
Isolamento e identificação de fungos filamentosos em peças anatômicas conservadas em formol

Isolation and identification of filamentous fungi in anatomical parts preserved in formol

João Calamares Neto¹, Tatiana Elias Colombo¹

¹Curso de Biomedicina da Universidade Paulista, São José do Rio Preto-SP, Brasil.

Resumo

Objetivo – Isolar e identificar os fungos filamentosos encontrados em peças anatômicas, conservadas em solução de formol. **Métodos** – As amostras fúngicas foram coletadas com o auxílio de *swab* embebido em solução salina estéril, diretamente dos tanques contendo as peças anatômicas estocadas em solução de formol a 10%. Os oito isolados foram semeados em placas de Petri contendo ágar Sabouraud Dextrose e ágar Batata Dextrose. Para a identificação das amostras foram realizadas análises macroscópicas e microscópicas das colônias características de fungos filamentosos. **Resultados** – Foram isolados os fungos *Aspergillus spp*, *Aureobasidium spp*, *Cladosporium spp* e *Penicillium spp* nas peças anatômicas analisadas. **Conclusão** – É recomendada aos alunos, professores e técnicos a proteção pessoal do sistema respiratório com máscaras, bem como o uso obrigatório de luvas, já que tanto os fungos como o formol presentes no ambiente são relacionados como indutores de problemas de saúde em ambientes escolares.

Descritores: Fungos/isolamento & purificação

Abstract

Objectives – Isolate and identify filamentous fungi found in anatomical specimens preserved in formalin. **Methods** – Fungal samples were collected with the aid of *swabs* moistened with sterile saline, directly from the tanks containing the anatomical specimens stored in formalin 10%. The eight isolates were grown in Petri dishes containing Sabouraud Dextrose Agar and Potato Dextrose. For sample identification macroscopic and microscopic analyzes of the characteristic colonies of filamentous fungi were performed. **Results** – Fungi *Aspergillus spp*, *Aureobasidium spp*, *Cladosporium spp* and *Penicillium spp* in anatomical samples analyzed were isolated. **Conclusion** – It is recommended to students, teachers and technical personnel to protect the respiratory system with masks, as well as the mandatory use of gloves, since both fungi like formaldehyde present in the environment, are related to induce health problems in school environments.

Descriptors: Fungi/isolation & purification

Introdução

Estudos sobre a invasão e a proliferação de fungos a sistemas biológicos em ambientes fechados é um assunto de grande importância em saúde pública que têm sido estudado por vários pesquisadores, pois há uma preocupação sobre os efeitos adversos à saúde provocada pelo contato ou exposição a micotoxinas e esporos produzidos pelos fungos contaminantes em ambientes fechados¹⁻².

Ambientes escolares têm sido alvo de várias pesquisas, devido ao aumento de relatos sobre alergias em alunos e professores, casos relacionados à exposição de grandes quantidades de esporos fúngicos suspensos no ar³⁻⁴.

Algumas literaturas verificaram a ocorrência de alguns sintomas respiratórios como tosse crônica, ofegância e dificuldade em respirar, significativamente associados à contaminação ambiental⁵.

Os fungos filamentosos são organismos que produzem uma grande quantidade de produtos naturais que são classificados como metabólitos secundários, sendo produzidos assim que o fungo completa a sua fase inicial de crescimento, e logo depois dá-se início a uma fase de desenvolvimento representada pela formação de esporos⁶.

Análises epidemiológicas mostram que, alguns me-

tabólitos secundários liberados em ambientes fechados, podem ser responsáveis por vários problemas de saúde nos ocupantes presentes no mesmo⁷.

O contato com as micotoxinas podem acontecer por inalação ou contato direto, apresentando vários efeitos, tais como, desordens agudas ou crônicas, reações sistêmicas e câncer⁸.

Além das micotoxinas, os fungos filamentosos também são responsáveis pela liberação de esporos. Os esporos fúngicos estão entre os agentes que mais causam reações alérgicas em nosso ambiente durante todo o ano⁹.

Os fungos também liberam, em ambientes fechados, propágulos fúngicos, que são partículas de reatividade imunológica e que possuem um tamanho menor que os esporos.

O desenvolvimento de fungos contaminantes nos ambientes fechados, e os problemas de saúde que os mesmos causam, estão diretamente relacionados a fatores do ambiente, como disponibilidade de água e temperatura nas suas fases distintas de desenvolvimento: germinação, crescimento e esporulação⁴.

Dentre os fatores ambientais responsáveis pelo desenvolvimento fúngico, o fator umidade é considerado como um risco confirmado para o aumento de casos de asma alérgica, rinite alérgica e dermatites atópicas,

sendo o risco de resfriados o mais comum entre as infecções respiratórias^{10,4}.

Os fungos do gênero *Aspergillus* aparecem com grande incidência em ambientes fechados, sendo considerados particularmente perigosos, pois podem resultar na colonização das vias aéreas, assim como atuar como poderosos alergênicos¹¹.

A proliferação desse gênero em ambientes fechados está entre os crescentes problemas da medicina moderna, pois tais microrganismos são altamente invasivos e infecciosos, principalmente para pessoas de comportamento de risco que sofrem de imunodeficiência¹².

Outros fungos como o *Penicillium* são implicados como indutores de problemas adversos de saúde em recinto fechado¹³.

Não há padrões aceitos para a interpretação e identificação de níveis fúngicos no ar em ambientes fechados ou ao ar livre. A melhor forma de prevenção contra o desenvolvimento fúngico seria o controle da umidade ambiental¹⁴.

Para possibilitar o estudo do corpo humano por tempo superior ao de autólise e sem a ação de microrganismos, é necessário o uso de métodos de fixação e preservação¹⁵. Os fixadores mais comuns são o formaldeído, a glicerina, o álcool etílico e o fenol. Estudos constataram que a resina de poliéster pode ser utilizada para a preservação de peças anatômicas para o ensino da anatomia humana, de maneira prática, estética e duradoura¹⁶.

A técnica mais utilizada nos laboratórios de anatomia é a fixação de peças anatômicas com solução de formol a 10%, sendo uma técnica de baixo custo, simples, que possui uma boa penetração nos tecidos; além disso, evita a proliferação de patógenos e não permite a deterioração do material em estudo. No entanto, produz peças que, com o passar do tempo, adquirem uma coloração mais escura do que a original, além de serem friáveis (se quebra facilmente) e de difícil utilização, pois aumentam o peso da estrutura ao encharcá-la, além de produzir vapores que provocam irritação das mucosas e conjuntivas oculares, apresentando toxicidade.

A principal característica da glicerina é a sua ação antisséptica, resultado da capacidade de desidratação celular, atuando contra fungos e bactérias gram-negativas e gram-positivas, com exceção para formas esporuladas. A glicerinação proporciona uma melhor preservação e superior resultado morfológico quando comparada ao uso de formol, por utilizar produtos menos agressivos às peças e por manter cor mais próxima do real¹⁶⁻¹⁵.

A literatura relata que o formaldeído apresenta ação bactericida, fungicida, virucida e esporocida. No entanto, devido a poucas pesquisas realizadas sobre a ação do formaldeído como fungicida em peças anatômicas, cadáveres e tanques de conservação de cadáveres, o presente estudo tornou-se necessário para enfatizar a ação deste produto de conservação muito utilizado nos laboratórios de anatomia humana.

Deste modo, este trabalho objetivou o isolamento e a identificação dos fungos filamentos encontrados em peças anatômicas conservadas em solução de formol a

10% no laboratório de anatomia de uma Universidade do Noroeste Paulista e, após a identificação, foi realizado levantamento bibliográfico, verificando se os fungos isolados oferecem algum risco a saúde das pessoas que são expostas a eles.

Métodos

A pesquisa desenvolvida foi dispensada da submissão ao Comitê de Ética por não envolver, de forma direta, pesquisas em seres humanos ou animais. Teve seu fundamento, primeiramente, baseado no método indutivo, cuja análise dos resultados caminhou para planos cada vez mais amplos, indo de constatações mais peculiares, às leis e teorias gerais, com inferência indutiva das amostras fúngicas encontradas nas peças anatômicas, sendo que, após a realização da pesquisa, os resultados foram comparados com os da literatura. Nessa parte, foi utilizado o método dedutivo, que se parte de princípios já conhecidos, sendo esses indiscutíveis e verdadeiros, levando a chegar a conclusões de maneira lógica e formal¹⁷.

Coleta das amostras

As amostras fúngicas (total de oito amostras) foram coletadas com auxílio de *swab* embebido em solução salina estéril, diretamente dos oito tanques contendo peças anatômicas estocadas em solução de formol a 10% no laboratório de anatomia de uma Universidade do Noroeste Paulista, no período referente ao mês de novembro de 2013.

Processamento das amostras

As oito amostras coletadas no laboratório de anatomia foram semeadas primeiramente em placas de Petri contendo ágar Sabouraud Dextrose (seletivo para fungo). As amostras foram incubadas em temperatura ambiente por um período de até sete dias. Dentro desse período, a placa foi observada diariamente quanto ao crescimento de fungos, sendo o micélio fúngico posteriormente semeado em ágar batata dextrose e incubado em temperatura ambiente para obtenção de uma colônia gigante. Posteriormente foi realizada a análise macroscópica (tipo de colônia, textura, relevo, coloração, bordas) e microscópica das colônias.

Métodos de Análise e Identificação

Análise Macroscópica

A análise macroscópica do micélio fúngico foi realizada por observação direta, onde foi verificada a textura (algodonosa, aveludada, pulverulenta, cremosa, etc), relevo (cerebriforme, rugoso, liso), coloração (hialino ou demáceo), bordas (regulares ou irregulares).

Análise Microscópica

A técnica de microcultivo em lâmina¹⁸, foi realizada colocando-se um pedaço circular de gaze sobre o fundo de uma placa de Petri esterilizada, a qual, recebeu o depósito sobre a gaze de um par de varetas de vidro de

comprimento apropriado para caber na placa, servindo de apoio para uma lâmina de vidro.

Um bloco de ágar batata dextrose foi colocado com auxílio de uma espátula sobre a superfície central da lâmina e nele inoculado o micélio fúngico nas bordas do bloco do ágar em quatro lugares uma porção da colônia, com auxílio de uma alça de inoculação, esterilizada em bico de Bunsen. Uma lamínula foi colocada de imediato sobre a superfície do bloco de ágar inoculado. Com auxílio de pipeta, uma pequena quantidade de água destilada estéril, suficiente para saturar a gaze, foi depositada no fundo da placa. A placa foi tampada e incubada à temperatura ambiente durante um período de 5 a 7 dias.

Quando o crescimento fúngico mostrou-se visualmente suficiente, a lamínula pode ser retirada com auxílio de uma pinça, sendo posteriormente colocada sobre uma gota do corante azul-de-lactofenol na superfície de outra lâmina e levada ao microscópio para análise.

Através da utilização do corante lactofenol azul de algodão foi possível analisar as estruturas das hifas, verificando a presença ou não de septos, as estruturas microscópicas dos conidióforos, assim como as estruturas microscópicas das fiálides, verificando a disposição das mesmas, a qual permite a diferenciação dos fungos filamentosos em diversos gêneros.

Resultados

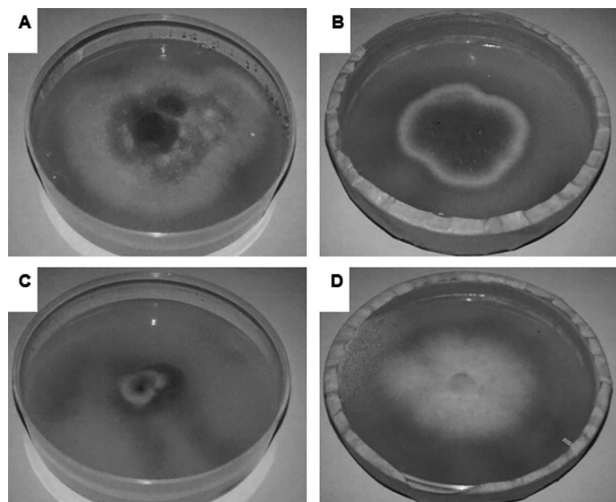


Figura 1. Colônias de fungos filamentosos isolados de peças anatômicas. Visualização macroscópica

Para identificar os microrganismos isolados das peças anatômicas conservadas em solução de formol a 10%, realizaram-se análises macroscópicas e microscópicas dos caracteres fenotípicos das colônias. Para a análise macroscópica foi observado quatro grupos distintos de fungos filamentosos (referentes as oito amostras coletadas), com textura pulverulenta, relevo rugoso, bordas irregulares e coloração do micélio reprodutivo apresentando ampla variação na coloração, sendo encontradas colônias em tons de verde, amarelo, cinza, marrons, preto e branco (Figura 1).

Quando foram analisados os caracteres fenotípicos microscópicos através da realização da prova do microcultivo em lâmina, constatou-se que se tratava de várias espécies fúngicas com determinadas variações a nível microscópico (dados não demonstrados): *Aureobasidium spp* (micélio demonstrado na Figura 1A), *Aspergillus spp* (micélio demonstrado na Figura 1B), *Cladosporium spp* (micélio demonstrado na Figura 1C) e *Penicillium spp* (micélio demonstrado na Figura 1D).

Discussão

De acordo com a literatura, o formol apresenta ação fungicida e bactericida mesmo a baixas concentrações. O aparecimento de substâncias brancas (fungos saprófitos) nas peças anatômicas foi devido a impermeabilidade da gordura ao formol, a concentração que se encontra o formol, e ao tempo de exposição destas peças ao ar livre¹⁹.

Dentre os fungos isolados em peças anatômicas conservadas em solução de formol a 10%, o fungo *Aureobasidium spp* é conhecido como levedura negra, devido a produção de melanina, apresenta um polimorfismo, podendo crescer como levedura ou micélio, dependendo das condições ambientais. A formação de clamidósporos de cor escura é uma característica. As hifas são lisas, com paredes finas e células frequentemente mais largas do que longas, formando um micélio compacto²⁰. O gênero *Aureobasidium spp* não apresenta referências em que se pode amparar como um gênero fazendo parte dos fungos do ar atmosférico, devendo então haver estudos mais amplos que permitam avaliar sua procedência²¹.

Aspergillus spp são fungos filamentosos ramificados, septados, sendo classificados segundo suas estruturas sexuadas, porém são distinguidos na prática clínica por suas estruturas assexuadas, incluindo a forma do conidióforo, as vesículas e fiálides de apoio e os conidiósporos²². O conidióforo apresenta-se geralmente asseptado e com a base geralmente em forma de T ou L, que é denominada, comumente, de célula pé, conectada a uma hifa vegetativa. O conidióforo se entende a partir da célula pé e pode continuar a se estender por alguns milímetros de comprimento até chegar a vesícula, na qual as células conidiogênicas e fiálides são formadas. As vesículas podem ter várias formas características²³. *Aspergillus* é considerado um fungo oportunista, pertencente ao filo *Ascomycota*, o maior filo de fungos, que inclui quase 50% de espécies fúngicas conhecidas. Fungos desse gênero são produtores de micotoxinas, metabólitos que podem conduzir a periculosidades severas, sendo encontradas em ambientes domésticos e profissionais⁸.

Cladosporium spp apresenta conidióforos com cadeias longas e ramificadas de conídios castanhos, ovais e de paredes lisas e finas. Os conídios podem ser produzidos em cadeias, com coloração marrom olivácea escuro ou marrom²⁴. Apresenta mais de 40 espécies. É "onipresente" e "cosmopolita", sendo um dos fungos mais comuns encontrados em todo o mundo. Seu cres-

cimento se dá em superfície de celulose, tecidos, madeira, lugares úmidos, reboco de azulejos principalmente em banheiros onde a umidade é muito alta¹⁹.

É considerado alérgico podendo causar asma. Geralmente não apresenta riscos para os seres humanos. Algumas espécies atualmente são referidas como *Cladophialophora* quando conduzem a infecção humana. Algumas enzimas produzidas por *Cladosporium* são utilizados na produção de contraceptivos orais¹⁹.

Penicillium spp pertence ao filo *Ascomycota*. Os ascomicetos diferem dos outros grupos porque apresentam estruturas em forma de sacos responsáveis pela reprodução sexuada, denominada asco, onde são formados os ascósporos haplóides, após a meiose. A formação dos ascos ocorre em estrutura complexa denominada ascoma, composta por hifas entrelaçadas e firmemente compactadas. Os ascomas podem ser abertos em forma de xícaras, fechados ou ainda esféricos, com formato de pêras, com pequeno poro através do qual saem os ascosporos. A reprodução assexuada se dá pela formação e liberação de conídios pelos conidióforos que são hifas modificadas responsáveis pela produção dos conídios²⁵.

As espécies que pertencem ao gênero *Penicillium* têm sido utilizadas como base em vários estudos, porém muitas pesquisas têm demonstrado o seu enorme potencial biotecnológico. Algumas espécies vêm sendo utilizadas no biocontrole, micoparasitismo, além da utilização de seus metabólitos secundários para diversas indústrias²⁶. Porém, algumas espécies desses gêneros também são produtoras de micotoxinas e metabólitos. A importância desses compostos tóxicos varia muito, sendo mediada pelos fatores biológicos e ecológicos de cada espécie²⁷.

A proliferação de fungos filamentosos, em ambiente fechado, associado com os fatores de umidade e temperatura, resultam em problemas respiratórios, causa de crescente preocupação, visto que, em laboratórios de anatomia humana, os fungos são capazes de se reproduzirem, e, conseqüentemente, liberarem seus metabólitos secundários, contaminantes do ar²⁸.

Conclusão

O isolamento de *Aspergillus spp*, *Cladosporium ssp* e *Penicillium ssp* em peças anatômicas conservadas em solução de formol a 10% em laboratórios de anatomia humana é um fato que deve ser tratado com cautela, visto as conseqüências adversas à saúde que a exposição a esses agentes podem causar (variando de distúrbios agudos e crônicos, a reações sistêmicas e até mesmo cânceres) quando encontrado contaminando ambientes fechados²⁸⁻²⁹.

Referências

1. Chao HJ, Schwartz J, Milton DK, Burge HA. Populations and determinants of airborne fungi in large office buildings. *Environ Health Perspect*. 2002;110(8):777-82.
2. Molina RT, Garijo MAG, Rodriguez AFM, Palacios IS. Pollen and spores in the air of a hospital out-patient ward. *Allergon Immunopathol*. 2002;30(4):232-8.
3. Santili J, Rockwell W. Fungal contamination of elementary schools: a new environmental hazard. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2003;90(2):203-8.
4. Schirmer WN, Pian LB, Szymanski MS, Gauer MA. A poluição do ar em ambientes internos e a síndrome dos edifícios doentes. *Cienc Saúde Colet*. 2011;16(8):3583-90.
5. Jedrychowski W, Flak E. Respiratory tract symptoms in school children exposed to indoor and outdoor air pollution. *Pneumonol Alergol Pol*. 1997;65(1):11-2.
6. Calvo AM, Wilson RA, Bok JW, Keller NP. Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2002;66(3):447-59.
7. Pieckova E, Kunova Z. Indoor fungi and their ciliostatic metabolites. *Ann Agric Environ Med*. 2002;9(1):59-63.
8. Reijula K, Tuomi T. Mycotoxins of aspergilli: exposure and health effects. *Front Biosci*. 2000;1(8):232-7.
9. Tortora GJ, Funke BR, Case CL. *Microbiologia*. 8. ed. Porto Alegre: Artmed; 2005.
10. Kilpelainen M, Terho EO, Helenius H, Koskenvuo M. Home dampness, current allergic diseases, and respiratory infections among young adults. *Thorax*. 2001;56(6):462-7.
11. Tome JF, van der Werf TS. Pulmonary aspergillosis. *Ned J Med*. 2001;59(5):244-58.
12. Bennet JW. An Overview of the genus aspergillus: Molecular Biology and Genomics. Norpolk UK; Caister Academic Press; 2010.
13. Sidrim JJ, Paixão GC, Brilhante RS, Rocha MF. Principais fungos contaminantes em rotina de micologia médica: micologia médica à luz de autores contemporâneos. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.
14. Burge HA. An update on pollen and fungal spore aerobiology. *J Allergy Clin Immunol*. 2002;110(4):544-52.
15. Weiglen AH. Preservation and plastination. *Clin Anat*. 2002;15(6):445.
16. Oliveira IM, Mindello MM, Martins YO, Silva Filho AR. Análise de peças anatômicas preservadas com resina de poliéster para estudo em anatomia humana. *Rev Col Bras Cir*. 2013;40(1):76-80.
17. Marconi MA, Lakatos EM. Metodologia do trabalho científico: procedimentos básicos, pesquisa bibliográfica, projeto e relatório, publicações e trabalhos científicos. 6. ed. São Paulo: Atlas; 2001.
18. Koneman E, Winn Jr. W, Allen S, Janda W, Procop G, Schreckenberger P, et al. Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001.
19. Przybysz CH, Scolin E, Forcato A, Araújo K, Costa L. Avaliação do possível crescimento e resistência de espécies fúngicas ao formol. *Rev Saúde Pesq*. 2009;2(3):325-31.
20. Oliveira IMA. Produção e caracterização da β - Frutofuranosidase de *Aureobasidium sp* e sua aplicação na produção frutooligosacarídeos [Tese de Doutorado]. Campinas-SP: Universidade Estadual de Campinas; 1997.
21. Ciência para um Planejamento Urbano [Homepage na Internet]. São José dos Campos: Universidade do Vale da Paraíba; 2014 [acesso em 2014 Oct 01]. Disponível em :www.unicepg.univap.br.
22. Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vacarrri EM, Takahashi de Melon. Tratado de micologia médica. 9. ed. São Paulo: Sarvier; 2002.
23. Monteiro MCP. Identificação de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* em solos preservados dos cerrados [dissertação de mestrado]. Minas Gerais: Universidade Federal de Lavras; 2012.

24. Menezes CP. Atividade antifúngica in vitro do óleo essencial de *Melissa officinalis* L. (Erva Cidreira) sobre *Cladosporium carionii* [dissertação de mestrado]. João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba; 2012.
25. Instituto de Botânica. Programa de Pós Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente. Curso de Capacitação de monitores e educadores Fungos: principais grupos e aplicações biotecnológicas. São Paulo: Instituto de Botânica; 2006.
26. Pitt JI. A laboratory guide to common *Penicillium* species. Australia: Food Science Australia a Joint Venture of CSIRO and AFISCI; 2000.
27. Pallu APS. Potencial biotecnológico de fungos do gênero *Penicillium* e interação com cana de açúcar [Tese em Doutorado]. Piracicaba: Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"; 2010.
28. Corrêa WR. Isolamento e identificação de fungos filamentosos encontrados em peças anatômicas em solução de formol a 10% [dissertação de mestrado]. São José dos Campos: Universidade do Vale do Paraíba; 2003.
29. Przybysz CH, Scolin E, Forcato A, Araújo K, Costa L. Avaliação do possível crescimento e resistência de espécies fúngicas ao formol. *Saúde Pesq.* 2009;2(3):325-31.

Endereço para correspondência:

Tatiana Elias Colombo
Av. Pres. Juscelino Kubitschek de Oliveira, s/nº – Jardim Tarraf II
São José dos Rio Preto-SP, CEP 15091-450
Brasil

E-mail: taty_ec@hotmail.com

Recebido em 17 de fevereiro de 2015
Aceito em 26 de agosto de 2015