



**POLITÉCNICO
DE LISBOA**

POLYTECHNIC
UNIVERSITY
OF LISBON

INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA

ESCOLA SUPERIOR DE SAÚDE DE LISBOA

**ESTÁGIO EM CONTAMINAÇÃO MICROBIANA EM DIFERENTES
AMBIENTES OCUPACIONAIS E INTERIORES**

CLÁUDIA FILIPA NUNES RODRIGUES

ORIENTADORAS:

DOUTORA CARLA SOFIA VIEGAS – ESCOLA SUPERIOR DE SAÚDE DE LISBOA

DOUTORA CARINA LADEIRA – ESCOLA SUPERIOR DE SAÚDE DE LISBOA

MESTRE RENATA CERVANTES – ESCOLA SUPERIOR DE SAÚDE DE LISBOA

Mestrado em Tecnologias Clínico-Laboratoriais

Lisboa, 2025

INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA

ESCOLA SUPERIOR DE SAÚDE DE LISBOA

**ESTÁGIO EM CONTAMINAÇÃO MICROBIANA EM DIFERENTES
AMBIENTES OCUPACIONAIS E INTERIORES**

CLÁUDIA FILIPA NUNES RODRIGUES

ORIENTADORAS:

DOUTORA CARLA SOFIA VIEGAS – ESCOLA SUPERIOR DE SAÚDE DE LISBOA

DOUTORA CARINA LADEIRA – ESCOLA SUPERIOR DE SAÚDE DE LISBOA

MESTRE RENATA CERVANTES – ESCOLA SUPERIOR DE SAÚDE DE LISBOA

JÚRI

PRESIDENTE: DOUTORA EDNA SORAIA RIBEIRO - ESCOLA SUPERIOR DE
SAÚDE DE LISBOA

ARGUENTE: DOUTORA CARLA ALEXANDRA TELES MARTINS - ESCOLA
NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA

Mestrado em Tecnologias Clínico-Laboratoriais

(esta versão incluiu as críticas e sugestões feitas pelo júri)

Lisboa, 2025

*“Somos o que repetidamente fazemos. A excelência, portanto, não é um feito,
mas um hábito.” - Aristóteles*

AGRADECIMENTOS

Este estágio, é o resultado de anos de estudo, aprendizagem e dedicação que só foi conseguido por ter tido muitas pessoas essenciais nesta minha caminhada. Em primeiro lugar, gostaria de agradecer ao H&TRC e, em particular, à equipa do Laboratório de Microbiologia Ambiental e Ocupacional por me terem concedido este estágio e por ter sido tão bem acolhida. No geral, esta foi uma experiência de aprendizagem muito rica, pois adquiri muitos conhecimentos sobre uma das minhas áreas de maior interesse.

Um agradecimento especial à Professora Carla Viegas que teve sempre disponível para esclarecer qualquer dúvida, e que deu sempre o apoio fundamental para que tudo corresse bem.

Agradecer também ao Pedro Pena, que sempre me orientou e ensinou-me bastante a nível de formatação de dados, agradecer também pela paciência que teve comigo.

Em especial, agradecer à Renata Cervantes, que foi luz no meu caminho, foi mais de que uma orientadora, esteve sempre presente em todas as minhas etapas durante o estágio, dando a maior orientação e ajuda na elaboração deste relatório e nos restantes trabalhos escritos e laboratoriais. Agradecer também pela dedicação e por nunca me ter deixado desistir.

Às minhas colegas de estágio, Cátia, Márcia, Bruna e Liliana, agradeço pela paciência e companheirismo tornando assim tudo mais fácil.

Agradecer também à Professora Carina Ladeira, por toda a dedicação, disponibilidade e incentivo que também ajudou bastante desde a escolha deste estágio até à defesa do mesmo.

À minha família, em especial ao meu Avô que mesmo já não estando presente, transmitiu-me toda a confiança em mim e encorajou-me nesta minha etapa tão importante. O apoio de toda a família, foi sem dúvida, uma das minhas maiores motivações e forças para concretizar este estágio.

Às minhas amigas, Marisa, Margarida, Diana, Joana e Caniço, um agradecimento gigante por toda a compreensão, paciência e dedicação que mesmo quando a resposta é “não posso ir sair porque tenho coisas para estudar”, continuavam sempre presentes quando mais precisava prontas para me arrancarem uma gargalhada e tornar tudo mais leve.

*H&TRC authors gratefully acknowledge FCT/MCTES UIDP/05608/2020
(<https://doi.org/10.54499/UIDP/05608/2020>) and UIDB/05608/2020*

(<https://doi.org/10.54499/UIDB/05608/2020>). This work is also supported by national funds through FCT/MCTES/FSE/UE, 2023.01366.BD (<https://doi.org/10.54499/2023.01366.BD>); UI/BD/153746/2022 and CE3C unit UIDB/00329/2020 (<https://doi.org/10.54499/UIDB/00329/2020>); UI/BD/151431/2021 (<https://doi.org/10.54499/UI/BD/151431/2021>); and Instituto Politécnico de Lisboa, national support through IPL/2022/InChildhealth/BI/12M; and for funding the projects IPL/IDI&CA2024/WWTPSValor_ESTeSL and IPL/IDI&CA2024/MycoSOS_ESTeSL, and the Academy of Medical Sciences (SBF007/100130). Funded by the European Union (grant agreement: 101056883). Views and opinions expressed are however, those of the author(s) only and do not necessarily reflect those of the European Health and Digital Executive Agency (HaDEA). Neither the European Union nor the granting authority can be held responsible for them. InChildHealth is also receiving funding from the Swiss State Secretariat for Education, Research and Innovation (SERI grant agreement 22.00324), from the United Kingdom Research and Innovation (UKRI grant agreement 10040524), and from the Australian National Health & Medical Research Council (NHMRC grant agreements APP2017786 and APP2008813).

I take a little piece of each of you with me, thank you very much!

RESUMO

No segundo ano do Mestrado Tecnologias Clínico-Laboratoriais, está integrado a unidade curricular Projeto/Tese/Estágio, em que se pode escolher a tipologia de estágio, apresentando no fim um relatório sobre as atividades desenvolvidas. O estágio realizado foi de natureza profissional, com início a 11 de novembro de 2024 e término a 11 de abril de 2025, com duração de 600 horas no laboratório de Microbiologia Ambiental e Ocupacional, pertencente ao Health & Technology Research Center.

Durante este período foi desenvolvido um projeto de doutoramento, com o objetivo de avaliar a exposição ocupacional/ambiental a agentes microbiológicos, como fungos e bactérias, em diferentes ambientes. Foram realizadas campanhas de amostragem ambiental, seguidas de atividades laboratoriais para a preparação e análise das amostras obtidas. O tratamento das amostras envolveu a aplicação de técnicas de microbiologia clássica, complementadas por métodos de biologia molecular.

O estágio abrangeu os conhecimentos adquiridos no primeiro ano curricular, para além de proporcionar a aquisição de novas competências práticas na área da microbiologia ambiental. Permitiu ainda a elaboração de produção científica (artigos, posters científicos, entrevistas) e reflexões sobre outros possíveis projetos de estudo.

PALAVRAS-CHAVE

Saúde ocupacional; Contaminantes biológicos aéreos; Prática laboratorial; Microbiologia ambiental e ocupacional

ABSTRACT

The second year of the Master's Degree in Clinical Laboratory Technologies includes the Project/Thesis/Internship course, in which students can choose the type of internship and submit a report on the activities carried out at the end. The internship was professional in nature, beginning on November 11, 2024, and ending on April 11, 2025, lasting 600 hours in the Environmental and Occupational Microbiology laboratory, which belongs to the Health & Technology Research Center.

During this period, a doctoral project was developed with the aim of assessing occupational/environmental exposure to microbiological agents, such as fungi and bacteria, in different environments. Environmental sampling campaigns were carried out, followed by laboratory activities for the preparation and analysis of the samples obtained. The treatment of samples involved the application of classical microbiology techniques, complemented by molecular biology methods.

The internship covered the knowledge acquired in the first academic year, in addition to providing the acquisition of new practical skills in the field of environmental microbiology. It also allowed for the production of scientific work (articles, scientific posters, interviews) and reflections on other possible study projects.

KEY WORDS

Occupational health; Airborne biological contaminants; Laboratory practice; Environmental and occupational microbiology

Índice

1. INTRODUÇÃO	1
a) Objetivos do Estágio	1
b) Justificação e Relevância do Estágio	2
c) Descrição do Local de Estágio	3
2. PROJETO EM DESENVOLVIMENTO	5
3. ENQUADRAMENTO TEÓRICO	7
a) Agentes Microbiológicos	7
b) Metodologias de Avaliação Microbiológica	9
c) Fungos e a sua relevância.....	10
d) <i>Aspergillus sp.</i>	11
e) Métodos de Amostragem.....	13
1. Métodos Ativos	13
2. Métodos passivos	16
f) Extração de Amostras	20
g) Análises Laboratoriais	20
1. Preparação de Meios de Cultura.....	21
2. Preparação de lâminas para observação microscópica	26
3. Reisolamento	27
h) Análises Moleculares	29
• Extração de DNA.....	29
• Preparação de PCR quantitativo, em tempo real	30
4. PRODUÇÃO CIENTÍFICA	31
5. DISCUSSÃO E REFLEXÃO CRÍTICA	32
6. PROPOSTA DE TRABALHO DE PESQUISA NA ÁREA	34
a) Introdução.....	35

b) Estado da Arte	35
c) Metodologia.....	36
d) Cronograma	37
e) Resultados Esperados	38
f) Conclusão.....	38
g) Limitações	39
7. REFERÊNCIAS.....	40

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA I - QUANTIDADES PARA CADA MEIO DE CULTURA PARA DETERMINAÇÃO DE CONTAMINAÇÃO BACTERIANA	21
TABELA II – QUANTIDADES PARA CADA MEIO DE CULTURA PARA DETERMINAÇÃO DE CONTAMINAÇÃO FÚNGICA.....	21
TABELA III -QUANTIDADE DE AZOL ADICIONADO A SDA.....	22

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 - LISTA DE AGENTES PATOGENICOS FÚNGICOS E BACTERIANOS PRIORITÁRIOS DA OMS.....	9
FIGURA 2 - ANDERSEN SIX-STAGES.....	14
FIGURA 3 - MAS-100	15
FIGURA 4 - BUTTON SAMPLER (BS).....	16
FIGURA 5 - EXEMPLO DE UM EDC	17
FIGURA 6 - EXEMPLO DE UM EDT	17
FIGURA 7 - ZARAGATOIA DE SUPERFÍCIE	18
FIGURA 8 - SD	19
FIGURA 9 - ESFREGONA (MOPS)	19
FIGURA 10 - PROCEDIMENTO DE INOCULAÇÃO.....	24
FIGURA 11 - PROCEDIMENTO DE INOCULAÇÃO DE AMOSTRAS	25
FIGURA 12 - CONTAGEM DE UFC'S EM PLACAS DE PETRI	26
FIGURA 13 - PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS COM COLORAÇÃO DE LACTOFENOL	27
FIGURA 14 - OBSERVAÇÃO MICROSCÓPICA DE ASPERGILLUS	27
FIGURA 15 - PROCESSO DE REISOLAMENTO FÚNGICO.....	28

ABREVIATURAS

BS – *Button Sampler*

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DG18 – *Dichloran Glycerol Agar 18%*

DPOC – Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica

EDC – *Electrostatic Dust Collector*

EDT – *Electrostatic Dust T-shirt*

ESSL – Escola Superior de Saúde de Lisboa

H&TRC – *Health & Technology Research Center*

ITRA – Itraconazol

LMAO – Laboratório de Microbiologia Ambiental e Ocupacional

MAC – *MacConkey Agar*

MEA – *Malt Extract Agar*

PBS – *Phosphate Buffered Saline* (Solução salina tamponada com fosfato)

PCR – Reação em Cadeia de Polimerase

POSA – Posaconazol

QAI – Qualidade do Ar Interior

qPCR – Reação em Cadeia de Polimerase quantitativa

SD – *Settled Dust* (poeira sedimentada)

TSA – *Tryptic Soy Agar*

UFC – Unidades Formadoras de Colónias

VORI – Voriconazol

VRBA – *Violet Red Bile Agar*

1. INTRODUÇÃO

No segundo ano do Mestrado em Tecnologias Clínico-Laboratoriais da Escola Superior de Saúde de Lisboa (ESSL), o estágio e o relatório escrito são componentes obrigatórias do currículo. Estes elementos permitem aos alunos desenvolver competências práticas e aplicar os conhecimentos teóricos em contextos reais e aprimorar as suas competências de pesquisa e análise por meio da elaboração de um relatório final.

Devido à natureza deste estágio, o formato e a estrutura deste relatório não seguem os padrões convencionais de um relatório tradicional. Estas adaptações foram feitas com o objetivo de apresentar de maneira mais clara as especificidades deste tipo de estágio e dar uma visão mais completa e detalhada da experiência vivida.

O presente relatório encontra-se estruturado em diferentes capítulos que refletem as atividades desenvolvidas durante o estágio, bem como as aprendizagens e reflexões decorrentes desta experiência.

Numa primeira parte, apresenta-se a fundamentação do estágio, os seus objetivos, a relevância e o contexto institucional onde decorreu. Em seguida, descrevem-se as atividades desenvolvidas no âmbito do projeto em que estive inserida. Inclui-se também um enquadramento teórico que aprofunda conceitos essenciais relacionados com os agentes microbiológicos e os métodos de avaliação utilizados. Posteriormente, são expostas as atividades de produção científica realizadas durante o estágio, como artigos em elaboração, participação em congressos e colaborações em revisões sistemáticas.

O relatório integra ainda uma secção de reflexão crítica, onde são discutidos os principais resultados alcançados, as aprendizagens obtidas e o impacto desta experiência na formação pessoal e profissional. Por fim, apresenta-se uma proposta de trabalho futuro, que dá continuidade à temática explorada, e reúnem-se as referências bibliográficas que sustentaram a elaboração deste relatório.

a) Objetivos do Estágio

A realização deste estágio profissional é essencial para adquirir competências teóricas e práticas no ambiente tendo em conta a Saúde Pública.

Os principais objetivos deste estágio foram:

- Realizar estudos em diferentes ambientes ocupacionais com o objetivo de caracterizar a contaminação microbiana (bactérias e fungos), assim como a resistência microbiana presente em espaços interiores. Foi dado especial destaque à deteção da espécie *Aspergillus fumigatus*.

- Conciliar a experiência prática com os conhecimentos teóricos adquiridos ao longo do mestrado, em particular na área da Microbiologia, através da aplicação de métodos de cultura microbiológica com relevância para a saúde pública, incluindo a inoculação de diferentes tipos de amostras (poeiras sedimentadas (SD), filtros e zaragatoa, e amostras de ar) recolhidas nos ambientes estudados.

- Aplicar técnicas de Biologia Molecular como a Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (qPCR), com o objetivo de detetar indicadores específicos de contaminação fúngica com potencial impacto na saúde.

- Desenvolver competências de comunicação científica, através da elaboração de artigos.

b) Justificação e Relevância do Estágio

A realização deste estágio teve grande relevância quer a nível académico, quer profissional. A oportunidade de integrar uma equipa de investigação permitiu aplicar de forma prática os conhecimentos teóricos adquiridos ao longo do primeiro ano do mestrado, especialmente, nas áreas de microbiologia, saúde pública e técnicas laboratoriais. A participação num projeto de investigação em curso, alinhado com a área em estudo proporcionou-me uma experiência enriquecedora, que através dos meus orientadores que são investigadores experientes, proporcionou-me a possibilidade de desenvolver competências essenciais como o procedimento de amostras provenientes de diferentes ambientes e a aplicação de técnicas laboratoriais, assim como na produção científica. Adicionalmente, o contacto direto com a rotina de um laboratório de investigação permitiu o desenvolvimento de competências transversais, como o pensamento crítico, a capacidade de adaptação e a resolução de problemas em tempo real, bem como o reforço de competências interpessoais fundamentais para o trabalho em equipa e em contexto científico. Este estágio constituiu, assim, uma etapa essencial na consolidação da formação académica e na preparação para futuros desafios profissionais nesta área.

A avaliação de ambientes interiores e ocupacionais tornou-se ainda mais importante face às alterações climáticas globais onde existem diferentes temperaturas e níveis de humidade, o que promove o crescimento de fungos e bactérias em ambientes fechados (Arundel et al., 1986; Sundell et al., 2011).

Os microrganismos, como *Aspergillus*, *Penicillium* e *Stachybotrys spp.* proliferam mais rápido em ambientes húmidos, libertando esporos e micotoxinas prejudiciais à saúde respiratória (“WHO guidelines for indoor air quality,” 2009).

A resistência microbiana tornou-se um problema crítico para a saúde pública e ambiental, uma vez que alguns microrganismos conseguem persistir em ambientes internos mesmo após a desinfeção. Esta persistência aumenta o risco de exposição, especialmente em trabalhadores, tornando essencial avaliar continuamente a presença destes organismos e orientar estratégias de prevenção (Allen et al., 2010; Martínez, 2008)

c) Descrição do Local de Estágio

O estágio curricular decorreu no Centro de Investigação em Tecnologias da Saúde (H&TRC) pertencente à Escola Superior de Saúde de Lisboa (ESSL), sendo reconhecido pela sua forte componente científica e tecnológica. O estágio decorreu entre 11 de novembro de 2024 até 11 de abril de 2025, num total de 600 horas. O trabalho laboratorial foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia Ambiental e Ocupacional (LMAO), tendo sido orientada pelas Professoras Doutoras Carla Viegas, Carina Ladeira e doutoranda Renata Cervantes.

O H&TRC, oferece condições de excelência permitindo o contacto direto com metodologias de investigação inovadoras. O Laboratório de Microbiologia Ambiental e Ocupacional (LMAO), tem como missão promover a investigação aplicada à saúde pública, bem como a avaliação de riscos ambientais e ocupacionais. O laboratório onde desenvolvi a minha atividade foca-se no estudo de agentes microbiológicos presentes em ambientes interiores bem como em contextos ocupacionais.

A avaliação de ambientes interiores e ocupacionais tornou-se ainda mais importante face às alterações climáticas globais onde existem diferentes temperaturas e níveis de humidade, o que promove o crescimento de fungos e bactérias em ambientes fechados (Arundel et al., 1986; Sundell et al., 2011).

Os microrganismos, como *Aspergillus*, *Penicillium* e *Stachybotrys spp.* proliferam mais rápido em ambientes húmidos, libertando esporos e micotoxinas prejudiciais à saúde respiratória (“WHO guidelines for indoor air quality,” 2009).

A resistência microbiana tornou-se um problema crítico para a saúde pública e ambiental, uma vez que alguns microrganismos conseguem persistir em ambientes internos mesmo após a desinfecção. Esta persistência aumenta o risco de exposição, especialmente em trabalhadores, tornando essencial avaliar continuamente a presença destes organismos e orientar estratégias de prevenção (Allen et al., 2010; Martínez, 2008).

2. PROJETO EM DESENVOLVIMENTO

InChildHealth (ICH) – *Identifying Determinants for Indoor Air Quality and their Health Impact in Environments for Children: Measures to Improve Indoor Air Quality and Reduce Disease Burdens*

Este projeto está integrado no HORIZON-HLTH-2021-ENVLTH-02-02 dedicado à temática: qualidade e saúde do ar interior. O InChildHealth (ICH) Este projeto tem como finalidade aprofundar, com elevado rigor científico, a forma como as crianças estão expostas diariamente a um conjunto diversificado de poluentes presentes em ambientes interiores, incluindo escolas, habitações, creches, bibliotecas e instalações desportivas.

A infância é um período particularmente sensível, no qual o sistema respiratório e imunológico encontram-se em desenvolvimento, tornando esta população mais vulnerável aos efeitos adversos da má qualidade do ar. Por isso, compreender a natureza e a magnitude destas exposições constitui uma prioridade na saúde pública, dado o seu potencial impacto tanto a curto prazo, como alergias, infeções respiratórias ou agravamento de sintomas asmáticos, como a longo prazo, nomeadamente no desenvolvimento de doenças crónicas.

Ao contrário de abordagens convencionais que estudam os poluentes de forma isolada, o ICH adota uma perspetiva de “*exposição múltipla realista*”. Este conceito reconhece que, nos ambientes interiores, os indivíduos não estão expostos a um único poluente, mas sim a uma combinação de agentes químicos, físicos e biológicos que interagem entre si. Desse modo, o projeto avalia a exposição combinada de partículas em suspensão, compostos orgânicos voláteis, bioaerossóis, agentes microbiológicos (fungos e bactérias), bem como parâmetros ambientais (temperatura, CO₂, humidade). Esta abordagem integrada permite estimar o impacto cumulativo destas exposições no organismo humano e produzir uma avaliação mais robusta dos riscos para a saúde infantil.

Além disso, o ICH tem em conta as alterações climáticas, reconhecendo que os fatores ambientais podem influenciar diretamente a exposição a poluentes. A temperatura e a humidade são determinantes para a proliferação de fungos, libertação de esporos, concentração de partículas e sobrevivência de

microrganismos. Assim, o projeto analisa como estas variações ambientais, amplificadas pelas alterações climáticas globais, modificam os perfis de exposição das crianças e intensificam eventuais riscos para a saúde.

Para além da investigação experimental, o ICH tem uma forte componente de intervenção aplicada, propondo medidas práticas baseadas em evidência científica que possam ser implementadas em escolas e habitações.

Entre estas incluem-se recomendações para melhoria da ventilação, definição de boas práticas de manutenção de edifícios, estratégias de mitigação de fontes internas de poluição, e ferramentas de apoio à decisão para escolas e famílias. Estas medidas têm como objetivo reduzir a exposição infantil a agentes nocivos, contribuindo para a promoção da saúde e prevenção de doenças.

O projeto distingue-se ainda pela componente de ciência cidadã (*Citizen Science*), que envolve ativamente a comunidade escolar (professores, alunos, encarregados de educação e funcionários) no processo de recolha de dados e implementação de boas práticas. Esta participação contribui de forma decisiva para aumentar o conhecimento da comunidade sobre saúde ambiental, reforçando a sensibilização para a relevância da qualidade do ar interior.

A minha participação no projeto permitiu-me desenvolver competências na avaliação de risco ambiental em contextos reais, monitorização da QAI em ambientes frequentados por crianças, na interpretação de dados de exposição a múltiplos poluentes e na comunicação através da interação com escolas.

3. ENQUADRAMENTO TEÓRICO

a) Agentes Microbiológicos

A identificação da composição microbiana presente em ambientes ocupacionais é fundamental para implementar medidas preventivas eficazes protegendo a saúde dos trabalhadores e das pessoas que frequentam esses ambientes. Os microrganismos mais recorrentes nestes contextos ocupacionais são as bactérias e os fungos, normalmente encontrados em espaços como unidades de saúde, escolas, mercearias e ambientes agrícolas (Smith et al., 2023; Viegas et al., 2022b).

Os seres humanos passam maior parte do seu tempo em ambientes interiores, o que reforça a importância de avaliar a qualidade do ar nesses espaços. A qualidade do ar interior influencia diretamente a saúde individual e representa um fator relevante no contexto da saúde pública. A resistência microbiana, constitui atualmente um desafio significativo para a saúde pública e ambiental, pois os microrganismos resistentes podem persistir em ambientes interiores mesmo depois da desinfecção o que aumenta o risco para os trabalhadores e população em geral, uma vez que limita as opções terapêuticas e preventivas disponíveis. A presença de microrganismos em ambientes fechados está normalmente associado a locais com excesso de humidade, com ventilação pouco eficiente, podendo comprometer significativamente a saúde dos ocupantes (Viegas et al., 2022b, 2021c).

As consequências da exposição a microrganismos com potencial patogénico incluem doenças respiratórias, alergias, intoxicações e agravamento de doenças já existentes, como por exemplo, asma (Yang et al., 2007) além disso, alguns organismos são produtores de toxinas (endotoxinas no caso de bactérias e micotoxinas no caso dos fungos) que podem ter também consequências na saúde das pessoas expostas.

As endotoxinas estão associadas a diferentes efeitos adversos a nível respiratório e sistémicos, podendo provocar tosse seca, dispneia, problemas pulmonares, febre, mal estar e/ou dores articulares, sendo que os trabalhadores de ambientes agrícolas, têxteis, processamento de madeira e tratamento de resíduos estão particularmente em risco (Douwes et al., 2003; Rylander, 2002).

As micotoxinas comuns em ambientes interiores e ocupacionais são: aflatoxinas, ochratoxina A, fumonisinas, deoxinivalenol (DON), zearalenona e tricotecenos (Viegas et al., 2023a; World Health Organization (2022))

A exposição por inalação pode causar irritação nas mucosas, danos a nível respiratório, supressão imunológica e até carcinogénese no caso da aflatoxina B1 (“IARC (2012) ; Pestka, 2010). As espécies fúngicas como *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium chrysogenum* e *Stachybotrys chartarum* foram encontradas em ambientes como escolas, creches e unidades de saúde, especialmente em zonas com infiltrações e humidade persistente (Viegas et al., 2022a, 2021d). Neste contexto a organização mundial de saúde publicou as seguintes listas de espécies bacterias e espécies fúngicas prioritárias.

Conforme estudos anteriores, bactérias como *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* já foram identificadas em contextos ocupacionais em ambientes como sistema de ventilação, ar condicionado e ambientes hospitalares, podendo causar pneumonias ou colonização ou outras infeções em trabalhadores ou utentes expostos (Baudet et al., 2021; Douwes et al., 2003; World Health Organization. (2024)).No que respeita aos fungos, as espécies listadas como prioritárias pela Organização Mundial da Saúde (OMS) foram *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Candida auris* e *Cryptococcus neoformans* que foram encontrados em ambientes interiores e tem demonstrado impactos significativos na saúde, especialmente em indivíduos imunocomprometidos, como hospitalizados, asmáticos ou alérgicos, conforme apresentado na figura 1.(Fisk et al., 2007; Nazaroff, 2016).

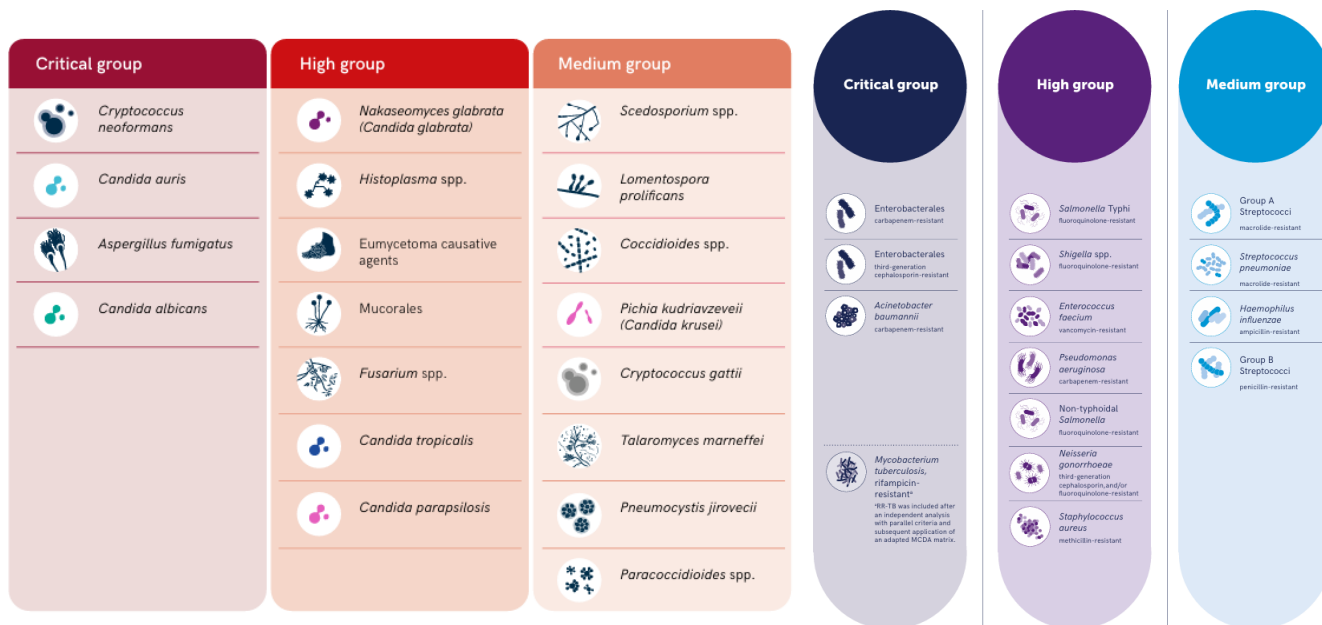


Figura 1 - Lista de agentes patogénicos fúngicos e bacterianos prioritários da OMS

No LMAO, é feita a quantificação de bactérias e fungos dos diversos ambientes avaliados e no caso dos fungos é feita a identificação e a deteção da espécie *Aspergillus* devido ao impacto que este fungo possui na saúde pública, como é o caso do *Aspergillus fumigatus* que já foi descritos em vários contextos ocupacionais e interiores, como é o caso de lares, ginásios, quartéis de bombeiros, entre outros) onde foi também reportado resistência a azóis e potencial citotóxico para as células pulmonares o que reforça a necessidade de monitorizar e promover medidas preventivas para salvaguardar a saúde dos trabalhadores/ utentes (Viegas et al., 2021a).

b) Metodologias de Avaliação Microbiológica

A exposição a bioaerossóis, partículas biológicas presentes no ar, bactérias, fungos e esporos representam um risco em diferentes ambientes. Nos ambientes ocupacionais onde o manuseio de matérias-primas favorecem a dispersão de esporos, os trabalhadores estão mais expostos a esses agentes levando assim a problemas respiratórios e infeções difíceis de tratar se esses esporos forem resistentes a azóis, sendo por isso essencial monitorizar esta exposição em diferentes contextos para compreender os efeitos na saúde não só dos

trabalhadores, mas também da população geral que estejam em contacto com esses ambientes (Caetano et al., 2017).

Para que possamos avaliar os microrganismos presentes nas diferentes matrizes ambientais, uma das técnicas mais utilizadas são as técnicas de microbiologia clássica em que as amostras são inoculadas em placas com meio de cultura. O objetivo deste método é permitir o crescimento de microrganismos viáveis, formando colónias visíveis que podem ser contadas e identificadas através de macro e microscopia. No entanto este método não deteta microrganismos não viáveis que podem estar presentes. A deteção destes microrganismos através de técnicas moleculares é importante, pois permite identificar a presença de agentes que já não estão ativos, mas que podem indicar histórico de contaminação, assim como a presença de genes de resistência ou risco potencial para a saúde (Caetano et al., 2017; Wijnand and AnneHalstensen, 2009). Assim, a combinação de métodos clássicos e moleculares fornece informação complementar, permitindo uma caracterização mais ampla da contaminação ambiental (Cervantes et al., 2025).

c) Fungos e a sua relevância

Fungos são organismos eucariotas que desempenham papéis essenciais nos ecossistemas e em diversas indústrias, como a farmacêutica, alimentar e ambiental. Além de contribuírem para a decomposição de matéria orgânica, muitos fungos produzem enzimas, ácidos orgânicos e compostos bioativos de interesse industrial e terapêutico, como é o caso da penicilina produzida por *Penicillium chrysogenum* ou da lovastatina produzida por *Aspergillus terreus* (Yang et al., 2007). Contudo, alguns fungos possuem potencial patogénico e podem causar doenças em humanos, animais e plantas, com elevado risco de mortalidade, especialmente em indivíduos imunocomprometidos (Hernandez and Martinez, 2018). Devido à sua ampla distribuição no ambiente, tanto interior como exterior, e à capacidade de produzir esporos resistentes, os fungos representam um desafio para a saúde pública e a segurança alimentar.

d) *Aspergillus sp.*

Os fungos são organismos que oferecem benefícios nas indústrias farmacêuticas, de bebidas e alimentares por produzirem enzimas, ácidos orgânicos e compostos bioativos, por exemplo, na indústria farmacêutica os fungos como *Penicillium chrysogenum* são a fonte original do antibiótico penicilina e o fungo *Aspergillus terreus* produz lovastina que é usada para controlar o colesterol (Yang et al., 2007).

No entanto, os fungos com potencial patogénico são considerados perigosos para os humanos, animais e plantas, com elevado potencial de causar mortalidade (Hernandez and Martinez, 2018). *Aspergillus* é um género de fungos filamentosos que se reproduz de forma assexuada, produzindo conídios (esporos) (Rivero-Menendez et al., 2016).

Estes conídios são facilmente dispersos pelo ar, o que contribui para a sua distribuição cosmopolita, sendo encontrados em praticamente todos os ambientes, incluído o ar exterior e interior, sementes, cereais, frutos secos, superfícies húmidas com pouca ventilação, produtos alimentares armazenados e ambientes hospitalares (Samson and Varga, 2009; Zakaria, 2024).

Os indivíduos imunocomprometidos, como por exemplo doentes submetidos a transplantes ou doentes em tratamentos de quimioterapia possuem maior risco porque os seus neutrófilos e macrófagos que são essenciais para destruir os esporos encontram-se comprometidos permitindo que o fungo invada o tecido e os vasos sanguíneos, levando assim a elevadas taxas de mortalidade (Kousha et al., 2011).

O género *Aspergillus* tem uma grande importância em diversas áreas, a nível da saúde pública, várias espécies, como *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus*, *A. niger* e *A. nidulantes* são consideradas potenciais patogénicas, a nível industrial são essenciais na produção de enzimas industriais (amílases, proteases, lípases), ácidos orgânicos (ácido cítrico e láctico) e na fermentação de alimentos tradicionais (molho de soja, miso, entre outros), também apresenta relevância na área agrícola e ambiental tanto positivamente como negativamente, podem contaminar grãos e sementes no pós colheita, produzindo micotoxinas perigosas que irão afetar a saúde causar perdas económicas, por outro lado, também tem potencial para o biocontrolo de pragas e biodegradação de resíduos agrícolas (Zakaria, 2024).

A aspergilose invasiva é uma infecção causada pelas espécies *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus* e *A. terreus*, sendo *A. fumigatus* a espécie mais comum devido à sua capacidade de produzir grandes quantidades de esporos microscópicos, os conídios, que são facilmente inaláveis e que afetam os alvéolos pulmonares (Latgé and Chamilos, 2019).

As taxas de mortalidade e morbidade da Aspergilose invasiva continuam elevadas, no entanto devido aos avanços dos diagnósticos e tratamentos a taxa de sobrevivência melhorou (Kousha et al., 2011; Latgé and Chamilos, 2019).

O tratamento para a aspergilose invasiva tem como base os triazóis, itraconazol (ITRA), voriconazol (VORI) e posaconazol (POSA) sendo administrado por via oral na terapia a longo prazo (Rivero-Menendez et al., 2016).

Normalmente quando um doente apresenta uma infecção por *Aspergillus fumigatus*, os médicos recorrem a triazóis para curar essa infecção, mas esses medicamentos só iram resultar caso o fungo não seja resistente, o que atualmente não tem acontecido pois já existem estirpes de *Aspergillus fumigatus* que são resistentes aos triazóis e por isso os medicamentos deixam de ter efeito, mesmo em pacientes que nunca tomaram triazóis, isto acontece porque o fungo já se encontra resistente no ambiente devido à agricultura que utiliza fungicidas que são muito parecidos com triazóis, por exemplo no cultivo de frutas e flores (Verweij et al., 2009).

O voriconazol é o medicamento antifúngico usado como tratamento de primeira linha, ou seja, o tratamento inicial, para a aspergilose invasiva. No entanto como alguns fungos estão a tornar-se resistentes a este antifúngico, usar voriconazol deixa de ser tão eficaz, gerando preocupação clínica em pacientes imunocomprometidos por dependerem desse tratamento.

O itraconazol é usado na profilaxia e no tratamento menos agressivo da doença e tem sido alvo de resistência significativa devido à mutação no gene *cyp51A* que afeta diretamente a ligação do antifúngico ao seu alvo. O posaconazol, tem sido usado como alternativa em casos de resistência ou intolerância ao voriconazol e itraconazol (Garcia-Rubio et al., 2017)

e) Métodos de Amostragem

A seleção adequada dos métodos de amostragem é crucial para obter uma caracterização rigorosa dos bioaerossóis e dos microrganismos presentes nos ambientes interiores e ocupacionais. Os métodos disponíveis podem ser agrupados em ativos e passivos, que diferem quanto ao princípio de recolha, sensibilidade e aplicabilidade consoante os objetivos do estudo (Cervantes et al., 2025; Whitby et al., 2022).

1. Métodos Ativos

Os métodos ativos baseiam-se na passagem de um volume conhecido de ar através de um equipamento de amostragem, permitindo recolher partículas biológicas em meios sólidos ou filtros com elevada sensibilidade (Manibusan and Mainelis, 2022). Esta abordagem é especialmente útil para quantificar bioaerossóis viáveis presentes no ar em tempo real, o que permite relacionar diretamente as concentrações ambientais com potenciais riscos para a saúde humana (Cervantes et al., 2025).

Os métodos ativos utilizados foram o *Andersen Six-Stages*, o *MAS-100* e *Button Aerosol Sampler*. Entre os métodos ativos mais utilizados são os de impactação, que depositam partículas sobre superfícies sólidas (como os meios de cultura) ou a filtração, que retém partículas em filtros de membrana. Neste caso, o *Andersen Six-Stages* e o *MAS-100* são métodos de impactação e o *BS* é um exemplo de um sistema de filtração (Cervantes et al., 2025).

Cada técnica apresenta as suas vantagens e limitações, o impacto é eficaz na recuperação de microrganismos viáveis mas pode não capturar partículas muito pequenas, a filtração permite análises moleculares posteriores embora possa comprometer a viabilidade celular (Cervantes et al., 2025; Whitby et al., 2022).

O *Andersen Six-Stages*, representado na figura 2, é frequentemente utilizado na investigação em saúde ambiental e ocupacional especialmente em estudos sobre bioaerossóis viáveis, sendo um equipamento de amostragem ativa que separa as partículas em função do seu diâmetros distribuindo-as em seis níveis com diâmetro cada vez menor, sendo por isso, relevante para avaliar a deposição das partículas em diferentes regiões do trato respiratório humano, sendo frequentemente usado em ambientes escolares e hospitalares, como demonstrado em estudos anteriores (Cervantes et al., 2024b; Viegas et al., 2020). O *Andersen Six-Stages* permite

caracterizar a distribuição granulométrica das partículas, fornecendo informação fisiologicamente relevante (Cervantes et al., 2024b), tem uma elevada eficiência na recuperação de microrganismos viáveis, sendo adequado para cultura e identificação (Manibusan & Mainelis, 2022) e é um método amplamente validado em estudos ambientais e ocupacionais, garantindo comparabilidade entre investigações (Viegas et al., 2020). No entanto, apresenta algumas desvantagens como por exemplo, pode não recolher partículas ultrafinas devido aos limites de corte de cada nível de diâmetro (Whitby et al., 2022), é um equipamento pesado, ruidoso e de difícil transporte (Cervantes et al., 2025) e a força de impactação pode reduzir a viabilidade de microrganismos mais frágeis (Manibusan & Mainelis, 2022).



Figura 2 - Andersen six-stages

O Microbial Air Sampler-100 (MAS-100), representado na figura 3 é um amostrador ativo que recolhe partículas (microrganismos, poeiras e outros contaminantes) que se encontram no ar, tendo sido usado para quantificar a carga microbiana do ar em ambientes interiores, nomeadamente em escolas e unidades de saúde (Cervantes et al., 2024a; Viegas et al., 2017).

O MAS-100 é um equipamento prático portátil e de fácil utilização em campo (Viegas et al., 2017, apresenta elevada precisão na quantificação de microrganismos viáveis (Cervantes et al., 2024a) e permite volumes de ar controlados, aumentando a reprodutibilidade dos resultados (Manibusan & Mainelis, 2022). Por outro lado, tal como outros impactadores, tem menor capacidade de retenção de partículas muito pequenas (Whitby et al., 2022) e apenas permite a recolha de microrganismos viáveis, não detetando partículas não cultiváveis (Cervantes et al., 2025).



Figura 3 - MAS-100

Na figura 4, está representado o amostrador de aerossóis, *Button Sampler* (BS) é um amostrador pessoal usado para avaliar a exposição individual, tendo sido amplamente utilizado em estudos de exposição ocupacional e ambiental (Viegas et al., 2019 Whitby et al., 2022). O BS permite medir a exposição pessoal real, acompanhando o trabalhador no local (Viegas et al., 2019), tem elevada eficiência na recolha de partículas inaláveis, incluindo partículas finas (Whitby et al., 2022) e a filtração permite análises moleculares posteriores, incluindo DNA e endotoxinas (Cervantes et al., 2025). No entanto apresenta algumas desvantagens, como por exemplo, pode comprometer a viabilidade microbiana, dificultando a cultura posterior (Whitby et al., 2022), requer bombas portáteis, o que aumenta o custo e pode causar desconforto ao utilizador (Cervantes et al., 2025) e a saturação do filtro pode prejudicar a eficiência se usado em ambientes com elevada carga de partículas (Manibusan & Mainelis, 2022).



Figura 4 - Button Sampler (BS)

2. Métodos passivos

Os métodos passivos baseiam-se na deposição natural de partículas ao longo do tempo, sem recurso a bombas ou fluxo forçado, proporcionando uma recolha contínua e representativa da exposição acumulada (Whitby et al., 2022). Estes métodos são particularmente úteis pela sua simplicidade, baixo custo e capacidade de integrar variações temporais da deposição de partículas, sendo frequentemente aplicados em estudos de larga escala ou em ambientes onde a instalação de equipamentos ativos é limitada (Cervantes et al., 2025).

Durante o projeto utilizou-se os *Electrostatic Dust Cloths* (EDCs) as zaragatoas e o *Settled dust* (SD) como métodos passivos.

São métodos mais económicos e não requerem equipamentos específicos, à exceção do aspirador comum. No entanto, apresentam limitações importantes como o facto de serem menos sensíveis na deteção de partículas pequenas e podem não representar com precisão a concentração real de fungos em suspensão no ar visto que dependem da deposição natural das partículas que por sua vez variam com o tempo e com o local da recolha (Cervantes et al., 2025; Whitby et al., 2022).

Deste modo, recomenda-se o uso de ambos os métodos, ativos e passivos para obter uma melhor caracterização da qualidade do ar interior (Cervantes et al., 2025).

Os EDCs, conforme representado na figura 5 foram usados durante um período de 30 dias em locais de estudo, tem uma medida de 10cm² que são esterilizados sob a luz UV e colocado em grupos de três com base no protocolo do projeto InChilHealth.



Figura 5 - Exemplo de um EDC

Na figura 6, está representado os EDC's que são também utilizados em T-shirts de voluntários para avaliação da exposição a nível respiratório. Esta estratégia permite que os panos recolham partículas em suspensão próximas das vias aéreas onde o ar é inalado pelos indivíduos.



Figura 6 - Exemplo de um EDT

Os EDC's representam a exposição acumulada ao longo do tempo, especialmente relevante para bioaerossóis (Whitby et al., 2022), são económicos, fáceis de aplicar e não necessitam de energia ou bombas (Cervantes et al., 2025) e permitem análises posteriores para endotoxinas, micotoxinas e DNA (Viegas et al., 2022c). No entanto, apresentam desvantagens como por exemplo, não representam concentrações instantâneas reais do ar, pois dependem de deposição natural (Whitby et al., 2022), são menos sensíveis para partículas muito pequenas e esporos leves (Cervantes et al., 2025) e a variabilidade ambiental (ventilação, atividade humana) influencia fortemente a recolha (Whitby et al., 2022).

As zaragatoas, representado na figura 7, são um método utilizado para avaliar a contaminação microbiana em superfícies. Consiste em delimitar uma área definida (ex:10 cm²) sobre a qual a zaragatoa deve ser passada em movimentos firmes e cruzados tanto no sentido horizontal como vertical, de forma a garantir o contacto direto em toda a área. Durante a passagem a zaragatoa deve ser rodada suavemente para maximizar o contacto com a superfície, assegurando a recolha eficiente dos microrganismos presentes (Cervantes et al., 2022a).

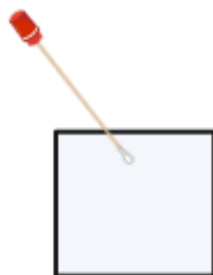


Figura 7 - Zaragatoa de Superfície

As zaragotas permitem monitorizar superfícies críticas e identificar hotspots de contaminação (Cervantes et al., 2022a), são de baixo custo e fáceis de implementar em qualquer ambiente (Whitby et al., 2022) e podem ser usadas tanto para análises culturais como moleculares (Cervantes et al., 2025). No entanto, não representam a exposição aérea real, apenas a contaminação de superfícies (Manibusan & Mainelis, 2022), a recuperação pode ser inconsistente devido à pressão manual e variações na superfície (Whitby et al., 2022) e podem recolher quantidades insuficientes para análises complexas (Cervantes et al., 2025).

A colheita de pó, conforme representado na figura 8, é realizada com um aspirador no qual se coloca um filtro previamente esterilizado e que serve para recolher as partículas sedimentadas. No caso do SD, o filtro serve também como matriz de amostragem quando a quantidade de pó recolhida não é suficiente para todas as análises, deste modo, o filtro em contacto com o pó permite maximizar esta amostra (Cervantes et al., 2022a).



Figura 8 - SD

O *Settled Dust*, capta grandes quantidades de material, útil para análises de endotoxinas e micotoxinas (Viegas et al., 2020), representa a acumulação histórica de poluentes e bioaerossóis (Whitby et al., 2022) e é adequado para ambientes com elevada deposição de partículas como escolas ou lares (Cervantes et al., 2022a). No entanto, não reflete concentrações aéreas instantâneas (Cervantes et al., 2025), a deposição depende fortemente das condições ambientais e limpeza (Whitby et al., 2022) e a amostra pode ser heterogênea devido à mistura de partículas antigas e recentes (Viegas et al., 2020).

Na figura 9, encontra-se uma outra matriz utilizada em alguns dos estudos realizados no LMAO são as esfregonas (Mops) que permitem recolher material biológico acumulado na superfícies ao longo do tempo e relacionar os resultados com a higienização dos espaços e eventuais contaminações cruzadas (Dias et al., 2022).



Figura 9 - Esfregona (mops)

As porções de esfregonas é usado como material de recolha, cobre áreas maiores do que zaragatoas, aumentando a representatividade (Dias et al., 2022), são práticas e permitem monitorizar sujidade e contaminação cumulativa (Cervantes et al., 2025) e são úteis para avaliar eficácia de procedimentos de limpeza (Dias et al., 2022). No entanto, apresentam desvantagens como os outros métodos passivos, não avaliam a concentração aérea direta (Whitby et al., 2022), podem recolher partículas muito heterogéneas, dificultando comparações entre locais (Cervantes et al., 2025) e dependem fortemente da técnica de recolha e da textura das superfícies (Whitby et al., 2022).

f) Extração de Amostras

Depois de recolher os microorganismos presentes no ar através dos métodos de amostragem referidos anteriormente, procede-se à extração de amostras (Viegas et al., 2020).

A extração das amostras tem como objetivo extrair os microorganismos da matriz preservando viabilidade microbiana (Caetano et al., 2017).

Para a extração é necessário usar uma solução tampão com 0,9% de NaCl + 0,05% de Tween 80. O NaCl irá favorecer a isotonicidade do meio, fazendo com que os microorganismos permanecem viáveis e o Tween 80 a 0,05% irá permitir a libertação das partículas aderentes (Caetano et al., 2017; Viegas et al., 2020).

g) Análises Laboratoriais

As análises realizadas no decorrer do estágio foram análises de microbiologia clássica, como a quantificação e identificação macro e microscopia dos microorganismos, no caso dos fungos e no caso das bactérias apenas quantificação, e o *screening* de resistência a azóis das amostras.

Além destas, outras análises são realizadas para as mesmas amostras, como é o caso, do *screening* dos isolados, extração de DNA e análises moleculares, as quais não tive oportunidade de realizar devido ao facto de terem iniciado após o término do meu estágio e dado ao número elevado de amostras analisadas. No caso das amostras passivas, estas são também separadas e enviadas para parceiros para serem analisadas para a presença de endotoxinas, micotoxinas e citotoxicidade.

Passo a descrever as tarefas que foram realizadas no âmbito do estágio.

1. Preparação de Meios de Cultura

Os meios de cultura devem ser preparados e manuseados com o maior cuidado possível para garantir a precisão dos resultados experimentais.

Tive oportunidade de preparar diferentes meios de cultura para bactérias e fungos. Os meios usados para bactérias foram para bactérias usou-se *Tryptic Soy Agar* (TSA), *Violet Red Bile Agar* (VRBA) e *MacConkey Agar* (MAC). Para fungos foi utilizado *Malt Extract Agar* (MEA) e *Dichloran Glycerol Agar* (DG18). Para o screening de resistência a resistência aos azóis usou-se o meio *Sabouraud Dextrose Agar* (SAB) suplementado com: *itraconazole* (ITRA), *voriconazole* (VORI) e posaconazole (POSA).

Nas tabelas seguintes, estão representadas as quantidades necessárias para cada meio de cultura.

Tabela I - Quantidades para cada meio de cultura para determinação de contaminação bacteriana

Meio de Cultura	Massa (g)	Volume H ₂ O destilada (mL)	Volume Total (mL)
TSA	38	950	950
VRBA	39,46	950	950
MAC	47,5	950	950

Tabela II – Quantidades para cada meio de cultura para determinação de contaminação fúngica

Meio de Cultura	Massa (g)	Cloranfenicol (g)	Glicerol (mL)	Etanol 70% (mL)	Volume H ₂ O destilada (mL)	Volume Total (mL)
MEA	29,74	0,095	2,23	9,50	950,00	950,00
DG18	22,50	-	130,00	-	750,00	950,00
SDA	62,20	-	-	-	950,00	950,00

Tabela III -Quantidade de Azol adicionado a SDA

Azol	Volume de Azol adicionado (mL)
ITRA	7,50
VORI	3,80
POSA	0,95

O meio *Tryptic Soy Agar* (TSA) tem na sua composição uma proteína, a caseína, e outros componentes como amido, glicerina e sais minerais. Este meio de cultura é utilizado em microbiologia permitindo isolar bactérias de amostras ambientais (Goh et al., 2022).

O *Violet Red Bile Agar* (VRBA) é constituído por sais biliares e cristais que suprimem o crescimento de organismos gram-positivos mas estimula o crescimento de organismos gram-negativos. Este meio é seletivo usado para detetar bactérias gram negativas (Hervert et al., 2016).

O *MacConkey Agar* (MAC) é um meio seletivo e diferencial usado no isolamento de bactérias gram-negativas entéricas. As bactérias gram-negativas fermentadoras de lactose irão formar colónias vermelhas enquanto que as bactérias não fermentadoras de lactose irão formar colónias opacas esbranquiçadas, isto acontece porque o meio possui um indicador de pH em condições ácidas (Jung and Hoilat, 2025).

O *Malt Extract Agar* (MEA) é usado para culturas fúngicas, pois é o meio que possui maior quantidade de açúcares e água, fazendo com que o crescimento seja rápido (Wu, 2007).

O *Dichloran Glycerol Agar* (DG18) é um meio de cultura seletivo para fungos xerofílicos, ou seja, fungos que tem a capacidade de crescer e desenvolver em ambientes com baixa disponibilidade de água como é o caso deste meio (Wu, 2007).

O *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) é um meio de cultura que promove o crescimento fúngico mas inibe o crescimento bacteriano, devido a seu pH ácido (“Sabouraud Agar for Fungal Growth Protocols,” n.d.). Este meio, é suplementado com os azóis e vai permitir testar a resistência aos antifúngicos azólicos (De Francesco, 2023).

De acordo com as diretrizes do EUCAST, os antifúngicos *itraconazol* (ITRA), *voriconazol* (VORI) e *posaconazol* (POSA) são azóis clinicamente relevantes para a investigação da eficácia contra *Aspergillus fumigatus*. Cada um desses antifúngicos possui composição e eficácia distintas no combate a diferentes espécies de *Aspergillus*. A padronização pelo EUCAST permite um maior entendimento dos perfis de resistência, dosagens ideais e da resposta terapêutica na aspergilose invasiva, contribuindo para decisões clínicas mais eficazes e confiáveis (“eucast: Métodos em AFST,” n.d.)

O *itraconazol* (ITRA) destaca-se no tratamento de infecções por *A. fumigatus* devido à sua ação inibitória sobre a enzima P-450, essencial para a desmetilação do esterol 14 α , etapa crítica na síntese do ergosterol, componente estrutural da membrana celular dos fungos (“Itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus* | Antimicrobial Agents and Chemotherapy,” n.d.)

O *voriconazol* (VORI) é atualmente considerado o tratamento de primeira linha para aspergilose invasiva, especialmente em pacientes imunocomprometidos. Estudos clínicos mostraram que o VORI apresenta boa eficácia e é geralmente bem tolerado, apesar de efeitos adversos como distúrbios visuais. Devido à sua alta variabilidade nos níveis plasmáticos, recomenda-se o monitoramento terapêutico para otimizar a dose e minimizar a toxicidade (Maertens et al., 2021).

Já o *posaconazol* (POSA) é frequentemente utilizado em pacientes de alto risco, como recetores de transplante de órgãos ou aqueles submetidos a quimioterapia intensiva para leucemia mieloide aguda e síndromes mielodisplásicas. O POSA tem sido especialmente útil como terapia de resgate, quando outras opções falham. Embora haja incertezas quanto à sua eficácia como terapia de primeira linha, estudos comparativos com o VORI (Maertens et al., 2021).

Depois da preparação dos meios e a colocação nas placas de Petri, prossegue-se para a inoculação das amostras, sendo inoculada cada amostra uma vez em cada meio, de acordo com a figura 10.

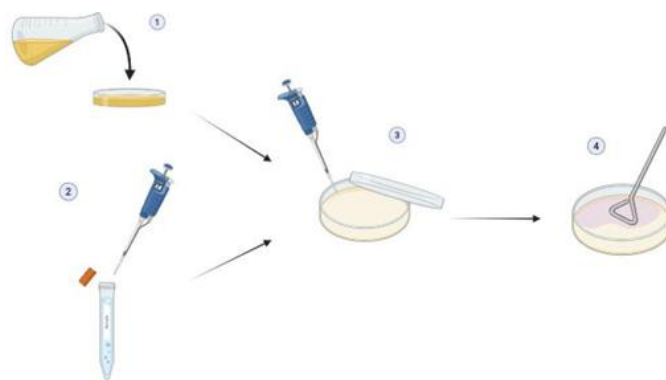


Figura 10 - Procedimento de inoculação

A inoculação das amostras foi realizada em todos os meios preparados: TSA, VRBA, MAC, MEA, DG18, SAB, ITRA, VORI e POSA. Com um micropipeta de 200 μL , pipetou-se 150 μL de cada amostra líquida e espalhou-se cuidadosamente, com um espalhador estéril.

Após a inoculação, coloca-se as placas em sacos selados e incubamos a diferentes temperaturas. No que toca à avaliação bacteriana, as placas com TSA foram incubadas a 30°C, enquanto que as placas de VRBA foram incubadas a 37°C. Ambos os meios foram incubados durante 7 dias. As placas de MAC foram incubadas a 35°C \pm 2°C durante 18h a 24 horas.

Para avaliar a contaminação fúngica, as placas de MEA e DG18 foram incubadas a 27°C, tendo em conta que DG18 é feito em duplicado pois uma parte das placas são incubadas a 37°C para avaliar também o potencial patogénico. Ambas as amostras foram incubadas durante 5 a 7 dias.

Os meios SDA, ITRA, VORI, e POSA, foram incubados a 27°C durante 48 horas.

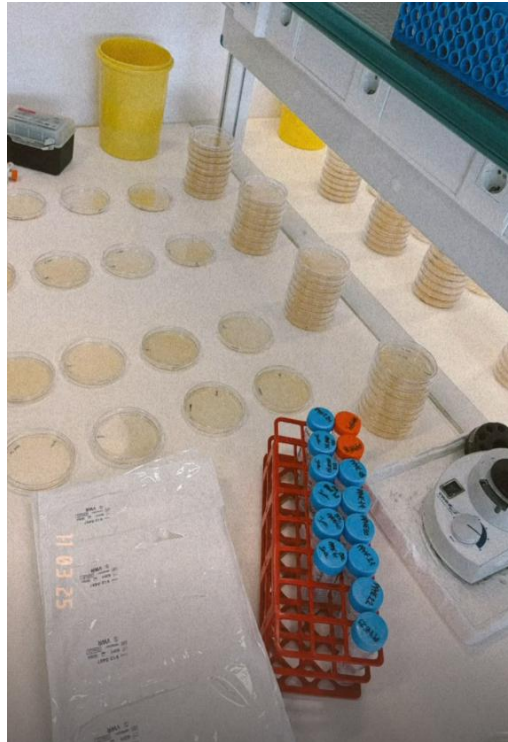


Figura 11 - Procedimento de Inoculação de amostras

Após o desenvolvimento microbiano nos diversos meios de cultura, procedeu-se à quantificação das Unidades Formadoras de Colónias (UFC) em cada uma das placas. Nos meios *MacConkey* (MAC), *Violet Red Bile Agar* (VRBA) e *Tryptic Soy Agar* (TSA), a contagem foi exclusivamente para colónias bacterianas, reconhecidas pela sua morfologia visível, através do seu tamanho, forma e tonalidade. Esta análise, realiza-se unicamente de forma quantitativa, contando o numero de bactérias presentes na amostra para que possamos comparar com o valor estabelecido na Portaria n.º 138-G/2021, de 1 de julho (“Portaria n.º 138-G/2021 | DR,” 2021.).

Por outro lado, nos meios *Dichloran Glycerol* (DG18), *Malt Extract Agar* (MEA) e *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA), foram analisadas unicamente as colónias de fungos filamentosos. A identificação destes fungos teve por base aspetos como a cor e as características dos esporos, sendo diferenciados por letras diferentes correspondente a cada fungo.

Colónias pertencentes ao grupo *Aspergillus niger* apresentam cor preta e esporos que se desprendem facilmente. Já as colónias de *Aspergillus fumigatus* distinguem-se pela cor verde-azulada. Neste caso, a análise é feita de forma quantitativa e

qualitativa, pois após a contagem das colônias fúngicas procede-se a análise microscópica para identificação das espécies presentes.

Na figura 12 encontra-se um exemplo de contagens de UFC's em placas de petri com diferentes meios de cultura.

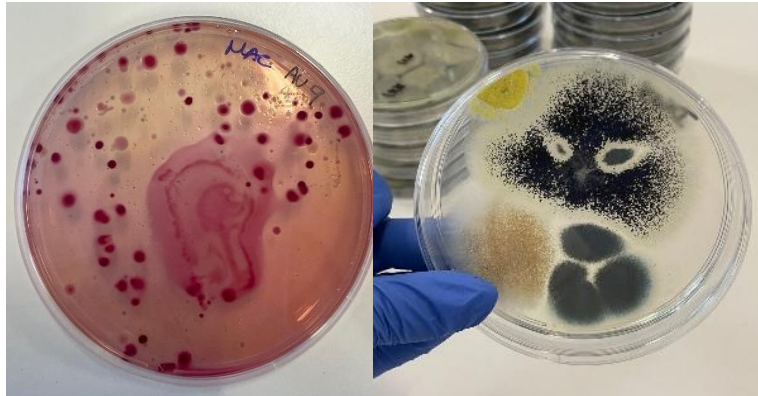


Figura 12 - Contagem de UFC's em placas de petri

2. Preparação de lâminas para observação microscópica

Inicialmente, com o auxílio de um bisturi estéril começa-se por retirar uma pequena porção de fungos de cada colônia e coloca-se em lâminas previamente preparadas com azul lactofenol. Para cobrir a preparação usou-se lamelas, pressionou-se e com papel absorvente tirou-se o excesso. Por fim as placas foram colocadas em caixas protegidas com parafilm.

A observação microscópica foi realizada pela Professora Carla Viegas, especialista em Micologia.

Na figura 13 pode-se observar a etapa final da preparação das lâminas para a observação microscópica e na figura 14 está representado um exemplo de *Aspergillus* ao microscópio.

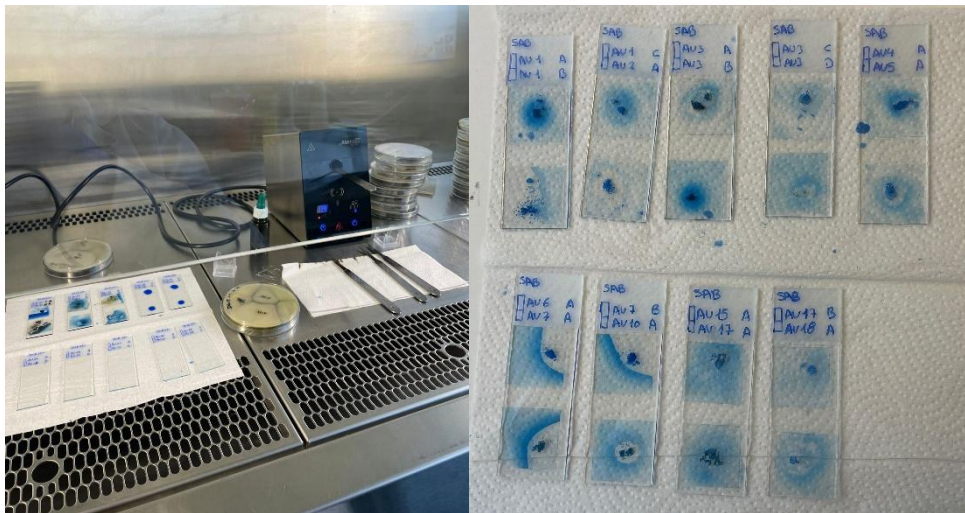


Figura 13 - Preparação das lâminas com coloração de lactofenol

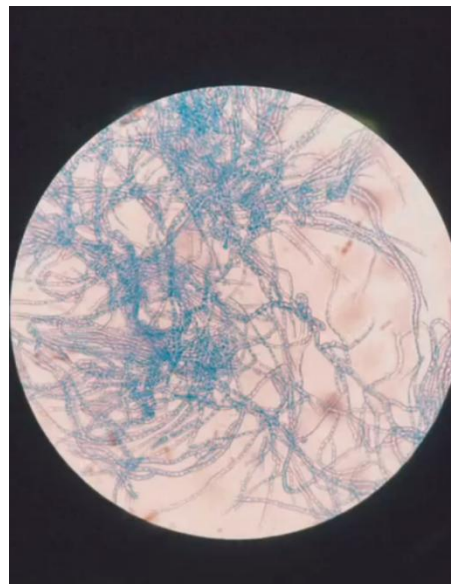


Figura 14 - Observação microscópica de *Aspergillus*

3. Reisolamento

A recuperação dos isolados fúngicos é uma etapa crucial em ambientes clínicos, identificando a sensibilidade dos fungos a diversos antifúngicos. Este processo permite determinar qual o medicamento mais eficaz contra cada tipo de fungo, fornecendo aos médicos informações importantes para o tratamento mais adequado.

A recuperação dos isolados fúngicos é também uma principal vantagem dos métodos de cultura, pois permitir obter microrganismos vivos diretamente das

amostras ambientais possibilitando assim o cultivo em meio apropriado e a formação de colônias puras. Esses isolados são analisados morfológicamente e submetidos a testes de suscetibilidade fúngicas (Viegas et al., 2021b).

Para que os isolados fúngicos possam ser recuperados, os fungos de interesse são primeiramente isolados em meio de cultura. Em seguida, são preparados tubos *ependorf* contendo amostras duplicadas dos isolados de *Aspergillus spp.*. Cada tubo é preenchido com 1 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS), de seguida, com uma ansa, transfere-se uma porção do fungo para o respectivo tubo *ependorf*. Após essa etapa, adicionam-se 250 µL de glicerol a cada tubo, e os isolados são armazenados a -80 °C (Viegas et al., 2021b).

O uso do PBS é essencial para manter a saúde e qualidade dos isolados durante o armazenamento e ensaios laboratoriais, pois proporciona condições controladas que aumentam a consistência e a reprodutibilidade dos resultados.

A adição de glicerol aos isolados também é fundamental, pois garante a viabilidade e integridade das amostras durante o armazenamento a temperaturas ultra baixas. Isso assegura que os isolados permaneçam estáveis e confiáveis para futuras pesquisas e testes laboratoriais (Viegas et al., 2021b).

Na figura 15 e na figura 16 está representado como se procede ao reisolamento de fungos.

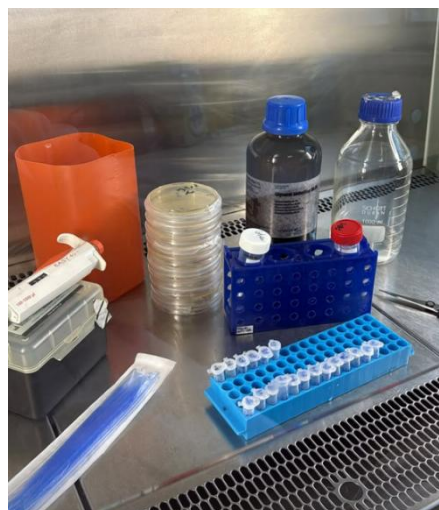
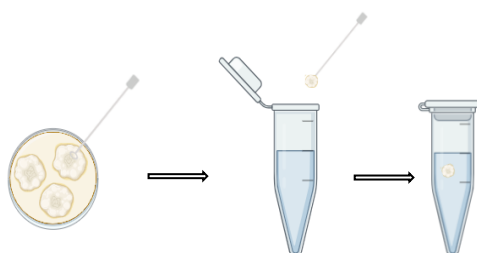


Figura 15 - Processo de reisolamento fúngico

Após observação microscópica, feita pela Professora Carla Viegas, as placas foram identificadas com o género de *Aspergillus*, sendo os mais frequentes os das seções *Nigri*, *Fumigati* e *Flavi*. Este género tem grande importância clínica, uma vez que todas as espécies de *Aspergillus* podem ser potencialmente patogénicas, embora algumas apresentem maior prevalência e impacto em infeções respiratórias e hospitalares. Paralelamente, foram também isolados fungos pertencentes ao *Mucorales*, como *Rhizopus* e *Mucor*, dos quais determinadas espécies também são clinicamente relevantes.

Primeiramente passou-se para o caderno e para *ependorfs* estéreis, as numerações que foram dadas a cada espécie, tendo em atenção que quando for espécies do género *Aspergillus* é necessário fazer em duplicado. Adicionou-se um 1 mL de PBS em cada *ependorf* para preservar a amostra de fungos. Com a ajuda de uma ansa de inoculação estéril removeu-se uma porção da colónia selecionada. Após terminar todas as placas, colocou-se 250 µL de Glicerol a 99,5%, para manter a viabilidade das células após o descongelamento. Por fim, agitou-se bem os tubos e armazenou-se a -80°C até seguirem para o ensaio de *screening* de resistência a azóis.

h) Análises Moleculares

- **Extração de DNA**

A extração de DNA é uma técnica essencial para a análise molecular das amostras em estudo. Depois do reisolamento, a obtenção do seu material genético permite avançar para métodos de identificação mais específicos e sensíveis, como por exemplo, o PCR (Ojo-Okunola et al., 2020).

Na extração de DNA utiliza-se Kits comerciais de acordo com as características das amostras em estudo (Ojo-Okunola et al., 2020).

Neste caso, como são amostras ambientais foi utilizado o kit *Quick-DNA Fungal/Bacterial*.

Estes kits incluem protocolos e reagentes otimizados, permitindo uma recuperação eficiente de DNA mesmo em amostras com matriz complexa, presença de inibidores ou com baixa biomassa. Esta fiabilidade é fundamental para garantir a

qualidade dos dados obtidos, especialmente em avaliações ambientais que exigem precisão e sensibilidade (Viegas et al., 2022c).

O procedimento consistiu nos seguintes passos:

1. As amostras foram primeiramente centrifugadas e o *pellet* resultante foi ressuspendido numa porção do sobrenadante.
2. O resultante foi colocado no tubo ZR *BashingBead Lysis*, que contém pequenas esferas, ao qual foi adicionado o tampão *BashingBead*.
3. Agitou-se as amostras no vórtex, durante 10 minutos e centrifugou-se novamente, durante 1 minuto.
4. O sobrenadante foi transferido para uma coluna com filtro (*Zymo-Spin III-F Filter*) que retém os componentes da parede celular indesejados aquando da centrifugação, permitindo que o ácido desoxirribonucleico seja colhido no tubo coletor.
5. Adicionou-se o tampão *DNA Binding* e o resultante foi transferido para uma *Zymo-Spin IC Column*. Este tampão permite que o material genético fique retido na membrana da coluna após a centrifugação.
6. De seguida são efetuadas duas lavagens, através da coluna, primeiramente com tampão *DNA Pre-wash* e, de seguida, com tampão *DNA Wash*.
7. Por último, transferiu-se a coluna para um *ependorf* e recuperou-se o ácido desoxirribonucleico da membrana com o auxílio do tampão *Elution*.
8. Deixou-se incubar a coluna com o tampão, 2 a 3 minutos e, posteriormente, o tubo foi centrifugado. O material genético é arrastado com o tampão neste processo.
9. As amostras foram armazenadas, em dois *ependorfs*, a -20 °C, para posterior deteção de espécies toxigénicas por PCR em tempo real.

- **Preparação de PCR quantitativo, em tempo real**

A técnica de PCR quantitativo em tempo real (qPCR) permite a deteção da amplificação de uma determinada região do material genético à medida que este é

sintetizado *in vitro*, o que contribui para a redução do tempo de análise (Haugland, et al. 2007). Esta abordagem possibilita a distinção entre diferentes espécies ambientais, uma vez que os fragmentos alvo são delimitados por sequências de primers específicas (Haugland, et al. 2007). Para a detecção da amplificação, os primers podem ser marcados com fluorescência ou podem ser utilizadas sondas intercaladoras que se ligam à dupla hélice do DNA (Haugland, et al. 2007).

Durante o estágio não tive oportunidade de desenvolver esta metodologia pela quantidade de amostras a serem processadas, no entanto o procedimento de qPCR normalmente envolve várias etapas.

Primeiro, calculam-se as quantidades necessárias de reagentes, como a *Supermix* de PCR, os *primers forward* e *reverse*, a sonda e a água para a preparação da *Master Mix*. Antes da manipulação, a superfície de trabalho, equipamentos e materiais são desinfetados, geralmente com etanol a 70%. Em seguida, preparam-se diluições dos *primers* e da sonda em tubos de *ependorf* separados. A *Master Mix* é então montada combinando todos os reagentes e distribuída nos poços de uma placa de PCR, normalmente em 16 μ L por poço. As amostras são adicionadas nos poços correspondentes, geralmente em 4 μ L, incluindo controles positivos (com DNA conhecido) e negativos (água). As amostras são frequentemente pipetadas em duplicado para permitir a obtenção de médias mais confiáveis. Finalmente, a placa é selada, centrifugada para garantir a homogeneidade da mistura e colocada no aparelho de qPCR, onde os parâmetros de amplificação são programados.

4. PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Durante o estágio desenvolvi e colaborei em diversas atividades relacionadas com a produção científica, destacando-se as seguintes:

Artigo científico em elaboração – encontro-me atualmente a analisar dados para a escrita de um artigo que tem como objetivo analisar a prevalência do fungo *Aspergillus niger* em diferentes ambientes ocupacionais com ênfase no potencial risco para a saúde dos trabalhadores. Este trabalho está a ser desenvolvido com bases em dados recolhidos de estudos realizados anteriormente pelos meus orientadores e será submetido a uma revisão científica.

Participação no Congresso BioMedLab – Estive presente no congresso BioMedLab2025 prestando apoio ao Mestre Pedro Pena e à Mestre Renata Cervantes durante o evento. Este congresso permitiu adquirir mais conhecimento e consolidar melhor algumas metodologias que não tive oportunidade de desenvolver em laboratório.

Colaboração numa revisão sistemática – Participei na revisão sistemática desenvolvida pela minha colega Cátia Godinho prestando apoio na análise de artigos. A revisão sistemática é sobre a exposição ocupacional a espécies resistentes a azóis. Esta colaboração contribuiu para aprofundar o meu conhecimento em metodologias de investigação científica.

5. DISCUSSÃO E REFLEXÃO CRÍTICA

O meu estágio foi inserido no projeto de investigação InChildHealth focado na investigação da qualidade do ar interior e na avaliação da contaminação fúngica, tendo como objetivo melhorar a qualidade ambiental em diferentes ambientes.

A qualidade do ar interior (QAI) é de extrema importância pela existência de bioaerossóis, que são encontrados em ambientes interiores e exteriores podendo permanecer por longos períodos. A exposição a bioaerossóis pode causar uma série de efeitos adversos à saúde, incluindo alergias, asma, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e várias doenças respiratórias e infecciosas (Cervantes et al., 2022b; Whitby et al., 2022).

A utilização de diferentes métodos de amostragem (ativos e passivos) e de diversos meios de cultura para bactérias e fungos foi essencial para garantir uma caracterização mais completa dos contaminantes presentes. Esta abordagem permitiu avaliar não apenas a quantidade de microrganismos, mas também a sua diversidade e o potencial risco associado à exposição.

A detecção de fungos com relevância clínica, como o *Aspergillus fumigatus*, destaca-se pela sua ligação a infeções e contextos hospitalares e pela crescente resistência aos azóis, o que reforça a importância do desenvolvimento de estratégias eficazes de monitorização e prevenção (Viegas et al., 2021d).

Aplicando o qPCR é possível detetar *Aspergillus* spp. que não foram detetáveis por meios convencionais sendo por isso essencial para a quantificação precisa da expressão genética, permitindo a especificação de ácidos nucleicos em tempo real (Taylor et al., 2019).

Deste modo, o estágio contribuiu para a consolidação dos conhecimentos adquiridos ao longo do mestrado e para o desenvolvimento de competências práticas em microbiologia ambiental. Este trabalho também evidenciou a importância da investigação em QAI para a proteção da saúde humana, reforçando a necessidade de continuar a investir em programas de rastreio, inovação tecnológica e formação de profissionais qualificados nesta área.

Outra reflexão importante prende-se com o impacto pessoal e académico desta experiência. O estágio não só consolidou os conhecimentos adquiridos ao longo do mestrado, como também desenvolveu competências práticas em microbiologia ambiental, pensamento crítico e resolução de problemas em laboratório, assim como a participação neste projeto de relevância internacional que fez-me reconhecer a responsabilidade de produzir dados de qualidade e a importância de uma comunicação científica clara e rigorosa.

Em suma, o estágio revelou-se uma experiência enriquecedora tanto no plano técnico como no pessoal, permitindo-me reconhecer as potencialidades e limitações

do trabalho desenvolvido e compreender de forma mais crítica os desafios associados à investigação em qualidade do ar interior.

6. PROPOSTA DE TRABALHO DE PESQUISA NA ÁREA

Avaliação da contaminação de *Aspergillus niger* em suplementos alimentares

a) Introdução

Cada vez mais a saúde e o bem estar físico estão aliados ao consumo de suplementos alimentares, com o objetivo de melhorar a saúde física e mental (Ratajczak et al., 2020).

Os suplementos alimentares contêm ingredientes naturais, como extratos vegetais e compostos bioativos e são armazenados em ambientes diferentes contribuindo assim uma probabilidade alta de contaminação microbiológica (Dlugaszewska et al., 2019).

Entre todos os microrganismos contaminantes, destaca-se o *Aspergillus niger*, devido à sua prevalência em produtos alimentares secos e industrializados, devido também à sua resistência a condições adversas, como baixa humidade e temperatura variável, e devido ao seu potencial patogénico, uma vez que produz micotoxinas representando riscos para a saúde, especialmente em indivíduos imunocomprometidos ((Frisvad et al., 2011; Samson et al., 2010; Viegas et al., 2018a).

Neste estudo o principal objetivo será investigar a presença de *Aspergillus niger* em suplementos alimentares comercializados, focando na análise da contaminação fúngica, de modo a contribuir para a segurança e qualidade destes produtos uma vez que tem sido bastante consumido nos últimos anos.

b) Estado da Arte

Vários estudos microbiológicos demonstraram a contaminação fúngica existente nos suplementos alimentares, especialmente de *Aspergillus niger*, devido a falhas em processos de produção e armazenamento (Ratajczak et al., 2020).

Aspergillus niger é um fungo frequentemente encontrado no ambiente e tem a capacidade de sobreviver em condições adversas, incluindo ambientes secos e com pouca humidade o que são características comuns em suplementos alimentares, sendo também caracterizado por ser negro e possuir esporos (Frisvad et al., 2011).

Além disso, *Aspergillus niger* tem sido associado à produção de metabolitos tóxicos, incluindo oxálico e gliotoxina, podendo atuar como agente patogénico em indivíduo imunocomprometidos (Samson et al., 2010).

Este fungo tem sido identificado com níveis elevados de bioaerossóis em ambientes ocupacionais, comprovando assim o seu potencial como agente de contaminação ambiental (Viegas et al., 2018b).

No entanto, apesar da sua relevância, os estudos sobre a prevalência de *Aspergillus niger* em suplementos comercializados continuam limitados, sendo por isso necessário novas investigações que contribuam para o conhecimento do risco microbiológico neste tipo de produto (Ratajczak et al., 2020).

c) Metodologia

O principal objetivo será avaliar a presença de *Aspergillus niger* em suplementos alimentares comerciais, com ênfase em produtos de origem natural, por exemplo a spirulina, curcuma, etc.

Inicialmente as amostras serão coletadas em formato de pó adquiridas em farmácias, lojas de produtos naturais e em supermercados, cerca de 30 amostras. Ao recolhermos amostras de diferentes marcas aumentamos a diversidade e conseguimos avaliar as variações das contaminações fúngicas relacionadas com as diferentes condições de armazenamento. Todas as amostras serão manipuladas em ambiente controlado e utilizando material estéril (Viegas et al., 2023b).

A seleção de aproximadamente 30 amostras baseia-se em estudos semelhantes que utilizam entre 20 e 40 amostras para obter uma estimativa representativa da contaminação microbiológica em produtos alimentares e suplementos, garantindo ao mesmo tempo viabilidade logística e operacional no laboratório. Assim, 30 amostras constituem um número adequado para permitir variabilidade suficiente entre marcas e categorias de suplementos, sem comprometer o tempo e os recursos disponíveis para a execução completa das análises microbiológicas.

As amostras serão selecionadas de acordo com critérios definidos para assegurar variedade entre marcas e tipos de suplementos, com o objetivo de abranger diferentes tipos de suplementos em pó, diferentes marcas, e diferentes locais de comercialização (farmácias, supermercados e lojas de produtos naturais). Serão incluídos exclusivamente suplementos em pó à base de ingredientes naturais. Para evitar possíveis erros, será selecionada apenas uma embalagem por marca e os produtos serão adquiridos em três tipos distintos de estabelecimentos, de modo a maximizar a diversidade e permitir avaliar possíveis diferenças associadas ao armazenamento e distribuição.

Cada amostra será homogeneizada e pesa-se 10 g para análise microbiológica para depois ser diluído em 90 mL de solução salina estéril a 0,85% (NaCl), começando assim com uma diluição inicial de 10^{-1} promovendo deste modo uma distribuição uniforme dos microrganismos presentes na amostra. De seguida prepara-se diluições seriadas até à concentração de 10^{-4} para reduzir a concentração microbiana permitindo o crescimento de colónias isoladas e deste modo facilitar a contagem posterior dos fungos presentes nas amostras (Viegas et al., 2023b).

De seguida, inocula-se 0,1 mL de cada diluição em placas de Petri com o meio SAB e DG18 suplementado com cloranfenicol (0,05 g/L) para inibir o crescimento bacterianos sem afetar o crescimento fúngico. As placas serão incubadas as 25°C por 5 a 7 dias, sendo estas as condições ideais para que os fungos mesófilos crescem (Pitt and Hocking, 2022; Viegas et al., 2023b).

Após este tempo, conta-se as unidades formadoras de colónias (UFC/g) em cada placa. A identificação do *Aspergillus niger* será realizada com base nas características macroscópicas e microscópicas (Pitt and Hocking, 2022; Viegas et al., 2023b).

Todas as análises serão realizadas em triplicado para garantir os resultados, e também será incluído controlos negativos, ou seja, placas não inoculadas para assegurar que não há contaminação durante o procedimento experimental (Viegas et al., 2023b).

d) Cronograma

Atividades a desenvolver	Janeiro	Fevereiro	Março	Abril	Maió
Revisão bibliográfica	×	×			
Planeamento e comprar as amostras	×	×			
Procedimento laboratorial		×	×		
Análise dos resultados			×	×	

Escrita do artigo	X	X	X	X	X
-------------------	---	---	---	---	---

e) Resultados Esperados

Com a realização deste estudo espera-se quantificar e caracterizar a presença de *Aspergillus niger* em suplementos alimentares disponíveis no mercado, identificando em que tipo de produtos a contaminação é mais frequente.

Os resultados permitirão identificar variações entre diferentes marcas e locais de aquisição, fornecendo dados relevantes sobre possíveis falhas nos processos de fabrico, armazenamento e comercialização. A informação obtida contribuirá para o conhecimento do risco microbiológico associado a estes produtos, permitindo arranjar estratégias de monitorização, de boas práticas de produção e de medidas de segurança alimentar aplicadas ao setor dos suplementos.

f) Conclusão

Considero que este trabalho reconhece a crescente importância destes produtos na saúde e bem estar da população, assim sendo, esta investigação permitirá não apenas identificar a ocorrência de *Aspergillus* em diferentes tipos de suplementos, mas também caracterizar padrões de contaminação associados a marcas, locais de aquisição e condições de armazenamento.

Os resultados esperados poderão contribuir para uma melhor compreensão do risco microbiológico associado a suplementos alimentares, reforçando a necessidade de adoção de práticas de controlo de qualidade mais rigorosas durante as etapas de fabrico, transporte e comercialização. Além disso, a identificação de falhas potenciais nos processos poderá apoiar a implementação de medidas corretivas e preventivas, com vista a reduzir a exposição dos consumidores a microrganismos com reconhecido potencial patogénico.

Assim, a médio prazo, os conhecimentos obtidos poderão sustentar recomendações técnicas e regulatórias para a monitorização de suplementos alimentares, contribuindo para garantir a segurança destes produtos e proteger a saúde pública.

g) Limitações

Este estudo poderá apresentar algumas limitações que devem ser consideradas na interpretação dos resultados.

A quantidade e diversidade das amostras recolhidas poderá não ser suficientemente representativa de todos os tipos de suplementos alimentares disponíveis no mercado, o que poderá limitar a generalização dos resultados.

A identificação específica de *Aspergillus niger* também pode ser considerada outra limitação, visto que devido à semelhança morfológica entre espécies de *Aspergillus*, métodos apenas baseados em cultura e microscopia podem levar a identificações erradas ou incompletas, sendo ideal confirmar com PCR.

Por fim, os resultados obtidos não permitirão inferir diretamente a toxicidade ou presença de micotoxinas produzidas por *Aspergillus niger*, uma vez que este estudo focar-se-á apenas nesta espécie.

7. REFERÊNCIAS

- Allen, H.K., Donato, J., Wang, H.H., Cloud-Hansen, K.A., Davies, J., Handelsman, J., 2010. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nat Rev Microbiol* 8, 251–259. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2312>
- Arundel, A.V., Sterling, E.M., Biggin, J.H., Sterling, T.D., 1986. Indirect health effects of relative humidity in indoor environments. *Environ Health Perspect* 65, 351–361. <https://doi.org/10.1289/ehp.8665351>
- Baudet, A., Baurès, E., Guegan, H., Blanchard, O., Guillaso, M., Le Cann, P., Gangneux, J.-P., Florentin, A., 2021. Indoor Air Quality in Healthcare and Care Facilities: Chemical Pollutants and Microbiological Contaminants. *Atmosphere* 12, 1337. <https://doi.org/10.3390/atmos12101337>
- Cervantes, R., Dias, M., Gomes, B., Carolino, E., Viegas, C., 2022a. Development of an Indexed Score to Identify the Most Suitable Sampling Method to Assess Occupational Exposure to Fungi. *Atmosphere* 13, 1123. <https://doi.org/10.3390/atmos13071123>
- Cervantes, R., Dias, M., Gomes, B., Carolino, E., Viegas, C., 2022b. Development of an Indexed Score to Identify the Most Suitable Sampling Method to Assess Occupational Exposure to Fungi. *Atmosphere* 13, 1123. <https://doi.org/10.3390/atmos13071123>
- Cervantes, R., Pena, P., Dias, M., Gomes, B., Viegas, C., 2024a. Assessing the impact of climate change on indoor fungal contamination in Lisbon Metropolitan Area primary schools: a comprehensive study.
- Cervantes, R., Pena, P., Gomes, B., Dias, M., Riesenberger, B., Rodriguez, M., Marques, L., Viegas, C., 2024b. Fungal contamination in Lisbon's primary schools: sampling insights and analytical approaches.
- Cervantes, R., Pena, P., Riesenberger, B., Rodriguez, M., Henderson, D., Gonçalves, S., Newire, E., Pogner, C., Salonen, H., Almeida Silva, M., Ferguson, R.M.W., Haverinen-Shaughnessy, U., Viegas, C., 2025. Critical insights on fungal contamination in schools: a comprehensive review of assessment methods. *Front. Public Health* 13. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2025.1557506>
- De Francesco, M.A., 2023. Drug-Resistant *Aspergillus* spp.: A Literature Review of Its Resistance Mechanisms and Its Prevalence in Europe. *Pathogens* 12, 1305. <https://doi.org/10.3390/pathogens12111305>
- Dias, M., Sousa, P., Viegas, C., 2022. Occupational exposure to bioburden in Portuguese ambulances.
- Długaszewska, J., Ratajczak, M., Kamińska, D., Gajecka, M., 2019. Are dietary supplements containing plant-derived ingredients safe microbiologically? *Saudi Pharmaceutical Journal* 27, 240–245. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2018.11.005>
- Douwes, J., Thorne, P., Pearce, N., Heederik, D., 2003. Bioaerosol health effects and exposure assessment: progress and prospects. *Ann Occup Hyg* 47, 187–200. <https://doi.org/10.1093/annhyg/meg032>
- eucast: Métodos em AFST [WWW Document], n.d. URL <https://www.eucast.org/astoffungi/methodsinantifungalsusceptibilitytesting> (accessed 6.21.25).
- Fisk, W.J., Lei-Gomez, Q., Mendell, M.J., 2007. Meta-analyses of the associations of respiratory health effects with dampness and mold in homes. *Indoor Air* 17, 284–296. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0668.2007.00475.x>
- Frisvad, J.C., Larsen, T.O., Thrane, U., Meijer, M., Varga, J., Samson, R.A., Nielsen, K.F., 2011. Fumonisin and ochratoxin production in industrial *Aspergillus niger* strains. *PLOS ONE* 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023496>

- Garcia-Rubio, R., Cuenca-Estrella, M., Mellado, E., 2017. Triazole Resistance in *Aspergillus* Species: An Emerging Problem. *Drugs* 77, 599–613. <https://doi.org/10.1007/s40265-017-0714-4>
- Goh, C.B.S., Goh, C.H.P., Wong, L.W., Cheng, W.T., Yule, C.M., Ong, K.S., Lee, S.M., Pasbakhsh, P., Tan, J.B.L., 2022. A three-dimensional (3D) printing approach to fabricate an isolation chip for high throughput in situ cultivation of environmental microbes. *Lab Chip* 22, 387–402. <https://doi.org/10.1039/D1LC00723H>
- Gordon, O., Berchtold, M., Staerk, A., Roesti, D., 2014. Comparison of different incubation conditions for microbiological environmental monitoring. *PDA J Pharm Sci Technol* 68, 394–406. <https://doi.org/10.5731/pdajpst.2014.00994>
- Haugland, R.A., Vesper, S.J., 2007. Genetics-Based Analytical Methods for Bacteria and Fungi in the Indoor Environment, in: *Sampling and Analysis of Indoor Microorganisms*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 133–154. <https://doi.org/10.1002/9780470112434.ch7>
- Hernandez, A., & Martinez, R. (2018). Environmental bioaerosols: sources and public health implications. *Journal of Environmental Health*, 80(7), 24–32.
- Hervet, C.J., Alles, A.S., Martin, N.H., Boor, K.J., Wiedmann, M., 2016. Evaluation of different methods to detect microbial hygiene indicators relevant in the dairy industry. *J Dairy Sci* 99, 7033–7042. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11074>
- IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Volume 100D [WWW Document], n.d. URL <https://www.who.int/publications/m/item/iarc-monographs-on-the-evaluation-of-carcinogenic-risks-to-humans-volume-100d> (accessed 7.21.25).
- Itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus* | Antimicrobial Agents and Chemotherapy [WWW Document], n.d. URL <https://journals.asm.org/doi/10.1128/aac.41.6.1364> (accessed 6.21.25).
- Jung, B., Hoilat, G.J., 2025. MacConkey Medium, in: *StatPearls*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Kousha, M., Tadi, R., Soubani, A.O., 2011. Pulmonary aspergillosis: a clinical review. *Eur Respir Rev* 20, 156–174. <https://doi.org/10.1183/09059180.00001011>
- Latgé, J.-P., Chamilos, G., 2019. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis in 2019. *Clin Microbiol Rev* 33, e00140-18. <https://doi.org/10.1128/CMR.00140-18>
- Maertens, J.A., Rahav, G., Lee, D.-G., Ponce-de-León, A., Ramírez Sánchez, I.C., Klimko, N., Sonet, A., Haider, S., Diego Vélez, J., Raad, I., Koh, L.-P., Karthaus, M., Zhou, J., Ben-Ami, R., Motyl, M.R., Han, S., Grandhi, A., Waskin, H., 2021. Posaconazole versus voriconazole for primary treatment of invasive aspergillosis: a phase 3, randomised, controlled, non-inferiority trial. *The Lancet* 397, 499–509. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00219-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00219-1)
- Manibusan, S., Mainelis, G., 2022. Passive Bioaerosol Samplers: A Complementary Tool for Bioaerosol Research. A Review. *J Aerosol Sci* 163, 105992. <https://doi.org/10.1016/j.jaerosci.2022.105992>
- Manibusan, K., & Mainelis, G. (2022). Comparison of bioaerosol sampling methods in occupational settings. *Aerosol Science and Technology*, 56(3), 215–228. <https://doi.org/10.1080/02786826.2021.2001234>
- Martínez, J.L., 2008. Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments. *Science* 321, 365–367. <https://doi.org/10.1126/science.1159483>
- Nazaroff, W.W., 2016. Indoor bioaerosol dynamics. *Indoor Air* 26, 61–78. <https://doi.org/10.1111/ina.12174>
- Ojo-Okunola, A., Claassen-Weitz, S., Mwaikono, K.S., Gardner-Lubbe, S., Zar, H.J., Nicol, M.P., du Toit, E., 2020. The Influence of DNA Extraction and Lipid Removal on Human Milk Bacterial Profiles. *Methods and Protocols* 3, 39. <https://doi.org/10.3390/mps3020039>

- Pestka, J.J., 2010. Deoxynivalenol: mechanisms of action, human exposure, and toxicological relevance. *Arch Toxicol* 84, 663–679. <https://doi.org/10.1007/s00204-010-0579-8>
- Pitt, J.I., Hocking, A.D., 2022. *Fungi and Food Spoilage*. Springer International Publishing, Cham. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-85640-3>
- Portaria n.º 138-G/2021 | DR [WWW Document], n.d. URL <https://diariodarepublica.pt/dr/detalhe/portaria/138-g-2021-166296490> (accessed 6.21.25).
- Ratajczak, M., Kaminska, D., Światły-Błaszkiwicz, A., Matysiak, J., 2020. Quality of Dietary Supplements Containing Plant-Derived Ingredients Reconsidered by Microbiological Approach. *Int J Environ Res Public Health* 17, 6837. <https://doi.org/10.3390/ijerph17186837>
- Rivero-Menendez, O., Alastruey-Izquierdo, A., Mellado, E., Cuenca-Estrella, M., 2016. Triazole Resistance in *Aspergillus* spp.: A Worldwide Problem? *J Fungi (Basel)* 2, 21. <https://doi.org/10.3390/jof2030021>
- Rylander, R., 2002. Endotoxin in the environment--exposure and effects. *J Endotoxin Res* 8, 241–252. <https://doi.org/10.1179/096805102125000452>
- Sabouraud Agar for Fungal Growth Protocols [WWW Document], n.d. . Sabouraud Agar for Fungal Growth Protocols. URL <https://asm.org:443/protocols/sabouraud-agar-for-fungal-growth-protocols> (accessed 6.21.25).
- Samson, R.A., Houbraken, J., Thrane, U., Frisvad, J.C., Andersen, B., 2010. *Food and indoor fungi: Second Edition*, C B S Laboratory Manual Series. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, The Netherlands.
- Samson, R.A., Varga, J., 2009. What is a species in *Aspergillus*? *Medical Mycology* 47, S13–S20. <https://doi.org/10.1080/13693780802354011>
- Smith, D.J., Gold, J.A.W., Benedict, K., Wu, K., Lyman, M., Jordan, A., Medina, N., Lockhart, S.R., Sexton, D.J., Chow, N.A., Jackson, B.R., Litvintseva, A.P., Toda, M., Chiller, T., 2023. Public Health Research Priorities for Fungal Diseases: A Multidisciplinary Approach to Save Lives. *J Fungi (Basel)* 9, 820. <https://doi.org/10.3390/jof9080820>
- Smith, J., Oliveira, M., Pereira, C., & Santos, R. (2023). Fungal exposure in food industry workplaces: implications for respiratory health. *International Journal of Occupational and Environmental Hygiene*, 29(2), 105–118.
- Sundell, J., Levin, H., Nazaroff, W.W., Cain, W.S., Fisk, W.J., Grimsrud, D.T., Gyntelberg, F., Li, Y., Persily, A.K., Pickering, A.C., Samet, J.M., Spengler, J.D., Taylor, S.T., Weschler, C.J., 2011. Ventilation rates and health: multidisciplinary review of the scientific literature. *Indoor Air* 21, 191–204. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0668.2010.00703.x>
- Taylor, S.C., Nadeau, K., Abbasi, M., Lachance, C., Nguyen, M., Fenrich, J., 2019. The Ultimate qPCR Experiment: Producing Publication Quality, Reproducible Data the First Time. *Trends in Biotechnology* 37, 761–774. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.12.002>
- Verweij, P.E., Snelders, E., Kema, G.H., Mellado, E., Melchers, W.J., 2009. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: a side-effect of environmental fungicide use? *The Lancet Infectious Diseases* 9, 789–795. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(09\)70265-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70265-8)
- Viegas, C., Almeida, B., Dias, M., Caetano, L.A., Carolino, E., Gomes, A.Q., Faria, T., Martins, V., Marta Almeida, S., 2020. Assessment of Children's Potential Exposure to Bioburden in Indoor Environments. *Atmosphere* 11, 993. <https://doi.org/10.3390/atmos11090993>
- Viegas, C., Caetano, L.A., Viegas, S., 2021a. Occupational exposure to *Aspergillus* section *Fumigati*: Tackling the knowledge gap in Portugal. *Environ Res* 194, 110674. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.110674>

- Viegas, C., Cervantes, R., Dias, M., Gomes, B., Pena, P., Carolino, E., Twaruzek, M., Kosicki, R., Caetano, L. aranha, Viegas, S., 2023a. Fungi and mycotoxins occupational exposure: 2022 Airmon - 10 conference. *Annals of Work Exposures and Health* 67, i9–i10. <https://doi.org/10.1093/annweh/wxac087.025>
- Viegas, C., Cervantes, R., Dias, M., Gomes, B., Pena, P., Carolino, E., Twaruzek, M., Kosicki, R., Soszczyńska, E., Viegas, S., Caetano, L.A., 2022a. Six Feet under Microbiota: Microbiologic Contamination and Toxicity Profile in Three Urban Cemeteries from Lisbon, Portugal. *Toxins (Basel)* 14, 348. <https://doi.org/10.3390/toxins14050348>
- Viegas, C., Cervantes, R., Dias, M., Gomes, B., Pena, P., Carolino, E., Twaruzek, M., Kosicki, R., Soszczyńska, E., Viegas, S., Caetano, L.A., Pinheiro, A.C., 2022b. Unveiling the Occupational Exposure to Microbial Contamination in Conservation–Restoration Settings. *Microorganisms* 10, 1595. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10081595>
- Viegas, C., Cervantes, R., Dias, M., Gomes, B., Pena, P., Carolino, E., Twaruzek, M., Kosicki, R., Soszczyńska, E., Viegas, S., Caetano, L.A., Pinheiro, A.C., 2022c. Unveiling the Occupational Exposure to Microbial Contamination in Conservation–Restoration Settings. *Microorganisms* 10, 1595. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10081595>
- Viegas, C., Dias, M., Carolino, E., Sabino, R., 2021b. Culture Media and Sampling Collection Method for *Aspergillus* spp. Assessment: Tackling the Gap between Recommendations and the Scientific Evidence. *Atmosphere* 12, 23. <https://doi.org/10.3390/atmos12010023>
- Viegas, C., Faria, T., Caetano, L.A., Carolino, E., Quintal-Gomes, A., Twaruzek, M., Kosicki, R., Viegas, S., 2019. Characterization of Occupational Exposure To Fungal Burden in Portuguese Bakeries. *Microorganisms* 7, 234. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7080234>
- Viegas, C., Faria, T., Pacífico, C., Dos Santos, M., Monteiro, A., Lança, C., Carolino, E., Viegas, S., Cabo Verde, S., 2017. Microbiota and Particulate Matter Assessment in Portuguese Optical Shops Providing Contact Lens Services. *Healthcare (Basel)* 5, 24. <https://doi.org/10.3390/healthcare5020024>
- Viegas, C., Monteiro, A., Carolino, E., Viegas, S., 2018a. Occupational exposure to bioburden in Portuguese bakeries: an approach to sampling viable microbial load. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology* 69, 250–257. <https://doi.org/10.2478/aiht-2018-69-3116>
- Viegas, C., Monteiro, A., Ribeiro, E., Caetano, L.A., Carolino, E., Assunção, R., Viegas, S., 2018b. Organic dust exposure in veterinary clinics: a case study of a small-animal practice in Portugal. *Arh Hig Rada Toksikol* 69, 309–316. <https://doi.org/10.2478/aiht-2018-69-3171>
- Viegas, C., Pimenta, R., Dias, M., Gomes, B., Brito, M., Aranha Caetano, L., Carolino, E., Gomes, A.Q., 2021c. Microbiological Contamination Assessment in Higher Education Institutes. *Atmosphere* 12, 1079. <https://doi.org/10.3390/atmos12081079>
- Viegas, C., Simões, A.B., Faria, M., Gomes, B., Cervantes, R., Dias, M., Carolino, E., Twaruzek, M., Kosicki, R., Viegas, S., Caetano, L.A., 2023b. Tea contamination by mycotoxins and azole-resistant mycobiota – The need of a One Health approach to tackle exposures. *International Journal of Food Microbiology* 385, 110015. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.110015>
- Viegas, C., Twaruzek, M., Almeida, B., Dias, M., Ribeiro, E., Carolino, E., Soszczyńska, E., Caetano, L.A., 2021d. Cytotoxicity of *Aspergillus Section Fumigati* Isolated from Health Care Environments. *JoF* 7, 839. <https://doi.org/10.3390/jof7100839>
- Whitby, C., Ferguson, R.M.W., Colbeck, I., Dumbrell, A.J., Nasir, Z.A., Marczylo, E., Kinnersley, R., Douglas, P., Drew, G., Bhui, K., Lemon, M., Jackson, S., Tyrrel,

- S., Coulon, F., 2022. Chapter Three - Compendium of analytical methods for sampling, characterization and quantification of bioaerosols, in: Bohan, D.A., Dumbrell, A. (Eds.), *Advances in Ecological Research, Functional Microbiomes*. Academic Press, pp. 101–229. <https://doi.org/10.1016/bs.aecr.2022.09.004>
- WHO bacterial priority pathogens list, 2024: Bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance [WWW Document], n.d. URL <https://www.who.int/publications/i/item/9789240093461> (accessed 7.21.25).
- WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action [WWW Document], n.d. URL <https://www.who.int/publications/i/item/9789240060241> (accessed 6.18.25).
- WHO guidelines for indoor air quality : dampness and mould [WWW Document], n.d. URL <https://www.who.int/publications/i/item/9789289041683> (accessed 7.17.25).
- Wu, F.Q., 2007. Culture-Based Analytical Methods for Investigation of Indoor Fungi, in: *Sampling and Analysis of Indoor Microorganisms*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 105–122. <https://doi.org/10.1002/9780470112434.ch5>
- Yang, C., Xu, Z., Wu, Y., et al. (2007). Characteristics of microbial aerosols in urban and rural environments. *Atmospheric Environment*, 41(20), 4514–4521. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2007.01.020>
- Zakaria, L., 2024. An Overview of Aspergillus Species Associated with Plant Diseases. *Pathogens* 13, 813. <https://doi.org/10.3390/pathogens13090813>