

ESTUDO DE COMUNIDADES FÚNGICAS EM ARQUIVOS

IMPLICAÇÕES NA CONSERVAÇÃO E NA SAÚDE

A. C. Pinheiro | Departamento de Conservação e Restauro da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa | catmarpin@gmail.com
C. Viegas | Escola Superior de Tecnologias de Saúde de Lisboa, Instituto Politécnico de Lisboa
V. Jurado | Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología, CSIC, Sevilla
R. Sabino, C. Veríssimo, L. Rosado | Unidade de Referência de Doenças Sistémicas e Zoonoses do Departamento de Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, IP, Lisboa
M. F. Macedo | Vicarte, Departamento de Conservação e Restauro da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

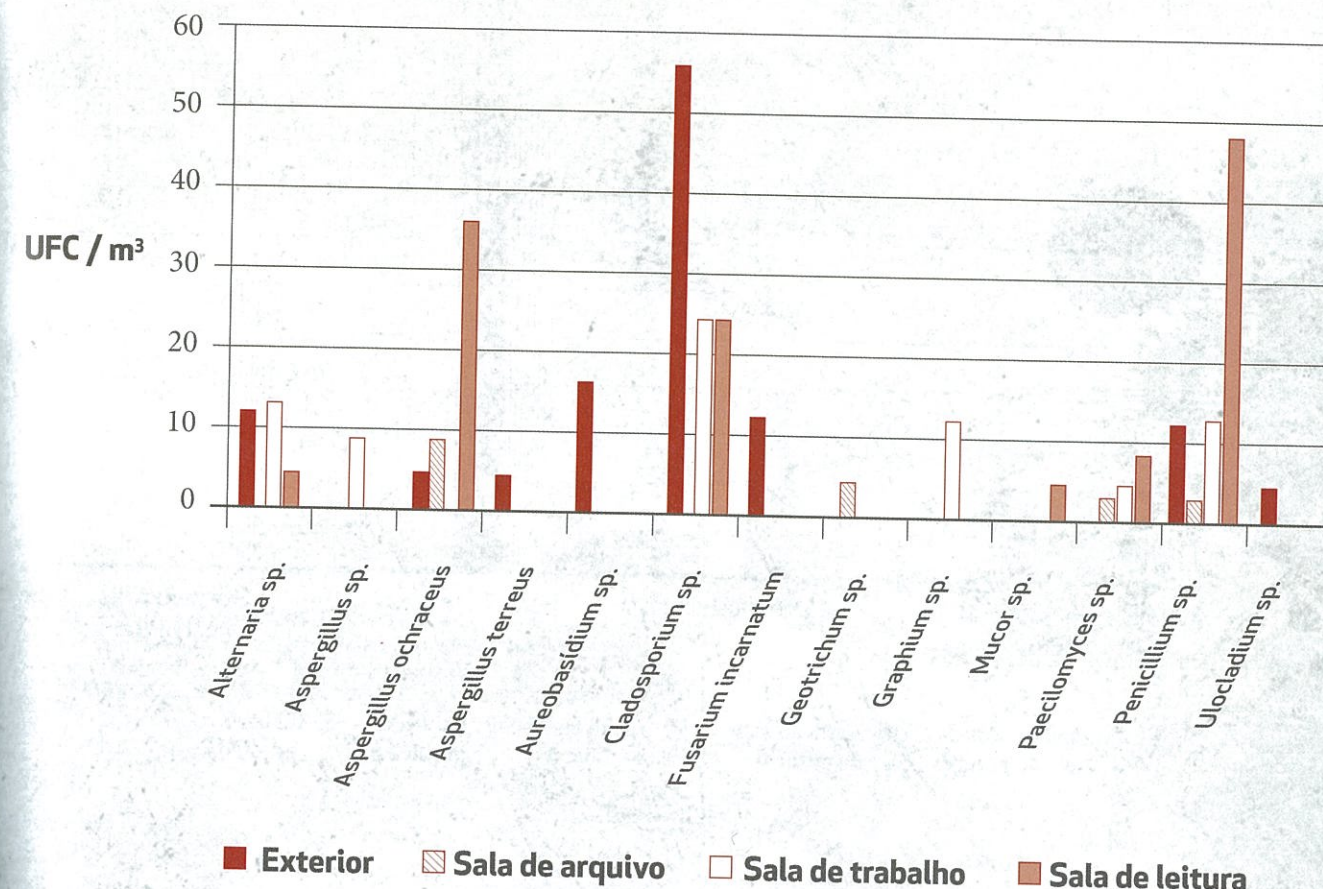
A influência da contaminação fúngica para a saúde ambiental e para a conservação do património é o tema premente e actual que suscitou a hipótese de estudo aqui apresentada. Os fungos, dada a sua extrema capacidade de adaptação, podem colonizar diversos materiais – orgânicos ou não – e a sua acção pode ser mecânica, por intermédio das suas hifas, ou química, através dos seus metabolitos. Em termos de conservação do património, os estudos sobre fungos têm suscitado grande interesse dada a sua elevada capacidade de biodeterioração (Sterflinger, 2010). Tendo inicialmente assentado em técnicas tradicionais de cultura (Zyska, 1998), os estudos mais recentes já incluem técnicas modernas de biologia molecular (Mesquita *et al.*, 2009; Michaelsen *et al.*, 2009). O estudo aqui apresentado utiliza ambas as técnicas: a convencional, recorrendo a meios de cultura específicos para o crescimento de fungos e a mais recente, utilizando o DNA fúngico e a amplificação genómica dos mesmos para conseguir identificá-los até ao nível da espécie. Para conseguir realizar este intuito, foi desenvolvida a aplicação da recente técnica de cromatografia líquida desnaturalante de alta resolução (DHPLC) à análise de amostras complexas de fungos filamentosos e leveduriformes.

Apesar do controlo ambiental (humidade relativa e temperatura) ser considerado como uma das medidas mais eficazes para a prevenção do aparecimento de contaminação fúngica, este tipo de estudo – em que se procura identificar a espécie / género fúngico responsável pela biodeterioração – pode trazer importantes informações em relação ao tratamento a aplicar no património afectado, pois fungos de espécies/géneros diferentes apresentam características estruturais / metabólicas diferentes e nestas dissimilaridades poderá assentar a eficácia do tratamento. Além disso, a presença de determinados fungos como o *Chaetomium spp.*, *Stemphylium spp.*, *Trichoderma spp.*, *Mucor spp.* ou *Rhizopus spp.*, pode alertar para a necessidade de medidas urgentes porque estes são alguns dos fungos que erodem, mancham e conseguem alterar a estrutura mecânica do papel (Mandrioli e Caneva, 1998). Em termos de saúde ambiental, as recentes exigências legislativas (NT-SCE-02) prevêm um limite máximo de contaminação fúngica em ambientes onde se realize actividade humana. Em Portugal não havia ainda qualquer registo de estudos efectuados em Arquivos que incorporassem a amostragem de ar, complementando-a com a amostragem de superfícies, de forma a obter resultados mais detalhados e precisos sobre a contaminação fúngica existente.

Metodologia

Arquivos localizados em território nacional constituíram o ambiente de estudo escolhido para a investigação ainda em curso. Em cada um dos locais de estudo – três na região de Lisboa e um em Évora – foram seleccionados locais de amostragem tendo o cuidado de incluir áreas devotadas inteiramente ao arquivo de espécies celulósicas de interesse cultural e áreas com actividade humana (salas de trabalho e salas de consulta de documentos). Em cada uma destas salas, foram amostrados os locais onde a contaminação fúngica mais poderia contribuir para a biodeterioração e/ou agravamento/precipitação de problemas de saúde. Assim sendo, foram efectuadas amostragens de ar e de superfícies, como pavimento, prateleiras, mesas e capas de acondicionamento dos documentos. Foi ainda amostrado qualquer local onde se verificasse crescimento visível de fungos. Para as amostras de ar foi usado apenas um meio de cultura mas para as superfícies foram usados dois meios (extracto de malte com cloranfenicol e DG18) com diferentes actividades de água (Aw) para garantir que todo o possível espectro fúngico cultivável seria observado. O espectro não cultivável foi analisado por técnicas de Biologia Molecular.

1. Quantificação e identificação de fungos nas amostras de ar recolhidas no Inverno num dos arquivos de Lisboa. Alguns dos fungos presentes no interior não foram detectados no exterior, o que sugere contaminação interna.



Após incubação das amostras de ar e de superfícies, as placas de crescimento foram analisadas com contagem das colónias e identificação morfológica das mesmas recorrendo a atlas de identificação (Larone, 2002; Samson *et al.*, 2004). No caso de crescimento múltiplo de vários tipos das leveduras, não identificáveis morfológicamente, foi aplicada a tecnologia de cromatografia líquida desnaturalante de alta resolução (DHPLC) para a separação das várias espécies. Este procedimento, uma vez desenvolvido, tem aplicações práticas não só no caso dos Arquivos (Pinheiro *et al.*, 2011a) como em património arquitectónico (Pinheiro *et al.*, 2011c) ou em casos clínicos com infecção por múltiplos agentes. Nos casos de crescimento nulo em placa, procedeu-se à extracção de DNA da amostra recolhida e de seguida procedeu-se à amplifi-

cação das regiões D2 e ITS2 capazes de fornecer informação genética acerca da espécie ou espécies em causa. A este procedimento seguiu-se a análise por DHPLC para avaliação da comunidade fúngica existente. Foram efectuadas colheitas em duas estações do ano (Verão e Inverno) e em cada um dos locais escolhidos. Em todos os arquivos tem sido verificada uma prevalência interior de *Penicillium spp.* e *Cladosporium spp.*, tanto nas amostras de ar como nas de superfície. Nas figuras 1 e 2 estão representados os resultados obtidos em termos de contagem e identificação de espécies num dos arquivos estudados e para uma das estações (Pinheiro *et al.*, 2011a; Pinheiro *et al.*,

Resultados

2011b). A quantificação é feita em UFCs ou unidades formadoras de colónias. Neste arquivo foi detectada a presença de *Stachybotrys sp.*, um dos fungos com forte impacto na saúde e que está contemplado na NT-SCE-02. Em termos regulamentares, e falando de padrões microbiológicos, a NT-SCE-02 considera potencialmente danosa a presença de determinados géneros/espécies de fungos: *Stachybotrys chartarum* (S. atra), *Fusarium spp.*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Histoplasma capsulatum* e *Cryptococcus neoformans*. Em relação aos géneros menos comuns, foram confirmadas já noutros arquivos as presenças de *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus versicolor* e *Fusarium sp.* e todos eles, portanto, com um forte impacto na saúde humana (Pinheiro *et al.*, 2011a).