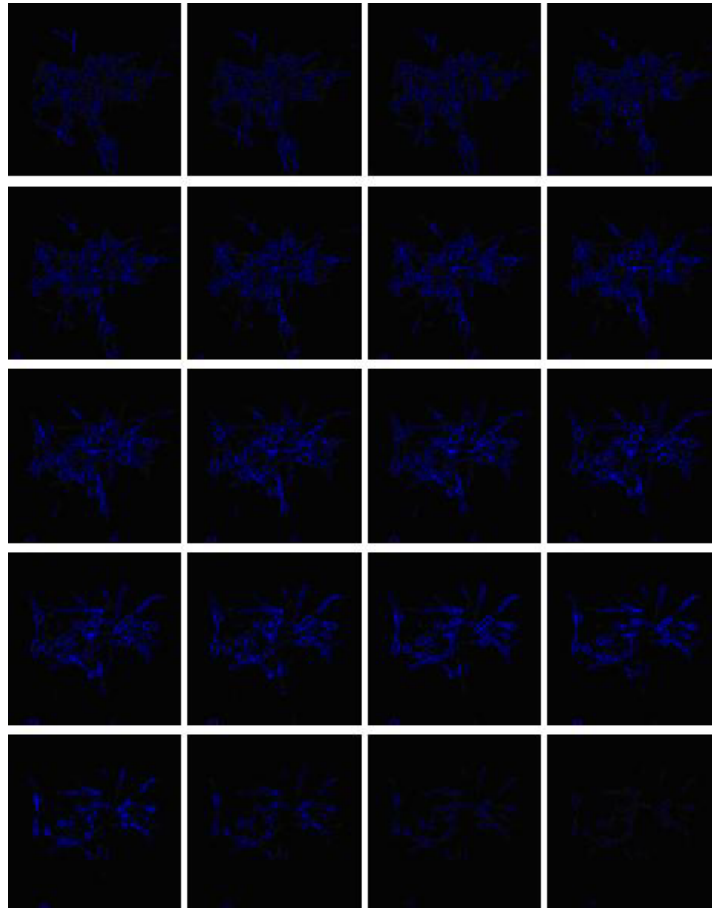
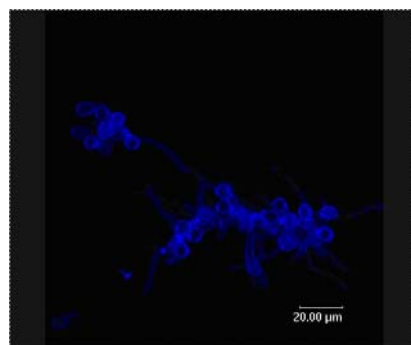


Na Figura 3.24 apresenta-se amostras de *Penicillium brevicompactum* crescidas em meio MEA líquido coradas simultaneamente coradas com FUN<sup>®</sup>1 e Calcofluor. Para a observação utilizou-se um microscópio de epifluorescência confocal LSM 510 META (Zeiss).



**Figura 3.24** - Aspecto morfológico de secções com “cortes” com diferentes profundidades da estirpe *P. brevicompactum* em cultura pura corado com Calcofluor, observadas em microscópio confocal (Zeiss) usando a objectiva 40X.



**Figura 3.25** – Reconstrução das diferentes secções (Figura 3.24) da estirpe *P. brevicompactum* em cultura pura corado com Calcofluor, observadas em microscópio confocal (Zeiss) usando a objectiva 40X.

Na Figura 3.25 apresenta-se amostras de *P. brevicompactum* coradas com Mag-fura-2 AM. Para a observação utilizou-se um microscópio de epifluorescência Axioskop (Carl Zeiss) equipado com objectiva 40X/0,30 usando luz UV.



**Figura 3.26** - Aspecto morfológico estruturas de *P. brevicompactum* em cultura pura corado com Mag-fura-2 AM, observas em microscópio epifluorescência Axioskop (Zeiss) usando a objectiva 40X.

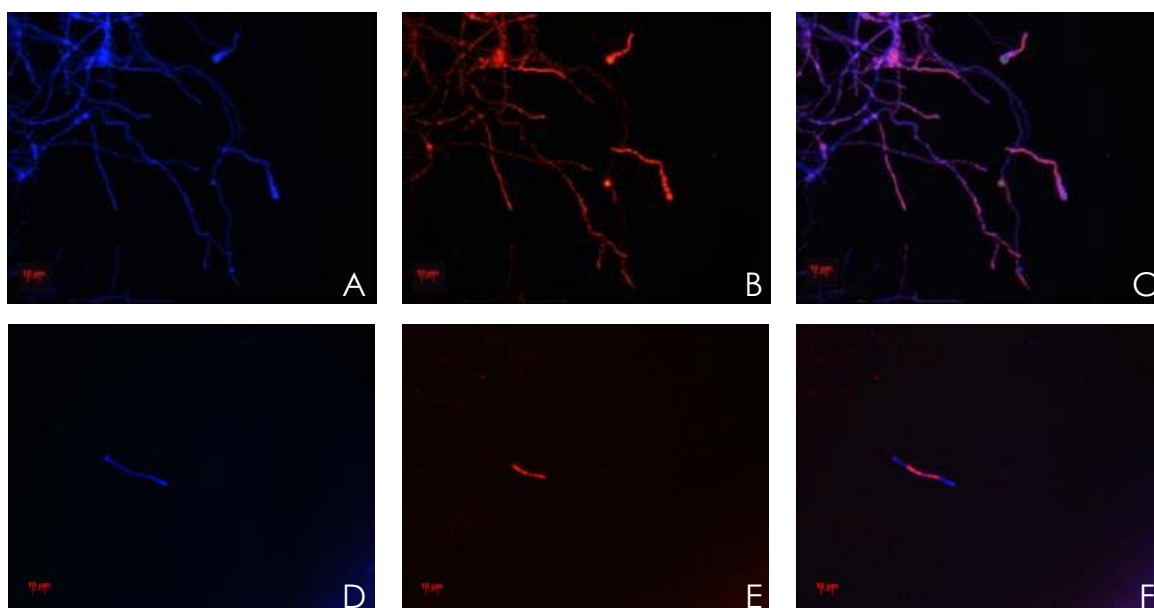
O Calcofluor White revelou-se um reagente de fácil aplicação e muito eficaz na detecção de fungos filamentosos. Este reagente foi usado em conjunto com uma corante de viabilidade, FUN®1, com esta conjugação pode-se visualizar não só a parede celular e a sua integridade mas também indagar quanto ao estado metabólico do espécimen. No entanto, ao contrário do CFW o FUN®1 revelou-se um reagente de implementação cuidadosa pois é sensível a variações no tempo e temperatura de incubação, o sinal deste corante também é perdido com alguma facilidade (verificando-se um aumento com a adição de uma solução de glucose no período de incubação). Também o reagente Mag-fura 2 AM se revelou uma reagente sensível e com sinal de fraca intensidade.

O uso de um microscópio de fluorescência confocal revelou-se uma ferramenta com muita potencialidade. No entanto, o acesso à sua utilização limitou-se a apenas algumas horas o que não possibilitou explorar as suas potencialidades.

### 3.5 FISH

Na Figura 3.26 apresenta-se amostras de *P. brevicompactum* em cultura pura coradas com Calcofluor e hibridizados através da técnica de FISH. Para a observação utilizou-se um microscópio de epifluorescência Axioskop (Carl Zeiss) equipado com objectiva 40X/0,30 usando luz UV. O comprimento de onda de excitação para o Calcofluor é 346 nm e o sinal é azul, enquanto que para o Cy3 o comprimento de excitação é 543 nm e o sinal é vermelho. O

processamento das imagens virtuais (C e F) foi levado criado usando o programa Paint Shop Pro 7, um programa de processamento de imagens.



**Figura 3.27** – Aspecto morfológico estruturas de *P. brevicompactum* em cultura pura corado com (A, D) Calcofluor, (B, E) Cy3, (C, F) imagem virtual com os dois corantes anteriores.

Implementou-se um procedimento experimental para a técnica de FISH a qual se demonstrou uma ferramenta com grande aplicabilidade para amostras de biofilme.

