



UNIVERSIDADE FEDERAL DO DELTA DO PARNAÍBA
CAMPUS MINISTRO REIS VELLOSO
CURSO DE BIOMEDICINA

NEILMA OLIVEIRA DE SOUSA

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS PARA CONSERVAÇÃO LABORATORIAL DE
AMOSTRAS FÚNGICAS PATOGÊNICAS**

PARNAÍBA-PI
2023

NEILMA OLIVEIRA DE SOUSA

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS PARA CONSERVAÇÃO LABORATORIAL DE
AMOSTRAS FÚNGICAS PATOGÊNICAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Federal do Delta do Parnaíba, como requisito obrigatório para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Tatiane Caroline Daboit

PARNAÍBA-PI

2023

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus, pois me sustentou em todos os momentos.

Aos meus pais e familiares, por todo apoio e inspiração nessa jornada.

As amizades valiosas que pude construir nessa trajetória.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a DEUS, por me amparar e me dar forças nos meus dias mais difíceis, e por me proteger e iluminar, por me proporcionar tantos ensinamentos e me ajudar nessa jornada acadêmica.

Também agradeço a minha família, em especial aos meus pais João e Silvana que tanto se esforçaram para me manter em outro estado, e sempre me apoiaram diante das adversidades, são meu exemplo de esforço e dedicação. Agradeço ao meu noivo Robério, meu amor, que esteve ao meu lado nessa caminhada e sempre me incentivou a persistir, acreditando no meu potencial e me apoiando em todas as situações. Minha eterna gratidão a minha vizinha Neuza, meu exemplo de fé, que neste momento se encontra hospitalizada, mas sei que não saio de suas orações.

E de forma especial, gostaria de agradecer aos meus amigos Neto, Jéssica, Tainara e Maria Clara pela paciência e conforto dado a mim, a Cíntia por todo apoio e companheirismo, principalmente nessa reta final de tantos acontecimentos importantes, vocês são essenciais e são luz no meu caminho.

Agradeço ainda a professora Dra. Tatiane Caroline Daboit por me proporcionar a oportunidade de participar dos projetos de um grupo de pesquisa maravilhoso (GEAMICOL) e por tudo que me ensinou, sendo um exemplo de mulher independente, forte e inteligente. Aproveito para agradecer aos colegas maravilhosos que tive o prazer de dividir a bancada do laboratório do GEAMICOL ao longo desses anos, Renata, Gabriela, Samara, Luiz, Jade, Andressa, Beatriz, Rodrigo e Neto com quem eu tanto aprendi, todos vocês foram essenciais nessa caminhada científica.

"Faça o teu melhor, na condição que você tem, enquanto você não tem condições melhores, para fazer melhor ainda!".

- Mário Sérgio Cortella.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Isolado *Fonsecaea pedrosoi* 46428 ATCC após ser submetido aos métodos de Castellani (C), Óleo Vegetal (OV) e *Cotton Balls* (CB), respectivamente, por 6 meses_____27

Figura 2: Isolado *Fonsecaea pedrosoi* 46428 ATCC após ser submetido aos métodos de Castellani (C), Óleo Vegetal (OV) e *Cotton Balls* (CB), respectivamente, por 24 meses_____27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resultado das análises de crescimento das amostras fúngicas após preservação por seis meses nos métodos Castellani (C), Óleo Vegetal (OV) e *Cotton Balls* (CB) em meio ágar Sabouraud _____28

Tabela 2: Resultado das análises de crescimento das amostras fúngicas após preservação por 24 meses nos métodos Castellani (C), Óleo Vegetal (OV) e *Cotton Balls* (CB) em meio ágar Sabouraud _____29

LISTA DE SIGLAS

ASD- Ágar Sabouraud Dextrose

C- Castellani

CB- *Cotton Balls*

GEAMICOL - Grupo de Estudos Avançados em Micologia Médica

OV- Óleo vegetal

SUMÁRIO

<u>1.INTRODUÇÃO</u>	24
<u>2. METODOLOGIA</u>	25
<u>2.1 APLICAÇÃO DOS MÉTODOS</u>	25
2.1.1.Método de Castellani.....	25
2.1.1.Método do Óleo Vegetal	26
2.1.1.Método de <i>Cotton Balls</i>	26
<u>2.2.PERÍODO DE INOCULAÇÃO E OBSERVAÇÃO</u>	26
<u>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</u>	27
<u>4. CONCLUSÃO</u>	32
<u>REFERÊNCIAS</u>	33
<u>ANEXOS</u>	35

Avaliação de Métodos para Conservação Laboratorial de Amostras Fúngicas Patogênicas

Artigo Formatado de acordo com as normas da revista *Research, Society and Development*

Evaluation of methods for laboratory preservation of pathogenic fungal samples

Avaliação de métodos para conservação laboratorial de amostras fúngicas patogênicas

Evaluación de métodos para la conservación en laboratorio de muestras de hongos patógenos

Neilma Oliveira de Sousa

Orcid: <https://orcid.org/0000-0001-9632-0559>

Universidade Federal do Delta do Parnaíba.

E-mail: neilmaoliveira@ufpi.edu.br

Prof. Dra. Tatiane Caroline Daboit

Orcid: <https://orcid.org/0000-0001-5186-7382>

Universidade Federal do Delta do Parnaíba.

E-mail: tatiane.daboit@ufpi.edu.br

Resumo: A micologia médica é uma área que vem ganhando importância, e para melhor realizar os estudos das espécies fúngicas, foi necessário buscar técnicas eficazes para sua preservação. Existem alguns métodos de conservação, porém nenhum é considerado o padrão ouro. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar três métodos de preservação, (*Cotton Balls*, Castellani e Óleo Vegetal) frente a diferentes espécies de fungos patogênicos. Foram utilizadas 17 amostras fúngicas, 13 filamentosas e 4 leveduriformes. Nos métodos Castellani e óleo vegetal, os fungos foram previamente inoculados em ágar Sabouraud, e posteriormente cobertos com água destilada estéril, sendo no segundo método é adicionada uma pequena quantidade de óleo vegetal estéril. No método *Cotton Balls*, foram preparados tubos com bolinhas de algodão, embebidas em ágar Sabouraud e posteriormente receberam os fungos. Todos os métodos foram avaliados após períodos de 6 e 24 meses quanto à viabilidade e presença de contaminação. Os resultados mostraram maior eficácia do método do óleo vegetal quando comparado aos demais, preservando bem tanto fungos filamentosos quanto leveduriformes, apresentando bom crescimento após um período de 24 meses. O método de Castellani demonstrou maior eficácia no período de 6 meses. O método *Cotton Balls* apresentou a pior eficiência na preservação de fungos. Assim, o método do óleo vegetal, por nós desenvolvido, mostrou-se a melhor opção para a conservação de isolados filamentosos e de leveduras em médio prazo.

Palavras-chave: *Cotton Balls* óleo vegetal; Castellani; métodos de armazenamento; viabilidade; contaminação

Abstract: Medical mycology is an area that has gained importance, and in order to better carry out studies of fungal species, it was necessary to seek effective techniques for their preservation. There are some methods for conservation, however, none is considered the gold standard. Thus, this work aimed to evaluate three preservation methods (*Cotton Balls*, Castellani and Vegetable Oil) against different pathogenic fungal species. Seventeen fungal samples were used, 13 filamentous and 4 yeast. O. In the Castellani and vegetable oil methods, the fungi were previously inoculated in Sabouraud agar, grown at the appropriate time and temperature, and subsequently covered with sterile distilled water, but in the second method a small amount of sterile vegetable oil is added. In the *Cotton Balls* method, tubes with cotton balls were prepared, which were soaked with Sabouraud agar and subsequently received the fungi, which grew in adequate time and temperature. All methods were evaluated after periods of 6 and 24 months for viability and presence of contamination. The results showed greater effectiveness of the vegetable oil method when compared to the others, preserving

well both filamentous and yeast fungi, showing good growth after a period of 24 months. Castellani's method demonstrated greater efficacy in the 6-month period. The Cotton Balls method showed the worst efficiency in preserving fungi. Thus, the vegetable oil method, developed by us, proved to be the best option for the conservation of filamentous and yeast isolates in the medium term.

Keywords: Cotton Balls; vegetable oil; Castellani; storage methods; viability; Contamination

Resumen: La micología médica es un área que ha ganado importancia, y para poder realizar mejor los estudios de las especies fúngicas, fue necesario buscar técnicas efectivas para su preservación. Existen algunos métodos para la conservación, sin embargo, ninguno se considera el estándar de oro. Por lo tanto, este trabajo tuvo como objetivo evaluar tres métodos de preservación (Bolas de Algodón, Castellani y Aceite Vegetal) contra diferentes especies de hongos patógenos. Se utilizaron diecisiete muestras de hongos, 13 filamentosos y 4 de levaduras. En los métodos de Castellani y aceite vegetal, los hongos se inocularon previamente en agar Sabouraud, se cultivaron en el momento y la temperatura adecuados y, posteriormente, se cubrieron con agua destilada estéril, pero en el segundo método se agregó una pequeña cantidad de aceite vegetal estéril. En el método de Bolas de Algodón se prepararon tubos con bolas de algodón, los cuales se empaparon con agar Sabouraud y posteriormente recibieron los hongos, los cuales crecieron en tiempo y temperatura adecuados. Todos los métodos fueron evaluados después de períodos de 6 y 24 meses para determinar viabilidad y presencia de contaminación. Los resultados mostraron una mayor eficacia del método del aceite vegetal en comparación con los demás, conservando bien tanto los hongos filamentosos como los levaduriformes, mostrando un buen crecimiento después de un período de 24 meses. El método de Castellani demostró mayor eficacia en el período de 6 meses. El método Cotton Balls mostró la peor eficiencia en la conservación de hongos. Así, el método del aceite vegetal, desarrollado por nosotros, demostró ser la mejor opción para la conservación de aislados filamentosos y de levaduras a medio plazo.

Keywords: Bolas de algodón; aceite vegetal; castellani; métodos de almacenamiento; viabilidad; Contaminación

1. Introdução

No século XIX, na área da microbiologia, a micologia passou a ser mais notada pelo homem e, a partir de tal fato, se fez necessário o aprimoramento de técnicas para o isolamento, cultivo e preservação das espécies fúngicas (COSTA, 2020). Ao estudar os fungos, são realizadas descobertas que reafirmam sua importância, pois possuem propriedades que são úteis para diversos fins. Portanto,

a preservação dos fungos é muito importante, pois assegura que perpetuem-com o passar do tempo sua patogenicidade e capacidade de esporulação, possibilitando dar continuidade às pesquisas que levam às descobertas para indústria ou para fins científicos, por exemplo (FIGUEIREDO,2001; SOLA et al., 2012).

A conservação dos fungos se dá por meio da atenuação ou paralisação do metabolismo celular, o que leva a uma diminuição na variação de células mães e filhas, sendo um dos principais objetivos do uso de métodos para manutenção. Entretanto este não é o único interesse, ela tem o intuito de evitar a ocorrência de mutações indesejáveis e contaminações, que geralmente ocorrem ao longo do tempo com as linhagens que passam por manutenções inadequadas (COSTA & FERREIRA, 2008).

Os métodos para conservação fúngica são classificados em três categorias, de acordo com o tempo de observação em que os fungos são mantidos. Assim, a classificação é de curto, médio e longo prazo. Existem diversos métodos de manutenção, porém os citados em um estudo realizado por Costa e Ferreira (2008), são os mais utilizados na microbiologia. Entre os métodos classificados a curto prazo, o mais usado é o repique contínuo; nos métodos a médio prazo têm-se três opções, sendo elas a aplicação de óleo mineral, uso de água esterilizada (conhecido como método de Castellani) e o congelamento a 20 graus negativos, também chamado de congelamento simples. Dentre os métodos para manutenção e preservação a longo prazo, estão citados a liofilização e a criopreservação (PEGG, 2002). Estudos relatam que até hoje não foi definido um método ideal, que se aplique de forma eficaz a todos os fungos já isolados, uma vez que os mesmos possuem particularidades.

Nesse sentido, se faz necessário dar continuidade a pesquisas na busca de um método que se aplique bem a qualquer microrganismo, que seja compatível ou adaptável às particularidades. Diante do exposto, observa-se a grande importância do estudo das diferentes técnicas de preservação de culturas fúngicas em laboratório, o que poderá possibilitar um considerável avanço nos conhecimentos relativos à biologia desses microrganismos. Assim, o presente trabalho visa avaliar três diferentes métodos de conservação de fungos (*Cotton balls* (CB), Castellani (C) e do Óleo Vegetal (OV)) para avaliar qual o mais eficaz frente a diferentes espécies fúngicas patogênicas.

2. Metodologia

O presente estudo se trata de uma pesquisa experimental iniciada no segundo semestre de 2020. As amostras fúngicas utilizadas foram oriundas da coleção do Laboratório de Estudos Avançados em Micologia Médica (GEAMICOL) da Universidade Federal do Delta do Parnaíba-UFDPar. Foram utilizados 4 isolados de fungos leveduriformes e 13 filamentosos, que contemplam fungos negros (*Cladophialophora carrionii* 68, *Cladophialophora carrionii* 768, *Exophiala spinifera*

AR, *Phialophora verrucosa* 146, *Phialophora verrucosa* ICB, *Rhinocladiella aquaspersa* 691, *Fonsecaea. monophora* 69704, *Fonsecaea pedrosoi* 46428 ATCC), dermatófitos (*Microsporium canis* 43979, *Epidermophyton floccosum* 1, *Trichophyton interdigitale* 73673), *Aspergillus* spp. (*Aspergillus flavus* 58, *Aspergillus fumigatus* 13073), *Candida* spp. (*Candida albicans* 10231 ATCC, *Candida krusei* 6258 ATCC) e *Cryptococcus* spp. (*Cryptococcus neoformans* 32269 ATCC, *Cryptococcus neoformans* 48189 ATCC) . Elas foram repicadas em ágar Sabouraud Dextrose (ASD) e incubadas em estufa à 35 °C durante os dias necessários de crescimento de cada espécie. Posteriormente os mesmos foram submetidos a três diferentes técnicas de preservação de fungos, sendo elas: método de Castellani (C), Óleo Vegetal (OV) e *Cotton Balls* (CB).

2.1 Aplicação dos Métodos

A aplicação dos métodos foi feita em triplicata, portanto cada fungo teve três amostras submetidas a cada um dos três métodos, totalizando a utilização de nove tubos de tampa rosqueável contendo ASD para cada período testado-(seis e 24 meses).

2.1.1. Método de Castellani (C)

Este é um método inserido na categoria de conservação fúngica a médio prazo. Consiste no armazenamento de microrganismo em água destilada estéril, sendo ideal aplicar em culturas jovens, possibilitando a redução metabólica das mesmas (ABREU & TUTUNJI, 2004; DIOGO *et al*,2005; NEUFELD & OLIVEIRA, 2008).

Com o uso de uma micropipeta foi adicionada água destilada e esterilizada aos tubos até o limite do bisel do ágar contendo os fungos já crescidos previamente. Após a realização do processo, os tubos foram vedados com parafilme e colocados em recipientes de plástico com tampa e armazenados na vertical em um armário do laboratório, em uma sala com temperatura entre 18-20 °C.

2.1.2. Método do óleo vegetal (OV)

Neste método desenvolvido por nós, foi utilizado óleo de soja e água destilada, ambos previamente esterilizados. Estes foram inseridos aos tubos contendo as amostras fúngicas com o auxílio de micropipeta, sendo que primeiro foi adicionada água destilada até cobrir o crescimento fúngico e em seguida-adicionada uma camada de óleo vegetal. Após a realização do procedimento,

as amostras foram vedadas com parafilme e armazenadas na vertical, em recipientes de plástico com tampa e em um armário do laboratório, em uma sala com temperatura aproximada de 18-20 °C.

2.1.3. Método de *Cotton Balls* (CB)

Esta técnica consiste na confecção de bolas de algodão que devem ser inseridas em tubos de vidro com tampa rosqueável e posteriormente embebidas com ASD. Segundo a literatura, este é um método de conservação e recuperação de filamentosos recente e simples, quando comparada a outros métodos usuais, tais com a liofilização e criopreservação (Al-Bedak et al., 2019). Foram realizados cultivos de microrganismos em tubos contendo ASD. Após o crescimento foram preparadas suspensões fúngicas utilizando alça microbiológica e solução salina. Com auxílio de uma pipeta, essas suspensões foram inoculadas em tubos contendo algodão embebidos previamente com ASD. Posteriormente, estes tubos foram incubados em uma estufa à 35 °C para crescimento.

Após o período de crescimento, os tubos foram vedados com parafilme e armazenados em um recipiente de plástico com tampa em um armário do laboratório, em uma sala com temperatura aproximada de 18-20 °C-para posterior observação.

2.2. Período de inoculação e observação

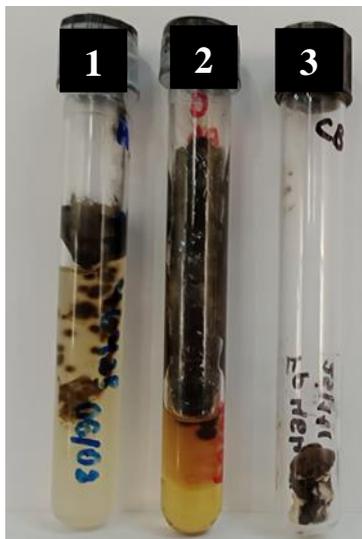
Após os dois períodos de tempo testados (6 e 24 meses), os tubos foram analisados visualmente, em que foram observadas as características gerais das colônias e meio de cultura. Após, a triplicata de cada método foram repicados novamente para tubos de ASD e crescidos à 35 °C, sendo mantidos em estufa pelo período de crescimento indicado para cada tipo de fungo para verificação dos resultados. Os tubos contendo as amostras repicadas foram observadas e quantificadas quantas amostras da triplicata apresentaram crescimento. A partir da análise, tabelas foram construídas, cada uma para um período de armazenamento. Assim, foi realizada a observação da viabilidade das amostras a fim de determinar o método com melhores resultados.

3. Resultados e Discussão

Nas **Figuras 1 e 2** estão, respectivamente, as triplicatas de fungo negro (*Fonsecaea pedrosoi* 46428 ATCC) avaliadas após 6 (seis) e 24 (vinte e quatro) meses nos diferentes métodos de conservação. É possível notar que a técnica em que os tubos mantiveram maior integridade do meio de cultura e do crescimento fúngico foram, OV, C e CB, nessa ordem. No método CB, houve um

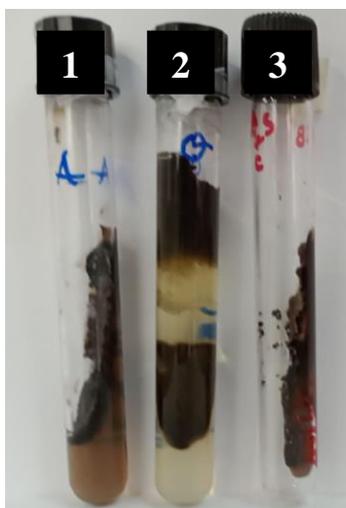
ressecamento intenso tanto do meio quanto no fungo. Essas características se repetiram nas demais classes de fungos avaliados.

Figura 1- Isolado *Fonsecaea pedrosoi* 46428 ATCC após ser submetido aos métodos de Castellani(1), Óleo Vegetal (2) e *Cotton Balls* (3) por seis meses.



Fonte: Autoria própria

Figura 2- Isolado *Fonsecaea pedrosoi* 46428 ATCC após ser submetido aos métodos de Castellani (1), Óleo Vegetal (2) e *Cotton Balls* (3) por 24 meses.



Fonte: Autoria Própria.

Os resultados com relação ao crescimento em ASD após 6 e 24 meses de armazenamento estão apresentados nas **Tabelas 1 e 2**, respectivamente.

Como podemos observar na **Tabela 1** 100% (n=13), dos fungos filamentosos foram capazes de crescer após 6 meses armazenados no método OV, 84,6% (n=11) após o método C e 54% (n=7)

no método CB. Com relação às leveduras, 100% (n=4) cresceram após 6 meses nos métodos OV e C, porém no primeiro, um maior número de tubos da triplicata apresentou crescimento e nenhum isolado cresceu após conservação no método CB. Dentre os fungos negros (n=8), cresceram após os métodos OV, C e CB, respectivamente, 100%, 75% (n=6) e 62,5% (n=5). Com relação aos dermatófitos, houve crescimento de 100% (n=3) após os métodos OV e C, mas de 33% (n=1) após a técnica CB. Sobre as espécies de *Aspergillus* (n=2), 100% cresceu após os métodos OV e C, sendo que mais tubos da triplicata cresceram no primeiro e 50% cresceu após conservação no CB.

Na **Tabela 2** estão tabulados os resultados das amostras fúngicas após 24 meses de estocagem nos diferentes métodos. Sobre os fungos filamentosos, 100% (n=13), 84,6% (n=11) C e 38,5% (n=5) cresceram após as técnicas OV, C e CB, respectivamente. Porém, no último método apenas um tubo da triplicata cresceu em ASD. Com relação às leveduras, 100% (n=4) cresceram após as metodologias OV e C, bem como nenhum cresceu após a CB. Em relação aos fungos negros, 100% (n=8), 75% (n=6) e 50% (n=4) cresceram após as técnicas OV, C e CB, respectivamente. Os dermatófitos (n=3) e *Aspergillus* spp. (n=2) apresentaram crescimento idêntico (100%) nas técnicas OV e C, e não cresceram após a técnica CB. Vale ressaltar, que um número maior de tubos da triplicata cresceu em ASD para o segundo grupo de fungos após submetido à metodologia OV, quando comparada ao método C.

Tabela 1: Resultado das análises de crescimento das amostras fúngicas após preservação por seis meses nos métodos Castellani(C), Óleo Vegetal (OV) e *Cotton Balls* (CB) em meio ágar Sabouraud.

Isolados	Viabilidade		
	Castellani*	Óleo vegetal*	<i>Cotton Balls</i> *
FUNGOS FILAMENTOSOS			
Fungos Negros			
<i>Cladophialophora carrionii</i> 68	2/3	3/3	0/3
<i>Cladophialophora carrionii</i> 768	2/3	3/3	2/3
<i>Exophiala spinifera</i> AR	0/3	3/3	2/3
<i>Phialophora verrucosa</i> 146	2/3	3/3	2/3
<i>Phialophora verrucosa</i> ICB	2/3	3/3	2/3
<i>Rhinochloidiella aquaspersa</i> 691	2/3	3/3	0/3
<i>Fonsecaea. monophora</i> 69704	0/3	3/3	0/3
<i>Fonsecaea pedrosoi</i> 46428 ATCC	2/3	3/3	2/3
Dermatófitos			
<i>Microsporum canis</i> 43979	2/3	1/3	0/3
<i>Epidermophyton floccosum</i> 1	2/3	2/3	2/3
<i>Trichophyton interdigitale</i> 73673	2/3	2/3	0/3
<i>Aspergillus</i> spp.			

<i>Aspergillus flavus</i> 58	2/3	3/3	0/3
<i>Aspergillus fumigatus</i> 13073	2/3	3/3	1/3
LEVEDURAS			
<i>Candida spp.</i>			
<i>Candida albicans</i> 10231 ATCC	2/3	2/3	0/3
<i>Candida krusei</i> 6258 ATCC	1/3	2/3	0/3
<i>Cryptococcus spp.</i>			
<i>Cryptococcus neoformans</i> 32269 ATCC	1/3	2/3	0/3
<i>Cryptococcus neoformans</i> 48189 ATCC	1/3	2/3	0/3

* Quantificação do número de tubos da triplicata que tiveram crescimento.

Fonte: autoria própria.

Tabela 2: Resultado das análises de crescimento das amostras fúngicas após preservação por 24 meses nos métodos Castellani (C), Óleo Vegetal (OV) e *Cotton Balls* (CB) em meio ágar Sabouraud.

Isolados	Viabilidade		
	Castellani*	Óleo vegetal*	<i>Cotton balls</i> *
FUNGOS FILAMENTOSOS			
<i>Fungos Negros</i>			
<i>Cladophialophora carrionii</i> 68	2/3	3/3	0/3
<i>Cladophialophora carrionii</i> 768	3/3	3/3	1/3
<i>Exophiala spinifera</i> AR	0/3	3/3	1/3
<i>Phialophora verrucosa</i> 146	2/3	3/3	1/3
<i>Phialophora verrucosa</i> ICB	2/3	3/3	1/3
<i>Rhinocladiella aquaspersa</i> 691	3/3	3/3	0/3
<i>Fonsecaea. monophora</i> 69704	0/3	3/3	0/3
<i>Fonsecaea pedrosoi</i> 46428 ATCC	3/3	3/3	0/3
<i>Dermatófitos</i>			
<i>Microsporum canis</i> 43979	2/3	1/3	0/3
<i>Epidermophyton floccosum</i> 1	2/3	2/3	0/3
<i>Trichophyton interdigitale</i> 73673	1/3	2/3	0/3
<i>Aspergillus spp.</i>			
<i>Aspergillus flavus</i> 58	2/3	3/3	0/3
<i>Aspergillus fumigatus</i> 13073	2/3	3/3	1/3
LEVEDURAS			
<i>Candida spp.</i>			
<i>Candida albicans</i> 10231 ATCC	2/3	2/3	0/3
<i>Candida krusei</i> 6258 ATCC	1/3	1/3	0/3
<i>Cryptococcus spp.</i>			
<i>Cryptococcus neoformans</i> 32269 ATCC	1/3	1/3	0/3
<i>Cryptococcus neoformans</i> 48189 ATCC	1/3	1/3	0/3

* Quantificação do número de tubos da triplicata tiveram bom crescimento

Fonte: Autoria própria

Os resultados obtidos nesse estudo foram satisfatórios, sobretudo com o método OV, sendo perceptível a boa conservação com essa técnica, e em segundo lugar o método C, que apresentou crescimento satisfatório no tempo indicado para cada fungo, com baixas taxas de contaminação, corroborando com o estudo feito por Feitosa et al. (2016), que aponta o método C como eficaz. Porém, foi perceptível na análise feita ao final do período de teste estipulado de 6 e 24 meses que alguns isolados apresentaram evaporação da água acrescida, com relativo ressecamento do meio, principalmente nos fungos filamentosos (Figura 1 e 2), bem como a presença de pontos de contaminantes em alguns isolados. Tal fato nos faz concordar com o estudo realizado por Borman et al. (2006) que avaliou o método C no período de dois meses a 21 anos e afirmou que o método apresenta vantagens pela acessibilidade e facilidade da execução da técnica, porém se faz necessário o seu uso atrelado a uma segunda técnica que possibilite uma garantia da manutenção da viabilidade e estabilidade dos fungos ao longo dos anos. A taxa de contaminação não foi relatada neste estudo pois o objetivo principal se deu em analisar a eficácia de crescimento dos isolados no meio no momento de reinoculação após sua retirada dos métodos.

Segundo Aparecido *et al.* (2001) e Matos *et al.* (2022), o método Castellani, garanti a preservação das características originais dos isolados por longos períodos, contribui para que não sejam contaminados por ácaros, baixo custo, tendo em vista que utiliza apenas água destilada, além de não requerer grande espaço físico para o acondicionamento dos frascos.

Segundo Karabicak *et al.* (2016), o armazenamento de isolados fúngicos em água estéril demonstrou maior estabilidade de crescimento quando comparado ao armazenamento em óleo mineral e criopreservação, o que corrobora com o estudo feito por Borman *et al.* (2006). Castellani, Neufeld e Oliveira (2008) em seu estudo comprovaram a eficiência da técnica por meio da manutenção de 15 cepas de dermatófitos por um período de 11 anos; assim, 94,3% (n=14 cepas) apresentaram viabilidade, sem alterações morfológicas. Alexandre et al. (2022) destacam a baixa efetividade do método Castellani na preservação de fungos filamentosos. Em seu estudo, utilizou água destilada estéril em microtubos acrescentando fungos filamentosos previamente cultivados em meio ágar Sabouraud, armazenando-os em refrigerador a 5°C durante 180 dias, ao final, a técnica apresentou baixa conservação e recuperação dos isolados.

A aplicação de uma camada de óleo mineral estéril por cima de culturas fúngicas é um método de conservação de médio prazo e impede que o oxigênio entre em contato com o microrganismo. Segundo o estudo feito por Sola et al. (2012) este é um método que apresenta maior eficácia quando

comparado ao método de repique periódico, porém há uma preocupação ambiental quanto à forma de descarte correto após o uso desse material, que deve ser feita por empresas especializadas. Além disso, há riscos de contaminação e o aparecimento de microrganismos mutantes, o que causa instabilidade na segurança do uso deste método (FEITOSA et al., 2016; DA SILVA, 2017).

Devido a estas questões, no nosso estudo foi avaliado o uso de óleo vegetal de soja, em pequena quantidade. Além de ser de fácil aquisição, barato, esse óleo pode ser descartado após passar por um processo de saponificação, já que o descarte direto deste material pode provocar a contaminação de lençóis freáticos e mananciais (RABELO, 2008). Além disso, consegue desempenhar a função do óleo mineral de forma eficiente, impedindo a evaporação da água que acontece no método C, bem como a contaminação.

Podemos observar a baixa eficiência do método CB, que durante o desenvolvimento da técnica se mostrou bastante laborioso, e apresentou baixo rendimento nos resultados. Foi possível observar também que, mesmo com o isolamento dos tubos houve alto índice desidratação do meio embebido no algodão, principalmente nos tubos contendo fungos leveduriformes. Bedak et al. (2019) avaliou o uso do método CB somente em fungos filamentosos, e no presente estudo foram avaliados com este método fungos leveduriformes e filamentosos, os autores recomendam o uso dessa técnica na preservação de diversos tipos de fungos, em virtude de sua baixa complexidade, baixo custo e por ser uma ferramenta de preservação de fungos filamentosos com baixo risco de contaminação. Entretanto, embora tenha sido perceptível que os fungos filamentosos, em especial os fungos negros, apresentaram crescimento após o armazenamento CB, sobretudo após seis meses, durante a pesquisa foi totalmente ineficiente em qualquer um dos tempos empregados com relação às leveduras, indo de encontro aos resultados de Bedak et al. (2019).

Levando em conta que a escolha do método ideal de conservação deve ser baseada nas vantagens e desvantagens de execução dos métodos (SOLA et al., 2012), o método que apresentou maiores desvantagens foi o de CB. Além de bastante laborioso na parte inicial da técnica, quando comparado aos demais, apresentou ressecamento dos isolados e, conseqüentemente, baixo índice de recuperação dos fungos. Contudo, na técnica de C, mesmo apresentando baixo custo e sendo de fácil execução, tivemos uma taxa de recuperação geral inferior do que o método OV em ambos períodos de armazenamento. A técnica de OV apresentou muitas vantagens, como baixo custo, de fácil execução.

Até o momento, mesmo com tantas técnicas existentes testadas ainda não foi definido um método que seja padrão-ouro para ser utilizado em todos os tipos de fungos (GIRÃO et al., 2016). No

nosso estudo, o método OV foi o que mais se aproximou de tal objetivo, devido suas boas características quando aplicado para a preservação dos isolados, demonstrando que seu uso é vantajoso para fungos filamentosos e leveduriformes.

4. Conclusão

Portanto, foi possível concluir que o método de maior eficácia na conservação de fungos filamentosos e leveduriformes os dois períodos analisados foi o método OV, uma técnica ainda não relatada, e que não causa impactos ao meio ambiente. Mais estudos devem ser realizados ampliando o número de isolados fúngicos e ampliando o período de conservação para avaliar a eficiência desse novo método.

Referências

- ABREU, M. M. V.; TUTUNJI, V. L. (2004). Implantação e manutenção da coleção de culturas de microorganismos do UniCEUB. *Universitas: Ciências da Saúde*, 02(2). 236-25.
- AL-BEDAK, OA, SAYED, RM, HASSAN, SHA,(2019).Um novo método de baixo custo para preservação a longo armazenamento. *Mycopathologia*.161(6).
- ALEXANDRE,V,*et al*,(2022). Atualização em métodos de conservação de fungos aplicados às coleções microbiológicas. *Encontro anual de iniciação científica da Universidade Estadual de Maringá ,Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Maringá, PR.*
- APARECIDO,C.C, EGYDIO,A.P.M, FIGUEIREDO,M.B.(2001). Avaliação de três diferentes métodos utilizados na Micoteca do Instituto Biológico de São Paulo para preservação de fungos fitopatogênicos. *Summa Phytopathologica, Jaguariúna*, v.27, p.421-424.
- BORMAN,A.M,SZEKELY,A,CAMPBELL,C.K,JOHNSON,M.E.(2006). Avaliação da viabilidade de fungos filamentosos patogênicos após armazenamento prolongado em água estéril e revisão de estudos recentes publicados sobre métodos de armazenamento. *Mycopathologia*. 161(6).365. DOI10.1007/s11046-006-0023-z
- CAVALCANTI,S.D.B. (2010).Aplicação de metodologias de preservação e caracterização de fungos na coleção de culturas do instituto de medicina tropical de São Paulo. *Dissertação (mestrado), faculdade de medicina na universidade de São Paulo.*
- COSTA, C. P.; FERREIRA, M. C. (2008). Preservação de microrganismos: revisão. *Revista de Microbiologia, São Paulo*, 22(3), 263-268.
- COSTA,L.P.;MOTA,M.E.B.;CARDOSO,A.M. (2020). Experimentação de diferentes métodos para conservação de coletâneas fúngicas. *Revista Brasileira Militar de Ciências*,6(16),24. doi <https://doi.org/10.36414/rbmc.v6i16.62>.
- Diogo HC, Sarpieri A, Pires MC.(2005) Preservação de fungos em água destilada. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 80(6):591-4.
- FEITOSA,N.T; SANTOS,F.A,de SENA,P.M.V,CARDOSO,A.L.C,de MELO,D.J.N,SANTOS,S.F.M.(2016).Técnicas de conservação de fungos filamentos produtores de celulases. *XIX Congresso Brasileiro De Engenharia Química*,03-04.
- FIGUEIREDO,M.B.(2001).Métodos de preservação de fungos patogênicos. *Biológico*.63,73-82.
- GIRÃO, M. D. et al. (2004)..Viabilidade de cepas de *Malassezia pachydermatis* mantidas em diferentes métodos de conservação. *Revista. da Sociedade Brasileira de Medicina. Tropical*, 37(3), 229-233.
- IQBAL S, ASHFAQ M, MALIK A, KHAN K, MATHEW P (2017). Isolamento, preservação e renascimento de *Trichoderma viride* em meios de cultura. *Journal of Entomology and Zoology Studies* 5(3),1640-1646.
- KARABICAK,N;KARATUNA,H; AKYAR,I.(2016).Avaliação das viabilidades e estabilidades patógeno, espécies de mofo e levedura usando três formas diferentes de métodos de preservação ao longo de um período de 12 anos, juntamente com uma revisão dos relatórios publicados. *Mycopathologia*.181(5-6),123. DOI 10.1007/s11046-016-9985-7.
- MATOS,R.S.M , *et al*,(2022). Avaliação da viabilidade do método de preservação Castellanni na conservação de fungos filamentosos. *Biologia: Ensino, Pesquisa e Extensão - Uma Abordagem do Conhecimento Científico nas Diferentes Esferas do Saber*, DOI 10.37885/210404309.
- MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; JORGENSEN, J. H.; PFALLER, M. A.; YOLKEN, R. H.(2003). Manual de microbiologia clínica. *ASM Press, Washington DC*,8, 2113.
- NEUFELD,P.M;OLIVEIRA,P.C.(2008). Preservação de Dermatófitos pela técnica de água destilada estéril. *Revista Basileira de análises clinicas*,40(3),167-169.DOI lil-541897.

PEGG DE. (2002). A história e os princípios da criopreservação. *Seminários em medicina reprodutiva*, 20(1), 05-14.
prazo de fungos filamentosos. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* . doi: <https://doi.org/10.1016/>

RABELO, R. A.(2008). Coleta seletiva de óleo residual de fritura para aproveitamento industrial. *Universidade Católica de Goiás*, 1 – 21.

SILVA,G.F. (2017).Estruturação Da Coleção De Cultura De Fungos Filamentosos Da Unila E Avaliação Da Produção De Antimicrobianos. 41. *Trabalho de Conclusão de Curso Ciências Biológicas –Ecologia e Biodiversidade–Universidade Federal da Integração Latino-Americana*, Foz do Iguaçu.

SOLA, M.C; FEISTEL, J.C; OLIVEIRA, A.P de; REZENDE, MINAFRA.C.S.(2012).Manutenção de microrganismos: conservação e viabilidade. *Enciclopédia Biosfera, Goiânia*, 8(14), 1398-1418.

ANEXOS

Anexo 1: Regras de Formatação da Revista “Research, Society and Development”

1) Text structure:

- Title in this sequence: English, Portuguese and Spanish.
- The authors of the article (must be placed in this sequence: name, ORCID, institution, e-mail). NOTE: The ORCID number is individual for each author, and it is necessary for registration at the DOI, and in case of error, it is not possible to register at the DOI).
- Abstract and Keywords in this sequence: Portuguese, English and Spanish (the abstract must contain the objective of the article, methodology, results and conclusion of the study. It must have between 150 and 250 words);
- Body of the text (must contain the sections: 1. Introduction, in which there is context, problem studied and objective of the article; 2. Methodology used in the study, as well as authors supporting the methodology; 3. Results (or alternatively, 3. Results and Discussion, renumbering the other subitems), 4. Discussion and, 5. Final considerations or Conclusion);
- References: (Authors, the article must have at least 20 references as current as possible. Both the citation in the text and the item of References, use the formatting style of the APA - American Psychological Association. References must be complete and updated Placed in ascending alphabetical order, by the surname of the first author of the reference, they must not be numbered, they must be placed in size 8 and 1.0 spacing, separated from each other by a blank space).

1) Estrutura textual

- Título nesta sequência: Inglês, Português e Espanhol.
- Resumo e Palavras-chave nesta sequência: Português, Inglês e Espanhol (o resumo deve conter o objetivo do artigo, metodologia, resultados e conclusão do estudo. Deve ter entre 150 e 250 palavras);
- Corpo do texto (deve conter as seções: 1. Introdução, em que há contexto, problema estudado e objetivo do artigo; 2. Metodologia utilizada no estudo, bem como autores que apoiam a metodologia; 3. Resultados (ou, alternativamente, 3. Resultados e Discussão, renumerando os demais subitens), 4. Discussão e, 5. Considerações Finais ou Conclusão);
- Referências: (Autores, o artigo deve ter pelo menos 20 referências o mais atual possível. Tanto a citação no texto quanto o item de Referências, utilizam o estilo de formatação da APA - American Psychological Association. As referências devem ser completas e atualizadas Colocadas em ordem alfabética crescente, pelo sobrenome do primeiro autor da referência,

elas não devem ser numeradas, devem ser colocadas em espaçamento de tamanho 8 e 1.0, separadas umas das outras por um espaço em branco).

2) Layout:

- Word format (.doc);
- Written in 1.5 cm space, using Times New Roman font 10, in A4 format and the margins of the text must be lower, upper, right and left of 1.5 cm .;
- Indents are made in the text editor ruler (not by the TAB key);

2) Layout:

- Escrito em espaço de 1,5 cm, utilizando fonte Times New Roman 10, em formato A4;
- Os recuos são feitos na régua do editor de texto (não pela tecla TAB);

3) Figures:

The use of images, tables and illustrations must follow common sense and, preferably, the ethics and axiology of the scientific community that discusses the themes of the manuscript. Note: the maximum file size to be submitted is 10 MB (10 mega).

Figures, tables, charts etc. (they must have their call in the text before they are inserted. After their insertion, the source (where the figure or table comes from ...) and a comment paragraph in which to say what the reader must observe is important in this resource The figures, tables and charts ... must be numbered in ascending order, the titles of the tables, figures or charts must be placed at the top and the sources at the bottom.

3) Figuras:

O uso de imagens, tabelas e ilustrações deve seguir o bom senso e, preferencialmente, a ética e a axiologia da comunidade científica que discute os temas do manuscrito.

Figuras, tabelas, gráficos etc. (eles devem ter sua chamada no texto antes de serem inseridos. Após a sua inserção, a fonte (de onde vem a figura ou tabela ...) e um parágrafo de comentário no qual dizer o que o leitor deve observar é importante neste recurso As figuras, tabelas e gráficos ... devem ser numerados por ordem crescente, os títulos das tabelas, figuras ou gráficos devem ser colocados no topo e as fontes na parte inferior.