

PADRONIZAÇÃO DE PROTOCOLOS PARA A PRODUÇÃO DE LÂMINAS FÚNGICAS PERMANENTES

Maria Julia M. Francisco Fernandes (UEM)

Polyana de Souza Costa (UEM)

Natalia Pecin Bagon (UEM)

Melyssa Fernanda Norman Negri Grassi (UEM)

Resumo:

A observação microscópica é essencial para o ensino e diagnóstico em micologia. No entanto, durante a produção de lâminas, há uma grande dificuldade em fixar e corar as delicadas estruturas filamentosas dos fungos, tornando a produção de lâminas permanentes de alta qualidade um desafio. Portanto, este projeto objetivou o desenvolvimento de um protocolo padronizado para a produção de lâminas fúngicas permanentes. Métodos de coloração como cristal violeta, lactofenol azul de algodão e azul de metileno foram testados em isolados de *Aspergillus fumigatus* e *Trichophyton rubrum*, com foco na técnica de microcultivo. A coloração e lavagem por imersão, associada à fixação com Entellan®, foi empregada para testar uma preservação a longo prazo. Os resultados demonstram que a combinação da técnica de microcultivo com a coloração com azul de metileno e fixação com Entellan® proporcionam preparações de alta qualidade, adequadas para uso didático. O trabalho contribui para o desenvolvimento de um protocolo operacional padrão, visando a criação de um acervo de lâminas permanentes para o Laboratório de Micologia Médica da UEM.

Palavras-chave: Micologia; Coloração; Fixação.

1. Introdução

A micologia, enquanto estudo e diagnóstico das doenças humanas causadas por fungos, ainda depende fundamentalmente de métodos manuais cultura-dependentes. A análise microscópica com o reconhecimento das estruturas morfológicas de fungos, como hifas e conidióforos, é um pilar no diagnóstico laboratorial, seja em contextos clínicos ou ambientais. Apesar de sua importância, a produção de lâminas permanentes que garantam a integridade e a durabilidade dos espécimes fúngicos é um processo complexo, pois as estruturas filamentosas apresentam dificuldades de fixação e coloração. A ausência de um protocolo operacional padrão robusto para a produção de lâminas com alta preservação a longo prazo é o objetivo da presente pesquisa.

2. Metodologia

O estudo seguiu uma abordagem metodológica que incluiu pesquisa bibliográfica, cultivo de isolados fúngicos e a aplicação de diferentes técnicas de coloração e fixação, como descrito a seguir.

2.1. Manutenção e microcultivo dos isolados fúngicos

Selecionamos isolados de *Aspergillus fumigatus* e *Trichophyton rubrum* da micoteca do grupo de pesquisa para a realização dos testes. Ambos foram repicados em tubos contendo Sabouraud Dextrose ágar (SDA) e incubados por 5 dias a 25°C. Posteriormente, foi realizado o método de microcultivo, um método de cultivo e observação da morfologia de fungos em microscópio. A técnica consistiu na preparação e no posicionamento lado a lado de fragmentos de meios de cultura distintos, como ágar Batata e ágar V8. Em seguida, fragmentos de crescimento fúngico frescos são semeados nas laterais desses cubos. A montagem foi incubada em uma câmara úmida a 25°C para fungos filamentosos. Finalmente, o fungo cultivado é examinado diretamente no microscópio, sem necessidade de transferências, facilitando a análise morfológica de suas estruturas em crescimento natural.

2.2. Métodos de Coloração e Fixação

Para a escolha da coloração mais adequada, testamos três diferentes corantes, buscando evidenciar as estruturas fúngicas, sendo eles, o cristal violeta, o azul de metileno e o azul de algodão (in home e comercial). Após a secagem dos corantes, de forma natural em temperatura ambiente ou sob temperatura controlada em estufa, as lamínulas foram submetidas à lavagem com água destilada por imersão, novamente secagem e então usado fixador em lâmina. Para a fixação definitiva e montagem permanente das lâminas, utilizou-se a resina líquida, Entellan®.

3. Resultados e Discussão

Detalhadamente, nosso protocolo final consistiu em realização dos microcultivos de ambas as espécies, *A. fumigatus* e *T. rubrum* e, após 5 dias de incubação em câmara úmida, com o auxílio de pinças, desmontamos os mesmos e realizamos as colorações das lamínulas. Posicionando-as sobre uma lâmina limpa, com a face que esteve em contato com o crescimento fúngico para cima e assim dispusemos 3 gotas de corante sobre elas. As lamínulas foram incubadas em estufa a 37°C durante 24 horas e posteriormente seguimos com a remoção do excesso de corante, mergulhando cada lamínula em água destilada até que não saia mais água com corante. A secagem foi realizada de forma com que a gravidade auxiliasse na saída da água, apoiando-a de pé sobre papel macio. Após a secagem completa, realizamos a aplicação de duas gotas de Entellan® sobre lâmina limpa e posicionamos a lamínula com a parte do crescimento em contato com o fixador. Após 24 horas de fixação, as lâminas foram analisadas em microscópio óptico desde a objetiva de 4x até 40x. A eficácia dos corantes foi avaliada, dos três corantes, o azul de metileno (Figura 1D e 2A; 2B e 2C) destacou-se por proporcionar um contraste nítido e facilitar a identificação das estruturas, apresentando maior capacidade em corar homogeneamente as estruturas fúngicas, hifas septadas e macro e microconídios. Visualmente, o azul de algodão, in home e comercial (Figura 1B e 1C), apresentaram menor fixação do corante após a etapa de lavagem, comprometendo a permanência da coloração antes da fixação definitiva. Enquanto o cristal violeta (Figura 1A), tendenciou a corar as paredes

celulares fúngicas, conferindo uma coloração semelhante à observada em bactérias Gram-positivas, apresentando variações na intensidade da coloração. A comparação entre os corantes evidenciou que a qualidade da visualização é intrinsecamente ligada ao corante e ao método de secagem empregado.

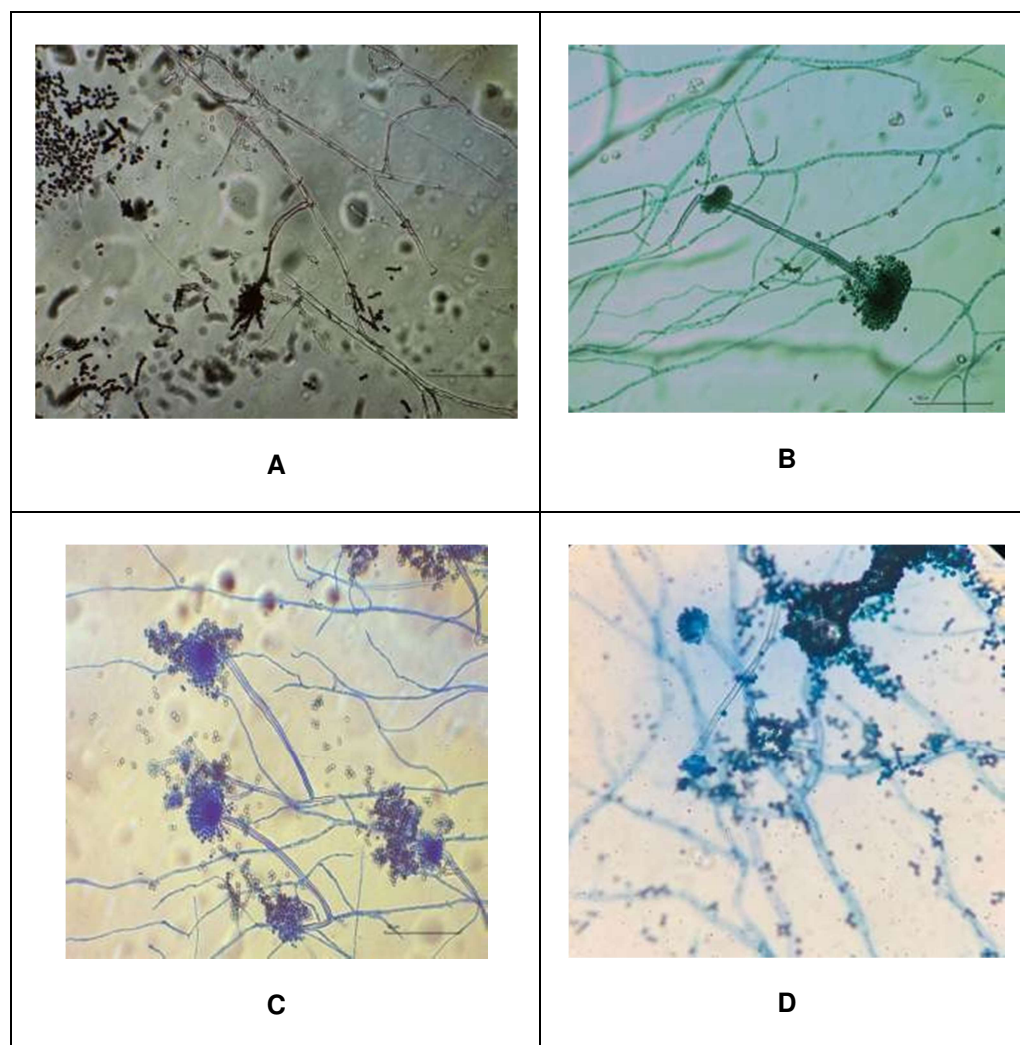


Figura 1 – Diferentes métodos de coloração aplicados ao *Aspergillus fumigatus*. A: *A. fumigatus* corado com cristal violeta; B: *A. fumigatus* corado com azul de algodão preparado em solução de lactofenol (preparação in home); C: *A. fumigatus* corado com azul de algodão em solução de lactofenol (corante comercial); D: *A. fumigatus* corado com azul de metileno.

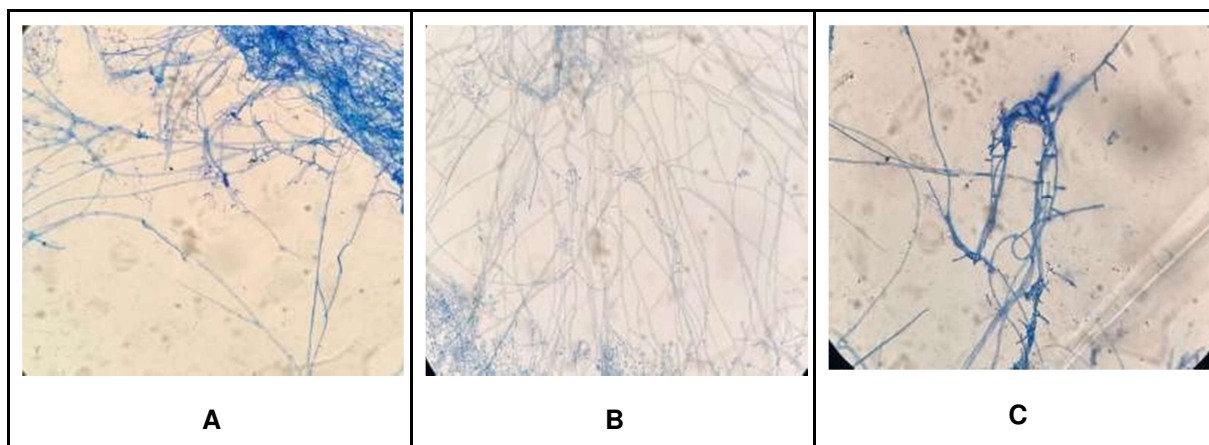


Figura 2 – Estruturas de frutificação de *Trichophyton rubrum* coradas com azul de metileno. Nas imagens A e C, observa-se com clareza a presença de microconídios, evidenciando sua morfologia característica. Na imagem B, é possível visualizar hifas septadas bem distribuídas ao longo do campo microscópico, destacando a organização típica do micélio do fungo.

4. Conclusão

Concluimos este projeto alcançando nosso objetivo, um protocolo padronizado simples, barato e duradouro, para a produção de lâminas fúngicas permanentes. A testagem e padronização são de extrema importância para o ensino e a pesquisa em micologia, pois o protocolo desenvolvido servirá como base para a criação de um acervo didático de lâminas permanentes de alta qualidade no Laboratório de Micologia Médica da UEM. A disponibilidade desse material facilitará o aprendizado de alunos de graduação e pós-graduação.

4. Referências

NEGRONI, Ricardo. **Microbiologia, Parasitologia, Micologia e Virologia**. 10. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2020.

LACAZ, Carlos da Silva. **Tratado de Micologia Médica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

ZANETTI, G. D. et al. Comparação de fixadores para a conservação de estruturas fúngicas em lâminas permanentes. **Revista de Ciências da Saúde**, v. 14, n. 1, p. 45-52, 2015.