

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE ALIMENTOS
CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM ALIMENTOS
CAMPUS DE CAMPO MOURÃO**

MAIRA MICHELE DOS SANTOS

**MANUTENÇÃO DE ISOLADOS FÚNGICOS DE IMPORTÂNCIA EM
ALIMENTOS**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**CAMPO MOURÃO
2017**

MAIRA MICHELE DOS SANTOS

**MANUTENÇÃO DE ISOLADOS FÚNGICOS DE IMPORTÂNCIA EM
ALIMENTOS**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação, apresentado à disciplina de Trabalho de Diplomação, do Curso Superior de Tecnologia em Alimentos do Departamento Acadêmico de Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR, como requisito parcial para obtenção do título de Tecnólogo.

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Regina Geraldo Perdoncini.

Coorientadora: Adriele Rodrigues dos Santos

CAMPO MOURÃO

2017



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA
FEDERAL DO PARANÁ
Campus Campo Mourão
Departamento Acadêmico de Alimentos



TERMO DE APROVAÇÃO

MANUTENÇÃO DE ISOLADOS FÚNGICOS DE IMPORTÂNCIA EM ALIMENTOS

por

MAIRA MICHELE DOS SANTOS

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi apresentado em Novembro de 2017 como parcial para obtenção do título de Tecnólogo de Alimentos. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Profª Drª Márcia Regina Geraldo Perdoncini
Orientadora

Adriele Rodrigues dos Santos
Coorientadora

Profª Idinea Fernandes dos Santos
Membro da Banca

Profª Eliane Sloboda Rigobello
Membro da Banca

Nota: O documento original e assinado pela Banca Examinadora encontra-se no Departamento Acadêmico de Alimentos da UTFPR Campus Campo Mourão.

RESUMO

SANTOS, M. M. **Manutenção de isolados fúngicos de importância em alimentos**. 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Tecnologia em Alimentos. Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Campo Mourão, 2017.

As coleções de culturas fúngicas são um importante patrimônio biológico, úteis à micologia como suporte em trabalhos científicos. Disponibilizam espécimes a qualquer momento para identificação, estudos morfofisiológicos, ciclo de vida, visando contribuir para o melhoramento de estudo de cada espécime. Não há um método de preservação que seja eficiente e recomendado para os diferentes grupos de fungos, sendo mais adequado aquele que mantiver, mesmo após longos períodos, as características originais da cultura, ou seja, viabilidade, esporulação e patogenicidade, evitando mutações e contaminações indesejadas. A escolha irá depender da infraestrutura do laboratório, do microrganismo em estudo e dos objetivos do trabalho. O presente trabalho objetivou avaliar a esporulação e a viabilidade dos isolados fúngicos utilizados, assim constatando a eficiência do método de preservação da sílica-gel. Mantiveram-se viáveis todos os isolados durante o período de realização do estudo.

Palavras-chave: Preservação. Viabilidade. Sílica-gel.

ABSTRACT

SANTOS, M. M. **Maintenance of fungal isolates of importance in food.** 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Tecnologia em Alimentos. Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Campo Mourão, 2017.

The collections of fungal cultures are an important biological patrimony, useful to mycology as a support in scientific work. They provide specimens at any time for identification, morphophysiological studies, life cycle, aiming to contribute to the study improvement of each specimen. There is no preservation method that is efficient and recommended for different groups of fungi, and it is more appropriate to maintain the original characteristics of the crop, ie, viability, sporulation and pathogenicity, avoiding undesired mutations and contamination. The choice will depend on the infrastructure of the laboratory, the micro-organism under study and the objectives of the work. The objective of this work was to evaluate the sporulation and viability of the fungal isolates used, thus confirming the efficiency of the silica gel preservation method. All isolates were maintained viable during the study period.

Keywords: Preservation. Viability. Silica gel.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Isolado <i>Aspergillus chevalieri</i>	21
Figura 2 - Isolado <i>Aspergillus niger</i>	21
Figura 3 - Isolado <i>Cladosporium oxysporum</i>	21
Figura 4 - Isolado <i>Fusarium graminearum</i> IAPAR 2218.....	21
Figura 5 - Isolado <i>Fusarium graminearum</i> UNB 1269.....	22
Figura 6 - Isolado <i>Oidium</i> sp	22
Figura 7 - Isolado <i>Penicillium citrinum</i>	22
Figura 8 - Isolado <i>Penicillium panemun</i>	22

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Viabilidade dos isolados fúngicos em sílica-gel.....20

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
2. OBJETIVOS.....	10
2.1. OBJETIVO GERAL.....	10
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	10
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
3.1. FUNGOS FILAMENTOSOS.....	11
3.2. FUNGOS FILAMENTOSOS EM ALIMENTOS.....	12
4. COLEÇÃO DE FUNGOS.....	15
5. MÉTODOS DE PRESERVAÇÃO DOS FUNGOS.....	16
5.1. MÉTODO DA SÍLICA-GEL.....	17
6. MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
6.1. MICRORGANISMOS.....	18
6.2. MEIOS DE CULTURAS, MATERIAIS E EQUIPAMENTOS.....	18
6.3. PREPARO DO INOCULO E TRANSFERÊNCIA PARA SÍLICA-GEL.....	18
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
8. CONCLUSÃO.....	24
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	25

1. INTRODUÇÃO

Os microrganismos são fonte de recursos genéticos de grande importância para biotecnologia, são essenciais para o funcionamento e equilíbrio dos ecossistemas. Estes avanços na biotecnologia dão subsídio para novos conhecimentos que são utilizados na agricultura, na indústria alimentar e na medicina (DELLARETTI, 2014).

A importância da manutenção e principalmente preservação de microrganismos caracteriza-se como reflexo da necessidade de utilização de organismos ou espécimes a qualquer momento, com propósitos experimentais, didáticos, industriais ou estudos comparativos (GUIMARÃES, 2011).

A finalidade da preservação é manter as culturas em estado viável, sem mudanças morfológicas, fisiológicas ou genéticas, assim como manter sua completa viabilidade e estabilidade (GUIMARÃES, 2011).

Diversos métodos vêm sendo empregados para preservação de fungos, porém, em virtude da biodiversidade destes microrganismos, não existe uma técnica padrão que seja capaz de preservá-los de forma adequada e generalizada (DELLARETTI, 2014).

A escolha do método de manutenção mais adequado deve ser baseada pelas características do agente em estudo, assim como pelas vantagens e desvantagens de cada técnica disponível (DELLARETTI, 2014).

Entre os diversos métodos utilizados na preservação de fungos destacam-se: repiques periódicos, óleo mineral, baixas temperaturas, nitrogênio líquido, sílica-gel, solo ou areia, água destilada e liofilização (PIRES, APARECIDO, FINATI, 2012).

Sendo assim, o presente trabalho tem por objetivo avaliar a viabilidade dos isolados fúngicos dos gêneros *Cladosporium oxysporum*; *Fusarium graminearum* UNB 1269; *Aspergillus niger*; *Oidium sp*; *Penicillium citrinum*; *Penicillium panemun*; *Aspergillus chevalieri*; *Fusarium graminearum* IAPAR 2218, preservados no método de sílica-gel no Laboratório de microbiologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná Campus Campo Mourão.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Objetivo deste trabalho é manter a coleção de isolados fúngicos viáveis no laboratório de microbiologia da UTFPR Campus Campo Mourão, para que seja utilizada na realização de pesquisas, através de trabalhos de conclusão de curso, iniciação científica, dissertações e teses de pós-graduação.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar os isolados fúngicos previamente identificados;
- Ativar os isolados inoculando-os em meios de cultura apropriados;
- Realizar a incubação em temperatura adequada para crescimento e esporulação.
- Realizar a técnica de manutenção em sílica dos fungos isolados.
- Verificar a viabilidade da técnica, através do cultivo dos fungos armazenados.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. FUNGOS FILAMENTOSOS

Os fungos já foram considerados plantas primitivas ou degeneradas, que perderam a clorofila e a capacidade de realizar fotossíntese. Apesar de muitas estruturas fúngicas serem similares às dos animais, com os quais o Reino está mais relacionado filogeneticamente, outras apresentam variações e outras ainda, são exclusivas dos fungos, constituindo, portanto, um grupo a parte, o Reino Fungi (SILVA, COELHO, 2006).

A identificação dos fungos é baseada quase que exclusivamente em sua morfologia tanto macro como microscopicamente. Macroscopicamente os fungos podem apresentar vários tipos morfológicos como colônias filamentosas (bolores) e colônias cremosas (leveduras). É importante no estudo macroscópico, o tipo de colônia, textura, velocidade de crescimento, formação de pigmentos entre outros. Microscopicamente a unidade estrutural dos fungos é representada pela hifa que forma um conjunto denominado micélio. O micélio pode se apresentar como micélio vegetativo exercendo as funções de assimilação de alimentos, fixação em substratos e crescimento das espécies, ou se diferenciar em micélio de frutificação que serve à reprodução dos fungos (SILVA, 2008).

Os fungos podem se reproduzir de duas maneiras assexuada ou sexuada. Assexuadamente podem gerar por meio de fragmentação e a mais constante que é a esporulação, onde são formados os esporos por meio da mitose, que são liberados e carregados para outro ambiente por meio de vias de dispersão, onde vão germinar. Na reprodução sexuada ocorre a fusão de duas hifas formando uma célula dicariótica, posteriormente unindo os dois núcleos da célula em apenas um, onde o mesmo sofrerá uma meiose, originando esporos (KANAGAWA, NEVES 2011).

Um mesmo fungo pode em determinadas ocasiões ter uma reprodução assexuada e em outra sexuada, o qual é denominado fungo holomorfo. Dependendo do tipo de reprodução, sua morfologia varia. Além disso, alguns fungos apresentam em determinadas condições, um micélio filamentoso e em outras condições, um micélio unicelular (SILVA, COELHO, 2006).

Fungos filamentosos possuem características próprias, os quais são organismos eucarióticos, não possuem clorofila, possuem filamentos simples ou ramificados que são as hifas, são multicelulares, heterotróficos e desempenham respiração celular ou fermentação para o ganho de energia (MORAES, PAES, HOLANDA, 2017). Esses fungos vivem na forma de saprófitas, excretando enzimas digestivas e absorvendo matéria orgânica morta, desempenhando assim papel fundamental no ciclo da vida. Os fungos têm como habitat, os mais diferentes substratos. A grande maioria deles vivem no solo fazendo parte da reciclagem dos materiais na natureza (LIMA, RIBEIRO, SILVA, 2015).

Os fungos formam diversas estruturas de dispersão, sendo a principal, os esporos, e através de dispositivos especiais, essas estruturas entram em contato com várias vias de dispersão. A principal via de dispersão é o ar atmosférico, através dos ventos. Aqueles que se dispersam pelo ar atmosférico são denominados de fungos anemófilos e podem causar alergias no homem e ser agentes deteriorantes de diversos materiais (RIBEIRO, *et al* 2017). Os fungos podem se dispersar também pela água, sementes, insetos, homem, animais, entre outros (SILVA, *et al* 2009). Pelas vias de dispersão, os fungos são espalhados na natureza. Quando encontram um substrato com nutrientes adequados, crescem e colonizam. Dessa forma, podem deteriorar vários materiais (CALLOL, 2013).

3.2. FUNGOS FILAMENTOSOS EM ALIMENTOS

Os fungos apresentam notável importância ecológica e econômica atuando na produção de alimentos, bebidas e medicamentos; sendo parasitas e provocando doenças nos animais e nos vegetais; e reciclando a matéria orgânica juntamente com as bactérias (LIMA, RIBEIRO, SILVA, 2015).

Em relação à utilização na alimentação, alguns fungos, como cogumelos são ricos em vitaminas e apresentam baixos teores de carboidratos e de gorduras, dezenas deles são utilizados na alimentação humana, e alguns são cultivados comercialmente como exemplo, pode-se ser citado o *Agaricus bisporus* e *Agaricus campestris* (champignon) e o *Lentinus edodes* (shitake) (BETT, 2016). Alguns fungos são utilizados durante a produção de queijos, sendo responsáveis pelos sabores característicos de queijos como o roquefort e o camembert, onde são

empregados os fungos *Penicillium roquefortii* e *Penicillium camembertii*, respectivamente (FREITAS, FIGUEIREDO, 2000).

Apesar das implicações econômicas associadas à medicina e a produção de alimentos industrializados, uma das maiores implicações dos fungos é ambiental, uma vez que muitos fungos participam no processo de decomposição da matéria orgânica. O processo de decomposição permite a transformação de elementos presentes nos organismos, sendo essencial para a manutenção da vida. Desta forma, a decomposição da matéria orgânica é um processo que controla várias funções importantes no ecossistema, tais como: reciclagem de nutrientes através da mineralização da matéria orgânica morta; produção de alimentos para uma sequência de organismos na cadeia alimentar de detritos; modificação de materiais inertes da superfície terrestre, produzindo, o complexo característico da terra que é o solo (KANAGAWA, NEVES, 2011).

Os fungos decompositores nutrem-se da matéria orgânica dos corpos em decomposição ou de partes ou resíduos deixados na natureza. Esta ação decompositora é indispensável para o equilíbrio biológico nos diversos ecossistemas da Terra, sendo essencial para a reciclagem de toda matéria na natureza (LIMA, RIBEIRO, SILVA, 2015).

Os microrganismos são seres invisíveis a olho nu, portanto, não sabemos em que quantidade eles estão presentes nos alimentos. Alguns microrganismos são encontrados em forma de bolores, e estão amplamente distribuídos na natureza, são encontrados no solo, ar, água e superfícies de vegetais e nos animais. Geralmente estão presentes em ambientes úmidos e escuros (BOSSOLAN, 2002).

O desenvolvimento microbiano nos alimentos é condicionado por diversos fatores ambientais, como temperatura e umidade relativa, denominados extrínsecos e por fatores intrínsecos, sendo os principais a atividade de água, o pH, o potencial redox e a composição do alimento (FREITAS, FIGUEIREDO, 2000).

O termo micotoxina é usado para designar um grupo de compostos produzidos por algumas espécies fúngicas durante seu crescimento, portanto pode ocorrer em qualquer época do crescimento, colheita, ou estocagem do alimento. Estes metabólicos secundários podem causar doenças ou morte quando ingeridas

pelo homem ou animais. As micotoxinas são contaminantes naturais de difícil controle em alimento (BRASIL, 2009).

Contudo, o crescimento do fungo e a presença de toxinas não são sinônimos, porque nem todos os fungos produzem toxinas. Varias espécies de fungos podem produzir um mesmo tipo de toxina, ou uma espécie de fungos pode produzir vários tipos de toxinas. Por outro lado as micotoxinas podem permanecer no alimento mesmo após a destruição dos fungos que as produziram (MAZIERO, BERSOT, 2010).

4. COLEÇÃO DE FUNGOS

Os fungos, além de exercerem funções de destaque nos seus habitats naturais, representam recursos genéticos para aplicação em inúmeros processos e produtos biotecnológicos. Desse modo, as coleções de culturas fúngicas, se bem estruturadas e conservadas, constituem patrimônio genético de grande valor em nosso mundo globalizado, no qual o desenvolvimento econômico e social sustenta-se, em grande parte, na biotecnologia. Portanto, as atividades de coleta, identificação, caracterização e conservação de fungos são cruciais para a comunidade científica (ABREU, TUTUNJI, 2003).

No Brasil existem instituições de grande relevância para a conservação da biodiversidade e o desenvolvimento de novas pesquisas, as coleções microbiológicas são responsáveis por organizar, classificar e documentar amostras, tornando-as disponíveis para o acesso de pesquisadores, empresas privadas, instituições de pesquisa e outras coleções de cultura (CAVALCANTI, 2010).

Algumas delas são: Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) que atualmente, o acervo conta com 600 exemplares de bactérias e 1.200 amostras de fungos de grande importância para pesquisas que beneficiam a saúde humana. Instituto de Botânica de SP que sua coleção de fungos do Herbário Maria Eneyda Pacheco Kauffmann Fidalgo (SP-Fungi) possui cerca de 35.000 exemplares de fungos e é a segunda maior coleção de fungos macroscópicos do Brasil. O Herbário PACA abriga um acervo de enorme importância histórica e científica para a Micologia e a Botânica no Brasil, com cerca de 140.000 exemplares de plantas e fungos coletados principalmente na região sul do país. A Fundação André Tosello em seus 40 anos de existência se orgulha de ter umas das mais importantes coleções de culturas do mundo, com mais de 7.600 linhagens. American Type Culture Collection (ATCC) é um centro de recursos confiável que hospeda uma diversidade de fungos e leveduras filamentosas, representando mais de 7.600 espécies. A coleção oferece mais de 32.000 cepas genéticas de leveduras.

5. MÉTODOS DE PRESERVAÇÃO DOS FUNGOS

A preservação de culturas fúngicas é o elemento essencial da sistemática e estudos de biodiversidade, pois os fungos são um grupo de grande diversidade e por isso vários métodos de cultivo e preservação são necessários para garantir a viabilidade e integridade morfológica, fisiológica e genética das culturas ao longo do tempo. O custo e a convivência de cada método, no entanto, também devem ser considerados (ABREU, TUTUNJI, 2003).

A preservação de culturas de microrganismos utilizados em programas de controle biológico é um pré-requisito para um grande número de procedimentos industriais e de pesquisa. Os critérios de escolha para um método específico de preservação recaem na manutenção de características morfológicas, bioquímicas e na estabilidade genética, pois caso os fungos sejam mantidos de modo a se adaptarem às condições de armazenamento, propriedades fundamentais dos isolados podem ser perdidas. E ainda, deve-se atentar para que o processo seja seguro e barato e ainda possibilite ao inóculo ser transportado, estocado e reconstituído com facilidade (DELLARETTI, 2014).

Existem vários métodos disponíveis para preservação de isolados fúngicos. Estes métodos podem ser divididos de acordo com tempo de preservação máximo: Métodos de curto prazo: repique contínuo, ou subcultivo. Métodos de médio prazo: preservação em óleo mineral, preservação em água estéril, congelamento a -20°C , secagem em sílica-gel, solo ou papel-filtro. Métodos de longo prazo: liofilização, congelamento a -80°C , criopreservação em nitrogênio líquido. As técnicas de crescimento contínuo envolvem constantes transferências de um meio saturado para um meio nutritivo, propiciando ótimas condições de crescimento podendo ser estocadas em refrigerador. As técnicas de secagem utilizam normalmente as formas de resistência dos fungos, como esporos, baseiam-se na redução da atividade de água e são caracterizadas por reduzir o metabolismo das células durante o período de armazenamento. Finalmente, há possibilidade de suspensão do metabolismo, através de técnicas de liofilização, manutenção em nitrogênio líquido, que propiciam redução de atividade de água por desidratação ou congelamento (CONSERVAÇÃO..., 2008).

5.1. MÉTODO DA SÍLICA-GEL

O armazenamento de fungos em sílica-gel permite conservação de esporos de isolados, por períodos prolongados (PERKINS, 2005). A contaminação por agentes contaminantes é bastante reduzida, pois as condições de umidade baixa previnem a sua presença. Outra grande vantagem deste método é o custo financeiro baixo e não haver necessidade de aparelhagem específica (OLIVEIRA, 2014). Muitas culturas, de um mesmo isolado, podem ser recuperadas de uma mesma amostra de armazenamento (PERKINS, 2005).

Este método consiste em espalhar uma suspensão de esporos de fungos sobre a sílica-gel e, em seguida, armazená-la em temperatura ambiente ou em baixa temperatura (PERKINS, 2005). O princípio deste método constitui na diminuição do metabolismo e evitar o crescimento fúngico por meio da desidratação e baixa temperatura, e é de fácil recuperação das culturas (OLIVEIRA, 2014). Recomenda-se o uso deste método de preservação quando os métodos de liofilização ou nitrogênio líquido não forem adequados (PERKINS, 2005).

6. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1. MICRORGANISMOS

Aspergillus chevalieri; *Aspergillus niger*; *Cladosporium oxysporum*; *Fusarium graminearum* UNB 1269; *Fusarium graminearum* IAPAR 2218; *Oidium* sp; *Penicillium citrinum*; *Penicillium panemun*.

6.2. MEIOS DE CULTURAS, MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

Preparo do meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA) – foi pesado 14,7g de BDA e dissolvido em 350ml de água destilada, aqueceu-se com agitação constante com auxílio de um bastão de vidro até o ágar dissolver aproximadamente à temperatura de 98°C. Em seguida foi transferido para um enlarmeyer e tapado com um tampão de algodão e gaze, foi esterilizado em autoclave à temperatura de 121°C por 15 minutos. Após esfriar até aproximadamente 50°C verteu-se em placas de Petri estéreis dentro da câmara de fluxo laminar e ao lado da chama.

Preparo do meio de cultura Leite Desnatado – foi pesado 5g de leite em pó e dissolvido em 100ml de água destilada, para obter uma concentração de 5%. Pipetou-se 3ml do meio preparado em tubos de ensaio e tampou-se. Foi esterilizado em autoclave por 15 minutos em temperatura de 121°C.

Materiais e equipamentos utilizados: Estufa incubadora - AAKER; geladeira; câmara de fluxo laminar – GRUPO VECO BIOSEG 09; vórtex; autoclave; microscópio luminoso - NIKON; meio de cultura BDA – KASVI; leite desnatado – PIRACANJUBA; sílica-gel - SYNTH.

6.3. PREPARO DO INOCULO E TRANSFERÊNCIA PARA SÍLICA-GEL

Os isolados foram inoculados em placas de Petri em meios de Batata Dextrose Agar (BDA), e incubados por 7 dias a 25°C para o crescimento e esporulação dos fungos. Foi adicionado 1 ml de leite desnatado 5% esterilizado a cultura para realização da raspagem da superfície com o auxílio de uma alça de inoculação flambada e resfriada para soltar os esporos. Em seguida foi transferido com o auxílio de uma micropipeta esterilizada a solução de esporos para um tubo contendo 2 ml de leite desnatado 5%, e agitou-se no vórtex por 30 segundos. Foi transferido novamente com auxílio da micropipeta esterilizada o leite de esporos a

um tubo esterilizado contendo sílica congelada. Onde permaneceram na estufa por 30 dias a 25°C, agitando-os a cada 2 dias no vórtex. Após este período verificou-se a eficiência da técnica de manutenção, colocando uma partícula da sílica em placas de petri com meio BDA, e incubando-as por mais 7 dias a 25°C. Para verificar se houve crescimento micelial após este período foi realizado uma conferência visual e microscópica de cada isolado.

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram coletados 24 amostras divididas entre as seguintes espécies: *Aspergillus chevalieri*; *Aspergillus niger*; *Cladosporium oxysporum*; *Fusarium graminearum* UNB 1269; *Fusarium graminearum* IAPAR 2218; *Oidium sp*; *Penicillium citrinum*; *Penicillium panemun*. De forma geral, os isolados apresentaram crescimento micelial e não foram observadas diferenças significativas entre eles. A tabela 1 representa a viabilidade dos isolados fúngicos pelo método de preservação da sílica-gel.

Tabela 1 – Viabilidade dos isolados fúngicos em sílica-gel

Fungos	Viabilidade
<i>Aspergillus chevalieri</i>	+
<i>Aspergillus niger</i>	+
<i>Cladosporium oxysporum</i>	+
<i>Fusarium graminearum</i> IAPAR 2218	+
<i>Fusarium graminearum</i> UNB 1269	+
<i>Oidium sp</i>	+
<i>Penicillium citrinum</i>	+
<i>penicillium panemun</i>	+

+: Houve crescimento micelial (Viável)

-: Não houve crescimento micelial

Todos os isolados preservados apresentaram desenvolvimento micelial para serem repicados para os tubos com sílica. Em relação ao crescimento micelial em meio de BDA em placas de Petri, todos os isolados, mesmo após o período de preservação apresentaram excelente crescimento e esporulação, após sete dias de incubação. Observou-se que os isolados não apresentaram mudanças em relação aos resultados obtidos antes da preservação.

Os resultados apresentados demonstram que o método desenvolvido para manutenção, preservação e a determinação da viabilidade de fungos filamentosos é efetivo e de fácil execução.

As imagens a seguir representam os resultados de cada isolado fúngico a partir de uma partícula de sílica-gel.

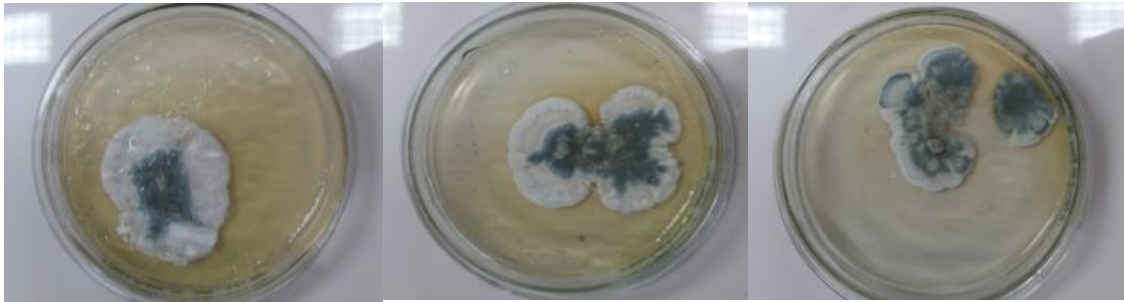


Figura 1 – Isolado *Aspergillus chevalieri*



Figura 2 – Isolado *Aspergillus niger*



Figura 3 – Isolado *Cladosporium oxysporum*



Figura 4 - *Fusarium graminearum* IAPAR 2218



Figura 5 – Isolado *Fusarium graminearum* UNB 1269



Figura 6 – Isolado *Oidium* sp



Figura 7 – Isolado *Penicillium citrinum*



Figura 8 – Isolado *Penicillium panemun*

Os fungos possuem uma imensa versatilidade de crescimento em atividade de água e pH reduzido, grande variedade de temperatura e substrato, capacidade de esporulação e disseminação em várias condições. O crescimento dos fungos tanto altera a composição química quanto a estrutura do alimento, fazendo com que

este seja desprezado, resultando na perda econômica e desperdício da matéria prima (SILVA, 2008).

Oliveira (2014) fez um estudo durante 180 dias, utilizando nove isolados de dois gêneros diferentes, por meio do método de preservação da sílica-gel, observou que o método é eficiente, porém depende muito da esporulação de cada espécie. Contudo a patogenicidade dos isolados não foi afetada pelo método avaliado.

Segundo Windels, Burnes e Kommedahl (1988) muitos isolados foram adequadamente preservados pelo método de sílica-gel a longo prazo, considerando assim o método eficiente para armazenamento de isolados por períodos prolongados. Também relata que a alta esporulação é essencial para este método.

Gonçalves, Hanada e Jesus (2009) observou que a viabilidade dos isolados é eficiente, e que foi possível identificar morfológicamente os isolados que estavam armazenados neste método de preservação.

Segundo Neiva, Yano e Sosa-Gómez (2017) a baixa umidade favoreceu a preservação no método de sílica-gel, constatando a maior viabilidade e a que menos houve contaminação dos isolados.

8. CONCLUSÃO

A preservação de microrganismos é um recurso prático e necessário para a atividade didática e de pesquisa. Pensar em manter, estocar e preservar coleções significa assegurar um patrimônio de culturas e bancos de isolados com atenção à morfologia, fisiologia, características toxigênicas. Entretanto, diferenças e características próprias de cada gênero e espécie, determinam as condições específicas da metodologia de preservação a ser empregada. O método de preservação deve manter as características originais dos fungos como a capacidade de esporulação. Além disso, o método deve ter baixo custo e requerer pouco espaço, requisitos preenchidos pelo método avaliado neste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, M. M. V.; TUTUNJI, V. L. **Implantação e manutenção da coleção de Culturas de microrganismos do UniCEUB**. Brasília: Universitas Ciências da Saúde, v.02 n.2, pp. 236-251, 2003.

AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION (ATCC) Disponível em:
<<https://www.atcc.org/>>. Acesso em: 26 out. 2017.

BETT, C. F. **Cultivo artesanal do cogumelo shiitake: uma potencial atividade para agroecossistemas sustentáveis**. Pato Branco, PR: Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR. Dissertação. 2016.

BOSSOLAN, N. R. S. **Introdução a Microbiologia**. São Paulo, SP: Universidade de São Paulo - USP. 2002.

BRASIL, Food Ingredients. **As micotoxinas**. Revista Nº 7 - 2009. Disponível em:
<<http://www.revista-fi.com/materias/90.pdf>>. Acesso em: 17 out. 2017.

CALLOL, M. V. **Biodeterioração do patrimônio histórico documental: alternativas para sua erradicação e controle**. Pág. 51-53. Rio de Janeiro, RJ: MAST / FCRB. 2013.

CAVALCANTI, S. D. B. **Aplicação de metodologia de preservação e caracterização de fungos na coleção de culturas do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. São Paulo, SP: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo - USP. 2010.

CONSERVAÇÃO de Microrganismos. Curitiba, PR. UFPR - UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. 2008. Disponível em:
<<http://www.ebah.com.br/content/ABAAAAXDwAD/conservacao-microrganismos#>>. Acesso em: 15 out. 2017.

DELLARETTI, E. M. **Preservação de fungos em baixas temperaturas**. Sete Lagoas, MG: Universidade Federal de São João - UFSJ. 2014.

FREITAS, A. C.; FIGUEIREDO, P. **Conservação de Alimentos**. Lisboa. 2000.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. Disponível em: <<https://portal.fiocruz.br/pt-br>>. Acesso em: 26 out. 2017.

FUNDAÇÃO ANDRE TOSELLO. Disponível em: <<http://fat.org.br>>. Acesso em: 26 out. 2017.

GUIMARÃES, L. C. **Métodos de preservação de fungos potencialmente toxigênicos**. Lavras, MG: Universidade Federal de Lavras - UFLA. 2011.

GONÇALVES, K. M.; HANADA, R. E.; JESUS, M. A. **Manutenção e preservação das culturas de fungos do gênero *Trichoderma* e *Penicillium* depositados no laboratório de patologia de madeira**. Manaus, AM. XVIII Jornada de Iniciação Científica PIBIC CNPq/FAPEAM/INPA. 2009.

INCT – HERBÁRIO VIRTUAL DA FLORA E DOS FUNGOS. Disponível em: <<http://inct.florabrasil.net/colecao-de-fungos-do-instituto-de-botanica-de-sp-incorpora-dados-a-rede-inct-herbario-virtual/>>. Acesso em: 26 out. 2017.

INCT – HERBÁRIO VIRTUAL DA FLORA E DOS FUNGOS. Disponível em: <<http://inct.florabrasil.net/paca-fungos>>. Acesso em: 26 out. 2017.

KANAGAWA, A. I.; NEVES, M. A. **Biologia e sistemática de fungos, algas e briófitas**. João Pessoa, PB: Universidade Federal da Paraíba - UFPB. 2011.

LIMA, E. F.; RIBEIRO M. I. D.; SILVA, T. L. L. **Diversidade de fungos anamorfos associados a decomposição**. Imperatriz, MA: Universidade Estadual do Maranhão - UEMA. 2015.

MAZIERO, M. T.; BERSOT, L. S. **Micotoxinas em alimentos produzidos no Brasil**. Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, Campina Grande, v.12, n.1, p.89-99, 2010.

MORAES, A. M. L.; PAES, R. A.; HOLANDA, V. L. **Micologia**. Capítulo 4. 2017.

NEIVA, M. M.; YANO, S. A. C.; SOSA-GÓMEZ, D. **Viabilidade de conídios de *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson conservados em diferentes condições de umidade**. VII Jornada Acadêmica da Embrapa Soja. P. 124-127. 2017.

OLIVEIRA, L. S. **Métodos para preservação de *Colletotrichum lindemuthianum* e *Pseudocercospora griseola***. Lavras, MG: Universidade Federal de Lavras - UFLA. 2014.

PERKINS, D. **How to preserve stocks**. Post. McC, DDP revision, 2005.

PIRES, G. C. C.; APARECIDO, C. C.; FINATTI, D. **Preservação em laboratório de fungos filamentosos por longos períodos de tempo**. São Paulo, SP: Divulgação técnica. 2012.

RIBEIRO, M. M. *et al.* **Levantamento da microbiota fúngica em clínica de fisioterapia de um centro universitário de práticas supervisionadas**. São José dos Campos, SP: Universidade do Vale do Paraíba - UNIVAP. 2017.

SILVA, L. F. **FUNGOS: um estudo sobre a sua ocorrência nos alimentos**. Belo Horizonte, MG: Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG. 2008.

SILVA, R. R.; COELHO, G. D. **Fungos principais grupos e aplicações biotecnológicas**. São Paulo, SP: Instituto de Botânica - IBt. 2006.

SILVA, F. P. *et al.* **Sazonalidade de *Cladosporium* sp (fungo anemófilo) na cidade de Tangará da Serra-MT em função dos fatores ambientais no período de um ano**. Barra do Bugres, MT: Universidade do Estado de Mato Grosso - UNEMAT. 2009.

WINDELS, C. E.; BURNES, P. M.; KOMMEDAHL, T. **Five-year preservation of *Fusarium* species on silica gel and soil**. The American Phytopathological Society. Saint Paul, v. 78, p.107-109. 1988.