SHO 2018

International Symposium on
Occupational Safety
and Hygiene

Guimarães
Portugal

TECHNICAL RECORD
Title
International Symposium on Occupational Safety and Hygiene: Proceedings Book of the SHO2018
Authors/Editors
Arezes, P., Baptista, J.S., Barroso, M.P., Carneiro, P., Cordeiro, P., Costa, N., Melo, R., Miguel, A.S., Perestrelo, G.
Publisher
Portuguese Society of Occupational Safety and Hygiene (SPOSHO)
Press Company
Norprint Artes Gráficas
Date
March 2018
Cover Design and Pagination
Manuela Fernandes
ISBN
978-989-98203-8-8
Legal Deposit
370216/14
Edition
300 copies

FICHA TÉCNICA
Título
International Symposium on Occupational Safety and Hygiene: Proceedings Book of the SHO2018
Autores/Editores
Arezes, P., Baptista, J.S., Barroso, M.P., Carneiro, P., Cordeiro, P., Costa, N., Melo, R., Miguel, A.S., Perestrelo, G.
Editora
Sociedade Portuguesa de Segurança e Higiene Ocupacionais (SPOSHO)
Impressão e Acabamentos
Norprint Artes Gráficas
Data
Março de 2018
Design da capa e edição
Manuela Fernandes
ISBN
978-989-98203-8-8
Depósito Legal
370216/14
Tiragem
300 exemplares

This edition is published by the Portuguese Society of Occupational Safety and Hygiene - SPOSHO, 2018.

Portuguese National Library Cataloguing in Publication Data

International Symposium on Occupational Safety and Hygiene: Proceedings Book of the SHO2018
edited by Arezes, P., Baptista, J.S., Barroso, M.P., Carneiro, P., Cordeiro, P., Costa, N., Melo, R., Miguel, A.S., Perestrelo, G.
Includes biographical references and index.
ISBN 978-989-98203-8-8

1. Safety. 2. Hygiene. 3. Industrial. 4. Ergonomics. 5. Occupational.
Publisher: Sociedade Portuguesa de Segurança e HigieneOcupacionais (SPOSHO)
Occupational Safety Hygiene SHO Series
Book in 1 volume, 220 pages

This book contains information obtained from authentic sources.
Reasonable efforts have been made to publish reliable data information, but the authors, as well as the publisher, cannot assume responsibility for the validity of all materials or for the consequences of their use.
Neither this book nor any part may be reproduced or transmitted in any form or by any means, electronic or physical, including photocopying, microfilming, and recording, or by any information storage or retrieval system, without prior permission in writing from the SPOSHO Direction Board.

All rights reserved. Authorization to photocopy items for internal or personal use may be granted by SPOSHO.

Trademark Notice: Product or corporate names may be trademarks or registered trademarks, and are used only for identification and explanation, without intent to infringe.

SPOSHO
DPS, Campus de Azurém
4800 – 058 Guimarães, Portugal
Visit SPOSHO website at: http://www.sposho.pt

© 2018 by SPOSHO
ISBN 978-989-98203-8-8

Exposição Ocupacional a Fungos: um Estudo de Caso na Indústria Transformadora da Cortiça

Occupational Exposure to Fungi: A case study in the Cork Industry

Ricardo Rocha[1], Maria Paula Neves[1], Mariana Girão[2], M. Fátima Carvalho[2], Rui S. Oliveira[3] and Joana Santos[4]
[1]School of Health, Polytechnic Institute of Porto
[2]CIIMAR - Interdisciplinary Centre of Marine and Environmental Research
[3]School of Health, Polytechnic Institute of Porto; University of Coimbra
[4]School of Health, Polytechnic Institute of Porto

ABSTRACT
Occupational exposure to fungi in the cork industry is responsible for several respiratory problems and can be influenced by factors such as automation level of the production process, type of ventilation, storage conditions and cooking times of cork boards. Thus, the main objective of this study was to evaluated and identified fungal species existing in the air and surfaces of slicing and punching workplaces in cork small and medium-sized companies (SMEs). Air and surfaces samples were collected in five cork SMEs, included a total of eighteen workplaces. The collection of pure fungal colonies and their respective isolation was performed by plaque scoring technique, and DNA extraction, followed by the PCR technique and sequencing. The fungi identified were *Penicillium glabrum* and *Neurospora* spp. Improve the ventilation and storage conditions, as well as increase automation level of the production can reduce the risk of occupational exposure in SMEs.

KEYWORD: small and medium-sized companies, fungal contamination, exposure, slicing, punching

1. INTRODUÇÃO

Portugal possui a maior área do mundo de montado de sobro, sendo a cortiça (casca do sobreiro) um recurso aproveitado para transformação por 670 empresas, que empregam cerca de 9000 trabalhadores (APCOR, 2016). A indústria portuguesa da cortiça é dividida por quatro subsetores: a preparação das pranchas de cortiça, a transformação da prancha de cortiça numa rolha natural, a granulação e a aglomeração (CTC, 2001). A fabricação de rolhas de cortiça natural é a maior atividade das empresas da indústria transformadora de cortiça (APCOR, 2015). Os processos de rabaneação e brocagem são processos integrantes na indústria transformadora para a obtenção de uma rolha de cortiça natural (CTC, 2001; Figueiredo, Fernandes, Limpo, Gil, & Maurício, 2001).

A preocupação relacionada com a exposição dos trabalhadores a fungos e poeiras de cortiça durante os processos transformação da cortiça tem levado ao desenvolvimento de alguns estudos, ainda escassos, no sentido de quantificar e identificar espécies presentes no ar e superfícies destes ambientes de trabalho (Oliveira et al., 2003; Viegas, Faria, Sabino, & Gomes, 2015), e que podem levar ao desenvolvimento de doenças profissionais. Os géneros e espécies de fungos mais comuns nestes ambientes de trabalho são o *Penicillium* spp., *Mucor* spp., *Trichoderma* spp., *Cladosporium* spp., *Aspergilus glaucus* (CTC, 2001; Santos, Bragança, & Casimiro, 2005). A incidência de problemas respiratórios, como a Asma Ocupacional e a Suberose nos trabalhadores da indústria da cortiça é, geralmente, atribuída à dispersão e, consequente, inalação de esporos de bolor e poeiras de cortiça que pode ocorrer durante o corte das placas, após a fase de maturação da cortiça. A espécie *Penicillium glabrum* tem sido referida como responsável pela Suberose, que se manifesta como um Alveolite Alérgica Extrínseca (AAE) (Delgado et al., 1996).

O presente estudo teve como principal objetivo avaliar e analisar a exposição ocupacional a fungos em postos de trabalho de rabaneação e brocagem em pequenas e médias empresas do setor da indústria transformadora da cortiça.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 *Amostra*

O estudo desenvolvido foi aplicado em 5 indústrias transformadoras de cortiça do concelho de Santa Maria da Feira (Aveiro, Portugal). As medições foram realizadas entre o fim do mês de maio e o início do mês de junho de 2017. As amostragens foram realizadas nas tarefas de rabaneação e brocagem de cortiça, por serem os locais que produzem mais poeiras de cortiça (Basílio, Gaspar, Pereira, & San Romão, 2006; Winck & Delgado, 2000). No total foram avaliados 18 postos de trabalho das empresas em estudo correspondendo a 18 trabalhadores. Foram registadas as condições gerais das empresas e as condições relativas às características da cortiça, nomeadamente, a sua origem, o dia da sua cozedura, bem como o tempo e a temperatura.

2.2 *Instrumentação*

A colheita de ar para a quantificação de microrganismos foi realizada através do amostrador de ar MAS-100 da *Merck Millipore* (Alemanha). Os parâmetros térmicos foram recolhidos através do equipamento de leitura direta IAQ-CALCTM- Modelo 8762. Para a identificação molecular dos fungos foram usados os equipamentos: termociclador *Veriti*™ de 96 poços, PN 4375786 (EUA) na fase de PCR; para obter as imagens no gel de agarose da fase da eletroforese usou-se

o equipamento Gel Doc™ XR+ da *Bio Rad* (170-8195) (EUA).

2.3 *Amostragem e análise laboratorial*

As amostragens de ar para a quantificação de microrganismos viáveis tiveram por base o procedimento NIOSH n.º 0800. O volume de ar amostrado foi de 50 L e o meio de cultura utilizado foi *Rose Bengal Caf Agar* (RBCA). Após a seleção dos locais a avaliar, procedeu-se à monitorização da temperatura do ar e humidade relativa do ar. Para a amostragem das superfícies de trabalho dos postos de rabaneação e brocagem e das pranchas de cortiça colocadas junto a estes postos foram realizados esfregaços com uma zaragatoa estéril. As amostras foram depois transportadas para o laboratório e incubadas durante 5 dias a ± 25°C. Os parâmetros térmicos foram recolhidos a uma altura de 1.5±0.5m acima do chão, a uma distância de 0.5m da parede e estabilizado durante 5 minutos, junto aos postos de trabalho em estudo. Depois do período de incubação, procedeu-se à contagem das colónias e ao cálculo de UFC/m^3. Posteriormente, foram isoladas as colónias com morfologia mais frequente nas amostras de ar e superfícies. A identificação molecular dos fungos contemplou três fases principais, que são: extração do ADN; PCR; sequenciação. Retirou-se uma porção de uma colónia para extração do ADN usando o kit E.Z.N.A® Bacterial DNA Kit (WHR; Omega–Bio tek, modelo: D3350-02, EUA), seguido o protocolo do referido kit. Seguidamente, realizou-se a técnica de PCR com os *primers* específicos para fungos: ITS 1 e ITS 2. A última fase do procedimento de identificação dos fungos, as sequências obtidas foram comparadas com bases de dados de referência, para selecionar a sequência que se assemelhasse mais à obtida, e assim, aferir o género ou espécie do microrganismo analisado.

2.4 *Análise de dados*

No procedimento de análise e tratamento dos dados foram utilizados os programas Microsoft Excel e o *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) – versão 24.0. O tratamento e a análise dos dados envolveram estatística descritiva, com análise das médias aritméticas e desvios padrões.

3. RESULTADOS

A Tabela 1 apresenta as características estruturais gerais das empresas em estudo. Todas as empresas apresentavam apenas sistemas de ventilação natural. As concentrações de microrganismos no ar foram incontáveis na maioria das amostras, exceto, num posto de rabaneação da empresa E e no primeiro posto de brocagem da empresa C, com uma concentração de 7.6x10^3 UFC/m^3 e 3.3x10^3 UFC/m^3, respetivamente. Desta forma, não é possível estabelecer uma relação entre o tempo de espera da cortiça desde a sua cozedura até à sua laboração e a concentração de fungos no ar, uma vez que os resultados das concentrações de fungos no meio RBCA, foram todos incontáveis. A espécie *Penicillium glabrum* obteve uma percentagem de similaridade de 99.8%, enquanto que o género *Neurospora* spp. obteve 100% de similaridade, com as bases de dados de referência.

4. DISCUSSÃO

O movimento das pranchas de cortiça para a rabaneação e o movimento do traço para a sua brocagem pode representar uma causa para a dispersão de fungos durante as atividades de brocagem e rabaneação, promovendo a disseminação de esporos e de hifas de fungos (Barontini et al., 2014). Por outro lado, o estudo realizado por Oliveira et al. (2003), referente à análise da colonização de fungos ao longo do processo de fabricação de rolhas de cortiça, mostrou uma redução considerável na concentração de fungos entre o início do processo de fabricação de rolhas e o seu fim, devido à redução gradual de humidade na rolha de cortiça. A temperatura próxima dos 25°C e a humidade constituem fatores propícios ao crescimento de fungos (Lee & Liao, 2014).

Segundo Winck et al. (2004), a exposição dos corticeiros a fungos no seu local de trabalho pode induzir o desenvolvimento de suberose. Ambos os fungos identificados neste estudo foram também confirmados em quase todas as amostras do estudo de Prat, Ruiz-Rueda, et al., (2009). Basílio et al. (2006) refere que *P. glabrum* é identificado não só em pequenas empresas, mas também em grandes indústrias. Côté, Chan, Brochu, & Chan-Yeung (1991), revela que o desenvolvimento de asma ocupacional num trabalhador da indústria da madeira deveu-se à presença de fungos do género Neurospora spp.

Tabela 1 – Principais características de Segurança e Higiene no Trabalho das empresas

Parâmetros Verificados	Empresa				
	A	B	C	D	E
1. Ventilação	Natural	Natural	Natural	Natural	Natural
1.1. Conservação do estado da ventilação	Média	Boa	Média	Média	Boa
2. Tetos e paredes em bom estado de conservação	Sim	Sim	Sim	Não	Sim
3. Pavimentos em bom estado de conservação	Sim	Sim	Sim	Não	Sim
4. Variações de temperatura significativas	Não	Não	Não	Não	Não
5. Área de trabalho desobstruída	Sim	Sim	Sim	Não	Sim
6. Vias de circulação desimpedidas	Sim	Sim	Sim	Não	Sim
7. Serviços de Segurança e Saúde no Trabalho implementados	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim

5. CONCLUSÃO

O principal agente etiológico da suberose, *P. glabrum*, foi detetado em todos as empresas estudadas, pelo que os trabalhadores estão em risco de desenvolver esta pneumonite de hipersensibilidade e também asma ocupacional pela presença do género *Neurospora* spp.

Como trabalhos futuros seria essencial avaliar a exposição a agentes biológicos num maior número de PMEs, utilizando amostradores individuais.

6. AGRADECIMENTOS

R.S. Oliveira reconhece o apoio da Fundação para Ciência e Tecnologia (FCT) através da bolsa de pesquisa SFRH / BPD / 85008/2012, Fundo Social Europeu (FSE) e Programa Operacional do Capital Humano (POCH). M.F. Carvalho agradece o apoio do programa FCT, FSE e Programa Operacional do Potencial Humano (POPH) ao investigador.

7. REFERÊNCIAS

APCOR. (2015). Cortiça - Estudo de Caracterização Setorial - Estatísticas e Prospectiva. Santa Maria de Lamas; Aveiro. Obtido de http://www.apcor.pt/portfolio-posts/estudo-caracterizacao-sectorial-e-prospectivo-2015/

APCOR. (2016). APCOR - Anuário do Sector da Cortiça 2016. Santa Maria de Lamas; Aveiro. Obtido de http://www.apcor.pt/wp-content/uploads/2016/09/Boletim-estatistico-2016.pdf

Barontini, M., Crognale, S., Scarfone, A., Gallo, P., Gallucci, F., Petruccioli, M., … Pari, L. (2014). Airborne fungi in biofuel wood chip storage sites. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *90*, 17–22.

Basílio, M. C., Gaspar, R., Pereira, C. S., & San Romão, M. V. (2006). *Penicillium glabrum* cork colonising isolates - preliminary analysis of their genomic similarity. *Revista Iberoamericana de Micología*, *23*(3), 151–154.

Côté, J., Chan, H., Brochu, G., & Chan-Yeung, M. (1991). Occupational asthma caused by exposure to neurospora in a plywood factory worker. *British Journal of Industrial Medicine*, *48*(4), 279–282.

CTC. (2001). *Indústria da Cortiça: Manual de Prevenção* (1.ª ed.). IDICT.

Delgado, J. L., Winck, J. C., Sapage, J. M., Torres, S., Sá, J. M., & Torrinha, J. A. (1996). Anticorpos IgG para o *Penicillium frequentans* na Doença Respiratória dos Trabalhadores da Indústria da Cortiça (Suberose). Aplicação de um novo método de Doseamento Fluoro-Enzimo-Imunológico na sua quantificação. *Revista Portuguesa Imunoalergol*, *4*.

Figueiredo, J. M., Fernandes, V. R., Limpo, V., Gil, L., & Maurício, N. (2001). *Guia técnico : Indústria da cortiça*. Lisboa: INETI.

Lee, S.-A., & Liao, C.-H. (2014). Size-selective assessment of agricultural workers' personal exposure to airborne fungi and fungal fragments. *Science of the Total Environment*, *466–467*, 725–732.

Oliveira, A. C., Peres, C. M., Correia Pires, J. M., Silva Pereira, C., Vitorino, S., Figueiredo Marques, J. J., … San Romão, M. V. (2003). Cork stoppers industry: defining appropriate mould colonization. *Microbiological research*, *158*(2), 117–24.

Prat, C., Ruiz-Rueda, O., Trias, R., Anticó, E., Capone, D., Sefton, M., & Bañeras, L. (2009). Molecular fingerprinting by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis reveals differences in the levels of microbial diversity for musty-earthy tainted corks. *Applied and Environmental Microbiology*, *75*(7), 1922–1931.

Santos, M. N., Bragança, M. H., & Casimiro, P. P. (2005). Microrganismos Associados à Cortiça em Diferentes Fases da sua Fileira. *Silva Lusitana*, *13*(1), 75–93. 63522005000100004&lng=pt&tlng=pt

Winck, J. C., & Delgado, J. L. (2000). Suberose: mais do que uma pneumonite de hipersensibilidade…. *Revista Portuguesa de Pneumologia*, *6*(3), 195–204.

Winck, J. C., Delgado, J. L., Murta, R., Vanzeller, M., & Marques, J. A. (2004). Cork workers' occupational asthma: Lack of association with allergic sensitisation to fungi of the work environment. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, *77*(4), 296–300.

Viegas, C., Faria, T., Sabino, R., & Gomes, A. (2015). Potential pathogenic fungi assessment through molecular biology in cork industry. *SHO2015: International Symposium on Occupational Safety and Hygiene.*