



ESCOLA SUPERIOR DE SAÚDE DO PORTO  
INSTITUTO POLITÉCNICO DO PORTO

---

Ana Rita da Mota Morais

---

Monitorização e Identificação de Fungos no  
Interior de Transportes Públicos Coletivos na  
Região do Porto

---

Dissertação submetida à Escola Superior de Saúde do Porto para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Higiene e Segurança nas Organizações, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Joana Carvalho dos Santos (Escola Superior de Saúde do Porto, Instituto Politécnico do Porto) e Doutor Rui Sérgio Viana Sodré de Oliveira (Escola Superior de Saúde, Instituto Pol cnico do Porto; Departamento de Ciências da Vida, Universidade de Coimbra)

Fevereiro, 2018

## **Agradecimentos**

À Professora Doutora Joana Santos da ESS-IPP, por ter aceitado ser minha orientadora, acompanhando-me nesta etapa e por toda a disponibilidade ao longo destes meses.

Ao Professor Doutor Rui Oliveira, meu co-orientador, por toda a disponibilidade, acompanhamento e apoio, principalmente na parte laboratorial.

À Doutora Fátima Carvalho pela disponibilidade e orientação no Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental da Universidade do Porto (Ciimar).

À Sociedade de Transportes Coletivos do Porto por ter aceitado o desafio e permitido a realização desta dissertação na sua empresa, cooperando em todos os momentos e demonstrando interesse pelo trabalho desenvolvido.

À Mestranda Mariana Girão pela disponibilidade e acompanhamento nos processos de extração de ADN e PCR realizados no Ciimar tendo sido uma ajuda preciosa para a compreensão de todos os processos e dos resultados obtidos.

À Diana Brites, minha amiga e companheira nesta aventura, por todo o apoio, ânimo e compreensão, tendo um papel fundamental na finalização desta etapa académica.

Um obrigada especial à minha mãe, que tanto lutou para eu chegar a este patamar, e que sempre teve uma palavra de incentivo ao longo da realização desta dissertação, motivando-me a aplicar-me cada vez mais, acreditando sempre que eu seria capaz de atingir este objetivo pessoal.

## Resumo

Os autocarros, como serviço de transporte público, são utilizados por milhares de pessoas em todas as cidades, pelas vantagens que apresentam. Os passageiros encontram-se perante um microambiente, expostos a agentes biológicos, como os fungos, que podem ter impacto na sua saúde humana. O presente estudo possui como principal objetivo a avaliação e análise da exposição a agentes biológicos nos transportes rodoviários coletivos, através da quantificação e identificação de espécies fúngicas. De janeiro a maio, foram realizadas 41 viagens, onde, posteriormente, foram analisadas 68 placas de Petri puras viáveis de fungos, sendo 66 pertencentes ao ar e 2 às superfícies. A obtenção de colónias puras de fungos e o seu respetivo isolamento foi realizada através da técnica de riscado em placa, e para identificação das espécies procedeu-se à extração do ADN, seguido da realização da técnica do PCR e posteriormente da sequenciação. Os resultados analisados permitiram averiguar que não existe uma correlação significativa entre o número de ocupantes, a temperatura e as concentrações de fungos no ar. A influência das estações do ano – inverno e primavera – assim como a ventilação natural/forçada não permitiu verificar associações entre as variáveis. As 6 espécies de fungos identificadas foram *Epicoccum nigrum*, *Cladoporium haloterans*, *Cryptococcus diffluens*, *Cladosporium tenuissimum*, *Alternaria infectoria* e *Alternaria tenuissima* / *Alternaria alternata*.

As medidas de prevenção como a manutenção do sistema de ar condicionado e de ventilação, a utilização de produtos de limpeza mais eficazes e a realização de avaliações sazonais à qualidade do ar interior deste tipo de transporte têm o objetivo de assegurar as condições de segurança e de conforto para todos os ocupantes.

**Palavras-chave:** Qualidade do ar interior, transportes públicos, agentes biológicos, fungos, identificação de espécies, monitorização

## Abstract

Buses are used by thousands of people in all cities, for the advantages they present. Passengers are faced with a microenvironment, exposed to biological agents such as fungi, which may have an impact on their human health. The present study has as main objective the evaluation and analysis of exposure to biological agents in collective road transport, through the quantification and identification of fungal species.

From January to May, 41 trips were carried out, where 68 pure Petri dishes of fungi were analyzed, 66 of them belonging to the air and 2 to the surfaces. The collection of pure fungal colonies and their respective isolation was performed by plaque scoring technique, and DNA extraction was performed to identify the species, followed by the PCR technique and sequencing. The results analyzed showed that there is no significant correlation between the number of occupants, temperature and concentrations of fungi in the air. The influence of the seasons of the year - winter and spring - as well as the natural / forced ventilation did not allow verifying associations between the variables. The 6 identified fungal species were *Epicoccum nigrum*, *Cladoporium haloterans*, *Cryptococcus diffluens*, *Cladoporium tenuissimum*, *Alternaria infectoria* and *Alternaria tenuissima* / *Alternaria alternata*.

Prevention measures such as maintenance of the air-conditioning and ventilation system, the use of more efficient cleaning products and seasonal assessments of the indoor air quality of this type of transport are intended to ensure safety and comfort for all occupants.

**Key words:** Indoor air quality, public transport, biological agents, fungi, species identification, monitoring

## Índice

<b>Introdução.....</b>	<b>- 1 -</b>
<b>CAPÍTULO I – Revisão Bibliográfica.....</b>	<b>- 4 -</b>
1.1 Enquadramento legal.....	- 8 -
1.2 Objetivos do estudo.....	- 9 -
<b>CAPÍTULO II – Materiais e Métodos.....</b>	<b>- 10 -</b>
2.1 Tipo de estudo .....	- 10 -
2.2 Caracterização da Amostra.....	- 10 -
2.3 Procedimento e instrumentação .....	- 12 -
<i>ii.iii.i Amostras de ar.....</i>	<i>- 12 -</i>
<i>ii.iii.ii Amostras de superfícies.....</i>	<i>- 14 -</i>
2.4 Análise laboratorial .....	- 15 -
<i>ii.iv.i Isolamento de culturas.....</i>	<i>- 15 -</i>
2.5 Identificação das espécies .....	- 16 -
<i>ii.v.i Extração.....</i>	<i>- 16 -</i>
<i>ii.v.ii. Reação em Cadeia Polimerase.....</i>	<i>- 17 -</i>
<i>ii.v.iii Ampliação das bandas de ADN e Sequenciação.....</i>	<i>- 18 -</i>
<i>ii.v.iv Bases de dados utilizadas na identificação das espécies.....</i>	<i>- 19 -</i>
2.6 Análise Estatística .....	- 19 -
<b>CAPÍTULO III – Apresentação de Resultados e Discussão.....</b>	<b>- 21 -</b>
3.1 Concentrações de fungos no ar.....	- 21 -
3.2 Contaminação fúngica das superfícies .....	- 30 -

3.3 Identificação das espécies .....	- 31 -
<b>Conclusão</b> .....	<b>- 42 -</b>
<b>Trabalhos futuros</b> .....	<b>- 45 -</b>
<b>Referências Bibliográficas</b> .....	<b>- 46 -</b>
<b>Anexos</b> .....	<b>- 52 -</b>
Anexo I - Protocolo Automatizado - E.Z.N.A <i>Bacterial DNA Kit</i> .....	- 53 -
Anexo II – Registo das características no decorrer das amostragens .....	- 54 -

## Índice de abreviaturas

ADN - Ácido Desoxirribonucleico

AMP - Área Metropolitana do Porto

CAE - Classificação de Atividade Económica

EN - Normas Europeias emitidas pelo Comité Europeu de Normalização

L/min - Litro por minuto

ml - mililitro

PDA - Potato Dextrose Agar

QAI - Qualidade do Ar Interior

RBCA - Rose bengal chloramphenicol agar

UFC's - Unidades formadoras de colónias

VLE - Valor Limite de Exposição

## Índice de figuras

Figura 1 - Autocarro tipo standart .....	- 11 -
Figura 2 – Amostrador <i>Merck Air Sampler</i> MAS-100 MERCK.....	- 14 -
Figura 3- Exemplo de tipos de riscado em placa. Fonte: Sinogas et al. (2002) .....	- 16 -
Figura 4 - Exemplo de uma placa mista de fungos .....	- 21 -
Figura 5 - Média da concentração de fungos em UFC/m <sup>3</sup> nas viagens de ida e de volta realizadas no inverno.....	- 26 -
Figura 6 - Média da concentração de fungos em UFC/m <sup>3</sup> nas viagens de ida e de volta realizadas na primavera.....	- 27 -
Figura 7 - Amplificação das bandas de ADN.....	- 32 -
Figura 8 - Amostra de <i>Epicoccum nigrum</i> .....	- 34 -
Figura 9 - Amostra de <i>Clasporium haloterans</i> .....	- 36 -
Figura 10 - Amostra de <i>Cryptococcus diffluens</i> .....	- 36 -
Figura 11 - Amostra de <i>Cladosporium tenuissimum</i> .....	- 37 -
Figura 12 - Amostra de <i>Alternaria infectoria</i> .....	- 38 -
Figura 13 - Amostra de <i>Alternaria tenuissima</i> / <i>Alternaria alternata</i> .....	- 39 -

## Índice de tabelas

Tabela 1 - Concentrações obtidas (UFC/m <sup>3</sup> ), n.º de ocupantes em cada viagem e temperatura no dia das amostragens. ....	- 22 -
Tabela 2 - Legenda das amostras no PCR e Primers específicos de fungos .....	- 31 -
Tabela 3 - Legenda das amostras que não amplificaram e primers específicos de bactérias .....	- 32 -
Tabela 4 - Identificação das espécies .....	- 33 -
Tabela 5 - Percentagens de similaridade .....	- 34 -

## **Introdução**

As crescentes e novas políticas associadas aos transportes públicos têm como principal foco prestar um serviço de qualidade e de segurança à sociedade, tendo também preocupações ambientais e económicas. As melhorias contínuas das infraestruturas e dos transportes criam uma dinâmica sustentável, proporcionando a todos os cidadãos o acesso a este serviço de forma igualitária, aumentando a acessibilidade, e contribuindo para a redução da exclusão social (Ruiz et al., 2017).

Os transportes públicos têm sido alvo de uma crescente visibilidade e credibilidade pelas soluções que apresentam à sociedade. São diversos os aspetos positivos inerentes à utilização deste tipo de transporte, destacando-se as questões sociais, ambientais e económicas.

A nível social, os transportes públicos oferecem um serviço que engloba diferentes veículos – metro, comboio, autocarro – permitindo que a população usufrua de um transporte seguro, acessível e eficiente. Relativamente ao ambiente, a utilização de transportes públicos invés do veículo privado permite reduzir as emissões de poluentes (Woods e Masthoff., 2017).

A aplicação de investimentos na melhoria e ampliação de infraestruturas rodoviárias e dos veículos contribui para o crescimento da economia do país, atraindo um maior número de passageiros. A utilização de transportes públicos tem crescido nas áreas urbanas, devido a fatores como o preço acessível, a abrangência de várias rotas e o aumento da comodidade. Por outro lado, este serviço proporciona a redução dos impactos ambientais, sendo que a uma parte significativa da população opta por não utilizar com tanta frequência os seus próprios veículos (Ponrahono et al., 2016).

Os condutores de transportes públicos e os respetivos passageiros encontram-se expostos a um microambiente que pode conter concentrações significativas de agentes biológicos, como bactérias e fungos, sendo essencial apostar nas avaliações da qualidade do ar, verificando a exposição real e elaborando medidas de melhoria, de forma a salvaguardar a saúde humana (Pang e Mu., 2007).

A qualidade do ar exterior pode ser um dos parâmetros que influencia a qualidade do ar interior dos transportes. Os poluentes podem entrar para o veículo, através da abertura de portas/janelas, ocorrendo a exposição a agentes biológicos oriundos do ar exterior. Desta

forma, é importante ter em conta o impacto da qualidade do ar exterior no ambiente interno do veículo.

A exposição a bioaerossóis em microambientes como os autocarros é quase inevitável. Jo e Lee (2008) referem que a exposição a elevadas concentrações de bioaerossóis encontra-se associada a patologias como a asma, rinite e pneumonite de hipersensibilidade. Segundo Kim et al. (2011) a presença dos passageiros é um dos fatores que contribui para a formação de bioaerossóis no interior dos transportes.

Os veículos a motor são um microambiente importante para exposição ambiental, analisando o facto de que os indivíduos despendem uma parte significativa do seu período diário a realizar os seus trajetos, seja para o emprego ou por questões de lazer. A literatura existente sobre a exposição a poluentes em transportes públicos recai essencialmente para os autocarros e metros, tendo em conta que abrangem um maior número de passageiros, ao contrário de táxis ou veículos particulares (Hsu e Huang, 2009).

Uma parte da população, como os motoristas de autocarros, de metros e de táxis passam uma percentagem significativa do dia a conduzir estes veículos, encontrando-se mais expostos aos contaminantes presentes no ar, quando comparados com quem conduz o seu veículo próprio. Xu e Hao (2017) referem que os ocupantes de veículos motorizados encontram-se expostos a níveis superiores de poluentes quando comparado com a concentração de poluentes no ambiente exterior.

De forma a proporcionar segurança e conforto nos autocarros, para os motoristas e para o público, torna-se crucial que a organização coloque em prática medidas para salvaguardar a saúde de todos os utilizadores, tais como a implementação de critérios de manutenção, que abranjam todas as estruturas do veículo, destacando-se a manutenção realizada no sistema de ventilação e no sistema de ar condicionado, que podem ter influência na qualidade do ar interior.

Segundo a EN 13306:2010, existem três tipos de manutenção: manutenção preventiva, quando efetuada a intervalos de tempo ou número de quilómetros preestabelecidos ou fixos, com o intuito de reduzir ou evitar possíveis avarias. A manutenção preventiva engloba, também, a manutenção preventiva operativa, inerente a ações simples realizadas pelo motorista, em tempo reduzido, como rotinas de inspeção; a manutenção preventiva sistemática, associada à substituição de algum dos elementos do veículo, realizada sem controlo antecipado do estado do autocarro ou do elemento; e, por último, a manutenção

preventiva condicionada, que atua no controlo do funcionamento e na avaliação da condição do estado dos equipamentos. A manutenção corretiva, onde se efetua a reparação, depois da deteção ou ocorrência da avaria. E por último, a manutenção de melhoria, com o intuito de remodelações que visem melhorar o funcionamento do veículo. Todas estas manutenções devem ser devidamente registadas e guardadas, pois pertencem ao histórico do autocarro.

Seguindo as Diretrizes sobre a qualidade do ar neste tipo de veículo, já mencionadas anteriormente, o sistema de ventilação no autocarro deve ser de fácil acesso para a realização da manutenção e limpeza regular das condutas e bobinas de arrefecimento, assim como facilitar a substituição dos filtros. A escolha dos materiais utilizados deve incidir nos ecológicos. Um dos aspetos na monitorização da qualidade do ar recai para a avaliação da concentração média de CO<sub>2</sub>, pelo período de uma hora, durante o normal período da viagem e nas horas de maior taxa de ocupação, pelo menos uma vez por ano. Cabe também ao responsável pela qualidade do ar, verificar a taxa de ventilação no mínimo uma vez a cada três anos.

Com o objetivo de garantir um adequado controlo da qualidade do ar interior deste tipo de transporte, o responsável por estas funções deve estabelecer um programa de limpeza do veículo, abrangendo a limpeza e substituição regular dos filtros de ar nos sistemas de ventilação e a limpeza regular das bobinas e das condutas de ar. Um aspeto importante é a escolha dos filtros a utilizar nestes sistemas. O sistema de ventilação nos autocarros deve possuir filtros de partículas, seguindo os padrões estabelecidos pelo American Society of Heating, Refrigeration and Air Conditioning Engineers (ASHRAE). Destaca-se a utilização de filtros HEPA (High Efficiency Particulate Air), com capacidade para filtrar partículas inferiores a 1.0 µm (Environmental Protection Department, 2003).

Torna-se relevante atuar na avaliação da exposição de agentes biológicos nos autocarros, dando especial atenção às concentrações fúngicas, analisando os fatores externos e os fatores internos que possuem um papel determinante no crescimento e concentração destes microrganismos no ar interior do veículo, assim como nas superfícies.

O presente estudo teve como principal objetivo avaliar e analisar, através da quantificação e identificação de espécies fúngicas, a exposição a agentes biológicos em Transportes Rodoviários Coletivos.

## **CAPÍTULO I – Revisão Bibliográfica**

A degradação da qualidade do ar que se tem verificado nas últimas décadas acarreta consequências negativas nos vários ecossistemas, tendo impacto também na saúde humana. As políticas para a qualidade do ar incidem essencialmente na redução de poluentes atmosféricos e ações que conduzam a uma redução das emissões de gases de efeito de estufa, assim como medidas que apoiem a utilização de energias renováveis.

Com vista a atuar na melhoria da qualidade do ar, nos anos 90, coube à União Europeia elaborar e colocar em prática um conjunto de requisitos sobre o controlo da qualidade do ar e a respetiva avaliação, nomeadamente no que diz respeito a métodos de monitorização e avaliação da qualidade do ar, assim como respetivos limites. Uma grande maioria da população da Europa habita em cidades onde os limites de qualidade do ar são ultrapassados, aumentando, desta forma, a probabilidade de riscos para a saúde humana (Gemmer e Xiao, 2013).

Nos últimos anos os vários países da União Europeia têm medido esforços para atuar nesta matéria, através da definição de diretrizes que englobam objetivos a longo prazo de forma a atuar no controlo dos níveis de determinados poluentes e da monitorização das respetivas concentrações no ar. Estas diretrizes reúnem o limite e o alerta da qualidade do ar, estratégias de monitorização, métodos de medição, de calibração e de avaliação da qualidade do ar (Monteiro et al., 2007).

A qualidade do ar exterior possui um papel importante na qualidade do ar interior, principalmente em microambientes. No dia-a-dia a população encontra-se em contacto constante com o ar interior, visto que a maioria dos empregos e das atividades é realizada em ambientes fechados, existindo uma interação muito próxima entre o ser humano e os agentes biológicos, como os fungos no ar. Inerente a este facto, compreende-se a necessidade de atuar na avaliação da qualidade do ar interior tendo como foco principal a salvaguarda da saúde humana. A análise do nível de concentração fúngica e das espécies podem ser indicadores da qualidade do ar interior no local em estudo.

Como uma parte significativa da população em geral utiliza os autocarros como meio de transporte para o local de trabalho, para a escola e para atividades de lazer, e durante um determinado período de tempo diário e/ou semanal, este meio de transporte é considerado

um microambiente importante para a avaliação da exposição ambiental. No entanto, os estudos incidentes na exposição a agentes biológicos em autocarros são escassos.

O desenvolvimento do sistema de transportes públicos nas cidades tem sido crescente, e reconhecido como uma importante fonte de exposição aos contaminantes atmosféricos. Segundo Gómez-Perales (2007) fatores como o tipo de veículo, o sistema de ventilação, a hora do dia e a estação do ano são variáveis importantes na exposição a contaminantes no interior do veículo, tendo influência nas concentrações presentes.

Os microambientes interiores são considerados como a principal fonte de exposição humana aos poluentes atmosféricos, tendo em conta o tempo despendido nesses espaços. A nível mundial, o desenvolvimento e crescimento dos sistemas de transportes como os autocarros e metros promovem uma necessidade de estudo da exposição dos indivíduos a este tipo de poluentes e a avaliação do impacto na saúde (Xu e Hao, 2017).

O ar interior pode conter entre 2 a 5 vezes mais contaminantes atmosféricos do que o ar exterior, colocando-se questões associadas à saúde pública, que carecem de análise e verificação, principalmente, pelos profissionais de saúde de forma a assegurar um ambiente seguro e a proteção da saúde humana. De uma forma geral, os principais sintomas inerentes à exposição de fungos no ar incluem problemas respiratórios, com especial impacto no nariz e nos pulmões e problemas oculares e nas mucosas (Cabral, 2010).

Segundo Prakash et al. (2014), numa viagem de autocarro os ocupantes encontram-se expostos a um microambiente que pode conter microrganismos, na sua maioria agentes com capacidade para desencadear patologias como asma e rinite alérgica. Prakash et al. (2014) refere, ainda, que os fungos se podem distinguir em três tipos: alergénicos, toxigénicos e com capacidade parasitária. Na maior parte das ocorrências, os fungos no ar são inalados, afetando o trato respiratório e os pulmões. Lee e Jo (2005) mencionam o impacto negativo na saúde humana da exposição a fungos no ar interior, destacando patológicas como a asma e rinite, e infeções na pele.

A qualidade do ar interior é cada vez mais um alvo de estudo, em diversos ambientes, uma vez que níveis elevados de contaminantes no ar interior têm um impacto na saúde pública e ocupacional.

Os bioaerossóis são microrganismos (bactérias, fungos ou vírus) ou compostos orgânicos derivados de microrganismos (endotoxinas, metabolitos, toxinas e outros fragmentos

microbianos. Devido ao seu peso reduzido, os bioaerossóis são de fácil transporte e podem acarretar problemas de saúde quando se encontra em elevadas concentrações nos ambientes internos (Jo e Lee, 2008).

A temperatura e a humidade relativa são dois fatores de condições ambientais que permitem o crescimento e desenvolvimento dos bioaerossóis. Em locais restritos, como os transportes públicos, Youn et al. (2010) referem que a presença de ocupantes afeta a concentração de bioaerossóis internos. Por outro lado, as fontes de bioaerossóis presentes no interior do transporte podem ser transferidas do exterior para o interior, através das janelas e portas do veículo.

O sistema de ar condicionado, presente nos autocarros públicos, encontra-se associado à proliferação de microrganismos. Segundo Hamada e Fujita (2002) a utilização frequente do sistema de ar condicionado é uma das variáveis com influência no crescimento e propagação de fungos revelando-se essencial a manutenção correta e periódica destes equipamentos, diminuindo a contaminação fúngica neste microambiente. Mui e Shek (2005) verificaram, a partir dos resultados obtidos no seu estudo, que um dos fatores que influenciava a concentração de poluentes no ar interior estava associado ao sistema de ventilação artificial.

Mandal e Brandl (2011) referem que os fatores mais importantes que afetam a qualidade do ar interior são o sistema de ar condicionado, a ventilação e o número de ocupantes. O estudo desses mesmos fatores ajuda a prever a concentração interna de bioaerossóis. Uma forma eficaz de monitorizar a qualidade do ar é medir os indicadores da qualidade do ar, que devem ser representativos da qualidade real do ar, e permitir a facilidade na medição e interpretação dos resultados, a monitorização em tempo real, e a possibilidade de estabelecer medidas de rotina nos procedimentos de manutenção. Um desses indicadores de qualidade é o dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), indicando a eficácia do sistema de ventilação (Hamada e Fujita, 2002).

Os estudos realizados no âmbito da concentração de fungos no ar, em transportes públicos, abrangem vários continentes. Na Ásia foram efetuadas avaliações da concentração de fungos no ar nas estações de metro, e verificou-se que as concentrações fúngicas no ar foram superiores durante o período das horas de maior tráfego, quando em comparação com as horas mais calmas (Cho et al., 2006).

Relativamente à Europa, em Itália foram realizados estudos no âmbito da avaliação de fungos no ar viáveis em estações de metro, nomeadamente em duas estações da cidade de

Milão. A análise dos resultados obtidos indicou que os géneros com maior concentração no ar foram *Cladosporium* spp., *Penicillium* spp., *Epicoccum* spp. e *Alternaria* spp. (Picco e Rodolfi, 2000). Os géneros *Cladosporium* spp., *Penicillium* spp. e *Aspergillus* spp. também obtiveram uma frequência superior nas estações de metro da cidade de Cairo, no Egipto (Awad, 2002). Segundo Bogomolova e Kirtsideli (2009), os resultados obtidos no sistema ferroviário subterrâneo indicaram que os fungos com maior concentração foram do género *Aspergillus* spp., *Cladosporium* spp. e *Penicillium* spp.

Os autocarros públicos também englobam os autocarros escolares. Segundo Li et al. (2017), cerca de 25 milhões de crianças utilizam diariamente os autocarros escolares, e cerca de 20 milhões de indivíduos possuem asma e aproximadamente 50% têm asma alérgica. A exposição aos fungos do género *Alternaria* spp., *Cladosporium* spp. e *Aspergillus* spp., presentes no ar interior, conduzem ao aparecimento de alergias no ser humano. (Wang et al., 2013).

Determinados materiais como os têxteis presentes nas estruturas dos veículos e as superfícies do sistema de ventilação artificial podem contribuir para a exposição a fontes de bioaerossóis, sendo que Lee e Jo (2005) referem que os têxteis como os que revestem os assentos do autocarro podem contribuir para o aumento da exposição a microrganismos. Segundo Prakash et al. (2013) foram realizadas amostragens nas superfícies de autocarros, nomeadamente nos assentos do veículo, tendo sido possível isolar 27 espécies de fungos diferentes, pertencentes a 17 géneros. O género *Aspergillus* spp. foi representado pelo número máximo de espécies (8 espécies) seguido por *Penicillium* spp. (3 espécies). No entanto, é importante realçar o reduzido número de estudos incidentes nas amostragens de superfícies em transportes públicos.

O fluxo de ar inerente ao funcionamento do ar condicionado induz à dispersão dos bioaerossóis presentes no veículo, assim como permite a dispersão dos bioaerossóis presentes nos tecidos dos assentos e nas roupas dos ocupantes (Jo e Lee, 2008).

Existem diretrizes de qualidade do ar que servem de base na avaliação da QAI nos autocarros. Essas diretrizes mencionam o estabelecimento de um plano de ação por parte da organização, em que se compromete a alcançar e a manter a QAI, dando a conhecer esse plano a todos os funcionários pertencentes à empresa e à própria população. Compete, também, à organização a responsabilidade da manutenção dos veículos e da nomeação de um responsável pela qualidade do ar, a tempo total ou parcial, tendo este como

responsabilidade principal atuar na garantia da qualidade de ar dentro dos autocarros, executando ações de monitorização e de registo de reclamações inerentes à qualidade do ar (Environmental Protection Department, 2003).

A importância do estudo do nível de exposição aos contaminantes biológicos nestes locais recai para o impacto na saúde humana, tendo em conta que esta exposição induz o aparecimento de patologias, sendo fundamental contribuir para um microambiente seguro e saudável.

## 1.1 Enquadramento legal

Para garantir a QAI é necessário assegurar locais saudáveis e seguros para todos, através da realização de avaliações de risco e dos níveis de exposição, estabelecendo medidas corretivas e/ou de prevenção.

A elaboração da presente investigação teve como suporte a legislação aplicável aos vários domínios descritos ao longo do trabalho, sendo mencionados de seguida.

Relativamente à área de Segurança e Saúde no Trabalho, a **Lei 3/2014 de 28 de janeiro** procede à segunda alteração à Lei n.º 102/2009, de 10 de setembro, que aprova o regime jurídico da promoção da segurança e saúde no trabalho, e à segunda alteração ao Decreto-Lei n.º 116/97, de 12 de maio, que transpõe para a ordem jurídica interna a Diretiva n.º 93/103/CE, do Conselho, de 23 de novembro, relativa às prescrições mínimas de segurança e saúde no trabalho a bordo dos navios de pesca.

No que diz respeito aos agentes biológicos, foi analisado o **Decreto-Lei n.º 84/97 de 16 de abril**, que Transpõe para a ordem jurídica interna as Diretivas do Conselho n.º 90/679/CEE, de 26 de Novembro, e 93/88/CEE, de 12 de Outubro, e a Diretiva n.º 95/30/CE, da Comissão, de 30 de Junho, relativas à proteção da segurança e saúde dos trabalhadores contra os riscos resultantes da exposição a agentes biológicos durante o trabalho.

Relativamente à exposição a agentes biológicos e aos processos de análise laboratorial, destaca-se a **Portaria 353-A/2013 de 4 de dezembro** onde são estabelecidos os valores mínimos de caudal de ar novo no espaço, as condições de referência para os poluentes do ar interior e ainda os são definidos os valores de referência relativos aos agentes biológicos

(bactérias, *Legionella* spp. e fungos). A realização das recolhas de amostras de ar e respetiva análise teve como base a versão 1.0 da Metodologia de avaliação da qualidade do ar interior em edifícios de comércio e serviços no âmbito desta portaria.

Foram, também, analisados os seguintes documentos: a **Portaria 405/98 de 11 de julho**, que aprova a classificação dos agentes biológicos, e onde é apresentada uma lista de classificação nos grupos 2,3 e 4 relativamente a fungos, parasitas, bactérias e vírus; a **EN 13098:2000** relativa à uniformização de processos no que respeita à avaliação de bactérias e fungos; a **NP EN ISO/IEC 17025:2005** – “*General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.*” e a **ISO 4822:2013** que abrange aos métodos de contagem de unidades formadoras de colónias a olho nu.

## 1.2 Objetivos do estudo

O presente estudo teve como objetivos quantificar os fungos viáveis no ar e nas superfícies; avaliar a influência de parâmetros como o número de ocupantes, a temperatura do ar e a ventilação na concentração de fungos; avaliar a existência da influência das estações do ano (inverno e primavera) nas concentrações obtidas; avaliar a influência dos procedimentos de higiene implementados em 20 autocarros na concentração de fungos presentes nas superfícies; identificar as espécies de fungos amostradas no ar e nas superfícies.

Por último, tendo em conta a importância desta temática para a saúde humana, destaca-se o papel de Técnico Superior de Segurança e Saúde no Trabalho, através da proposta de medidas que atuem na minimização da exposição de todos os ocupantes a fungos potencialmente patogénicos.

## **CAPÍTULO II – Materiais e Métodos**

### **2.1 Tipo de estudo**

A realização do presente trabalho incidiu num estudo descritivo, tendo sido quantificadas e identificadas as espécies de fungos presentes no ar e nas superfícies de autocarros do tipo “*standart*”.

### **2.2 Caracterização da Amostra**

O presente estudo ocorreu nos autocarros públicos que abrangem a cidade do Porto. Os transportes coletivos na cidade do Porto remontam ao ano de 1872, quando a “Companhia Carril Americano do Porto” iniciou a sua exploração em Portugal.

A importância da prestação de um serviço de transporte público urbano de passageiros na Área Metropolitana do Porto, em associação com os restantes operadores rodoviários, ferroviário e de metro, é um dos principais focos desta empresa, proporcionando a fácil mobilidade dos cidadãos, sendo uma opção competitiva ao transporte individual, contribuindo para a redução das problemáticas ambientais e sociais.

A empresa abrange cinco tipos de autocarros distintos – *standart*, minibus, de dois pisos, articulados e elétricos. As amostragens deste estudo foram realizadas nos autocarros tipo *standart*, apresentado na Figura 1, pois este é o tipo de veículo com maior representatividade na cidade do porto, encontrando-se nas quatro distintas linhas de circulação presentes na cidade – linhas circulares, de periferia, radiais e diametrais – que abrangem diversos trajetos, desde as zonas históricas da cidade às zonas de periferia. Desta forma, as rotas realizadas pelo tipo *standart* permite abranger locais como hospitais, escolas, bairros sociais e praias, diferindo estes nas suas características, podendo ter influência na presença microbiana no interior do autocarro.



Figura 1 - Autocarro tipo *standart*

(Fonte: <http://www.stcp.pt/pt/institucional/stcp/frota/autocarros-standard/>)

O presente estudo foi realizado na cidade do Porto, e primeiramente foi selecionado o tipo de autocarro a ser utilizado. São cinco o tipo de autocarros existentes na cidade do Porto – *standart*, minibus, de dois pisos, articulados e elétricos – tendo a escolha recaído para os autocarros *standart*. Esta escolha derivou do facto do tipo *standart* ser o mais representativo, estando presente em todas as linhas de circulação existentes na área urbana do Porto – linhas circulares, de periferia, radiais e diamétrais – que englobam trajetos distintos, assim como abrangem zonas da cidade que diferem entre si no que diz respeito ao clima (zonas perto de praias, por exemplo) e a locais importantes da cidade, como escolas, hospitais, lares, bairros sociais.

Relativamente à estrutura do autocarro *standart*, este possui uma capacidade máxima de 83 passageiros, sendo 34 lugares sentados e 49 lugares de pé. Possuem um sistema de ventilação e um sistema de ar condicionado, ambos controlados pelo motorista, e 9 janelas. Destes dois sistemas, o de ventilação é o mais utilizado.

No que respeita à avaliação das características no momento da realização das amostragens, elaborou-se uma lista de verificação em forma de tabela, como ferramenta, onde se registaram informações importantes no momento das amostragens, que ajudaram a compreender as concentrações de fungos encontradas. Registaram-se informações quanto ao número de placas recolhidas, o número de janelas abertas, a temperatura do ar, a ventilação, o sistema de ar condicionado e a variação do número de ocupantes do veículo, referentes às

viagens de ida 1 e de ida 2, assim como às viagens de volta 1 e de volta 2. Esta lista de verificação encontra-se nos Anexos.

O presente estudo engloba um total de 21 autocarros, realizando variados trajetos pela cidade do Porto, desde o centro até à periferia. No total, foram realizadas 41 viagens, sendo 21 viagens de ida e 20 viagens de volta.

## 2.3 Procedimento e instrumentação

### ii.iii.i Amostras de ar

Em cada uma das viagens, foram realizadas duas amostragens de recolhas de ar para o volume de 250 L, e os seus respetivos duplicados em cada viagem de ida, e duas amostragens de recolha de ar de 250 L para cada viagem de volta. O mesmo processo foi realizado para o volume de 100 L.

No final das 41 viagens realizadas, o número de placas de fungos foi de 108. O número de placas de fungos puros foi de 80, 77 pertencentes ao ar e 3 pertencentes às superfícies, das quais fazem parte varões verticais, corrimões horizontais e assentos, após a repicagem das colónias. O número de placas disponíveis sofreu uma alteração significativa, tendo em conta a necessidade de descartar as placas que não se encontravam viáveis e que poderiam encontrar-se contaminadas pela água ou pela presença de cristais de gelo.

Este descarte deveu-se ao facto do armazenamento das placas no frigorífico a aproximadamente 4 °C ter sido prolongado durante o período de 5 meses – de janeiro a maio – e, como consequência, algumas destas placas adquiriram gelo. Desta forma, após o processo de descarte das placas não viáveis e após o isolamento para assegurar a pureza das mesmas, restaram 68 placas de fungos puros, das quais 66 pertenciam ao ar e 2 pertenciam às superfícies.

O processo de amostragens realizou-se de 24 de janeiro a 4 de maio de 2017, de modo a abranger duas estações do ano, nomeadamente inverno e primavera. Contudo, em determinados dias de primavera registaram-se temperaturas demasiado elevadas para a época em questão, como por exemplo 28 °C no dia 11 de abril, assumindo características de verão, o que tornou a avaliação deste parâmetro inconclusivo. Deste modo, realizou-se a

avaliação da temperatura do ar no dia das amostragens, avaliando a existência de uma possível relação deste parâmetro com as concentrações de fungos encontradas no ar.

Relativamente às amostragens, estas foram realizadas em autocarros cujo início de trajeto começava na garagem, em direção à primeira paragem. Como tal, estes tinham sido higienizados durante o período da noite para se encontrarem preparados a iniciar o seu percurso estabelecido.

As recolhas de amostras de superfícies foram realizadas em dois momentos distintos: no início do percurso, ainda na garagem, anteriormente à entrada de passageiros, e no fim da viagem. Esta distinção foi realizada com objetivo de permitir averiguar o possível impacto dos ocupantes na contaminação das superfícies analisadas.

No que diz respeito às recolhas de amostras de ar, estas foram realizadas no início da viagem de ida e no final da mesma viagem, uma amostragem no início da viagem de volta e outra no final da mesma viagem, juntamente com os seus duplicados. Importa referir que as recolhas de amostras de ar foram realizadas sempre na presença de ocupantes de forma a averiguar qual o impacto do número de ocupantes na contaminação do ar.

As colheitas de amostras de fungos no ar foram realizadas no meio de cultura RBCA, em duplicado, tendo em conta que deve existir pelo menos um branco em cada 10 amostras. A colheita é geralmente efetuada por impacto direto em meio semi-sólido com recurso a um equipamento de filtração de ar que deve possuir calibração válida. O tempo de colheita (t) é selecionado de forma manual, sendo V o volume de colheita pretendido.

Em cada viagem nos autocarros *standart*, foi preenchida a lista de verificação, elaborada para este propósito, de forma a auxiliar na perceção da influência de alguns critérios na concentração dos fungos encontrados. Este documento, presente nos Anexos, inclui os seguintes itens de análise: o dia da amostragem, linha de circulação do autocarro, número de janelas abertas/fechadas, sistema de ventilação ligado/desligado, sistema de ar condicionado ligado/desligado, indicações meteorológicas no momento da avaliação, número de ocupantes nas viagens de ida e de volta, e o número de amostras recolhidas de RBCA.

Para realizar a colheita das amostras de ar foi utilizado o amostrador *Merck Air Sampler MAS-100 MERCK*, apresentado na Figura 2, de acordo com o método NIOSH 0800. O volume de ar e o tempo de amostragem devem ser otimizados e definidos de acordo com a contaminação espetável do ambiente em estudo. Deste modo, foram realizadas recolhas de

amostras piloto para definir o volume de ar aspirado, sendo este de 250 litros durante 2 min e de 100 litros durante 1 min.



Figura 2 – Amostrador *Merck Air Sampler MAS-100 MERCK*

Para a obtenção de amostras de ar representativas do ambiente interior do autocarro, foi necessário analisar qual o espaço mais adequado para a colocação do equipamento MAS-100 MERCK, tendo também em consideração não interferir no habitual funcionamento do veículo, assim como no conforto dos ocupantes. Desta forma, o equipamento foi colocado no espaço contíguo à última fila de assentos do autocarro, existindo estabilidade para o equipamento.

#### ii.iii.ii Amostras de superfícies

Para a realização de amostragens nas superfícies do autocarro recorreu-se ao método de zaragatoa, seguido de espalhamento direto na própria placa com o meio de cultura RBCA.

Inicialmente, foi utilizado o método de zaragatoa, realizando a amostragem com a zaragatoa e posteriormente colocando-a num tubo contendo a solução isotónica de Ringer. Dado que os resultados obtidos em laboratório, após as respetivas diluições, não foram coerentes, recorreu-se ao método de utilização de zaragatoas em seco, realizando o esfregão na superfície e posteriormente o riscado direto na placa de Petri.

Para garantir a representatividade nas amostras de superfícies, estas recolhas foram realizadas nos pontos onde era esperado que os passageiros do autocarro utilizem com maior frequência. Foram então recolhidas amostras nos dois varões verticais junto às portas de entrada e nos dois varões junto à saída de passageiros, assim como no corrimão lateral em frente à porta de saída e nos bancos dos últimos lugares do veículo.

Após a obtenção das amostras estas foram transportadas devidamente numa mala térmica até ao laboratório da Escola Superior de Saúde do Porto, local onde foram armazenadas na estufa, seguindo os critérios de temperatura e tempo para o crescimento de fungos – 25 °C durante 7 dias, seguindo a EN 13098: 2000.

De forma a avaliar os parâmetros de temperatura e de humidade presentes no interior do veículo, foi estipulado a utilização do equipamento de leitura direta IAQ-CALCTM – modelo 8762. No entanto, a dificuldade de manusear dois equipamentos num espaço confinado, assim como a própria instabilidade dos trajetos realizados, não permitiram a utilização deste equipamento. Desde modo, para obter os valores de temperatura do ar que se faziam sentir no momento das avaliações recorreu-se a um termómetro digital, com um erro associado de aproximadamente 2 °C.

## 2.4 Análise laboratorial

Após a incubação das amostras de fungos referentes ao ar e às superfícies, pelo tempo e temperatura necessárias ao seu crescimento, procedeu-se à contagem das colónias. Esta contagem realizou-se a olho nu, sendo o valor máximo obtido > 300 UFC's, de acordo com as metodologias descritas na norma ISO 4822:2013 e na EN 13098:2000 e foram apresentadas em unidades formadoras de colónias por cada metro cúbico de ar (UFC/m<sup>3</sup>).

### ii.iv.i Isolamento de culturas

Após a contagem das colónias mistas das placas, selecionaram-se as colónias mais comuns e procedeu-se ao seu isolamento através do Método de Riscado em placa, especificado na Figura 3, de forma a obter colónias puras – culturas que contém apenas um tipo de fungo – e viáveis que permitissem a sua futura identificação da espécie.

Este método é dos mais utilizados na área de microbiologia para o isolamento de colónias, pela sua facilidade de execução e rapidez (Sinogas et al., 2002). Primeiramente, com o recurso a uma ansa levada ao rubro, recolhe-se uma pequena porção da amostra pretendida, e esta é riscada na superfície do meio sólido RBCA. A ansa é levada ao rubro entre cada espalhamento. O objetivo do recurso a este método é o da obtenção de pelo menos uma

colónia isolada das restantes (Abelho, 2013) de forma a facilitar a sua posterior identificação. De seguida, as placas foram incubadas durante 7 dias a 25 °C.

As análises microbiológicas realizaram-se no laboratório de Saúde Ambiental da Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto, que recorre a metodologias avançadas e creditadas.

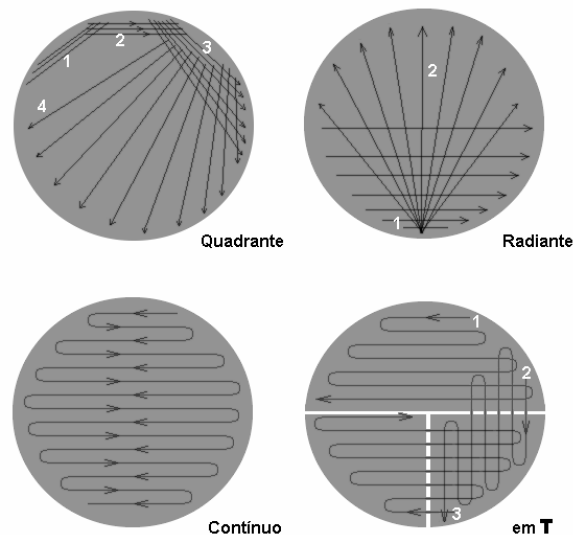


Figura 3- Exemplo de tipos de riscado em placa. Fonte: Sinogas et al. (2002)

## 2.5 Identificação das espécies

### ii.v.i Extração

Para realizar a extração de ADN dos fungos, utilizou-se o mesmo kit utilizado para extração de bactérias – E.Z.N.A. *Bacterial DNA kit*, seguiram-se as etapas do protocolo automatizado que pode ser consultado no capítulo dos Anexos. Este kit embora seja utilizado para extração de bactérias, devido à sua utilização para extração de fungos em trabalhos anteriores, e com bons resultados obtidos, foi utilizado neste caso (Girão, M., comunicação pessoal, 6 de julho, 2017).

Primeiramente, dentro da câmara de fluxo laminar, para assegurar as condições de assepsia, retirou-se uma porção significativa do fungo puro em placa com um ansa estéril e colocou-se em microtubos. Após este passo, seguiu-se o protocolo automatizado, apresentado em Anexos.

As especificações relativas ao kit utilizado para a extração de ADN, fabricado por *OMEGA bio-tek*, podem ser consultadas no site [omegabiotek.com](http://omegabiotek.com). O link de acesso encontra-se na Bibliografia.

### ii.v.ii. Reação em Cadeia Polimerase

Para obter a identificação das espécies recorreu-se à técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), após a extração do ADN dos fungos com o *E.Z.N.A Bacterial DNA KIT*.

Esta técnica é utilizada frequentemente pela sua rapidez e sensibilidade. É um ensaio enzimático simples, que permite a amplificação de um determinado fragmento de ADN específico de um complexo grupo de ADN. Para formar o produto de PCR, a ADN polimerase é a enzima que tem como papel ligar os nucleótidos – bases adenina, timina, citosina e guanina. Os primers utilizados são específicos para o fragmento de ADN que se pretende amplificar (Garibyan e Avashia, 2013).

Os elementos são posteriormente misturados num tubo de ensaio ou numa placa de 96 poços, e posteriormente é colocado num termociclador, durante cerca de 3 h. Neste equipamento, ocorrem ciclos repetitivos da amplificação de ADN, em quantidade suficiente para posteriormente ser possível de ser detetado.

Na primeira fase, durante a fase de desnaturação ocorre a separação das cadeias de ADN. Na segunda fase, a fase de ligação, sucede a ligação das sequências iniciadoras, os primers, às cadeias que contêm as sequências alvo. Por último, ocorre a extensão com a produção de novas cadeias de ADN complementar. Uma desvantagem da técnica de PCR incide na possibilidade de ocorrência de contaminação da amostra, o que podem induzir à obtenção de um resultado errado.

Os primers utilizados permitem a amplificação de apenas a porção de ADN que se pretende. Neste estudo, foram utilizados os primers específicos para fungos: ITS 1 e ITS 4, que amplificam o Gene ITS do rRNA. Este gene é considerado um marcador filogenético, sendo diferente em cada organismo, o que permite a sua identificação.

As temperaturas das diferentes fases que ocorrem no termociclador, já se encontram otimizadas, com exceção da temperatura de annealing que é regulada de acordo com os

primers utilizados. Neste caso, como foram utilizados os primers específicos para fungos, a temperatura de annealing situou-se nos 50 °C.

A mistura do PCR contém o primers ITS 1 e ITS 2, assim como água e Quiagen, composta por nucleótidos, uma solução tampão e polimerase.

As especificações relativas ao equipamento Termociclador, fabricado por *Applied Biosystems*, podem ser consultadas no site [thermofisher.com](http://thermofisher.com). O link de acesso encontra-se na Bibliografia.

Concluída esta etapa, procedeu-se à elaboração do gel de agarose, para utilizar na eletroforese, constituído por 1.4g de agarose, 100 ml de tampão TAE e 0.5 µl de syber safe, que irá permitir a visualização das bandas de ADN. O gel de agarose com uma concentração de 1.2% é constituído por 100 ml de tampão e 1.2g de agarose.

Para carregar o gel nos poços e proceder à realização da eletroforese, colocou-se 1.4 µl de corante azul de bromefol em cada espaço do suporte dos tubos, introduziu-se em cada um 3 µl de ADN e 3 µl da mistura em cada espaço. De seguida inseriu-se no primeiro poço do gel 3 µl de Ladder 1 kb, que é um marcador de tamanho, e deixou-se correr o gel a 150 mV durante 30 min.

A eletroforese é uma técnica analítica que necessita de passagem da corrente elétrica, do polo negativo para o polo positivo, sendo que esta diferença de potencial permite separar os fragmentos de ADN da amostra. Esta técnica encontra-se apresentada na figura 6.

Foi realizado um controlo negativo que não possui ADN e um controlo positivo. O controlo negativo efetuou-se com o objetivo de controlar as possíveis contaminações, sendo que no controlo positivo utilizou-se uma amostra que já se conhecia à *priori* o resultado como sendo o correto / expectável.

### ii.v.iii Ampliação das bandas de ADN e Sequenciação

Após a finalização da etapa da eletroforese, colocou-se o gel de agarose no equipamento BIO RAD Molecular Imager Gel Doc <sup>TM</sup> XR+ with Image Lab Software. Este passo possibilitou observar no computador, através de software específico, as bandas de ADN, analisando se estas amplificaram corretamente.

As especificações relativas ao equipamento BIO RAD Molecular Imager Gel Doc™ XR+ with Image Lab Software, fabricado por BIO-RAD, encontram-se disponíveis no site bio-rad.com. O link de acesso encontra-se na Bibliografia.

Posteriormente à amplificação das bandas de ADN, procedeu-se ao envio das amostras para um laboratório externo, com o objetivo de sequenciar e obter a identificação das espécies dos fungos analisados. Esta identificação permite estudar as características de cada espécie de fungos analisadas, e compreender quais os riscos para a saúde humana. Após a receção dos resultados do laboratório, recorreu-se ao programa *Geneous*, onde foi possível visualizar os eletroferogramas de cada fungo.

Todo o processo que envolveu extração de ADN e PCR foi realizado nas instalações do Laboratório ECOBIOTEC do Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental (Ciimar).

#### ii.v.iv Bases de dados utilizadas na identificação das espécies

As bases de dados utilizadas para confirmar os resultados das sequências de ADN obtidas e obter as percentagens de similaridade de identificação das espécies de fungos foram a Nucleotide Collection e *ISHAM ITS DATABASE*.

## 2.6 Análise Estatística

Para efetuar o tratamento dos resultados obtidos recorreu-se ao programa *Microsoft Excel* e o software *IBM SPSS*. A análise dos dados foi efetuada através de estatística descritiva, onde se realizou a análise de médias aritméticas.

No que diz respeito à distribuição das variáveis em estudo, foram realizados os testes à normalidade, através do teste *Kolmogorov-Smirnov*. As variáveis “concentrações de fungos no ar” nas viagens de ida e de volta, assim como a variável “número de ocupantes” seguiram uma distribuição normal, por outro lado, a variável “temperatura” não seguiu uma distribuição normal.

Desta forma, para as variáveis com distribuição normal foram aplicados testes paramétricos, tendo sido utilizado o teste t para duas amostras emparelhadas, para verificar se existiam

diferenças significativas entre as concentrações de fungos no ar nas viagens de ida e nas viagens de volta.

Por outro lado, foi utilizado o teste de correlação de *Pearson*, de forma a verificar se existia uma correlação entre as variáveis “concentrações de fungos no ar” e “número de ocupantes”, com um nível de significância de  $\alpha = 0.05$ . De acordo com Cohen (1988), foi considerada uma correlação fraca com valores entre [0.10, 0.30], uma correlação moderada entre [0,30 e 0,50] e uma correlação forte com valores entre [0,50 e 1].

Como a variável “temperatura” não seguia a distribuição normal, foi aplicado o teste não paramétrico coeficiente de correlação de *Spearman*, com o intuito de analisar a existência de uma correlação entre esta variável e a variável “concentrações de fungos no ar”, com um nível de significância de  $\alpha = 0.05$ . De acordo com Higgins (2004), foi considerada uma correlação positiva se  $r > +1$ , uma correlação negativa se  $r = -1$ , e uma correlação nula se  $r = 0$ .

## CAPÍTULO III – Apresentação de Resultados e Discussão

### 3.1 Concentrações de fungos no ar

No decorrer das 41 viagens realizadas recolheu-se um total de 108 placas mistas incluindo as amostras relativas ao ar e às superfícies. Na Figura 4 encontra-se apresentado um exemplo de uma placa mista relativa a uma amostragem de 250 L de ar após a contagem das UFC's.

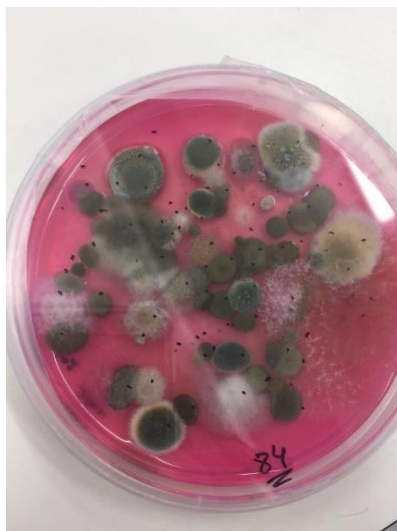


Figura 4 - Exemplo de uma placa mista de fungos

Com o objetivo de obter colónias puras, repicaram-se algumas colónias mistas e procedeu-se ao seu isolamento. Após este processo, obteve-se um total de 80 placas de fungos puros dos quais 77 placas pertencentes ao ar e 3 às superfícies. Ao longo do tempo foi necessário descartar placas por excesso de água, uma vez que poderia comprometer a qualidade dos resultados. Deste modo, o número total de placas com colónias puras e viáveis foi de 68 – 66 placas do ar e 2 das superfícies.

No decorrer das amostragens relativas ao ar observou-se que a temperatura do ar no decorrer dos 5 meses oscilou entre os 15 e 28 °C. Relativamente ao ar condicionado, este permaneceu quase sempre desligado com exceção de um dia, em que foi ligado pelo motorista. Relativamente à ventilação artificial esta foi ligada em 9 dos 21 dias de amostragens.

A Tabela 1 apresenta os resultados relativos às concentrações fúngicas obtidas, bem como o número de ocupantes correspondente em cada viagem de ida e de volta, assim como a temperatura registada no período de cada amostragem.

Monitorização e Identificação de Fungos no Interior de Transportes Públicos Coletivos na Região do Porto

Tabela 1 - Concentrações obtidas (UFC/m<sup>3</sup>), n.º de ocupantes em cada viagem e temperatura no dia das amostragens.

Estação do Ano	Mês	Dia	Concentração	Nº	Concentração	Nº	Concentração	Nº	Concentração	Nº	T. <sup>a</sup> (°C)
			(UFC/m <sup>3</sup> ) Ida 1	Ocupantes	(UFC/m <sup>3</sup> ) Ida 2	Ocupantes	(UFC/m <sup>3</sup> ) Volta 1	Ocupantes	(UFC/m <sup>3</sup> ) Volta 2	Ocupantes	
Inverno	Janeiro	1	72	12	98	20	43	18	87	19	-
Inverno	Janeiro	2	112	16	125	22	-	-	-	-	-
Inverno	Fevereiro	3	54	20	48	28	33	26	76	25	-
Inverno	Fevereiro	4	130	13	53	25	49	20	24	22	-
Inverno	Fevereiro	5	9	10	5	24	0	28	3	25	18
Primavera	Março	6	58	12	58	18	44	33	62	17	20
Primavera	Março	7	56	20	63	36	91	12	84	16	20
Primavera	Março	8	16	22	20	15	Erro MAS 100	15	Erro MAS 100	11	25
Primavera	Março	9	54	12	56	16	58	17	70	16	24
Primavera	Março	10	19	15	41	10	43	25	49	30	22
Primavera	Março	11	>100	15	188	33	63	27	31	18	22
Primavera	Março	12	55	19	53	20	25	21	9	23	15
Primavera	Março	13	76	10	137	22	52	30	55	17	17
Primavera	Março	14	37	15	135	26	46	22	118	13	20
Primavera	Abril	15	155	18	87	35	98	20	144	10	25
Primavera	Abril	16	>300	14	68	29	94	23	102	14	26
Primavera	Abril	17	42	12	4	8	1	3	6	6	28
Primavera	Abril	18	34	13	26	17	0	12	11	19	20

Monitorização e Identificação de Fungos no Interior de Transportes Públicos Coletivos na Região do Porto

Primavera	Abril	19	98	7	64	30	67	34	60	16	25
Primavera	Abril	20	9	17	72	3	57	18	68	20	21
Primavera	Maio	21	31	14	35	25	23	18	22	16	26

**Legenda:**

**Ida 1** – Amostragem realizada no início da viagem de ida

**Ida 2** – Amostragem realizada no final da viagem de ida

**Volta 1** – Amostragem realizada no início da viagem de volta

**Volta 2** – Amostragem realizada no final da viagem de volta

No inverno, nas viagens de ida as concentrações de fungos no ar variaram entre 5 a 130 UFC/m<sup>3</sup>; nas viagens de volta, o intervalo de concentrações variou entre 0 a 87 UFC/m<sup>3</sup>. Na primavera, nas viagens de ida as concentrações de fungos no ar variaram entre 4 a >300 UFC/m<sup>3</sup>; nas viagens de volta, o intervalo de concentrações variou entre 0 a 144 UFC/m<sup>3</sup>.

As viagens onde se verificaram concentrações mais elevadas ocorreram no dia 11, na viagem de ida 1, obtendo-se uma concentração > 100 UFC/m<sup>3</sup>; no dia 14, na viagem de ida 1, obteve-se uma concentração de 135 UFC/m<sup>3</sup>; no dia 15, na viagem de ida obteve-se a concentração de 155 UFC/m<sup>3</sup> e na viagem de volta 2 obteve-se a concentração de 144 UFC/m<sup>3</sup>. A maior concentração de fungos no ar contabilizada ocorreu no dia 16, na viagem de ida 1, cuja concentração foi > 300 UFC/m<sup>3</sup>.

Importa realçar que no dia 8, na viagem de volta 1 e de volta 2 não existem dados visto que o amostrador *Merck* MAS-100 não funcionou corretamente, tendo sido impossível realizar essas amostragens.

Analisando os dados obtidos nas concentrações dos 21 dias de amostragens, verifica-se que a concentração mais elevada de fungos no ar ocorreu no dia 16, ultrapassando o valor de 300 UFC/m<sup>3</sup>. Nesta viagem encontravam-se presentes 14 ocupantes. No dia 7, na viagem de ida, ocorreu o maior número de ocupantes e a concentração de fungos no ar situou-se nos 63 UFC/m<sup>3</sup>.

A análise estatística da concentração média de fungos no ar nas viagens de ida e nas de volta não demonstrou diferenças significativas ( $p = 0,099 > 0,05$ ).

Relativamente ao parâmetro “ocupantes”, no dia 4, na viagem de ida 1 obteve-se uma concentração de 130 UFC/m<sup>3</sup>, encontrando-se 13 ocupantes no autocarro. No entanto, verificou-se que na viagem de ida 2, do mesmo dia, a concentração de fungos foi menor - 53 UFC/m<sup>3</sup> - mas o número de ocupantes era superior – 25 ocupantes. A análise a estes resultados do dia 4 não permite aferir que um número superior de ocupantes possua influência direta na concentração de fungos no ar. O mesmo resultado se verifica no dia 20, em que na viagem 1 a concentração de fungos no ar situou-se nos 9 UFC/m<sup>3</sup>, na presença de 17 passageiros e na viagem de ida 2 a concentração de fungos foi superior, sendo de 72 UFC/m<sup>3</sup>, na presença de 13 passageiros.

No dia 5, na viagem de volta 1, não foi contabilizado qualquer fungo na placa, no entanto encontravam-se 28 ocupantes no veículo. No dia 18, para a viagem de volta 1 também não existiu crescimento de fungos, estando presentes 12 ocupantes.

Na análise estatística das concentrações de fungos no ar nas viagens de ida e o número de ocupantes nas viagens de ida verificou-se uma correlação moderada entre estas duas variáveis ( $r = 0,399$ ;  $p = 0,073$ ). As concentrações de fungos no ar nas viagens de volta e o número de ocupantes nas viagens de volta, foram analisadas estatisticamente, verificando-se uma correlação fraca entre estas duas variáveis ( $r = 0,181$ ;  $p = 0,433$ ).

Um dos parâmetros avaliados foi a temperatura do ar, registada em todas as viagens. Verificou-se que as temperaturas medidas foram elevadas para a estação do ano correspondente – inverno e primavera, uma vez que existiram medições de temperatura elevadas para a altura no ano, nomeadamente 28 °C na viagem do dia 17, não sendo uma temperatura esperada na estação da primavera. Este facto dificultou averiguar uma possível associação entre a estação do ano e a concentração obtida de fungos no ar. Sendo assim, o objetivo incidiu na análise da possível relação entre a temperatura do ar e a concentração de fungos no ar para a estação do ano em análise.

No dia 12 registou-se a temperatura mais baixa de todo o estudo (15 °C) e as concentrações foram de 55 e 53 UFC/m<sup>3</sup>, nas viagens de ida 1 e ida 2, respetivamente. A temperatura mais elevada foi registada no dia 17, com 28 °C, e as concentrações foram significativamente mais baixas, sendo que na viagem de ida 1 obteve-se 42 UFC/m<sup>3</sup> e na viagem de ida 2 apenas 4 UFC/m<sup>3</sup>. No mesmo dia, a concentração de fungos no ar para a viagem de volta 1 foi de 1 UFC/m<sup>3</sup> e de 6 UFC/m<sup>3</sup> para a volta 2. Estes resultados podem indicar que o aumento da temperatura não contribuiu para um aumento da concentração de fungos no ar.

Tendo em análise os dados do dia 17, em que se obteve a temperatura mais elevada de todo o estudo e a concentração mais baixa de ocupantes no interior do autocarro, uma possível explicação recai para o facto de ter abrangido o período de férias da páscoa, verificando-se um número mais reduzido de passageiros nos transportes públicos.

Foi analisada estatisticamente a possível correlação entre a temperatura e a concentração de fungos no ar nas viagens de ida e nas de volta. No que diz respeito às viagens de ida, na análise destes dois parâmetros, verificou-se uma correlação nula ( $r = 0,46$ ). No mesmo processo para as viagens de volta, os resultados indicaram uma correlação nula ( $r = 0,93$ ).

Segundo um estudo de Kawasaki (2010) e analisando os dados de duas estações de metro A e B (A – estação com plataformas subterrâneas e à superfície e B – estação com plataforma à superfície), na estação A a concentração de fungos no ar foi superior na estação do outono, onde se verificou um nível superior de humidade relativa.

Xu e Hao (2017) realizaram um estudo onde verificaram a influência das estações do ano na concentração de fungos no ar, tendo existido um aumento de concentração de mais de 3 vezes nas estações da primavera e verão, e uma diminuição por mais de duas vezes no outono e no inverno. Normalmente, as concentrações de fungos no ar são maiores no verão do que no inverno (Wang et al., 2010).

As concentrações médias de fungos em UFC/m<sup>3</sup> no ar inerentes ao inverno encontram-se apresentadas na Figura 5 e as concentrações médias de fungos em UFC/m<sup>3</sup> no ar na estação da primavera encontram-se apresentadas na Figura 6.

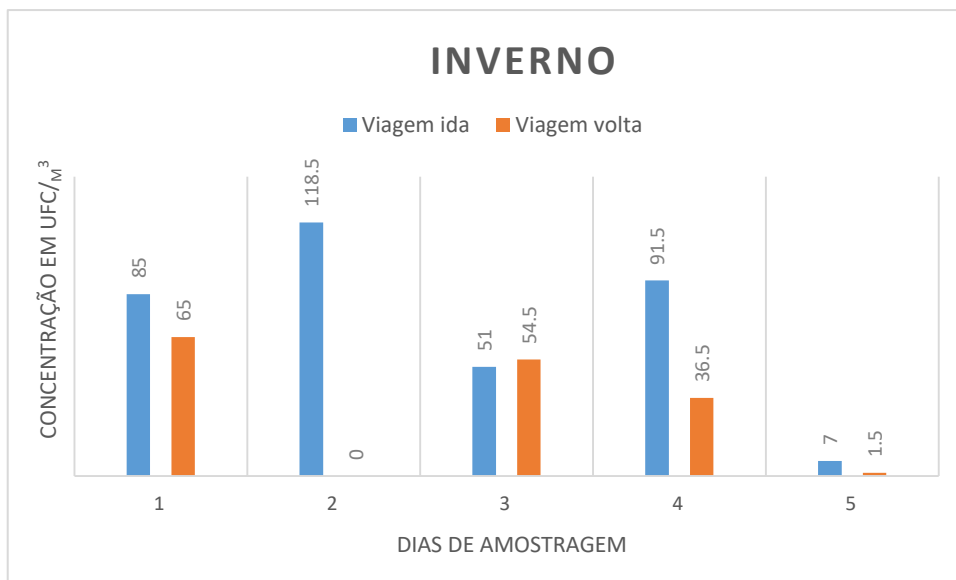


Figura 5 - Média da concentração de fungos em UFC/m<sup>3</sup> nas viagens de ida e de volta realizadas no inverno

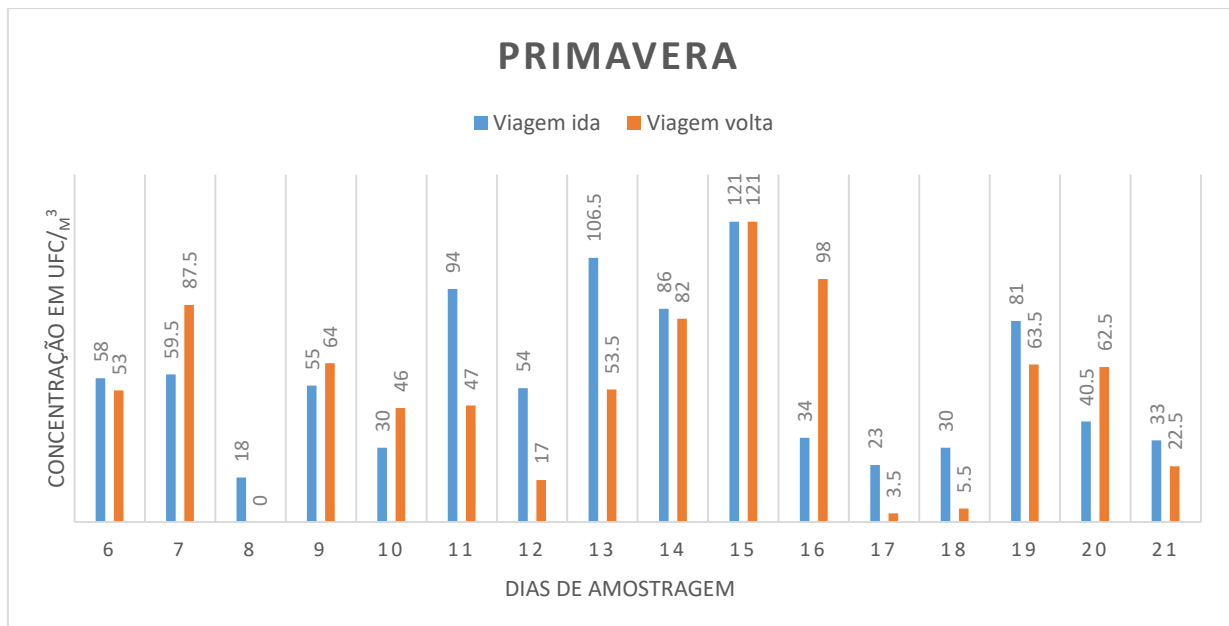


Figura 6 - Média da concentração de fungos em UFC/m<sup>3</sup> nas viagens de ida e de volta realizadas na primavera

Não foi possível estabelecer uma relação clara entre as estações do ano/ temperatura ambiente e a concentração de fungos. No entanto, são vários os estudos que conseguiram associar a temperatura e as estações do ano com o crescimento de fungos no ar interior. Nas estações do ano os fatores principais incidem na temperatura e na humidade relativa (Orosa e Oliveira, 2011).

No que respeita ao outro parâmetro avaliado no presente estudo, como o sistema de ar condicionado, este foi ligado apenas uma vez pelo motorista, não sendo utilizado nas restantes viagens. Relativamente ao sistema de ventilação artificial foi ligada em 9 dias, favorecendo a renovação e circulação do ar interior.

Uma variável que pode ter impacto na avaliação da qualidade do ar interior é a ventilação natural do veículo. Foram registadas o número de janelas abertas em todas as amostragens, de forma a perceber a influência deste parâmetro na concentração de fungos no ar. Nos 21 dias de amostragens, não foi aberta nenhuma janela em 12 viagens, estando apenas o sistema de ventilação artificial ligado.

Efetuada uma comparação entre as concentrações obtidas nas amostragens referentes a estes dois dias, verifica-se que no dia 14, só com a presença de ventilação artificial, as concentrações de fungos foram menores – na viagem de ida 1 obteve-se 37 UFC/m<sup>3</sup>, na ida

2 foi de 135 UFC/m<sup>3</sup> e na viagem de volta 1 obteve-se 46 UFC/m<sup>3</sup> e 118 UFC/m<sup>3</sup> na viagem de volta 2. Era expectável que no dia 15, devido à existência de uma janela aberta e da consequente ventilação natural do espaço, em associação com a ventilação artificial ligada, as concentrações de fungos no ar fossem menores do que as obtidas no dia 14. No entanto, tal não se verificou, sendo que na viagem de ida 1 contabilizou-se 155 UFC/m<sup>3</sup>, na ida 2 obteve-se 87 UFC/m<sup>3</sup>, na viagem de volta 1 contabilizou-se 98 UFC/m<sup>3</sup> e na viagem de volta 2 situou-se nos 144 UFC/m<sup>3</sup>.

Segundo Jo e Lee (2008) a utilização da ventilação no interior do veículo, nomeadamente a artificial, permitem a renovação do ar e a consequente dispersão dos contaminantes aéreos. Neste caso, a abertura da janela não originou uma redução da concentração de microrganismos no ar. Uma possível explicação para este facto recai para a importância que a qualidade do ar exterior tem na qualidade do ar interior, aumentando a carga microbiana no autocarro, através da circulação dos poluentes do ar exterior para o ar interior.

A utilização de ventilação natural nos autocarros públicos pode ser executada através da abertura das janelas existentes. Wang et al. (2013) referem uma menor concentração de fungos no ar quando as janelas se encontram fechadas, mas o sistema de ar condicionado ligado.

O sistema de ventilação artificial deve ter cuidados específicos, como uma manutenção periódica do equipamento e dos filtros, pela possibilidade de crescimento de microrganismos nestes equipamentos. A presença de humidade que rodeia o ar condicionado, assim como a que se encontra no interior do equipamento, contribui para o aumento da concentração de fungos e consequente contaminação do ar. Hamada e Fujita (2002) referem que as espécies fúngicas mais frequentes nos filtros de ar condicionado são do género *Cladosporium* e *Penicillium*.

A ventilação artificial é um dos fatores que possui um impacto direto na concentração e dispersão dos bioaerossóis, assim como a temperatura, a humidade relativa e o número de ocupantes (Youn et al., 2010).

Segundo o estudo de Vollaroa et al. (2014), foi possível observar que alterações na estrutura do autocarro, nomeadamente na utilização de vidros de melhor desempenho, espuma isolante e tinta refletora, permitiram reduzir a absorção da luz solar, o que se traduziu numa menor utilização do sistema de ar condicionado na época do verão, sendo reduzido, também, o

desconforto dos passageiros com as temperaturas elevadas no interior do veículo. Esta poderia ser uma solução a ser implementada nos transportes coletivos nacionais.

Os parâmetros analisados neste estudo, de forma a averiguar possíveis associações com a concentração de fungos no ar, devem ser tidos em conta, de forma a controlar a concentração fúngica nestes transportes, utilizados por centenas de pessoas diariamente.

Uma deficiente qualidade do ar interior coloca em risco a saúde dos ocupantes, mas também dos próprios motoristas, que se encontram várias horas por dia a conduzir os autocarros. Compreende-se, assim, a necessidade de uma monitorização de todas as variáveis que proporcionem as condições para o crescimento e propagação de microrganismos.

De forma a reduzir a concentração de fungos no ar interior destes veículos, o foco principal recai para a correta monitorização de todos os equipamentos, especialmente do sistema de ventilação e do sistema de ar condicionado, garantindo o seu normal funcionamento e higienização periódica, assim como a manutenção frequente dos respetivos filtros.

### 3.2 Contaminação fúngica das superfícies

De forma a avaliar a concentração de fungos nas superfícies foram realizados esfregaços com zaragatoas em dois varões – junto à porta de entrada e junto à porta de saída dos passageiros, nas viagens de ida (quando ainda não tinha entrado nenhum ocupante), nos três varões nas viagens de volta – um junto à porta de entrada e dois junto a porta de saída – e ainda numa superfície, também realizada nas viagens de volta. Esta superfície variou entre o varão vertical junto à porta de saída, o varão horizontal em frente à porta de saída e ainda um banco localizado na parte traseira do veículo. A opção por esta superfície era executada no momento da amostragem, dependendo da lotação do autocarro. A realização destas amostragens deriva da literatura existente, cujos resultados apontaram o crescimento fúngico em superfícies (Youn et al., 2010).

Os resultados obtidos relativamente à contaminação das superfícies foram relevantes para verificar se nestes locais ocorria crescimento microbiano, e, se sim, quais as espécies de fungos encontradas nas várias superfícies avaliadas. Relativamente ao objetivo estabelecido baseado na avaliação da higienização dos veículos, este não foi possível averiguar, visto que seria necessário avaliar vários pontos, tais como o plano de higienização, os produtos de limpeza utilizados, a periodicidade da troca de filtros e respetiva manutenção do sistema de ventilação artificial, pontos estes a que não se obteve acesso, de forma a promover uma análise concreta deste parâmetro.

Relativamente às superfícies destes veículos, e de forma a reduzir a concentração de fungos, é essencial garantir uma correta desinfeção destas superfícies, com os produtos adequados para tal. Esta higienização é realizada no período da noite, sendo que o autocarro realiza os trajetos estipulados, sem existir uma higienização durante estes turnos. Tal facto induz à probabilidade de contaminação, uma vez que centenas de pessoas utilizam estes transportes e entram em contacto com as várias superfícies. A utilização de desinfetantes, a correta higienização e a aplicação de produtos mais eficazes, são opções válidas para a redução da concentração de fungos. Uma possível medida a ser implementada é a formação dos trabalhadores que executam a higienização e limpeza dos veículos, de forma a garantir que estes realizam esta tarefa da forma mais correta e eficaz.

### 3.3 Identificação das espécies

A segunda parte do estudo consistiu na identificação das espécies de fungos presentes no ar e nas superfícies. No que respeita à identificação das espécies encontradas, as 8 amostras em que se extraiu o ADN estão apresentadas na Tabela 2.

Às 8 amostras, foi atribuído a numeração de 2.2 a 2.9, correspondendo cada número ao código à frente apresentado. Os códigos são constituídos pela data de amostragem, seguida do número atribuído à colónia selecionada para isolamento, e a designação de AP para “Ar Puras” e de CSP para “Corrimão Superfície Puras”. Como exemplo: a amostra com o número 2.2 corresponde à amostra recolhida no dia “13/4”, o “2” corresponde ao número atribuído à colónia selecionada para ser efetuado o isolamento, e a sigla “AP” corresponde a “Ar Puras”.

Tabela 2 - Legenda das amostras no PCR e Primers específicos de fungos

Amostras		Primers
<b>2.2</b>	13/4 2 AP	ITS 1 ITS 4
<b>2.3</b>	2/3 CSP	
<b>2.4</b>	4/4 2 AP	
<b>2.5</b>	30/3 4 AP	
<b>2.6</b>	7/2 4 AP	
<b>2.7</b>	13/4 5 AP	
<b>2.8</b>	4/4 4 AP	
<b>2.9</b>	28/3 5 AP	

A constituição do PCR (1x) englobou 5µl de Kit – Qiagen, 1µl de Mix primers, 3µl de H<sub>2</sub>O, 1µl de Template (DNA), sendo o volume final de 10 µl. Relativamente à constituição do PCR (16x) este incluiu 80 µl de Kit – Qiagen, 16 µl de Mix primers, 48 µl de H<sub>2</sub>O, originando o volume final de 114 µl.

Foram efetuados 35 ciclos, diferenciando nas temperaturas e duração: 95 °C - 15min; 94 °C – 30s; 50 °C – 90 seg; 72 °C – 2 min e 72 °C - 10min.

Primeiramente foram analisados os resultados do PCR, tendo-se obtido 6 bandas de ADN amplificadas, que posteriormente foram enviadas para um laboratório externo, para sequenciar e obter a identificação das espécies, através do ADN destas. A juntar às 6 bandas de ADN amplificadas, duas bandas não amplificaram corretamente, nomeadamente as amostras 2.2 e 2.4, apresentadas na Figura 7. Este resultado pode ter ocorrido por inúmeras razões, tais como as seguintes: as amostras não se encontravam puras, a quantidade de ADN presente na amostra era reduzida ou excessiva, o microrganismo avaliado não era um fungo, algum erro numa das fases inerentes ao processo de PCR ou da extração de ADN.

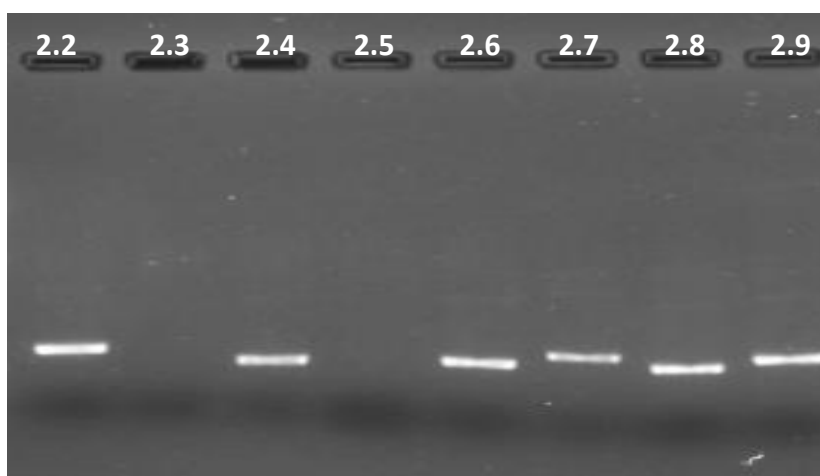


Figura 7 - Amplificação das bandas de ADN

Para reavaliar essas duas amostras cujas bandas não amplificaram e tentar obter uma explicação plausível, procedeu-se à realização de um segundo PCR com uma alteração: os primers utilizados foram os primers de bactérias, apresentados na Tabela 3. No entanto, os resultados da sequenciação demonstraram que não existiu uma amplificação da banda de ADN, ou seja, é possível descartar a hipótese de que essas duas amostras não tenham obtido um resultado positivo no primeiro PCR por não serem fungos.

Tabela 3 - Legenda das amostras que não amplificaram e primers específicos de bactérias

Amostras		Primers
3.8	13/4 2 AP	1492R e 27F
3.9	4/4 2 AP	

A constituição do PCR (1x) englobou 5µl de Kit – Qiagen, 1µl de Mix primers, 3µl de H<sub>2</sub>O, 1µl de Template (DNA), sendo o volume final de 10 µl. Relativamente à constituição do PCR (12x) este incluiu 60 µl de Kit – Qiagen, 12 µl de Mix primers, 36 µl de H<sub>2</sub>O, originando o volume final de 108 µl.

Foram realizados 30 ciclos, diferenciando nas temperaturas e na duração: 95 °C - 15min; 94 °C – 30s; 48 °C – 90 seg; 72 °C – 2 min e 72 °C - 10min.

A Tabela 4 a seguir apresentada exhibe as espécies de fungos encontradas tanto no ar como nas superfícies dos autocarros, às quais correspondem os códigos do PCR supramencionados nas Figuras anteriores.

Tabela 4 - Identificação das espécies

<b>Código PCR</b>	<b>Identificação Final</b>
<b>2.2</b>	<i>Epicoccum nigrum</i>
<b>2.3</b>	Falhou
<b>2.4</b>	<i>Cladosporium halotolerans</i>
<b>2.5</b>	Falhou
<b>2.6</b>	<i>Cryptococcus diffluens</i>
<b>2.7</b>	<i>Cladosporium tenuissimum</i>
<b>2.8</b>	<i>Alternaria infectoria</i>
<b>2.9</b>	<i>Alternaria tenuissima / Alternaria alternata</i>

Consultaram-se duas bases de dados diferentes de forma a obter níveis de identificação elevados, bem como percentagens de similaridade o mais concretas possível, que permitissem afirmar com o máximo nível de certeza a identificação da espécie encontrada. Estas espécies possuem diferentes origens, tanto ambiental como clínica, podendo ter impacto na saúde humana.

A Tabela 5 apresenta as percentagens de similaridade exatas relativas à identificação das espécies nas duas bases de dados consultadas, sendo estas *Nucleotide Collection e ISHAM ITS DATABASE*.

Tabela 5 - Percentagens de similaridade

<b>Espécie</b>	<b>Nucleotide Collection</b>	<b>ISHAM ITS DATABASE</b>
<i>Epicoccum nigrum</i>	100%	99,3%
<i>Cladosporium halotolerans</i>	100%	96,8%
<i>Cryptococcus diffluens</i>	100%	99,8%
<i>Cladosporium tenuissimum</i>	100%	98,3%
<i>Alternaria infectoria</i>	99%	99,5%
<i>Alternaria tenuissima</i> / <i>Alternaria alternata</i>	100%	100%

As bases de dados consultadas apresentaram então resultados de similaridade elevados, identificando seis espécies de fungos, nomeadamente: *Epicoccum nigrum*, *Cladosporium halotolerans*, *Cryptococcus diffluens*, *Cladosporium tenuissimum*, *Alternaria infectoria* e *Alternaria tenuissima* / *Alternaria alternata*.

Das 6 amostras de fungos que foram sequenciadas, apenas uma correspondia a uma amostragem realizada em superfícies, neste caso uma zaragatoa efetuada no corrimão junto à porta de saída do autocarro. A espécie *Epicoccum nigrum*, a primeira espécie identificada, apresentada na Figura 8, tem distribuição mundial, sendo associada principalmente a plantas (Pusz et al., 2015) e encontrada em frutas e legumes, como o pêsego e feijão e batatas. Por norma, afeta as sementes e grãos depois da colheita ou durante o armazenamento. Este é um fungo com capacidade para controlar biologicamente os agentes patogénicos que afetam as plantas, tendo um estilo de vida endofítico (Wilma et al., 2013).



Figura 8 - Amostra de *Epicoccum nigrum*

Mahadevakumar (2013) estudou a doença da mancha foliar causada por *E. nigrum* no feijão indiano *Lablab purpureus*, na Índia. No ano de 2010, começaram a surgir manchas foliares neste tipo de feijão, tendo esta doença afetado entre 40 e 80% em 130 hectares. Estas manchas caracterizam-se por serem de pequenas dimensões, na parte superior da folha.

Segundo Fávaro et al. (2012), através dos resultados do seu estudo, *E. nigrum* tem a capacidade de atuar no controlo biológico de fitopatógenos e na produção de metabolitos secundários, podendo ser aplicado na colheita da cana-de-açúcar, contribuindo para o aumento da biomassa do sistema radicular.

No que diz respeito à origem clínica, através de amostras recolhidas do ar interior e amostras de materiais de construção, foi verificado que o fungo *E. nigrum* colonizava nos seios nasais de quatro pacientes, causando a designada Sinusite Fúngica Alérgica. Esta espécie encontra-se associada à hipersensibilidade pneumonite em habitações com bolor (Noble et al., 1997),

Segundo o estudo de Bisht et al. (2002) cerca de 82% dos pacientes com sensibilidade a *E. nigrum* apresentam reatividade positiva da pele a outros fungos que também causam alergias do tipo I, no trato respiratório.

Como a sua origem é predominantemente ambiental/alimentar, o facto de estar presente numa superfície do autocarro sugere uma contaminação proveniente do exterior, através da entrada de ar pela janelas e portas e consequente deposição nesta superfície em análise, ou explicada pela presença de algum alimento contaminado por este fungo. Por outro lado, como existem estudos, anteriormente mencionados, que referem que *E. nigrum* causa Sinusite Fúngica Alérgica, a sua presença no veículo pode estar associada a um passageiro portador desta patologia.

A segunda espécie identificada foi *Cladosporium halotolerans*, apresentada na Figura 9. O estudo de Segers et al. (2016) verificou que o fungo *C. halotolerans* é mais resistente às mudanças de água disponível do que os fungos *Aspergillus niger* e *Penicillium rubens*. Esta espécie é considerada comum no interior nas habitações.

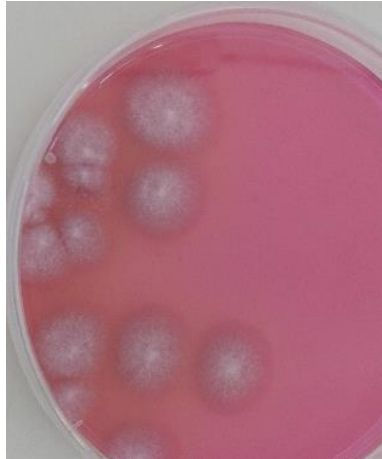


Figura 9 - Amostra de *Clasporium haloterans*

O número de estudos e de bases de dados relativos a *C. haloterans* são escassos, visto que só recentemente este foi separado de *Clasdosporium sphaerospermum* (Yang et al., 2016).

No que respeita à contaminação do ar, a espécie *C. haloterans* encontra-se associada a ambientes hipersalinos. A sua presença no ar interior do autocarro pode ter como possível explicação o facto de alguns trajetos abrangerem as zonas de praia da cidade do Porto, e a sua entrada ter ocorrido através da abertura de janelas e de portas.

A terceira espécie identificada foi *Cryptococcus diffluens*, apresentada na Figura 10, e é um fungo de origem ambiental que provoca lesões na pele, que podem ser resistentes a antibióticos, dificultando o tratamento dos pacientes.



Figura 10 - Amostra de *Cryptococcus diffluens*

Um estudo realizado por Kantarcioğlu et al. (2007) relatou a ocorrência de uma lesão designada por criptococose subcutânea, num jovem saudável. O estudo destas lesões permitiu verificar a associação com infeções associadas a *Cryptococcus*. Foi possível relacionar os trabalhos executados ao ar livre no deserto, pelo utente, com *C. diffluens*, embora seja mencionado que este fungo não possui, ainda, uma distribuição geográfica estabelecida, inerente ao reduzido número de isolados.

*C. diffluens* é considerado um agente infeccioso, sendo que uma possível explicação para a sua presença neste microambiente pode estar associada à presença humana de indivíduos portadores deste tipo de lesões.

A quarta espécie identificada foi *Cladosporium tenuissimum*, apresentada na Figura 11. Nam et al. (2015) realizaram um estudo incidente na morte da flor do morango, na Coreia, tendo verificado que um dos agentes patogénicos foi *C. tenuissimum*.



Figura 11 - Amostra de *Cladosporium tenuissimum*

Assante et al. (2004) estudaram as interações entre o fungo *C. tenuissimum* e o patogénico *Uromyces appendiculatus*, que afeta os feijoeiros. *C. tenuissimum* revelou ser capaz de controlar biologicamente a doença que afeta esta espécie de feijoeiro, produzindo metabolitos tóxicos, possuindo a capacidade de ser patogénico e de produzir compostos ativos que atuam contra a ferrugem que surge nos feijões.

A espécie *C. tenuissimum* tem origem ambiental, sendo considerada patogénica para plantas. Desta forma, a sua presença no ar interior do autocarro pode estar associada à entrada pela

ventilação natural no autocarro, nomeadamente pela abertura de janelas e de portas. Não existem estudos que relacionem esta espécie com impactos na saúde humana.

A quinta espécie identificada foi *Alternaria infectoria*, apresentada na Figura 12. No norte da Europa, a *A. infectoria* é o tipo de *Alternaria* predominantemente encontrada em cereais. As espécies de *Alternaria* produzem aproximadamente 125 metabolitos, muitas delas desempenhando um papel importante na patogénese das plantas. Por outro lado, diversos metabolitos tóxicos produzidos pelas espécies de *Alternaria* podem contaminar produtos alimentares e rações para animais (Ivanova et al., 2010).



Figura 12 - Amostra de *Alternaria infectoria*

A espécie *A. infectoria* tem origem ambiental - afeta principalmente as colheitas de trigo. No entanto, este fungo também é considerado patogénico para o ser humano, podendo causar uma infeção subcutânea e sistémica. As espécies de *Alternaria* têm sido associadas a infeções no ser humano. Segundo o estudo de Halaby et al. (2001), num paciente imunocomprometido foi relatada uma infeção fúngica causada por *A. infectoria*. As manifestações clínicas desta infeção abrangem desde lesões cutâneas locais às infeções invasivas e dispersas. A sua presença no interior do veículo pode estar associada quer ao ambiente exterior, transportando este fungo para o interior do veículo através da abertura das janelas/portas do autocarro, assim como à presença de passageiros portadores deste tipo de lesões causadas por esta espécie.

A sexta espécie identificada foi *Alternaria tenuissima* / *Alternaria alternata*, apresentada na Figura 13. A espécie *A. tenuissima* pode afetar a pele de pacientes imunocomprometidos, produzindo metabolitos tóxicos que podem colocar em risco o ser humano. No que diz

respeito às plantas, esta espécie é considerada um patógeno fúngico vegetal, afetando um grande número de espécies de plantas e de sementes. Por outro lado, a *A. tenuissima* tem a capacidade de interagir com os poluentes do meio ambiente, contribuindo para a sua degradação. Esta espécie consegue adaptar o seu crescimento e sobrevivência a diversas condições ambientais (Wan et al., 2008).



Figura 13 - Amostra de *Alternaria tenuissima* / *Alternaria alternata*

A espécie *A. tenuissima* é um fungo que se encontra com grande facilidade no meio ambiente, tendo um impacto negativo nas plantas e no ser humano, podendo causar doenças a ambos. Wan et al. (2008) refere, através dos resultados do seu estudo que *A. tenuissima* encontra-se diretamente associada ao fungo patógeno *Phaeosphaeria nodorum*, afetando as plantas. Wee et al. (2016) estudaram a mancha da folha em chokeberry preto, um arbusto de folhas resistentes a baixas temperaturas, e os resultados dos isolados demonstraram que o agente causal deste sintoma nas folhas era causado por *A. tenuissima*.

Um estudo realizado na Grécia, tendo por base colheitas de maçãs, verificou que os fungos que causam putrefação do núcleo desta fruta foram a *A. tenuissima* e *A. arborescens*, colocando em causa a produção de maçãs. A *Alternaria* spp. foi considerada o terceiro patógeno mais comum, encontrado nestas frutas. (Ntasiou et al., 2015).

No que diz respeito à espécie *Alternaria alternata*, foi relatado um caso em que esta espécie causou decomposição em tomates, afetando significativamente as colheitas desse fruto (Yang et al., 2016).

Landschoot et al. (2017) realizaram um estudo nos sintomas verificados em folhas de batatas e verificaram que a espécie *A. alternata* infeta as folhas da batata surgindo manchas de cor castanho-escura para, posteriormente, manchas de cor preta. Este fungo pode tornar-se resistente aos fungicidas, devido à sua aplicação frequente. A *A. alternata* tem um estilo de vida oportunista. Os resultados deste estudo apontam para a reduzida eficácia dos fungicidas utilizados no combate a este fungo nas batatas.

Castro et al. (2017) isolaram o fungo que causa doença no fruto *Hylocereus undatus* Haw, conhecida por pitaia vermelha, tendo identificado a espécie como *A. alternata*. Este fungo cresce na epiderme da papaia, desenvolvendo manchas circulares de cor castanha clara, com um halo castanho-escuro, podendo contribuir para a decomposição desta fruta, alterando a sua qualidade e consequente possibilidade de consumo para o ser humano.

Apesar da origem destas espécies ser ambiental, Pastor e Guarro (2008) referem que *A. alternata* foi identificada como agente causal em seis casos de lesões oculares, tendo também sido isolada em quatro casos de sinusite causada por fungos. Estes autores mencionam que embora a incidência de *Alternaria* spp. como agente causal de onicomicose seja reduzida, *A. alternata* foi isolada em 11 pacientes. Por último, Pastor e Guarro (2008) referem que a espécie *A. alternata* e *A. tenuissima* foram isoladas de lesões cutâneas e subcutâneas, nomeadamente de descamação da pele ou nódulos geralmente indolores. Compreende-se, assim, o impacto que esta espécie tem na saúde humana.

Devido à sua origem ambiental, uma possível explicação para a presença das espécies *A. tenuissima* / *A. alternata* é devido à sua presença no ar exterior, que aquando dos momentos de abertura de janelas para ventilação natural, ou de abertura de portas para entrada/saída de ocupantes, pode entrar para o veículo, permanecendo no ar interior. Por outro lado, a presença destas espécies no interior do veículo pode derivar da presença de indivíduos portadores de alguma destas patologias.

Tendo em conta os resultados obtidos na concentração e na identificação das espécies, torna-se fundamental elaborar medidas a implementar neste tipo de transportes públicos.

A avaliação da qualidade do ar interior em autocarros revela-se ainda mais importante tendo em conta o impacto na saúde humana da exposição a fungos, causando doenças alérgicas como a asma a rinite, irritações da pele, dos olhos e da boca. Os fungos possuem fragmentos

que conseguem penetrar no trato respiratório, e determinadas espécies produzem micotoxinas, podendo causar intoxicações graves em animais e em humanos.

Tendo em análise as espécies fúngicas encontradas no ar e nas superfícies, é importante estudar qual o impacto que estas espécies podem ter no meio ambiente e na saúde humana, e para tal, podem ser realizados testes/ensaios de patogenicidade. No entanto, no presente trabalho não foi realizada essa etapa.

Segundo Neno (2016), os testes de patogenicidade a fungos podem ser realizados através dos Postulados de Koch e de inoculações cruzadas. Estas inoculações permitem averiguar a patogenicidade dos isolados em estudo noutro hospedeiro. Goulart (2005) destaca três métodos que podem ser realizados nos testes laboratoriais: método do papel de filtro, método do papel de filtro com congelamento e método de incubação em Potato Dextrose Agar – PDA.

Para verificar a patogenicidade dos fungos isolados, podem ser utilizados dois métodos distintos de inoculação - através dos discos miceliais e de suspensões de esporos (Pinto, 2010).

## Conclusão

Os autocarros públicos são utilizados diariamente por uma parte significativa da população, proporcionando a acessibilidade a diferentes pontos da cidade.

Neste tipo de transporte, considerado um microambiente, os ocupantes podem encontrar-se expostos a agente biológicos, como os fungos. As espécies de fungos presentes no ar e nas superfícies podem acarretar diversos impactos na saúde humana, e deste facto compreende-se a necessidade da implementação de estudos da QAI nos autocarros.

Ao longo do presente estudo foram avaliados os parâmetros associados aos objetivos estabelecidos inicialmente. Relativamente à variável da temperatura, os resultados não permitiram verificar uma associação entre este parâmetro e a concentração de fungos presentes no ar.

No que diz respeito ao número de ocupantes os resultados obtidos não foram os esperados, tendo em conta que em viagens com maior número de ocupantes a concentração de fungos no ar não foi superior à concentração obtida em viagens com menor número de passageiros.

O parâmetro da ventilação natural através da abertura de uma janela, não demonstrou uma influência na concentração fúngica no ar. É importante realçar, também, que apenas numa viagem foi aberta uma janela, encontrando-se fechadas nas restantes amostragens.

Relativamente à avaliação da influência sazonal – inverno e primavera – na contaminação de fungos no ar, não foi possível verificar uma possível associação. As temperaturas medidas nestas duas estações não sofreram uma variabilidade significativa, dificultando a análise dos resultados obtidos. Por outro lado, importa referir que das 21 viagens realizadas nos autocarros, 5 pertenciam à estação de inverno e as restantes 16 à estação da primavera.

O destaque dos objetivos estabelecidos recai para a identificação das espécies de fungos, nomeadamente cinco espécies pertencentes às amostragens de fungos no ar e uma espécie relativa à amostragem de superfícies. O cumprimento deste objetivo possibilitou caracterizar estas seis espécies, conhecendo a sua origem e possível impacto na saúde humana.

A presença humana neste microambiente contribui para a contaminação do interior do autocarro, principalmente das superfícies. Por outro lado, as espécies de fungos cuja origem é ambiental indicam a sua possível presença no exterior deste microambiente, mas que

através da ventilação natural, da abertura das janelas e da utilização das portas do veículo, conseguem penetrar neste microambiente. Para atuar no controlo destes dois fatores mencionados, e de forma a garantir uma redução da contaminação interior, é essencial uma correta higienização das superfícies de todo o veículo, optando por produtos eficazes e apropriados à atividade.

Ao longo do presente estudo, surgiram algumas limitações que dificultaram os objetivos inicialmente estabelecidos. Destaca-se não ter sido possível avaliar os parâmetros da temperatura do ar e da humidade relativa com o equipamento IAQ-CALC TM- Modelo 8762; a impossibilidade de analisar o impacto das estações do ano inverno e primavera na concentração de fungos, tendo em conta que o clima e as temperaturas medidos não correspondiam ao expectável para a estação do ano em estudo.

Analisando a legislação em vigor na QAI, designadamente o Decreto-lei 118/2013 de 20 de agosto e à Portaria n. 353-A/2013 de 4 de dezembro, referentes ao cumprimento dos valores limite de exposição, uma das limitações encontradas foi a não realização de avaliações relativas à qualidade do ar exterior, impossibilitando a comparação com os resultados obtidos na qualidade do ar interior do veículo. Esta avaliação teria sido relevante tendo em análise a influência que a qualidade do ar exterior possui na QAI.

Torna-se importante que se seguissem as medidas mencionadas em Diretrizes e Normas relativas à qualidade do ar nos autocarros, de forma a tornar estes veículos seguros para os usuários, sendo efetuadas as manutenções necessárias e periódicas.

Além de seguir as Diretrizes estabelecidas para a qualidade do ar, e de assegurar uma correta e eficaz monitorização, manutenção e limpeza do veículo, a organização deve ter em conta ações de sensibilização, junto dos seus usuários, que permitam reduzir o risco de contaminações do ar interior e de propagação de doenças infecciosas.

Na época que abrange os meses de inverno, é de esperar que surja um aumento substancial do número de indivíduos portadores do vírus da gripe. Tendo em atenção o volume de passageiros diários que recorrem a este transporte, é necessário elaborar medidas que visem estabelecer comportamentos de prevenção, de forma a proteger os passageiros expostos, diminuindo a probabilidade de transmissão do vírus (SteelFisher et al., 2012).

As ações preventivas a implementar podem incidir na colocação de cartazes nas paragens de autocarros, com imagens que captem a atenção do indivíduo, e com frases simples

direcionadas para os comportamentos a ter, tais como: não espirrar ou tossir sem proteger a boca/nariz, utilizando os braços à frente da face, optando por proteger quem os rodeia. É também importante chamar a atenção para a não colocação das mãos nas superfícies, como assentos/varões, caso o indivíduo utilize a mão à frente da face quando tosse/espirra. Estas ações permitem reduzir o risco de contaminação do ar interior e das próprias superfícies do autocarro.

Além dos cartazes afixados nas paragens dos autocarros, a organização também pode optar por colocar informações básicas no interior do veículo, quer em formato papel, quer no painel eletrónico, situado na entrada do autocarro. O incentivo à vacinação, como forma de autoproteção, também pode ser uma forma útil de sensibilizar os usuários para esta temática. Ao longo do ano podem surgir outras questões relacionadas com a saúde pública, como vírus e doenças, predominantes da época em questão ou não, e cabe aos responsáveis da organização elaborar medidas preventivas que atuem na sensibilização e proteção dos passageiros, salvaguardando a saúde da população, assim como a qualidade do ar interior dos autocarros.

## **Trabalhos futuros**

Como propostas de trabalhos futuros sugere-se realizar o presente estudo no período de um ano, de forma a abranger as quatro estações do ano, aumentando a probabilidade da avaliação da influência sazonal na concentração de fungos no ar. Seria, também, interessante a realização deste estudo nouro tipo de transportes públicos, nomeadamente no Metro e nos Comboios, de forma a efetuar a comparação dos níveis de concentração de fungos no ar e nas superfícies.

Relativamente aos autocarros, uma das propostas recai para o estudo da influência das diferentes rotas e horários efetuados. De forma a avaliar a influência da qualidade do ar exterior na QAI do veículo, propõe-se uma avaliação da qualidade do ar exterior.

Por último, sugere-se a realização de testes de patogenicidade das espécies de fungos encontrados quer no ar quer nas superfícies dos autocarros.

## Referências Bibliográficas

- Abelho, M. (2011). Protocolos de Microbiologia Ambiental. *Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Coimbra*. Obtido de [http://www.esac.pt/Abelho/MicroAmbiental/Protocolos%5B3%5D\\_2011\\_2012.pdf](http://www.esac.pt/Abelho/MicroAmbiental/Protocolos%5B3%5D_2011_2012.pdf).
- Andersen, B., Krøger, E., & Roberts, R. G. (2002). Chemical and morphological segregation of *Alternaria arborescens*, *A. infectoria* and *A. tenuissima* species-groups. *Mycological Research*, *106*(2), 170-182.
- Andersen, B., Sørensen, J. L., Nielsen, K. F., van den Ende, B. G., & de Hoog, S. (2009). A polyphasic approach to the taxonomy of the *Alternaria infectoria* species-group. *Fungal Genetics and Biology*, *46*(9), 642-656.
- Assante, G., Maffi, D., Saracchi, M., Farina, G., Moricca, S., & Ragazzi, A. (2004). Histological studies on the mycoparasitism of *Cladosporium tenuissimum* on urediniospores of *Uromyces appendiculatus*. *Mycological research*, *108*(2), 170-182.
- Awad, A. H. A. (2002). Environmental study in subway metro stations in Cairo, Egypt. *Journal of Occupational Health*, *44*(2), 112-118.
- BIO-RAD. Molecular Imager Gel Doc XR + System with image lab software. Consultado em 8 de dezembro de 2017. Disponível em <http://www.bio-rad.com/en-us/sku/1708195-molecular-imager-gel-doc-xr-system-with-image-lab-software>.
- Bisht, V., Singh, B. P., Arora, N., Gaur, S. N., & Sridhara, S. (2002). Antigenic and allergenic cross-reactivity of *Epicoccum nigrum* with other fungi. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, *89*(3), 285-291.
- Bogomolova, E., & Kirtsideli, I. (2009). Airborne fungi in four stations of the St. Petersburg Underground railway system. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *63*(2), 156-160.
- Cabral, J. P. (2010). Can we use indoor fungi as bioindicators of indoor air quality? Historical perspectives and open questions. *Science of the total environment*, *408*(20), 4285-4295.
- Castro, J. C., Endo, E. H., de Souza, M. R., Zanqueta, E. B., Polonio, J. C., Pamphile, J. A., Ueda-Nakamura, T., Nakamura, C. V., Filho, B. P. D. & Filho, B. A. A. (2017). Bioactivity of essential oils in the control of *Alternaria alternata* in dragon fruit (*Hylocereus undatus* Haw. *Industrial Crops and Products*, *97*, 101-109.
- Chao, H. J., Schwartz, J., Milton, D. K., & Burge, H. A. (2002). Populations and determinants of airborne fungi in large office buildings. *Environmental health perspectives*, *110*(8), 777.
- Cohen, J. (1988). The effect size. *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences*, 77-83. Retrieved from <http://ci.nii.ac.jp/naid/10025197088/>

Eloy, M., & Cruz, L. (2008). A new bacterial disease of carnation in Portugal caused by *Burkholderia andropogonis*. *Revista de Ciências Agrárias*, 31(2), 89-95.

Environmental Protection Department (2003). Practice Note for Managing Air Quality in Air conditioned Public Transport Facilities. *Buses*. Consultado em 19 de janeiro. Disponível em:

[http://www.epd.gov.hk/epd/sites/default/files/epd/english/resources\\_pub/publications/files/pn03\\_1\\_txt.pdf](http://www.epd.gov.hk/epd/sites/default/files/epd/english/resources_pub/publications/files/pn03_1_txt.pdf)

Favaro, L. C. L., Sebastianes, F. L. C., & Araújo, W. L. (2012). *Epicoecum nigrum* P16, a sugarcane endophyte, produces antifungal compounds and induces root growth. *PLoS One*, 7(6), e36826.

Garibyan, L., & Avashia, N. (2013). Research techniques made simple: polymerase chain reaction (PCR). *The Journal of investigative dermatology*, 133(3), e6.

Gómez-Perales, J. E., Colvile, R. N., Fernández-Bremauntz, A. A., Gutiérrez-Avedoy, V., Páramo-Figueroa, V. H., Blanco-Jiménez, S., López, E. B., Bernabé-Cabanillas, R., Mandujano, F., Hidalgo-Navarro, M., Nieuwenhuijsen, M.J. (2007). Bus, minibús, metro inter-comparison of commuters' exposure to air pollution in Mexico City. *Atmospheric Environment*, 41(4), 890-901.

Goulart, A. C. P. (2005). Fungos em sementes de soja: detecção, importância e controle. *Embrapa Agropecuária Oeste-Livro técnico (INFOTECA-E)*.

Halaby, T., Boots, H., Vermeulen, A., van der Ven, A., Beguin, H., van Hooff, H., & Jacobs, J. (2001). Phaeohyphomycosis caused by *Alternaria infectoria* in a renal transplant recipient. *Journal of clinical microbiology*, 39(5), 1952-1955.

Hamada, N., & Fujita, T. (2002). Effect of air-conditioner on fungal contamination. *Atmospheric Environment*, 36(35), 5443-5448.

Hamada, S., Seike, Y., Tanimori, S., Sakamoto, T., & Kishida, M. (2011). Characterization of D-galacturonate reductase purified from the psychrophilic yeast species *Cryptococcus diffluens*. *Journal of bioscience and bioengineering*, 111(5), 518-521.

Hernández-Castillo, O., Mugica-Álvarez, V., Castañeda-Briones, M. T., Murcia, J. M., García-Franco, F., & Briseño, Y. F. (2014). Aerobiological study in the Mexico City subway system. *Aerobiologia*, 30(4), 357-367.

Higgins, J. H. (2004). *Introduction to Modern Nonparametric Statistics*. Thomson, Toronto

Hsu, D. J., & Huang, H. L. (2009). Concentrations of volatile organic compounds, carbon monoxide, carbon dioxide and particulate matter in buses on highways in Taiwan. *Atmospheric Environment*, 43(36), 5723-5730.

Ivanova, L., Petersen, D., & Uhlig, S. (2010). Phomenins and fatty acids from *Alternaria infectoria*. *Toxicon*, 55(6), 1107-1114.

- Jo, W. K., & Lee, J. H. (2008). Airborne fungal and bacterial levels associated with the use of automobile air conditioners or heaters, room air conditioners, and humidifiers. *Archives of environmental & occupational health*, 63(3), 101-107.
- Kantarcioğlu, A. S., Boekhout, T., Sybren De Hoog, G., Theelen, B., Yücel, A., Ekmekci, T. R., Fries, B.C., Ikeda, R., Koslu, A. & Altas, K. (2007). Subcutaneous cryptococcosis due to *Cryptococcus diffluens* in a patient with sporotrichoid lesions case report, features of the case isolate and in vitro antifungal susceptibilities. *Medical mycology*, 45(2), 173-181.
- Kawasaki, T., Kyotani, T., Ushiogi, T., Izumi, Y., Lee, H., & Hayakawa, T. (2010). Distribution and identification of airborne fungi in railway stations in Tokyo, Japan. *Journal of occupational health*, 52(3), 186-193.
- Kim, K. Y., Kim, Y. S., Kim, D., & Kim, H. T. (2011). Exposure level and distribution characteristics of airborne bacteria and fungi in Seoul metropolitan subway stations. *Industrial health*, 49(2), 242-248.
- Landschoot, S., Carrette, J., Vandecasteele, M., De Baets, B., Höfte, M., Audenaert, K., & Haesaert, G. (2017). Boscalid-resistance in *Alternaria alternata* and *Alternaria solani* populations: An emerging problem in Europe. *Crop Protection*, 92, 49-59.
- Lee, J. H., & Jo, W. K. (2005). Exposure to airborne fungi and bacteria while commuting in passenger cars and public buses. *Atmospheric Environment*, 39(38), 7342-7350.
- Li, F., Lee, E. S., Zhou, B., Liu, J., & Zhu, Y. (2017). Effects of the window openings on the micro-environmental condition in a school bus. *Atmospheric Environment*, 167, 434-443.
- Mahadevakumar, S., Jayaramaiah, K. M., & Janardhana, G. R. (2014). First report of leaf spot disease caused by *Epicoccum nigrum* on *Lablab purpureus* in India. *Plant Disease*, 98(2), 284-284.
- Mandal, J., & Brandl, H. (2011). Bioaerosols in indoor environment-a review with special reference to residential and occupational locations. *The Open Environmental & Biological Monitoring Journal*, 4(1).
- Marco, G., & Bo, X. (2013). Air quality legislation and standards in the European union: background, status and public participation. *Advances in Climate Change Research*, 4(1), 50-59.
- Monteiro, A., Miranda, A. I., Borrego, C., & Vautard, R. (2007). Air quality assessment for Portugal. *Science of the Total Environment*, 373(1), 22-31.
- Mui, K. W., & Shek, K. W. (2005). Influence of in-tunnel environment to in-bus air quality and thermal condition in Hong Kong. *Science of the total environment*, 347(1), 163-174.
- Nam, M. H., Park, M. S., Kim, H. S., Kim, T. I., & Kim, H. G. (2015). *Cladosporium cladosporioides* and *C. tenuissimum* cause blossom blight in strawberry in Korea. *Mycobiology*, 43(3), 354-359.

- Nasini, G., Arnone, A., Assante, G., Bava, A., Moricca, S., & Ragazzi, A. (2004). Secondary mould metabolites of *Cladosporium tenuissimum*, a hyperparasite of rust fungi. *Phytochemistry*, 65(14), 2107-2111.
- Neno, J. F. R. (2015). *Identificação e estudo de espécies de Botryosphaeria sp. em eucalipto e em montado de sobro*. (Dissertação de Mestrado não editada, Mestrado em Biologia Humana e Ambiente). Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, Lisboa.
- Noble, J. A., Crow, S. A., Ahearn, D. G., & Kuhn, F. A. (1997). Allergic fungal sinusitis in the southeastern USA: involvement of a new agent *Epicoccum nigrum* Ehrenb. ex Schlecht. 1824. *Journal of medical and veterinary mycology*, 35(6), 405-409.
- Ntasiou, P., Myresiotis, C., Konstantinou, S., Papadopoulou-Mourkidou, E., & Karaoglanidis, G. S. (2015). Identification, characterization and mycotoxigenic ability of *Alternaria* spp. causing core rot of apple fruit in Greece. *International journal of food microbiology*, 197, 22-29.
- Omega bio-tek (2017). E.Z.N.A bacterial DNA Kit. Consultado em 8 de dezembro de 2017. Disponível em <http://omegabiotek.com/store/wp-content/uploads/2013/04/D3350-Bacterial-DNA-Kit-Combo-Online.pdf>.
- Orosa, J. A., & Oliveira, A. C. (2012). An indoor air perception method to detect fungi growth in flats. *Expert Systems with Applications*, 39(3), 3740-3746.
- Pang, X., & Mu, Y. (2007). Characteristics of carbonyl compounds in public vehicles of Beijing city: concentrations, sources, and personal exposures. *Atmospheric Environment*, 41(9), 1819-1824.
- Pastor, F. J., & Guarro, J. (2008). *Alternaria* infections: laboratory diagnosis and relevant clinical features. *Clinical Microbiology and Infection*, 14(8), 734-746.
- Picco, A. M., & Rodolfi, M. (2000). Airborne fungi as biocontaminants at two Milan underground stations. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 45(1), 43-47.
- Pinto, P. S. G. C. (2010). *Doença de Petri da videira: avaliação da eficácia de fungicidas na protecção de feridas de poda*. (Dissertação de Mestrado não editada, Mestrado em Engenharia Agrónoma). Universidade Técnica de Lisboa, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa.
- Ponrahono, Z., Bachok, S., Ibrahim, M., & Osman, M. M. (2016). Assessing Passengers' Satisfaction Level on Bus Services in Selected Urban and Rural Centres of Peninsular Malaysia. *Procedia-Social and Behavioral Sciences*, 222, 837-844.
- Portnoy, J. M., Barnes, C. S., & Kennedy, K. (2004). Sampling for indoor fungi. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 113(2), 189-198.
- Portnoy, J. M., Kwak, K., Dowling, P., VanOsdol, T., & Barnes, C. (2005). Health effects of indoor fungi. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 94(3), 313-320.

- Prakash, N. K., Bhuvanewari, S., Kumar, M. R., Lankesh, S., & Rupesh, K. (2014). A Study on the Prevalence of Indoor Mycoflora in Air Conditioned Buses. *Br. Microbiol. Res. J.* 4(3):282–292
- Ruiz, M., Segui-Pons, J. M., & Mateu-LLadó, J. (2017). Improving Bus Service Levels and social equity through bus frequency modelling. *Journal of Transport Geography*, 58, 220-233.
- Sautour, M., Sixt, N., Dalle, F., L'Ollivier, C., Fourquenot, V., Calinon, C., Paul, K., Valvin, S., Maurel, A., Couillault, G., Cachia, C., Vagner, O., Cuisenier, B., Caillot, D. & Bonnin, A. (2009). Profiles and seasonal distribution of airborne fungi in indoor and outdoor environments at a French hospital. *Science of the total environment*, 407(12), 3766-3771.
- Segers, F. J., van Laarhoven, K. A., Huinink, H. P., Adan, O. C., Wösten, H. A., & Dijksterhuis, J. (2016). The indoor fungus *cladosporium halotolerans* survives humidity dynamics markedly better than *aspergillus niger* and *penicillium rubens* despite less growth at lowered steady-state water activity. *Applied and environmental microbiology*, 82(17), 5089-5098.
- Sinogas, C., Alho, L., & Brito, I. (2012). Bio0408-Microbiologia-Protocolos. *Universidade de Évora*.
- SteelFisher, G. K., Blendon, R. J., Ward, J. R., Rapoport, R., Kahn, E. B., & Kohl, K. S. (2012). Public response to the 2009 influenza A H1N1 pandemic: a polling study in five countries. *The Lancet infectious diseases*, 12(11), 845-850.
- Termo Fisher Scientific. Applied Biosystems Veriti. Thermal Cycler (2010). Consultado em 30 de agosto de 2017. Disponível em <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4375786>
- Versão Portuguesa da Norma Europeia 13306 (2010) “Terminologia da Manutenção”, Comité Europeu de Normalização (CEN).
- Vollaro, R. D. L., Evangelisti, L., Battista, G., Gori, P., Guattari, C., & Fanchiotti, A. (2014). Bus for urban public transport: Energy performance optimization. *Energy Procedia*, 45, 731-738.
- Wan, Y., Wang, X., Huang, Y., Qiu, D., & Jiang, L. (2008). Identification and characterization of cDNA sequences encoding the HIS3 and LEU2 genes of the fungus *Alternaria tenuissima*. *Journal of Genetics and Genomics*, 35(4), 251-256.
- Wang, Y. F., Tsai, C. H., Huang, Y. T., Chao, H. R., Tsou, T. C., Kuo, Y. M., Wang, L. C. & Chen, S. H. (2013). Size distribution of airborne fungi in vehicles under various driving conditions. *Archives of environmental & occupational health*, 68(2), 95-100.
- Wang, Y. F., Wang, C. H., & Hsu, K. L. (2010). Size and seasonal distributions of airborne bioaerosols in commuting trains. *Atmospheric environment*, 44(35), 4331-4338.

Wee, J. I., Park, J. H., Back, C. G., You, Y. H., & Chang, T. (2016). First report of leaf spot caused by *Alternaria tenuissima* on black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) in Korea. *Mycobiology*, *44*(3), 187-190.

Wilman, K., Stępień, Ł., Fabiańska, I., & Kachlicki, P. (2014). Plant-pathogenic fungi in seeds of different pea cultivars in Poland. *Archives Of Industrial Hygiene and Toxicology. The Journal of Institute for Medical Research and Occupational Health*, *65*(3), 329-338.

Xu, B., & Hao, J. (2017). Air quality inside subway metro indoor environment worldwide: A review. *Environment International*, *107*, 33-46.

Yang, J. W., Lien, S., Chou, Y. C., & Kirschner, R. (2016). *Cladosporium halotolerans*, a new record of an indoor fungus in Taiwan. *Fungal Science*, *31*, 1-6.

Yang, J., Sun, C., Zhang, Y., Fu, D., Zheng, X., & Yu, T. (2017). Induced resistance in tomato fruit by  $\gamma$ -aminobutyric acid for the control of alternaria rot caused by *Alternaria alternata*. *Food chemistry*, *221*, 1014-1020.

## **Anexos**

## Anexo I - Protocolo Automatizado - E.Z.N.A *Bacterial DNA Kit*

Inicialmente dentro da câmara de fluxo laminar, para assegurar as condições de assepsia, retirou-se uma boa porção de fungo puro em placa com uma ansa estéril e colocou-se dentro de *eppendorfs*. Após este passo, seguiu-se na íntegra o seguinte protocolo:

1. Centrifugar a 7000g, 5 minutos. Aspirar o sobrenadante;
2. Juntar 100 µl de *TE buffer* + 10 µl *Lysozima*. Incubar a 37°C, durante 30 minutos,
3. Juntar 25 mg de *glass beads*. Vortex 5 minutos na velocidade máxima;
4. Juntar 100 µl *TL buffer* + 20 µl Proteinase K. Incubar durante 1 hora a 55°C (misturar no vortéx a cada 20-30min);
5. Juntar 5 µl RNase, inverter os tubos e incubar a 65°C, 10 minutos;
6. Centrifugar a 10000g, 2 minutos e transferir o sobrenadante para um tubo novo;
7. Juntar 222 µl BL, levar ao vortéx. Incubar a 65°C, 10 minutos;
8. Juntar 220 µl EtOH. Vortéx 20 seg.;
9. Colocar as amostras no termociclador. Misturar com a pipeta se formar precipitado.
10. Centrifugar a 10000g, 1 minuto;
11. Inserir num tubo novo de 2 ml. Juntar 500 µl de *HBC buffer*. Centrifugar a 10000g, 1 minuto;
12. Descartar o excesso. Juntar 700 µl de *wash buffer*. Centrifugar a 10000g, 1 minuto e voltar a descartar o excesso;
13. Repetir o processo de lavagem;
14. Centrifugar a 14000g, 2 minutos para a coluna seca;
15. Colocar a coluna num tubo novo de 1,5 ml;
16. Adicionar 100 µl *elution buffer* (65°C). Incubar 4 minutos, at RT. Centrifugar 10000g, 1 minuto;
17. Repetir o processo

Anexo II – Registo das características no decorrer das amostragens

DATA	BUS	CLIMA EXTERIOR°C	N.º JANELAS ABERTAS	N.º AMOSTRAS RBCA	VENTILAÇÃO	A/C	VARIÇÃO N.º OCUPANTES			
							1001		2501	
24/jan	201	chuva	0	8	OFF	OFF	12	20	18	19
31/jan	201	chuva	0	8	ON	OFF	16	22		
07/fev	201	sol	0	10	OFF	OFF	20	28	26	25
14/fev	502	sol/chuva	0	10	OFF	OFF	13	25	20	22
21/fev	501	sol	0	10	OFF	ON	10	24	28	25
02/mar	208	encoberto ±20°C	0	4	OFF	OFF	12	18	33	17
07/mar	502	encoberto ±20°C	0	4	ON(*)	OFF	20	36	12	16
09/mar	504	sol ± 25°C	0	2	ON forte	OFF	22	15	0	
14/mar	501	sol ± 24°C	2	4	OFF	OFF	12	16	17	16
16/mar	601	sol ± 22°C	5	4	ON	OFF	15	10	25	30
21/mar	208	Sol ± 22°C	0	4	OFF	OFF	15	33	27	18
23/mar	208	chuva ± 15°C	0	4	ON	OFF	19	20	21	23
28/mar	501	sol ± 18°C	0	4	ON	OFF	10	22	30	17
30/mar	502	sol/nuvens	0	4	ON	OFF	15	26	22	13
04/abr	208	sol ± 23°C	1	4	ON	OFF	18	35	20	10
06/abr	907	sol ± 26°C	8	4	OFF	OFF	14	29	23	14
11/abr	501	sol ± 28°C	1	4	ON	OFF	12	8	3	6
13/abr	501	sol ± 20°C	0	4	OFF	OFF	13	17	12	19
18/abr	502	sol ± 25°C	2	4	OFF	OFF	7	30	34	16
27/abr	601	sol ± 21°C	2	4	OFF	OFF	17	3	18	20
04/mai	208	sol ± 26°C	1 (*)	4	ON	OFF	14	25	18	16