
Isolamento e identificação de fungos filamentosos em slimes

Isolation and identification of filament fungi in slimes

Rafaela Yukaren Canovas Imamura¹, Laura Fenerich Alberghini¹, Marcell Sant'anna Camacho de Oliveira¹, Tatiana Elias Colombo¹

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

Resumo

Objetivo – Analisar o desenvolvimento de fungos filamentosos existentes nos brinquedos denominados *slime*. **Métodos** – Por se tratar de uma pesquisa experimental, a mesma foi realizada no laboratório escola da UNIP – Universidade Paulista. Neste local foi empregada a coleta de amostras e seu armazenamento em um recipiente plástico durante o período de 14 dias. O seu processamento foi realizado através da sementeira de colônias em ágar Sabouraud-Dextrose e posteriormente em ágar Batata Dextrose para a obtenção de colônias gigantes. Além disso, foram realizados os métodos de análise e identificação bioquímica, o qual foi dividido em análise macroscópica e microscópica. **Resultados** – Quando examinamos os caracteres fenotípicos no microcultivo, comprovou-se a presença do gênero *Aspergillus* em todas as amostras (cinco), sendo os isolados classificados em seções, uma classificação infragenérica que agrupa diferentes espécies que possuem morfologia similar. As seções encontradas foram: *Aspergillus* seção *Flavi* (3 isolados) e *Aspergillus* seção *Nigri* (2 isolados). **Conclusão** – A presença do *Aspergillus* no slime é um fato que não pode ser ignorado, pois necessita-se de uma atenção maior quanto à eficácia dos componentes químicos existentes no brinquedo, visto que esse tipo de objeto é, na sua maior parte, manuseado pela classe infantil, podendo gerar processos infecciosos, possibilitando, assim, diversos danos à saúde.

Descritores: Fungos; Hifas; Bórax; *Aspergillus*

Abstract

Objective – Analyze the development of filamentous fungi existing in toys called slime. **Methods** – As this is an experimental research, it was carried out in the school laboratory at UNIP – Universidade Paulista. In this place, the collection of samples and their storage in a plastic container was used during the period of 14 days. Its processing was carried out by sowing colonies on Sabouraud-Dextrose agar and later on Potato Dextrose agar to obtain giant colonies. In addition, the methods of analysis and biochemical identification were carried out, which was divided into macroscopic and microscopic analysis. **Results** – When the phenotypic characters in the microcultivation were examined, the presence of the genus *Aspergillus* was verified in all samples (five), and the isolates were classified in sections, an infrageneric classification that groups different species that have similar morphology. The sections found were: *Aspergillus* section *Flavi* (3 isolates) and *Aspergillus* section *Nigri* (2 isolates). **Conclusions** – The presence of the *Aspergillus* in the slime is a fact that cannot be ignored, as greater attention is needed as to the effectiveness of the chemical components in the toy, since this type of object is mostly handled by the infant class, it can generate infectious processes, thus making possible several health damages.

Descriptors: Fungi; Hyphae; Borax; *Aspergillus*

Introdução

O slime consiste em um material viscoso, não tóxico. De acordo com o processo histórico, seus princípios surgiram nas primeiras décadas do século XX, recebendo o nome de *Silly Putty* a qual foi elaborada por James Wright no laboratório da General Electric em New Haven. Este feito surgiu em uma tentativa inesperada, pois, seu real objetivo era a produção de borracha para fornecer pneus de caminhões e botas de soldados durante a Segunda Guerra Mundial. Durante esse período, Wright percebeu que o composto formado com óleo de silicone associado ao ácido bórico tinha propriedades flexíveis e elásticas muito parecidas com a borracha. Ao longo dos anos, Hotgson comprou o direito de produção da General Electric e passou a produzir o brinquedo em larga escala no mercado. O grande sucesso veio a partir de 1980 onde surgiram formulações variadas e diversificação de marcas, trazendo variedades ao consumidor.^{1,2}

A formulação comercial para o brinquedo consiste nos seguintes itens: poli (álcool vinílico) ou goma de

guar, bórax, água, corante e um agente antifúngico para evitar que a massa embolore. O antifúngico deve ser eficaz e testado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Esse componente permite que não haja proliferação de colônias de fungos. No entanto, com as diversas receitas caseiras para a produção do brinquedo, não se encontra especificações e teste de qualidade em relação à utilização do antifúngico, possibilitando, assim, a disseminação fúngica e riscos de infecções à indivíduos que irão manuseá-los.³

O brinquedo tornou-se um item de aquisição muito desejado pelas crianças, principalmente os indivíduos da geração “youtube”. Os produtores de conteúdo ensinam detalhadamente os compostos que são utilizados e o modo de preparo. Importante ressaltar que essas receitas não seguem um padrão de segurança, pois na maioria das vezes não utilizam o antifúngico ou colocam-o em dosagem inadequada referente à quantidade de massa produzida. Além disso, o armazenamento torna-se um problema, pois, na maioria das vezes, as crianças não acabam guardando-as no local correto. Dessa forma, a explosão de canais com atores mirins

e a facilidade de acesso às receitas geram a produção da massinha caseira de modo inadequado, possibilitando a proliferação fúngica no local. A análise morfofisiológica dos fungos torna-se fundamental a fim de entender o mecanismo de proliferação dos mesmos nos slimes.²

Os fungos são organismos responsáveis pela manutenção da microbiota dos ecossistemas onde são encontrados, devido às suas características heterotróficas e ao seu consumo de matéria orgânica como fonte de energia. Assim, classificam-se em unicelulares, como no caso das leveduras e, também em pluricelulares como no caso dos fungos filamentosos, os quais formam filamentos denominados *hifas*, que em conjunto constituem o micélio fúngico, responsável por diversas funções como obtenção de energia e propagação de espécie. Além disso, realizam a decomposição e a bio-transformação dos materiais celulósicos e da lignina, presente na parede vegetal.^{4,5,6}

Os processos fisiológicos e nutritivos dos fungos estão relacionados a determinados fatores como no caso do pH, temperatura, disponibilidade de oxigênio, umidade, fonte de carbono e de nitrogênio. Esses itens tornam-se imprescindíveis para o crescimento e reprodução dos mesmos.^{5,7}

Nos sistemas submersos, os fungos filamentosos, frequentemente, formam *pellets* suspensos no meio fermentativo, os quais variam de tamanho, de acordo com as condições de cultivo e com as características próprias de cada fungo. É de suma importância, analisar as características como pH ideal, fontes de carbono e nitrogênio e aeração, para que determinem as condições de cultivo mais apropriadas para a obtenção de metabólitos de interesse biológico.^{7,8,9}

Os fungos são considerados heterotróficos pelo fato de obterem energia através de fontes de carbono provenientes de material orgânico. Entretanto, nem todos os fungos conseguem obter energia dos mesmos tipos de substratos. Dessa forma, é necessária uma série de características fisiológicas para promoverem a hidrólise dos compostos, como no caso da lignina.^{5,8}

A lignina está presente na parede celular dos vegetais e tem função estrutural, conferindo resistência à célula. Outro composto é a celulose, a qual é o polissacarídeo mais abundante na biosfera e possui estrutura linear, constituída por monômeros de glicose unidos por ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$. Há, também, a hemicelulose que é encontrada intercalada entre as microfibras da celulose, permitindo com que ocorram resistência e elasticidade, impedindo, assim, que se toquem. Dessa forma, a partir do momento em que os fungos conseguem ultrapassar essas barreiras biológicas, utilizam os substratos celulares e proliferam-se demasiadamente.^{5,10}

O presente trabalho teve como objetivo isolar e identificar os fungos filamentosos encontrados nos brinquedos denominados como slimes, comumente manuseados por crianças de diversas faixas etárias

Métodos

A pesquisa desenvolvida foi dispensada da submissão ao Comitê de Ética por não envolver, de forma direta, pesquisas em seres humanos ou animais. Trata-se de uma pesquisa experimental que foi realizada no laboratório escolar da Universidade Paulista – UNIP, Campus JK, São José do Rio Preto (SP).¹¹

Preparo da amostra

O slime utilizado no presente estudo foi preparado de modo caseiro, cujos componentes foram cola, corante, glitter, água boricada e bicarbonato de sódio. O seu armazenamento foi feito em um recipiente de plástico, fechado por 14 dias.

Processamento de amostras

As colônias observadas no slime foram semeadas em meio de cultura ágar Sabouraud-Dextrose, por se tratar macroscopicamente de um fungo, e incubadas em temperatura ambiente por um período de até 7 dias. Dentro desse período, a placa foi observada diariamente, sendo o micélio fúngico posteriormente semeado em ágar Batata Dextrose e incubado em temperatura ambiente para obtenção de uma colônia gigante, cujas características macroscópicas (tipo de colônia, textura, relevo, coloração, bordas) e microscópicas (observação de hifas) foram evidenciadas.¹²

Métodos de análise e identificação

Análise macroscópica

A análise macroscópica do micélio fúngico foi realizada por observação direta, a partir da verificação da textura (algodonosa, aveludada, pulverulenta, cremosa etc), do relevo (cerebriforme, rugoso, liso), da coloração (hialino ou demáceo) e das bordas (regulares ou irregulares).^{7,12}

Análise microscópica

Com relação à observação das estruturas microscópicas (hifas) foi utilizado o corante lactofenol azul de algodão. Para verificação do gênero e espécie referente aos fungos filamentosos isolados, foi utilizada a técnica do microcultivo em lâmina.^{12,13}

Resultados

Após os procedimentos de isolamento, cinco amostras foram positivas para fungos filamentosos (71,42%). Nestas amostras, apenas duas espécies foram identificadas, apresentando assim, variação morfológica diferente (Figura 1).

Quando examinados os caracteres fenotípicos no microcultivo, comprovou-se a presença do gênero *Aspergillus* em todas as amostras (cinco), sendo os isolados classificados em seções, uma classificação infragênérica que agrupa diferentes espécies que possuem morfologia similar. As seções encontradas foram: *Aspergillus* seção *Flavi* (três isolados) e *Aspergillus* seção *Nigri* (dois isolados) (Figura 2).

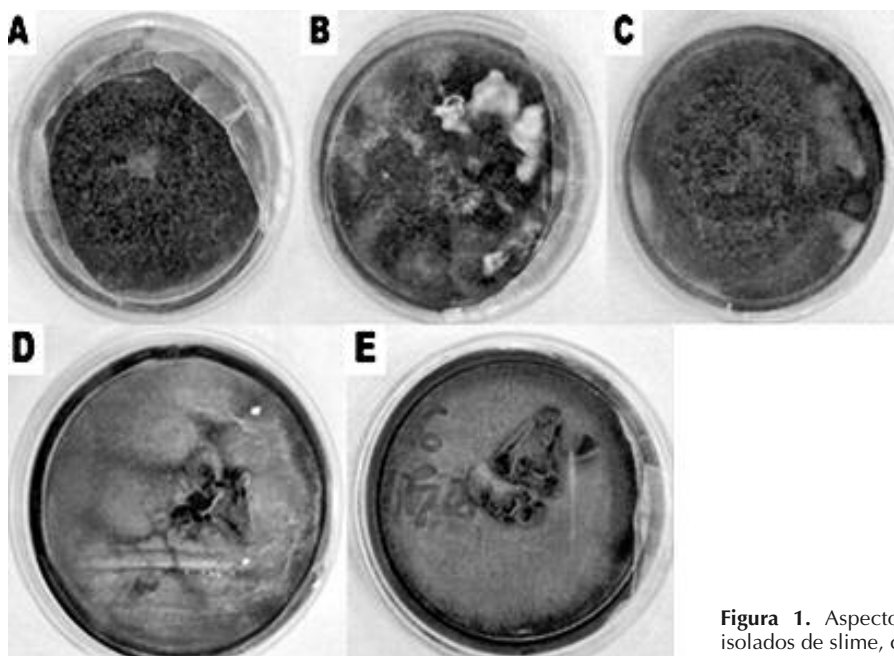


Figura 1. Aspectos macroscópicos dos fungos filamentosos isolados de slime, cultivados em ágar batata (30°C).

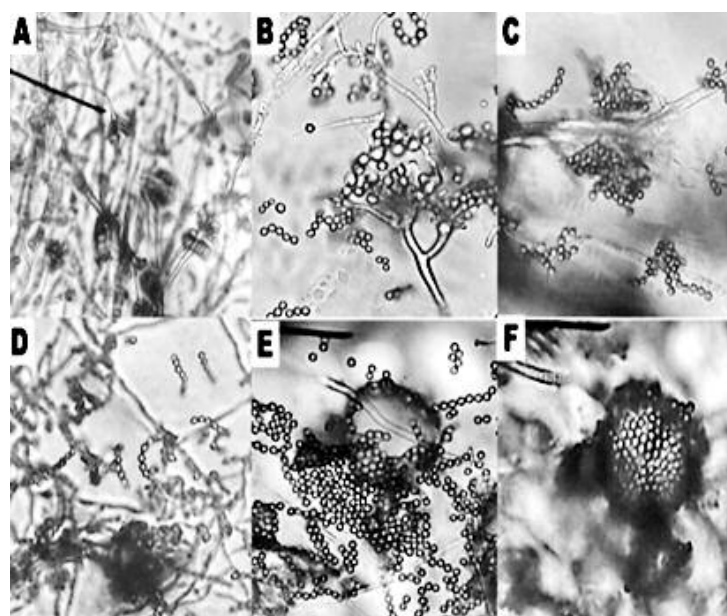


Figura 2. Aspectos microscópicos de alguns fungos isolados de slime, realizado microcultivo em ágar batata (30°C). **A:** Presença de conidióforo, vesícula globosa coberta com uma camada de fiálides seguida de conídios, além de inúmeras hifas septadas característico de *Aspergillus* seção *Flavi. flavus*. **B:** Presença de conidióforo, vesícula globosa coberta com uma camada de fiálides seguida de conídios e conídios livres por todo o campo microscópico, além de hifas não septadas característico de *Aspergillus* seção *Flavi*. **C:** Presença de conidióforo, vesícula globosa coberta com uma camada de fiálides seguida de conídios e conídios livres por todo o campo microscópico característico de *Aspergillus* seção *Flavi*. **D:** Presença de esporos por todo o campo microscópico, além de hifas não septadas característico de *Aspergillus* seção *Nigri*. **E:** presença de esporos por todo o campo microscópico, além de hifas não septadas característico de *Aspergillus* seção *Nigri*. **F:** Presença de uma estrutura redonda chamada de esporângio, na qual possui esporos em seu interior característico de *Aspergillus* seção *Nigri*.

Discussão

A produção de slime tornou-se muito difundida entre as crianças como forma de diversão. Isto será relacionado diretamente com a crescente utilização da internet por parte do público infantil, no qual este é considerado nativo digital, devido ao engajamento precoce, onde consomem uma infinidade de conteúdo *online*.²

Em análise dos aspectos químicos compostos no slime comercializado, ressalta-se a presença de antifúngicos, fato que garante o manuseio do brinquedo sem risco de proliferações fúngicas. Esse componente é crucial para a não disseminação fúngica no brinquedo, porém a maioria das massinhas caseiras não

apresenta essa substância, desencadeando, assim, a proliferação fúngica e, posteriormente a disseminação de processos infecciosos. Ao decorrer da presente pesquisa, o brinquedo caseiro foi alvo de análises microbiológicas, fato que tornou evidente a comprovação do crescimento de fungos filamentosos no slime. Esse dado mostrou a eficácia e importância do antifúngico no slime, já que quando fabricados de modo inadequado, sem seguir os parâmetros da Avisa, podem acarretar incertezas em relação à eficácia dos compostos químicos presentes no brinquedo e um possível risco de contaminação aos indivíduos que entram em contato direto.²

No slime caseiro analisado no presente estudo, os fungos observados foram caracterizados macroscopicamente e microscopicamente, sendo possível concluir a identificação do gênero *Aspergillus*, considerado possível causador de doenças infecciosas.¹⁴

O gênero *Aspergillus* pertence à família *Aspergillaceae*.¹⁵ Morfológicamente apresenta ramificações e septos, sendo classificado de acordo com suas estruturas sexuadas e assexuadas. O fato de seus conídios serem muito pequenos facilita sua permanência e suspensão no ar, podendo penetrar por via inalatória no corpo do homem, desse modo são responsáveis pela ocorrência de infecções pulmonares oportunistas, como no caso da aspergilose, considerada como o principal tipo de acometimento, mas também podem atacar canais auditivos, seios nasais, córneas e proporcionar onicomicoses.^{16,17}

Atualmente, há inúmeras espécies de *Aspergillus*, as quais são atualmente identificadas por biologia molecular, porém como no presente estudo a identificação foi baseada na análise morfológica, foi possível identificar o *Aspergillus* seção *Flavi* e *Aspergillus* seção *Nigri*. A taxonomia desses grupos é complexa e está evoluindo continuamente. Alguns grupos são conhecidos pela capacidade de produção de aflatoxinas, definidas como metabólicos secundários tóxicos produzidos por *Aspergillus* quando em condições de temperatura e umidade favoráveis.¹⁸

Algumas medidas devem ser tomadas para diminuir a instalação e a ocorrência dessa população de microrganismo nesses brinquedos, evitando os episódios de problemas de saúde pública e a ocorrência de infecções fúngicas. Dentre as medidas, podemos citar a inclusão do antifúngico como componente da massinha caseira, a fim de adequar-se aos padrões de eficiência em relação ao tempo que o produto for exposto ao manuseio de crianças. Em seguida, os responsáveis devem ser vigilantes em relação aos menores enquanto brincam, já que os mesmos podem se tornar fômites capazes de absorver, reter e transportar microrganismos infecciosos, tornando-se um problema de saúde pública. Por fim, a Anvisa deve atentar-se às receitas caseiras.

Conclusão

A presença do *Aspergillus* no slime é um fato que não pode ser ignorado, pois necessita-se de um atenção maior quanto à eficácia dos componentes químicos existentes no brinquedo, visto que este tipo de objeto é, na sua maior parte, manuseado pela classe infantil, podendo gerar processos infecciosos, possibilitando, assim, diversos danos à saúde.

Referências

1. Silva AC, Dias A, Santos B, Júnior C, Neves J, Costa A, et al. In: Anais do LIX Congresso Brasileiro de Química: 2019; João Pessoa. João Pessoa, PB. Centro de Eventos do Tambaú Hotel; 2019.

2. Cardoso ACO, Barros HNS, Oliveira DAAS, Messeder JC. A química da Slime: implicações e perspectivas no Ensino Fundamental. RevUnila [revista na internet]. 2019 [Acesso 27 set 2020], v.3, n.2. Disponível em: <https://doi.org/10.30705/eqpv.v3i2.1947>.

3. Barbosa WRC, Souza RVF, Bonatto MP. Brincando com polímeros: reflexões sobre a cognição infantil na educação em saúde. In: Anais do XI Encontro Nacional de Pesquisa em Educação em Ciências: 2017; Florianópolis. Florianópolis, SC. Universidade Federal de Santa Catarina; 2017.

4. Silva CJA, Malta DJN. A importância dos fungos na biotecnologia. Cad. Grad. 2016; 2(3).

5. Marcante PL. Isolamento e bioprospecção de cepas fúngicas do sudeste do Paraná [trabalho de conclusão de curso]. Pato Branco: Universidade Tecnológica Federal do Paraná; 2018.

6. Rodrigues AN. Incidência e fatores de risco de contaminação por fungos filamentosos na mucosa oral de trabalhadores rurais das culturas de cana-de-açúcar, laranja e abacaxi da região de Frutal – MG [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2016.

7. Murray PR. Microbiologia médica básica. Rio de Janeiro: Elsevier; 2018.

8. Ascencio IM. Seleção de fungos filamentosos produtores de hidrolases e pré otimização das condições de cultivo [dissertação de mestrado]. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo; 2016.

9. Dias M. Comparação do perfil proteômico através da técnica de espectrometria de massas dos fungos *Aspergillus niger* e *Rhizopus microsporus* submetidos a estresse pela adição de cobre [tese]. São Paulo: Departamento de Engenharia Química da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo; 2018.

10. Garcia FS. Enzimas oxidoredutases produzidas por fungos filamentosos [dissertação de mestrado]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2018.

11. Swerts MSO. Manual para elaboração de trabalhos científicos [internet]. Alfenas: Unifenas; 2019 [Acesso 15 maio 2020.] Disponível em: <https://unifenas.br/pesquisa/manual%20metodologia/normasdepublicacoes.pdf>

12. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BR). Microbiologia clínica para o controle de infecção relacionada à assistência à saúde; 2010 [acesso 20 set 2020]. Disponível em: <https://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/publicacoes/item/deteccao-e-identificacao-de-fungos-de-importancia-medica>

13. Lacaz CS, Porto E, Martins JC, Heins-Vaccari EM, Melo NT. Tratado de micologia médica Lacaz. 9ª ed. São Paulo: Sarvier; 2002.

14. Toyotome T. Causative agents of *Aspergillosis* including Cryptic *Aspergillus* species and *A. fumigatus*, Med Mycol J. 2016; 57(4).

15. Houbraken J, Kocsubé, S; Visagie CM, Yilmaz N, Wang XC, Meijer M, et al. Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera (*Eurotiales*): An overview of families, genera, subgenera, sections, series and species. Stud Mycol. 2020; 95:5-169.

16. Toyotome T, Saito S, Koshizaki Y, Komatsu R, Matsuzawa T, Yaguchi T. Prospective survey of *Aspergillus* species isolated from clinical specimens and their antifungal susceptibility: a five-year single-center study in Japan. J Infect Chemother. 2020; 26(2): 321-3.

17. Duo Filho VB, Siqueira JPZ, Colombo TE. Monitoramento de fungos amenófilos no ambiente de uma biblioteca no município de São José do Rio Preto – SP, Brasil. Arq Ciênc Saúde. 2020; 24(2): 75-80.

18. Wang P, Chang PK, Kong Q, Shan S, Wei Q. Comparison of aflatoxin production of *Aspergillus flavus* at different temperatures and media: Proteome analysis based on TMT. Int J Food Microbiol. 2019; 310: 108313.

Endereço para correspondência:

Tatiana Elias Colombo
Avenida Juscelino K. de Oliveira, s/ nº, Jardim Tarraf II
São José do Rio Preto – SP, CEP 15091-450
Brasil

E-mail: taty_ec@hotmail.com

Recebido em 11 de dezembro de 2020
Aceito em 21 de dezembro de 2020