela reunião de leveduras, em gemação binária, que continuam multiplicando-se, sem se dissociarem. Não tem ascas.

Classificação.—A nossa levedura pertence ao *Género Atelosaccharomices* de Beurm. e Goug. 1909.

Para a classificação da espécie vamos recorrer às suas reacções bioquímicas, especialmente à sua acção nos açúcares que conseguimos obter:—A nossa levedura fermenta a glucose, lactose, bem como a manite e a inulina. Não fermenta a sacarose e a maltose.

Comparemos estas reacções com o quadro das fermentações açucaradas das diversas leveduras, que Castellani e Chalmers englobam sob a designação lata de Monílias. Neste quadro, as espécies caracterizadas por produzirem apenas ácido e não gaz, nos açúcares, são: *blanchardi*, *burgessi*, *lustigi*, *perryi* e *zeylanica*.

Por indicação do Prof. Froilano de Melo, incluímos nas leveduras a comparar com a nossa, algumas, que no quadro de Castellani trazem a indicação de *Gs. (slight gas)*, por nos ter afirmado aquele Professor que na sua experiência, as reacções *ligeiras* são de uma certa inconstância, por vezes num mesmo *échantillon* proveniente do mesmo tubo ou de edades diferentes. Eis as reacções dêsses fungos:

Blanchardi.—Fermenta a sacarose, maltose e ligeiramente a inulina; fermenta e produz gaz (gs.) na glucose. Não fermenta a lactose e a manite.

Burgessi.— Produz gaz (gs) e fermenta a glucose, sacarose e maltose. Não fermenta a lactose, manite e a inulina.

Lustigi.— Fermenta a glucose e ligeiramente a maltose; fermenta e produz gaz (gs) na sacarose. Não fermenta a lactose e a manite.

Perryi.— Fermenta a glucose, maltose e ligeiramente a inulina; fermenta e produz gaz (gs) na sacarose. Não fermenta a lactose e a manite.

Zeylanica.— Fermenta a glucose, sacarose, maltose e ligeiramente a lactose e a inulina. Não fermenta a manite.

A nossa espécie será intitulada *Atelosaccharomyces portuensis*.

Visto

Pode imprimir-se

A. Salazar

Alfredo de Magalhães

Presidente.

Director.

BIBLIOGRAFIA

CAST E CHALMERS.—*Manual of Tropical Diseases.*

E. KAYSER.—*Les levures, Encyclop des aide-memoires.*
—2.^a edição, 1906.

FRANZ LAFAR.—*Technical Mycology.*—vol. II.

FROILANO DE MELO.—*Some general remarks on medical mycology and mycological technique.*—(Boletim geral de Medicina e Farmácia. V série, n.º 3).

FROILANO DE MELO E FIDELIS FERNANDES.—*Primeira contribuição para o estudo das leveduras da sura do Coqueiro (Cocos nucifera).*—(Arquivos Indo-portuguêses de Medicina e História Natural. Nova Gôa, 1921).

FROILANO DE MELO E GONZAGA FERNANDES.—*Ensaio de classificação de fungos pertencentes à classe dos Blastomyces.*—(Arquivos de Higiene e de Patologia Exóticas, vol. VI, 1918).

FROILANO DE MELO E GONZAGA FERNANDES.—*Sôbre a freqüência do parasitismo das vias respiratórias humanas por fungos do tipo de leveduras.*—(Arquivos de Higiene e de Patologia Exóticas, vol. VI, 1918).

SABOURAUD.—*Les teignes*.—Paris, 1910.

Annales de l'Institut Pasteur.

A. GUILLIERMOND e G. PEJU.—*Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie*.— vol. II, 1919.

DIEZ.—*Dic. etimológico das ling. rom.*—pag. 193.

KÖRTING.—*Dic. latino-românico*.—§ 5552.

MEYER-LÜBKE.—*Dic. etimológico românico*.—§ 5005.

Rev. de filiolog.—Españ. V, 39.

Explicação das gravuras

FIG. A — *Monília Zeylanica*.

Células vegetativas.

Células em gemação binária.

Células gigantes.

Filamento miceliano tendo na sua extremidade um cacho de conídias.

Pseudomicélio.

FIG. B — *Atelosaccharomyces roseus*.

Células vegetativas isoladas e em grupo.

Células em gemação binária.

Artículos de elementos levedurais unidos em cadeia.

Células gigantes.

FIG. C — *Atelosaccharomyces portuensis*.

Células isoladas.

Pseudomicélio formado pela reunião das células.

FIG. D — *Oidium Lactis*.

Elementos cilíndricos.

Micélios septuados.

Tubos germinativos formados pela junção das conídias.

Tubo I — *Monilia Zeylanica* (cultura de 3 meses).*Tubo II* — *Atelosaccharomyces roseus* (cultura de 15 dias).*Tubo III* — *Atelosaccharomyces portuensis* (cultura de 8 dias).Fig. A — *Monilia Zeylanica*.

Células vegetativas.

Células em germinação binária.

Células gemmas.

Estrutura miceliária formada na sua extremidade por co-

nho de conídias.

Pseudomicélio.

Fig. B — *Atelosaccharomyces roseus*.

Células vegetativas isoladas e em grupo.

Células em germinação binária.

Articulação de elementos vegetativos unidos em cadeia.

Células gigantes.

Fig. C — *Atelosaccharomyces portuensis*.

Células isoladas.

Pseudomicélio formado pela reunião das células.

FIG. C

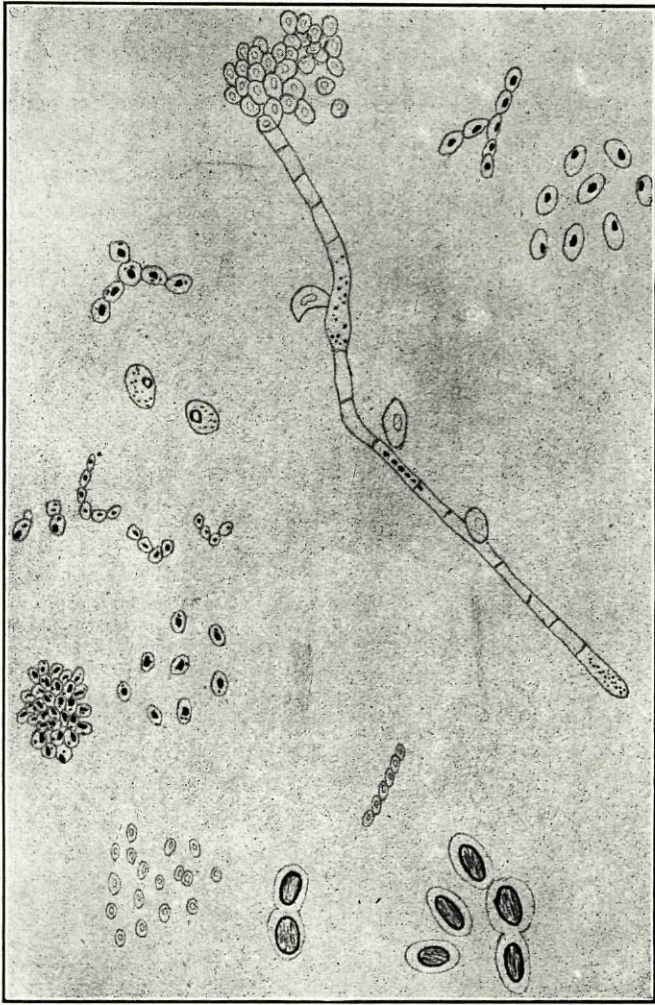


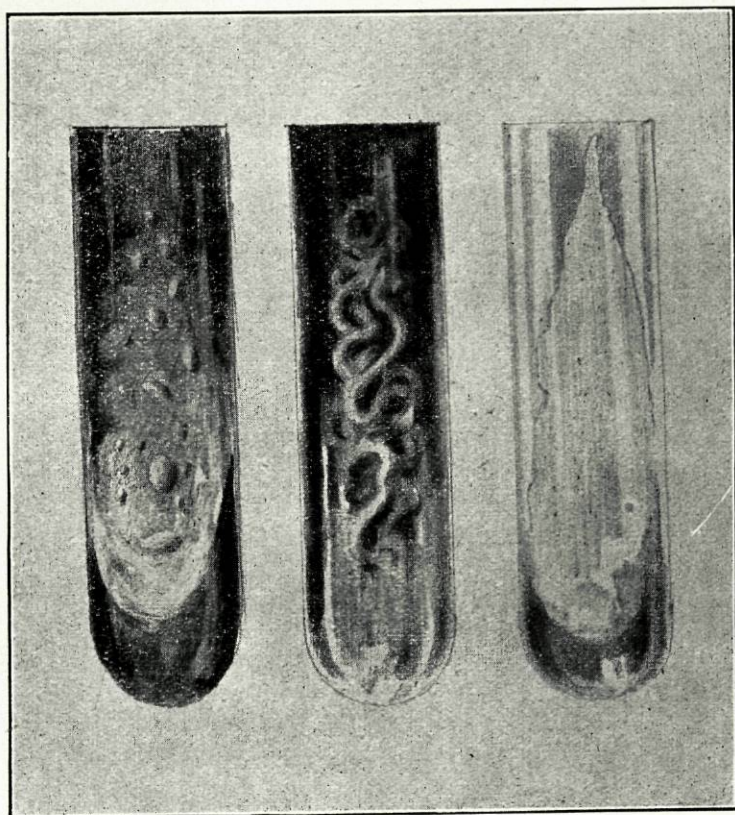
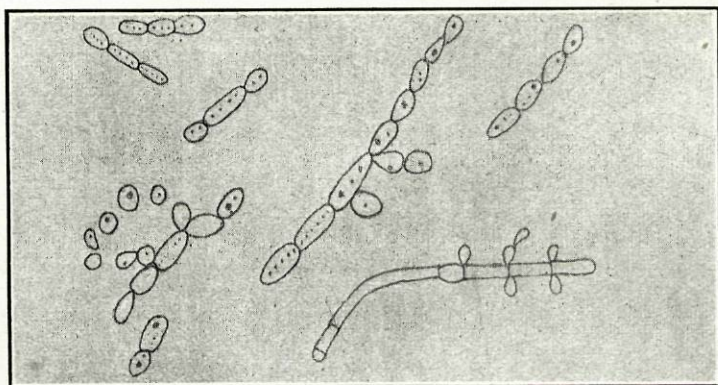
FIG. B

FIG. C

FIG. A

FIG. A

FIG. D

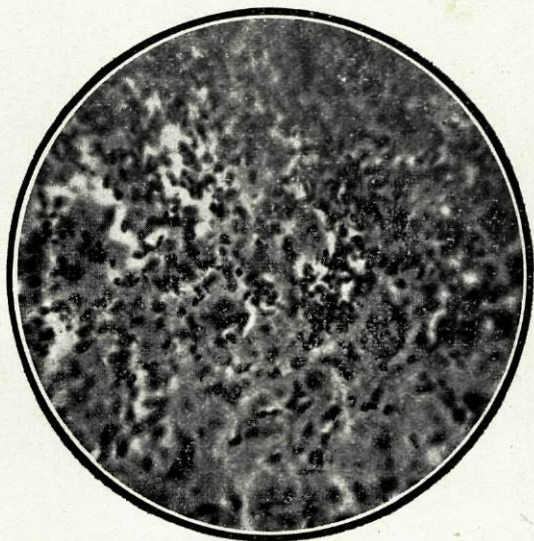
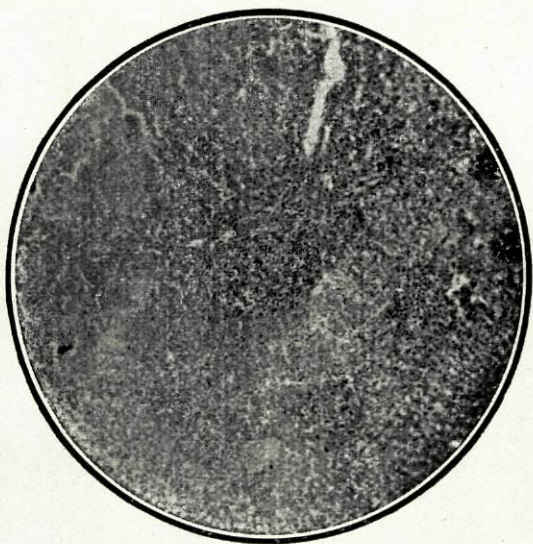


Tubo I

Tubo II

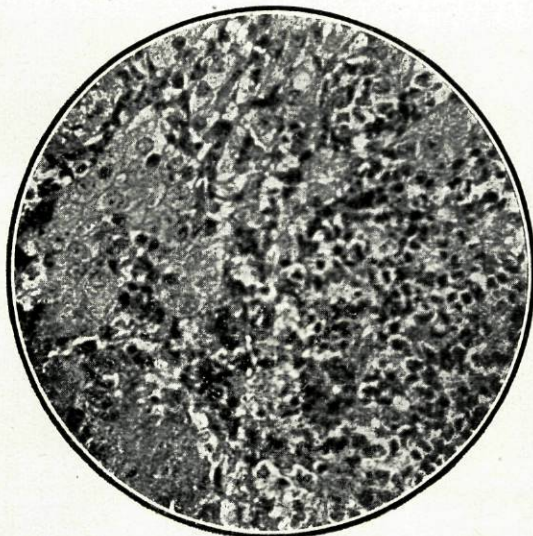
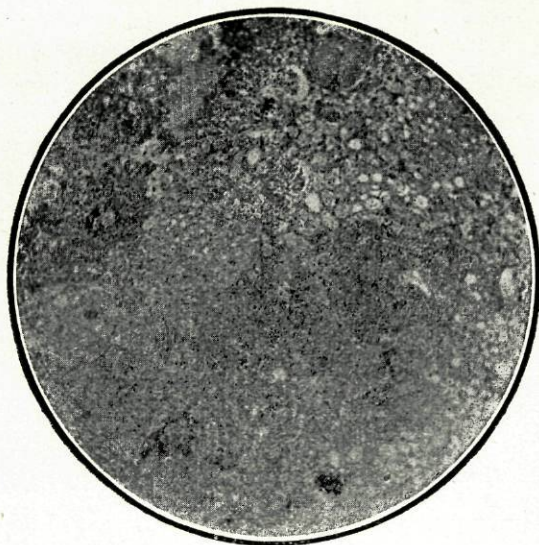
Tubo III

EST. III



Corte do rim. — Obj. 3 e 8 Reichert.
Coloração. — Hemateína-eosina. Fixação. — Líquido
de Bouin.

EST. IV



Corte do rim. — Obj. 3 e 8 Reichert.
Coloração. — Hemateína-eosina. Fixação. — Líquido
de Bouin.

ERRATAS

<i>Pags.</i>	<i>Linhas</i>	<i>Onde se lê</i>	<i>Leia-se</i>
10	12	segunda	terceira
21	14	5 ^m	5 ^μ
"	"	9 ^m	9 ^μ
27	2	5 ^m	5 ^μ
54	13	para o regresso	no regresso
56	21	núcleo	micélio
87	29	micélio	cílio
124	2	que Castellani publica	publicado por Castellani
127	8	micoses sistemá- ticas que	micoses que
128	23 e 25	de que uma	de que se tratava duma
Na Est. III		Corte do rim	Corte do fígado